

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1期(总第203期)

2024年2月25日出版

主管

上海科学院

主办

上海市实验动物学会
上海实验动物研究中心

编辑

《实验动物与比较医学》编辑委员会

主编

王健

执行主编

吴宝金

出版

《实验动物与比较医学》编辑部

地址: 上海市金科路3577号

邮编: 201203

电话: 021-50793657

E-mail: bjb50793657@163.com

网址: <http://www.slarc.org.cn/dwyx>

编辑部负责人

张俊彦

印刷

上海新开宝商务印刷有限公司

发行

上海市报刊发行局

范围: 国内公开发售

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

主编卷首语

守正创新, 努力提高本刊学术服务及引领能力

吴宝金, 王健 1

人类疾病动物模型

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)

中国研究型医院学会医学动物实验专家委员会 3

高原急性缺氧肠道应激损伤小鼠模型的构建与评价

郑建华, 法云智, 董巧燕, 邱业峰, 陈菁菁 31

Dmd基因突变小鼠构建及在肌肉及免疫系统的表型验证

梁敏, 郭洋, 王津津, 朱梦妍, 池骏, 陈艳娟, 王成稷,
喻智澜, 沈如凌 42

树鼩乳腺肿瘤模型的代谢组学分析

方茜, 敖青青, 李春宏, 欧阳轶强, 郭松超, 胡冰 52

新冠病毒感染转录组学数据及比较医学分析

冯婷婷, 李依桐, 吴玥, 王珏, 孔琪 62

围绝经期综合征动物模型的制备方法及其评价指标分析

梁天薇, 邓亚胜, 黄慧, 荣娜, 刘鑫, 王玉洁, 林江 74

实验动物设施及管理

清华大学实验动物中心小鼠自动饮水系统漏水情况统计分析

唐倩倩, 张秀莉, 常在 85

实验动物设施运行维护和保养模式探讨

黄跃, 董烨, 舒加乐 92

教学培训实践

不同麻醉通气方法在胸外科微创手术培训中的应用与比较

刘意抒, 赵善民, 蔡丽萍 97

比较医学研究与报告规范

《动物研究：体内实验报告》即ARRIVE 2.0指南的解释和阐述（五）

马政文，李夏莹，刘晓宇，李 焱，王 剑，卢 今，陈国元，卢 晓，白 玉，卢选成，刘永刚，
陶雨风，庞万勇 105

人文回忆

深切缅怀李厚达教授

薛整风，钱 莉，高 慧，宗卫峰，吴宝金，邢 华，贺争鸣，邵义祥，李劲松 115

科普讲坛

为什么要开展动物实验

孙 强 121

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
《实验动物与比较医学》第七届编辑委员会成员名单 英文目次后插页
《实验动物与比较医学》出版伦理声明 61
《实验动物与比较医学》2024年征订启事 73
书讯：电子实验手册《实验动物胚胎操作实验手册》正式发布 126
《实验动物与比较医学》稿约(2024年版) 附 I
广告 封二,前插1~7,后插1~8,封三,封底

期刊基本参数: CN 31-1954/Q*1981*b* 大 16*128*zh*P*¥ 30.00*2000*13*2024-02
(经方正字库授权,本刊使用字体包括方正雅宋系列、方正兰亭黑pro global系列、方正金陵系列、方正Capitolium系列)

本期责任编辑	丁玉强							
本期审稿专家	陆彩霞	包晶晶	陈民利	崔永春	丁玉强	富群华	罕园园	华孝挺
	黎 明	李 顺	李 焱	宋晓明	屠伟峰	王朝霞	王含必	王 健
	王守立	王爽洁	吴宝金	徐 平	姚 明	叶茂青	袁晓龙	张 周
	赵 静	周正宇	朱顺星	朱 焰	卓振建			
本期责任编辑	张俊彦	丁宇菁						
本期责任排版	王伟民							
本期特邀编校	富群华	陶启辰	刘晓宇	吴凌波				
本期实习编校	崔占鼎	郭家欣	李燕真	娄怡欣	陆佳雯	任益凡	王艳君	吴昊晟
	杨 悦	张 萍	周 培	周 烁				

LABORATORY ANIMAL AND COMPARATIVE MEDICINE

Bimonthly

Established in September, 1981 Volume 44, Issue 1

February 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, DING Yuqiang

CONTENTS IN BRIEF

Animal Models of Human Diseases

Guidelines for the Selection of Animal Models and Preclinical Drug Trials
for Spontaneous Intracerebral Hemorrhage (2024 Edition)

*Committee of Experts on Medical Animal Experiments, Chinese Research Hospital
Association* 3

Construction and Evaluation of a Mouse Model with Intestinal Injury by
Acute Hypoxic Stress in Plateau

ZHENG Jianhua, FA Yunzhi, DONG Qiaoyan, QIU Yefeng, CHEN Jingqing 31

Construction of *Dmd* Gene Mutant Mice and Phenotype Verification in
Muscle and Immune Systems

*LIANG Min, GUO Yang, WANG Jinjin, ZHU Mengyan, CHI Jun, CHEN Yanjuan,
WANG Chengji, YU Zhilan, SHEN Ruling* 42

Metabolomics Analysis of *Tupaia belangeri* Breast Tumor Model

FANG Xi, AO Qingqing, LI Chunhong, OUYANG Yiqiang, GUO Songchao, HU Bing
..... 52

Transcriptome Data and Comparative Medical Analysis of COVID-19 Virus
Infection

FENG Tingting, LI Yitong, WU Yue, WANG Jue, KONG Qi 62

Preparation Methods and Evaluation Criteria Analysis of Animal Models
for Perimenopausal Syndrome

*LIANG Tianwei, DENG Yasheng, HUANG Hui, RONG Na, LIU Xin, WANG Yujie,
LIN Jiang* 74

Facilities and Management for Laboratory Animals

Statistical Analysis of the Leakage Situation in the Automated Watering
System for Mice in Tsinghua University Laboratory Animal Resources
Center

TANG Qianqian, ZHANG Xiuli, CHANG Zai 85

Discussion on the Operation, Maintenance and Care Modes of Laboratory
Animals Facilities

HUANG Yue, DONG Ye, SHU Jiale 92

Educational and Teaching Practice

Application and Comparison of Different Anesthetic Ventilation Methods
in Minimally Invasive Thoracic Surgery Training

LIU Yishu, ZHAO Shanmin, CAI Liping 97

Guidelines for Comparative Medical Research and Reporting

Interpretation and Elaboration for the ARRIVE Guidelines 2.0—Animal
Research: Reporting *In Vivo* Experiments (V)

*MA Zhengwen, LI Xiying, LIU Xiaoyu, LI Yao, WANG Jian, LU Jin, CHEN Guoyuan,
LU Xiao, BAI Yu, LU Xuancheng, LIU Yonggang, TAO Yufeng, PANG Wanyong* 105

《实验动物与比较医学》第七届编辑委员会成员名单

特邀顾问

夏咸柱(军事科学院军事医学研究院)

顾问

褚芳(江西省职业病防治研究院)

高诚(上海实验动物研究中心)

顾为望(南方医科大学)

黄韧(广东省实验动物监测所)

肖杭(南京医科大学)

薛智谋(苏州大学)

周光兴(复旦大学)

名誉主编

李劲松(中国科学院分子细胞科学卓越创新中心)

主编

王健(上海市生物医药技术研究院)

执行主编

吴宝金(中国科学院分子细胞科学卓越创新中心)

副主编

陈洪岩(中国农业科学院哈尔滨兽医研究所)

陈学进(上海交通大学)

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)

刘恩岐(西安交通大学)

秦川(中国医学科学院医学实验动物研究所)

施标(上海市农业科学院生物技术研究所)

孙强(中国科学院脑科学与智能技术卓越创新中心)

徐平(上海吉辉实验动物饲养有限公司)

燕顺生(新疆维吾尔自治区疾病预防控制中心)

姚明(上海市肿瘤研究所)

张周(中国科学院上海药物研究所)

编委

艾志福(江西中医药大学)

常艳(上海益诺思生物技术股份有限公司)

常在(清华大学)

陈真(上海市第一康复医院)

陈国强(上海实验动物研究中心)

陈国元(中国科学院分子细胞科学卓越创新中心)

陈鸿军(中国农业科学院上海兽医研究所)

陈丽(安徽医科大学)

陈民利(浙江中医药大学)

崔东红(上海市精神卫生中心)

崔淑芳(海军军医大学)

戴建军(上海市农业科学院畜牧兽医研究所)

杜小燕(首都医科大学)

韩凌霞(北京维通利华实验动物技术有限公司)

何远清(中国医学科学院苏州系统医学研究院)

和占龙(中国医学科学院医学生物学研究所)

姜宝红(中国科学院上海药物研究所)

赖国旗(重庆医科大学)

冷颖(中国科学院上海药物研究所)

李善刚(昆明理工大学)

李文德(广东省实验动物监测所)

李垚(上海交通大学)

刘吉宏(上海开纯洁净室技术工程有限公司)

刘少英(四川省林业科学研究院)

刘向云(上海体育学院)

刘忠华(华南农业大学)

卢静(首都医科大学)

卢选成(中国疾病预防控制中心)

陆彩霞(中国医学科学院医学生物学研究所)

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)

潘登科(四川省医学科学院·四川省人民医院)

潘学营(上海益诺思生物技术股份有限公司)

庞万勇(赛诺菲全球研发中心)

庞晓斌(河南大学)

师长宏(空军军医大学)

施爱民(南京医科大学)

宋国华(山西医科大学)

宋晓明(杭州师范大学)

孙兆增(谱尼测试集团股份有限公司)

谭毅(重庆医科大学)

唐炜(中国科学院上海药物研究所)

唐利军(湖北省疾病预防控制中心)

唐元家(上海交通大学医学院附属仁济医院)

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)

王萧(广州中医药大学)

王朝霞(上海交通大学)

王德军(浙江中医药大学)

王建飞(安盟得医药科技有限公司)

王可洲(山东第一医科大学)

王胜昌(上海实验动物研究中心)

王玉娥(西南大学)

魏强(中国医学科学院医学实验动物研究所)

吴德国(中国科学院遗传与发育生物学研究所)

吴建辉(上海市生物医药技术研究院)

吴强(苏州苏净安发环境科技有限公司)

夏长友(中国农业科学院哈尔滨兽医研究所)

肖君华(东华大学生物科学与技术研究所)

谢建芸(上海实验动物研究中心)

邢凤英(上海交通大学医学院附属第九人民医院)

熊炜(上海海关动植物与食品检验检疫技术中心)

徐艺玫(新疆维吾尔自治区疾病预防控制中心)

许彤辉(复旦大学)

闫明霞(复旦大学附属肿瘤医院)

杨斐(复旦大学)

杨伟敏(美迪西普亚医药科技<上海>有限公司)

应华忠(浙江省实验动物中心)

袁进(南方医科大学)

张泉(扬州大学)

张笑人(广州医科大学附属肿瘤医院)

张永斌(广州中医药大学)

赵静(江苏集萃药康生物科技股份有限公司)

赵四海(西安交通大学)

赵彦光(上海实验动物研究中心)

郑和平(中国人民解放军联勤保障部队第九〇〇医院)

周洁(上海懿尚生物科技有限公司)

周文江(复旦大学)

周晓辉(上海市公共卫生临床中心)

周正宇(苏州大学)

朱顺星(南通大学)

青年编委

卞勇(南京中医药大学)

陈仁金(徐州医科大学)

戴然然(上海交通大学医学院附属瑞金医院)

邸亚男(北京大学第三医院)

冯洁(中国科学院分子细胞科学卓越创新中心)

高彩霞(中国农业科学院哈尔滨兽医研究所)

高静(上海交通大学)

高巍(吉林大学)

罕园园(中国医学科学院医学生物学研究所)

黄镇(福建中医药大学实验动物中心)

郎廷元(重庆医科大学附属第一医院)

李静(复旦大学附属华山医院)

李娜(中国科学院上海药物研究所)

李顺(上海市公共卫生临床中心)

李长龙(首都医科大学)

林金杏(上海实验动物研究中心)

刘晓宇(中国疾病预防控制中心职业卫生所)

刘颖(北京中医药大学)

刘月环(杭州医学院<浙江省医学科学院>)

刘真(中国科学院脑科学与智能技术卓越创新中心)

卢晓(迪哲医药有限公司)

陆涛峰(贵州中医药大学)

彭长庚(同济大学)

彭诗宇(西湖实验室)

沈如凌(上海实验动物研究中心)

史仍飞(上海体育学院)

宋宁宁(复旦大学)

田雨光(南方医科大学)

王春霞(上海交通大学医学院附属儿童医院)

王红平(四川省药品检验研究院)

王亮(大连医科大学)

王荣(西安医学院)

王宇(上海市食品药品检验研究院)

魏盛(山东中医药大学实验中心)

吴剑(复旦大学附属中山医院)

吴微(中国科学院分子细胞科学卓越创新中心)

谢淑武(上海市生物医药技术研究院)

徐丹(武汉大学)

徐汪节(上海交通大学)

杨利峰(中国农业大学)

杨玉琴(上海市第一人民医院)

叶茂青(复旦大学附属华东医院)

于士颜(上海交通大学医学院附属第九人民医院)

于艳(中国康复科学所)

于志锋(上海交通大学医学院附属第九人民医院)

张磊(同济大学医学院)

赵静洁(首都医科大学附属北京友谊医院)

赵莹(上海实验动物研究中心)

庄乐南(浙江大学)

卓振建(北京大学深圳研究生院)

特邀审稿专家

陈振文(首都医科大学)

傅江南(暨南大学)

金帆(浙江大学医学院附属妇产科医院)

饶军华(广东省科学院动物研究所)

邵奇鸣(江苏鼎泰药物研究<集团>股份有限公司)

邵义祥(南通大学)

孙德明(国家卫生健康委科学技术研究所)

屠伟峰(南京医科大学附属苏州科技城医院)

王纯耀(郑州大学)

王靖宇(大连医科大学)

王勇(中国科学院亚热带农业生态研究所)

吴永杰(上海市高血压研究所)

谢家骏(上海中医药大学)

徐彭(江西中医药大学)

薛整风(扬州大学)

岳秉飞(中国食品药品检定研究院)

曾林(军事科学院军事医学科学研究所)

(*常务编委)

守正创新,努力提高本刊 学术服务及引领能力



岁月不居,时节如流。2023年,《实验动物与比较医学》依托第七届编委会团队,严格执行编委会章程及各项工作制度,在编委队伍优化、专题/专栏/专刊出版、期刊版面改进、学术交流活动组织、实验动物科创团队推介等方面开展了卓有成效的工作,为实现本刊的“十四五”发展目标打下了坚实基础。

2023年5月,我们荣幸邀请到中国工程院院士、动物病毒学家夏咸柱研究员担任本刊第七届编辑委员会的特邀顾问。2023年11月,根据2022—2023年参与期刊工作业绩情况评选出8位优秀青年编委,并按编委会章程的有关规定完成了青年编委人选的调整工作,新增了14位青年编委;调整后的青年编委队伍由50位青年学者组成,明显增强了整个编委会团队的活力,为本刊未来发展注入了新的动能。

2023年,本刊持续推进专题、专栏及专刊出版工作。在已有的“人类疾病动物模型”、“实验动物资源开发与利用”、“动物实验技术与方法”和“实验动物管理及质量控制”等经典专栏基础上,新推出了“比较医学研究与报告规范”专栏,通过对国际实验动物研究领域内著名的ARRIVE 2.0指南等进行汉化和解读,促进国内实验动物研究工作的高质量发展和国际认可;该专栏得到了中国科学技术期刊编辑学会2023年翰笔计划“动物实验医学研究及报告规范化的国际对标”和中国合格评定国家认可委员会主持的国家重点研发计划“实验动物共性关键质量评价技术标准研究”课题支持,相关内容已被列为中国科学院大学等国内数家科研、教学单位的教育培训内容。此外,2023年第4期推出了实验动物科学“华东会议优秀论文展”专题,2023年第5期推出了“庆祝上海实验动物研究中心成立40周年专刊”,将期刊出版与专业会议和行业大事紧密融合,在把牢学术出版质量的前提下,积极致力于记录并推动我国的实验动物与比较医学科技发展。

为了突出本刊特色、提高辨识度,2023年初编辑部重新设计了期刊封面,采用富有生命力的蓝绿色背景,辅以常见实验动物及人体剪影,充分体现实验动物与人类及比较医学的息息相关性;同时设计了本刊第一个专属logo,将用作今后各种通知和证书的正式标签。而且为进一步对标国际学术出版规范,方便国内外读者的多种阅读需求,本刊的内文版式也做了一些优化:每篇文章的首页给出该文专属二维码,文末提供“引用本文”的推荐格式,图表内容和参考文献都增加了英文对照。再者,2023年期刊官网的“虚拟专题”和“行业资讯”等栏目内容不断充实,针对优秀论文的多媒体精准推送和开放存取(包括原始数据、操作视频和审稿意见等)工作也在逐步推进。

新冠疫情结束后的2023年,本刊在主办单位指导和支持下,组织了一系列的线下学术交流活动:6月,在苏州召开了第七届编委会的第一次编委座谈会;9月,在上海召开了2023年刊务理事座谈会及“实验动物设施信息化建设案例分享及研讨会”;11月,在2023上海实验动物科学论坛上承办了“实验动物与学术出版”和“安太力杯青年论坛”两个专场。另外,自2022年8月至2023年12月,本刊的“实验动物与比较医学科创团队推介”专栏已连续为国内20家优秀科研团队做了图文并茂的专业宣传。这些学术交流及宣传活动使期刊服务方式从单纯地刊发优秀科研论文,进一步拓展为搭建更大的学术交流平台。

基于上述工作，本刊的专业服务力、学术引领力和社会影响力正在不断增强。据2023年底中国科学文献计量评价研究中心发布的中国学术期刊影响因子年报数据显示，本刊影响因子连续4年稳步升高，并首次进入了基础医学类Q2区。同时，本刊的国际化推广工作持续进行，继被美国Chemical Abstracts、美国Ulrichsweb、英国CAB Abstracts和Global Health、波兰ICI World of Journals和ICI Master List、瑞典DOAJ等数据库收录后，2023年又被美国全学科学术全文数据库（EBSCO）和WHO西太平洋地区医学索引数据库（WPRIM）收录。另外，2023年本刊继续入选中国科协“科技期刊双语传播工程”，并荣获中文畅销报刊在线阅读平台之一博看网的2023“出版融合创新奖”。

风物长宜放眼量。2024年，《实验动物与比较医学》将延续既定的工作框架和分阶段目标，在坚持本刊特色和办刊宗旨的同时，密切关注行业需求，依托编委力量，启动大综述组织策划工作，着力提升本刊的学术影响力；进一步拓展本刊优秀论文的推介宣传渠道，并尝试申请更高水平的国内外数据库，让更多读者看到本刊发表的更多优秀论文；尽快引入并培养年轻科学编辑，持续加强编辑部团队建设和服务能力，打造具有更强执行力和创新力的期刊服务团队。2023年所取得的成绩，离不开全体编委的指导、同行专家的支持、投稿作者的信任和广大读者的关心；2024年我们将继续坚守初心、守正创新，充分凝聚学科及行业力量，促进我国实验动物与比较医学领域的人才培养、团队建设、科技合作和创新发展，更好地发挥期刊的学术服务及引领能力。

吴宝金（执行主编），王 健（主编）

（2024年2月，写于上海）

本刊被收录情况：

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，长江文库、博看网、中邮阅读网，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）

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)

中国研究型医院学会医学动物实验专家委员会

[摘要] 自发性脑出血 (spontaneous intracerebral hemorrhage, sICH) 是最常见和致死性最高的卒中类型, 其特征是脑实质的自发性出血, 目前尚无有效的防治方法。现有的sICH动物模型可以概括为三大类: (1) 诱导性脑出血模型, 主要有自体血注入、胶原酶注射、微气球充盈、高血糖诱导的sICH血肿扩大模型; (2) 自发性高血压脑出血模型, 主要有易卒中自发性高血压大鼠和易卒中肾血管性高血压大鼠模型; (3) 基因修饰模型, 主要有高血压脑出血转基因模型、脑淀粉样血管病转基因模型、脑动静脉畸形病变相关基因修饰模型、脑海绵状血管畸形相关基因修饰模型及胶原蛋白相关基因修饰模型。这些模型不仅帮助我们了解sICH的发病机制、探索预防或治疗的方法, 也可用于临床前药物试验, 促进sICH新药研发工作。本指南系统总结了sICH的发病机制, 详细介绍了不同种属建模动物的优劣性、不同sICH动物模型的建模原理和方法、建模技术细节、模拟的病理生理机制及其临床相关性以及sICH动物模型神经行为评价技术, 并比较了各种sICH模型的优缺点及其适用的研究范围, 最后重点概括了sICH相关的临床前药物试验设计要点。

[关键词] 自发性脑出血; 卒中; 动物模型; 临床前药物试验

[中图分类号] R-332; Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2024)01-0003-28



Guidelines for the Selection of Animal Models and Preclinical Drug Trials for Spontaneous Intracerebral Hemorrhage (2024 Edition)

Committee of Experts on Medical Animal Experiments, Chinese Research Hospital Association

Correspondence to: ZHANG Huabiao (ORCID: 0009-0002-1094-0891), E-mail: zhanghuabiao@yeah.net;

HE Gang (ORCID: 0009-0005-5102-6264), E-mail: hegangdoctor@126.com;

HAN Xinwei (ORCID: 0000-0003-4407-4864), E-mail: hanxinwei2006@163.com;

LI Yingjun (ORCID: 0009-0003-5971-6599), E-mail: bjthst@163.com

[ABSTRACT] Spontaneous intracerebral hemorrhage (sICH), the most prevalent and lethal subtype of stroke, is characterized by spontaneous hemorrhage in the brain parenchyma. Presently, there are no effective methods for preventing and treating sICH. The existing sICH animal models can be broadly categorized into three classes: (1) induced intracerebral hemorrhage models, including autologous blood injection model, collagenase injection model, microballoon inflation model, and hyperglycemia-induced sICH hematoma expansion model; (2) spontaneous hypertensive intracerebral hemorrhage models mainly include stroke-prone spontaneously hypertensive rats (SHRsp) and stroke-prone renovascular hypertensive rats (RHRsp); (3) gene-modified models encompassing transgenic hypertensive intracerebral hemorrhage, transgenic cerebral amyloid angiopathy, arteriovenous malformation-related, cerebral cavernous malformation-related and collagen-related genetically modified animal models for sICH.

[通信作者] 张化彪 (1969—), 男, 博士, 副主任医师, 副教授, 研究方向: 神经病学和介入神经放射学的临床、教学和科研。E-mail: zhanghuabiao@yeah.net。ORCID: 0009-0002-1094-0891;

何 纲 (1966—), 男, 博士, 主任医师, 教授, 研究方向: 中西医结合脑血管病基础和临床研究。E-mail: hegangdoctor@126.com。ORCID: 0009-0005-5102-6264;

韩新巍 (1958—), 男, 博士, 主任医师, 教授, 研究方向: 各类疾病的影像学诊断与介入放射学理论和临床, E-mail: hanxinwei2006@163.com。ORCID: 0000-0003-4407-4864;

李英俊 (1974—), 男, 博士, 教授, 研究方向: 病理学与病理生理学。E-mail: bjthst@163.com。ORCID: 0009-0003-5971-6599

These models contribute not only to unraveling the pathogenesis of sICH and exploring preventive or therapeutic interventions, but also serve as invaluable tools for conducting preclinical drug trials to advance novel treatments. This guide comprehensively reviews sICH pathogenesis, delineates the superiority and inferiority of different species of modeling animals, explains the modeling principles and techniques for various sICH animal models, elucidates the technical details of animal model production, summarizes the pathophysiological mechanism simulated by the models and their clinical relevance, outlines the neurobehavioral evaluation methodologies for sICH animal models, compares the advantages and disadvantages of various models, and suggests their applicable research areas. Additionally, it underscores critical considerations in the design of preclinical drug trials for sICH.

[Key words] Spontaneous intracerebral hemorrhage; Stroke; Animal models; Preclinical drug trials

目次

1 流行病学与病因学.....	4	4.3.3 脑动静脉畸形相关基因修饰模型.....	13
2 病理学表现.....	6	4.3.4 脑海绵状血管畸形相关基因修饰模型.....	14
3 细胞病理生理学机制.....	7	4.3.5 胶原蛋白相关基因修饰模型.....	14
4 动物模型.....	9	4.3.6 各种基因修饰模型对比.....	14
4.1 诱导性模型.....	9	4.4 动物模型神经行为评价技术.....	14
4.1.1 胶原酶诱导模型.....	9	5 临床前药物试验设计要点.....	17
4.1.2 自体血注入模型.....	10	5.1 实验合法合规.....	17
4.1.3 微气球充盈模型.....	11	5.2 动物种属选择.....	17
4.1.4 高血糖诱导脑出血后血肿扩大模型.....	11	5.3 动物模型选择.....	17
4.2 自发性高血压脑出血模型.....	11	5.4 药物安全性和有效性评估.....	17
4.3 基因修饰模型.....	12	5.5 药物剂量探索和优化.....	20
4.3.1 高血压脑出血转基因模型.....	12	5.6 给药途径和方法确定.....	20
4.3.2 脑淀粉样血管病转基因模型.....	12	5.7 药效学实验设计和数据分析方法.....	21
		5.8 实验伦理和动物福利.....	21

自发性脑出血 (spontaneous intracerebral hemorrhage, sICH) 是最常见和致死性最高的卒中类型^[1]。在全球每年新发的1 500万卒中患者中, sICH占美国、欧洲和澳大利亚全部卒中的10%~15%, 占亚洲卒中的20%~30%^[2]; sICH在中国的占比则更高, 例如湖南长沙地区可达到55.4%^[3]。虽然目前针对sICH已普遍实施早期外科手术和ICU管理措施, 但仍不能有效地避免其较高的致残率和死亡率, 30 d死亡率可达40%^[4], 仅20%的幸存患者可在6个月内恢复到生活自理^[5]。因此, 通过动物模型深入研究和阐明sICH的关键机制、寻找sICH防治新靶点, 具有十分重要的临床意义^[6]。

目前, 卒中临床前研究面临的最大挑战是临床转化困难, 大量对动物模型有效的治疗药物在临床试验中却未得到阳性结果^[7]。其中的原因很复杂, 而且在动物模型制备技术的成熟度、模型的标准化和多样性、模型评价指标的选择、实验条件的控制、模型的临床

相关性等方面均存在缺陷, 大多数临床试验也未能遵循多中心随机双盲原则等, 这些都可能导致临床前研究结果与临床试验结果的不一致。鉴于此, 中国研究型医院学会医学动物实验专家委员会经过长期酝酿和多次深入讨论, 组织中国60余家科研院校的100多位基础和临床研究专家共同参与制订本指南。指南将重点介绍: (1) 不同种属建模动物的优劣性、不同sICH模型的建模原理和方法、建模技术细节、模拟的病理生理机制及其临床相关性、神经行为学评价技术、各种模型的优缺点及其适用的研究范围; (2) sICH临床前药物试验的设计要点。希望本指南能作为sICH临床前动物模型选择和药物评价研究的指导, 以促进我国脑卒中基础研究成果的转化应用。

1 流行病学与病因学

高血压是sICH最常见的危险因素。70%的sICH由高血压引起, 降低血压可明显降低sICH的发病率。其

治疗途径包括：(1) 急性期措施的控制血压、应用维生素K拮抗剂和外科手术清除颅内血肿等；(2) 长期措施的个体化最佳降压目标、新型抗凝药物的应用和创伤更小的外科手术等^[8]。在sICH患者血压 $\geq 140/90$ mmHg状态下，发病后6个月再出血的部位及其比例分别是：脑叶出血42%，深部实质出血50%，小脑出血8%^[8]。血压降低程度和神经功能获益之间存在一定关系。sICH后1 h内中度(22.8 mmHg)降低收缩压，90 d后反映神经功能的改良的Rankin量表(modified Rankin scale, mRS)评分明显好转；大幅度(60 mmHg)降低收缩压并不能带来神经功能改善和获益^[9]。在急性sICH动物模型中，血压增高程度与炎症因子和双重内皮缩血管素-1/血管内皮生长因子信号多肽受体(the dual endothelin-1/vascular endothelial growth factor signal-peptide receptor, DEspR)在外周血中性粒细胞和单核细胞中的表达水平呈正相关，当血压较高时DEspR表达水平也较高，对调节神经炎症反应有重要意义^[10]。因此，阻断DEspR表达、减少次级损伤因子DEspR⁺CD11b⁺免疫类型可降低高血压所致sICH的死亡率，提高患者生存率，减少神经功能损伤^[11]。给予高盐和N(ω)-硝基-L-精氨酸甲酯盐酸盐(nomega-nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride, L-NAME)饮食后，人类肾素(renin)和血管紧张素原(angiotensinogen)过表达(R⁺/A⁺)转基因小鼠的动脉血压呈进展性升高，在10 d后出现sICH^[12]，该模型优于胶原酶注射模型。不足之处是出血量过少和出血时间不确定，导致针对sICH的治疗时间窗太短^[13]。

平滑肌细胞变性导致局部小血管破裂，与颅内深部自发性sICH相关，但某些进展性平滑肌细胞变性导致的小血管病却很少发生深部sICH。胶原酶IV(collagen type IV, Col4) $\alpha 1$ 和Col4 $\alpha 2$ 形成的异三聚体对血管基质膜和功能有重要作用，两种基因突变可引起脑血管微出血和致命性sICH^[14]。其机制可能是：通过增加小鼠Notch3活性而使转化片段(translational segment, TS)过度激活，导致上游滋养小动脉血管内压增加，促使平滑肌细胞缺失的小动脉破裂，从而引起sICH^[15]。体外研究显示，磷酸化细胞外信号调节蛋白激酶1(phospho-extracellular signal regulated kinase 1, p-ERK1)/基质金属蛋白酶2(matrix metalloproteinase-2, MMP-2)轴与低血清尿酸水平诱导的弹性蛋白变性密切相关，p-ERK1/MMP-2阻断剂和生理浓度的尿酸具有sICH后神经保护功能。其机制

可能是，上调p-ERK1/MMP-2轴减轻了脑血管中平滑肌细胞-弹性蛋白收缩单位的破坏^[16]。

脑淀粉样血管病是除高血压性穿支动脉病变之外导致sICH的另一种小血管病^[17]。80%的脑淀粉样血管病都是散发性的，也有以遗传形式存在的。在70岁以上的sICH患者中，20%为脑淀粉样血管病相关性脑出血^[18]。脑淀粉样血管病源性sICH的临床病理特征包括：皮层微出血灶(cortical microbleeds, CMB)、皮层浅表铁沉积(cortical superficial siderosis, cSS)、凸面蛛网膜下腔出血(convexal subarachnoid hemorrhage, cSAH)和脑叶sICH。既往有脑叶sICH的脑淀粉样血管病患者，每年出血再发率为8.9%；伴发cSAH的脑淀粉样血管病的患者，每年脑叶出血再发率达到19%^[19]，而cSS则是脑淀粉样血管病独有的且与更高sICH复发率密切相关的神经影像标志物^[20]。脑淀粉样血管病相关的短暂性、局灶性神经事件(transient focal neurological episode, TFNE)是脑叶sICH及其致死的高危因素，尤其当运动系统TFNE被误诊为短暂性脑缺血发作(transient ischemia attack, TIA)且错误应用抗栓药物治疗时更容易导致sICH。因此做好精确诊断、避免误诊和误治非常重要^[21]。作为脑淀粉样血管病的生物学标志物，载脂蛋白E(apolipoprotein E, ApoE)基因型ApoE $\epsilon 4$ 和脑淀粉样血管病关系密切。脑淀粉样血管病源性sICH的高危遗传因素ApoE $\epsilon 2$ 增加了血管的脆性，与sICH临床后果的严重程度密切相关。在ApoE等位基因不同的脑淀粉样血管病诱导的sICH中，影像学上的生物标志物也有不同表现，如ApoE $\epsilon 2/\epsilon 4$ 两个等位基因和脑淀粉样血管病的电子计算机断层扫描(computed tomography, CT)标志物，手指样突起(finger-like projections, FLP)有选择性的密切关系^[22]。

口服抗凝药物可使sICH的风险增加7~10倍。与传统抗凝药物如华法林、普通肝素和其他维生素K拮抗剂(vitamin K antagonist, VKA)相比，新型直接口服抗凝剂(direct oral anticoagulation, DOAC)可明显降低sICH风险^[23]。与华法林相比，达比加群减少sICH风险约60%，阿哌沙班减少约57%，依度沙班减少约56%，利伐沙班减少约41%^[24]。与传统抗凝药物低分子肝素相比，阿哌沙班、依度沙班、利伐沙班的sICH风险相似；与阿司匹林相比，达比加群和阿哌沙班有相似的sICH风险，而利伐沙班则增加sICH风险。在脑卒中的二级预防过程中，DOAC可以使华法林导

致的sICH风险减少46%^[25]。虽然DOAC或抗血小板药物可减少sICH导致的心血管事件发生,但同时也增加sICH风险,获益与风险共存^[26]。在发生脑微出血的小鼠中,华法林可引起致命的sICH。虽然DOAC增加了微出血风险,但不引发长期的认知功能障碍^[27]。目前尚不清楚抗凝药物是否通过加重患者已有的微出血而引起sICH。

脑血管畸形包括海绵状血管畸形和脑动静脉畸形,是继发性sICH的主要原因。目前国际上没有明确的脑海绵状血管畸形最佳监测策略,一般需要经过一段临床观察期和放射影像监测期之后,才能给予明确的治疗;随着脑海绵状血管畸形的增大,sICH风险也逐渐增加,引起的临床症状也越来越严重^[28]。大多数脑海绵状血管畸形是散发的,家族性脑海绵状血管畸形是一种罕见的常染色体显性疾病,其发病与*KRIT1*、*CCM2*和*PDCD10*基因突变有关,利用这些基因突变可制作脑海绵状血管畸形动物模型^[29]。*RASA1*基因突变和家族性脑海绵状血管畸形的严重程度及其表型密切相关,而*EPHB4*基因则不参与此类相关性^[30]。家族性脑海绵状血管畸形源性sICH的再次出血风险高,风险分层管理与脑海绵状血管畸形的神经损伤程度具有一致性^[31]。脑部动静脉畸形的畸形血管团破裂引起sICH,其年发病率在2%~4%,在某些特定条件下达到34%左右,可引起严重的神经功能缺损^[32]。通过对畸形血管团基因测序,发现5种上调的差异表达基因,*HMOX*、*PLA2G7*、*FUCA1*、*ACP5*和*IFI30*,涉及了导致脑动静脉畸形破裂的炎症过程和细胞外基质的表达;另有5种下调的差异表达基因,包括*TNFSF18*、*CCL4L1*、*TPH1*、*PKHD1L1*和*TMEM235*与细胞黏附和肌纤维组装相关,可通过影响炎症和血管强度导致脑动静脉畸形破裂^[33]。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)过度表达可促进脑动静脉畸形形成,*Ras*对VEGF的生理功能有重要作用。在内皮细胞上可控*Ras*过度活化小鼠模型中,可出现脑动静脉畸形和sICH^[34]。在人类脑动静脉畸形内皮细胞上,可观察到参与*Ras*/丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)信号通路的基因突变,如*Kras*^[35]。

高胆固醇血症(hypercholesterolemia)可增加发生心血管病的风险。不同范围的胆固醇对sICH发生风险有不同影响。低密度脂蛋白胆固醇(low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C) < 1.82 mmol/L和较低

的甘油三酯水平增加女性sICH风险^[36]。当血脂水平在如下范围内,sICH呈强烈的自限性:胆固醇4.90~5.10 mmol/L、高密度脂蛋白1.12~1.33 mmol/L(男性2.55~2.76 mmol/L)、甘油三酯5.33~5.82 mmol/L。当血脂水平高于或低于该范围时,sICH失去自限性,出现更多和更严重的sICH^[37]。与高血压性sICH的严重程度类似,高脂血症可加剧sICH后炎性反应。使用他汀类药物降血脂和稳定斑块不增加颅内微出血风险^[38],对心和脑都具有良好的保护作用,是未来研究的主要方向。

2 病理学表现

血肿扩大:20%~40%的sICH患者在发病后第1天出现血肿扩大,是导致临床严重后果的一个重要危险因素^[39]。影像学表现如CT血管造影(CT angiography, CTA)的“点征”、CT的“混合征”和“黑洞征”在一定程度上都预示了血肿扩大^[40]。临床上,BRAIN评分^[41]、BAT评分^[42]和9点预测评分^[41]这3种评分体系能更精确地预测血肿扩大。

止血药物可防止血肿扩大、预防其带来的严重临床后果,但减少血肿扩大并不能提高神经功能和存活率。氨甲环酸(tranexamic acid, TXA)与止血药物的代表重组激活因子Ⅶ(recombinant activated factor Ⅶ, rFⅦa)疗效相近。尽管TXA能够最大程度地减少血肿扩大,但是90 d内神经功能损伤和致死率并没有得到改善^[43]。在抗血小板药物、VKA和DOAC拮抗剂中,一种可结合达比加群的依达赛珠(Idarucizumab)单抗片段具有拮抗达比加群的作用,能逆转达比加群引起的严重出血。这种具有逆转作用的药物是否能够提高神经功能,目前仍不清楚^[44]。作为一种重组人凝血因子Xa诱导蛋白,安得塞奈(Andexanet alfa)虽然对急性sICH具有良好的止血作用,但同时有18%的患者也容易发生血栓性事件,如卒中和深静脉血栓等^[45]。目前已有的sICH动物模型限制了对血肿扩大的研究,胶原酶和自体血注射模型都不产生血肿扩大,尤其是高血压和高血脂导致恶化的sICH^[46]。液态聚合物凝胶凝聚关联组织制作的sICH模型可形成占位和继发性血肿,其血肿扩大程度呈血压依赖性,但血肿缺乏溶血毒性^[47],可用于限制血肿扩大的研究。

急性降低血压是另一种潜在的限制血肿扩大的方法。血压的急剧上升预示着sICH后血肿扩大、死亡率和致残率升高^[48]。和常规治疗相比,急性降低血压

(将收缩压从 140~179 mmHg 降低到 110~139 mmHg)不但不能减少死亡率和致残率,反而会增加肾脏受损^[49]。尽管血肿清除疗法已在临床上广泛应用,但目前并无证据显示这种外源性的血肿清除可明显改善神经功能^[50]。在自体血注射或胶原酶诱导的两种小鼠 sICH 模型中,内源性血肿清除方法如过氧化物酶增殖体激活受体- γ (peroxisome proliferator-activated receptor- γ , PPAR γ) 和类脂 X 受体拮抗剂 (retinoid X receptor agonists) 可改变小胶质细胞/巨噬细胞的表型,提高吞噬能力,加速血肿清除,促进神经功能恢复^[51]。白细胞介素 (interleukin, IL)-4/信号转导与转录激活因子 6 (signal transducers and activators of tranion, STAT6) 对内源性血肿的清除起到重要作用,如经鼻给予 IL-4 纳米颗粒,可以加速血肿清除并改善神经功能,也可将“别吃我 (don't eat me)”信号表达到抑制吞噬的红细胞上 (CD₄₇ 抗体),达到相同的血肿清除效果^[52]。

白质脱髓鞘损伤和轴索变性:白质损伤 (white matter injure, WMI) 在人类 sICH 中常见。sICH 可导致灰质破坏和远/近端 WMI,其中 WMI 和认知能力缺陷、神经功能缺损以及抑郁有密切关系。WMI 的机制与机械损伤、血红蛋白和铁离子诱导的氧化应激、神经炎症、兴奋性毒性和血脑屏障破坏等有关^[53]。在自体血注入 *Thy1-YFP* 基因敲除小鼠 sICH 模型中,WMI 的病理生理机制涉及了轴索破坏、脱髓鞘、成熟少突胶质细胞 (oligodendrocytes, OLG) 丢失,sICH 后轴索细胞结构的改变不仅影响着轴索的生理功能,还影响了线粒体的运输功能,最终出现轴索变性^[54]。使用组蛋白脱乙酰酶 (histone deacetylases, HDAC) 抑制剂或敲除 *HDAC2* 基因,能通过调节小胶质细胞和巨噬细胞极化、缓解 sICH 小鼠模型的神经炎症和 WMI^[55]。因此,保护血肿周围 WMI 已成为治疗 sICH 神经功能损伤的重要思路和方法。将治疗双向情感障碍、神经退行性疾病和脑部创伤的氯化锂 (LiCl) 注入自体血 sICH 模型小鼠中,其病理性 WMI 包括髓鞘和轴突变性、行为学表现和电生理功能均得到明显改善,其机制在于:LiCl 阻断了葡萄糖合成激酶-3 β (glycogen synthase kinase-3 β , GSK-3 β) 表达,提高了脑源性神经营养因子 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) 表达,通过减少 OLG 死亡而缓解髓鞘破坏和轴突变性^[56]。使用针对神经炎症的抗生素和抑制小胶质细胞活化的米诺环素治疗 sICH 小型猪模型,以及使用鞘氨醇-1 磷

酸酶受体调节剂芬戈莫德 (FTY720) 治疗 sICH 小鼠模型,都可以减少 WMI。值得注意的是,芬戈莫德 (Fingolimod) 目前已用于 sICH 临床治疗,每天单次口服 400 mg 的米诺环素也有安全的神经保护作用^[57-58]。

细胞死亡是 sICH 在细胞水平的标志性病理改变。在 sICH 后数小时到数天内,血凝块源性毒性产物导致细胞死亡。sICH 后细胞死亡启动的子程序包括细胞自噬、凋亡性坏死和铁凋亡等。其中,铁凋亡是一种铁依赖的非凋亡、坏死及自噬的细胞程序性死亡方式,主要由脂质过氧化和谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase 4, GPX4) 驱动。sICH 动物模型显示,5-脂氧化酶 (5-lipoxygenase, 5-*LO*) 基因敲除可以促进神经功能的恢复,与 N-乙酰半胱氨酸阻断毒性花生四烯酸的产物有关^[59]。在胶原酶和自体血注入小鼠 sICH 模型中,脂质过氧化通过抑制铁抑素-1 (ferrostatin-1) 和脂抑素-1 (liprostatin-1) 表达,可以减轻神经功能缺损、脑萎缩和神经元细胞死亡等^[60]。通过补充 GPX4 等硒蛋白或增加脑渗透性硒肽消除铁凋亡,皆可改善胶原酶诱导小鼠 sICH 模型的神经功能。虽然 sICH 患者的铁凋亡基因表达增强,但是抗铁凋亡药物对神经功能的改善作用仍不清楚^[60]。最近的临床研究结果显示,去铁胺可使中度血肿的 sICH 患者获益^[61]。sICH 后细胞死亡涵盖了神经元和脑内皮细胞,其内在的信号通路仍不清晰。在用胶原酶和自体血制作的小鼠和山羊 sICH 模型中,远离血肿的区域出现了内皮细胞功能不全和血脑屏障破坏^[62],进一步导致脑水肿,以及免疫细胞和神经毒性分子、炎症前体分子、血管活性分子的渗透^[63]。sICH 诱导的细胞毒性脑水肿和血管源性脑水肿与脑实质细胞损伤、血管损伤和血脑屏障破坏密切相关。这两种类型的脑水肿和脑内离子种类紧密相关,如 Na⁺和 Cl⁻。目前脑水肿治疗仅局限于高渗液 (甘露醇和高渗盐水) 或过度换气。尽管磺脲类受体-1 离子通道拮抗剂格列本脲在 sICH 大鼠模型中的作用仍存在争议,但是最近的临床研究结果显示,格列本脲可以减少血肿周围水肿^[64]。

3 细胞病理生理学机制

炎症介质:sICH 后炎症虽然部分类似于脑缺血引起的炎症,但是其导致脑内炎症的机制并不清楚。局部的小胶质细胞和胶质细胞最早对炎症产生反应,两者促进炎症激活并吸引循环免疫细胞内流,其中吞噬细胞占多数。脑出血局部存在增加释放的炎症细胞因

子, 如IL-1 β 、肿瘤坏死因子、自由基和化学因子等, 这些炎症细胞因子吸引并激活了淋巴细胞^[65]。急性脑损伤引起的显著炎症加剧了sICH后的脑损伤。在胶原酶和自体血小鼠sICH模型中, 血肿周围小胶质细胞产生甲酰肽受体-1 (formyl peptide receptor 1, FPR1) 和甲酰肽结合后, 激活并重新聚集了小胶质细胞、嗜中性粒细胞, 进而加重了神经功能损伤。FPR1整合了炎症过程, 可能是未来治疗sICH的一个靶点^[66]。大多数免疫功能正常的sICH动物模型可用来研究sICH后的炎症影响和化学动力学机制, 并且通过炎症相关合并症为研究sICH炎症提供了平台。

促炎小胶质细胞和巨噬细胞: sICH后的神经炎症主要归因于小胶质细胞和巨噬细胞的激活, 而IL-4可以将小胶质细胞和巨噬细胞的促炎症功能转为抗炎功能, 其发挥神经保护和抗凋亡作用的内在机制尚不清楚。在sICH小鼠模型中, 给予IL-4后可以减少神经损伤、脑水肿及sICH诱导的缺血性损伤, 其机制可能是: IL-4通过调节M1/M2极化来介导炎症, 刺激M2期小胶质细胞和巨噬细胞的极化, 部分通过JAK1/STAT6信号转导通路缓解sICH神经炎症^[67]。神经炎症主要与sICH较差的预后相关, 因此M1期小胶质细胞和巨噬细胞被认为是sICH早期的治疗靶点。在啮齿类动物sICH模型中, 具有中枢神经系统渗透性的四环素类抗生素如米诺环素可通过抑制促炎小胶质细胞和巨噬细胞改善神经功能; 但前期的临床研究并未得出此结论^[68]。在sICH后期, M2期小胶质细胞和巨噬细胞的抗炎作用可改善神经功能, 归因于血肿的移除和血肿周围水肿的吸收。M2期小胶质细胞和巨噬细胞也促进局部白质的完整性, 甚至产生神经保护。因此, 小胶质细胞和巨噬细胞的亚急性期与优化的、促进抗炎的治疗时间窗相一致^[69]。需要指出, sICH后神经炎症不能截然分为早期和后期, 而是一个复杂而持续的过程, 故而在制定实验性神经炎症靶向干预策略时, 必须充分地考虑这一点。

嗜中性粒细胞: sICH患者嗜中性粒细胞的基因表达上调, 其特异性反应包括转移RNA (transfer RNA, tRNA) 转录、线粒体功能紊乱、内质网压力等途径, 非特异性反应包括干扰素信号、神经炎症信号、死亡受体信号和活化T细胞的核因子途径^[70]。嗜中性粒细胞产生的炎症和细胞毒性加剧了sICH损伤, 同时具有保护神经功能的作用^[71], 如铁清除乳铁蛋白的分泌可以减少血肿周围水肿, 并促进血肿的清除。中性粒细

胞分泌的IL-27, 可减少炎症和细胞毒性产物数量, 增加铁清除物产量, 使嗜中性粒细胞的作用倾向于神经保护方向。值得注意的是, 在骨髓中神经系统诱导的嗜中性粒细胞将IgG的Fc区与乳铁蛋白相融合, 从而产生良好的治疗效果和等离子体半衰期长的分子^[72]。

免疫微环境: 为了抵消炎症反应, 受损的中枢神经系统诱导产生了全身的免疫抑制。sICH发生后交感和副交感神经被过度激活, 导致脾脏萎缩和淋巴细胞减少, 而脾脏萎缩的程度和sICH血肿大小、严重程度以及免疫抑制之间的关联密切^[73]。在注射自体血或胶原酶的啮齿类动物模型中, sICH后的免疫抑制过程表达程序性死亡配体-1 (programmed death ligand 1, PD-L1), 美托洛尔可作为潜在的治疗选择; 此外, 周围血液循环中相关可溶性PD-L1增加, 同时血肿周围神经源性PD-L1减少, 证实了脑源性PD-L1是sICH后免疫抑制的一个新机制^[74]。sICH患者血肿大小和位置的变化深度影响sICH后的免疫反应调节, 据此可以制作与临床sICH更加类似的动物模型。作为鞘氨醇类似物和鞘氨醇-1-磷酸酶受体 (sphingosine-1-phosphate receptor, S1PR) 调节剂治疗复发性多发性硬化的药物, 芬戈莫德 (FTY720) 可以通过不同的分子机制和通路如S1PR、NF- κ B、磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸-3-激酶/蛋白激酶B (phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase/protein kinase B, PI3K/AKT)、蛋白磷酸酶2A (protein phosphatase 2A, PP2A) 和P2X7受体 (P2X7 receptor, P2X7R) 产生抗凋亡、抗炎、抗过氧化应激功能, 对sICH损伤发挥保护作用^[75]。在治疗sICH过程中, FTY720的免疫抑制效应主要依赖于阻断辅助因子CD4⁺和效应因子CD8⁺T细胞和CD19⁺B细胞来完成^[76]。

肠脑轴: 脑叶sICH常伴有高风险的消化性溃疡; 深部sICH除了伴有较高的消化性溃疡风险之外, 还有胃食管反流性疾病的风险^[77], 这为sICH后肠脑轴的存在提供了证据。中枢神经系统调节免疫细胞时, 通过肠脑轴影响微生物组发挥作用; 微生物组在中枢神经系统病理性神经炎症、神经可塑性和自体免疫中起重要作用。在各种sICH动物模型中, 肠道微生物群通过激活NOD样受体家族含pyrin结构域蛋白3 (NOD-like receptors family pyrin domain containing 3, NLRP3) 炎症小体和炎症细胞释放因子而影响神经炎症, 即NLRP3炎症小体激活了肠道微生物群。通过NLRP3炎症小体调节菌-肠脑轴, 可能作为一种治疗sICH后二

次损伤的新思路^[78]。在胶原酶诱导的小鼠脑出血模型中,胃肠运动性降低和微生物群失调已被证实,并对预后产生不利影响;用健康的微生物群再定植脑出血小鼠,显示出良好的治疗效果^[79]。因此,进一步研究sICH患者的肠道微生物组变化以及微生物组移植将非常重要。

4 动物模型

迄今已使用小鼠、大鼠、兔、猫、猪、犬、绵羊和灵长类等动物制作了多种实验性sICH模型^[80]。通过分析2021年10月—2022年5月发表的51项sICH动物模型研究报告,Paiva等^[81]发现大多数研究(63%)选择大鼠作为实验动物,使用最多的模型是自体血注入模型(51%),其次是胶原酶诱导模型(35%),较少的是微气球充盈模型(8%),最少的是脑血管损伤模型(6%)。无论哪种方法建立的sICH动物模型均存在各自的优缺点,因此在sICH临床前药物试验中精准选择符合研究目标的动物模型极为重要。

4.1 诱导性模型

4.1.1 胶原酶诱导模型

4.1.1.1 造模原理

胶原酶是一种金属蛋白酶,能够溶解毛细血管周围的细胞外基质并打开血脑屏障,导致活动性脑实质出血,模拟了人类sICH^[82]。多种胶原酶可用于诱导sICH动物模型,其中使用最多的是Ⅶ型胶原酶。

4.1.1.2 造模方法

Rosenberg等^[83]于1990年首次报道:大鼠麻醉、消毒后固定,颅骨钻孔,在脑立体定位指引下,使用微量注射泵在9 min内向左侧尾状核注入含0.1~1.0 U胶原酶(Ⅺ型或Ⅶ型)的生理盐水2 μL诱导大鼠sICH;出血范围由胶原酶的注入量决定,通过调节胶原酶的含量,可控制血肿的大小。最终选择0.5 U的Ⅶ型胶原酶用于模型制作。随后Clark等^[84]采用相同方法制作了胶原酶诱导的小鼠sICH模型。

4.1.1.3 模型评价指标

脑血肿:大鼠脑内注射0.2 U胶原酶后10 min左右出现首次出血。MRI检查显示,出血区的血液扩散到脑实质,在前4 h内血肿体积不断增大,4周和6周后血肿范围进一步扩大^[85]。

脑水肿:大鼠脑内注射胶原酶6 h后,脑水肿迅速增长,在2~3 d达到峰值^[86]。

血脑屏障通透性:MacIellan等^[87]用MRI检查发

现,大鼠脑内注射胶原酶30 min后,开始出现血脑屏障通透性增加;注射后12 h、2 d和4 d呈时间依赖性加重。

组织病理:尾状核注入0.5 U胶原酶诱导sICH大鼠的脑组织学检查显示,注射后1 h内针刺部位的血管周围可见红细胞,4 h后出现血肿,24 h后发现含有液体、血细胞和纤维蛋白的坏死肿块,7 d后观察到充满脂质的巨噬细胞,第3周时观察到囊肿。注射后4、24、48 h检测到注射部位脑含水量显著增加,24 h检测到后脑段含水量显著增加。大鼠的行为异常持续了48 h,在1周后功能恢复^[82]。尾状核注射含有0.14 U胶原酶和1.4 U肝素的生理盐水诱导大鼠sICH后12 h,血肿周围组织的中性粒细胞开始向血肿中心浸润;注射后48 h,巨噬细胞开始进入血肿中心;注射后1周,MRI检查可见广泛的白质水肿;组织学检查显示,血肿周围组织中的中等大小纹状体神经元丢失。推测血管外渗的血液引起一种脑内混合性炎症细胞反应,在出血后48~72 h达到最大,与至少持续4~6周的脑细胞死亡有关^[88]。

神经功能缺损:自发旋转、对侧前肢屈曲、后肢缩回、梁行走能力和双侧前爪抓握测试等神经功能检测结果显示,尾状核注射胶原酶导致大鼠严重的脑损伤和持续的神经功能缺损,恢复率低且不能自动恢复^[85],这与临床上sICH患者的状况类似。尾状核注射胶原酶和肝素诱导大鼠sICH后1 d,大鼠神经功能明显受损,2 d后开始出现改善,在1~2周时明显改善,但3周后仍残留部分神经功能缺损^[89]。大鼠纹状体内注射0.4 U胶原酶21 d后,神经功能缺损的恢复率非常低,在2个月后仍可观察到长期的神经缺损^[80]。

4.1.1.4 优缺点及应用

优点包括:(1)制作方法简单快速,造模成功率较高,出血稳定性和重复性较好,模型的一致性较好;(2)胶原酶模型模拟了临床sICH发病的几个关键阶段,包括血管破裂、血肿形成和血肿扩张^[90-92]。

缺点包括:(1)胶原酶并没有造成脑血管的物理性破裂,只是造成了小血管破裂而形成弥漫性渗血,与深穿支动脉破裂出血导致sICH的临床情况不符合;(2)胶原酶对脑组织具有细胞毒性作用,可损伤神经功能及血脑屏障,并放大了sICH后脑内炎症反应^[90-92]。因此胶原酶注射模型并不能完全模拟人类sICH后继发性脑损伤的病理生理,不能用来研究sICH后血肿周围组织的血液循环障碍。

应用：胶原酶注射模型适用于研究脑水肿及脑水肿在sICH损伤中的作用，以及sICH后神经功能的恢复及其治疗效果评价等^[90-92]。

4.1.2 自体血注入模型

4.1.2.1 造模原理

将自体血液注入动物脑实质内特定区域（如尾状核），直接有效地形成脑水肿^[93]。

4.1.2.2 造模方法

单次注射法：麻醉并固定动物后，在动物颅骨钻孔。在立体定位引导下，通过微量注射泵将非肝素化自体动脉血以缓慢恒定的速度注入大鼠尾状核，注血量与动物脑组织大小相关（大鼠脑注血量25、50和100 μL 分别相当于人脑20、40和80 mL的出血量）^[93]。

两次注射法：Deinsberger等^[94]在1996年提出两次注血sICH模型构建方法。将50 μL 新鲜自体动脉血分成两部分，首先以10 $\mu\text{L}/\text{min}$ 的注射速率将15 μL 血液注入大鼠尾状核，静置针头7 min使血液沿针道凝结，然后再以相同速率注入剩余的35 μL 血液以形成凝块。Belayev等^[95]在2003年使用两次注血法制作出小鼠ICH模型：在立体定位引导下，将一根30号不锈钢套管通过一个头颅钻孔引入左侧纹状体；首次注射（超过3 min）全血5 μL ，留置7 min，然后再次注射（超过5 min）全血10 μL ，留置10 min后缓慢抽出注射插管。该模型产生了持续的神经功能缺损、脑内水肿、大脑肿胀和皮质灌注不足，与人类高血压基底神经节脑出血非常相似。

与单次注血模型比较，两次注血模型的主要优点是显著减少了血液通过针道回流以及向脑室和（或）蛛网膜下腔渗漏，较好地控制了水肿的大小、形态及部位，从而产生可重复的脑内水肿；其缺点是注射难度相对较大、两次注射之间的时间延迟，导致血凝块更容易形成。

三次注血法：Ma等^[96]于2006年对注血模型做了进一步的改进，制作了三次注血小鼠模型。使用玻璃毛细管从供体小鼠的眶静脉中迅速提取血液，首先注入5 μL 血液，暂停7 min使注入的血液沿着针道产生凝血，然后再注入5 μL 血液，暂停1 min以加强凝血，最后在4 min内注入剩下的20 μL 血液。注血60 min后，模型小鼠出现明显的神经功能缺损。存活48 h后组织学检查显示，均存在局部脑水肿。该模型的优点是产生了一致性更好的脑水肿。

经过一系列的持续改进，自体血注入模型的稳定性和重复性得到明显改善，已经成为目前应用最广泛的一种sICH动物模型。并且通过在额叶或基底神经节注射血液，开发出了猫、犬、猪、羊和猴等大型动物sICH模型。

4.1.2.3 模型评价指标

脑水肿：大鼠尾状核注入100 μL 自体血4 h内，水肿大小稳定，水肿通常在注血后4~6周消退^[93]。

脑水肿：大鼠尾状核注入100 μL 自体血后，在24 h内脑水肿迅速增长，2~3 d达到峰值^[93]。

血脑屏障通透性：MacLellan等^[87]使用MRI评估大鼠脑内注入100 μL 自体血后12 h、2 d和4 d的血脑屏障损伤情况，发现血脑屏障通透性呈现时间依赖性减轻。Knight等^[97]用MRI观察到，大鼠脑内注射100 μL 自体血1 d后，仅在水肿边缘观察到血脑屏障通透性略有增加，14 d后仍保持轻微升高，血脑屏障通透性同样呈现时间依赖性降低。

组织病理：Xue等^[98]研究了大鼠纹状体注血模型1 h~4周后，脑内炎症和细胞死亡的时间过程。结果显示，注血24 h后水肿周围组织中存在退化的红细胞和核碎片；中性粒细胞浸润在48 h达到高峰，之后逐渐消退；注血4 h后，小胶质细胞激活开始明显增多，48~72 h达到最大值，并持续到4周；CD8a免疫反应性淋巴细胞在注血后48 h开始出现，并持续到1周；TUNEL阳性细胞在注血后72 h达到最大值，并持续到4周。推测由血管外渗的血液引起一种脑内混合性炎症细胞反应，并且在出血后48~72 h达到峰值，与至少持续4周的脑细胞死亡有关。

神经功能缺损：自发旋转、对侧前肢屈曲、后肢缩回、梁行走能力和双侧前爪抓握测试等神经功能检测结果显示，大鼠脑内注射100 μL 非肝素化自体血1、4、7和14 d后，神经功能缺损存在时间依赖性恢复，21 d后神经功能完全恢复^[99]。大鼠纹状体注入100 μL 自体血后1~28 d，神经功能部分恢复^[100]。提示自体血注入模型可能存在神经功能自发性恢复，对长期神经功能损伤研究的价值可能有限。

4.1.2.4 优缺点及应用

优点包括：（1）模型制作方法直接有效，应用立体定位仪后水肿位置更加准确，模型制作成功率高；（2）注血模型脑实质出血的发生发展过程与人类sICH的自然病理进程更加接近^[90-92]。

缺点包括：（1）脑内注血形成的水肿并非由脑血

管破裂引起,不能重现人类sICH的深穿支动脉血管点状破裂事件;(2)容易出现注入的血液沿针道返流、向脑室和(或)蛛网膜下腔渗漏等情况,出血量与血肿形态没有直接关系,模型的一致性较差^[90-92]。

应用:脑内注血模型适用于研究血液成分、血凝块释放物质在sICH后继发性脑损伤中的作用及其机制,对sICH后的自然凝血和炎症途径研究尤其合适^[90-92]。

4.1.3 微气球充盈模型

4.1.3.1 造模原理

利用微气球充盈产生占位效应,模拟脑血肿的压迫效果,这是一种纯机械性ICH模型构建策略^[101]。

4.1.3.2 造模方法

由Sinar等^[101]于1987年首先提出。在SD大鼠颅骨上钻孔,将一个微气球安装在25号钝性针头上,通过立体定位将微气球插入右侧尾状核,最后用牙科黏合剂密封钻孔。静置30 min后,在13.3 kPa的平均压力下将微气球用20 s充气至50 μ L,保持10 min后放气。微气球充胀模型通过充放气改变微气球的体积,模拟不同大小血肿对脑组织的压迫作用。

4.1.3.3 模型评价指标

组织病理:微气球的充盈造成了明显的血肿占位效应,在右侧尾状核上出现广泛的缺血性损伤,同侧额叶皮质和尾状核的脑血流量(cerebral blood flow, CBF)降低,颅内压(intracranial pressure, ICP)显著升高^[101]。微气球充气后6~24 h出现细胞凋亡,24 h后凋亡细胞分布范围和凋亡细胞数量快速增加;在气球放气后10~120 min出现神经元坏死,提示细胞凋亡和死亡均可能有助于病变核心的形成^[102]。

4.1.3.4 优缺点及应用

优点:微气球充盈模型模拟了人类sICH的血肿占位效应,模型的一致性和重复性较好。

缺点:(1)没有形成脑血肿,不能模拟脑血肿、血凝块形成及其释放的内源性毒性物质造成的继发性脑损伤,与临床sICH的病理生理不符合;(2)易造成不可逆脑损伤,无法评估继发性脑损伤^[90-92]。

应用:微气球模型可用于对sICH的血肿占位效应、外科手术清除血肿及其效果的研究,还可用于观察脑灌注压变化对全身的影响^[90-92]。

4.1.4 高血糖诱导的血肿扩大模型

4.1.4.1 造模原理

高血糖增加了实验性脑出血的血肿扩张幅度,这

种作用是由芳烃受体介导的。

4.1.4.2 造模方法

首先利用立体定位仪注射0.075 U胶原酶诱导sICH小鼠模型,3 h后经腹腔注射50%葡萄糖(6 mL/kg)。注射点周围脑组织内出现明显的血肿扩张现象^[103]。

4.1.4.3 模型评价指标

组织病理:与正常血糖水平动物比较,在造模后6 h高血糖动物右侧基底节观察到更大的肉眼血肿和出血量持续增加,血肿量在24 h达到峰值并持续72 h,血浆葡萄糖浓度则在出血后8 h恢复到基线水平。芳烃受体在高血糖sICH发生后被激活,主要广泛定位于血管周围的星形细胞和内皮细胞。模型小鼠中芳烃受体与早期生长反应因子-1相互作用,显著增加以响应高血糖;随后血栓反应蛋白-1(thrombospondin 1, THBS1)/转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)/血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)轴上调,参与了血脑屏障功能损伤,导致sICH后脑血肿扩张,模拟了高血糖诱导脑血肿扩张的病理生理过程^[103]。

4.1.4.4 优缺点及应用

优点:该模型部分模拟了在糖尿病基础上发生sICH的临床情况^[103],并且模拟了临床常见的脑出血后血肿再扩大的现象,为进一步研究血肿再扩大提供了一个较好的动物模型。

缺点:建模动物为年轻雄性小鼠,需要进一步明确性别和年龄依赖性的影响^[103]。

应用:本模型可用于研究高血糖对脑血肿扩张的影响,以及sICH后血肿扩大的原因与机制等^[103]。

4.2 自发性高血压脑出血模型

4.2.1 造模原理

通过遗传学方法建立自发性高血压脑出血模型,可以较真实地模拟临床脑出血发生的病理生理基础,是一种理想的sICH动物模型^[104]。

4.2.2 造模方法

易卒中性自发性高血压大鼠(stroke-prone spontaneously hypertensive rat, SHRsp)由Okamoto等^[104]采用遗传学方法,选择因卒中死亡的自发性高血压大鼠子代近亲交配、培育而成。其中10%发生高血压病,80%发生脑卒中。易卒中性肾血管性高血压大鼠(stroke-prone renovascular hypertension rat, RHRsp)是由Zeng等^[105]用0.3 mm的环状银夹钳夹大鼠双侧肾动脉,通过缩窄双肾动脉造成肾血管性高血

压。在肾动脉缩窄40周后, 200 mmHg 以上的稳定性高血压发生率为100%。自发性卒中(包括脑出血、脑梗死、梗死与出血混合性损伤)发生率为61.8%, 伴有或不伴有蛛网膜下腔积液。

4.2.3 模型评价指标

组织病理: SHRsp大鼠卒中病理特征与人类相似, 具体表现为脑组织内不同程度的出血、小血管扩张及脑软化, 以及神经细胞的纤维走行不清楚或消失等^[104]。RHRsp大鼠具有与人类高血压相似的脑血管损害: 包括细小动脉纤维素样坏死、透明变性、血管壁增厚、管腔狭窄及微动脉瘤形成等^[105]。

4.2.4 优缺点及应用

优点包括: (1) 由于与临床发病过程最接近, SHRsp模型是国际上公认的高血压脑卒中动物模型, 能重现人类sICH的发病过程^[104]; (2) RHRsp易于建立, 价格低廉, 且有与人脑出血相似的高血压动脉硬化化的病理生理基础^[105]。

缺点包括: (1) SHRsp价格昂贵, 来源困难, 而且饲养困难, 可重复性差, 易变种、断种, 以及实验时间长等^[104]; (2) RHRsp不是单纯的sICH模型, 而是脑梗死、脑出血及混合性脑卒中并存^[105], sICH的发生率较低; (3) 两种模型的共同缺点是重复性差、脑出血量和位置都不可控, 为进行同质性评价带来很大障碍^[104-105]。

应用: RHRsp模型可用于高血压动脉粥样硬化性脑出血的病理生理机制研究; SHRsp模型比较适用于研究人类sICH的发病过程^[104-105]。

4.3 基因修饰模型

导致sICH的病因具有多元性, 遗传因素是其中的一个重要因素。研究发现基因变异与sICH的发病密切相关^[106-107], 基因变异可以通过影响血压和损伤血管等途径导致脑实质出血。基因修饰动物模型是指以模式动物为载体, 利用各种基因编辑技术将目的DNA片段导入或删除, 实现内源基因的修改, 从而构建出能模拟人类特定生理、病理、细胞特征的动物模型。一直以来, 日趋成熟的基因工程技术为构建脑出血基因相关动物模型提供了技术支撑。目前已有几种重要的转基因sICH动物模型被成功地应用于实验研究^[18], 包括高血压脑出血转基因模型、脑淀粉样血管病转基因模型、脑动静脉畸形相关基因修饰模型、脑海绵状血管畸形相关基因修饰模型和胶原蛋白相关基因修饰模型。

4.3.1 高血压性脑出血转基因模型

由Iida等^[12]在2005年首次报道。过度表达人肾素和血管紧张素原的R+/A+双转基因小鼠患有慢性高血压, 平均动脉压可达到150 mmHg, 而且小鼠寿命不受影响。给予高盐饮食和含一氧化氮合酶抑制剂L-NAME饮用水可以诱导小鼠产生更严重的高血压, 在第3周时平均动脉压高达(198±6) mmHg。所有小鼠在10周内死亡并伴有脑干出血, 其中一些小鼠存在脑干、小脑和基底神经节出血。出血位置和卒中类型都与人类高血压出血性中风非常相似, 是研究临床sICH比较适宜的转基因动物模型。

4.3.2 脑淀粉样血管病转基因模型

脑淀粉样血管病是指 β -淀粉样蛋白沉积在脑血管上引起的脑血管病^[108], 主要沉积于直径为50~500 μ m的小动脉管壁, 大部分存在于靠近管腔的部位和血管外膜^[109-110]。纤维素样坏死和玻璃样变性可以导致管壁增厚, 最终形成双层管壁或者管壁套管壁的现象^[111]。目前至少有5种过表达淀粉样蛋白前体蛋白(amyloid precursor protein, APP)的转基因小鼠模型^[18, 112], 其中有些模型具有脑淀粉样血管病和sICH的表型, 少数模型未发生sICH。

4.3.2.1 APP23转基因小鼠模型

APP23转基因小鼠携带有过表达的突变基因APP751, 由神经元特异性Thy-1启动子控制, 可出现ICH的表型^[113-114]。该变异的杂合子小鼠在19月龄后才出现明显的脑淀粉样蛋白沉积, 累及小动脉, 遍及大脑各个皮层区域, 但主要存在于新皮质、海马、丘脑和软脑膜等部位。19月龄以上的小鼠可并发sICH, 但出血病灶很小, 不可能引起神经系统变性或死亡。出血部位常见于新皮质和丘脑, 而在皮层表面、海马和纹状体较为少见。27月龄的APP23转基因小鼠可能发生反复出血, 并且出血量较大。该模型可能是研究脑淀粉样血管病相关脑出血的最佳动物模型。

4.3.2.2 Tg-SwDI转基因小鼠

该小鼠转入的APP基因携带有3个突变(Swedish、Dutch和Iowa), 分别是Swedish K670N/M671L、Dutch/Iowa E693Q/D694N, 由相对脑特异性的启动子Thy1.2控制^[115]。12月龄的Tg-SwDI转基因小鼠可在淀粉样变的小血管周围出现小出血灶, 偶见报道有sICH的表型。对于该模型的症状和出血频率, 尚无相关研究报告。

4.3.2.3 APPDutch转基因小鼠

过表达的APP基因携带有E693Q突变, 受Thy1启

动子调控^[116]。该突变导致淀粉样变性-荷兰型(HCHWA-D)遗传性脑出血^[117]。该病为常染色体显性遗传, β -淀粉样蛋白沉积在软脑膜动脉和皮层小动脉, 患者从50岁开始反复发生脑叶出血。携带有该变异的小鼠可以发展为脑淀粉样血管病, 并出现平滑肌细胞的丢失和变性、脑实质出血、血管周围胶质增生。22~25月龄的小鼠开始出现明显的淀粉样蛋白沉积, 29月龄小鼠出现脑出血, 类似于老年性脑出血, 出血灶多数很微小, 引起小鼠神经系统症状的可能性比较小。该研究未详细描述出血频率、位置和脑出血相关症状。

4.3.2.4 Tg2576转基因小鼠

Tg2576小鼠曾被广泛用于研究阿尔茨海默病。Fisher等^[118]在该模型中描述了淀粉样变相关的sICH转基因小鼠。在人巨细胞病毒启动子控制下, 该转基因小鼠表达人含有695个氨基酸的APP剪接体, 并携带有Swedish突变。通过普鲁士蓝染色可以检测到, 15~24月龄的Tg2576转基因小鼠脑实质内出现数量和体积逐渐增大的微出血。使用抗血小板聚集药物双嘧达莫治疗对微出血没有影响。然而, 使用抗 $A\beta$ -40抗体处理小鼠9周后微出血加重, 双嘧达莫可预防这种作用。被动免疫可减少脑实质内淀粉样蛋白沉积, 但可能会加剧血管的淀粉样蛋白沉积。该研究同样未指出Tg2576小鼠是否都出现了sICH及出血的详细位置。目前该模型已被用于sICH研究^[119]。

4.3.2.5 ADanPP7转基因小鼠

家族性丹麦痴呆是一种罕见的神经系统退行性疾病, 为BRI2基因突变导致的常染色体显性遗传, 该变异导致了异常延长的突变淀粉样蛋白分子结构Dan-淀粉样蛋白(ADan)。Coomaraswamy等^[120]以C57BL/6N小鼠为背景, 构建过表达BRI2基因的Danish突变体模型, 利用以黏粒为基础的叙利亚仓鼠胚蛋白表达框架, 控制该蛋白主要在神经元表达。病理表现为异常ADan蛋白在脑血管壁沉积, 伴血管平滑肌细胞丢失、小胶质细胞增生和脑微出血。在18月龄的ADanPP7转基因小鼠每侧大脑半球平均存在14个微出血灶, 但确切位置和大小不详。Morris水迷宫实验显示小鼠记忆受损, 旷场实验显示小鼠焦虑增加。这些神经行为异常是由自身出血所致, 还是因淀粉样斑块引起的神经炎症、神经原纤维缠结等诱发产生, 目前尚不清楚。

脑淀粉样血管病相关的动物模型比较适用于研究

脑淀粉样血管病相关的sICH和小动脉完整性的分子机制。这些模型的共同局限性是: sICH的发生与衰老紧密相关, 小鼠模型需要超10个月的时间才能发生sICH。迄今为止, 对这些模型的出血症状、时间、部位、体积及数量尚无详细描述, 且无法比较不同模型的脑出血严重程度^[18]。

4.3.3 脑动静脉畸形相关基因修饰模型

脑动静脉畸形是一种胚胎期脑血管发育异常造成的先天性疾病, 即脑动脉和脑静脉之间缺乏毛细血管, 动脉与静脉直接相通, 形成动静脉之间的短路, 导致一系列脑血流动力学的紊乱^[121]。临床上常表现为反复颅内出血、部分性或全身性癫痫发作、短暂性脑缺血发作以及进行性神经功能障碍^[122]。大约有5%的患者为家族性的, 包括出血性毛细血管扩张症和毛细血管畸形-动静脉畸形综合征, 二者均为常染色体显性遗传^[123-124]。目前已发现多个基因与脑动静脉畸形相关^[125]。利用基因工程技术制备脑动静脉畸形的动物模型, 大部分用来研究脑动静脉畸形的分子机制, 对sICH表型的描述相对较少。脑动静脉畸形的基因工程小鼠模型有如下几种:

4.3.3.1 Aik1条件性基因敲除小鼠模型

对该模型的研究发现, 所有小鼠均在脑和脊髓发生了出血, 80%以上的小鼠在10~15周龄出现脑出血相关的瘫痪或死亡。如果小鼠在此期间没有死亡, 即使他们携带有多发的脑动静脉畸形, 死亡风险也会明显下降。这种小鼠的出血是年龄相关的, 可用于研究脑动静脉畸形血管易于损伤的分子机制^[126]。

4.3.3.2 Kras条件性基因敲入小鼠模型

通过向5周龄小鼠的球后静脉窦注射过表达Kras-G12V的腺病毒可以成功制备小鼠脑动静脉畸形模型。小鼠在第9周时表现为自发性的颅内多灶出血, 位于背侧或腹侧的嗅球和中脑腹侧^[127]。此外, 条件性过表达Kras-G12D的转基因小鼠出生后第1天即可诱导Kras-G12D表达, 早期12 d内死亡率较高, 存活21 d的小鼠可以检测到不完全显性的脑出血, 这些小鼠并没有脑动静脉畸形的表型, 脑血管不仅没有扩张, 反而变细且易破裂^[128]。

4.3.3.3 Notch4转基因小鼠模型

条件性表达激活的Notch4蛋白片段的小鼠一般在2~5周龄内死亡, 其神经系统表现包括共济失调和癫痫。所有小鼠都会出现sICH, 并在22 d前达到高峰, 出血部位最常见于小脑, 其次是新皮层, 未见脑干

出血^[129]。

4.3.3.4 *Endoglin* 基因敲除小鼠模型

杂合敲除 *Endoglin* 基因的小鼠模型 (*Eng*^{+/-}) 只有 30% 具有脑动脉畸形的表型, 纯合敲除该基因的小鼠表型正常。在平滑肌细胞内, 通过 *Cre* 重组酶条件性敲除 *Endoglin* 基因 (他莫昔芬诱导), 大部分杂合小鼠用 VEGF 处理后可以出现脑动静脉畸形^[130]。但 *Endoglin* 基因敲除模型是否具有 sICH 表型未见报道。

4.3.3.5 其他基因修饰模型

个别基因修饰动物模型可以出现脑出血的表型, 但文献对脑出血的细节描述很少。基质 Gla 蛋白 (matrix Gla protein, *MGP*) 基因敲除小鼠在出生后第 4 周, 可以检测到有脑动静脉畸形合并有脑出血^[131]。在内皮细胞条件性敲除 *Rbpj* 基因小鼠在出生后第 14 天, 可以检测到动静脉畸形和脑出血^[132]。*Itgb8* 和 *Smad4* 条件性基因敲除小鼠模型可以出现脑动静脉畸形^[133], 但未见报道是否存在 sICH 表型。

4.3.4 脑海绵状血管畸形相关基因修饰模型

脑海绵状血管畸形是一种隐匿性血管畸形, 它缺乏动脉成分, 发病率为 0.4%~0.8%, 占颅内血管畸形的 10%~25%, 仅次于脑动静脉畸形^[134]。临床上, 大部分患者无任何症状和体征或仅伴有轻度头痛、头晕。出血较为常见, 并且大约 8%~37% 的患者可出现较大出血灶^[135]。研究表明, 有 40%~60% 的脑海绵状血管畸形患者具有家族史, 多为常染色体显性遗传疾病^[136]。利用基因工程技术可以制备这些颅内血管畸形的动物模型, 用于脑出血疾病研究。

4.3.4.1 *Ccm2* 基因相关脑海绵状血管畸形模型

敲除内皮细胞中 *Ccm2* 基因表达的小鼠在出生后第 8 天, 即可检测到脑海绵状血管畸形的表型^[137]; 这也导致小鼠寿命缩短^[138]: 该小鼠第 8 天存活率为 99%, 第 15 天存活率为 71%, 2 月龄存活率为 20%。利用 loxp 系统控制 *Ccm2* 基因的表达, 可以显著提高存活率^[139]: 90 d 存活率可达 98.1%, 150 d 存活率可达 95.8%, 平均寿命可达 183 d。脑动静脉畸形也呈持续进展: 出生后 1 周, 在小脑可以发现小的散发的动静脉畸形; 在第 5 周, 大脑半球可以检测到小的散发的动静脉畸形, 同时小脑出现多孔洞损伤; 在第 12 周, 大脑半球和脑干出现损伤, 这些损伤随着时间的延长, 都在逐渐增大, 融合成大的病灶, 并可能出现在所有的脑区; 在第 15 周, 6 只小鼠中有 5 只出现了脑出血的表型; 15 周以后, 所有的小鼠都出现了脑出血的表

型; 有 2 只小鼠在 5.5 月龄和 6 月龄时出现了大的脑血肿^[29]。

4.3.4.2 *Ccm1*^{+/-}/*Msh2*^{+/-} 双基因敲除小鼠模型

该模型同样可以出现脑海绵状血管畸形和微出血, 但目前缺乏对出血表型的细节描述^[140]。

4.3.5 胶原蛋白相关基因修饰模型

成人 IV 型胶原 $\alpha 1$ (collagen type IV $\alpha 1$, *COL4A1*) 基因突变均导致儿童自发性颅内出血^[141-143]。*Col4a1* ^{Δ ex41} 是小鼠 *COL4A1* 基因的剪切位点变异, 导致含有 3 个螺旋结构的 41 号外显子缺失^[144]。纯合变异的基因工程小鼠 *Col4a1* ^{Δ ex41/ Δ ex41} 会在胚胎发育时期死亡; 杂合变异 *Col4a1*^{+/ Δ ex41} 小鼠胚胎生长缓慢, 50% 会在出生后 1 d 内死亡。*Col4a1*^{+/ Δ ex41} 小鼠有多种异常表现, 包括脑穿通畸形和反复发生的多灶性颅内出血: 在胚胎期第 10.5 天, 小鼠即可出现不规则的出血和巨大血管、多灶性的脑实质出血和脑室出血; 在胚胎期第 12.5 天可发现血管迂曲、密度增大; 在出生时即出现许多肉眼可见的血肿和频发的脑实质出血。80% 的小鼠会有脑穿通畸形, 所有小鼠均有脑出血表型 (全外显), 出血部位会随时间而变化: 1 月龄小鼠表现为小血管病, 在皮层、脑内灰质核团、脑干、小脑可以出现许多小的含铁血黄素沉积; 3 月龄的小鼠前述病变清除, 在基底节可出现少数体积较大的血肿、血红蛋白降低及含铁血黄素沉积, 提示反复颅内出血; 随着小鼠年龄增大, 会出现巨大血管和血栓形成。该模型可用于研究脑出血的环境影响因素和遗传因素。

4.3.6 各种基因修饰模型对比

对各种基因修饰 sICH 动物模型的构建方法及优缺点进行比较, 见表 1。

4.4 动物模型神经行为评价技术

神经功能包括意识状态、运动、感觉、视觉、共济和神经反射等。神经功能损伤检测结果不仅是判断模型制作成功与否的验证性指标, 也是保证模型同质性的质控指标, 同时还是评估治疗效果的重要依据。

在 sICH 动物实验研究中经常使用的神经行为评分系统主要有: Bederson 评分^[145], 可用于检测运动功能 (表 2); Zea-Longa 评分^[146], 可用于检测运动功能 (表 3); 平衡木测试^[147], 可用于检测运动和平衡功能 (表 4); 改良 Garcia 评分^[148], 可用于检测运动和感觉功能 (表 5); 改良神经系统严重程度评分 (modified neurological severity score, mNSS)^[149], 可用

表1 sICH基因修饰动物模型的比较

Table 1 Comparison of genetically modified animal models for sICH

模型类别及构建方法 Model categories & construction methods	优点 Advantages	缺点 Disadvantages
自发性高血压脑出血R ⁺ /A ⁺ 双转基因模型:给予高盐饮食和含L-NAME的饮用水,诱导R ⁺ /A ⁺ 双转基因自发性高血压小鼠产生更严重的高血压,从而引发sICH ^[12]	模型小鼠出血位置为脑干、基底节和小脑,与人类sICH部位相似 ^[12] 。是研究临床sICH较理想的基因修饰动物模型	(1)造模药物不仅对小鼠肾脏和心脏有影响,也会在该模型上试验新药的药代动力学和药效学 ^[18] ; (2)培育时间长,小鼠需超过10月龄才能发生sICH ^[18]
脑淀粉样血管病脑出血转基因模型:用过表达APP的转基因小鼠建立了5种脑淀粉样血管病模型 ^[18] ,包括APP23转基因小鼠、Tg-SwDI转基因小鼠、APP Dutch转基因小鼠、Tg2576转基因小鼠和ADanPP7转基因小鼠	(1)适用于脑淀粉样血管病相关sICH和小动脉完整性的分子机制研究 ^[18, 112] ; (2)APP23转基因模型小鼠在27月龄可发生反复和大量的出血,是研究脑淀粉样血管病相关sICH较理想的模型 ^[113-114]	(1)缺乏sICH表型的具体描述,且无法比较不同模型的严重程度 ^[18] ; (2)仅AD-anPP7转基因小鼠模型被报道出现过出血相关症状,其他4种模型的出血量均较小 ^[120]
动静脉畸形出血基因工程模型: (1)Alk1条件性基因敲除小鼠 ^[126] ; (2)Kras条件性基因敲入小鼠 ^[127] ; (3)Notch4基因相关基因敲除小鼠 ^[124] ; (4)MGP基因敲除小鼠 ^[131] ; (5)Rbpj基因敲除小鼠 ^[132] ; (6)Itgb8和smad4条件性基因敲除小鼠 ^[133] ; (7)Endoglin基因敲除小鼠 ^[130]	可用于研究脑动静脉畸形血管易损伤的分子机制 ^[125]	(1)制作困难,价格高昂,死亡率高,使用较少; (2)缺乏对sICH表型的细节描述 ^[139]
脑海绵状血管畸形相关基因修饰模型: (1)Ccm2基因相关脑海绵状血管畸形模型 ^[137] ; (2)Ccm1 ^{+/-} /Msh2 ^{-/-} 双基因敲除小鼠模型 ^[140]	可用于研究脑海绵状血管畸形的分子机制	(1)制作困难,价格高昂,死亡率高,使用较少; (2)部分模型缺乏对sICH表型细节描述
胶原蛋白脑出血基因工程模型: Col4a1突变小鼠 ^[144]	可用于研究sICH的环境影响因素和遗传因素 ^[144]	多数小鼠在早期死亡;存活小鼠在胚胎期即可发生sICH,且随年龄增大而加重 ^[144]

表2 Bederson评分

Table 2 Bederson score

分类 Classification	等级 Grade	神经缺损表现 Manifestations of neural deficits
正常	0	未观察到神经缺损
中等	1	瘫痪侧前肢内收并屈曲于腹下(提尾悬空试验阳性)
严重	2	向瘫痪侧推动大鼠,阻力较正常侧降低(侧推试验阳性),没有向正常侧转圈行为
	3	除2级表现外,伴有向正常侧转圈行为,或爬行时向瘫痪侧倾倒

检测方法:提起大鼠的尾巴,使动物距离台面10 cm高,正常大鼠的前爪处于伸直状态,模型大鼠存在神经行为异常表现

等级说明:评价等级越高,说明神经损伤越严重

优点: (1)操作简单; (2)从整体上反映动物神经损伤程度,可进行定性和半定量评价

缺点: (1)检测方法相对粗糙和主观; (2)多用于早期神经损伤检测,不能全面反映远期神经损伤程度

表3 Zea-Longa评分

Table 3 Zea-Longa score

分类 Classification	神经缺损表现 Manifestations of neural deficits	评分 Scores
没有神经功能缺损	正常站立或爬行	0
轻度神经功能损伤	提尾时瘫痪侧前肢内收屈曲,不能完全伸展	1
中度神经功能损伤	爬行时向瘫痪侧转圈	2
重度神经功能损伤	站立或爬行时,向瘫痪侧摔倒	3
	没有自发性爬行,伴意识水平降低	4

评分说明: (1)5级0~4分制评分系统。基础分为1分,如果没有基础分,则2~4分的评分视为无效。 (2)分值越高,说明神经功能缺损越严重

优点: 操作简单

缺点: (1)检测方法相对粗糙和主观; (2)仅用于检测早期神经功能损伤,不能反映远期神经功能损伤程度

表4 平衡木测试

Table 4 Balance beam test

神经缺损表现	评分
Manifestations of neural deficits	Scores
能够顺利爬过横杆,四肢完全发挥作用,无明显神经损害体征	7
能够爬过横杆,瘫痪肢体发挥作用 > 50%	6
能够爬过横杆,瘫痪肢体发挥作用 < 50%	5
不能顺利爬过横杆,跌落率 < 50%	4
无法顺利爬过横杆,跌落率 > 50%	3
不能在横杆上爬行,但可以坐在上面	2
根本爬不上横杆,无法将后腿放在水平位置,如果放在横杆上就会掉落下来	1

检测方法:将一根长度为 80 cm、宽度为 2.5 cm 的横杆一端放在地下,另一端以 60°角斜靠在墙面。逐个将动物放到木板上,通过观察动物在横杆上的行走能力评估其运动功能

评分说明:评分为 1~7 分,分值越小,说明神经功能缺损越严重。

优点:(1)装置简单,容易修改以适应不同测试需求;(2)可用于短期和长期运动功能损伤评估

缺点:(1)仅适用于较活跃的啮齿类动物,不适用于活动较少的动物;(2)测试方法未标准化,木条的宽度、长度、形状等均未统一

表5 改良 Garcia 评分

Table 5 Modified Garcia score

测试项目	神经缺损表现	评分
Test item	Manifestations of neural deficits	Scores
自主运动:观察动物在鼠笼内 5 min 的活动	活动正常	3
	轻度受限	2
	中度受限	1
	严重受限	0
体态对称性:提尾使之悬空,观察四肢状态	体态对称	3
	体态不对称	2
	偏瘫	1
前肢伸展功能:提尾悬空后肢,将前肢放在桌面,观察前肢伸展运动状况	对称	3
	轻度不对称	2
	显著不对称	1
	偏瘫	0
攀爬力和握力:攀爬和抓紧鼠笼的能力	攀爬容易,抓持有力	3
	攀爬困难,瘫痪侧抓持无力	2
	不能攀爬或转圈	1
双侧身体触觉	双侧对称	3
	瘫痪侧反应迟钝	2
	瘫痪侧无反应	1
双侧胡须触碰反应	对称	3
	不对称	2
	瘫痪侧无反应	1

评分说明:分值为 4~18 分,18 分为正常。分值越大,表示神经功能损伤越轻

优点:综合评估运动、感觉、反射功能,可用于短期和长期神经功能评估

缺点:评价参数多,操作较复杂

于综合检测运动和感觉功能(表6)。

值得推荐的是,Hartman 等^[150]对 Garcia 评分系统作了修改,设计出一个专门用于 sICH 大鼠模型的神经功能评估系统(表7),可用于综合评估运动、感觉、认知和学习等神经功能缺损。

对于 sICH 模型动物表现出的学习和记忆能力障

表6 改良神经系统严重程度评分

Table 6 Modified neurological severity score

测试项目	神经缺损表现	评分
Test item	Manifestations of neural deficits	Scores
运动功能:		
(1)提尾试验	前肢屈曲	1
	后肢屈曲	1
	后头部在 30 s 内偏离垂直轴 > 10°	1
(2)将大鼠放置于地板上	正常行走	0
	不能直线行走	1
	向偏瘫侧转圈	2
	向偏瘫侧倾倒	3
感觉功能:		
(1)放置试验 (视觉和触觉测试)	离桌面 10 cm 处 45° 倾斜靠近桌面, 反应延迟	1
	向桌子边缘压迫鼠爪刺激肢体肌肉, (深感觉测试) 无反应	1
(3)平衡木试验	稳定、平衡的姿势	0
	紧抓平衡木边缘	1
	紧抱平衡木, 一侧肢体从平衡木垂落	2
	紧抱平衡木, 双侧肢体从平衡木垂落, 或在平衡木上转圈 (> 60 s)	3
	试图在平衡木上保持平衡但跌落 (> 40 s)	4
	试图在平衡木上保持平衡但跌落 (> 20 s)	5
	跌落, 或未尝试保持平衡, 或挂在平衡木上 (< 20 s)	6
反射功能:		
(1)耳廓反射	接触外耳道时摇头	1
(2)角膜反射	用棉花轻触角膜时眨眼	1
(3)惊恐反射	对快弹硬纸板产生的短暂噪音有运动反应	1
(4)癫痫、肌阵挛、出现一种即得 1 分肌张力减退		1

评分说明:总分 18 分,评分越高,表示神经损伤越严重。13~18 分为严重损伤;7~12 分为中度损伤;1~6 分为轻度伤害

优点:综合评估运动、感觉、反射和平衡功能,可用于长期神经功能缺损评估

缺点:(1)评价参数多,操作复杂;(2)仅适合评估基底节而非所有脑区神经功能缺损

表7 脑出血大鼠神经功能评分系统

Table 7 Neurological function scoring system in ICH rats

测试项目 Test item	评分 Scores			
	3	2	1	0
自发活动 (在常规鼠笼内观察5 min)	大鼠在笼盒里到处移动、探索环境、爬到鼠笼上缘≥3个侧面	大鼠在笼盒里笨拙地到处移动探索、爬到鼠笼上缘<3个侧面	重症大鼠根本没有向上爬行，在鼠笼里几乎没有移动	大鼠完全没有移动
肢体运动对称性 (尾部悬挂)	四肢对称伸展	一侧肢体较对侧伸展更少或更慢	一侧肢体活动很少	一侧肢体完全没有移动 (偏瘫)
前肢伸展 (尾巴悬挂，前爪悬在桌子上)	双侧前肢伸直，用双侧前爪对称地行走	前爪行走受损，伸展不对称	一侧肢体活动很少	一侧肢体完全没有移动 (偏瘫)
攀爬 (在45°角的台面上进行)	牢牢抓紧鼠笼钢丝，很容易地爬到笼顶	肢体不对称地攀爬，或无力抓紧鼠笼钢丝	不能攀爬或只能转圈	大鼠完全没有移动
轴向感觉 (从后背轻微刺激躯干)	对躯干两侧的刺激，大鼠都同样受到惊吓	一侧身体的反应慢于另一侧	对一侧躯体的刺激没有反应	一侧肢体完全没有移动 (偏瘫)
本体振动感觉 (从后背轻轻触摸)	对身体两侧的棉花束触碰，大鼠都会同样地转头	一侧身体的反应慢于另一侧	对一侧躯体的刺激没有反应	一侧肢体完全没有移动 (偏瘫)
评分方法:通过6项功能测试,综合评估大鼠神经功能				
评分说明:每项测试可能得分为0~3分,0分最差,3分最好。总分最低0分,最高18分				
优点:一种专用于ICH大鼠模型的神经功能评价方法,可用于检测短期和长期的运动、感觉、平衡、认知等神经功能缺损				
缺点:尚未见关于该评分系统缺点的报道				

碍，目前常采用跳台法、避暗法、穿梭箱法来测定动物一次性被动回避反射能力；使用Y形水迷宫实验、Morris水迷宫实验和八臂迷宫实验等评价动物的空间学习和记忆能力。

5 临床前药物试验设计要点

5.1 实验合法合规

使用实验动物进行临床前药物试验，需要严格遵守我国的相关法律法规和标准规范。在我国，实验动物管理属于行政许可范畴，实行实验动物许可证管理制度，有一系列的法规和标准。其中规定：实验动物必须来自具有“实验动物生产许可证”的单位，动物实验单位必须具有“实验动物使用许可证”，动物实验设施环境指标应符合国家标准GB 14925—2023的要求，否则实验（或试验）结果不予认可。以注册为目的的药物非临床安全性评价应该在GLP（Good Laboratory Practice）实验室内完成，其他药物非临床安全性评价和药效学研究应在具备“实验动物使用许可证”的实验室进行。

5.2 动物种属选择

在sICH的临床前药物试验中，选择合适的动物种属非常重要。考虑到不同种属动物间的遗传差异和生理学特征，需要选择与人类在基因组水平上高度相似的动物种属，从而提高研究的可靠性和外推性^[142]。

用于sICH研究的动物有非人灵长类动物、猫^[151]、犬^[152]、猪^[153]、兔^[6]、鼠^[154]、绵羊^[63]，其中小鼠、大鼠和猪是最常使用的物种^[81]。比较不同种属动物用于sICH建模的优缺点，见表8。

5.3 动物模型选择

选择合适的动物模型建立方法并遵循标准的操作流程，对于实验的可靠性和准确性至关重要。在针对sICH的药物临床前动物实验中，必须选择最适合拟解决的关键问题和主要测试目标的动物模型，以获得最佳的转化价值。现有模型在技术和临床相关性方面有不同的优缺点，其适用的研究领域也不同，见表9。

5.4 药物安全性和有效性评估

药物安全性和有效性评估是sICH临床前药物试验的核心环节。严谨的实验设计和规范的操作流程对于准确评估药物疗效、提高研究的可靠性和外推性非常重要。药物安全性和有效性评估实验设计要点包括如下几个方面：

（1）评价指标：选择科学、客观、敏感的评价指标，如死亡率、出血面积、神经功能缺损评分等，并明确各指标的具体检测方法、观察时间点和观察频次等。

（2）给药途径：根据药物性质和实验要求，选择合适的给药途径，如口服、注射、脑室内注入等。

（3）给药时间：需要根据sICH模型特点和试验目

表 8 sICH 建模动物比较

Table 8 Comparison of different animals for sICH modeling

动物 Animals	优点 Advantages	缺点 Disadvantages
非人灵长类动物	与人类基因相似度超过 90 % , 而且生理功能和大脑构造等都与人类接近, 是临床前研究的理想实验动物。适合于 sICH 神经生理和病理研究、新药研发和外科创新技术转化研究 ^[155]	(1) 饲养管理条件要求复杂, 一般需要大型动物饲养间; (2) 监管和监督严格, 限制了灵长类动物的使用; (3) 实验动物资源稀缺, 价格昂贵; (4) 生物安全问题 ^[156] , 如疫病监测, 与人之间存在较多的人兽共患病; (5) 实验操作安全问题, 如需要严格参照实验室标准操作规程进行, 且动物体型较大, 具有一定的攻击性, 需要专业人员捕捉; (6) 伦理和动物福利问题, 如需要提供更充分的科学依据和伦理论证, 更加严谨地评估研究伤害-获益比, 考虑使用的必要性和意义、采取有效的措施以保证动物福利, 以及实验完成后如何妥善处置动物等问题
猫	适合于生理学及神经生理学研究。实验用猫的质量直接影响到研究结果及临床试验质量 ^[157]	(1) 目前仅有自体血注入猫 ICH 模型, 且很少使用; (2) 目前实验用猫仍未被纳入标准化实验动物管理范畴, 缺乏相关国家标准, 其遗传背景、年龄、微生物和寄生虫携带状况不清, 无质量合格证明, 检测实验室面临巨大的生物安全风险; (3) 血液生化等背景参考数据有限, 有待进一步积累。这些都可能带来实验数据不准确、实验结果不可靠、重复性差等问题
犬	是最早用于建立实验性脑出血模型的动物品种, 通过自体血注入方法, Steiner 等在 1975 年就确定了犬不同脑室出血的致死量; (2) 目前已建立犬自发性高血压 ICH 模型; (3) 脑体积较大, 便于手术操作以及精细观察生理和病理变化 ^[155] ; (4) 自体血注入犬 ICH 模型已被广泛用于神经生理学和病理生理学机制研究, 以及 CT、MRI、超声等影像检查以及药物治疗和手术干预等方面的研究; (5) 犬和人类在体型大小、心血管生理和解剖结构等方面较相似, 可应用于人类临床诊断成像方式和治疗设备的临床前试验 ^[158] ; (6) 与啮齿类动物相比, 循环血容量更大, 便于连续血液采样 ^[159]	(1) 价格较贵, 来源较少, 需要大型动物笼舍; (2) 作为人类陪伴动物, 用于实验研究时同样受到严格监管, 道德和文化上的原因制约其在生物医学研究中的使用 ^[160]
猪	(1) 仔猪模型的脑血肿体积可能比啮齿类动物高出 20 ~ 30 倍, 适合模拟人类 sICH 的病理生理学过程, 用于开发新的外科手术技术 ^[161] ; (2) 猪模型近年来已被广泛应用于脑出血诊疗相关的新型脑内监测仪研发、新治疗方法探索、溶栓药物和血肿清除术疗效评估等临床前研究 ^[90-91]	(1) 需要大型动物间; (2) 不能以简单、直接的方式评估模型手术切除血肿的效果
兔	(1) 体型中等, 脑体积明显大于啮齿类, 便于手术操作和标本收集, 更适于神经影像学、外科技术和急性脑损伤病理生理等方面的研究 ^[155] ; (2) 与大动物比较, 使用成本较低, 建模成功率高, 死亡率偏低, 允许进行更长时间的研究; (3) 与人类有相似的脑血管形态特征, 在发生 ICH 时, 脑血管的生理学和化学变化与人类相似 ^[90] ; (4) 基底节区相对发达, 定位相对容易, 耳缘静脉取血方便, 出血后神经功能缺损明显 ^[162]	(1) 群居性差, 同性别成年兔群居饲养会发生斗殴咬伤; (2) 胆小易受惊吓, 产生应激反应; (3) 缺乏转基因系统, 在研究基因组效应方面的应用有限
啮齿类	(1) 大鼠和小鼠价格便宜, 体型较小, 繁殖快, 容易饲养, 是 sICH 研究中最常用的动物; (2) 小型啮齿类动物的全身麻醉和给药更容易, 可以开发大量的实验模型 ^[13] ; (3) 基因修饰小鼠模型被广泛使用, 是研究 sICH 遗传学机制的最佳动物模型; (4) 人类 sICH 的发生部位多为基底节区, 大鼠也拥有基底节区, 其中尾状核为脑内最大核团, 容易定位; (5) 可以提供好的成本效益, 准确的检测和结果模式, 以及大量可用于免疫组织化学和分子生物学的试剂样本	(1) 大鼠和小鼠脑回缺乏、白质相对稀少, 与人类大脑的相似性较差; (2) 脑体积小, 限制了可产生血肿的大小, 并且难以用于人体检查仪器和外科手术研究; (3) 拥有无法比拟的再生和康复能力 ^[6]
绵羊	(1) 诱导的 sICH 病变可控性好、可重复性高; (2) 适用于 sICH 神经影像学, 而且可重复性高 ^[63]	(1) 使用率低; (2) 大型动物饲养、实验困难

表9 sICH动物模型比较

Table 9 Comparison of animal models for sICH

模型 Models	优势 Advantages	劣势 Disadvantages	适用研究领域 Applicable research areas
胶原酶诱导模型	(1)操作简单,重复性好,注射位置准确,出血量可控 ^[163] ; (2)能够模拟sICH患者自然发生的持续出血和血肿扩张过程,脑组织学变化与人类一致,是最接近人类sICH的动物模型 ^[163] ; (3)有典型的神经功能障碍,可作为评价脑出血后神经功能缺失和促功能恢复的干预手段效果评价的工具模型 ^[164] ; (4)最适合大鼠和小鼠等小动物,并允许在转基因小鼠上应用 ^[163] ; (5)已开发出胶原酶注射诱导猪ICH模型 ^[153]	(1)出血是弥漫性的,是胶原酶注射部位周围小血管破裂的结果,其血肿形成较慢 ^[165] ; (2)胶原酶引起广泛的炎症反应 ^[165] ,不适用于研究脑出血后的炎症反应机制; (3)胶原酶有细胞毒性作用 ^[164] ,不能完全模拟人类sICH继发性损伤的病理生理	(1)常用于啮齿类动物模型,尤其适用于研究sICH病理生理机制,以及脑血肿形成和血肿扩张、血管源性水肿、血脑屏障损伤、轴突变性、细胞凋亡、内皮障碍和脑卒中后的全身并发症 ^[18] ; (2)大鼠、小鼠模型尤其适合于sICH潜在治疗方法,如脑部超低温、人促红细胞生成素等的临床前研究,以及微小RNA、外泌体、纳米颗粒等新兴治疗探索等 ^[6, 90-91, 166]
自体血注入模型	(1)操作简单,重复性好,出血位置准确,出血量一致 ^[93-96] ; (2)方法无菌且不使用外来物质,可模拟人类sICH自然出血和血液凝固过程 ^[93-96] ; (3)适用于所有物种,其中大鼠和小鼠尾状核注血模型使用最普遍 ^[167] ,并允许在转基因小鼠上应用。通过在额叶或基底神经节注射血液,已开发出兔、猫、犬、猪、羊、猴等多种大型动物模型 ^[159, 168]	(1)不是真正意义的血管破裂出血,不能模拟人类sICH的小血管破裂 ^[91] ; (2)血液容易渗漏进入脑室和/或蛛网膜下腔,虽然两次和三次注血啮齿类动物模型解决了该问题,但增加了操作的复杂性 ^[94-96] ; (3)该模型的神经功能障碍不明显,神经功能评分较低,因此神经学功能需要结合多种行为学评价方法来进行 ^[162]	(1)啮齿类模型尤其适合sICH后血液及血凝块毒性物质如凝血酶、红细胞、补体、氧化应激、细胞凋亡和促炎症级联反应在继发性脑损伤中的作用和机制研究 ^[90-91, 169] ; (2)大鼠、小鼠模型适用于脑部超低温、干细胞等临床前研究,以及微小RNA、外泌体、纳米颗粒等新兴治疗探索等 ^[6, 90] ; (3)兔模型被用于研究sICH成像技术、手术创新、药物治疗、麻醉药物对脑血流动力学和颅内压的影响,以及继发性损伤的病理生理机制等 ^[90] ; (4)犬模型被用于研究sICH成像技术、脑生理学、新治疗方法,以及立体定向血肿抽吸手术的安全性和效果评估等 ^[90] ; (5)猪模型 ^[170] 临床相关性好,适用于sICH病理生理学和病理化学、水肿发展、血液成分的作用和脑组织代谢研究,以及组织纤溶酶原激活物(tPA)诱导血栓溶解后的药物和手术治疗效果评估,深部局部低温疗法、血红素加氧酶抑制剂等疗效评价等 ^[90]
微气球充盈模型	微气球充盈产生机械性占位效应,可模拟不同大小血肿对脑组织的压迫效果 ^[171]	(1)没有产生真实的血肿,不能模拟血液和随后血凝块释放物质引起的继发性脑损伤 ^[101] ; (2)易造成不可逆脑损伤,无法评估继发性脑损伤 ^[171-174]	大鼠模型可用于评估占位效应、颅内压、脑血流量,以及血肿清除的效果等 ^[101-102, 172]
高血糖诱导脑出血后血肿扩大模型	部分模拟了在糖尿病基础上发生sICH的临床情况 ^[103]	建模动物为年轻雄性小鼠,需进一步明确性别和年龄依赖性的影响 ^[103]	可用于糖尿病对sICH发生的影响、脑血肿扩大的原因和机制等研究 ^[175]
自发性高血压脑出血模型	(1)SHRsp与人类动脉硬化高血压sICH的病理生理和发病过程最接近 ^[104] ; (2)RHRsp模型的血压峰值高,术后210 d内平均血压峰值为(17.2±1.1)kPa,存在与人类sICH相似的高血压动脉硬化病理生理基础 ^[105]	(1)SHRsp模型价格昂贵,来源困难,饲养困难,易变种及断种,实验时间长等 ^[104] ; (2)RHRsp不是单纯的sICH模型,而是脑梗死、脑出血及混合性脑卒中并存 ^[105] ; (3)重复性差,脑损伤大小和位置都不可预测 ^[104-105]	适用于sICH病理生理机制研究 ^[104-105] 。该模型可以从以下几个方面进行药效评估: (1)RHRsp大鼠模型的生存期; (2)脑出血后运动功能障碍的改善情况; (3)脑系数; (4)组织形态学方法检测脑水肿程度、海马CA1区神经元变性和细胞数目; (5)脑出血后病灶吸收速度、小胶质细胞及毛细血管增生情况
基因修饰动物模型	(1)小鼠双转基因(R ⁺ /A ⁺)高血压脑出血主要发生于基底节、脑干和小脑等部位 ^[12] ,与人类sICH多发部位相似; (2)部分模型更能反映临床情况,如APP23转基因小鼠模型27月龄可发生反复及大量的出血,可能是研究脑淀粉样血管病相关脑出血的最佳动物模型 ^[113-114]	(1)价格昂贵,制作困难,实验时间长,动物死亡率高 ^[18, 112, 126] ; (2)转基因模型的出血时间、数量、大小和位置都不可预测,且无法比较不同模型脑出血的严重程度 ^[18, 112, 126]	(1)转基因啮齿类动物模型可用于研究sICH的基因发病机制及遗传因素对脑出血恢复的影响等 ^[18] ; (2)转基因小鼠模型适用于特定疾病(如脑淀粉样血管病、动静脉畸形)相关性sICH研究 ^[18, 113-114, 126]

的选择合适的给药时间点,如出血发生后立即给药、24 h内给药等。

(4) 对照组: 设立已上市同类药品阳性对照组,以评估药物的有效性; 设立假手术组、生理盐水组等阴性对照组,以消除手术和环境等因素对实验结果的影响。

5.5 药物剂量探索和优化

剂量探索和优化是临床前药物试验的重要环节。药物剂量与药物疗效和毒性直接相关,合适的剂量应当在保证动物安全前提下尽可能发挥最大效能^[176]。通过系统地调整药物剂量、观察不同剂量下的治疗效果,最终有可能找到最佳药物治疗剂量,以确保药物的安全性和有效性。在sICH临床前药物试验的药物剂量探索和优化时,应重点考虑下列因素:

(1) 安全剂量和给药频率的估算: 应尽可能全面收集拟试验药物的前期研究数据如理化性质和药代动力学等,用于估计最低起效剂量和最低毒性剂量; 同时明确药物在体内的消除方式、代谢时间、药-时曲线等,根据这些数据可估算药物的安全剂量和给药频率^[177-179]。

(2) 动物种属及给药途径的差别: 应考虑到不同动物种属和不同给药途径下给药剂量的显著差别^[177-179],如啮齿类动物和灵长类动物的可接受剂量完全不同,同一种属动物颅内给药和静脉给药的剂量亦明显不同。

(3) 不同种属动物间的给药剂量换算: 在进行某一种属动物的剂量探索时,需要对同一药物在不同种属动物之间的给药剂量进行换算,目前最公认和最常用的方法是单位体表面积法。需要注意的是,换算得到的剂量只可作为剂量探索的参考,不能直接作为最终剂量使用^[177-179]。

(4) 剂量探索试验的设计: 剂量探索试验是药效学评价的初始步骤,其目的是尽早对药物的开发价值定性,并定位大致的起效剂量范围。其设计要点如下。

①实验模型: 与后续正式的药效学实验一样,应当选择最接近临床病理改变和病程发展过程的动物模型。可从同类产品中获得信息,有助于确定潜在的实验模型,并预测/评价拟试验药物在该模型中的安全性和疗效问题。②实验规模: 一般样本量较小,约为正式实验样本量的一半。例如拟使用啮齿类动物的药效实验,在实践中其探索实验一般不超过6只/组,通常使用单性别动物,必要时开展双性别动物实验。③实验终点:

优先选择临床获益相关性大的实验终点,通常不做机制研究,不额外增加实验成本。④剂量设计: 一般仅设立阴性对照组和低、中、高3个药物剂量组,其中低、高剂量分别为估算的最低起效剂量和最低毒性剂量。剂量设计通常选择较大的剂量间距,争取在较大范围内发现药物是否有效及大致有效水平^[179]。在通过探索试验获知药物的起效剂量水平后,还需要在后续的正式实验中进行进一步确认。正式实验的剂量设计原则通常是: 不再设立较大的剂量组间距,而希望在较小的剂量范围内精确描述药物的剂量反应关系。⑤实验操作: 动物实验不可避免地受到人为影响,不同操作者的手法偏好等会对实验造成潜在影响,故探索实验与后续正式实验的操作者需要保持一致,实验动物的种属及来源也必须保持一致。

5.6 给药途径和方法确定

在sICH药物临床前试验中,应根据试验要求和目的选择合适的给药途径和方法,能够提高治疗效果并减少不必要的不良反应。同时还应关注给药操作的规范性和准确性,以减少操作误差对实验结果的影响。其要点如下:

(1) 新药的给药途径由药物的理化性质及药理药代特点决定^[179]。给药途径的选择需要以在靶部位实现最大药物暴露为目的,同时也要考虑病人的依从性及临床可实现性。对于口服生物利用度较低的药物,可以考虑注射途径。需要注意的是注射给药会带来新的问题,如依从性降低、临床风险上升及药学要求增加等。在脑出血新药开发中,除常规途径之外,还可以考虑经鼻脑途径实现脑部给药,能够绕过血脑屏障,最大程度递送药物。目前已经有多款作用于中枢神经的药物采用鼻喷制剂,并成功上市。

(2) 临床前试验的给药途径需与临床保持一致或最大程度地模拟临床。对于临床上的胶囊或片剂口服药物,在临床前试验中给药途径和方法一般是: 小动物通常采用灌胃的方式; 大动物可灌胃也可以直接给予制剂。对于临床上注射使用的药物,在动物实验中也应以注射方式给药。若无过敏反应或急性反应,动物静脉注射时间可以较为迅速,否则需要缓慢推注以保持与临床操作一致。由于皮下注射不同部位可能带来药物吸收速率的差异,导致药物起效时间及药效差异。因此在进行皮下注射时,需要明确具体注射部位并进行多点注射。

(3) 若无确定的临床拟用途径,则需根据用药阶

段、药物特点（作用机制、药代动力学）等方面考虑给药途径和方法，具体如下。①预防用药：sICH通常发病急，发病前无征兆^[180]，临床上通常根据患者的发病可能性而选择预防用药，如为预防家族遗传、高血压、高血糖、高血脂、高胆固醇等患者发生sICH而使用的保健类药品^[181]。从携带及服用便利性角度考虑，这类药物应优选口服用药途径，或根据药物特点选择其他给药途径。在预防性药物的动物实验给药方案设计时，可重点关注灌胃给药途径。②治疗/发病后用药：急性发病期需要及早干预、尽快起效，可选择颅内或静脉注射途径；对于主要发挥清颅内血肿、降血压作用的药物，在动物实验设计时也应以内注射或静脉注射为主。并且需要选用合适的造模方法，避免因造模操作不当导致动物过早死亡而无法评价药效。发病后治疗主要针对神经功能受损，使用促进神经生长和预防复发类药物，应根据药物作用机制和药代动力学数据选择合适的给药途径。由于康复治疗的时间较长，因此在临床前药物试验中不宜选用对动物伤害较大的给药方式，如颅内注射等。

5.7 药效学实验设计和数据分析方法

药效学实验是新药开发的基石。药效研究应当反映预期的临床应用和适应症，应遵循科学的实验设计和数据分析方法，确保实验过程的规范性和结果数据的可靠性。

5.7.1 药效学试验实验设计要点

(1) 组别设计：需要设立正常对照、疾病模型阴性对照、待试药物的2~3个剂量组以及市售阳性药物对照。其中市售对照优先选择与新药作用机制相似的临床用药，其次选择临床主流用药，以评价药物的药效强度及特点。

(2) 模型的选择：由于临床病理病程的多样性，以及临床前动物模型的病理过程多为人为诱发，动物模型的病理与临床往往仅会部分一致，很难用一个模型完整地模拟所有临床情况。因此，通常需要使用1种以上的动物物种或2个以上的模型确认新药的药效。除了最大程度符合临床之外，还需要提高造模的成功率，产生稳定一致、重复性好、精确度高的血肿。模型的严重程度不宜过重，造模出血可预期，一般不建议造成严重出血。严重的脑出血（或注入过量的自体血）对于任何药物治疗都是极大挑战。处于概念验证阶段的新药，在模型选择和实验设计中，建议选择程度合适的脑出血模型，以便清楚地判断药效。为提高

实验的精度，需要提高不同组别动物模型严重程度的一致性。建议建立相应的模型评价终点和标准，用于模型的严重程度和一致性评估，确保不同组别动物的严重程度不存在较大差异。

(3) 样本量的确定：需要根据实验体系的灵敏度来调整，并且满足统计学要求。以啮齿类为例，每组动物一般不少于10只^[182]。

(4) 给药时间：早期探索阶段通常优先采用预防给药；后续的药效学研究则需要尽可能在给药干预时间上接近临床治疗时间。

(5) 药效评估：可靠的生物标志物可以反映病理病程的改变，有利于临床前动物数据向临床的转化。建议：①根据药物作用特点设置相关的生物标志物检测，并且应当对生物标志物的分析方法学及其效能特点进行充分的描述；②根据药物的药代动力学及药理机制特点设置药效检测时间点，进行神经行为学和影像学等的检测。尤其需要重视的是，神经行为学评分需要进行盲法设计，以排除可能存在的主观倾向性。

5.7.2 数据管理与分析

新药开发需要保证全过程信息的真实、准确、完整和可追溯^[183]。在药效学研究中需要建立实验数据、实验体系及实验过程管理体系，确保数据的真实、准确、完整和可追溯性。数据统计与分析是评价药效学试验结果的重要工具，帮助研究者定量分析变异对实验结果的影响，从中归纳出具有规律性的结论。数据统计与分析需关注的要点如下：(1) 在实验开始前就需要根据数据出现的特点选择相应的统计方法；(2) 需要识别非药物因素导致的可疑的异常数据（特别大或特别小的数据），剔除额外干扰因素的影响^[182]；(3) 对实验结果的评价，既要考虑统计学显著性，也要考虑生物学意义。

5.8 实验伦理和动物福利

在sICH临床前药物试验中，应遵循法律法规和伦理原则，保障实验动物的福利和权益。实验动物福利管理内容以动物实验伦理为重点^[184]，涵盖“3R原则”（即代替、减少、优化原则）、麻醉、镇痛、人道终点、安乐死等方面，是保证动物实验结果真实可靠的前提。其中包括：

(1) 动物福利：尊重实验动物的“五大自由”（即生理、环境、卫生、行为、心理共5个方面的福利）。在动物实验过程中，通过优化实验环境、提供充足的饲养空间和良好的饲养条件、合理安排实验进程、采

用适当的麻醉和镇痛、微量采血^[185]等措施,尽可能减少实验动物的痛苦和牺牲。同时,在实验过程中应密切监测动物的生理指标和行为变化,及时发现并处理动物的病症,以确保动物的安全。在动物实验结束后,采取适当的措施对动物进行安置或执行安乐死,以尊重动物的生命和权益。

(2) 伦理审查:目的是提供独立的伦理审查意见,确保动物实验在保护动物福利、尊重伦理规范的前提下开展,以保证实验的合法性、道德性和可靠性。审查内容主要包括研究者资质、动物选择、实验目的、方法和条件及动物操作等方面,确保临床前药物试验实验符合动物实验伦理原则。

(3) 人类健康和权益:确保研究结果对人类健康和权益有积极影响,符合社会伦理和法律规定。

[作者贡献 Author Contribution]

本指南的制订工作由以下4个专家组(完整名单附后)共同完成:

组织专家组负责确定执笔专家人选,确认指南主题和范围,组织初稿审阅和终稿修订,召集指南制订工作会议等;执笔专家组负责相关文献查阅、筛选和核定,以及指南各章节的起草和修订工作等;共识专家组通过线上会议对指南内容进行研讨和论证,提出意见,达成共识;审稿专家组负责指南的评审工作,评价指南内容的学术质量,并提出修改意见。

[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] GBD 2019 Stroke Collaborators. Global, regional, and national burden of stroke and its risk factors, 1990-2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019[J]. *Lancet Neurol*, 2021, 20(10): 795-820. DOI: 10.1016/S1474-4422(21)00252-0.
- [2] QURESHI A I, MENDELOW A D, HANLEY D F. Intracerebral haemorrhage[J]. *Lancet*, 2009, 373(9675): 1632-1644. DOI: 10.1016/S0140-6736(09)60371-8.
- [3] LIU M, WU B, WANG W Z, et al. Stroke in China: epidemiology, prevention, and management strategies[J]. *Lancet Neurol*, 2007, 6(5): 456-464. DOI: 10.1016/S1474-4422(07)70004-2.
- [4] VAN ASCH C J, LUITSE M J, RINKEL G J, et al. Incidence, case fatality, and functional outcome of intracerebral haemorrhage over time, according to age, sex, and ethnic origin: a systematic review and meta-analysis[J]. *Lancet Neurol*, 2010, 9(2): 167-176. DOI: 10.1016/S1474-4422(09)70340-0.
- [5] FOGELHOLM R, MURROS K, RISSANEN A, et al. Long term survival after primary intracerebral haemorrhage: a retrospective population based study[J]. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2005, 76(11): 1534-1538. DOI: 10.1136/jnnp.2004.055145.
- [6] ZILLE M, FARR T D, KEEP R F, et al. Novel targets, treatments, and advanced models for intracerebral haemorrhage[J]. *EBioMedicine*, 2022, 76: 103880. DOI: 10.1016/j.ebiom.2022.103880.
- [7] O'COLLINS V E, MACLEOD M R, DONNAN G A, et al. 1, 026 experimental treatments in acute stroke[J]. *Ann Neurol*, 2006, 59(3): 467-477. DOI: 10.1002/ana.20741.
- [8] MYSERLIS E P, MAYERHOFER E, ABRAMSON J R, et al. Lobar intracerebral hemorrhage and risk of subsequent uncontrolled blood pressure[J]. *Eur Stroke J*, 2022, 7(3): 280-288. DOI: 10.1177/23969873221094412.
- [9] WANG X, DI TANNA G L, MOULLAALI T J, et al. J-shape relation of blood pressure reduction and outcome in acute intracerebral hemorrhage: a pooled analysis of INTERACT2 and ATACH-II individual participant data[J]. *Int J Stroke*, 2022, 17(10): 1129-1136. DOI: 10.1177/17474930211064076.
- [10] SCHLEICHER R L, LI K R, MYLVAGANAM R, et al. Expression of DEspR in acute intracerebral hemorrhage[J]. *J Stroke Cerebrovasc Dis*, 2022, 31(10): 106685. DOI: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2022.106685.
- [11] HERRERA V L M, GROMISCH C M, DECANO J L, et al. Anti-DEspR antibody treatment improves survival and reduces neurologic deficits in a hypertensive, spontaneous intracerebral hemorrhage (hslCH) rat model[J]. *Sci Rep*, 2023, 13(1): 2703. DOI: 10.1038/s41598-023-28149-3.
- [12] IIDA S, BAUMBACH G L, LAVOIE J L, et al. Spontaneous stroke in a genetic model of hypertension in mice[J]. *Stroke*, 2005, 36(6): 1253-1258. DOI: 10.1161/01.str.0000167694.58419.a2.
- [13] CHEN Y H, CHANG J B, WEI J J, et al. Assessing the evolution of intracranial hematomas by using animal models: a review of the progress and the challenges[J]. *Metab Brain Dis*, 2021, 36(8): 2205-2214. DOI: 10.1007/s11011-021-00828-y.
- [14] JEANNE M, JORGENSEN J, GOULD D B. Molecular and genetic analyses of collagen type IV mutant mouse models of spontaneous intracerebral hemorrhage identify mechanisms for stroke prevention[J]. *Circulation*, 2015, 131(18): 1555-1565. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.114.013395.
- [15] RATELADE J, KLUG N R, LOMBARDI D, et al. Reducing hypermuscularization of the transitional segment between arterioles and capillaries protects against spontaneous intracerebral hemorrhage[J]. *Circulation*, 2020, 141(25): 2078-2094. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.119.040963.
- [16] XIAO N, LIU T L, LI H, et al. Low serum uric acid levels promote hypertensive intracerebral hemorrhage by disrupting the smooth muscle cell-elastin contractile unit and upregulating the Erk1/2-MMP axis[J]. *Transl Stroke Res*, 2020, 11(5): 1077-1094. DOI: 10.1007/s12975-020-00791-3.
- [17] HOSTETTLER I C, SEIFFGE D J, WERRING D J. Intracerebral hemorrhage: an update on diagnosis and treatment[J]. *Expert Rev Neurother*, 2019, 19(7): 679-694. DOI: 10.1080/

- 14737175.2019.1623671.
- [18] ALHARBI B M, TSO M K, MACDONALD R L. Animal models of spontaneous intracerebral hemorrhage[J]. *Neurol Res*, 2016, 38(5):448-455. DOI: 10.1080/01616412.2016.1144671.
 - [19] CANNISTRARO R J, MESCHIA J F. The clinical dilemma of anticoagulation use in patients with cerebral amyloid angiopathy and atrial fibrillation[J]. *Curr Cardiol Rep*, 2018, 20(11):106. DOI: 10.1007/s11886-018-1052-1.
 - [20] MALHOTRA K, THEODOROU A, KATSANOS A H, et al. Prevalence of clinical and neuroimaging markers in cerebral amyloid angiopathy: a systematic review and meta-analysis [J]. *Stroke*, 2022, 53(6):1944-1953. DOI: 10.1161/STROKEAHA.121.035836.
 - [21] SANCHEZ-CARO J M, DE LORENZO MARTÍNEZ DE UBAGO I, DE CELIS RUIZ E, et al. Transient focal neurological events in cerebral amyloid angiopathy and the long-term risk of intracerebral hemorrhage and death: a systematic review and meta-analysis[J]. *JAMA Neurol*, 2022, 79(1): 38-47. DOI: 10.1001/jamaneurol.2021.3989.
 - [22] HOSTETTLER I C, SEIFFGE D, WONG A, et al. *APOE* and cerebral small vessel disease markers in patients with intracerebral hemorrhage[J]. *Neurology*, 2022, 99(12): e1290-e1298. DOI: 10.1212/WNL.00000000000200851.
 - [23] BAI Y, DENG H, SHANTSILA A, et al. Rivaroxaban versus dabigatran or warfarin in real-world studies of stroke prevention in atrial fibrillation: systematic review and meta-analysis[J]. *Stroke*, 2017, 48(4): 970-976. DOI: 10.1161/STROKEAHA.116.016275.
 - [24] WU T T, LV C Y, WU L S, et al. Risk of intracranial hemorrhage with direct oral anticoagulants: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials[J]. *J Neurol*, 2022, 269(2):664-675. DOI: 10.1007/s00415-021-10448-2.
 - [25] BUTCHER K S, NG K, SHERIDAN P, et al. Dabigatran treatment of acute noncardioembolic ischemic stroke[J]. *Stroke*, 2020, 51(4): 1190-1198. DOI: 10.1161/STROKEAHA.119.027569.
 - [26] COCHRANE A, CHEN C, STEPHEN J, et al. Antithrombotic treatment after stroke due to intracerebral haemorrhage[J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2023, 1(1): CD012144. DOI: 10.1002/14651858.CD012144.pub3.
 - [27] PÉTRAULT M, OUK T, PÉTRAULT O, et al. Safety of oral anticoagulants on experimental brain microbleeding and cognition[J]. *Neuropharmacology*, 2019, 155: 162-172. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2019.05.030.
 - [28] HILL C S, BORG A, HORSFALL H L, et al. Cerebral cavernous malformation: management, outcomes, and surveillance strategies - A single centre retrospective cohort study[J]. *Clin Neurol Neurosurg*, 2023, 225:107576. DOI: 10.1016/j.clineuro.2022.107576.
 - [29] CARDOSO C, ARNOULD M, DE LUCA C, et al. Novel chronic mouse model of cerebral cavernous malformations[J]. *Stroke*, 2020, 51(4): 1272-1278. DOI: 10.1161/STROKEAHA.119.027207.
 - [30] CHOKSI F, WEINSHEIMER S, NELSON J, et al. Assessing the association of common genetic variants in EPHB4 and RASA1 with phenotype severity in familial cerebral cavernous malformation[J]. *Mol Genet Genomic Med*, 2021, 9(10): e1794. DOI: 10.1002/mgg3.1794.
 - [31] WEINSHEIMER S, NELSON J, ABLA A A, et al. Intracranial hemorrhage rate and lesion burden in patients with familial cerebral cavernous malformation[J]. *J Am Heart Assoc*, 2023, 12(3): e027572. DOI: 10.1161/JAHA.122.027572.
 - [32] VAN BEIJNUM J, VAN DER WORP H B, BUIS D R, et al. Treatment of brain arteriovenous malformations: a systematic review and meta-analysis[J]. *JAMA*, 2011, 306(18): 2011-2019. DOI: 10.1001/jama.2011.1632.
 - [33] LI H, YAN Z H, HUO R, et al. RNA sequencing analysis between ruptured and un-ruptured brain AVM[J]. *Chin Neurosurg J*, 2022, 8(1):13. DOI: 10.1186/s41016-022-00282-4.
 - [34] LI Q F, DECKER-ROCKEFELLER B, BAJAJ A, et al. Activation of ras in the vascular endothelium induces brain vascular malformations and hemorrhagic stroke[J]. *Cell Rep*, 2018, 24(11):2869-2882. DOI: 10.1016/j.celrep.2018.08.025.
 - [35] NIKOLAEV S I, FISH J E, RADOVANOVIC I. Somatic activating KRAS mutations in arteriovenous malformations of the brain [J]. *N Engl J Med*, 2018, 378(16): 1561-1562. DOI: 10.1056/NEJMc1802190.
 - [36] RIST P M, BURING J E, RIDKER P M, et al. Lipid levels and the risk of hemorrhagic stroke among women[J]. *Neurology*, 2019, 92(19): e2286-e2294. DOI: 10.1212/WNL.00000000000007454.
 - [37] KREL M, MIULLI D E, JUNG H, et al. Minimization of intraparenchymal hemorrhagic stroke size by optimization of serum lipids[J]. *Cureus*, 2019, 11(4): e4406. DOI: 10.7759/cureus.4406.
 - [38] MOUTZOURI E, GLUTZ M, ABOLHASSANI N, et al. Association of statin use and lipid levels with cerebral microbleeds and intracranial hemorrhage in patients with atrial fibrillation: a prospective cohort study[J]. *Int J Stroke*, 2023, 18(10):1219-1227. DOI: 10.1177/17474930231181010.
 - [39] LI Q, ZHANG G, XIONG X, et al. Black hole sign: novel imaging marker that predicts hematoma growth in patients with intracerebral hemorrhage[J]. *Stroke*, 2016, 47(7): 1777-1781. DOI: 10.1161/STROKEAHA.116.013186.
 - [40] MOROTTI A, DOWLATSHAHI D, BOULOUIS G, et al. Predicting intracerebral hemorrhage expansion with noncontrast computed tomography: the BAT score[J]. *Stroke*, 2018, 49(5): 1163-1169. DOI: 10.1161/STROKEAHA.117.020138.
 - [41] WANG X, ARIMA H, SALMAN R A S, et al. Clinical prediction algorithm (BRAIN) to determine risk of hematoma growth in acute intracerebral hemorrhage[J]. *Stroke*, 2015, 46(2): 376-381. DOI: 10.1161/STROKEAHA.114.006910.
 - [42] BROUWERS H B, CHANG Y, FALCONE G J, et al. Predicting hematoma expansion after primary intracerebral hemorrhage [J]. *JAMA Neurol*, 2014, 71(2):158-164. DOI: 10.1001/jamaneurol.2013.5433.
 - [43] MAYER S A, BRUN N C, BEGTRUP K, et al. Efficacy and safety

- of recombinant activated factor VII for acute intracerebral hemorrhage[J]. *N Engl J Med*, 2008, 358(20): 2127-2137. DOI: 10.1056/NEJMoa0707534.
- [44] VAN DER HORST S F B, MARTENS E S L, DEN EXTER P L, et al. Idarucizumab for dabigatran reversal: a systematic review and meta-analysis of indications and outcomes[J]. *Thromb Res*, 2023, 228:21-32. DOI: 10.1016/j.thromres.2023.05.020.
- [45] CONNOLLY S J, MILLING T J Jr, EIKELBOOM J W, et al. Andexanet alfa for acute major bleeding associated with factor Xa inhibitors[J]. *N Engl J Med*, 2016, 375(12): 1131-1141. DOI: 10.1056/NEJMoa1607887.
- [46] CHU H L, GAO Z D, HUANG C Y, et al. Relationship between hematoma expansion induced by hypertension and hyperglycemia and blood-brain barrier disruption in mice and its possible mechanism: role of aquaporin-4 and Connexin43 [J]. *Neurosci Bull*, 2020, 36(11):1369-1380. DOI: 10.1007/s12264-020-00540-4.
- [47] SCHLUNK F, BÖHM M, BOULOUIS G, et al. Secondary bleeding during acute experimental intracerebral hemorrhage[J]. *Stroke*, 2019, 50(5): 1210-1215. DOI: 10.1161/STROKEAHA.118.021732.
- [48] MOROTTI A, SHOAMANESH A, OLIVEIRA-FILHO J, et al. White matter hyperintensities and blood pressure lowering in acute intracerebral hemorrhage: a secondary analysis of the ATACH-2 trial[J]. *Neurocrit Care*, 2020, 32(1): 180-186. DOI: 10.1007/s12028-019-00761-0.
- [49] KLAHR A C, KOSIOR J C, DOWLATSHAHI D, et al. Lower blood pressure is not associated with decreased arterial spin labeling estimates of perfusion in intracerebral hemorrhage [J]. *J Am Heart Assoc*, 2019, 8(11): e010904. DOI: 10.1161/JAHA.118.010904.
- [50] SATTUR M G, SPIOTTA A M. Commentary: efficacy and safety of minimally invasive surgery with thrombolysis in intracerebral haemorrhage evacuation (MISTIE III): a randomized, controlled, open-label, blinded endpoint phase 3 trial[J]. *Neurosurgery*, 2020, 86(5): E444-E446. DOI: 10.1093/neuros/nyz551.
- [51] CHANG C F, MASSEY J, OSHEROV A, et al. Bexarotene enhances macrophage erythrophagocytosis and hematoma clearance in experimental intracerebral hemorrhage[J]. *Stroke*, 2020, 51(2): 612-618. DOI: 10.1161/STROKEAHA.119.027037.
- [52] XU J, CHEN Z Q, YU F, et al. IL-4/STAT6 signaling facilitates innate hematoma resolution and neurological recovery after hemorrhagic stroke in mice[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2020, 117(51):32679-32690. DOI: 10.1073/pnas.2018497117.
- [53] FU X J, ZHOU G Y, ZHUANG J F, et al. White matter injury after intracerebral hemorrhage[J]. *Front Neurol*, 2021, 12: 562090. DOI: 10.3389/fneur.2021.562090.
- [54] YANG Y, CHEN X Z, FENG Z Z, et al. MEC17-induced α -tubulin acetylation restores mitochondrial transport function and alleviates axonal injury after intracerebral hemorrhage in mice[J]. *J Neurochem*, 2022, 160(1): 51-63. DOI: 10.1111/jnc.15493.
- [55] YANG H, NI W, WEI P J, et al. HDAC inhibition reduces white matter injury after intracerebral hemorrhage[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2021, 41(5): 958-974. DOI: 10.1177/0271678X20942613.
- [56] LI M X, XIA M, CHEN W X, et al. Lithium treatment mitigates white matter injury after intracerebral hemorrhage through brain-derived neurotrophic factor signaling in mice[J]. *Transl Res*, 2020, 217:61-74. DOI: 10.1016/j.trsl.2019.12.006.
- [57] YANG Z Y, DONG S S, ZHENG Q Y, et al. FTY720 attenuates iron deposition and glial responses in improving delayed lesion and long-term outcomes of collagenase-induced intracerebral hemorrhage[J]. *Brain Res*, 2019, 1718: 91-102. DOI: 10.1016/j.brainres.2019.04.031.
- [58] FOU DA A Y, NEWSOME A S, SPELLICY S, et al. Minocycline in acute cerebral hemorrhage: an early phase randomized trial [J]. *Stroke*, 2017, 48(10):2885-2887. DOI: 10.1161/STROKEAHA.117.018658.
- [59] ZHOU S Y, CUI G Z, YAN X L, et al. Mechanism of ferroptosis and its relationships with other types of programmed cell death: insights for potential interventions after intracerebral hemorrhage[J]. *Front Neurosci*, 2020, 14:589042. DOI: 10.3389/fnins.2020.589042.
- [60] CHEN B, CHEN Z H, LIU M J, et al. Inhibition of neuronal ferroptosis in the acute phase of intracerebral hemorrhage shows long-term cerebroprotective effects[J]. *Brain Res Bull*, 2019, 153:122-132. DOI: 10.1016/j.brainresbull.2019.08.013.
- [61] SELIM M, FOSTER L D, MOY C S, et al. Deferoxamine mesylate in patients with intracerebral haemorrhage (i-DEF): a multicentre, randomised, placebo-controlled, double-blind phase 2 trial[J]. *Lancet Neurol*, 2019, 18(5): 428-438. DOI: 10.1016/S1474-4422(19)30069-9.
- [62] JIA P J, HE J X, LI Z F, et al. Profiling of blood-brain barrier disruption in mouse intracerebral hemorrhage models: collagenase injection vs. autologous arterial whole blood infusion[J]. *Front Cell Neurosci*, 2021, 15:699736. DOI: 10.3389/fncel.2021.699736.
- [63] BOLTZE J, FERRARA F, HAINSWORTH A H, et al. Lesional and perilesional tissue characterization by automated image processing in a novel gyrencephalic animal model of peracute intracerebral hemorrhage[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2019, 39(12):2521-2535. DOI: 10.1177/0271678X18802119.
- [64] KUNG T F C, WILKINSON C M, DIRKS C A, et al. Glibenclamide does not improve outcome following severe collagenase-induced intracerebral hemorrhage in rats[J]. *PLoS One*, 2021, 16(6): e0252584. DOI: 10.1371/journal.pone.0252584.
- [65] XUE M Z, YONG V W. Neuroinflammation in intracerebral haemorrhage: immunotherapies with potential for translation [J]. *Lancet Neurol*, 2020, 19(12):1023-1032. DOI: 10.1016/S1474-4422(20)30364-1.
- [66] LI Z G, LI Y L, HAN J R, et al. Formyl peptide receptor 1 signaling potentiates inflammatory brain injury[J]. *Sci Transl Med*, 2021, 13(605): eabe9890. DOI: 10.1126/scitranslmed.abe9890.

- [67] HE Y, GAO Y, ZHANG Q, et al. IL-4 switches microglia/macrophage M1/M2 polarization and alleviates neurological damage by modulating the JAK1/STAT6 pathway following ICH[J]. *Neuroscience*, 2020, 437: 161-171. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2020.03.008.
- [68] BAI Q, XUE M Z, YONG V W. Microglia and macrophage phenotypes in intracerebral haemorrhage injury: therapeutic opportunities[J]. *Brain*, 2020, 143(5): 1297-1314. DOI: 10.1093/brain/awz393.
- [69] TSCHOE C, BUSHNELL C D, DUNCAN P W, et al. Neuroinflammation after intracerebral hemorrhage and potential therapeutic targets[J]. *J Stroke*, 2020, 22(1): 29-46. DOI: 10.5853/jos.2019.02236.
- [70] CARMONA-MORA P, ANDER B P, JICKLING G C, et al. Distinct peripheral blood monocyte and neutrophil transcriptional programs following intracerebral hemorrhage and different etiologies of ischemic stroke[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2021, 41(6):1398-1416. DOI: 10.1177/0271678X20953912.
- [71] ZHAO X R, TING S M, LIU C H, et al. Neutrophil polarization by IL-27 as a therapeutic target for intracerebral hemorrhage [J]. *Nat Commun*, 2017, 8(1): 602. DOI: 10.1038/s41467-017-00770-7.
- [72] ZHAO X R, KRUEL M, TING S M, et al. Optimized lactoferrin as a highly promising treatment for intracerebral hemorrhage: pre-clinical experience[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2021, 41(1):53-66. DOI: 10.1177/0271678X20925667.
- [73] HAN R R, LUO J Y, SHI Y C, et al. PD-L1 (programmed death ligand 1) protects against experimental intracerebral hemorrhage-induced brain injury[J]. *Stroke*, 2017, 48(8):2255-2262. DOI: 10.1161/STROKEAHA.117.016705.
- [74] CHENG N, WANG H, ZOU M, et al. Brain-derived programmed death-ligand 1 mediates immunosuppression post intracerebral hemorrhage[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2022, 42(11):2048-2057. DOI: 10.1177/0271678X22116048.
- [75] ZHANG L, WANG H D. FTY720 in CNS injuries: molecular mechanisms and therapeutic potential[J]. *Brain Res Bull*, 2020, 164:75-82. DOI: 10.1016/j.brainresbull.2020.08.013.
- [76] ZHANG L Q, WURI J, AN L L, et al. Metoprolol attenuates intracerebral hemorrhage-induced cardiac damage by suppression of sympathetic overactivity in mice[J]. *Auton Neurosci*, 2021, 234:102832. DOI: 10.1016/j.autneu.2021.102832.
- [77] SONG J R, CHEN W J, YE W. Stroke and the risk of gastrointestinal disorders: a Mendelian randomization study [J]. *Front Neurol*, 2023, 14: 1131250. DOI: 10.3389/fneur.2023.1131250.
- [78] ZHANG Y, YU W P, FLYNN C, et al. Interplay between gut microbiota and NLRP3 inflammasome in intracerebral hemorrhage[J]. *Nutrients*, 2022, 14(24): 5251. DOI: 10.3390/nu14245251.
- [79] YU X B, ZHOU G Y, SHAO B, et al. Gut microbiota dysbiosis induced by intracerebral hemorrhage aggravates neuroinflammation in mice[J]. *Front Microbiol*, 2021, 12: 647304. DOI: 10.3389/fmicb.2021.647304.
- [80] BAI Q, SHENG Z F, LIU Y, et al. Intracerebral haemorrhage: from clinical settings to animal models[J]. *Stroke Vasc Neurol*, 2020, 5(4):388-395. DOI: 10.1136/svn-2020-000334.
- [81] PAIVA W S, ZIPPO E, MIRANDA C, et al. Animal models for the study of intracranial hematomas (Review) [J]. *Exp Ther Med*, 2022, 25(1):20. DOI: 10.3892/etm.2022.11719.
- [82] ROSENBERG G A, ESTRADA E, KELLEY R O, et al. Bacterial collagenase disrupts extracellular matrix and opens blood-brain barrier in rat[J]. *Neurosci Lett*, 1993, 160(1):117-119. DOI: 10.1016/0304-3940(93)90927-d.
- [83] ROSENBERG G A, MUN-BRYCE S, WESLEY M, et al. Collagenase-induced intracerebral hemorrhage in rats[J]. *Stroke*, 1990, 21(5):801-807. DOI: 10.1161/01.str.21.5.801.
- [84] CLARK W, GUNION-RINKER L, LESSOV N, et al. Citicoline treatment for experimental intracerebral hemorrhage in mice [J]. *Stroke*, 1998, 29(10): 2136-2140. DOI: 10.1161/01. str. 29. 10.2136.
- [85] MACLELLAN C L, SILASI G, POON C C, et al. Intracerebral hemorrhage models in rat: comparing collagenase to blood infusion[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2008, 28(3): 516-525. DOI: 10.1038/sj.jcbfm.9600548.
- [86] TANAKA Y, MARUMO T, SHIBUTA H, et al. Serum S100B, brain edema, and hematoma formation in a rat model of collagenase-induced hemorrhagic stroke[J]. *Brain Res Bull*, 2009, 78(4-5):158-163. DOI: 10.1016/j.brainresbull.2008.10.012.
- [87] MACLELLAN C L, DAVIES L M, FINGAS M S, et al. The influence of hypothermia on outcome after intracerebral hemorrhage in rats[J]. *Stroke*, 2006, 37(5): 1266-1270. DOI: 10.1161/01.STR.0000217268.81963.78.
- [88] DEL BIGLIO M R, YAN H J, BUIST R, et al. Experimental intracerebral hemorrhage in rats. Magnetic resonance imaging and histopathological correlates[J]. *Stroke*, 1996, 27 (12): 2312-2319; discussion 2319-2320. DOI: 10.1161/01. str. 27. 12.2312.
- [89] BERAY-BERTHAT V, DELIFER C, BESSON V C, et al. Long-term histological and behavioural characterisation of a collagenase-induced model of intracerebral haemorrhage in rats[J]. *J Neurosci Methods*, 2010, 191(2):180-190. DOI: 10.1016/j.jneumeth.2010.06.025.
- [90] JAMES M L, WARNER D S, LASKOWITZ D T. Preclinical models of intracerebral hemorrhage: a translational perspective[J]. *Neurocrit Care*, 2008, 9(1): 139-152. DOI: 10.1007/s12028-007-9030-2.
- [91] ANDALUZ N, ZUCCARELLO M, WAGNER K R. Experimental animal models of intracerebral hemorrhage[J]. *Neurosurg Clin N Am*, 2002, 13(3): 385-393. DOI: 10.1016/s1042-3680(02) 00006-2.
- [92] MA Q Y, KHATIBI N H, CHEN H, et al. History of preclinical models of intracerebral hemorrhage[J]. *Acta Neurochir Suppl*, 2011, 111:3-8. DOI: 10.1007/978-3-7091-0693-8_1.
- [93] YANG G Y, BETZ A L, CHENEVERT T L, et al. Experimental intracerebral hemorrhage: relationship between brain edema, blood flow, and blood-brain barrier permeability in rats[J]. *J Neurosurg*, 1994, 81(1): 93-102. DOI: 10.3171/jns.

- 1994.81.1.0093.
- [94] DEINSBERGER W, VOGEL J, KUSCHINSKY W, et al. Experimental intracerebral hemorrhage: description of a double injection model in rats[J]. *Neurol Res*, 1996, 18(5):475-477. DOI: 10.1080/01616412.1996.11740456.
- [95] BELAYEV L, SAUL I, CURBELO K, et al. Experimental intracerebral hemorrhage in the mouse: histological, behavioral, and hemodynamic characterization of a double-injection model[J]. *Stroke*, 2003, 34(9):2221-2227. DOI: 10.1161/01.STR.0000088061.06656.1E.
- [96] MA B, ZHANG J. Nimodipine treatment to assess a modified mouse model of intracerebral hemorrhage[J]. *Brain Res*, 2006, 1078(1):182-188. DOI: 10.1016/j.brainres.2006.01.045.
- [97] KNIGHT R A, HAN Y X, NAGARAJA T N, et al. Temporal MRI assessment of intracerebral hemorrhage in rats[J]. *Stroke*, 2008, 39(9):2596-2602. DOI: 10.1161/STROKEAHA.107.506683.
- [98] XUE M, DEL BIGLIO M R. Intracerebral injection of autologous whole blood in rats: time course of inflammation and cell death[J]. *Neurosci Lett*, 2000, 283(3): 230-232. DOI: 10.1016/s0304-3940(00)00971-x.
- [99] YANG D M, KNIGHT R A, HAN Y X, et al. Vascular recovery promoted by atorvastatin and simvastatin after experimental intracerebral hemorrhage: magnetic resonance imaging and histological study[J]. *J Neurosurg*, 2011, 114(4):1135-1142. DOI: 10.3171/2010.7.JNS10163.
- [100] KARKI K, KNIGHT R A, HAN Y X, et al. Simvastatin and atorvastatin improve neurological outcome after experimental intracerebral hemorrhage[J]. *Stroke*, 2009, 40(10):3384-3389. DOI: 10.1161/STROKEAHA.108.544395.
- [101] SINAR E J, MENDELOW A D, GRAHAM D I, et al. Experimental intracerebral hemorrhage: effects of a temporary mass lesion[J]. *J Neurosurg*, 1987, 66(4): 568-576. DOI: 10.3171/jns.1987.66.4.0568.
- [102] NAKASHIMA K, YAMASHITA K, UESUGI S, et al. Temporal and spatial profile of apoptotic cell death in transient intracerebral mass lesion of the rat[J]. *J Neurotrauma*, 1999, 16(2):143-151. DOI: 10.1089/neu.1999.16.143.
- [103] REN R, LU Q, SHERCHAN P, et al. Inhibition of aryl hydrocarbon receptor attenuates hyperglycemia-induced hematoma expansion in an intracerebral hemorrhage mouse model [J]. *J Am Heart Assoc*, 2021, 10(20): e022701. DOI: 10.1161/JAHA.121.022701.
- [104] OKAMOTO K, YAMORI Y, NAGAOKA A. Establishment of the stroke-prone spontaneously hypertensive rat (SHR) [J]. *Circ Res*, 1974, 35: 1143-1153.
- [105] ZENG J, ZHANG Y, MO J, et al. Two-kidney, two clip renovascular hypertensive rats can be used as stroke-prone rats[J]. *Stroke*, 1998, 29(8): 1708-1713; discussion 1713-1714. DOI: 10.1161/01.str.29.8.1708.
- [106] GUO H X, YOU M F, WU J H, et al. Genetics of spontaneous intracerebral hemorrhage: risk and outcome[J]. *Front Neurosci*, 2022, 16:874962. DOI: 10.3389/fnins.2022.874962.
- [107] EKKERT A, ŠLIACHTENKO A, UTKUS A, et al. Intracerebral hemorrhage genetics[J]. *Genes*, 2022, 13(7): 1250. DOI: 10.3390/genes13071250.
- [108] CHARIDIMOU A, BOULOUIS G, GUROL M E, et al. Emerging concepts in sporadic cerebral amyloid angiopathy[J]. *Brain*, 2017, 140(7):1829-1850. DOI: 10.1093/brain/awx047.
- [109] GOKHALE S, CAPLAN L R, JAMES M L. Sex differences in incidence, pathophysiology, and outcome of primary intracerebral hemorrhage[J]. *Stroke*, 2015, 46(3):886-892. DOI: 10.1161/STROKEAHA.114.007682.
- [110] AUER R N, SUTHERLAND G R. Primary intracerebral hemorrhage: pathophysiology[J]. *Can J Neurol Sci Le J Can Des Sci Neurol*, 2005, 32(Suppl 2): S3-S12.
- [111] BIFFI A, GREENBERG S M. Cerebral amyloid angiopathy: a systematic review[J]. *J Clin Neurol*, 2011, 7(1):1-9. DOI: 10.3988/jcn.2011.7.1.1.
- [112] BILKEI-GORZO A. Genetic mouse models of brain ageing and Alzheimer's disease[J]. *Pharmacol Ther*, 2014, 142(2):244-257. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2013.12.009.
- [113] WINKLER D T, BONDOLFI L, HERZIG M C, et al. Spontaneous hemorrhagic stroke in a mouse model of cerebral amyloid angiopathy[J]. *J Neurosci*, 2001, 21(5):1619-1627. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.21-05-01619.2001.
- [114] STURCHLER-PIERRAT C, ABRAMOWSKI D, DUKE M, et al. Two amyloid precursor protein transgenic mouse models with Alzheimer disease-like pathology[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(24):13287-13292. DOI: 10.1073/pnas.94.24.13287.
- [115] DAVIS J, XU F, DEANE R, et al. Early-onset and robust cerebral microvascular accumulation of amyloid beta-protein in transgenic mice expressing low levels of a vasculotropic Dutch/Iowa mutant form of amyloid beta-protein precursor[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(19):20296-20306. DOI: 10.1074/jbc.M312946200.
- [116] HERZIG M C, WINKLER D T, BURGERMEISTER P, et al. Abeta is targeted to the vasculature in a mouse model of hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis[J]. *Nat Neurosci*, 2004, 7(9):954-960. DOI: 10.1038/nn1302.
- [117] MAAT-SCHIEMAN M, ROOS R, VAN DUINEN S. Hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis-Dutch type[J]. *Neuropathology*, 2005, 25(4): 288-297. DOI: 10.1111/j. 1440-1789.2005.00631.x.
- [118] FISHER M, VASILEVSKO V, PASSOS G F, et al. Therapeutic modulation of cerebral microhemorrhage in a mouse model of cerebral amyloid angiopathy[J]. *Stroke*, 2011, 42(11): 3300-3303. DOI: 10.1161/STROKEAHA.111.626655.
- [119] HAN B H, ZHOU M L, JOHNSON A W, et al. Contribution of reactive oxygen species to cerebral amyloid angiopathy, vasomotor dysfunction, and microhemorrhage in aged Tg2576 mice[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112(8): E881-E890. DOI: 10.1073/pnas.1414930112.
- [120] COOMARASWAMY J, KILGER E, WÖLFING H, et al. Modeling familial Danish dementia in mice supports the concept of the amyloid hypothesis of Alzheimer's disease[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(17): 7969-7974. DOI: 10.1073/pnas.1001056107.
- [121] VOLLHERBST D F, BENDSZUS M, MÖHLENBRUCH M A.

- Vascular malformations of the brain and its coverings[J]. *J Neuroendovasc Ther*, 2020, 14(8): 285-294. DOI: 10.5797/jnet.ra.2020-0020.
- [122] NARANBHAI N, PÉREZ R. Management of brain arteriovenous malformations: a review[J]. *Cureus*, 2023, 15(1): e34053. DOI: 10.7759/cureus.34053.
- [123] BARBOSA DO PRADO L, HAN C, OH S P, et al. Recent advances in basic research for brain arteriovenous malformation[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(21):5324. DOI: 10.3390/ijms20215324.
- [124] WINKLER E A, PACULT M A, CATAPANO J S, et al. Emerging pathogenic mechanisms in human brain arteriovenous malformations: a contemporary review in the multiomics era [J]. *Neurosurg Focus*, 2022, 53(1): E2. DOI: 10.3171/2022.4.FOCUS2291.
- [125] VETISKA S, WÄLCHLI T, RADOVANOVIC I, et al. Molecular and genetic mechanisms in brain arteriovenous malformations: new insights and future perspectives[J]. *Neurosurg Rev*, 2022, 45(6): 3573-3593. DOI: 10.1007/s10143-022-01883-4.
- [126] MILTON I, OUYANG D, ALLEN C J, et al. Age-dependent lethality in novel transgenic mouse models of central nervous system arteriovenous malformations[J]. *Stroke*, 2012, 43(5):1432-1435. DOI: 10.1161/STROKEAHA.111.647024.
- [127] FISH J E, FLORES SUAREZ C P, BOUDREAU E, et al. Somatic gain of KRAS function in the endothelium is sufficient to cause vascular malformations that require MEK but not PI3K signaling[J]. *Circ Res*, 2020, 127(6): 727-743. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.119.316500.
- [128] PARK E S, KIM S, HUANG S N, et al. Selective endothelial hyperactivation of oncogenic KRAS induces brain arteriovenous malformations in mice[J]. *Ann Neurol*, 2021, 89(5):926-941. DOI: 10.1002/ana.26059.
- [129] CARLSON T R, YAN Y B, WU X Q, et al. Endothelial expression of constitutively active Notch4 elicits reversible arteriovenous malformations in adult mice[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(28):9884-9889. DOI: 10.1073/pnas.0504391102.
- [130] SATOMI J, MOUNT R J, TOPORSIAN M, et al. Cerebral vascular abnormalities in a murine model of hereditary hemorrhagic telangiectasia[J]. *Stroke*, 2003, 34(3): 783-789. DOI: 10.1161/01.STR.0000056170.47815.37.
- [131] YAO Y C, YAO J Y, RADPARVAR M, et al. Reducing Jagged 1 and 2 levels prevents cerebral arteriovenous malformations in matrix Gla protein deficiency[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(47):19071-19076. DOI: 10.1073/pnas.1310905110.
- [132] NIELSEN C M, CUERVO H, DING V W, et al. Deletion of Rbpj from postnatal endothelium leads to abnormal arteriovenous shunting in mice[J]. *Development*, 2014, 141(19):3782-3792. DOI: 10.1242/dev.108951.
- [133] SU H, KIM H, PAWLIKOWSKA L, et al. Reduced expression of integrin alphavbeta8 is associated with brain arteriovenous malformation pathogenesis[J]. *Am J Pathol*, 2010, 176(2):1018-1027. DOI: 10.2353/ajpath.2010.090453.
- [134] MOUCHTOURIS N, CHALOUHI N, CHITALE A, et al. Management of cerebral cavernous malformations: from diagnosis to treatment[J]. *Sci World J*, 2015, 2015:808314. DOI: 10.1155/2015/808314.
- [135] NIKOUBASHMAN O, DI ROCCO F, DAVAGNANAM I, et al. Prospective hemorrhage rates of cerebral cavernous malformations in children and adolescents based on MRI appearance[J]. *AJNR Am J Neuroradiol*, 2015, 36(11): 2177-2183. DOI: 10.3174/ajnr.A4427.
- [136] HOFFMAN J E, WITTENBERG B, MOREL B, et al. Tailored treatment options for cerebral cavernous malformations[J]. *J Pers Med*, 2022, 12(5):831. DOI: 10.3390/jpm12050831.
- [137] WANG Y D, NAKAYAMA M, PITULESCU M E, et al. Ephrin-B2 controls VEGF-induced angiogenesis and lymphangiogenesis [J]. *Nature*, 2010, 465(7297): 483-486. DOI: 10.1038/nature09002.
- [138] BOULDAY G, RUDINI N, MADDALUNO L, et al. Developmental timing of CCM2 loss influences cerebral cavernous malformations in mice[J]. *J Exp Med*, 2011, 208(9): 1835-1847. DOI: 10.1084/jem.20110571.
- [139] BOULDAY G, BLÉCON A, PETIT N, et al. Tissue-specific conditional CCM2 knockout mice establish the essential role of endothelial CCM2 in angiogenesis: implications for human cerebral cavernous malformations[J]. *Dis Model Mech*, 2009, 2(3-4):168-177. DOI: 10.1242/dmm.001263.
- [140] MCDONALD D A, SHENKAR R, SHI C B, et al. A novel mouse model of cerebral cavernous malformations based on the two-hit mutation hypothesis recapitulates the human disease[J]. *Hum Mol Genet*, 2011, 20(2):211-222. DOI: 10.1093/hmg/ddq433.
- [141] JEANNE M, LABELLE-DUMAIS C, JORGENSEN J, et al. COL4A2 mutations impair COL4A1 and COL4A2 secretion and cause hemorrhagic stroke[J]. *Am J Hum Genet*, 2012, 90(1):91-101. DOI: 10.1016/j.ajhg.2011.11.022.
- [142] WENG Y C, SONNI A, LABELLE-DUMAIS C, et al. COL4A1 mutations in patients with sporadic late-onset intracerebral hemorrhage[J]. *Ann Neurol*, 2012, 71(4):470-477. DOI: 10.1002/ana.22682.
- [143] SHAH S, ELLARD S, KNEEN R, et al. Childhood presentation of COL4A1 mutations[J]. *Dev Med Child Neurol*, 2012, 54(6): 569-574. DOI: 10.1111/j.1469-8749.2011.04198.x.
- [144] GOULD D B, PHALAN F C, BREEDVELD G J, et al. Mutations in Col4a1 cause perinatal cerebral hemorrhage and porencephaly[J]. *Science*, 2005, 308(5725): 1167-1171. DOI: 10.1126/science.1109418.
- [145] BEDERSON J B, PITTS L H, TSUJI M, et al. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination[J]. *Stroke*, 1986, 17(3):472-476. DOI: 10.1161/01.str.17.3.472.
- [146] LONGA E Z, WEINSTEIN P R, CARLSON S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. *Stroke*, 1989, 20(1):84-91. DOI: 10.1161/01.str.20.1.84.
- [147] FEENEY D M, BOYESON M G, LINN R T, et al. Responses to cortical injury: I. Methodology and local effects of contusions

- in the rat[J]. *Brain Res*, 1981, 211(1):67-77. DOI: 10.1016/0006-8993(81)90067-6.
- [148] GARCIA J H, WAGNER S, LIU K F, et al. Neurological deficit and extent of neuronal necrosis attributable to middle cerebral artery occlusion in rats. Statistical validation[J]. *Stroke*, 1995, 26(4):627-634, 635. DOI: 10.1161/01.str.26.4.627.
- [149] CHEN J, SANBERG P R, LI Y, et al. Intravenous administration of human umbilical cord blood reduces behavioral deficits after stroke in rats[J]. *Stroke*, 2001, 32(11): 2682-2688. DOI: 10.1161/hs1101.098367.
- [150] HARTMAN R, LEKIC T, ROJAS H, et al. Assessing functional outcomes following intracerebral hemorrhage in rats [J]. *Brain Res*, 2009, 1280: 148-157. DOI: 10.1016/j. brainres. 2009. 05.038.
- [151] TOMITA H, ITO U, OHNO K, et al. Chronological changes in brain edema induced by experimental intracerebral hematoma in cats[J]. *Acta Neurochir Suppl*, 1994, 60: 558-560. DOI: 10.1007/978-3-7091-9334-1_154.
- [152] LEE E J, HUNG Y C. Marked anemic hypoxia deteriorates cerebral hemodynamics and brain metabolism during massive intracerebral hemorrhage[J]. *J Neurol Sci*, 2001, 190 (1-2):3-10. DOI: 10.1016/s0022-510x(01)00567-6.
- [153] MUN-BRYCE S, WILKERSON A C, PAPUASHVILI N, et al. Recurring episodes of spreading depression are spontaneously elicited by an intracerebral hemorrhage in the swine[J]. *Brain Res*, 2001, 888(2): 248-255. DOI: 10.1016/s0006-8993(00)03068-7.
- [154] BULLOCK R, MENDELOW A D, TEASDALE G M, et al. Intracranial haemorrhage induced at arterial pressure in the rat. Part 1: description of technique, ICP changes and neuropathological findings[J]. *Neurol Res*, 1984, 6(4):184-188. DOI: 10.1080/01616412.1984.11739687.
- [155] 林潇, 倪浩棋, 黄李洁, 等. 常用脑出血动物模型的研究进展[J]. *温州医科大学学报*, 2017, 47(9):698-703. DOI: 10.3969/j. issn.2095-9400.2017.09.017.
- LIN X, NI H Q, HUANG L J, et al. Research progress of common animal models of cerebral hemorrhage[J]. *J Wenzhou Med Univ*, 2017, 47(9): 698-703. DOI: 10.3969/j. issn.2095-9400.2017.09.017.
- [156] 胡凌峰, 柳洁, 范胜涛. NHP实验动物在神经科学领域的应用及挑战[J]. *中国比较医学杂志*, 2024, 34(1):151-157. DOI:10. 3969 / j. issn.1671-7856. 2024. 01. 020.
- HU L F, LIU J, FAN S T. Application and challenges of NHP laboratory animals in neuroscience[J]. *Chin J Comp Med*, 2024, 34(1):151-157. DOI:10. 3969/j.issn.1671-7856.2024.01.020.
- [157] 宋洋, 付金凤. 浅谈实验用猫的饲养与管理方法[J]. *黑龙江医药*, 2011, 24(6):928-930.
- SONG Y, FU J F. A brief discussion on the feeding and management methods of experimental cats[J]. *Heilongjiang Med J*, 2011, 24(6):928-930.
- [158] ZHAO H, LIU E Q, ZHANG Y Q. Dog models of human atherosclerotic cardiovascular diseases[J]. *Mamm Genome*, 2023, 34(2):262-269. DOI: 10.1007/s00335-022-09965-w.
- [159] TAHA A, BOBI J, DAMMERS R, et al. Comparison of large animal models for acute ischemic stroke: which model to use? [J]. *Stroke*, 2022, 53(4): 1411-1422. DOI: 10.1161/STROKEAHA.121.036050.
- [160] TAYLOR K, ALVAREZ L R. An estimate of the number of animals used for scientific purposes worldwide in 2015[J]. *Altern Lab Anim*, 2019, 47(5-6): 196-213. DOI: 10.1177/ 0261192919899853.
- [161] ANDRADE A F, SOARES M S, PATRIOTA G C, et al. Experimental model of intracranial hypertension with continuous multiparametric monitoring in swine[J]. *Arq Neuropsiquiatr*, 2013, 71(10): 802-806. DOI: 10.1590/0004-282X20130126.
- [162] 刘智, 袁楠, 兰天野, 等. 脑出血实验动物模型制备及在中医药研究中的应用[J]. *毒理学杂志*, 2019, 5 (4):323-326.
- LIU Z, YUAN N, LAN T Y, et al. Preparation of experimental animal models of cerebral hemorrhage and their application in traditional Chinese medicine research[J]. *J Toxicol*, 2019, 5(4):323-326.
- [163] KRAFFT P R, ROLLAND W B, DURIS K, et al. Modeling intracerebral hemorrhage in mice: injection of autologous blood or bacterial collagenase[J]. *J Vis Exp*, 2012(67): e4289. DOI: 10.3791/4289.
- [164] LOVE C J, KIRSCHENBAUM D, SELIM M, et al. Observation of collagen-containing lesions after hematoma resolution in intracerebral hemorrhage [J]. *Stroke*, 2021, 52(5): 1856-1860. DOI: 10.1161/STROKEAHA. 120.030240.
- [165] XUE M Z, DEL BIGIO M R. Comparison of brain cell death and inflammatory reaction in three models of intracerebral hemorrhage in adult rats[J]. *J Stroke Cerebrovasc Dis*, 2003, 12(3):152-159. DOI: 10.1016/S1052-3057(03)00036-3.
- [166] LASO-GARCIA F, CASADO-FERNANDEZ L, PINIELLA D, et al. Circulating extracellular vesicles promote recovery in a preclinical model of intracerebral hemorrhage[J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2023, 32: 247-262. DOI: 10.1016/j. omtn. 2023. 03.006.
- [167] KRAFFT P R, ROLLAND W B, DURIS K, et al. Modeling intracerebral hemorrhage in mice: injection of autologous blood or bacterial collagenase [J]. *J Vis Exp*, 2012, (67): e4289. DOI:10.3791/4289.
- [168] 段晓春, 王中, 陈罡. 脑出血动物模型研究进展[J]. *中华神经创伤外科电子杂志*, 2015(2):36-39. DOI: 10.3877/cma.j.issn.2095-9141.2015.02.011.
- DUAN X C, WANG Z, CHEN G. The research progress of animal model of cerebral hemorrhage[J]. *Chin J Neurotraumatic Surg Electron Ed*, 2015(2):36-39. DOI: 10.3877/ cma.j.issn.2095-9141.2015.02.011.
- [169] JING C H, BIAN L H, WANG M, et al. Enhancement of hematoma clearance with CD47 blocking antibody in experimental intracerebral hemorrhage[J]. *Stroke*, 2019, 50(6): 1539-1547. DOI: 10.1161/STROKEAHA.118.024578.
- [170] WAGNER K R, XI G, HUA Y, et al. Lobar intracerebral hemorrhage model in pigs: rapid edema development in perihematomal white matter[J]. *Stroke*, 1996, 27(3):490-497.

- DOI: 10.1161/01.str.27.3.490.
- [171] KINGMAN T A, MENDELOW A D, GRAHAM D I, et al. Experimental intracerebral mass: description of model, intracranial pressure changes and neuropathology[J]. *J Neuropathol Exp Neurol*, 1988, 47(2): 128-137. DOI: 10.1097/00005072-198803000-00005.
- [172] LOPEZ VALDES E, HERNANDEZ LAIN A, CALANDRE L, et al. Time window for clinical effectiveness of mass evacuation in a rat balloon model mimicking an intraparenchymatous hematoma[J]. *J Neurol Sci*, 2000, 174(1): 40-46. DOI: 10.1016/s0022-510x(99)00288-9.
- [173] KINGMAN T A, MENDELOW A D, GRAHAM D I, et al. Experimental intracerebral mass: time-related effects on local cerebral blood flow[J]. *J Neurosurg*, 1987, 67(5): 732-738. DOI: 10.3171/jns.1987.67.5.0732.
- [174] NEHLS D G, MENDELOW D A, GRAHAM D I, et al. Experimental intracerebral hemorrhage: early removal of a spontaneous mass lesion improves late outcome[J]. *Neurosurgery*, 1990, 27(5): 674-682; discussion 682.
- [175] ZHENG Y, HU Q, MANAENKO A, et al. 17 β -Estradiol attenuates hematoma expansion through estrogen receptor α /silent information regulator 1/nuclear factor-kappa b pathway in hyperglycemic intracerebral hemorrhage mice[J]. *Stroke*, 2015, 46(2): 485-491. DOI: 10.1161/STROKEAHA.114.006372.
- [176] European Medicines Agency. ICH guideline M3 (R2) on non-clinical safety studies for the conduct of human clinical trials and marketing authorisation for pharmaceuticals [EB/OL]. [2023-12-22]. <http://zy.yaozh.com/sda/WC500002720.pdf>.
- [177] Food and Drug Administration. Guidance, compliance & regulatory information (Biologics) [EB/OL]. [2023-12-22]. <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/guidance-compliance-regulatory-information-biologics>.
- [178] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 2版. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 30-35.
CHEN Q. Research methods in pharmacology of Chinese Materia Medica[M]. 2nd. Beijing: People's Health Publishing House, 2006: 30-35.
- [179] GUPTA D, GUPTA S V, YANG N N. Understanding the routes of administration[M]// PATHAK Y V, ARAÚJO DOS SANTOS M, ZEA L. Handbook of space pharmaceuticals. Cham: Springer International Publishing, 2022: 23-47.
- [180] 张谦, 冀瑞俊, 赵萌, 等. 中国脑血管病临床管理指南(第2版)(节选): 第5章脑出血临床管理[J]. *中国卒中杂志*, 2023, 18(9): 1014-1023. DOI: 10.3969/j.issn.1673-5765.2023.09.007.
ZHANG Q, JI R J, ZHAO M, et al. Chinese stroke association guidelines for clinical management of cerebrovascular diseases (second edition) (excerpt) —chapter five clinical management of intracerebral hemorrhage[J]. *Chin J Stroke*, 2023, 18(9): 1014-1023. DOI: 10.3969/j.issn.1673-5765.2023.09.007.
- [181] 国家卫生健康委脑卒中筛查与防治工程委员会. 脑卒中筛查与防治技术规范[J]. *中国医学前沿杂志(电子版)*, 2013, 5(9): 44-50. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7372.2013.09.017.
Stroke Screening and Prevention Project Committee, National Health and Family Planning Commission, P. R. China. Technical specification for screening and prevention of stroke[J]. *Chin J Front Med Sci Electron Version*, 2013, 5(9): 44-50. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7372.2013.09.017
- [182] 徐叔云. 药理实验方法学[M]. 3版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 200-202.
XU S Y. Experimental methodology of pharmacology[M]. 3rd. Beijing: People's Health Publishing House, 2002: 200-202.
- [183] 国家市场监督管理总局. 药品注册管理办法[A/OL]. (2020-01-22)[2024-01-11]. https://www.samr.gov.cn/zw/zfxgk/fdzdgknr/fgs/art/2023/art_3275cb2a929d4c34ac8c0421b2a9c257.html. State Administration for Market Regulation. Provisions for drug registration[A/OL]. (2020-01-22)[2024-01-11]. https://www.samr.gov.cn/zw/zfxgk/fdzdgknr/fgs/art/2023/art_3275cb2a929d4c34ac8c0421b2a9c257.html.
- [184] 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, China National Standardization Commission. Laboratory animal—Guideline for ethical review of animal welfare: GB/T 35892-2018 [S]. Beijing: China Standards Press, 2018.
- [185] 陈佳琦, 吕龙宝, 张飞燕, 等. 浅谈微量采血法在药物非临床研究中的应用及3R原则的贯彻[J]. *实验动物与比较医学*, 2022, 42(4): 306-312. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2021.163.
CHEN J Q, LÜ L B, ZHANG F Y, et al. Application of blood microsampling and its implementation of the 3Rs in non-clinical studies of drugs[J]. *Lab Anim Comp Med*, 2022, 42(4): 306-312. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2021.163.

(收稿日期: 2024-01-02 修回日期: 2024-02-15)

(本文编辑: 张俊彦, 富群华)

[引用本文]

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.

《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）》 编写专家组名单

组织专家：

李英俊（北京通和立泰生物科技有限公司）
陈琳（北京市神经修复产业创新研究院）
张化彪（郑州大学第一附属医院放射介入科）
何纲（南方科技大学第一附属医院/深圳市人民医院中医科）

执笔专家：

张化彪（郑州大学第一附属医院放射介入科）
何纲（南方科技大学第一附属医院/深圳市人民医院中医科）
徐洪亮（郑州大学第一附属医院神经内科）
张晓燕（河南省郑州市管城区人民医院神经内科）
张本骏（河南省郑州市第七人民医院神经内科）
包义君（中国医科大学附属第四医院神经外科）
李新军（成都医学院第一附属医院神经外科）
段晓春（扬州大学附属医院神经外科）
韩新巍（郑州大学第一附属医院放射介入科）
陈琳（北京市神经修复产业创新研究院）
李英俊（北京通和立泰生物科技有限公司）
李津南（中国科学院昆明动物研究所）
邓毅恒（长安医院重症医学科）
李娜（中国科学院上海药物研究所实验动物室）
王小洪（扬州大学医学院人体解剖教研室）
罕园园（中国医学科学院医学生物学研究所）
陈瑛（国科赛赋河北医药技术有限公司）
张海飞（昭衍<苏州>新药研究中心有限公司）
卓振建（北京大学深圳研究生院实验动物中心）

共识专家：

白玉（华北制药集团新药研究开发有限责任公司）
卜碧涛（华中科技大学同济医学院附属同济医院神经内科）
陈亮（复旦大学附属华山医院神经外科）
陈红伟（航空总医院脑脊液病神经外科）
陈鑫璞（郑州大学第一附属医院神经外科）
陈文武（河南大学第一附属医院神经内科）
楚长彪（首都医科大学宣武医院神经内科）
戴宜武（解放军总医院神经外科学部暨第七医学中心神经外科）
丁新生（南京医科大学第一附属医院神经内科）
董延生（国科赛赋河北医药技术有限公司）
杜鹏（复旦大学附属中山医院神经内科）
冯华（重庆陆军军医大学第一附属医院神经外科）
付伟伦（首都医科大学附属北京天坛医院介入神经病学科）
郭社卫（郑州大学第一附属医院神经外科）
郭守刚（山东第一医科大学附属省立医院神经内科）
郭俭（上海永慈康复医院神经康复科）
郝强（首都医科大学附属北京天坛医院神经外科）
何超（温州医科大学附属诸暨医院）
黄红云（北京市虹天济神经科学研究院）
黄小平（广东省深圳市中医院神经外科）
贾延劫（郑州大学第一附属医院神经内科）
姜鹏（首都医科大学附属北京天坛医院神经介入科）
姜涛（首都医科大学附属北京天坛医院神经外科）
姜除寒（首都医科大学附属北京天坛医院神经外科）
金杰（河南中医药大学第一附属医院脑病中心）
金恒伟（首都医科大学附属北京天坛医院神经外科）
李红敏（郑州大学医学科学院）
李利中（河南省鹤壁市人民医院卒中中心）
李文强（首都医科大学附属北京天坛医院神经外科）
李晓波（扬州大学附属苏北人民医院神经内科）
刘凯（郑州大学第五附属医院介入科）
刘恋（首都医科大学附属北京天坛医院神经介入科）

刘鹏（首都医科大学附属北京天坛医院神经介入科）
刘宇（郑州大学第一附属医院神经内科）
刘爱华（首都医科大学附属北京天坛医院神经外科）
刘庆新（滨州医学院附属医院神经内科）
刘新科（首都医科大学附属北京天坛医院神经外科）
吕鸿利（河南省孟州市第二人民医院神经内科）
罗杰坤（中南大学湘雅医院中西医结合研究所）
罗西凯（河南省鹤壁市人民医院卒中中心）
莫大鹏（首都医科大学附属北京天坛医院神经介入科）
穆士卿（首都医科大学附属北京天坛医院神经介入科）
聂亚雄（南华大学附属第一医院神经内科）
曲鑫（首都医科大学宣武医院神经外科）
石广志（首都医科大学附属北京天坛医院神经重症）
邵彤（济宁医学院附属医院神经外科）
宋景贵（新乡医学院第二附属医院神经内科）
宋剑平（复旦大学附属华山医院神经外科）
苏辉（解放军总医院第一医学中心神经外科医学部）
孙保亮（山东第一医科大学脑科学与类脑研究院）
孙立倩（首都医科大学附属北京天坛医院神经介入科）
孙倩茹（海南省三亚哈尔滨医科大学鸿森医院神经内科）
孙石磊（郑州大学第一附属医院神经内科）
唐涛（中南大学湘雅医院中西医结合研究所）
王宁（首都医科大学附属北京天坛医院神经外科）
王菁婧（郑州大学第一附属医院神经内科）
王新志（河南中医药大学第一附属医院脑病中心）
伍国峰（贵阳医科大学附属医院神经内科）
谢嵘（复旦大学附属华山医院神经外科）
薛孟周（郑州大学第二附属医院脑血管病科）
颜津津（广州医科大学附属惠州医院神经内科）
阎龙（吉林大学第二医院神经外科）
杨堃（海南医学院第一附属医院神经外科）
杨进华（广州中医药大学附属高州中医院神经外科）
杨清武（第三军医大学新桥医院神经内科）
杨伟民（郑州大学第一附属医院神经内科）
袁晓娜（郑州大学第一附属医院急诊医学科）
尤为（首都医科大学附属北京天坛医院神经外科）
张磊（首都医科大学宣武医院神经内科）
张璐（郑州大学第一附属医院神经内科）
张旻（华中科技大学同济医学院附属同济医院神经内科）
张祥（复旦大学附属华山医院神经外科）
张卫民（湖南省脑科医院神经外科）
张晓军（内蒙古自治区人民医院神经外科）
张义森（首都医科大学附属北京天坛医院神经外科）
张艳华（河南省鹤壁市煤炭总医院神经内科）
赵敏（河南中医药大学第一附属医院脑病中心）
钟平（复旦大学附属华山医院虹桥院区神经外科）
钟书（中山大学附属第一医院广西医院神经外科）
王福斌（河南省清丰县人民医院神经内科）
武衡（南华大学附属第一医院神经内科）
吴洪亮（山东省烟台市毓璜顶医院神经外科）
朱红灿（郑州大学第一附属医院神经内科）

审稿专家：

陈民利（浙江中医药大学比较医学研究所）
崔永春（中国医学科学院阜外医院动物实验中心）
王守立（苏州大学病理系/江苏博赛孚医疗科技有限公司）
朱顺星（南通大学实验动物中心）
吴宝金（中国科学院分子细胞科学卓越创新中心）
王健（上海市生物医药技术研究院）



陈菁菁, 博士, 军事医学研究院副研究员(资格)。2020年6月博士毕业于中国农业大学动物科技学院, 同年9月起就职于军事科学院军事医学研究院实验动物中心。主要从事实验动物相关的教学与科研工作, 重点围绕动物营养与模型创制, 针对功能性营养物质尤其是功能性氨基酸开展生物学功能方面的研究, 揭示其对维持肠道健康及肠道微生物稳态等的作用机制; 同时, 利用新技术开展军事医学动物模型创制和评价工作。参加工作以来, 主持军队实验动物专项面上项目1项、青年人才培养基金项目1项, 国家重点研发计划子课题2项; 作为骨干成员参与国家科技创新2030重大项目及军队项目等10余项; 近3年在 *Frontiers in Microbiology*, *Genes & Diseases*, *NPJ Biofilms Microbiomes* 等杂志发表学术论文10余篇, 其中以第一作者或通信作者发表SCI论文4篇; 以第一完成人获授权实用新型专利2项, 参与发明专利5项。



邱业峰, 博士, 研究员, 硕士生导师。目前任军事科学院军事医学研究院实验动物中心主任。兼任北京市实验动物学学会副理事长、全军实验动物管理委员会专家库专家、《实验动物科学》杂志副主编、中国合格评定国家认可委员会(CNAS)实验动物评审员。主要从事实验动物相关教学与科研工作, 重点围绕实验动物模型创制研究。先后承担国家自然科学基金、军队和国家重大科技项目20余项。作为第一作者或通信作者在 *Nature Communication*, *EBioMedicine* 等期刊发表论文10余篇; 获授权发明专利及实用新型专利23项、软件著作权6项; 参编专著3部, 其中副主编1部。作为主要完成人的相关科研成果获得北京市科学技术奖自然科学奖一等奖。曾获北京市实验动物行业协会“北京市先进个人”等荣誉。

高原急性缺氧肠道应激损伤小鼠模型的构建与评价

郑建华, 法云智, 董巧燕, 邱业峰, 陈菁菁

(军事医学研究院实验动物中心, 北京 100071)

[摘要] **目的** 通过模拟急性缺氧环境, 建立实验性高原小鼠肠道应激损伤模型, 为探讨高原急性胃肠病的致病机制以及防治措施奠定基础。**方法** 根据体重按随机数字表法, 将36只SPF级成年雄性BALB/c小鼠分为常氧24 h组、常氧72 h组、低氧24 h组和低氧72 h组, 每组9只。常氧对照组小鼠饲养于常规屏障环境中; 低氧应激组饲养于屏障环境中的低氧舱内, 氧气浓度设定为10%以模拟高原环境, 分别应激24 h和72 h, 建立急性缺氧所致肠道损伤模型。造模结束后, 称量小鼠体重, 用1%戊巴比妥钠麻醉后断颈处死各组小鼠, 采集十二指肠和结肠组织并进行HE染色后观察肠道组织病理形态, 通过蛋白质印迹和免疫组织化学法检测肠道组织中紧密连接相关蛋白表达水平, 应用实时荧光定量PCR检测炎症细胞因子和趋化因子的mRNA表达水平, 采用TUNEL染色法检测肠上皮细胞凋亡活性等指标, 从而对该模型的肠道损伤相关表型进行评价。**结果** 与常氧组相比, 低氧24 h组和低氧72 h组的小鼠表现为体重减轻, 十二指肠绒毛长度变短、隐窝结构异常、绒毛/隐窝比下降, 结肠黏膜炎性细胞浸润、隐窝结构不规则。低氧24 h组和低氧72 h组小鼠的十二指肠和结肠组织中闭锁蛋白(Occludin)及闭锁小带蛋白(zonula occludens-1, ZO-1)表达水平明显下降 ($P<0.05$), 十二指肠组织中促凋亡蛋白Bax表达明显上调, 抑凋亡蛋白Bcl-2表达明显下调 ($P<0.05$), 而且肠上皮细胞的凋亡活性显著增强 ($P<0.05$)。此外, 缺氧应激24 h和72 h后, 小鼠十二指肠组织中白细胞介素(interleukin, IL)-1 β 、IL-6、单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1)及肿瘤坏死因子- α (tumour necrosis factor- α , TNF- α) mRNA水平显著增高 ($P<0.05$); 缺氧应激24 h后, 小鼠结肠组织中炎症细胞因子的表达水平无显著变化 ($P>0.05$); 但缺氧应激72 h后, 小鼠结肠组织中促炎因子IL-1 β 、TNF- α 、IL-6、MCP-1以及抗炎因子IL-10 mRNA水平显著增高 ($P<0.05$)。

[基金项目] 军队实验动物专项科研课题“色氨酸调控内质网应激和肠道菌群结构改善肠应激损伤的作用研究”(SYDW_KY[2021]06); 军事医学研究院青年人才基金项目“内质网应激性细胞凋亡在高原低氧环境肠道损伤中的致病机制研究”(AMMS-QNPY-2022-019)

[第一作者] 郑建华(1998—), 男, 硕士研究生, 研究方向: 实验动物模型创制研究。E-mail: zjhcbm0311@163.com

[通信作者] 邱业峰(1980—), 男, 博士, 研究员, 研究方向: 实验动物模型创制研究。E-mail: qiuyefeng2001@163.com。ORCID: 0000-0002-5392-3293;

陈菁菁(1990—), 女, 博士, 副研究员(资格), 研究方向: 动物营养与实验动物模型创制。E-mail: CJQ9512@163.com。ORCID: 0000-0002-1506-7510

结论 利用低氧舱模拟高原急性缺氧环境可导致应激小鼠肠道组织结构异常、肠屏障功能障碍,并诱导肠上皮细胞凋亡,引发肠道炎症反应。这些结果表明急性缺氧应激肠道损伤小鼠模型构建成功。

[关键词] 高原急性缺氧; 肠道应激损伤; 细胞凋亡; 炎症反应; 小鼠

[中图分类号] Q95-33; R-332 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2024)01-0031-11



Construction and Evaluation of a Mouse Model with Intestinal Injury by Acute Hypoxic Stress in Plateau

ZHENG Jianhua, FA Yunzhi, DONG Qiaoyan, QIU Yefeng, CHEN Jingqing

(Laboratory Animal Center of the Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China)

Correspondence to: QIU Yefeng (ORCID:0000-0002-5392-3293), E-mail: qiuyefeng2001@163.com;

CHEN Jingqing (ORCID:0000-0002-1506-7510), E-mail: CJQ9512@163.com

[ABSTRACT] **Objective** By simulating acute hypoxic conditions, an experimental model of intestinal stress injury in plateau mice was established to explore the pathogenic mechanism of acute gastrointestinal diseases in plateau, and to lay foundation for preventive and therapeutic measures. **Methods** Thirty-six SPF-grade adult male BALB/c mice were randomly divided into four groups: normoxic 24 h, normoxic 72 h, hypoxic 24 h, and hypoxic 72 h, based on body weight using a randomized numerical table method, with nine mice in each group. Mice in the normoxic group were kept in a conventional barrier environment, while those in the hypoxic group were placed in a hypoxic chamber within the barrier environment with oxygen concentration set at 10% to simulate plateau conditions. They were subjected to stress for 24 h and 72 h, respectively, in order to establish a model of intestinal injury induced by acute hypoxia. After modeling, the mice were weighed, anesthetized with 1% pentobarbital sodium, and then euthanized by cervical dislocation. Duodenal and colonic tissues were collected. Histopathological morphology of intestinal tissues was observed after HE staining. Western blotting and immunohistochemistry were used to detect the expression levels of tight junction-related proteins in intestinal tissues. Real-time fluorescence quantitative PCR was performed to measure the expression levels of inflammatory cytokines and chemokines. TUNEL staining was used to assess apoptotic activity of intestinal epithelial cells, thus evaluating intestinal injury-related phenotypes in this model. **Results** Compared with the normoxic groups, mice in the 24 h and 72 h hypoxia groups showed weight loss, shortened duodenal villi, abnormal crypt structure, and decreased villus/crypt ratio. The colonic mucosa was infiltrated with inflammatory cells and irregular crypt structure. Expression levels of Occludin and zonula occludens-1 (ZO-1) were significantly decreased in duodenal and colonic tissues of mice in the 24 h and 72 h hypoxia groups ($P<0.05$). The expression of pro-apoptotic protein Bax was significantly up-regulated while expression of anti-apoptotic protein Bcl-2 was significantly down-regulated in duodenal tissues ($P<0.05$). Apoptotic activity of intestinal epithelial cells was significantly enhanced ($P<0.05$). In addition, interleukin (IL)-1 β , IL-6, monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), and tumor necrosis factor- α (TNF- α) mRNA levels were significantly increased in duodenal tissues after 24 and 72 h of hypoxic stress ($P<0.05$). After 24 h of hypoxic stress, there was no significant change in the expression levels of inflammatory cytokines in colon tissues ($P>0.05$), but after 72 h, the expression levels of pro-inflammatory factors IL-1 β , TNF- α , IL-6, MCP-1, and anti-inflammatory factor IL-10 mRNAs significantly increased in colon tissues of mice ($P<0.05$). **Conclusion** The usage of a hypoxia chamber to simulate an acute hypoxic environment in plateau can lead to abnormal intestinal tissue structure, intestinal barrier dysfunction, and induce intestinal epithelial cell apoptosis, triggering an intestinal inflammatory response in stress mice. These findings indicate the successful construction of a mouse model for an acute hypoxic stress-induced intestinal injury.

[Key words] Plateau acute hypoxia; Intestinal stress injury; Apoptosis; Inflammatory response; Mice

我国高原面积辽阔, 约占国土总面积的26%, 且随着经济的不断发展, 进入高原的人群越来越多。高原处于一种低压缺氧环境, 海拔4 000 m的空气中氧气含量只有海平面的60%左右^[1-2]; 而海拔5 000 m左右的氧气含量约为10%, 为海平面的50%左右^[3]。越来越多的证据表明, 急性缺氧会对多种人体器官造成损伤而危害健康^[4-5], 并且肠道作为机体应对各类应激反应的靶器官首当其冲^[6]。有研究发现, 在前往高原地区的人群中, 胃肠道疾病的发生率随着海拔的升高而增加^[7-8], 大约80%的急性高原病患者至少有一种胃肠道不适症状(如厌食症、恶心、腹泻、呕吐等)^[1]。进一步研究显示, 肠道特殊的血液供应和解剖结构增加了其对缺氧的敏感性, 这使得其容易受到缺氧应激的影响^[9-10], 在高原缺氧环境中人体会发生不同程度的胃肠道损伤^[11-12]。胃肠道是人体内最大的细菌和内毒素库, 一旦肠道屏障功能受损, 大量细菌和内毒素可能通过血流易位至其他组织或器官, 从而诱导炎性介质的级联、全身炎症反应综合征和多器官功能障碍综合征(multiple organ dysfunction syndrome, MODS)等的发作^[13-15]。因此, 加强对高原胃肠道损伤病理机制及其干预技术的研究将有助于保障和改善高原地区人群的健康水平。

急性缺氧性胃肠道损伤的发病机制复杂, 目前尚不清楚。一种可能的解释是肠屏障损伤, 即高原暴露会降低内脏灌注和血氧水平, 导致缺氧和氧化应激。这些应激源可能会损伤肠道屏障, 导致细菌移位和局部或全身炎症反应等后果^[9]。此外, 有研究表明, 氧稳态对维持胃肠道健康至关重要^[1]。随着海拔的升高, 肠道的绒毛长度、隐窝深度、黏膜壁厚度和绒毛表面积形态学损伤加重^[7]。急性缺氧环境增加了细菌移位, 降低了闭锁蛋白(Occludin)的表达, 促进了脂多糖进入血液^[16]。虽然目前已有许多方法用于建立胃肠道损伤的动物模型, 但其中较少有产生类似于急性缺氧诱导肠屏障损伤表型的模型。已有研究证明, 当大鼠保持在模拟的7 000 m海拔时, 胃肠道明显受损^[7]; 而小鼠在氧含量5%条件下饲养48 h(模拟海拔8 000 m以上)后, 肠道受损严重^[16]。然而, 这种建模方法与人类实际生活情况不同。人类生存的高度限制是海拔5 000 m, 90%的人类生活在海拔3 000 ~ 4 000 m范围内^[9]。因此, 急需一种符合实际且稳定有效的高原缺氧肠应激损伤动物模型, 为低氧环境下引发高原肠道疾病的发病机制研究提供必要的实验基础。为此, 本研究利用低氧舱, 设定氧气体积分数为

10%, 模拟海拔5 000 m左右的高原低氧环境, 构建更符合人类生活实际情况的急性缺氧应激肠道损伤小鼠模型, 并对造模结果进行评价。

1 材料与方法

1.1 实验动物

7周龄SPF级雄性BALB/c小鼠36只, 体重21~23 g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司[SCXK(京)2021-0006]。所有实验操作符合动物福利和动物实验伦理要求, 并通过军事医学研究院实验动物管理与使用委员会批准[IACUC-DWZX-2022-049]。所有小鼠饲养于军事医学研究院实验动物中心屏障设施环境[SYXK(军)2017-0022, 2022年10月已通过验收, 但尚未领到新证], 恒温在(23±2)℃, 相对湿度为40%~60%, 明暗交替时间12 h/12 h, 每笼(塑料小鼠笼, 长×宽×高: 403 mm×165 mm×175 mm)饲养3只小鼠, 自由采食和饮水。所有器材、垫料、饲料等均在使用前进行高压灭菌处理。

1.2 试剂与仪器

戊巴比妥钠由军事医学院供应站提供, 来源于上海原思标物科技有限公司(货号57-43-2); HE染色套装(货号G1003)购自武汉塞维尔生物科技有限公司; 兔抗鼠闭锁蛋白(Occludin, 货号#91131)和切割活化的半胱氨酸蛋白酶(cleaved caspase-3, c-caspase-3)(货号#9661)抗体购自美国Cell Signaling Technology公司; 兔抗鼠Claudin-1抗体(货号37-4900)购自美国Invitrogen公司; 兔抗鼠闭锁小带蛋白(zonula occludens-1, ZO-1)抗体(货号21773-1-AP)、B淋巴细胞瘤-2(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)抗体(货号12789-1-AP)和Bcl-2相关X蛋白(BCL2-associated X, Bax)抗体(货号50599-2-Ig)均购自美国Proteintech公司; ECL超敏发光液(加强型)(货号HXP1868)和BCA蛋白定量试剂盒(货号LOT: HX351691)均购自北京华兴博创基因技术有限公司; β -actin抗体(货号ab8227)购自英国Abcam公司; 聚偏二氟乙烯膜(PVDF膜)(货号IPVH00010)购自美国Merck公司; DAB显色试剂盒(20×)(货号ZLI-9018)和辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔IgG聚合物(货号PV-6001)均购自北京中杉金桥生物技术有限公司; 总RNA提取用TRIzol试剂盒(货号MF034-05)与实时荧光定量PCR用qRT-PCR Mix(货号MF787-01)均购自北京聚合美生物科技有限公司; 反转录试剂盒(货号RR047A)购自日本TaKaRa BIO公司; 基因引物由生工生物工程(上海)股

份有限公司合成；一步法TUNEL细胞凋亡检测试剂盒（货号G1501-50T）、蛋白酶K（货号G1205）、EDTA（pH 9.0）抗原修复液（货号G1203）、组织自发荧光淬灭剂（货号G1221）、抗荧光淬灭封片剂（货号G1401）、DAPI染色试剂（货号G1012）、牛血清白蛋白（bovine serum albumin, BSA）（货号GC305010）、Cy3标记的山羊抗兔IgG（货号GB111402）和Alexa Fluor 488标记山羊抗兔IgG（货号GB25301）均购自武汉塞维尔生物科技有限公司。

低氧设备（型号0320GC-A06）为北京隆福佳生物科技有限公司产品，包括低氧舱和气体混合机：低氧舱用于饲养动物，气体混合机通过向低氧舱内灌入N₂和压缩空气来模拟低氧环境。病理石蜡切片机（型号RM2016）和明场、荧光FISH数字病理扫描仪（型号Aperio VERSA）为德国Leica公司产品。组织包埋机（型号JB-L5）为武汉俊杰电子有限公司产品。显微镜以及成像系统（型号DS-U3）和正置光学显微镜（型号Eclipse E100）为日本Nikon公司产品。标准规格酶标仪（型号#1681130）、ChemiDoc成像系统和实时荧光定量PCR仪（型号CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System, C1000 Touch™）均为美国Bio-Rad产品。组织匀浆机（型号MagNA Lyser Instrument, #03358968001）为瑞士Roche公司产品。核酸蛋白定量仪（型号NanoPhotomete, N50-Touch）为德国Implen公司产品。全波长酶标仪（型号SpectraMax ABS plus）为美国Molecular Devices公司产品。

1.3 分组处理和组织样本采集

所有实验小鼠适应性饲养1周后，采用随机数字表法，将小鼠分为常氧24 h组（Normoxia-24 h）、低氧24 h组（Hypoxia-24 h）、常氧72 h组（Normoxia-72 h）和低氧72 h组（Hypoxia-72 h），每组9只。常氧组小鼠饲养于实验动物中心屏障环境中，作为对照；低氧组小鼠放入屏障环境实验室的低氧舱内，实验时氧气体积分数设定为10%。实验结束后，小鼠禁食6 h，称重后用1%戊巴比妥钠，按照5 μ L/g小鼠体重的剂量，腹腔注射进行麻醉，然后实施断颈法安乐死。解剖后分别采集小鼠十二指肠和结肠组织，置于预冷的PBS中冲洗，用滤纸吸干水分，置于液氮冷冻，并转移至-80 $^{\circ}$ C冰箱保存，用于后续分子指标检测。另剪取一小块十二指肠和结肠组织，置于质量分数为4%的多聚甲醛溶液中固定24 h，生理盐水（即0.9%NaCl溶液）洗涤3次，保存于70%乙醇溶液，用于后续的组

织切片制作。为减少个体差异，采集的各类组织均选择固定部位。

1.4 HE染色观察肠道组织病理学变化

将固定好的十二指肠和结肠组织进行梯度75%、85%、90%、95%、100%乙醇脱水，二甲苯透明、浸蜡与包埋，切片厚度为5 μ m。粘片后于37 $^{\circ}$ C烘箱烤片48 h，切片脱蜡至水，依次将切片放入二甲苯I、II各20 min，无水乙醇I、II和75%乙醇溶液中各5 min，自来水洗，然后进行苏木精和伊红染色：苏木精染液染3~5 min，伊红染液染色5 min，脱水封固。光学显微镜下观察染色结果，并拍照。

1.5 蛋白质印迹法检测肠道屏障功能和上皮细胞凋亡相关蛋白表达

将液氮冷冻保存的组织标本加入RIPA细胞裂解液、蛋白酶和磷酸酶抑制剂后，提取小鼠十二指肠、结肠总蛋白，用BCA蛋白定量试剂盒测得蛋白浓度。每个样本取30 μ g总蛋白，加入蛋白上样缓冲液，100 $^{\circ}$ C煮沸变性后上样，恒压120 V电泳1 h分离不同分子量蛋白质，恒流200 mA湿转60 min将SDS-聚丙烯酰胺凝胶上的蛋白转移到PVDF膜上。加入封闭液室温封闭1 h后，加入兔抗鼠Occludin、ZO-1、Bax和Bcl-2一抗，4 $^{\circ}$ C孵育过夜（稀释比例均为1:2 000；内参 β -actin抗体稀释比例为1:5 000），PBST洗涤3次 $\times$ 6 min；加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔IgG二抗（抗体稀释比例均为1:5 000），在室温孵育1.5 h，PBST洗涤3次 $\times$ 6 min；用ECL超敏发光液显影曝光拍照，将得到的目的蛋白条带用Image J软件进行光密度分析并统计灰度值，以目的蛋白与内参 β -actin蛋白条带灰度值表示目的蛋白的相对表达水平。

1.6 免疫组织化学法检测肠道紧密连接蛋白和细胞凋亡相关蛋白表达

将1.4节中制作好的结肠、十二指肠组织石蜡切片充分脱蜡，梯度乙醇溶液复水，切片浸泡在柠檬酸盐缓冲液中微波加热修复，加入3%过氧化氢稀释液消除内源性过氧化物酶的活性；加入羊血清封闭液37 $^{\circ}$ C孵育30 min后，加入兔抗鼠Occludin和c-caspase-3一抗于4 $^{\circ}$ C过夜孵育，PBS洗涤后滴加辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔IgG二抗并在37 $^{\circ}$ C温箱中孵育30 min；PBS洗涤，DAB显色，苏木精对比染色细胞核，脱水后用中性树脂封固保存并拍照。利用Image J软件对每个视野图片的染色区域进行光密度定量，平均光密度=总光密度值/组织面积（AOD=IOD/area）。

1.7 实时荧光定量PCR检测肠道炎性细胞因子和凋亡相关蛋白水平

将液氮冷冻保存的组织取约 50 mg，加入 1 mL TRIGent 后，低温匀浆裂解，RNA 提取具体步骤遵照 TRIGent 试剂盒说明进行操作。获得 RNA 沉淀后于 4 ℃ 条件下 12 000 r/min 离心 15 min，弃上清液，用 1 mL 体积分数为 0.1% 的 DEPC 水配制的 75% 乙醇洗涤 RNA 沉淀，该步骤重复 2 次以提高 RNA 的质量；4 ℃ 条件 12 000 r/min 离心 5 min，弃上清液，室温干燥 1~2 min，DEPC 水溶解 RNA，使用 NanoPhotometer-N50-Touch 分光光度计测定 RNA 浓度和质量并记录；根据

反转录试剂盒说明书的方法，取 2 μg 总 RNA，在去除基因组 DNA 后，进行反转录反应得到 cDNA。实时定量 PCR 反应使用 SYBR Green 染料法，反应体系为 12.5 μL。循环参数包括 95 ℃ 变性 30 s，1 个循环；95 ℃ 变性 5 s，60 ℃ 退火 30 s，扩增 40 个循环。应用熔解曲线程序进行连续荧光测量，以 β -actin 为内参基因，使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算目标基因白细胞介素（interleukin, IL）-1 β 、IL-6、IL-10、肿瘤坏死因子- α （tumor necrosis factor- α , TNF- α ）及单核细胞趋化蛋白-1（monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1）的 mRNA 相对水平，引物序列见表 1。

表 1 实时荧光定量 PCR 引物序列
Table 1 Sequence list of primers used in real-time fluorescent quantitative PCR

基因 Gene	正向引物 Forward primers(5'→3')	反向引物 Reverse primers(5'→3')
β -actin	GGCTGTATTCCCTCCATCG	CCAGTTGGTAACAATGCCATGT
IL-1 β	GCAACTGTTCTGAACTCAACT	ATCTTTTGGGGTCCGTCAACT
TNF- α	CCTGTAGCCACGTCGTAG	GGGAGTAGACAAGGTACAACCC
IL-6	TAGTCCTTCCTACCCCAATTTC	TTGGTCCTTAGCCACTCCTTC
MCP-1	TAAAAACCTGGATCGGAACCAAA	GCATTAGCTTCAGATTACGGGT
IL-10	AGCCTTATCGGAAATGATCCAGT	GGCCTTGTAGACACCTTGGT

1.8 TUNEL 染色法检测肠道上皮细胞凋亡

使用一步法 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒进行十二指肠上皮细胞凋亡检测，具体步骤参照说明书进行。将 1.4 节中制作好的十二指肠石蜡切片进行脱蜡，用蛋白酶 K 在 37 ℃ 孵育 22 min 进行抗原修复，并用 0.1% Triton 破膜处理 20 min，然后加入 TdT 酶溶液和荧光标记液于 37 ℃ 孵育 2 h，再加入 DAPI（体积稀释比为 1：1 000）对比染色细胞核，最后使用 Nikon 成像系统 DS-U3 对 TUNEL 阳性染色细胞进行观察和拍照。

1.9 统计学处理

应用 SPSS 26.0 软件进行统计分析，并用 GraphPad Prism 9.0 软件绘图。各实验结果数值均用平均值±标准误差表示。本研究虽设计了 4 组，但统计分析时仅作为常氧组（24 h 或 72 h）和缺氧组（相应时间）进行比较，因此两组间均数比较采用双侧 t 检验，以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

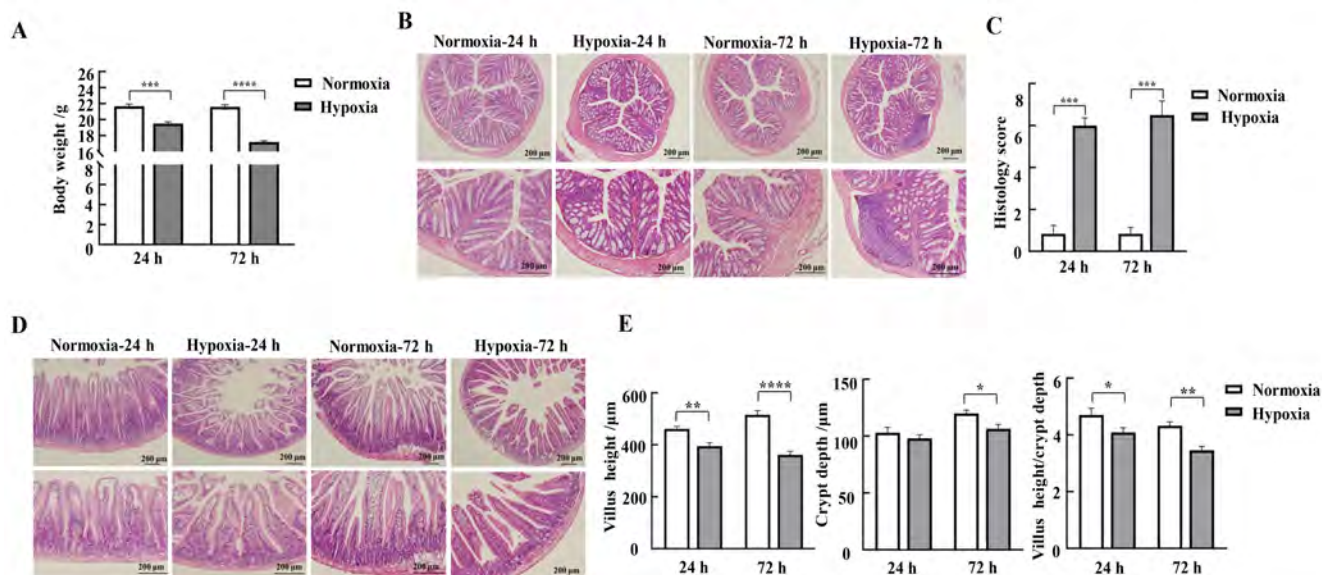
2.1 急性缺氧应激对小鼠体重及肠道组织病理学变化的影响

与常氧对照组相比，急性缺氧应激 24 h 和 72 h 均

能够显著降低小鼠体重（ $P<0.05$ ）（图 1A），这与先前的研究结果^[3]一致。进一步的 HE 染色结果显示，与常氧对照组相比，缺氧应激 24 h 和 72 h 的小鼠结肠表现出结肠黏膜炎性细胞浸润、隐窝结构异常的现象，出现了一定程度的病理损伤（图 1B~C）；此外，缺氧应激 24 h 和 72 h 的小鼠十二指肠绒毛均出现缩短和脱落现象（图 1D），绒毛长度显著缩短（ $P<0.05$ ），绒毛长度与隐窝深度比值均显著降低（ $P<0.05$ ，图 1E）。

2.2 急性缺氧应激对肠道紧密连接蛋白表达的影响

蛋白质印迹检测结果显示，缺氧应激 24 h 和 72 h 后小鼠十二指肠组织中紧密连接蛋白 Occludin 的相对表达水平均显著降低（ $P<0.05$ ，图 2A），而且缺氧应激 72 h 后 ZO-1 蛋白的相对表达水平显著降低（ $P<0.05$ ，图 2B）。免疫组织化学检测结果显示，缺氧应激 24 h 和 72 h 后十二指肠组织中 Occludin 蛋白的原位表达量略有减少，但差异尚未有统计学意义（图 2C~D）；而缺氧应激 24 h 和 72 h 均能降低结肠组织中 Occludin 蛋白的原位表达水平，且 24 h 组的差异有统计学意义（ $P<0.05$ ，图 2E~F）。以上结果提示急性缺氧应激可导致肠道屏障受损。



注: A, 各组小鼠体重变化 ($n=9$); B~C, 小鼠结肠 HE 染色结果及病理组织学评分 (每组 3 只小鼠样本); D, 小鼠十二指肠 HE 染色结果; E, 小鼠十二指肠绒毛长度、隐窝深度和绒毛长度/隐窝深度比值 (每组 3 只小鼠样本)。Normoxia 为常氧对照组, Hypoxia 为低氧应激组。数据表示为平均值 $\pm$ 标准误; 与对照组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$ 。

Note: A, Changes in body weight of mice in each group ($n=9$); B-C, HE staining results and pathohistologic scores of mice colon ($n=3$); D, HE staining results of mice duodenum; E-G, Lengths of mice duodenal villi, depths of crypts, and values of villus length/crypt depth ($n=3$). Normoxia indicates normoxic control group, and Hypoxia indicates hypoxic stress group. Data are expressed as mean $\pm$ standard error; compared with normoxic control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$.

图1 缺氧应激对小鼠体重变化、结肠和十二指肠黏膜形态的影响

Figure 1 Effects of hypoxic stress on body weight changes and morphology of the mucosa of the colon and duodenum in mice

2.3 急性缺氧应激对肠道组织炎性细胞因子表达的影响

实时荧光定量PCR检测结果显示, 缺氧应激24 h后小鼠十二指肠组织中IL-1 β 、IL-6和MCP-1的mRNA表达水平明显提高, 72 h后IL-1 β 和TNF- α 表达水平明显提高(图3A~B, $P<0.05$); 缺氧应激24 h后小鼠结肠组织中炎性细胞因子的表达均无明显变化, 但72 h后可炎性细胞因子和趋化因子IL-1 β 、TNF- α 、IL-6、MCP-1以及抗炎因子IL-10的表达水平均明显增高(图3C~D, $P<0.05$)。

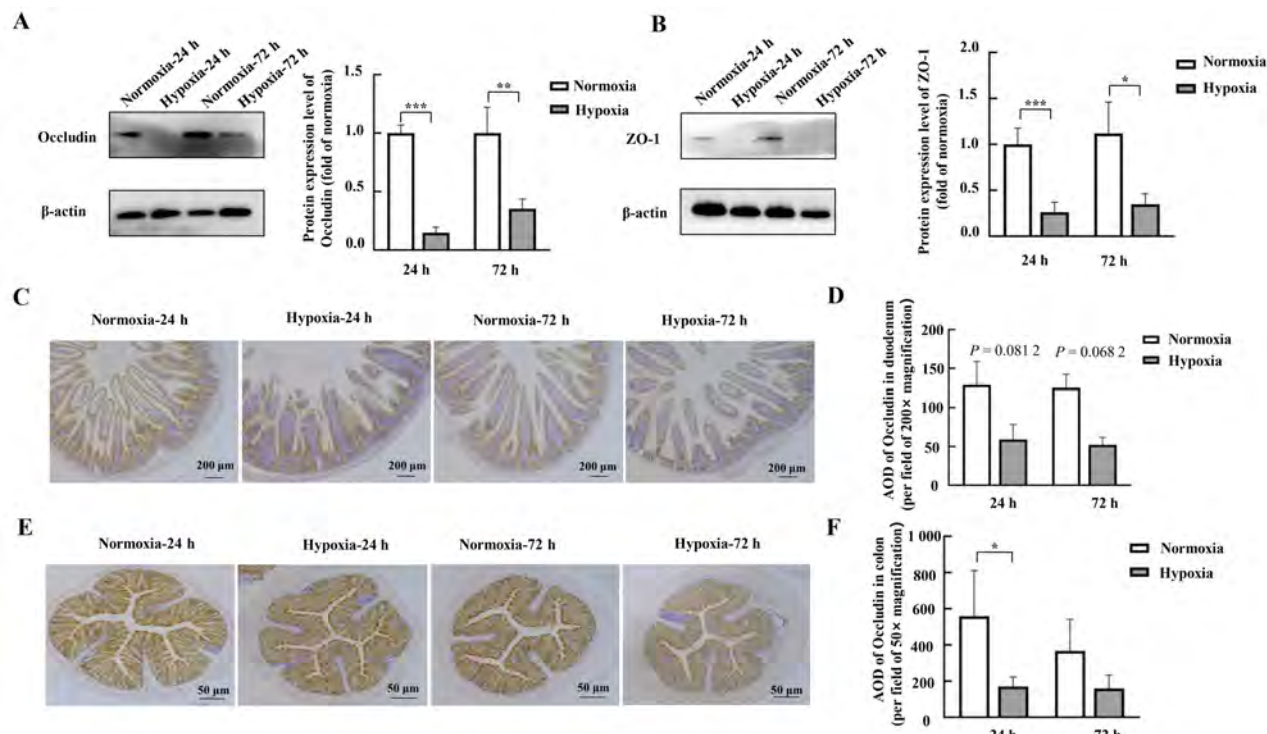
2.4 急性缺氧应激诱导肠上皮细胞的凋亡

TUNEL染色后观察发现, 缺氧应激24 h和72 h的小鼠十二指肠上皮细胞凋亡均显著增加($P<0.0001$, 图4A~B)。免疫组织化学法(针对结肠组织)和蛋白质印迹法(针对十二指肠组织)结果显示, 缺氧应激24 h能够显著上调小鼠肠道组织中凋亡蛋白c-caspase-3的表达($P<0.05$, 图5A~B); 与常氧对照组相比, 缺氧应激24 h和72 h后抗凋亡蛋白Bel-2的表达水平显著降低($P<0.05$), 而且缺氧应激72 h后小鼠肠道促凋亡蛋白Bax的表达有增加趋势(图5C~D)。

3 讨论

本研究通过模拟急性缺氧环境, 建立了实验性高原小鼠肠道应激损伤模型, 并观察到该模型小鼠肠道组织出现病理损伤, 导致肠屏障功能障碍, 主要的病理表现为十二指肠绒毛脱落、绒毛长度缩短、绒毛长度/隐窝深度比值降低、肠绒毛受损, 以及肠组织中紧密连接蛋白的表达水平显著降低等。本研究还发现, 缺氧应激可促使小鼠肠道促凋亡相关蛋白表达上调, 抑凋亡蛋白表达下降, 肠上皮细胞凋亡增加。此外, 通过对缺氧应激不同时间小鼠肠道炎症水平的监测, 发现缺氧应激可导致肠道组织炎性细胞因子表达水平升高, 炎性细胞浸润, 出现一定程度的炎症反应, 且缺氧应激24 h时十二指肠组织发生炎症反应, 而缺氧72 h时结肠开始出现较为严重的炎症反应。

呼吸急促和中枢神经系统症状如头痛和头晕, 是急性高原反应的主要症状, 若不及时治疗, 可能导致高原肺水肿和高原脑水肿, 后者是一种潜在的人类致命性疾病^[1-3]。急性高山病是高原地区特有的由急性缺氧引起的相关疾病。此外, 除了常见的头痛、胸闷、

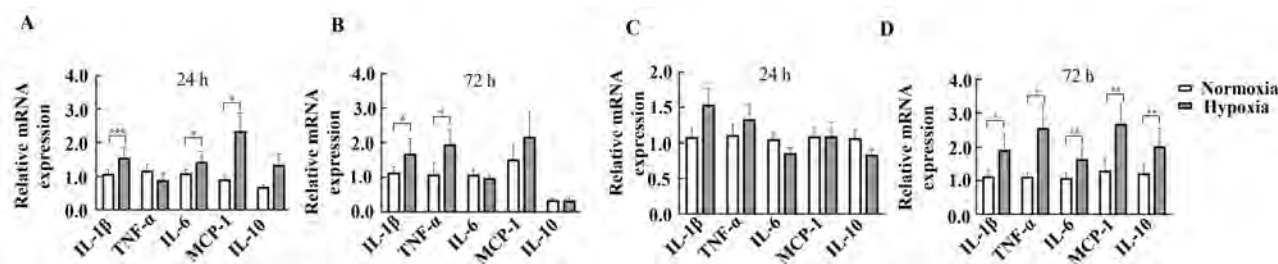


注：A～B，蛋白质印迹法检测小鼠十二指肠组织中紧密连接蛋白 Occludin、ZO-1 的表达及其相对表达量分析（每组 4 只小鼠样本）；C～D，免疫组织化学法检测小鼠十二指肠组织中紧密连接蛋白 Occludin 及其平均光密度值（AOD）（每组 3 只小鼠样本）；E～F，免疫组织化学法检测小鼠结肠组织中紧密连接蛋白 Occludin 及其平均光密度值（AOD）（每组 3 只小鼠样本）。Normoxia 为常氧对照组，Hypoxia 为缺氧应激组。数据表示为平均值±标准误；与对照组比较，* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ ，*** $P<0.001$ 。

Note: A-B, Expression of tight junction proteins Occludin and ZO-1 in mouse duodenal tissues detected by Western blotting and their relative expression level analysis ($n=4$). C-D, Detection of the tight junction protein Occludin and its average optical density (AOD) in mouse duodenal tissues by immunohistochemistry ($n=3$). E-F, Detection of tight junction protein Occludin and its AOD in mouse colon tissues by immunohistochemistry ($n=3$). Normoxia indicates control normoxic group, and Hypoxia indicates hypoxic stress group. Data are expressed as mean $\pm$ standard error; compared with normoxic control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

图2 蛋白质印迹和免疫组织化学法检测缺氧应激对小鼠十二指肠和结肠组织中紧密连接蛋白表达的影响

Figure 2 Effects of hypoxic stress on the expression of the tight junction protein in mouse duodenal and colonic tissues as detected by Western blotting and immunohistochemistry



注：A～B，小鼠十二指肠组织；C～D，小鼠结肠组织。Normoxia 为常氧对照组，Hypoxia 为缺氧应激组。数据表示为平均值±标准误，每组 6 只小鼠样本；与对照组比较，* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ ，*** $P<0.001$ 。

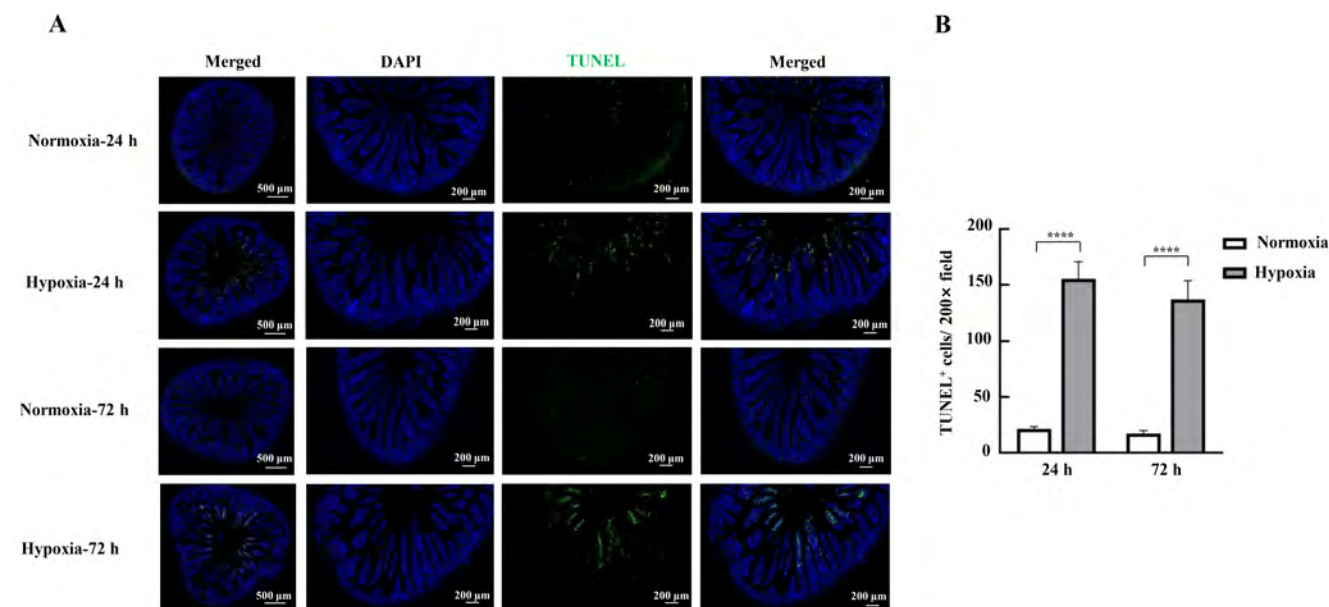
Note: A-B, Mouse duodenal tissues; C-D, Mouse colon tissues. Normoxia indicates normoxic control group, and Hypoxia indicates hypoxic stress group. Data are expressed as mean $\pm$ standard error; $n=6$, compared with normoxic control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

图3 实时荧光定量PCR检测缺氧应激对小鼠十二指肠和结肠组织中炎症细胞因子表达的影响

Figure 3 Effects of hypoxic stress on the expression of inflammatory cytokines in mouse duodenal and colonic tissues detected by real-time fluorescence quantitative PCR

心悸等症状外，急性高山病也会出现恶心、呕吐和腹泻等肠道症状^[8-9]，这可能进一步加重呼吸困难、头晕和头痛。在登上高原后的2～4 d观察到了包括消化

性溃疡在内的胃肠道病变^[5]。据报道，在4 905 m高空工作的体力劳动者中也出现了高原胃肠道出血^[10]。越来越多的证据表明，肠黏膜损伤是肠功能障碍的主要



注：A，小鼠十二指肠组织的TUNEL染色照片；B，TUNEL阳性细胞计数。Normoxia为常氧对照组，Hypoxia为缺氧应激组。数据表示为平均值±标准误；每组3只小鼠样本；与常氧对照组比较，**** $P<0.0001$ 。

Note: A, Photographs of TUNEL staining of mouse duodenal tissues; B, TUNEL-positive cell count. Normoxia indicates normoxic control group, and Hypoxia indicates hypoxic stress group. Data are expressed as mean $\pm$ standard error; $n=3$, compared with normoxic control group, **** $P<0.0001$.

图4 TUNEL染色法检测缺氧应激对小鼠肠上皮细胞凋亡的影响

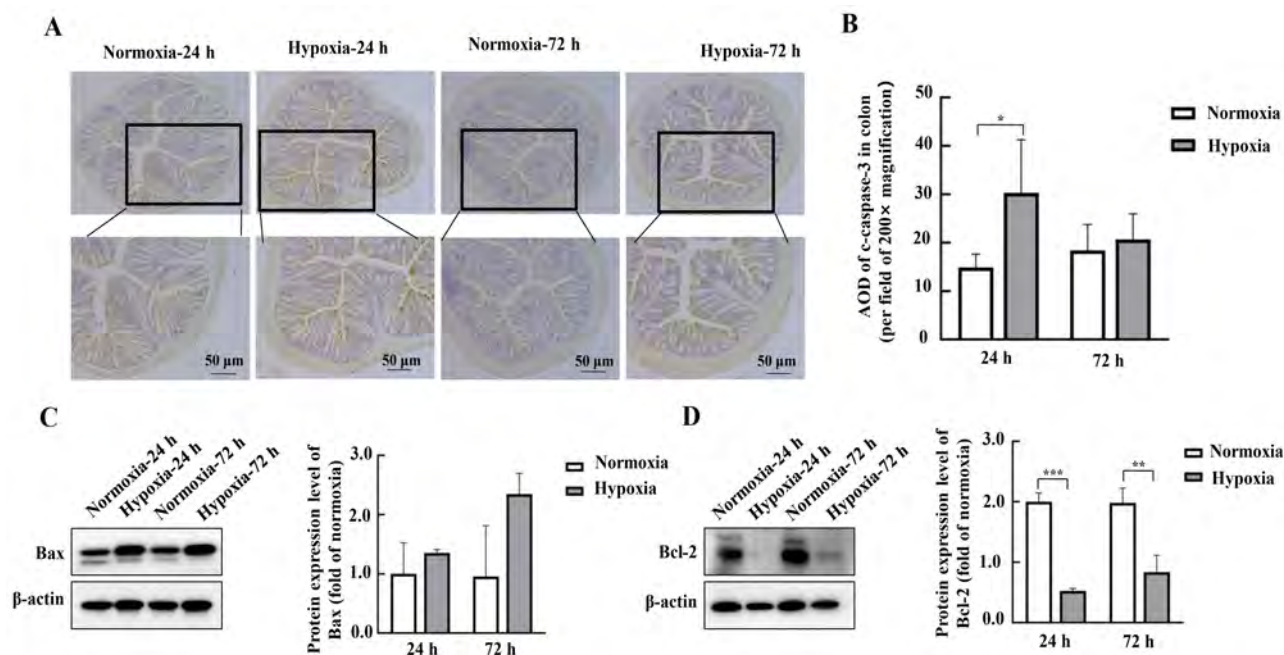
Figure 4 Effects of hypoxic stress on apoptosis of mice intestinal epithelial cells detected by TUNEL staining method

原因，但与高海拔有关的胃肠道反应的发病机制尚不清楚。氧稳态对维持胃肠道健康至关重要，缺氧条件下氧气是影响人类行为和活动的主要因素^[17-19]，高原地区低氧使得人类一旦进入高海拔地区就容易出现消化系统变化，胃肠道屏障被破坏并引起功能障碍。研究表明，当海拔高于2 500 m时，机体容易出现缺氧应激，这也是人类在攀登高海拔时（海拔>2 500 m）易出现胃肠道疾病的可能主要原因之一^[9]。此外，在缺氧条件下（如高海拔地区）可观察到血液的重新分配。更多血液被用于满足其他器官对血液的需要，这加剧了肠道的缺血和缺氧状态，从而导致肠上皮细胞的损伤和肠道通透性的增加^[13]。上述研究表明缺氧环境下机体肠黏膜及肠屏障受损。在本研究中，我们发现急性缺氧应激也可导致小鼠的肠黏膜损伤，具体表现为急性缺氧应激小鼠十二指肠绒毛长度变短、隐窝结构异常、绒毛/隐窝比下降，结肠黏膜出现炎性细胞浸润、隐窝结构不规则等。

紧密连接蛋白表达影响肠黏膜的完整性和通透性^[20]，与肠道屏障密切相关。本研究观察到，急性缺氧模型小鼠十二指肠和结肠组织中紧密连接蛋白Occludin和ZO-1的表达水平均显著降低，提示该模型小鼠的肠黏膜完整性和通透性受损，从而导致肠道屏

障障碍。胃肠道中的缺氧应激可损害肠道微血管，导致高原性胃肠道出血^[10]。本研究虽未观察到模型小鼠存在明显的胃肠道出血现象，但肠道出现了组织结构的病理改变以及明显的病理组织损伤。此外，肠道是机体营养吸收的主要场所。肠屏障受损、功能障碍会影响营养物质的消化吸收，伴随身体不适、厌食等症状，这也可能是长期处于高原地区体重减轻的原因^[21]。本研究也发现急性缺氧应激模型小鼠的体重出现了显著降低。

肠道屏障是病原微生物进入肠腔必须经过的屏障。当该屏障受到破坏时，病原微生物感染和肠道炎症的风险容易增加，这会进一步导致细菌移位和局部或全身炎症反应等^[9]。肠道中促炎细胞因子的局部释放可直接损害肠道屏障，增加肠道通透性，并降低 Na^+/K^+ -ATP酶活性，引起肠腔内液体积聚，从而导致腹泻^[14]。炎性细胞因子如TNF- α 、IL-1 β 和IL-6在缺氧暴露后含量升高，且被认为可促进高原性肺水肿、脑水肿的发生^[22-23]。本研究发现，缺氧应激能够显著提高小鼠十二指肠和结肠组织中炎性细胞因子及炎性标志物的表达水平，与前期研究报告^[22-25]相一致。缺氧应激后表达显著升高的TNF- α 是一种重要的促炎因子，其通过诱导上皮细胞凋亡破坏上皮屏障，还可促



注：A~B，免疫组织化学法检测小鼠结肠组织中凋亡相关蛋白 c-caspase-3 及其平均光密度值（AOD）（每组 3 只小鼠样本）；C~D，蛋白质印迹法检测小鼠十二指肠组织中凋亡相关蛋白 Bax、Bcl-2 的表达及其相对表达量分析（每组 6 只小鼠样本）。Normoxia 为常氧对照组，Hypoxia 为缺氧应激组。数据表示为平均值±标准误；与常氧对照组比较，* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ ，*** $P<0.001$ 。

Note: A-B, Detection of apoptosis-related protein c-caspase-3 and its average optical density (AOD) in mouse colon tissues by immunohistochemistry ($n=3$). C-D, Expression of apoptosis-related proteins Bax and Bcl-2 and their relative expression analysis in mouse duodenal tissues detected by Western blotting method ($n=6$). Normoxia indicates normoxic control group, and Hypoxia indicates hypoxic stress group. Data are expressed as mean $\pm$ standard error; $n=6$, compared with normoxic control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

图5 蛋白质印迹和免疫组织化学法检测缺氧应激对小鼠肠道中凋亡相关蛋白表达的影响

Figure 5 Effects of hypoxic stress on the expression of intestinal apoptosis-related proteins in mouse colon detected by Western blotting and immunohistochemistry

炎症趋化因子聚集，活化中性粒细胞和巨噬细胞，以及激活肠道免疫系统^[26]。IL-6作为经典的炎症信号通路中重要的转录调节因子NF- κ B的效应分子之一，可以激活NF- κ B，进一步促进炎症细胞浸润，加重肠黏膜组织损伤。本研究在缺氧应激模型小鼠肠道中也发现了TNF- α 、IL-1 β 和IL-6等炎症细胞因子的mRNA表达水平显著升高。此外，本研究还发现，十二指肠中炎症因子表达的显著升高主要发生在缺氧24 h，而结肠中主要在缺氧应激72 h时出现炎症标志物的大量表达。这提示在急性缺氧早期，小肠最为敏感，较结肠先发生应激损伤，随着缺氧应激时间延长，结肠炎症加剧。严重的炎症反应过程不仅可促使肠道出现较为明显的应激损伤，还会对动物的机体性能产生长期影响。

已有研究表明，细胞凋亡可诱导上皮细胞屏障损伤，而肠上皮细胞凋亡是引起肠屏障功能障碍和免疫紊乱的重要机制^[27]。细胞凋亡和坏死被认为是肠上皮更新和组织稳态所必需的两种主要的细胞死亡类型。

细胞凋亡是一种免疫沉默形式的细胞死亡，是抑制肠道进一步发生炎症反应的重要过程，且肠上皮细胞易受坏死性凋亡的影响^[28]。近年来，一些研究表明肠上皮细胞坏死性凋亡可导致人类炎症性肠病中的肠道炎症或损伤^[29]；在溃疡性结肠炎中，可溶性CD95L介导的上皮细胞凋亡可能导致上皮屏障功能破坏，促进病原微生物入侵^[30]；坏死性凋亡有助于促进脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导的肠损伤^[29]；在炎症肠病患者和结肠炎临床前模型中通常可以观察到肠上皮细胞凋亡^[31]。本课题组前期研究结果显示，在离乳应激仔猪中小肠上皮细胞持续内质网应激诱导的过度凋亡可能是引起屏障功能异常的原因之一^[19]。应激状态下，体内可产生大量自由基。而自由基作为活性分子，已被证实是多种细胞内重要的凋亡诱导分子，能够引起凋亡相关蛋白的表达。这提示应激反应可能与凋亡信号通路的激活有关。执行细胞凋亡内在途径的关键取决于Bcl-2家族成员，这些蛋白质可以感知细胞应激并启动线粒体外膜的透化，导致细胞色素c和线

粒体衍生的半胱氨酸蛋白酶激活剂 (second mitochondria-derived activator of caspases, SMAC) 的释放。细胞色素c和SMAC导致凋亡小体形成和凋亡抑制蛋白 (inhibitor of apoptosis proteins, IAP) 的抑制, 最终导致凋亡性细胞死亡^[27-28]。本研究发现, 构建的急性缺氧应激小鼠模型中肠道上皮细胞凋亡显著增加, 且凋亡信号通路中抗凋亡蛋白Bcl-2的表达显著下调, 促凋亡蛋白Bax表达增加。Caspase 3是细胞凋亡过程中最主要的终末剪切酶, 它被凋亡信号活化, 对凋亡相关蛋白进行专一性切割, 从而失去抗凋亡活性, 转变为促凋亡蛋白^[32-34]。本研究结果发现, 急性缺氧应激小鼠模型中肠道c-caspase-3的蛋白水平显著提高。以上结果提示, 激活凋亡信号通路可促进肠道上皮细胞凋亡, 是急性缺氧应激引起肠道屏障功能障碍的可能原因之一。

目前在高原胃肠道疾病与缺氧肠道应激损伤研究中, 多以人作为研究对象, 通过测定体重指标、临床症状、血液样本中肠道脂肪酸结合蛋白 (intestinal fatty acid binding protein, I-FABP)、D-乳酸、脂多糖结合蛋白 (lipopolysaccharide binding protein, LBP) 等^[9,20,22]指标评判肠道屏障功能障碍。这种方法对肠道损伤的评价作用有限, 缺乏较为直观的肠道屏障功能损伤证据。还有部分研究以小鼠、大鼠作为研究对象, 多数模拟海拔在7 000 m及以上的生活环境, 可观察到小鼠、大鼠胃肠道明显受损; 而人类长期生存的高度限制是海拔5 000 m, 且90%的人类居住生活在4 000 m海拔以内^[3-4], 因此现有的动物建模方法与实际情况不太相符。本研究模拟海拔5 000 m高原低氧环境, 构建小鼠急性缺氧应激损伤动物模型, 从而进行一系列直观评价指标的检测。结果显示, 高原急性缺氧环境可导致应激小鼠肠道组织结构异常、肠屏障功能障碍、肠上皮细胞凋亡, 并引发肠道炎症反应。这些结果提示急性缺氧应激肠道损伤小鼠模型构建成功, 但具体的致病机制尚有待进一步深入揭示。

[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军事医学研究院实验动物管理与使用委员会批准 (批号 IACUC-DWZX-2022-049), 所有实验操作均按照军事医学研究院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 Military Medical Research Institute (Grant No. IACUC-DWZX-2022-049), and all experimental operations have been carried out in

accordance with the Standard Operating Procedures of the Experimental Animal Center of the Military Medical Research Institute, and in compliance with the requirements of the relevant laws and regulations on experimental animals in China.

[作者贡献 Author Contribution]

郑建华负责方法设计、实验操作、数据统计及论文撰写; 法云智负责监督指导及论文的审核及修改; 董巧燕参与部分实验操作、文稿校正; 邱业峰负责方案策划、研究方案与论文的审核及修改; 陈菁青提供研究经费, 负责项目管理、有效验证、论文修改及定稿。

[利益声明 Declaration of Interest]

所有作者均声明本文不存在利益冲突。

[参考文献 References]

- [1] WANG F, ZHANG H, XU T, et al. Acute exposure to simulated high-altitude hypoxia alters gut microbiota in mice[J]. Arch Microbiol, 2022, 204(7):412. DOI: 10.1007/s00203-022-03031-4.
- [2] NUSS R. Medical conditions and high-altitude travel[J]. N Engl J Med, 2022, 386(19): 1866-1867. DOI: 10.1056/NEJMc2203182.
- [3] 王珍, 周亚洲, 王立坤, 等. 持续低氧条件下大鼠肠道微生物变化及其与心肌损伤的关联研究[J]. 微生物学报, 2023, 63(8):3054-3067. DOI: 10.13343/j.cnki.wsxb.20220862. WANG Z, ZHOU Y Z, WANG L K, et al. Alterations in gut microbiota and their associations with cardiac injury in rats after exposure to continuous normobaric hypoxia[J]. Acta Microbiol Sin, 2023, 63(8): 3054-3067. DOI: 10.13343/j.cnki.wsxb.20220862.
- [4] KHANNA K, MISHRA K P, GANJU L, et al. High-Altitude-Induced alterations in Gut-Immune Axis: a review[J]. Int Rev Immunol, 2018, 37(2): 119-126. DOI: 10.1080/08830185. 2017. 1407763.
- [5] FRUEHAUF H, VAVRICKA S R, LUTZ T A, et al. Evaluation of acute mountain sickness by unsedated transnasal esophagogastroduodenoscopy at high altitude[J]. Clin Gastroenterol Hepatol, 2020, 18(10):2218-2225.e2. DOI: 10.1016/j.cgh.2019.11.036.
- [6] HAMAD N, TRAVIS S P L. Weight loss at high altitude: pathophysiology and practical implications[J]. Eur J Gastroenterol Hepatol, 2006, 18(1): 5-10. DOI: 10.1097/00042737-200601000-00002.
- [7] LUO H, ZHOU D J, CHEN Z, et al. Establishment and evaluation of an experimental rat model for high-altitude intestinal barrier injury[J]. Exp Ther Med, 2017, 13(2):475-482. DOI: 10.3892/etm.2016.4012.
- [8] MEIER D, COLLET T H, LOCATELLI I, et al. Does this patient have acute mountain sickness? [J]. JAMA, 2017, 318(18):1810. DOI: 10.1001/jama.2017.16192.
- [9] MCKENNA Z J, GORINI PEREIRA F, GILLUM T L, et al. High-altitude exposures and intestinal barrier dysfunction[J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2022, 322(3): R192-R203.

- DOI: 10.1152/ajpregu.00270.2021.
- [10] WU T Y, DING S Q, LIU J L, et al. High-altitude gastrointestinal bleeding: an observation in Qinghai-Tibetan railroad construction workers on Mountain Tanggula[J]. *World J Gastroenterol*, 2007, 13(5):774-780. DOI: 10.3748/wjg.v13.i5.774.
- [11] BISCHOFF S C, BARBARA G, BUURMAN W, et al. Intestinal permeability: a new target for disease prevention and therapy [J]. *BMC Gastroenterol*, 2014, 14:189. DOI: 10.1186/s12876-014-0189-7.
- [12] KÖNIG J, WELLS J, CANI P D, et al. Human intestinal barrier function in health and disease[J]. *Clin Transl Gastroenterol*, 2016, 7(10): e196. DOI: 10.1038/ctg.2016.54.
- [13] LOSHBAUGH J E, LOEPKY J A, GREENE E R. Effects of acute hypobaric hypoxia on resting and postprandial superior mesenteric artery blood flow[J]. *High Alt Med Biol*, 2006, 7(1):47-53. DOI: 10.1089/ham.2006.7.47.
- [14] MUSCH M W, CLARKE L L, MAMAH D, et al. T cell activation causes diarrhea by increasing intestinal permeability and inhibiting epithelial Na⁺/K⁺-ATPase[J]. *J Clin Invest*, 2002, 110(11):1739-1747. DOI: 10.1172/JCI15695.
- [15] DINMORE A J, EDWARDS J S, MENZIES I S, et al. Intestinal carbohydrate absorption and permeability at high altitude (5,730 m)[J]. *J Appl Physiol*, 1994, 76(5):1903-1907. DOI: 10.1152/jappl.1994.76.5.1903.
- [16] LI Y Y, WANG Y C, SHI F, et al. Phospholipid metabolites of the gut microbiota promote hypoxia-induced intestinal injury via CD1d-dependent $\gamma\delta$ T cells[J]. *Gut Microbes*, 2022, 14(1): 2096994. DOI: 10.1080/19490976.2022.2096994.
- [17] BASNYAT B, MURDOCH D R. High-altitude illness[J]. *Lancet*, 2003, 361(9373): 1967-1974. DOI: 10.1016/S0140-6736(03)13591-X.
- [18] KARL J P, BERRYMAN C E, YOUNG A J, et al. Associations between the gut microbiota and host responses to high altitude[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2018, 315(6): G1003-G1015. DOI: 10.1152/ajpgi.00253.2018.
- [19] FAN X X, LI S, WU Z L, et al. *Glycine* supplementation to breast-fed piglets attenuates post-weaning jejunal epithelial apoptosis: a functional role of CHOP signaling[J]. *Amino Acids*, 2019, 51(3):463-473. DOI: 10.1007/s00726-018-2681-9.
- [20] PATANKAR J V, BUBECK M, ACERA M G, et al. Breaking bad: necroptosis in the pathogenesis of gastrointestinal diseases [J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1203903. DOI: 10.3389/fimmu.2023.1203903.
- [21] ZHANG W, JIAO L F, LIU R X, et al. The effect of exposure to high altitude and low oxygen on intestinal microbial communities in mice[J]. *PLoS One*, 2018, 13(9): e0203701. DOI: 10.1371/journal.pone.0203701.
- [22] HUANG X, ZHOU Y Z, ZHAO T, et al. A method for establishing the high-altitude cerebral edema (HACE) model by acute hypobaric hypoxia in adult mice[J]. *J Neurosci Methods*, 2015, 245: 178-181. DOI: 10.1016/j.jneumeth.2015.02.004.
- [23] ZHOU Y Z, HUANG X, ZHAO T, et al. Hypoxia augments LPS-induced inflammation and triggers high altitude cerebral edema in mice[J]. *Brain Behav Immun*, 2017, 64:266-275. DOI: 10.1016/j.bbi.2017.04.013.
- [24] HILL G W, GILLUM T L, LEE B J, et al. Prolonged treadmill running in normobaric hypoxia causes gastrointestinal barrier permeability and elevates circulating levels of pro- and anti-inflammatory cytokines[J]. *Appl Physiol Nutr Metab*, 2020, 45(4):376-386. DOI: 10.1139/apnm-2019-0378.
- [25] LI M, HAN T Y, ZHANG W J, et al. Simulated altitude exercise training damages small intestinal mucosa barrier in the rats [J]. *J Exerc Rehabil*, 2018, 14(3): 341-348. DOI: 10.12965/jer.1835128.064.
- [26] SHIH D Q, TARGAN S R. Insights into IBD pathogenesis[J]. *Curr Gastroenterol Rep*, 2009, 11(6): 473-480. DOI: 10.1007/s11894-009-0072-9.
- [27] LIU L, LIANG L P, YANG C H, et al. Extracellular vesicles of *Fusobacterium nucleatum* compromise intestinal barrier through targeting RIPK1-mediated cell death pathway[J]. *Gut Microbes*, 2021, 13(1): 1-20. DOI: 10.1080/19490976.2021.1902718.
- [28] PATANKAR J V, BECKER C. Cell death in the gut epithelium and implications for chronic inflammation[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2020, 17(9): 543-556. DOI: 10.1038/s41575-020-0326-4.
- [29] LIU Y L, XU Q, WANG Y, et al. Necroptosis is active and contributes to intestinal injury in a piglet model with lipopolysaccharide challenge[J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12(1):62. DOI: 10.1038/s41419-020-03365-1.
- [30] STRÄTER J, WELLISCH I, RIEDL S, et al. CD95 (APO-1/Fas)-mediated apoptosis in colon epithelial cells: a possible role in ulcerative colitis[J]. *Gastroenterology*, 1997, 113(1): 160-167. DOI: 10.1016/S0016-5085(97)70091-x.
- [31] OKUMURA R, TAKEDA K. Roles of intestinal epithelial cells in the maintenance of gut homeostasis[J]. *Exp Mol Med*, 2017, 49(5): e338. DOI: 10.1038/emmm.2017.20.
- [32] CHENG E H, KIRSCH D G, CLEM R J, et al. Conversion of bcl-2 to a bax-like death effector by caspases[J]. *Science*, 1997, 278(5345):1966-1968. DOI: 10.1126/science.278.5345.1966.
- [33] MCKENNA Z J, BELLOVARY B N, DUCHARME J B, et al. Circulating markers of intestinal barrier injury and inflammation following exertion in hypobaric hypoxia[J]. *Eur J Sport Sci*, 2023, 23(10):2002-2010. DOI: 10.1080/17461391.2023.2203107.
- [34] MCKENNA Z J, FENNEL Z J, BERKEMEIER Q N, et al. Exercise in hypobaric hypoxia increases markers of intestinal injury and symptoms of gastrointestinal distress[J]. *Exp Physiol*, 2022, 107(4):326-336. DOI: 10.1113/EP090266.
- (收稿日期: 2023-08-17 修回日期: 2023-11-18)
(本文编辑: 张俊彦, 富群华, 丁宇菁, 张萍)
- [引用本文]**
郑建华, 法云智, 董巧燕, 等. 高原急性缺氧肠道应激损伤小鼠模型的构建与评价[J]. *实验动物与比较医学*, 2024, 44(1): 31-41. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2023.118.
ZHENG J H, FA Y Z, DONG Q Y, et al. Construction and evaluation of a mouse model with intestinal injury by acute hypoxic stress in plateau[J]. *Lab Anim Comp Med*, 2024, 44(1): 31-41. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2023.118.



沈如凌, 生物学博士, 上海实验动物研究中心模式生物研发部部长, 上海科学院模式动物转化研究所副所长,《实验动物与比较医学》杂志青年编委, 中国医药生物技术协会组织生物样本库分会委员。主持基因编辑模式动物研发及模型资源库建设工作, 已带领团队完成基因敲除/敲入小鼠模型研发及表型研究150余种, 为神经退行性疾病、免疫及感染性疾病、肿瘤治疗、代谢和心脑血管疾病等方向的应用研究提供模型支撑, 先后承担或参与国家和省部级疾病动物模型研发及抗肿瘤研究方向的课题多项, 以通信作者或第一作者身份在国内外学术期刊上发表相关论文20余篇, 获得发明专利授权5项, 实用新型专利2项。

梁敏, 博士毕业于复旦大学生理学专业, 助理研究员, 现任职于上海实验动物研究中心模式生物研发部, 主要从事神经退行性疾病、神经免疫等

方面的模式动物模型研发及表型研究工作, 同时从事实验动物的胚胎资源保种工作。以第一作者身份发表SCI论文和中文期刊论文共计4篇, 获得中国博士后科学基金1项, 参与国家自然科学基金面上项目1项。



*Dmd*基因突变小鼠构建及在肌肉及免疫系统的表型验证

梁敏¹, 郭洋¹, 王津津², 朱梦妍¹, 池骏², 陈艳娟¹, 王成稷¹, 喻智澜¹, 沈如凌¹

(1. 上海实验动物研究中心, 上海 201203; 2. 上海南方模式生物科技股份有限公司, 上海 201318)

[摘要] **目的** 利用CRISPR/Cas9基因编辑技术构建抗肌萎缩蛋白(dystrophin, *Dmd*)基因第23号外显子点突变的*Dmd*基因突变小鼠, 分析并验证该小鼠在肌肉及免疫系统中的表型变化, 为杜氏肌营养不良症等疾病提供评价模型。**方法** 针对*Dmd*基因23号外显子序列特征, 设计合成小向导RNA(small guide RNA, sgRNA); 将Cas9 mRNA、sgRNA片段和oligo donor DNA显微注射到C57BL/6J小鼠受精卵中, 并将该受精卵移植至代孕鼠后出生获得F0代小鼠; F0代小鼠通过交配获得子代小鼠后, 基因型鉴定筛选得到*Dmd*基因阳性突变小鼠(命名为*Dmd*^{Mu/+}小鼠)。选择3月龄和9月龄的雄性半合子*Dmd*^{Mu/+}小鼠(命名为*Dmd*^{Mu/Y}小鼠)和野生型C57BL/6J小鼠(作为对照)用于表型验证: 称量记录活体小鼠体重, 并通过悬挂实验检测小鼠肌张力; 采集心脏和半腱肌, 采用HE染色法观察组织病理学变化, 进一步通过蛋白质印迹法检测9月龄小鼠肌肉组织内*Dmd*蛋白的表达情况。利用脂多糖诱导建立*Dmd*^{Mu/Y}小鼠急性炎症模型, 采集小鼠颌下静脉血, 采用流式细胞术检测外周血中性粒细胞和单核细胞比例变化。**结果** 基因组测序和蛋白质印迹结果表明*Dmd*基因点突变小鼠(即*Dmd*^{Mu/+}小鼠)构建成功, *Dmd*^{Mu/+}小鼠骨骼肌和心肌中未见*Dmd*蛋白表达, 与野生型C57BL/6J小鼠相比明显下降($P<0.05$)。与背景相同的野生型小鼠相比较, 3月龄和9月龄的雄性半合子突变小鼠(*Dmd*^{Mu/Y}小鼠)体重明显减轻($P<0.01$), 肌张力显著下降($P<0.05$); 9月龄*Dmd*^{Mu/Y}小鼠的骨骼肌和心肌发生肌间隙变宽等明显病变。未注射脂多糖时, 与野生型小鼠相比, 3月龄*Dmd*^{Mu/Y}小鼠的外周血中性粒细胞和单核细胞比例显著降低($P<0.01$); 经脂多糖诱导后, 3月龄*Dmd*^{Mu/Y}小鼠的外周血中性粒细胞比例仍然较野生型小鼠显著降低($P<0.01$), 而9月龄*Dmd*^{Mu/Y}小鼠的外周血中性粒细胞比例在脂多糖诱导后显著升高($P<0.05$), 但较野生型小鼠仍显著降低($P<0.01$); 同月龄*Dmd*^{Mu/Y}小鼠经脂多糖诱导后外周血单核细胞比例与野生型小鼠相比仅有偏低趋势($P>0.05$)。**结论** 成功构建了*Dmd*基因突变小鼠模型, 证实该基因具有维系肌肉组织正常形态和肌张力等重要功能, 并初步发现该基因缺失会减少外周血液中性粒细胞比例, 为后续研究杜氏肌营养不良症患者的免疫系统异变机制提供新的思路。

[关键词] *Dmd*基因; CRISPR/Cas9; 杜氏肌营养不良症; C57BL/6J小鼠

[中图分类号] Q95-33; R-332 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2024)01-0042-10



[基金项目] 上海市科技创新行动计划-实验动物专项课题“人源化小鼠模型的建立和评价平台建设”(22140900102)

[第一作者] 梁敏(1981—), 男, 博士, 助理研究员, 研究方向: 模式动物模型研发及表型研究(神经免疫方向)。E-mail: liangmin@slarc.org.cn

[通信作者] 沈如凌(1981—), 女, 博士, 副研究员, 研究方向: 模式动物模型研发及表型研究(肿瘤免疫和神经免疫方向)。E-mail: shenruling@slarc.org.cn。ORCID: 0000-0002-7529-810X

Construction of *Dmd* Gene Mutant Mice and Phenotype Verification in Muscle and Immune Systems

LIANG Min¹, GUO Yang¹, WANG Jinjin², ZHU Mengyan¹, CHI Jun², CHEN Yanjuan¹, WANG Chengji¹, YU Zhilan¹, SHEN Ruling¹

(1. Shanghai Laboratory Animal Research Center, Shanghai 201203, China; 2. Shanghai Model Organisms Inc. Shanghai 201318, China)

Correspondence to: SHEN Ruling (ORCID: 0000-0002-7529-810X), E-mail: shenruling@slarc.org.cn

[ABSTRACT] Objective The aim is to utilize CRISPR/Cas9 gene editing technology to construct *Dmd* gene mutant mice with a point mutation in exon 23 of the *Dmd* gene. Subsequently, the phenotypic changes of the mice in muscles and immune systems are analyzed and verified, providing an evaluation model for Duchenne muscular dystrophy and other related diseases. **Methods** Based on the sequence characteristics of exon 23 of the *Dmd* gene, small guide RNA (sgRNA) was designed and synthesized. Cas9 mRNA, sgRNA fragments, and oligo donor DNA were microinjected into fertilized eggs of C57BL/6J mice. After transferring the fertilized eggs to surrogate mice, F0 generation mice were born. After mating with F0 generation mice, offspring mice were obtained, and *Dmd* gene positive mutant (*Dmd*^{Mu/+}) mice were obtained after genotype identification. Male hemizygous *Dmd*^{Mu/+} (*Dmd*^{Mu/Y}) mice were selected for phenotype validation. The body weight of live 3- and 9-month-old mice were recorded. Muscle tension was evaluated through the grid test. Hearts and semitendinosus muscles were collected, and the histopathological changes were observed using HE staining. Further, the expression of *Dmd* protein in muscle tissue of 9-month-old mice was analyzed by Western blotting. An acute inflammation model was established in *Dmd*^{Mu/Y} mice using lipopolysaccharide induction. Peripheral blood from the submandibular vein was collected, and the changes in the proportion of neutrophils and monocytes were detected by flow cytometry. **Results** The results of genome sequencing and Western blotting confirmed the successful construction of *Dmd* gene point mutant mice (*Dmd*^{Mu/+} mice). *Dmd* protein expression was not detected in skeletal muscle and myocardium of *Dmd*^{Mu/+} mice, and it was significantly reduced compared to wild-type C57BL/6J mice ($P < 0.05$). Compared with wild-type mice of the same background, *Dmd*^{Mu/Y} mice at 3 and 9 months of age showed significant weight loss ($P < 0.01$) and decreased muscle tension ($P < 0.05$). 9-month-old *Dmd*^{Mu/Y} mice exhibited significant pathological changes in skeletal muscle and myocardium, including widening of intermuscular space. Under normal condition, compared with wild-type mice, the proportion of neutrophils and monocytes in the peripheral blood of 3-month-old *Dmd*^{Mu/Y} mice was significantly lower than that of wild-type mice ($P < 0.01$). After lipopolysaccharide stimulation, the proportion of neutrophils in peripheral blood of 3-month-old *Dmd*^{Mu/Y} mice remained significantly lower compared to that of wild-type mice ($P < 0.01$). The proportion of neutrophils in peripheral blood of 9-month-old *Dmd*^{Mu/Y} mice significantly decreased after lipopolysaccharide induction ($P < 0.01$), with a trend of change observed in monocytes between groups. **Conclusion** The successful construction of the *Dmd* gene mutant mouse model has confirmed the vital function of *Dmd* gene in maintaining normal muscle tissue morphology and muscle tone. It preliminarily indicated that *Dmd* gene deletion could significantly reduce the proportion of neutrophils in peripheral blood, offering a new perspective for the study of immune system alterations in Duchenne muscular dystrophy patients.

[Key words] *Dmd* gene; CRISPR/Cas9; Duchenne muscular dystrophy; C57BL/6J mice

抗肌萎缩蛋白 (dystrophin, *Dmd*) 基因位于人类 X 染色体短臂 Xp21 上, 长达 2 450 kb, 是目前已知最大的人类基因之一。*Dmd* 基因表达的蛋白相对分子质量为 4.27×10^5 , 主要分布于骨骼肌细胞、心肌细胞和脑细胞的细胞膜, 同时在机体的其他细胞膜上均有较

微量存在。当人 *Dmd* 基因发生缺失突变或者重复突变时, 会导致 *Dmd* 蛋白缺失或失去正常功能^[1-2]。*Dmd* 基因突变主要导致 3 种遗传疾病, 其一为致死性遗传疾病即杜氏肌营养不良症 (Duchenne muscular dystrophy, DMD), 另外两种为贝氏肌营养不良症

(Becker muscular dystrophy, BMD) 和中间型肌营养不良症 (intermediate muscular dystrophy, IMD) [3-4]。DMD 是一种罕见的致命性神经肌肉萎缩遗传病, 通过 X 染色体连锁隐性遗传, 因此该病发病人群主要是男性, 女性极为罕见。全球新生男婴的 DMD 发病率约为 1/3 500, 多在 5 岁之前发病, 20 岁左右死亡。而 BMD 患者表型较为缓和, 大多在 16 岁之后丧失运动能力, 且存活时间相对较长。IMD 病情介于 DMD 和 BMD 之间, 患者通常在 12~16 岁丧失运动能力 [5-6]。此外 *Dmd* 基因突变导致的其他疾病类型由重至轻依次为 DMD 相关扩张型心肌病、有症状女性携带者、肌肉痉挛伴肌红蛋白尿、无症状女性携带者和无症状高肌酸激酶 (creatinine kinase, CK) 血症 [4]。

已有文献显示, 相较于野生型小鼠, *Dmd* 基因自发突变的 X-连锁肌营养不良 (X-linked muscular dystrophy, mdx) 小鼠中骨髓来源巨噬细胞对外源刺激反应更为剧烈, 这种机制受 Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4) 调控 [7]。最近也有人指出, mdx 小鼠体内巨噬细胞表现出训练免疫 (trained immunity) 的主要特征 [8], 这提示训练免疫可能是 DMD 疾病治疗的一个潜在靶点。在 DMD 患者中, 肌肉组织更为脆弱, 当肌肉组织受损后, 中性粒细胞作为最先应答的免疫细胞之一, 会被募集至受损处 [9]。当 mdx 小鼠的受损肌肉组织被中性粒细胞浸润后, 中性粒细胞能通过分泌髓过氧化物酶 (myeloperoxidase, MPO) 激活巨噬细胞的促炎活性 [10]。由此推测 *Dmd* 基因可能在机体免疫细胞中发挥一定作用。

为了进一步丰富 DMD 疾病模型的种类, 本研究选择以 C57BL/6J 小鼠为背景, 利用 CRISPR/Cas9 技术构建 *Dmd* 基因第 23 号外显子 C2983T 点突变小鼠 (*Dmd*^{Mu/+}), 然后选择雄性半合子小鼠 (*Dmd*^{Mu/Y}) 进行蛋白表达、肌张力和肌肉组织病理学方面的表型验证; 证明 *Dmd* 基因点突变小鼠模型构建成功后, 进一步用脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 诱导建立 *Dmd*^{Mu/Y} 小鼠急性炎症模型, 采用流式细胞术检测外周血中性粒细胞和单核细胞比例变化, 探索 *Dmd* 基因除作用肌肉系统外对免疫系统的影响, 以期为 DMD 等重大罕见病的发病机制和治疗研究提供有力工具和参考。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级 C57BL/6J 野生型小鼠购自上海灵畅生物科

技有限公司 [SCXK (沪) 2023-0003], 3 月龄雌鼠 (体重 22~28 g) 和雄鼠 (体重 26~32 g) 各用于构建基因突变模型, 3 月龄和 9 月龄雄鼠各 20 只用于对照实验。基于 C57BL/6J 小鼠建立的 *Dmd* 基因点突变 (*Dmd*^{Mu/+}) 小鼠由上海南方模式生物科技股份有限公司制备和繁育 [SCXK (沪) 2019-0002]。动物实验在上海实验动物研究中心进行 [SYXK (沪) 2019-0003], 小鼠饲养于 SPF 级动物设施, 食用辐照饲料和灭菌水, 昼夜循环照明时间 12 h: 12 h, 室内温度和相对湿度分别为 20~26 °C 和 40%~70%。所有实验操作均符合上海实验动物研究中心动物实验伦理要求 (审批号: 202301302)。

1.2 主要试剂与仪器

对小鼠受精卵进行基因编辑所需的 pX-T7-sgRNA 质粒和 Cas9 表达载体为本实验自主构建, mMACHINE® T7 Ultra 转录试剂盒 (AMB13455) 购自美国 ThermoFisher 公司, HiScribe™ T7 High Yield RNA 合成试剂盒 (#E2040S) 购自美国 NEB 公司。分子生物学实验所需的 DH5 α 感受态细胞 (9128)、T₄ DNA 连接酶 (2011B)、Taq 酶 (R100B) 和 PCR 相关试剂等均购自日本 TaKaRa 公司, 质粒小量抽提试剂盒 (D6944) 和琼脂糖胶回收试剂盒 (D2500) 均购自美国 Omega 公司。RIPA 裂解液 (G2002)、辣根过氧化物酶标记羊抗鼠二抗 (GB23301) 和 GAPDH 单抗 (GB15002) 均购自武汉 Servicebio 公司。*Dmd* 单抗 (D8168) 和 LPS (L3129) 均购自德国 MERCK 公司。HE 染液套装 (G1003) 和 ECL 化学发光试剂盒 (G2014) 购自武汉塞维尔生物科技有限公司。异氟烷购自山东安特牧业科技有限公司。流式细胞术所需的 CD11b-PC7 (561098) 购自美国 BD 公司, Ly6g-PE (127607) 和 Ly6c-Violet650 (128049) 等流式抗体均购自美国 Biolegend 公司。

试验所用仪器: 光学显微镜 (NIB900) 购自宁波永新光学股份有限公司; 高速冷冻离心机 (5427R) 购自德国 Eppendorf 公司; PCR 仪 (S1000) 购自美国 Bio-Rad 公司; 多功能水平电泳槽 (HE-120) 和凝胶成像仪 (1600) 均购自上海天能科技有限公司; 病理切片机 (RM2016) 购自上海徕卡仪器有限公司; 流式细胞仪 (CytoFLEX) 购自美国 Beckman Coulter 公司。

1.3 *Dmd* 基因点突变小鼠制备

Dmd 基因点突变小鼠的构建策略如图 1 所示。C57BL/6J 小鼠的 *Dmd* 基因定位于染色体 Xp21 区域

(ENSMUSG00000045103)。根据小鼠 *Dmd* 基因结构，选择 23 号外显子上位点，设计小向导 RNA (small guide RNA, sgRNA) 序列 (表 1)。根据 sgRNA 靶位点，设计合成对应的寡核苷酸供体 DNA (oligo donor DNA) (表 1) 用于 sgRNA 表达载体构建。sgRNA 和 Cas9 表达载体线性化后，根据体外转录试剂盒说明书进行 sgRNA 和 Cas9 表达载体的体外转录。

取 C57BL/6J 小鼠受精卵，将 Cas9 mRNA、sgRNA 片段和 oligo donor DNA 显微注射到受精卵中，然后移植入代孕鼠，后者产仔获得 F0 代小鼠。F0 代阳性小鼠与 C57BL/6J 野生型小鼠交配，经剪鼠尾抽提基因组后进行 PCR 鉴定 (PCR 引物序列信息见表 1) 及产物测序确认，获得阳性 F1 代小鼠。PCR 反应条件：94 °C 3 min；95 °C 15 s，60 °C 15 s，72 °C 3 min (共计 35 个循环)；72 °C 5 min。F1 代小鼠经过杂合子自交，获得 *Dmd* 基因敲除的纯合子 (*Dmd*^{Mu/Mu}，雌性) 和半合子 (*Dmd*^{Mu/Y}，雄性) 小鼠，后代纯合子小鼠由 *Dmd*^{Mu/Mu} 与 *Dmd*^{Mu/Y} 小鼠交配获得，均统称为 *Dmd* 基因点突变 (*Dmd*^{Mu/+}) 小鼠。选取雄性半合子小鼠 *Dmd*^{Mu/Y} 用于后续表型验证，以野生型 C57BL/6J 小鼠作为对照。

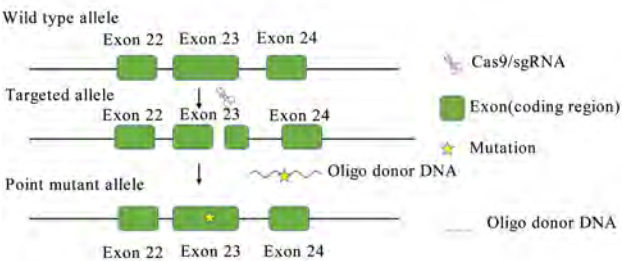


图1 *Dmd*基因点突变小鼠的构建策略示意图
Figure 1 Construction strategy of *Dmd* gene point mutation mice

1.4 蛋白质印迹检测 *Dmd*基因突变小鼠肌肉组织内 *Dmd* 蛋白表达

取 9 月龄的 *Dmd*^{Mu/Y} 小鼠和野生型 C57BL/6J 雄鼠各 3 只，用二氧化碳吸入法使小鼠安乐死后，采集其半腱肌和心肌，加入预混蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液，经匀浆、裂解、离心，提取蛋白样品。用含 6% 分离胶的聚丙烯酰胺凝胶电泳后，将蛋白电转至 PVDF 膜，用脱脂奶粉封闭后，加入 *Dmd* 单抗 (一抗，稀释比例为 1 : 1 000) 和内参 GAPDH 一抗 (稀释比例为 1 : 2 000)，4 °C 孵育过夜，洗膜后加入辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠二抗 (稀释比例为 1 : 5 000)，室温孵育 30 min，洗膜后通过化学发光法进行显色。

表 1 sgRNA、oligo donor DNA 和 PCR 引物序列信息
Table 1 sgRNA and oligo donor DNA as well as PCR primer sequence information

序列名称	序列 (5'→3')
Sequence name	Sequence (5'→3')
小向导 RNA	TCTTTGAAAGAGCAACAAAATGG
sgRNA	
寡核苷酸供体 DNA	GCTCTGCAAAGTTCTTTGAAAGAGCAATAA
Oligo donor DNA	AATGGCTTCAACTATCTGAGTGACACTGT GAAGGAGATGGCCAAGAAAGCACCTTCA GAAATATGCCAGAAATATCTGTC
引物 I	ATGCTTGATATTGAGTAGTTA
Primer I	
引物 II	AATAGATTGGCTTTTGAT
Primer II	
测序引物	ATGCTTGATATTGAGTAGTTA
Sequencing primer	

1.5 小鼠体重称量以及 HE 染色检测 *Dmd* 基因突变小鼠心脏及肌肉组织病理变化

称量 3 月龄和 9 月龄 *Dmd*^{Mu/Y} 小鼠和野生型 C57BL/6J 雄鼠各 9 只的体重并记录，然后随机取 3 月龄和 9 月龄小鼠各 3 只，二氧化碳法安乐死后取心脏和半腱肌，用 4% 多聚甲醛溶液固定过夜，经乙醇溶液梯度脱水、石蜡包埋后，切片厚度为 5 μm。切片经二甲苯脱蜡、乙醇溶液水化处理，进行 HE 染色：苏木精染色，盐酸乙醇溶液分化处理，伊红染液对比染色细胞核，中性树脂封片，光学显微镜观察组织结构。

1.6 悬挂实验测试 *Dmd* 基因突变小鼠肢体肌张力

取 3 月龄和 9 月龄小鼠各 5 ~ 8 只，参考 Kuribara 的测试方法 [11] 进行悬挂实验 (grid test)。在自制的塑料箱上水平放置直径 1.5 mm 的金属杆，杆距离箱底 30 cm，金属杆上方距离 1 cm 加盖，避免小鼠翻坐于金属杆上，记录小鼠抓取金属杆悬挂直至落地的时间，以此反映小鼠肢体肌张力。参考文献 [12] 的标准进行结果评分：0 ~ 4 s 为 0 分，5 ~ 9 s 为 1 分，10 ~ 14 s 为 2 分，15 ~ 19 s 为 3 分，20 ~ 24 s 为 4 分，25 ~ 29 s 为 5 分，超过 30 s 为 6 分。每只小鼠共测 5 次，每次间隔 1 min，评分后取平均值。

1.7 建立 LPS 诱导 *Dmd* 基因突变小鼠炎症模型

取 3 月龄和 9 月龄的 C57BL/6J 雄鼠和 *Dmd*^{Mu/Y} 雄鼠，随机分为 LPS 0 h 和 72 h 组，每组 5 只小鼠。一次性腹腔注射 LPS 5 mg/kg，制备急性炎症模型。分别在注射 LPS 药物后 0 h 和 72 h，经异氟烷麻醉，采集小鼠颌下静脉血，用于后续的流式细胞术检测。

1.8 流式细胞术检测 *Dmd* 基因突变小鼠炎症模型的外周血免疫细胞比例

将1.7节采集到的外周血液进行抗凝处理,按流式抗体说明书推荐比例加入流式抗体(CD11b-PC7和Ly6g-PE用于检测中性粒细胞,CD11b-PC7和Ly6c-Violet650用于检测单核细胞),4℃避光反应30 min,加入自制的红细胞破膜通透剂,室温避光处理10 min,PBS洗涤细胞后重悬于PBS中。其中每个样品收集10 000~20 000个细胞,应用流式细胞仪检测外周血中免疫细胞所占比例。采用CytExpert软件进行结果分析。

1.9 统计学分析

利用PASW 18.0和GraPhpad Prism 8软件进行统计分析,并用GraPhpad Prism 8软件绘图。各实验所得结果数据用平均数±标准误表示。独立样本两组间比较采用*t*检验;符合正态分布的多组数据比较采用单因素方差分析,组内两两比较采用LSD-*t*检验;*P* < 0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 成功获得 *Dmd* 基因点突变小鼠

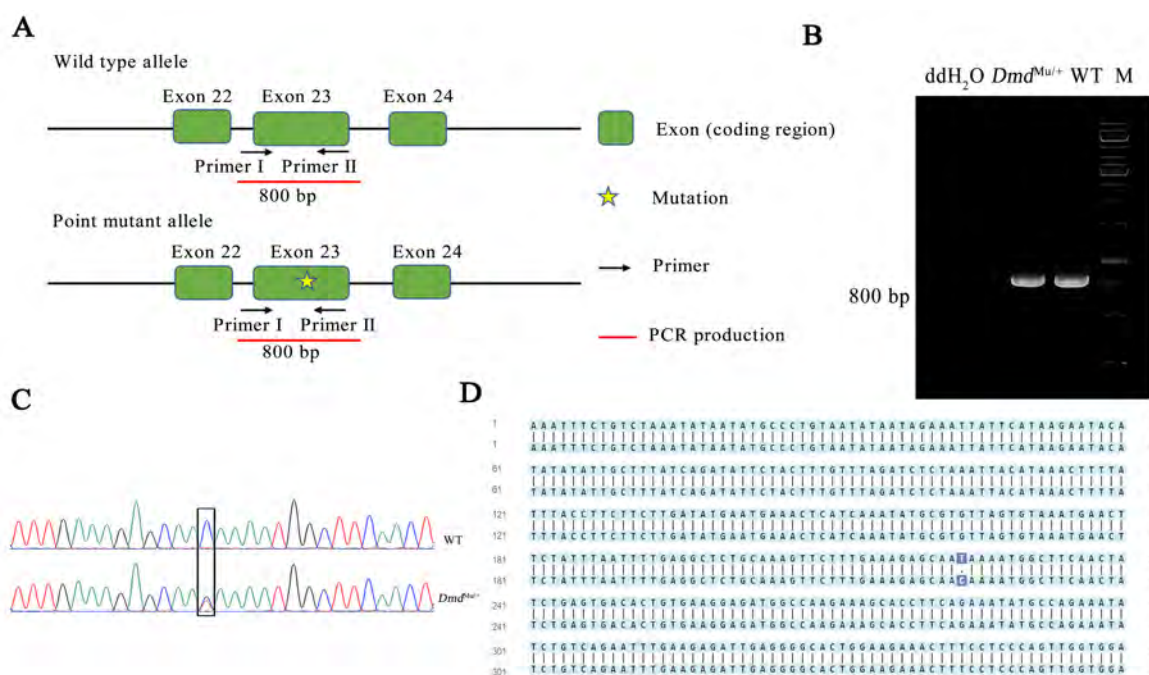
利用CRISPR/Cas9技术切割*Dmd*基因23号外显子

第2983位处,并通过同源重组方式将胞嘧啶(C)突变为胸腺嘧啶(T),获得终止密码子提前的基因点突变小鼠,从而使得*Dmd*蛋白在翻译表达过程中提前结束,造成*Dmd*基因功能的缺失。经受精卵显微注射,共出生28只F0代小鼠。*Dmd*基因点突变小鼠鉴定策略如图2A所示。通过PCR方式对F0代小鼠基因型进行鉴定,PCR产物(凝胶电泳结果见图2B)经测序确认(图2C~D)。本研究共获得2只*Dmd*基因点突变的阳性F0代小鼠。

2.2 *Dmd* 基因点突变小鼠的表型验证

蛋白质印迹法检测9月龄的*Dmd*基因点突变半合子雄性小鼠(*Dmd*^{Mu/Y}小鼠)的半腱肌和心肌内*Dmd*蛋白表达水平,结果显示,与野生型C57BL/6J小鼠相比,*Dmd*^{Mu/Y}小鼠的肌肉(半腱肌)和心脏并未见*Dmd*蛋白的表达,差异有统计学意义(*P* < 0.05,图3A、B)。

各组小鼠的体重比较结果显示:3月龄的*Dmd*^{Mu/Y}小鼠体重均值为(27.4±0.47)g,同月龄的野生型C57BL/6J小鼠体重均值为(30.1±0.35)g;9月龄*Dmd*^{Mu/Y}小鼠的体重均值为(35.5±0.61)g,同月龄野生型C57BL/6J小鼠的体重均值为(42.6±1.19)g;与野生型C57BL/6J小鼠相比,*Dmd*^{Mu/Y}小鼠明显偏轻,差



注: A, 鉴定策略示意图; B, 点突变小鼠PCR产物电泳结果; C~D, DNA测序结果(*Dmd*^{Mu/+}为杂合点突变小鼠, WT为野生型C57BL/6J小鼠, M为DNA分子量标准物)

Note: A, identification strategy diagram; B, PCR electrophoresis maps of *Dmd*^{Mu/+} mice; C-D, DNA sequencing results. *Dmd*^{Mu/+}, heterozygous point mutant mice; WT, wild-type mice; M, DNA marker.

图2 *Dmd* 基因点突变小鼠基因型鉴定

Figure2 Genotype results of *Dmd* point mutant mice

异有统计学意义 ($P<0.01$, 图3C)。

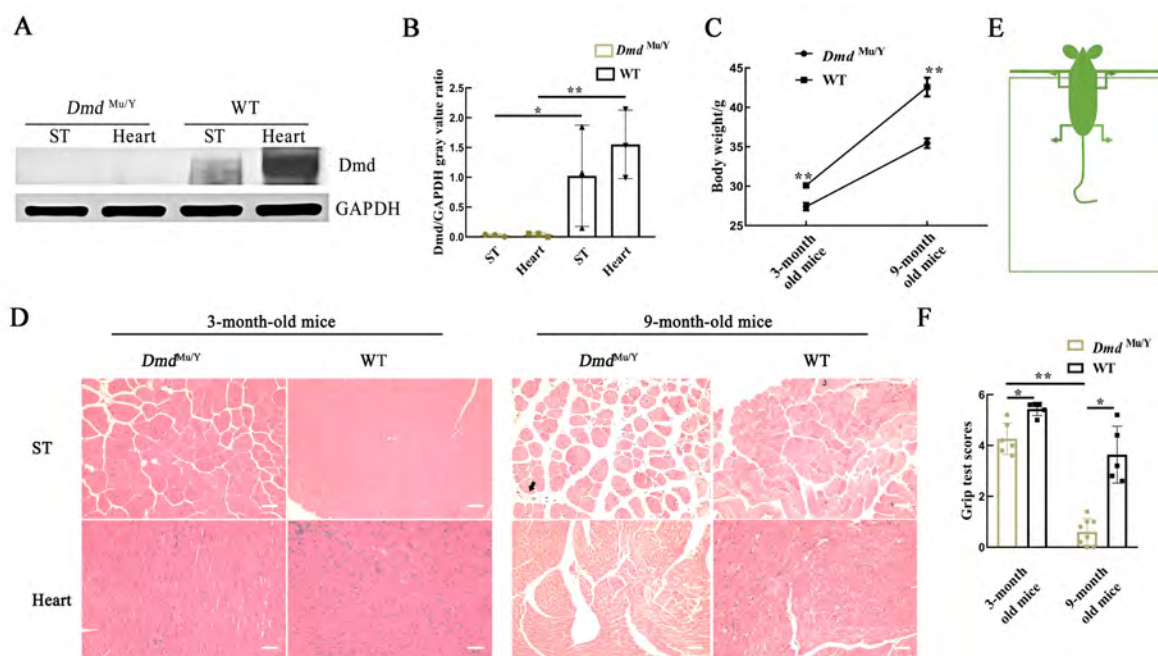
对3月龄和9月龄小鼠的半腱肌和心肌组织进行HE染色,结果显示野生型C57BL/6J小鼠的肌肉组织中细胞核为淡蓝色,细胞质为红色,肌纤维大小均一;9月龄 $Dmd^{Mu/Y}$ 小鼠的肌纤维大小不一,有少量炎症细胞浸润,肌间隙变宽;3月龄 $Dmd^{Mu/Y}$ 小鼠的相应病理变化症状较轻。HE染色结果还显示,在9月龄 $Dmd^{Mu/Y}$ 小鼠心肌组织中同样存在心肌细胞大小不一和肌间隙变宽等病理变化,而野生型C57BL/6J小鼠无此病变,3月龄 $Dmd^{Mu/Y}$ 小鼠的心肌组织表现也基本正常(图3D)。

悬挂实验(图3E~F)结果显示,3月龄和9月龄 $Dmd^{Mu/Y}$ 小鼠的悬挂分数为 4.27 ± 0.25 和 0.60 ± 0.19 ,相同月龄的野生型C57BL/6J小鼠的悬挂分数为 5.44 ± 0.12 和 3.64 ± 0.50 ,3月龄 $Dmd^{Mu/Y}$ 小鼠的悬挂分数值显著低

于同月龄野生型C57BL/6J小鼠 ($P<0.05$),而且9月龄 $Dmd^{Mu/Y}$ 小鼠的悬挂分数显著低于同月龄野生型C57BL/6J小鼠 ($P<0.05$)和3月龄 $Dmd^{Mu/Y}$ 小鼠 ($P<0.01$)。结果提示,与野生型C57BL/6J小鼠相比较, $Dmd^{Mu/Y}$ 小鼠的肌张力显著下降,且随着年龄增长,该小鼠的肌张力也大幅下降。

2.3 $Dmd^{Mu/Y}$ 小鼠在急性炎症模型中的血液免疫细胞变化

据报道,DMD小鼠模型除在肌肉系统病变外,免疫系统也出现病变,但相对来说,以往的受关注度较低。为探索 Dmd 基因突变小鼠的免疫系统功能,本研究用3月龄、9月龄的 $Dmd^{Mu/Y}$ 小鼠和野生型C57BL/6J小鼠,通过腹腔注射LPS制备急性炎症模型,然后取外周血,采用流式细胞术检测中性粒细胞和单核细胞比例。结果显示,与3月龄的野生型



注: A~B, 蛋白质印迹法检测 $Dmd^{Mu/Y}$ 小鼠半腱肌(ST)和心脏组织中Dmd蛋白水平[野生型C57BL/6J小鼠(WT)作为对照, GAPDH为内参蛋白, $n=3$, * $P<0.05$, ** $P<0.01$]; C, 3月龄和9月龄 $Dmd^{Mu/Y}$ 小鼠和野生型C57BL/6J小鼠(WT)体重测量结果[野生型C57BL/6J小鼠(WT)作为对照, $n=9$, ** $P<0.01$]; D, HE染色检测3月龄和9月龄 $Dmd^{Mu/Y}$ 小鼠的肌肉病理学变化[与野生型C57BL/6J小鼠(WT)相比, 9月龄 $Dmd^{Mu/Y}$ 小鼠的骨骼肌和心肌肌间隙变宽, 肌纤维大小不一, 有少量炎症细胞浸润(见箭头); $n=3$, 比例尺为100 μm]; E, 检测小鼠肌张力的悬挂实验示意图; F, 3月龄和9月龄小鼠前肢悬挂分数统计图(3月龄的 $Dmd^{Mu/Y}$ 小鼠 $n=6$, WT小鼠 $n=5$; 9月龄的 $Dmd^{Mu/Y}$ 小鼠 $n=8$, WT小鼠 $n=5$, * $P<0.05$, ** $P<0.01$)。

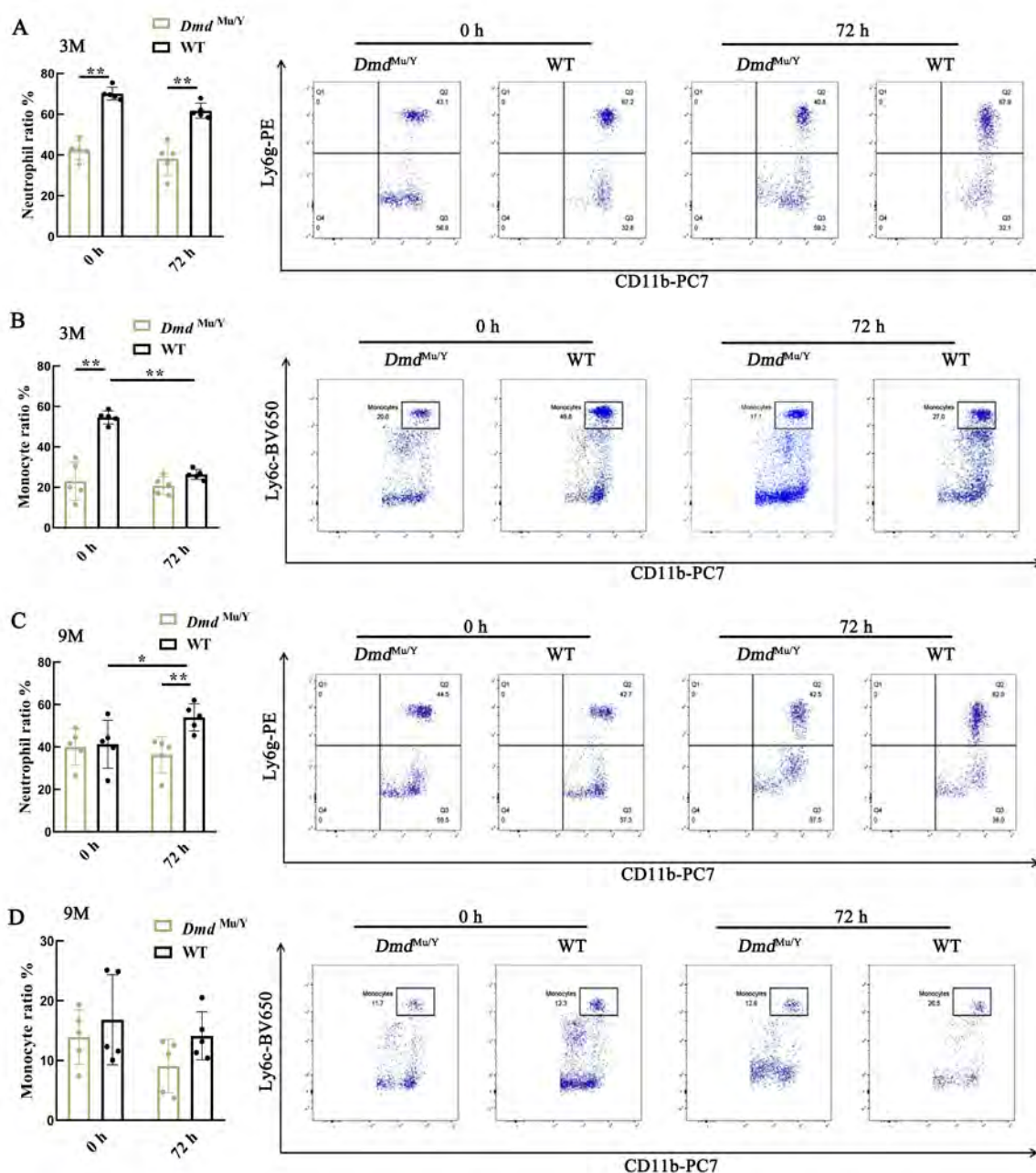
Note: A-B, The expression levels of Dmd protein in semitendinosus (ST) and heart of $Dmd^{Mu/Y}$ mice were detected by Western blotting [wild-type C57BL/6J mice (WT) were used as the control group; GAPDH was internal control protein; $n=3$, * $P<0.05$, ** $P<0.01$]; C, the body weight of 3-month and 9-month old $Dmd^{Mu/Y}$ mice [wild-type C57BL/6J mice (WT) were used as the control group; $n=9$, ** $P<0.01$]; D, HE staining results of muscle tissue pathologic changes in 3-month and 9-month old $Dmd^{Mu/Y}$ mice [wild-type C57BL/6J mice (WT) were used as the control group; the gap between skeletal (ST) and myocardial (Heart) muscles of 9-month old $Dmd^{Mu/Y}$ mice became wider and the size of muscles varied; Infiltrating inflammatory cells were observed (sign by arrow); $n=3$, bar=100 μm]. E, Schematic diagram of grid test; F, The statistical chart of the grid test [3-month old, $Dmd^{Mu/Y}$ mice $n=6$, WT mice $n=5$; 9-month old, $Dmd^{Mu/Y}$ mice $n=8$, WT mice $n=5$, * $P<0.05$, ** $P<0.01$].

图3 $Dmd^{Mu/Y}$ 小鼠表型验证

Figure 3 Phenotypic validation of $Dmd^{Mu/Y}$ mice

C57BL/6J 小鼠相比, 同月龄 $Dmd^{Mu/Y}$ 小鼠在 LPS 注射 0 h 时, 中性粒细胞和单核细胞比例均显著降低 ($P < 0.01$, 图 4A、B), 而在 LPS 注射 72 h 后中性粒细胞所占比例仍然显著降低 ($P < 0.01$), 但单核细胞比例没有显著差异 ($P > 0.05$)。另外, 与 9 月龄的野生型

C57BL/6J 小鼠相比, 同月龄 $Dmd^{Mu/Y}$ 小鼠在 LPS 注射 0 h 时的中性粒细胞和单核细胞比例均无显著差异 ($P > 0.05$, 图 4C ~ D), 而 LPS 注射 72 h 后 $Dmd^{Mu/Y}$ 小鼠的中性粒细胞比例显著降低 ($P < 0.01$), 单核细胞比例仅有偏低趋势 ($P > 0.05$)。



注: A 和 B, 3 月龄 $Dmd^{Mu/Y}$ 小鼠注射脂多糖 (LPS) 0 h 和 72 h 后的中性粒细胞比例和单核细胞比例变化; C 和 D, 9 月龄 $Dmd^{Mu/Y}$ 小鼠注射 LPS 0 h 和 72 h 后的中性粒细胞比例和单核细胞比例变化。野生型 C57BL/6J 小鼠 (WT) 作为对照。n=5, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

Note: A-B, Changes in neutrophils ratio (A) and monocyte ratio (B) in 3-month old $Dmd^{Mu/Y}$ mice after injection of lipopolysaccharide (LPS) for 0 and 72 hours; C-D, Changes in neutrophils ratio (C) and monocyte ratio (D) in 9-month old $Dmd^{Mu/Y}$ mice after injection of LPS for 0 and 72 hours. The wild-type C57BL/6J mice (WT) were used as the control group; n=5, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

图 4 流式细胞法检测 LPS 诱导急性炎症模型中 $Dmd^{Mu/Y}$ 小鼠血液中性粒细胞和单核粒细胞比例变化

Figure 4 The proportion of neutrophils and monocytes in the blood of $Dmd^{Mu/Y}$ mice of LPS-induced acute inflammation model detected by flow cytometry

3 讨论

人 *Dmd* 基因拥有 79 个外显子, 在骨骼肌内转录全长达 14 kb 的 mRNA, 共编码含 3 685 个氨基酸的大分子蛋白质。*Dmd* 蛋白位于肌细胞膜内表面, 能维持细胞膜结构的稳定性, 其蛋白质结构从 N 端至 C 端依次为氨基端、血影蛋白棒状区、富半胱氨酸区和羧基端^[13]。除最长的 *Dmd* 蛋白外, 另有多种不同的蛋白亚型, 广泛分布在肌肉系统和神经系统。*Dmd* 基因突变除导致骨骼肌出现进行性无力和萎缩外, 还常伴随着心肌受损。

目前已经研发得到多种 *Dmd* 基因突变相关的疾病动物模型。例如, 利用 Morpholino 技术敲低斑马鱼 *Dmd* 基因表达得到斑马鱼 DMD 疾病模型^[14], 用于研究 *Dmd* 蛋白和其相关蛋白功能; 通过 *Dmd* 基因 23 号外显子第 3185 位胞嘧啶自发突变为胸腺嘧啶, 导致终止密码子提前, *Dmd* 基因功能出现缺陷, 得到的 mdx 小鼠模型^[15], 这是目前使用最为广泛的 DMD 疾病模型之一; 还有一种被认为是介于小鼠 DMD 模型和人 DMD 疾病之间的肌营养不良金毛猎犬模型 (golden retriever muscular dystrophy, GRMD), 该模型在生物化学、组织病理和功能学水平等方面非常近似于人 DMD 疾病^[16]; 另外是通过第 52 号外显子突变得到的猪 DMD 模型, 该模型在临床、生物化学和病理标志物等方面类似于人 DMD 疾病, 但是该模型在动物性成熟之前会出现死亡等^[17]。相较于斑马鱼、犬和猪而言, 小鼠是优良的人类遗传性疾病动物模型, 其生理和发育功能与人类相似, 且饲养繁育成本相对较低。除了 mdx 小鼠模型外, 还有科研团队研发出 4 号外显子点突变的 *Dmd*^{E4*} 小鼠, 该小鼠在心肌病和肌肉功能衰退等方面能较好地模拟 DMD 患者心脏病理等多方面病变进程^[18]; 也有科研团队在小鼠基因组上用人源的 51 号外显子替代鼠源的 51 号外显子并敲除 50 号外显子, 同时采用腺病毒载体表达 sgRNA 靶向人 51 号外显子的 CRISPR/Cas9 基因编辑方式, 有效恢复了 *Dmd* 蛋白表达并改善了包括组织病理学与握力强度在内的 DMD 特征^[19]。此外, *Dmd* 基因与 *Dmd* 相关基因双敲除小鼠即 mdx; utrⁿ 鼠也是常见的 DMD 小鼠模型, 该小鼠表现出严重的肌营养不良表型; 其他双基因敲除鼠如 mdx; myoD^{-/-}、mdx; adbn^{-/-}、mdx; α 7 integrin^{-/-}、mdx; PV^{-/-} 等也是研究 DMD 疾病较好的小鼠模型^[20]。

DMD 患者体内的 *Dmd* 基因突变率高。据文献显

示, *Dmd* 基因突变有 55%~65% 为基因缺失, 点突变约占 25%, 重复突变约占 8%^[21]。*Dmd* 基因缺失片段大小与临床疾病的严重程度并不成正相关。本研究设计的 *Dmd*^{Mu/+} 小鼠将 23 号外显子第 2983 位碱基胞嘧啶 (C) 突变为胸腺嘧啶 (T) (C2983T), 导致 *Dmd* 基因的终止密码子提前出现, 仅产生一个截短的长肽。因为 DMD 患者主要为男性, 本研究选择 *Dmd* 基因点突变的雄性小鼠 *Dmd*^{Mu/Y} 作为研究对象。研究发现 *Dmd*^{Mu/Y} 小鼠表现出肌肉退化、心脏结构病变等症状, 与文献报道的 mdx 小鼠表现一致^[22-24]。此外, 与文献报道的 *Dmd*^{E4*} 小鼠^[18] 类似, *Dmd*^{Mu/Y} 小鼠同样出现了心脏组织病变和肌张力降低等变化。可知本研究构建的 DMD 模型小鼠与上述模型鼠相比, 病理特征较为一致。但本研究是利用 CRISPR/Cas9 技术进行点突变构建 DMD 模型, 与 mdx 小鼠等传统的自发性 DMD 模型相比, 建模周期明显缩短, 具有经济高效的优势。经 LPS 诱导急性炎症后, 初步研究表明, 与野生型 C57BL/6J 小鼠相比, 3 月龄的 *Dmd*^{Mu/Y} 小鼠外周血中性粒细胞和单核细胞比例显著降低, 9 月龄的 *Dmd*^{Mu/Y} 小鼠中性粒细胞也显著降低。有文献表明, mdx 小鼠相较于野生型小鼠, 在轻微刺激下, 与免疫密切相关的下丘脑-垂体-肾上腺轴 (hypothalamic-pituitary-adrenal, HPA) 活性会更强^[25]; 而在 LPS 等刺激下, mdx 小鼠相较于野生型小鼠会产生更多的促炎分子^[26]。结合本研究结果, 笔者推测 *Dmd* 基因可能在免疫系统与神经系统的交互中发挥了重要作用。

Dmd 基因除了在肌肉组织有表达外, 在其他细胞中也有少量表达。本研究中构建的 *Dmd*^{Mu/Y} 小鼠中 *Dmd* 基因失活是否影响了其免疫功能, 值得深入探讨。流式细胞分析结果显示, *Dmd*^{Mu/Y} 小鼠除了肌肉系统表型与典型的 DMD 疾病相吻合外, 其免疫系统表型也出现异常: 与野生型 C57BL/6J 小鼠相比, 未注射 LPS 时 3 月龄 *Dmd*^{Mu/Y} 小鼠的外周血中性粒细胞和单核细胞比例均显著降低 ($P<0.01$), 而经 LPS 诱导后 3 月龄和 9 月龄 *Dmd*^{Mu/Y} 小鼠的外周血中性粒细胞比例也显著降低 ($P<0.01$)。肌肉组织能分泌诸如白细胞介素-6 等细胞因子^[27], 而白细胞介素-6 在免疫系统中发挥重要作用。本研究中 *Dmd* 基因突变小鼠在全身炎症模型中通过哪些相关细胞因子等调节免疫系统, 这也是一个值得深入研究的方向。同时, 中性粒细胞和巨噬细胞是吞噬病原体的第一道防线^[28]。笔者推测 *Dmd*^{Mu/Y} 小鼠外周血中低水平的中性粒细胞和单核细胞使得它们更

容易感染相关病症,或感染过程中病情更重,但是这需要更多的实验证据来证实。根据已有文献,推测LPS被注射入*Dmd*^{Mu/Y}小鼠体内后,能被血清中的LPS结合蛋白识别并富集,与之形成复合物,进而与单核/巨噬细胞和中性粒细胞细胞膜上的CD14受体结合,后者与TLR4受体及髓样分化蛋白-2作用,实现细胞信号转导^[29]。这也是本研究选择在*Dmd*^{Mu/Y}小鼠模型上研究中性粒细胞和单核细胞的原因之一。上述表型验证结果提示,本研究构建的*Dmd*^{Mu/Y}小鼠模型可以成为研究DMD疾病免疫系统异常的有效模型。

综上所述,本课题组研发的*Dmd*基因点突变*Dmd*^{Mu/Y}小鼠模型的部分症状与DMD疾病症状相吻合,为研究*Dmd*基因功能和DMD疾病相关治疗提供了一种新的有用模型。此外,在该小鼠上也观察到免疫细胞水平异常,这为DMD疾病的发病机制和药物筛选以及治疗方案探索提供了新的思路。

[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上海实验动物研究中心实验动物管理和伦理委员会审核批准(批准号:202301302)。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 the animal experiments involved in this study have been examined and approved by the IACUC of Shanghai Laboratory Animal Research Center (Approval Letter No. 202301302). All the experimental procedures were carried out in accordance with the relevant laws and regulations on experimental animals in China.

[作者贡献 Author Contribution]

梁敏负责动物实验和分子生物学实验等操作、数据分析及论文撰写;

郭洋参与收集资料 and 数据分析;

王津津负责突变小鼠构建策略设计;

朱梦妍参与分子生物学实验;

池骏负责胚胎显微注射实验;

陈艳娟负责实验动物饲养管理;

王成稷参与动物实验;

喻智澜参与数据分析;

沈如凌负责实验方案审核、论文修改和定稿。

[利益声明 Declaration of Interest]

所有作者均声明本文不存在利益冲突。

[参考文献 References]

[1] NALLAMILI B R R, CHAUBEY A, VALENCIA C A, et al. A single NGS-based assay covering the entire genomic sequence of the *DMD* gene facilitates diagnostic and newborn screening confirmatory testing[J]. Hum Mutat, 2021,

42(5):626-638. DOI: 10.1002/humu.24191.

- [2] FORTUNATO F, FARNÈ M, FERLINI A. The *DMD* gene and therapeutic approaches to restore dystrophin[J]. Neuromuscul Disord, 2021, 31(10): 1013-1020. DOI: 10.1016/j.nmd.2021.08.004.
- [3] WANG L A, XU M, LI H A, et al. Genotypes and phenotypes of *DMD* small mutations in Chinese patients with dystrophinopathies[J]. Front Genet, 2019, 10:114. DOI: 10.3389/fgene.2019.00114.
- [4] BRANDSEMA J F, DARRAS B T. Dystrophinopathies[J]. Semin Neurol, 2015, 35(4):369-384. DOI: 10.1055/s-0035-1558982.
- [5] LINDSAY A, RUSSELL A P. The unconditioned fear response in dystrophin-deficient mice is associated with adrenal and vascular function[J]. Sci Rep, 2023, 13(1): 5513. DOI: 10.1038/s41598-023-32163-w.
- [6] 李少英, 孙筱放, 黎青, 等. 中国人群中抗肌萎缩蛋白基因突变类型和分布特点及其与临床症状的相关性[J]. 遗传, 2011, 33(3): 251-254. DOI: 10.3724/SP.J.1005.2011.00251.
- LI S Y, SUN X F, LI Q, et al. Association of mutation types and distribution characteristics of dystrophin gene with clinical symptoms in Chinese population[J]. Hereditas, 2011, 33(3):251-254. DOI: 10.3724/SP.J.1005.2011.00251.
- [7] BHATTARAI S, LI Q A, DING J, et al. TLR4 is a regulator of trained immunity in a murine model of Duchenne muscular dystrophy[J]. Nat Commun, 2022, 13:879. DOI: 10.1038/s41467-022-28531-1.
- [8] PETROF B J, PODOLSKY T, BHATTARAI S, et al. Trained immunity as a potential target for therapeutic immunomodulation in Duchenne muscular dystrophy[J]. Front Immunol, 2023, 14: 1183066. DOI: 10.3389/fimmu.2023.1183066.
- [9] TULANGEKAR A, SZTAL T E. Inflammation in Duchenne muscular dystrophy-exploring the role of neutrophils in muscle damage and regeneration[J]. Biomedicines, 2021, 9(10):1366. DOI: 10.3390/biomedicines9101366.
- [10] TRIPODI L, VILLA C, MOLINARO D, et al. The immune system in Duchenne muscular dystrophy pathogenesis[J]. Biomedicines, 2021, 9(10): 1447. DOI: 10.3390/biomedicines9101447.
- [11] KURIBARA H, HIGUCHI Y, TADOKORO S. Effects of central depressants on rota-rod and traction performances in mice [J]. Jpn J Pharmacol, 1977, 27(1):117-126. DOI: 10.1254/jjp.27.117.
- [12] 姚庆和, 张华, 高国栋. 帕金森病小鼠模型行为学检测方法的比较研究[J]. 中国实验动物学报, 2006, 14(4): 264-270. DOI: 10.3969/j.issn.1005-4847.2006.04.006.
- YAO Q H, ZHANG H, GAO G D. Comparison of behavioral tests in MPTP-induced Parkinson's disease in mice[J]. Acta Lab Animalis Sci Sin, 2006, 14(4): 264-270. DOI: 10.3969/j.issn.1005-4847.2006.04.006.
- [13] MCGREEVY J W, HAKIM C H, MCINTOSH M A, et al. Animal models of Duchenne muscular dystrophy: from basic mechanisms to gene therapy[J]. Dis Model Mech, 2015, 8(3): 195-213. DOI: 10.1242/dmm.018424.
- [14] GIBBS E M, HORSTICK E J, DOWLING J J. Swimming into

- prominence: the zebrafish as a valuable tool for studying human myopathies and muscular dystrophies[J]. FEBS J, 2013, 280(17):4187-4197. DOI: 10.1111/febs.12412.
- [15] SICINSKI P, GENG Y, RYDER-COOK A S, et al. The molecular basis of muscular dystrophy in the *mdx* mouse: a point mutation[J]. Science, 1989, 244(4912):1578-1580. DOI: 10.1126/science.2662404.
- [16] BARTHÉLÉMY I, PINTO-MARIZ F, YADA E, et al. Predictive markers of clinical outcome in the GRMD dog model of Duchenne muscular dystrophy[J]. Dis Model Mech, 2014, 7(11): 1253-1261. DOI: 10.1242/dmm.016014.
- [17] STIRM M, FONTEYNE L M, SHASHIKADZE B, et al. Pig models for Duchenne muscular dystrophy - from disease mechanisms to validation of new diagnostic and therapeutic concepts[J]. Neuromuscul Disord, 2022, 32(7): 543-556. DOI: 10.1016/j.nmd.2022.04.005.
- [18] LI J, WANG K Y, ZHANG Y C, et al. Therapeutic exon skipping through a CRISPR-guided cytidine deaminase rescues dystrophic cardiomyopathy *in vivo*[J]. Circulation, 2021, 144(22):1760-1776. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.121.054628.
- [19] ZHANG Y, LI H, NISHIYAMA T, et al. A humanized knockin mouse model of Duchenne muscular dystrophy and its correction by CRISPR-Cas9 therapeutic gene editing[J]. Mol Ther Nucleic Acids, 2022, 29: 525-537. DOI: 10.1016/j.omtn.2022.07.024.
- [20] WILLMANN R, POSSEKEL S, DUBACH-POWELL J, et al. Mammalian animal models for Duchenne muscular dystrophy[J]. Neuromuscul Disord, 2009, 19(4): 241-249. DOI: 10.1016/j.nmd.2008.11.015.
- [21] 董奇超, 陈慧敏. Duchenne型肌营养不良基因治疗研究进展[J]. 中国当代儿科杂志, 2018, 20(8): 691-697. DOI: 10.7499/j.issn.1008-8830.2018.08.017.
- DONG Q C, CHEN H M. A review of gene therapy for Duchenne muscular dystrophy[J]. Chin J Contemp Pediatr, 2018, 20(8): 691-697. DOI: 10.7499/j.issn.1008-8830.2018.08.017.
- [22] BULFIELD G, SILLER W G, WIGHT P A, et al. X chromosome-linked muscular dystrophy (*mdx*) in the mouse[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1984, 81(4): 1189-1192. DOI: 10.1073/pnas. 81.4.1189.
- [23] GRIFFIN J L, WILLIAMS H J, SANG E, et al. Metabolic profiling of genetic disorders: a multitissue 1H nuclear magnetic resonance spectroscopic and pattern recognition study into dystrophic tissue[J]. Anal Biochem, 2001, 293(1): 16-21. DOI: 10.1006/abio.2001.5096.
- [24] MORRONI J, SCHIRONE L, VECCHIO D, et al. Accelerating the *Mdx* heart histo-pathology through physical exercise[J]. Life, 2021, 11(7):706. DOI: 10.3390/life11070706.
- [25] RAZZOLI M, LINDSAY A, LAW M L, et al. Social stress is lethal in the *mdx* model of Duchenne muscular dystrophy[J]. EBioMedicine, 2020, 55: 102700. DOI: 10.1016/j.ebiom. 2020.102700.
- [26] CHANG L L, NIU F N, CHEN J, et al. Ghrelin improves muscle function in dystrophin-deficient *mdx* mice by inhibiting NLRP3 inflammasome activation[J]. Life Sci, 2019, 232:116654. DOI: 10.1016/j.lfs.2019.116654.
- [27] 李想, 崔迪, 邱守涛. 白细胞介素-6在骨骼肌质量调节中的作用[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2023, 39(6):778-788. DOI: 10.13865/j.cnki.cjbmb.2022.09.1245.
- LI X, CUI D, QIU S T. Interleukin-6 in skeletal muscle mass regulation[J]. Chin J Biochem Mol Biol, 2023, 39(6): 778-788. DOI: 10.13865/j.cnki.cjbmb.2022.09.1245.
- [28] JACKAMAN C, TOMAY F, DUONG L, et al. Aging and cancer: the role of macrophages and neutrophils[J]. Ageing Res Rev, 2017, 36:105-116. DOI: 10.1016/j.arr.2017.03.008.
- [29] 王颖. 脂多糖信号通路中的蛋白质修饰[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2008, 24(6):505-511. DOI: 10.13865/j.cnki.cjbmb.2008.06.013.
- WANG Y. Post-translational modifications in regulation of lipopolysaccharide-activated signal transduction pathway[J]. Chin J Biochem Mol Biol, 2008, 24(6):505-511. DOI: 10.13865/j.cnki.cjbmb.2008.06.013.
- (收稿日期: 2023-06-27 修回日期: 2023-11-28)
(本文编辑: 张俊彦, 富群华, 丁宇菁, 任益凡)

[引用本文]

- 梁敏, 郭洋, 王津津, 等. *Dmd*基因突变小鼠构建及在肌肉及免疫系统的表型验证[J]. 实验动物与比较医学, 2024, 44(1): 42-51. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2023.089.
- LIANG M, GUO Y, WANG J J, et al. Construction of *Dmd* gene mutant mice and phenotype verification in muscle and immune systems[J]. Lab Anim Comp Med, 2024, 44(1): 42-51. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2023.089.



胡冰, 女, 硕士, 助理研究员, 广西医科大学实验动物中心生产部部长。多年从事实验动物的饲养繁殖、疾病防控工作, 在实验动物的繁殖力综合评估以及胚胎移植保存方面有丰富的工作经验, 熟悉多种实验动物的生活习性。同时参与实验动物学的教学及科研工作, 多次指导并参与实验动物学相关的教学授课比赛, 并用广西特色实验动物树鼩建立了多种实验动物模型, 包括树鼩乳腺癌模型、树鼩阿尔兹海默病模型, 在实验动物学教学和科研方面积累了丰富的经验。主持广西医科大学教师研究项目1项, 参与国家自然科学基金项目1项、广西自然科学基金项目1项。以第一作者发表SCI论文1篇, 参与发表中英文论文4篇, 获批专利2项。

树鼩乳腺肿瘤模型的代谢组学分析

方茜¹, 敖青青², 李春宏¹, 欧阳轶强¹, 郭松超¹, 胡冰¹

(1. 广西医科大学实验动物中心, 南宁 530021; 2. 桂林市人民医院, 桂林 541002)

[摘要] 目的 研究树鼩乳腺肿瘤发生、发展过程中代谢组学的变化, 探讨机体代谢物质改变与肿瘤发生、发展的密切关系, 以期筛选出反映乳腺肿瘤病情进展的生物标志物。方法 通过连续3次、每次间隔15 d的方式给20只树鼩每只灌胃7,12-二甲苯并蒽(7,12-dimethylbenzoanthracene, DMBA) 0.15 mg/kg, 并添加高脂高糖饲料, 诱导实验观察24个月或直至树鼩生成乳腺肿瘤。使用气相色谱-飞行时间质谱联用技术(gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry, GC-TOFMS)对DMBA诱导发生乳腺肿瘤树鼩、DMBA诱导未发生乳腺肿瘤树鼩以及未诱导正常树鼩(12只)的血清代谢物进行非靶向测定, 通过主成分分析(principal component analysis, PCA)、正交偏最小二乘法分析(orthogonal partial least squares analysis, OPLS-DA)等多维统计分析, 进一步结合 t 检验进行组间差异比较, 以VIP > 1且 $P < 0.05$ 的标准筛选差异性代谢物, 并结合HMDB在线数据库对显著变化的差异代谢物进行鉴定, 最后应用京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)通路数据库富集代谢相关基因调控通路。结果 DMBA诱导后树鼩的乳腺肿瘤发生率为40% (8/20)。DMBA造模成瘤组与正常对照组相比, 树鼩血清中检测到有30种代谢差异产物, 其中18种下调, 12种上调, 差异均具有统计学意义(VIP > 1, $P < 0.05$); KEGG通路分析发现, 谷氨酸代谢、甘油酯代谢、柠檬酸循环、丙氨酸代谢这4个代谢通路发生显著改变。DMBA造模成瘤组与DMBA造模未成瘤组相比, 检测到有18种代谢差异产物, 其中7种下调, 11种上调, 差异具有统计学意义(VIP > 1, $P < 0.05$); KEGG通路分析发现, 柠檬酸循环、谷氨酸代谢这2个代谢通路发生显著改变。DMBA造模未成瘤组与正常对照组相比, 检测到有31种代谢差异产物, 其中14种下调, 17种上调, 差异具有统计学意义(VIP > 1, $P < 0.05$); KEGG通路分析发现, 柠檬酸循环、谷氨酸代谢、甘油酯代谢这3个代谢通路发生显著改变。结论 代谢组学分析可展示乳腺肿瘤树鼩血清中代谢产物的变化特点, 结果提示谷氨酸代谢、甘油酯代谢、柠檬酸循环、丙氨酸代谢途径与高脂高糖饮食下DMBA诱导树鼩乳腺肿瘤的发生与发展有相关性, 这为进一步研究乳腺肿瘤发病的生物机制奠定了基础。

[关键词] 树鼩; 乳腺肿瘤; 代谢组学; 7,12-二甲苯并蒽; 高脂高糖

[中图分类号] Q95-33; R-332 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2024)01-0052-10



Metabolomics Analysis of *Tupaia belangeri* Breast Tumor Model

FANG Xi¹, AO Qingqing², LI Chunhong¹, OUYANG Yiqiang¹, GUO Songchao¹, HU Bing¹

(1. Laboratory Animal Center, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China; 2. Guilin People's Hospital, Guilin 541002, China)

Correspondence to: Hu Bing, E-mail: 1020360353@qq.com

[ABSTRACT] **Objective** To explore the metabolic changes during the development of *Tupaia belangeri*

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目“DMBA诱发高脂饮食模式乳腺癌模型的比较代谢组学分析”(31760642)

[第一作者] 方茜(1991—), 女, 硕士, 实验师, 主要从事实验动物微生物学研究。E-mail: 290227387@qq.com

[通信作者] 胡冰(1978—), 女, 硕士, 助理研究员, 主要从事实验动物学研究。E-mail: 1020360353@qq.com

breast tumors, to investigate the close relationship between the changes of serum metabolic substances and the occurrence and progression of tumors, and to screen for biomarkers reflecting the progression of breast tumors. **Methods** Breast tumors in *Tupaia belangeri* were induced by orally administering 7,12-dimethylbenzoanthracene (DMBA) three times, with a 15-day interval between each administration, along with a high-fat and high-sugar diet. The DMBA-induced breast cancer group and the DMBA-induced without breast cancer group were compared with the control group. Untargeted determination of serum metabolites was performed using gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry (GC-TOFMS) in DMBA-induced *Tupaia belangeri* with breast cancer, DMBA-induced without breast cancer and the control group. Multidimensional statistical analysis including unsupervised principal component analysis (PCA), and orthogonal partial least squares analysis (OPLS-DA) were conducted. Furthermore, *t*-test was used for intergroup differential comparison. Differential metabolites were screened under $VIP > 1$ and $P < 0.05$ conditions, and significantly changing differential metabolites were identified using the HMDB online database. The Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway database was utilized to enrich metabolic-related gene regulatory pathways. **Results** The incidence of breast tumors was 40% in DMBA-induced *Tupaia belangeri*. Compared with the control group, 30 metabolic differential products were detected in the serum of the group with breast cancer, with 18 down-regulated and 12 up-regulated ($VIP > 1$, $P < 0.05$). KEGG pathway analysis revealed significant changes in four metabolic pathways: glutamate metabolism, glyceride metabolism, citric acid cycle, and alanine metabolism. Compared with the group without breast cancer, 18 metabolic differential products were detected, with 7 down-regulated and 11 up-regulated ($VIP > 1$, $P < 0.05$). KEGG pathway analysis revealed significant changes in the citric acid cycle and glutamate metabolism. Compared with the control group, 31 metabolic differential products were detected in the serum of the groups without breast cancer, with 14 down-regulated and 17 up-regulated ($VIP > 1$, $P < 0.05$). KEGG pathway analysis revealed significant changes in three metabolic pathways: glutamate metabolism, glyceride metabolism, and citric acid cycle. **Conclusion** Metabolomics analysis can reveal the characteristics of changes in metabolites in the serum of breast tumors. The results suggest that glutamate metabolism, glyceride metabolism, citric acid cycle, and alanine metabolism pathways are associated with the occurrence and development of DMBA-induced breast tumors in *Tupaia belangeri*. It provides a foundation for further research into the biological mechanism of breast cancer.

[Key words] *Tupaia belangeri*; Breast tumors; Metabolomics; 7,12-Dimethylbenzoanthracene; High fat and sugar

乳腺肿瘤作为一种高度异质性的肿瘤，是女性最常见的恶性肿瘤，每年全世界大约有120万妇女罹患此病，发病率呈明显上升趋势^[1-2]。乳腺肿瘤的发生、发展受诸多因素影响，机制未明。建立适宜的乳腺肿瘤动物模型，有助于开展乳腺肿瘤分子机制研究，对防治乳腺肿瘤具有重要意义。

树鼩是生活在热带和亚热带地区的哺乳纲攀鼯类小型动物。全基因组比较分析发现，树鼩与灵长类亲缘关系最为接近，与人类在细胞与分子层面有较高的相似性^[3]。正是由于具有这种独特的遗传特性，树鼩成为一种潜在的理想实验动物模型，目前已成功建立了多种疾病动物模型，其中包括乳腺肿瘤模型^[4-5]。

代谢组学属于新兴学科，与蛋白质组学、转录组学和基因组学共同构成了系统生物学的核心内容。代谢组学主要是利用相关检测设备快速且准确地分析相关生物样本，对内源性小分子代谢物的动态变化进行精准分析，从而能够更进一步地分析相关疾病与内源性小分子差异代谢物之间的关系^[6-7]。目前建立树鼩乳腺肿瘤模型并进行代谢组学技术分析的研究已有报道，但是大多数研究使用的是树鼩自发乳腺肿瘤模型，该模型存在造模成功率低的缺点。为此，本研究通过化学诱导的方法建立树鼩乳腺肿瘤诱导模型，提高了造模成功率，并在此基础上分析树鼩乳腺肿瘤发生过程中的差异代谢物，以期为进一步探究乳腺肿瘤发病的潜在生物标志物奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物

普通级成年（4月龄及以上）雌性树鼯32只，健康未育，体重120~140 g，由中国科学院昆明动物研究所提供[SCXK（滇）K2020-0004，质量合格证为0002473]。实验动物饲养于广西医科大学普通级动物饲养室[SYXK（桂）2020-0004]，室温（23±2）℃，相对湿度30%~60%，12 h明/暗循环，自由饮水。动物实验方案经广西医科大学实验动物伦理委员会批准（No.202006029），遵循实验动物3R原则。

1.2 主要试剂与仪器

7,12-二甲基苯并蒽（7,12-dimethylbenzoanthracene, DMBA）（纯度98%，批号200601）购自上海吉至生化科技有限公司，DMBA溶液的配制：电子秤称量DMBA粉剂150 mg，溶解于10 mL花生油中，60℃水浴助溶、振荡混匀，配制成终质量浓度为15 mg/mL的DMBA溶液。氯仿及吡啶（批号201101、200724）购自生工生物工程（上海）股份有限公司。4%多聚甲醛（批号201103）溶液、甲醇分析纯溶液（批号JK200730）和L-2-氯苯丙氨酸（批号20023418）购自上海吉至生化科技有限公司。衍生化试剂双（三甲基硅烷基）三氟乙酰胺[bis（trimethylsilyl）trifluoroacetamide, BSTFA]含1%三甲基氯硅烷（trimethylchlorosilane, TMCS）（批号211670），购自美国REGIS Technologies公司。异氟烷（批号20201519）和吸入式气体麻醉机购自深圳市瑞沃德生命科技有限公司。气相色谱仪（型号Agilent 7890A）购自美国Agilent公司。质谱仪（型号Chroma TOF PEGASUS HT）购自美国LECO公司。

1.3 树鼯乳腺肿瘤模型的建立

将32只树鼯随机分为两组：DMBA造模组20只，正常对照组12只。DMBA造模组分3次灌胃给予DMBA溶液，每次每只树鼯灌胃量为0.15 mg/kg，每次灌胃时间间隔为15 d；同时增加高脂高糖饮食，即每日在全价饲料中均匀拌入10%白砂糖和10%猪油，自由采食。正常对照组在相同的时间内灌胃给予相同体积的花生油，饲喂全价饲料。DMBA诱导开始后，每周观察树鼯体内的乳腺肿瘤生长情况，观察期限为24个月。

1.4 样本采集

每周观察记录各组树鼯的体重及体长等基础信息。

实验终止时间为到达观察期限24个月或者肿瘤质量超过树鼯体重的10%，前者列为DMBA造模未成瘤组，后者列为DMBA造模成瘤组。实验终止时进行所有组树鼯血液样本的采集，每只树鼯采血1 mL，抗凝，4℃保存2 h后低温离心，取上层血清，分装，保存于-80℃超低温冰箱待用。对生长了肿瘤的树鼯进行肿瘤样本的采集，即给树鼯吸入异氟烷麻醉后将肿瘤完整切除，置于4%多聚甲醛溶液中固定，石蜡包埋、切片并进行HE染色，显微镜下观察肿瘤组织病理学变化。采集完样本后采用二氧化碳吸入法将动物安乐死。

1.5 血清代谢组学分析

使用气相色谱-飞行时间质谱联用技术（gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry, GC-TOFMS）对DMBA诱导发生乳腺肿瘤的树鼯（即DMBA造模成瘤组）、DMBA诱导未发生乳腺肿瘤的树鼯（即DMBA造模未成瘤组）以及未经DMBA诱导的正常树鼯（即正常对照组）的血清代谢物进行非靶向测定，然后通过主成分分析（principal component analysis, PCA）、正交偏最小二乘法分析（orthogonal partial least squares analysis, OPLS-DA）等进行多维统计分析，并结合HMDB在线数据库对显著变化的差异代谢物进行鉴定，最后应用京都基因与基因组百科全书（Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG）通路数据库富集代谢相关基因调控通路。血清代谢组学分析的样本前处理、仪器设置、进样分析及统计学处理具体参照文献[8]进行。

1.6 统计学分析

采用SPSS 17.0统计软件进行数据分析，计量资料以均数±标准差表示。代谢组学数据使用SIMCA-V15.0.2软件（Sartorius Stedim Data Analytics AB，瑞典Umetrics公司）进行分析，差异代谢物筛选标准为 t 检验的 P 值<0.05，同时OPLS-DA模型第一主成分的变量权重值（variable importance in the projection, VIP）>1。

2 结果

2.1 DMBA诱导后树鼯造模结果及基本情况

DMBA诱导实验观察期结束后，发现DMBA造模组20只树鼯中，共有8只树鼯的乳腺部位长瘤，12只树鼯并未长瘤。故最终根据是否经DMBA诱导以及诱导后是否长瘤，将树鼯分为3组：DMBA造模成瘤组共8只、DMBA造模未成瘤组共12只，以及正常对照组共12只。树鼯基本情况详见表1。

表1 3组树鼩基本情况

Table 1 Basic information of *Tupaia belangeri* in three groups

分组 Group	动物数量 <i>n</i> Number of <i>Tupaia belangeri</i>	体重/g Body weight/g	体长/cm Body length/cm	肿瘤质量/g Tumor weight/g	肿瘤体积/mm ³ Tumor size/mm ³
DMBA 造模未成瘤组 DMBA-induced group with breast cancer	8	135.36±20.31	17.91±2.12	3.15±1.40	4 153.12±213.23
DMBA 造模未成瘤组 DMBA-induced group without breast cancer	12	131.11±11.54	17.68±1.32	-	-
正常对照组 Normal control	12	123.65±10.54	17.73±0.65	-	-

注:肿瘤体积计算公式: $V=(D\times d^2\times \pi)/6$, D 代表较长的直径, d 代表较短的直径。
Note: Tumor size was calculated by the formula: $V=(D\times d^2\times \pi)/6$, where D represents the larger tumor diameter, and d represents the smaller diameter.

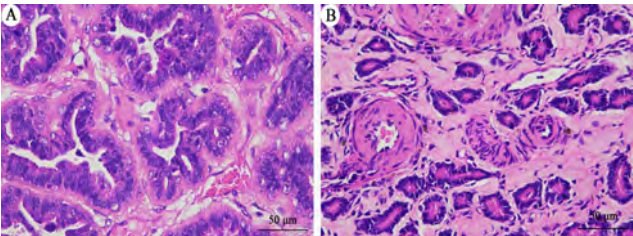
2.2 DMBA 诱导后树鼩乳腺肿瘤的组织病理结果

将树鼩乳腺组织及乳腺肿瘤组织进行 HE 染色后, 可见 DMBA 造模成瘤组的乳腺肿瘤组织腺泡结构不规整, 腔壁明显增厚, 腺管致密增生, 为高度分化的管状腺瘤 (图 1A); 而正常对照组树鼩的乳腺组织腺体形态良好, 排列规则, 管腔无扩张 (图 1B)。

2.3 DMBA 诱导树鼩发生乳腺肿瘤后的代谢组学比较结果

2.3.1 检测质控与稳定性

使用 GC-TOFMS 技术分析 3 组树鼩血清样本的代谢产物图谱。本次血清样本的代谢组学检测包括本研究送检样本与石倩倩等 [8] 的送检样本, 故本文的质控结果数据、总出峰数与文献 8 一致。本次检测一共从血清样本中提取到 493 个峰, 经过进一步分析, 最后确定了 451 个特征峰; 所有样品出峰较均匀, 强度适



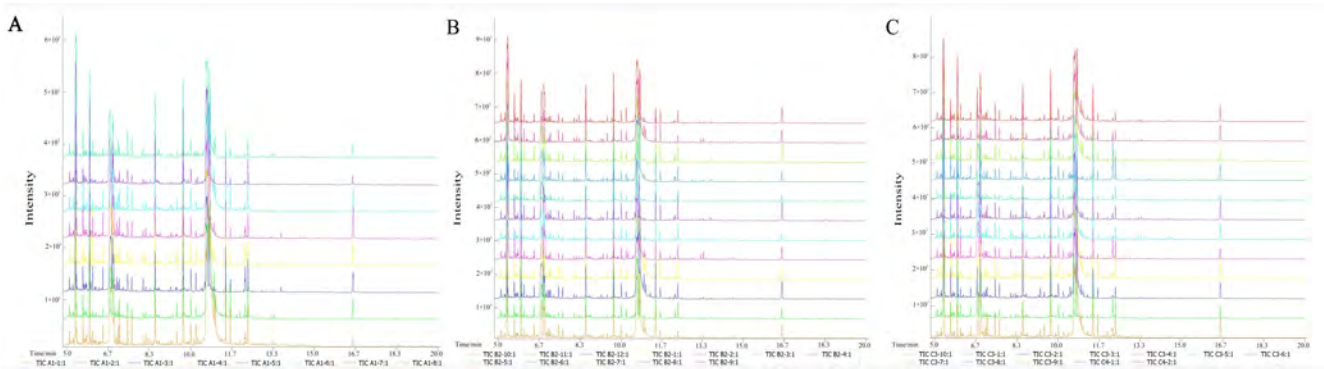
注: A, DMBA 造模成瘤组树鼩的乳腺肿瘤组织; B, 正常对照组树鼩的乳腺组织。标尺 50 μm。

Note: A, Breast tumour tissue of the DMBA-induced breast cancer group; B, Breast tissue of the normal group. Scale bars, 50 μm.

图1 树鼩乳腺肿瘤的病理结果

Figure 1 Pathological results of breast cancer in *Tupaia belangeri*

中。质控样本常用于评价系统的稳定性, 本次实验中的质控样本相关性较高 (均 > 0.97), 表明模型稳定性好, 数据质量高。不同组别树鼩血清的总离子流图见图 2。



注: A, DMBA 造模成瘤组 (8只); B, DMBA 造模未成瘤组 (12只); C, 正常对照组 (12只)。
Note: A, DMBA-induced breast cancer group ($n=8$); B, DMBA-induced without breast cancer group ($n=12$); C, Normal control group ($n=12$).

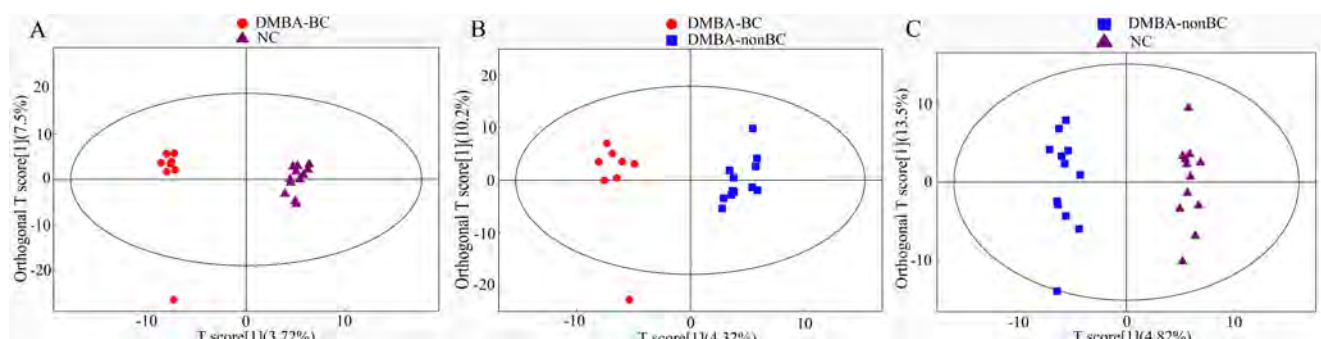
图2 各组树鼩血清的总离子流图

Figure 2 Total ion flow maps of serum from each group of *Tupaia belangeri*

2.3.2 OPLS-DA 结果分析

全部样本的PCA得分散点图结果显示, 正常对照组与DMBA造模成瘤组、DMBA造模未成瘤组的代谢模式所处象限都不重叠, 都位于可信区间内。进一步

采用OPLS-DA分析发现, 正常对照组与DMBA造模成瘤组、DMBA造模成瘤组与DMBA造模未成瘤组、DMBA造模未成瘤组与正常对照组之间相比较, 发现各组血清样本区分显著, 且几乎处于95%置信区间内, 见图3。



注: A, DMBA造模成瘤组(DMBA-BC)与正常对照组(NC)血清代谢物对比的OPLS-DA得分图; B, DMBA造模成瘤组(DMBA-BC)与DMBA造模未成瘤组(DMBA-nonBC)血清代谢物对比的OPLS-DA得分图; C, DMBA造模未成瘤组(DMBA-nonBC)与正常对照组(NC)血清代谢物对比的OPLS-DA得分图。

Note: A, The OPLS-DA score plot of blood metabolites comparison between DMBA-induced breast cancer (DMBA-BC) group and normal control (NC) group; B, The OPLS-DA score plot of blood metabolites comparison between DMBA-induced with breast cancer (DMBA-BC) group and those without breast cancer (DMBA-nonBC); C, The OPLS-DA score plot of blood metabolites comparison between DMBA-induced without breast cancer (DMBA-nonBC) group and normal control (NC) group.

图3 各树鼩组间对比的OPLS-DA模型得分散点图

Figure 3 Score scatter plot of OPLS-DA model for each group of *Tupaia belangeri*

2.3.3 血清差异代谢物的筛选

通过SIMCA-V15.0.2软件进行分析, 以OPLS-DA模型第一主成分的VIP > 1及 $P < 0.05$ 筛选差异代谢物; 各组间的差异代谢物火山图见图4A~C。通过以上分析得到的差异代谢物在生物学上往往具有结果和功能相似性/互补性, 或者受同一代谢通路的正调控/负调控。

进一步对以上特征进行层次聚类分析, 结果见图4D~F。DMBA造模成瘤组与正常对照组对比, 差异代谢产物有30种, 其中18种下调, 12种上调; DMBA造模成瘤组与DMBA造模未成瘤组对比, 差异代谢产物有18种, 其中7种下调, 11种上调; DMBA造模未成瘤组与正常对照组对比, 差异代谢产物有31种, 其中14种下调, 17种上调。

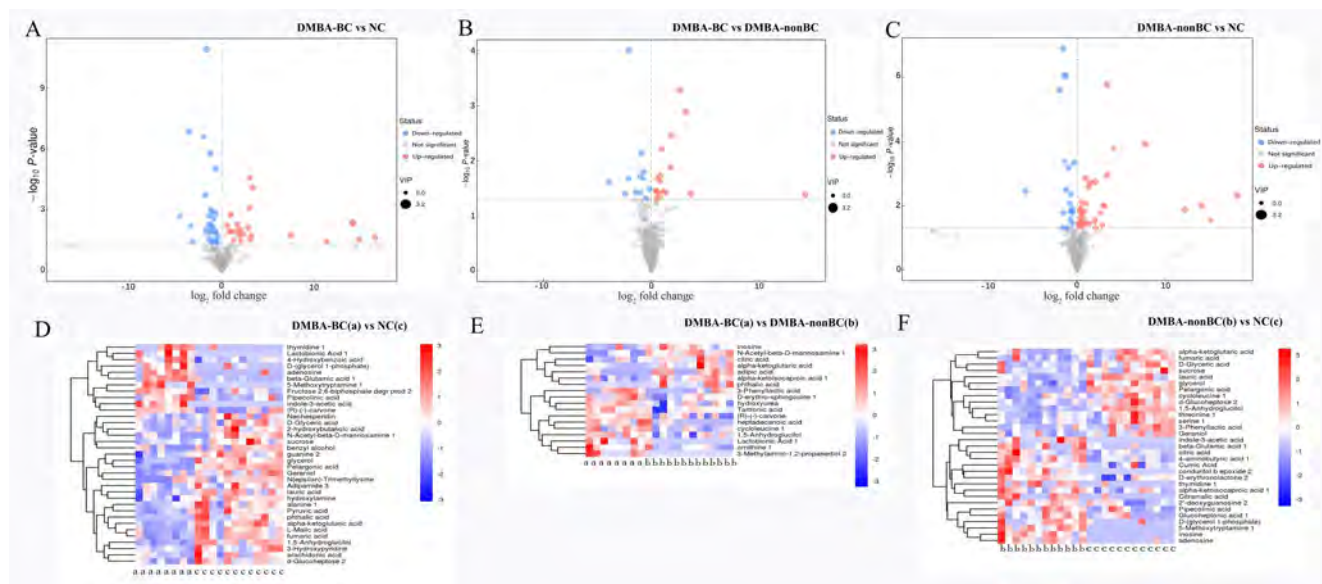
表2列举了各组之间表达差异最显著的前15个代谢物。

2.3.4 差异代谢物所在通路分析

利用KEGG通路数据库富集差异代谢物所在通路, 结果见图5。DMBA造模成瘤组与正常对照组的差异代谢物共富集到23条KEGG代谢通路, 其中影响因子最

高的8条代谢通路为谷氨酸代谢、甘油酯代谢、柠檬酸代谢、丁氨酸代谢、丙酮酸盐代谢、糖异生、花生四烯酸代谢以及 α -酮戊二酸代谢。DMBA造模成瘤组与DMBA造模未成瘤组的差异代谢物共富集到11条KEGG代谢通路, 其中影响因子最高的6条代谢通路为柠檬酸代谢、谷氨酸代谢、二羧酸盐代谢、神经鞘脂代谢、谷胱甘肽代谢, 以及丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢。DMBA造模未成瘤组与正常对照组的差异代谢物共富集到18条KEGG代谢通路, 其中影响因子最高的6条代谢通路为谷氨酸代谢、甘油酯代谢、柠檬酸代谢、甘油磷脂代谢、二羧酸代谢, 以及丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢。

对差异代谢物参与的代谢途径进行整合分析, 结合KEGG数据库分析, 可知DMBA造模成瘤组与正常对照组对比时, 谷氨酸代谢(差异代谢物为 α -酮戊二酸和谷氨酸)、甘油酯代谢(差异代谢物为甘油酸-3-磷酸)、柠檬酸循环(差异代谢物为 α -酮戊二酸和丙酮酸)、丙氨酸代谢(差异代谢物为丙酮酸)这4个代谢通路发生显著改变(均 $P \leq 0.01$); DMBA造模成瘤组与DMBA造模未成瘤组相比时, 柠檬酸循环、谷氨酸



注：A和D，DMBA造模成瘤组（DMBA-BC）与正常对照组（NC）对比；B和E，DMBA造模成瘤组（DMBA-BC）与DMBA造模未成瘤组（DMBA-nonBC）对比；C和F，DMBA造模未成瘤组（DMBA-nonBC）与正常对照组（NC）对比。

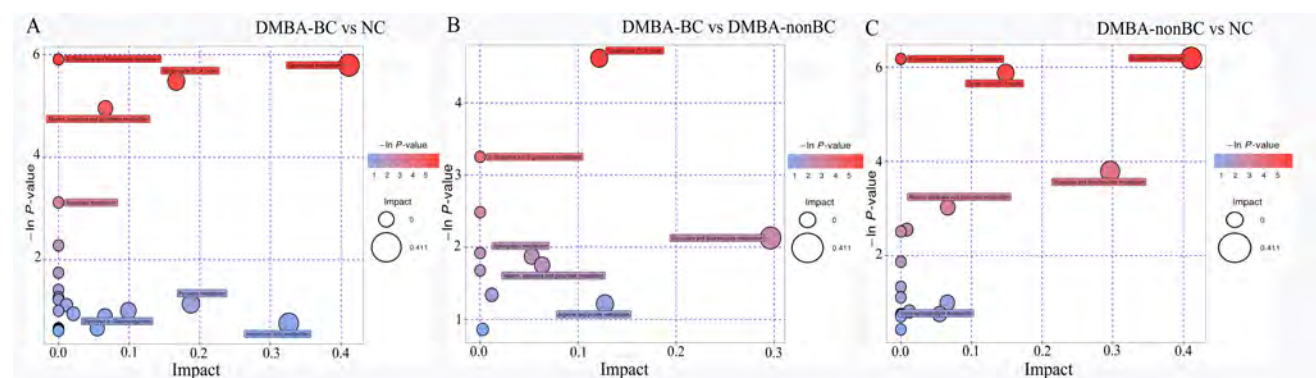
Note: A and D, DMBA-induced group with breast cancer (DMBA-BC) vs normal control (NC) group; B and E, DMBA-induced group with breast cancer (DMBA-BC) vs DMBA-induced group without breast cancer (DMBA-nonBC); C and F, DMBA-induced group without breast cancer (DMBA-nonBC) vs normal control (NC) group.

图4 各组树鼩组间对比的差异代谢物火山图(A~C)和层次聚类分析结果热图(D~F)

Figure 4 The volcano map (A-C) and heatmap of hierarchical clustering analysis (D-F) of differential metabolites between groups of *Tupaia belangeri*

代谢这2个代谢通路发生显著改变（差异代谢物均为 α -酮戊二酸和柠檬酸， P 均 <0.05 ）；DMBA造模未成瘤组与正常对照组相比时，柠檬酸循环（差异代谢物

为柠檬酸）、谷氨酸代谢（差异代谢物为谷氨酸）、甘油酯代谢（差异代谢物为甘油酸-3-磷酸）这3个代谢通路发生显著改变（均 $P=0.002$ ）。



注：A，DMBA造模成瘤组（DMBA-BC）与正常对照组（NC）对比的差异代谢物代谢通路；B，DMBA造模成瘤组（DMBA-BC）与DMBA造模未成瘤组（DMBA-nonBC）对比的差异代谢物代谢通路；C，DMBA造模未成瘤组（DMBA-nonBC）与正常对照组（NC）对比的差异代谢物代谢通路。

Note: A, Differential metabolic pathways between DMBA-induced group with breast cancer (DMBA-BC) and normal control (NC) group; B, Differential metabolic pathways between DMBA-induced (DMBA-BC) group with breast cancer and those without breast cancer (DMBA-nonBC); C, Differential metabolic pathways between DMBA-induced without breast cancer (DMBA-nonBC) group and normal control (NC) group.

图5 各组树鼩之间差异代谢通路分析图

Figure 5 Analysis of different metabolic pathways among groups of *Tupaia belangeri*

表2 DMBA造模成瘤组与正常对照组树鼩对比关键差异代谢产物

Table 2 Key differential metabolites between DMBA-induced group with breast cancer and control group of *Tupaia belangeri*

DMBA 造模成瘤组 vs 正常对照组 DMBA-BC vs NC					DMBA 造模成瘤组 vs DMBA 造模未成瘤组 DMBA-BC vs DMBA-nonBC					DMBA 造模未成瘤组 vs 正常对照组 DMBA-nonBC vs NC				
代谢物 Metabolites	VIP	P	Log-FC	CT	代谢物 Metabolites	VIP	P	Log-FC	CT	代谢物 Metabolites	VIP	P	Log-FC	CT
甘油酸-3-磷酸 Glycerate-3-phosphate	2.762	< 0.001	-0.650	↑	十七烷酸 Margaric acid	2.236	0.013	1.783	↑	甲氧基色胺 Methoxytryptamine	3.020	< 0.001	7.659	↑
谷氨酸 Glutamate	2.086	< 0.001	3.051	↑	香芹酮 Carvone	2.096	0.019	0.812	↑	肌苷 Inosine	1.280	< 0.001	4.104	↑
腺苷 Adenosine	2.561	0.001	2.995	↑	羟基脲 Hydroxyurea	1.160	0.021	0.539	↑	葡萄糖庚糖 Glucose heptose	1.303	< 0.001	-1.476	↓
2,6-二磷酸果糖 2,6-Fructose diphosphate	1.273	0.002	1.035	↑	1-磷酸鞘氨醇 Sphingosine 1-phosphate	1.431	0.024	0.839	↑	甘油 Glycerol	2.420	< 0.001	-0.419	↓
4-羟基苯甲酸 4-Hydroxybenzoic acid	1.101	0.002	0.916	↑	1,5-脱水葡萄糖醇 1,5-Dehydrated glucose alcohol	1.878	0.035	0.418	↑	月桂酸 Lauric acid	2.291	0.001	-1.011	↓
壬酸 Pelargonic acid	3.167	< 0.001	-1.640	↓	鸟氨酸 Ornithine	1.344	0.036	1.042	↑	腺苷 Adenosine	2.737	0.001	3.399	↑
1,5-脱水葡萄糖醇 1,5-Anhydroglucosol	2.779	< 0.001	-1.216	↓	丙醇二酸 Tartronic acid	1.375	0.037	0.508	↑	氨基丁酸 Aminobutyric acid	2.140	0.001	0.914	↑
α-酮戊二酸 α-Ketoglutaric acid	2.382	< 0.001	-1.771	↓	3-苯基乳酸 3-Phenyllactic acid	1.248	0.038	1.373	↑	苏氨酸 Threonine	1.738	0.004	-0.702	↓
富马酸 Fumaric acid	2.301	0.001	-1.174	↓	N-乙酰基-D-氨基胺 N-acetyl-D-aminoamine	2.648	0	-2.090	↓	1,2-脱水肌醇 1,2-Dehydrated Inositol	2.925	0.005	18.130	↑
羟胺 Hydroxylamine	1.492	0.001	-0.975	↓	α-酮异己酸 α-Ketoisocaproic acid	2.371	0.007	-0.891	↓	丝氨酸 Serine	1.568	0.008	-0.830	↓
2-羟基丁酸 2-Hydroxybutyric acid	2.176	0.002	-0.625	↓	己二酸 Adipic acid	1.757	0.021	-2.106	↓	吲哚乙酸 Indoleacetic acid	2.373	0.010	14.098	↑
L-苹果酸 L-malic acid	2.313	0.002	-1.319	↓	柠檬酸 Citric acid	1.043	0.021	-0.742	↓	胸苷 Thymidine	1.882	0.010	2.960	↑
邻苯二甲酸 Phthalate	1.860	0.002	-4.509	↓	邻苯二甲酸 Phthalic acid	2.109	0.024	-3.879	↓	柠檬酸 Citric acid	2.049	0.010	3.048	↑
丙酮酸 Pyruvate	2.085	0.008	-1.193	↓	肌苷 Inosine	1.690	0.037	-1.451	↓	甘油酸-3-磷酸 Glycerate-3-phosphate	1.664	0.015	-0.574	↓
花生四烯酸 Arachidonic acid	1.356	0.033	-0.543	↓	α-酮戊二酸 α-Ketoglutaric acid	1.978	0.038	-0.996	↓	谷氨酸 Glutamate	1.292	0.016	2.622	↑

注: DMBA-BC 为 DMBA 造模成瘤组; DMBA-nonBC 为 DMBA 造模未成瘤组; NC 为正常对照组; VIP 为变量权重值; FC 为差异倍数; CT 变化趋势。
Note: DMBA-BC, DMBA-induced group with breast cancer group; DMBA-nonBC, DMBA-induced group without breast cancer; NC, normal control group; VIP, variable importance in the projection; FC, fold change; CT, Change trend.

3 讨论

乳腺肿瘤是一类严重危害女性健康的肿瘤,在我国其发病率一直居高不下,呈逐年上升趋势,且患者越来越年轻化^[9]。通过建立相应的动物模型来深入研究乳腺肿瘤的发病机制,尤为重要。目前,利用树鼯建立乳腺肿瘤模型的研究已有报道。例如,徐小珊等^[10]利用化学诱癌的方式在刚分娩的母树鼯双侧乳房的脂肪垫中注射 100 mg/kg 的 DMBA 溶液,获得了乳腺肿瘤树鼯诱导模型,表明 DMBA 具有诱发乳腺癌的作用。何保丽等^[11]结合高水平的激素作用,并利用 DMBA 灌胃的方式,也成功建立了树鼯乳腺肿瘤模型。然而,如果仅仅使用灌胃 DMBA 的方式,很难诱导出树鼯乳腺肿瘤模型^[10]。据既往文献报道,高糖高脂饮食的生活方式也是女性乳腺肿瘤的高风险因素之一^[12-13]。所以本研究尝试在 DMBA 灌胃的基础下,结合高脂高糖饮食来建立了树鼯乳腺肿瘤模型。在实验观察期结束后,发现共有 8 只树鼯出现乳腺肿瘤,肿瘤发生率为 40%。本研究为探讨现代高脂高糖生活方式促进乳腺肿瘤发生的机制提供了动物模型。

值得关注的是,经 DMBA 处理 24 个月仍有 60% 的树鼯并未发生乳腺肿瘤。本研究尝试从代谢组学的角度分析 DMBA 造模成瘤组与 DMBA 造模未成瘤组间血清代谢物的差异,分析高糖高脂饮食结合 DMBA 化学诱导建模的影响因素,有助于进一步提高乳腺肿瘤建模的成功率。肿瘤细胞中糖酵解和三羧酸循环的上调是癌细胞增殖的已知主要途径之一。肿瘤细胞增殖需要摄入大量能量来维持细胞生长,故其糖酵解和氨基酸代谢较为活跃^[14]。相对于正常对照组,DMBA 造模成瘤组的 α -酮戊二酸、丙酮酸显著下调,而谷氨酸上调,这与文献报道^[15]相符。谷氨酰胺是蛋白质合成中的编码氨基酸,在体内可以由葡萄糖转变而来,而肿瘤的发生会上调谷氨酰胺酶表达,这将加速谷氨酰胺的降解,从而导致大量谷氨酸富集于体内,随后机体将谷氨酸进一步催化为 α -酮戊二酸并进入三羧酸循环,为肿瘤细胞供能^[16-17]。与此同时,机体内的碳源物质转运进入细胞内后,肿瘤细胞会优先进行糖酵解,将碳源物质代谢为丙酮酸,随后丙酮酸进入三羧酸循环后形成 α -酮戊二酸,肿瘤细胞需要消耗大量的 α -酮戊二酸,为生物合成柠檬酸和脂肪酸的三羧酸循环提供碳源,并为肿瘤细胞提供能量,以此来维持肿瘤细胞的生长^[18]。故肿瘤细胞内,丙酮酸和 α -酮戊二酸

的含量呈现下降趋势。石倩倩等^[8]对 7 只自发乳腺肿瘤的树鼯样品进行了代谢组学分析,也发现了同样的趋势:自发乳腺肿瘤的树鼯血清代谢物中,脯氨酸、羟脯氨酸出现显著下调。脯氨酸、羟脯氨酸是合成蛋白质的重要氨基酸之一,这也证明了肿瘤细胞在体内代谢旺盛,摄取并消耗机体大量的氨基酸。

肿瘤细胞中的脂质代谢紊乱已经被广泛报道^[19]。DMBA 造模成瘤组中甘油酸-3-磷酸含量高于正常对照组,这是由于肿瘤细胞的生长需要大量的脂质来参与糖酵解。脂质的合成与糖酵解有关,肿瘤细胞会利用糖酵解的中间产物如柠檬酸来合成脂质,用于满足肿瘤细胞增殖过程中对生物量的高需求^[20]。甘油酸磷酸化后生成甘油酸-3-磷酸,可进一步糖异生或参与糖酵解。脂类的超量供给为肿瘤细胞增殖提供了更多的原料,致使肿瘤细胞快速扩增^[21]。

乳腺癌是一类典型的糖酵解和脂肪酸合成显著增加的恶性肿瘤。 α -酮戊二酸、柠檬酸都是糖酵解过程中的重要中间产物,同时柠檬酸能够进一步被裂解为乙酰辅酶 A。乙酰辅酶 A 是内源性合成脂肪酸和胆固醇的关键性物质,并参与重要蛋白的修饰。有研究表明,肿瘤细胞吸收的葡萄糖通过糖酵解过程转化为柠檬酸,并通过分解柠檬酸来获能,从而维持肿瘤细胞的迁移和侵袭^[22]。DMBA 造模成瘤组与 DMBA 造模未成瘤组对比发现, α -酮戊二酸、柠檬酸都出现了下调的现象,提示 DMBA 造模成瘤组需要消耗大量的 α -酮戊二酸和柠檬酸来获能。

DMBA 造模未成瘤组与正常对照组相比,机体虽然也出现谷氨酸上调的趋势,但是甘油酸-3-磷酸呈下调趋势,且柠檬酸呈现上调趋势。笔者推测,虽然 DMBA 造模未成瘤组树鼯增加了高脂高糖饮食,但是并未呈现体内脂质过剩现象,这可能与本组树鼯脂质吸收能力较弱或脂质代谢能力较强有关。

综上,本研究发现 α -酮戊二酸、丙氨酸、谷氨酸、甘油酸-3-磷酸以及柠檬酸等代谢产物的改变与 DMBA 诱发树鼯乳腺肿瘤的发生与发展密切相关。差异代谢物在乳腺肿瘤发生、发展中的确切机制有待进一步探索。

[医学伦理声明 Medical Ethics Statement]

本研究涉及的所有动物实验均已通过广西医科大学实验动物福利伦理委员会审批同意(批准编号 DW20200527-274)。所有实验过程均遵照中国实验动物相关法律法规条例要求进行。

All animal experiments involved in this study have been approved by the Experimental Animal Welfare Ethics Committee of Guangxi Medical University (Approval No. 202006029). All experiments were conducted in accordance with the requirements of Chinese laws and regulations on laboratory animals.

[作者贡献 Author Contribution]

方茜负责数据收集处理与文章初稿撰写;

敖青青负责实验记录;

李春宏负责查阅文献并整理数据;

郭松超负责数据分析以及经费支持;

欧阳轶强负责数据分析和技术支持;

胡冰负责实验路线设计和实验指导, 以及论文修改与审核。

[利益声明 Declaration of Interest]

所有作者均声明本文不存在利益冲突。

[参考文献 References]

- [1] 郭心怡, 吕青. 2023年«NCCN乳腺癌风险降低指南»解读[J]. 中国胸心血管外科临床杂志, 2023, 30(6):787-804. DOI:10.7507/1007-4848.202303034.
GUO X Y, LV Q. Interpretations of the NCCN guidelines for breast cancer risk reduction(version 2023) [J]. Chin J Clin Thorac Cardiovasc Surg, 2023, 30(6): 787-804. DOI: 10.7507/1007-4848.202303034.
- [2] 王英哲, 殷咏梅, 江泽飞. 2023年CSCO«乳腺癌诊疗指南»更新要点解读[J]. 中国肿瘤外科杂志, 2023, 15(3): 209-213, 218. DOI: 10.3969/j.issn.1674-4136.2023.03.001.
WANG Y Z, YIN Y M, JIANG Z F. Interpretation of updated key points of Chinese society of clinical oncology(CSCO)breast cancer guidelines 2023[J]. Chin J Surg Oncol, 2023, 15(3): 209-213, 218. DOI: 10.3969/j.issn.1674-4136.2023.03.001.
- [3] 姜艺, 顾天豪, 夏添松. 特殊乳腺癌动物模型研究进展[J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2021, 41(2):292-295, 309. DOI:10.7655/NYDXBNS20210227.
JIANG Y, GU T H, XIA T S. Research progress of special animal models of breast cancer[J]. J Nanjing Med Univ Nat Sci, 2021, 41(2):292-295, 309. DOI:10.7655/NYDXBNS20210227.
- [4] 夏巍, 赖永静, 杜龙, 等. 树鼩在人类肿瘤疾病动物模型中的应用进展[J]. 动物医学进展, 2019, 40(3):109-113. DOI: 10.16437/j.cnki.1007-5038.2019.03.020.
XIA W, LAI Y J, DU L, et al. Application of tree shrew in animal models of human tumor diseases[J]. Prog Vet Med, 2019, 40(3):109-113. DOI: 10.16437/j.cnki.1007-5038.2019.03.020.
- [5] 贾杰, 代解杰. 树鼩在生物医学研究中的优势与挑战[J]. 实验动物与比较医学, 2019, 39(1): 3-8. DOI: 10.3969/j.issn.1674-5817.2019.01.002.
JIA J, DAI J J. Advantages and challenges of tree shrews in biomedical research[J]. Lab Anim Comp Med, 2019, 39(1): 3-8. DOI: 10.3969/j.issn.1674-5817.2019.01.002.
- [6] OLIVARES O, DÄBRITZ J H M, KING A, et al. Research into cancer metabolomics: towards a clinical metamorphosis[J]. Semin Cell Dev Biol, 2015, 43: 52-64. DOI: 10.1016/j.semcdb.2015.09.008.
- [7] 马小雨, 罗彩萍, 刘悦. 代谢组学在乳腺癌诊疗中应用的研究进展[J]. 药学实践与服务, 2023, 41(3):139-145. DOI:10.12206/j.issn.2097-2024.202109112.
- [8] 石倩倩, 敖青青, 韦兰成, 等. 树鼩自发性乳腺癌的代谢组学分析[J]. 广西医科大学学报, 2021, 38(10):1860-1864. DOI: 10.16190/j.cnki.45-1211/r.2021.10.005.
SHI Q Q, AO Q Q, WEI L C, et al. Metabonomics analysis of spontaneous breast cancer in tree shrew[J]. J Guangxi Med Univ, 2021, 38(10): 1860-1864. DOI: 10.16190/j.cnki.45-1211/r.2021.10.005.
- [9] 韩春平, 许佳琪, 宋旭阳. 南阳地区育龄期女性乳腺癌流行特征及相关因素[J]. 中国卫生工程学, 2023, 22(2):217-219. DOI: 10.19937/j.issn.1671-4199.2023.02.021.
HAN C P, XU J Q, SONG X Y. Epidemiological characteristics and related factors of breast cancer in women of childbearing age in Nanyang area[J]. Chin J Public Health Eng, 2023, 22(2):217-219. DOI: 10.19937/j.issn.1671-4199.2023.02.021.
- [10] 徐小珊, 侯小明, 王伟, 等. DMBA诱导树鼩乳腺肿瘤(中缅树鼩)[J]. 现代生物医学进展, 2015, 15(2):228-232. DOI: 10.13241/j.cnki.pmb.2015.02.007.
XU X S, HOU X M, WANG W, et al. DMBA induced breast tumors in tree shrews(*Tupaia belangeri* Chinese) [J]. Prog Mod Biomed, 2015, 15(2): 228-232. DOI: 10.13241/j.cnki.pmb.2015.02.007.
- [11] 何保丽, 夏厚军, 角建林, 等. 人工诱导树鼩乳腺肿瘤的病理分析[J]. 中国比较医学杂志, 2016, 26(3): 6-10. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.03.002.
HE B L, XIAO H J, JIAO J L, et al. Pathological analysis of the induced breast tumor models in tree shrew[J]. Chin J Comp Med, 2016, 26(3): 6-10. DOI: 10.3969. j. issn. 1671-7856.2016.03.002.
- [12] 杜沛, 沈红艺, 李中平, 等. 大豆异黄酮对DMBA诱导高脂饮食幼龄大鼠乳腺肿瘤的作用[J]. 南京中医药大学学报, 2014, 30(5): 498-500. DOI: 10.14148/j.issn.1672-0482.2014.05.060.
DU P, SHEN H Y, LI Z P, et al. Effects of soy isoflavones and high-fat diet on genesis and progress of 7, 12-dimethylbenz(α) anthracene-induced breast cancer in young female SD rats [J]. J Nanjing Univ Tradit Chin Med, 2014, 30(5):498-500. DOI: 10.14148/j.issn.1672-0482.2014.05.060.
- [13] HOSSEINPOUR Z, REZAEI TAVIRANI M, AKBARI M E. Stage analysis of breast cancer metabolomics: a system biology approach[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2023, 24(5):1571-1582. DOI: 10.31557/APJCP.2023.24.5.1571.
- [14] JOBARD E, PONTOIZEAU C, BLAISE B J, et al. A serum nuclear magnetic resonance-based metabolomic signature of advanced metastatic human breast cancer[J]. Cancer Lett, 2014, 343(1):33-41. DOI: 10.1016/j.canlet.2013.09.011.
- [15] ZHANG Y P, SHIPKOVA P A, WARRACK B M, et al. Metabolomic profiling and drug interaction characterization reveal riboflavin As a breast cancer resistance protein-specific endogenous biomarker that demonstrates prediction of transporter activity *in vivo*[J]. Drug Metab Dispos, 2023, 51(7):851-861. DOI: 10.1124/dmd.123.001284.
- [16] KODAMA M, OSHIKAWA K, SHIMIZU H, et al. A shift in glutamine nitrogen metabolism contributes to the malignant

progression of cancer[J]. Nat Commun, 2020, 11(1):1320. DOI: 10.1038/s41467-020-15136-9.

[17] XIAO D F, ZENG L M, YAO K, et al. The glutamine-alpha-ketoglutarate (AKG) metabolism and its nutritional implications[J]. Amino Acids, 2016, 48(9): 2067-2080. DOI: 10.1007/s00726-016-2254-8.

[18] WISE D R, THOMPSON C B. Glutamine addiction: a new therapeutic target in cancer[J]. Trends Biochem Sci, 2010, 35(8):427-433. DOI: 10.1016/j.tibs.2010.05.003.

[19] 吴静, 杨睿, 刘树业. 代谢组学技术在乳腺癌标志物筛选中的应用进展[J]. 天津医药, 2018, 46(9): 1019-1022. DOI: 10.11958/20180365.

WU J, YANG R, LIU S Y. Application of metabonomics in screening markers for breast cancer[J]. Tianjin Med J, 2018, 46(9):1019-1022. DOI: 10.11958/20180365.

[20] HOU J, REID N E, TROMBERG B J, et al. Kinetic analysis of lipid metabolism in breast cancer cells via nonlinear optical microscopy[J]. Biophys J, 2020, 119(2):258-264. DOI: 10.1016/j.bpj.2020.06.007.

[21] ZHAO Z W, XIAO Y J, ELSON P, et al. Plasma

lysophosphatidylcholine levels: potential biomarkers for colorectal cancer[J]. J Clin Oncol, 2007, 25(19): 2696-2701. DOI: 10.1200/JCO.2006.08.5571.

[22] 邱振东, 邓文宏, 洪育蒲, 等. ATP 柠檬酸裂解酶对结肠癌细胞脂质代谢及肿瘤生物学行为的作用[J]. 中国普外基础与临床杂志, 2021, 28(1):48-52. DOI: 10.7507/1007-9424.202004133.

QIU Z D, DENG W H, HONG Y P, et al. Effects of ATP citrate lyase on lipid metabolism and tumor biological behavior of colon cancer cells[J]. China Ind Econ, 2021, 28(1):48-52. DOI: 10.7507/1007-9424.202004133.

(收稿日期:2023-06-30 修回日期:2023-12-12)

(本文编辑:张俊彦,富群华,丁宇菁,吴昊晟)

[引用本文]

方茜, 敖青青, 李春宏, 等. 树鼩乳腺肿瘤模型的代谢组学分析[J]. 实验动物与比较医学, 2024, 44(1): 52-61. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2023.094.

FANG X, AO Q Q, LI C H, et al. Metabolomics analysis of *Tupaia belangeri* breast tumor model[J]. Lab Anim Comp Med, 2024, 44(1): 52-61. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2023.094.

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

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

《实验动物与比较医学》编辑部



孔 琪, 医学博士, 硕士生导师, 研究员。现任中国医学科学院医学实验动物研究所、北京协和医学院比较医学中心生物信息研究中心负责人、课题组长, 曾任所长助理(2014—2018年)。社会兼职包括中国实验动物学会实验动物标准化专业委员会秘书长, 全国实验动物标准化技术委员会秘书长(2005—2018年)等。长期从事比较医学大数据、比较组学和实验动物标准化研究工作。主管国家科技部批准设立的“国家动物模型资源共享平台”和“国家人类疾病动物模型资源库”数据管理工作。主持北京市自然科学基金、中英国际合作项目等5项, 参与国家863计划、传染病重大专项、重点研发计划、医学创新工程等10余项课题。开发了比较医学大数据平台等12个专业数据库, 获得国际专利2项、软著8项。参编教材专著26部, 包括国家统编研究生教材《医学实验动物学》(第1~2版编委兼秘书, 第3版副主编)和长学制临床医学专业教材《实验动物学》(第1~3版编委兼秘书), 以及“协和”特色教材《实验动物学》(副主编)、《中华医学百科全书-医学实验动物学》(编委兼秘书)等。主编或参编国家标准12项, 团体标准10项。以第一作者或通信作者身份发表论文33篇, 参与发表25篇, 其中SCI论文19篇。获得教育部、中国实验动物学会等科技奖励5项, 曾获中国实验动物学会“优秀青年人才奖”。

新冠病毒感染转录组学数据及比较医学分析

冯婷婷, 李依桐, 吴 玥, 王 珏, 孔 琪

(中国医学科学院医学实验动物研究所, 北京协和医学院比较医学中心, 国家人类疾病动物模型资源库, 国家卫生健康委员会人类疾病比较医学重点实验室, 新发再发传染病动物模型研究北京市重点实验室, 北京市人类重大疾病实验动物模型工程技术研究中心, 北京 100021)

[摘要] **目的** 通过系统梳理与分析新冠病毒感染相关的转录组数据, 为研究新冠病毒感染过程中的生物学变化和致病机制提供更多的比较医学基础信息。**方法** 按照检索策略, 以COVID-19和SARS-CoV-2为检索词, 从GEO、ArrayExpress、GEN三大转录组数据库收集获得2020年1月—2023年5月的新冠病毒感染转录组数据集, 分析得到新冠病毒感染转录组的数据资源组成、分布和研究应用情况, 并对数据分布进行可视化展示及关联分析。从临床医学和比较医学两个方面, 围绕临床相关分子机制、生物标志物及相关免疫反应、治疗干预策略等方面, 分析现有新冠病毒感染转录组数据的研究应用和局限性, 阐述其研究价值和应用前景。**结果** 共纳入新冠病毒感染转录组数据975组, 在3个数据库中样本来源于人的数据集最多, 分别占71.9%、77.9%和90.0%。除人以外, 小鼠等是数据主要来源物种, 呼吸系统和神经系统是数据分布排名在前的两个系统。在临床意义方面关联27个数据集。分析显示, 基于转录组数据挖掘得到呼吸道损伤等相关分子机制, cfDNA等生物标志物可作为治疗靶点, 以M1型巨噬细胞为代表的细胞变化和失调与新冠病毒感染严重程度相关。比较医学分析表明小鼠、仓鼠等均为新冠病毒易感动物, 其中恒河猴和食蟹猴与人类的感染特征高度相似, 仓鼠除了呼吸道症状还存在消化系统症状。新冠病毒能在各种易感动物呼吸系统器官、雪貂的肠道及水貂的耳部进行复制, 产生肺炎、弥漫性肺损伤等不同程度的病理变化; 基于免疫应答差异, 可使用仓鼠进行中和抗体反应研究。**结论** 目前新冠病毒感染转录组数据较多, 但缺少比较转录组研究, 可将转录组学与比较医学进一步结合, 从而对新冠病毒感染的比较医学差异进行更深入的挖掘。

[关键词] 新冠病毒; 转录组; 大数据; 分子机制; 数据分析

[中图分类号] R-332 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2024)01-0062-12



Transcriptome Data and Comparative Medical Analysis of COVID-19 Virus Infection

FENG Tingting, LI Yitong, WU Yue, WANG Jue, KONG Qi

(Institute of Laboratory Animal Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College,

[基金项目] 北京市自然科学基金资助项目“基于大数据的新型冠状病毒肺炎动物模型数据库建立”(M21027)

[第一作者] 冯婷婷(1999—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 比较医学。E-mail: fengtingting@cnilas.org

[通信作者] 孔 琪(1978—), 男, 博士, 研究员, 研究方向: 比较医学。E-mail: kongqi@cnilas.org. ORCID: 0000-0003-2867-7382

National Human Diseases Animal Model Resource Center, NHC Key Laboratory of Human Disease Comparative Medicine, Beijing Key Laboratory for Animal Models of Emerging and Reemerging Infectious Diseases, Beijing Engineering Research Center for Experimental Animal Models of Human Critical Diseases, Beijing 100021, China)

Correspondence to: KONG Qi (ORCID: 0000-0003-2867-7382), E-mail: kongqi@cnilas.org

[ABSTRACT] Objective To provide more basic information of comparative medicine for the study of biological changes and pathogenesis of COVID-19 by systematical sorting and analyzing the transcriptome data. **Methods** Following a retrieval strategy, using COVID-19 and SARS-CoV-2 as key words, transcriptome datasets related to COVID-19 from January 2020 to May 2023 were collected from GEO, ArrayExpress and GEN Transcriptome databases. The composition, distribution, and research application of COVID-19 transcriptome data resources were analyzed. Data distribution was visually displayed and correlation analysis was performed. The research applications and limitations of existing COVID-19 transcriptome data were analyzed from the perspectives of clinical medicine and comparative medicine, focusing on clinical-related molecular mechanisms, biomarkers and related immune responses, treatment intervention strategies, etc. The research value and application prospects were discussed. **Results** A total of 975 sets of COVID-19 transcriptome data were included. Among three databases, datasets from humans accounted for the highest proportion, namely 71.9%, 77.9%, and 90%, respectively. Species other than humans, such as mice, were the main sources of data, with the respiratory and nervous systems having the highest distribution of data. Twenty-seven datasets were associated with clinical significance. Analysis revealed that respiratory tract injury and other related molecular mechanisms were obtained through transcriptome data mining. Biomarkers such as cfDNA could be used as therapeutic targets. The severity of COVID-19 infection was associated with cell changes and disorders represented by M1 macrophages. Comparative medical analysis showed that mice, hamsters, and other animals were susceptible to SARS-CoV-2. Rhesus monkeys and cynomolgus monkeys exhibited infection characteristics highly similar to human. Apart from respiratory symptoms, hamsters also exhibited digestive system symptoms. SARS-CoV-2 can replicate in the respiratory organs of various susceptible animals, the intestines of ferrets and the ears of minks, resulting in interstitial pneumonia, diffuse lung injury and other pathological changes of varying degrees. Based on the differences in immune responses, hamsters can be used for neutralizing antibody reaction research. **Conclusion** Currently there is a wealth of COVID-19 transcriptome data, but there is a lack of comparative transcriptome research. Transcriptomics can be combined with comparative medicine to further explore the differences in comparative medicine of COVID-19.

[Key words] COVID-19; Transcriptome; Big data; Molecular mechanisms; Data analysis

转录组是特定细胞、组织或器官在某种功能状态下进行DNA转录的所有RNA的总和。转录组数据分析可研究不同生物中基因表达的变化,有助于理解人类疾病发生和发展的分子机制^[1]。新型冠状病毒即严重急性呼吸综合征冠状病毒2(severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2, 下文简称新冠病毒)可导致新冠病毒肺炎即新冠病毒疾病(coronavirus disease 2019, COVID-19),已造成数百万人死亡。国家卫生健康委已于2022年12月26日发布公告,将新冠病毒肺炎更名为新冠病毒感染^[2]。随着测序能力的提高和新冠病毒感染研究的深入,新冠病毒感染转录组数据资源变得更加丰富。转录组作为一种重要

的研究工具,有助于揭示新冠病毒感染的疾病特征和分子机制,为临床治疗提供了新的思路。

国际上规模较大的转录组数据库有美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)的GEO数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)、欧洲分子生物学实验室(European Molecular Biology Laboratory, EMBL)-欧洲生物信息学研究所(European Bioinformatics Institute, EBI)的ArrayExpress数据库(<https://www.ebi.ac.uk/biostudies/arrayexpress>)和中国国家生物信息中心的GEN数据库(<https://ngdc.cnecb.ac.cn/gen/>)。本文通过归纳以上3种数据库中有关新冠病毒感染的转录组数据,然后从临

床意义角度和比较医学角度分析相关数据的组成与分布、研究进展以及应用前景,并提出建议,以期为新冠病毒感染机制研究和新药开发提供理论依据与指导,也为其在比较医学方面的潜在应用提供思路。

1 数据来源及分析方法

1.1 数据来源

以“COVID-19”或“SARS-CoV-2”为检索词,“Series”为数据导入类型(Entry type),“Expression profiling by array”或“Expression profiling by high throughput sequencing”为数据类型(Study type),搜索GEO数据库中2020年1月—2023年5月的新冠病毒感染相关转录组数据。

以“COVID-19”或“SARS-CoV-2”为主题词,搜索ArrayExpress数据库和GEN数据库中2020年1月—2023年5月的新冠病毒感染相关转录组数据。

1.2 纳入和排除标准

纳入标准:(1)研究对象为新冠病毒感染的人、实验动物或细胞;(2)研究类型为随机对照实验;(3)技术类型为微阵列和高通量测序技术。排除标准:非新冠病毒感染或非转录组的其他组学数据。最终获得新冠病毒感染的转录组数据共975套。

1.3 数据处理

根据研究物种、数据类型、感染组织等进行分类,并采用Excel 2019和统计学软件Prism 9进行统计处理。分类结果以柱状图和饼图呈现。

2 数据分析结果

2.1 新冠病毒感染转录组数据总体组成和分布

从GEO、ArrayExpress、GEN三大转录组数据库收集获得975个新冠病毒感染转录组数据集;其中,GEO数据库有783个,GEN数据库有132个,ArrayExpress数据库有60个(图1)。

2.2 GEO数据库的新冠病毒感染转录组数据

在GEO数据库中,新冠病毒感染转录组数据共有783个系列和23 208个样本;其中749个系列使用高通量测序技术,37个系列使用微阵列技术,3个系列同时使用两种技术。这些数据集主要来源于人类、动物模型和细胞,其中人类的数据集共有563个,动物模型的数据集来源于小鼠(113个)、非人灵长类(58个)、仓鼠(41个)和其他实验动物(图2)。

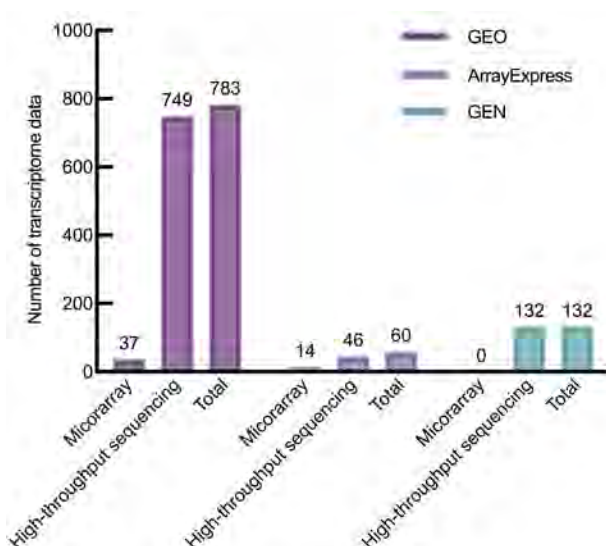


图1 各数据库中SARS-CoV-2感染转录组数据

Figure 1 SARS-CoV-2 infection transcriptome data in various databases

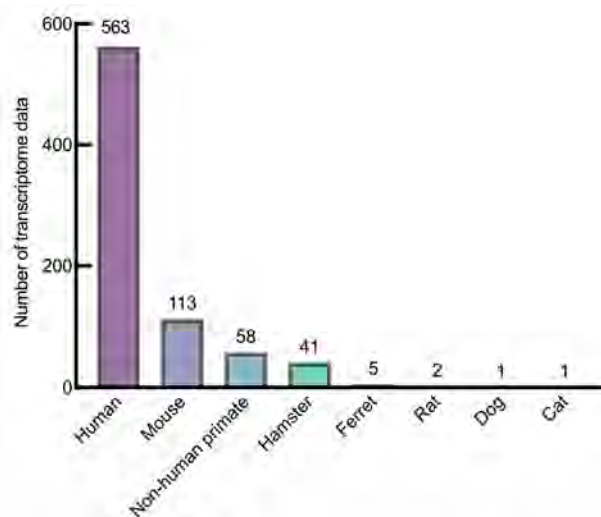
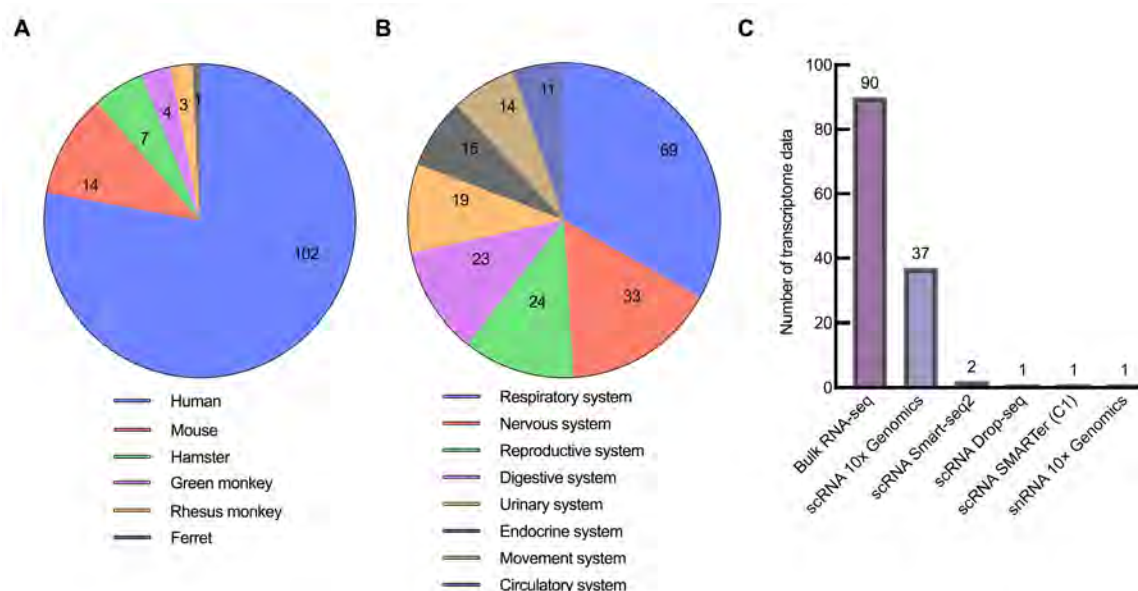


图2 GEO数据库中SARS-CoV-2感染转录组数据按研究物种分类

Figure 2 Classification of SARS-CoV-2 infection transcriptome data in GEO series by species

2.3 GEN数据库的新冠病毒感染转录组数据

在GEN数据库中,共有132个新冠病毒感染转录组数据;按照物种和组织的不同进行分类,整理得到结果见图3。其中,人的转录组数据最多(102个),占所有数据总和的77.9%。按照病毒感染的系统分类,排名在前的为呼吸系统和神经系统。进一步统计获得转录组数据所用的具体测序方法,发现大多使用Bulk RNA-seq方法。



注：A，按研究物种分类；B，按感染系统分类；C，按测序方法分类。

Note: A, classified by species; B, classified by system; C, classified by sequencing methods.

图3 GEN数据库中SARS-CoV-2感染转录组数据分类结果

Figure 3 Classification result of SARS-CoV-2 infection transcriptome data in GEN database

2.4 ArrayExpress 数据库的新冠病毒感染转录组数据

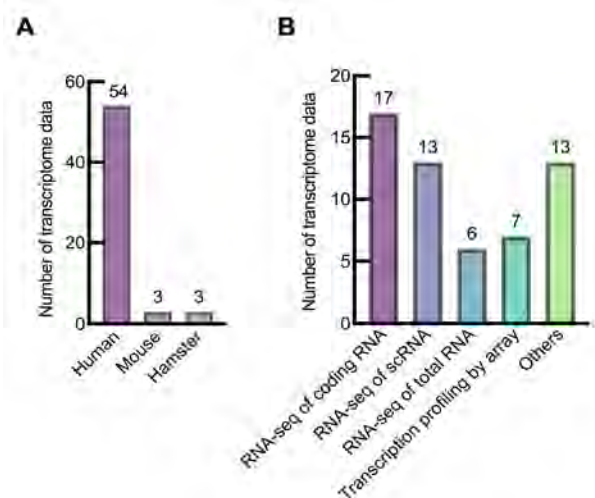
在 ArrayExpress 数据库中共有 60 个新冠病毒感染转录组数据；按照研究物种和检测方法的不同进行分类整理得到结果见图 4。其中，人的转录组数据最多（54 个），占有数据总和的 90%。在具体检测方法类型方面，编码 RNA 的 RNA-seq 占比最大。

3 新冠病毒感染转录组数据的临床意义

3.1 探索新冠病毒感染相关临床表型的分子机制

新冠病毒感染的临床分型有四类，即轻型、普通型、重型和危重型。感染主要病变在肺脏，可累及脾、心血管、肝、肾和脑等器官。新冠病毒感染具有多种临床表型，如肺功能不全、血液学改变、肝肾功能异常和心肌损伤等。本研究整理了基于转录组数据挖掘得到的临床发现，并与研究使用的数据集信息相关联，结果见表 1。

新冠病毒感染症状集中体现在呼吸道损伤。Jha 等^[3]通过肺部转录组分析发现，与急性炎症相关的肿瘤坏死因子（tumor necrosis factor, TNF）、白细胞介素（interleukin, IL）-32、IL-1 α 、趋化因子配体 [chemokine (C-X-C motif) ligand, CXCL] 1 和 CXCL3 在新冠病毒感染中表达水平较低。这会抑制病毒转录反应，从而可能导致病毒复制时间延长和严



注：A，按物种分类；B，按具体方法分类。

Note: A, classified by species; B, classified by specific methods.

图4 ArrayExpress 数据库中SARS-CoV-2感染转录组数据分类结果

Figure 4 Classification results of SARS-CoV-2 infection transcriptome data in the ArrayExpress database

重的肺损伤。肺损伤患者中存在共同的信号通路，涉及细胞毒性淋巴细胞和促炎巨噬细胞之间的串扰。此外，TNF 超家族成员，B 细胞激活因子（B-cell Activating factor of the TNF family, BAFF）和肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体（TNF related apoptosis inducing

表1 SARS-CoV-2感染转录组临床意义挖掘及对应数据集
Table 1 Clinical significances of SARS-CoV-2 transcriptome and associated datasets

样本来源 Sample origins	组织/细胞 Tissues/cells	发现 Finding	数据集编号 Datasets' number
人;雪貂 Human; ferrets	NHBE、A549、Calu3细胞,肺组织(人); 鼻腔冲洗液(雪貂)	新冠病毒感染肺损伤相关机制	GSE147507
人;雪貂 Human; ferrets	NHBE、A549、Calu3细胞(人);鼻腔冲洗 液(雪貂)	应对新冠病毒感染时 NHBE 细胞上调 MALAT1 和 NEAT1 表达	GSE147507
人;C57BL/6 小鼠 Human; C57BL/6 mice	PBMC、肺泡灌洗液(人);淋巴结(小鼠)	髓细胞、上皮细胞和 T 细胞之间的相互作用驱动组 织损伤	GSE149689; GSE155673; GSE145926; GSE149443
金黄仓鼠 Golden hamsters	心脏	新冠病毒感染对心脏的损伤机制	PRJNA884511
人 Human	肺、肝脏	新冠病毒感染肝损伤相关机制	GSE150316
人 Human	肺泡灌洗液	严重新冠病毒感染患者的支气管肺泡灌洗液中富 含促炎单核细胞衍生的巨噬细胞	GSE145926
人 Human	肺泡灌洗液	M1 型巨噬细胞和重度新冠病毒感染患者之间的关 系最高	GSE145926
人 Human	肺泡灌洗液	在重症监护室的新冠病毒感染患者中,中性粒细 胞高度激活	EGAS00001004571 (EGA)
人 Human	皮肤	新冠病毒感染引起皮疹机制	GSE161225
人 Human	血液、鼻上皮、唾液	CCL3 等基因为严重新冠病毒感染鼻腔、口腔和血 液中的生物标志物	GSE183071
人 Human	上呼吸道、鼻咽、全血	发现与新冠病毒感染每种分子亚型相关的特定基 因	GSE156063; GSE163151
人 Human	外周血、全血、血浆和白细胞	ARG1 等 7 个基因生物标志物可区分 SARS-CoV-2 相关的 ARI 和其他类型的 ARI	GSE161731; GSE171110 GSE152641; GSE157103 GSE172114; GSE161777
人 Human	PBMC、全血、血浆和白细胞	生物标志物 TGFBI、TTYH2 和 CD4 参与免疫反应和 炎症	GSE152418; GSE166424; GSE157103
人 Human	全血	新冠病毒感染严重程度的转折点与 S100A9 等 8 个 中性粒细胞特征基因有关	E-MTAB-11240 (EMBL-EBI)
人 Human	外周血	神经损伤相关的 UCHL1 表达增加与严重症状有关	GSE152418
人 Human	外周血	miR-146-146a-5p 等 3 个非编码 RNA 是新冠病毒感 染的潜在治疗靶点	HRA000238 (NGDC)
人 Human	外周血	鉴定了 6 个具有不同分子特征的新冠肺炎亚型	GSE143507
人 Human	血沉棕黄层细胞、A549 细胞	cfDNA 能够作为查看疾病严重程度的非侵入性生 物标志物	GSE147507; GSE154998
人 Human	PBMC	无症状患者中 PBMC 的免疫反应较弱,复阳患者 的 PBMC 具有高炎症免疫反应	GSE179627
人 Human	PBMC	循环单核淋巴细胞的变化可预测新冠病毒感染的 严重程度	GSE180594
人 Human	额叶皮质、脉络丛	新冠病毒感染患者脑和脉络丛细胞的功能失调	GSE159812

注: NHBE 为支气管上皮细胞, A549 为肺癌人类肺泡基底上皮细胞, Calu3 为人肺腺癌细胞, cfDNA 为循环游离 DNA, PBMC 为外周血单核细胞, MALAT1 为转移相关性肺腺癌转录本 1, NEAT1 为核富集丰度转录本 1, CCL3 为趋化因子配体 3, ARG1 为精氨酸酶 1, ARI 为急性呼吸系统疾病, TGFBI 为转化生长因子 β 诱导蛋白, TTYH2 为蛋白 tweety 同源物 2, CD4 为分化决定簇抗原 4, UCHL1 为泛素羧基端酯酶 L1。

Note: NHBE, normal human bronchial epithelial cells; A549, human non small cell lung cancer cell line; Calu3, human lung adenocarcinoma cell line; cfDNA, circulating-free DNA; PBMC, peripheral blood mononuclear cells MALAT1, metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1; NEAT1, nuclear enriched abundant transcript 1; CCL3, C-C motif chemokine 3; ARG1, arginase-1; ARI, acute respiratory illness; TGFBI, transforming growth factor beta induced protein; TTYH2, protein tweety homolog 2; CD4, cluster of differentiation 4; UCHL1, ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1.

ligand, TRAIL) 在严重肺损伤中表达水平持续上调^[4]。

感染新冠病毒后, 患者经常伴有肺外表现, 包括肝功能障碍。新冠病毒感染转录组分析发现, 重症患者与肝硬化、纤维化、非酒精性脂肪肝和 A、B、C 型肝炎患者肝组织的差异主要是以病理组织重塑为特征。Hammoudeh 等^[5] 分析新冠病毒感染患者肝组织的转录组数据, 发现 G 偶联蛋白受体家族基因、DnaJ 热休克蛋白家族成员 B1 (DnaJ heat shock protein family member B1, DNAJB1)、胰岛素样生长因子 2 (insulin-like growth factor 2, IGF2)、表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR)、肝癌衍生生长因子 (hepatoma-derived growth factor, HDGF) 和其他与组织重塑相关的转录产物表达水平显著上调, 而与代谢途径和线粒体功能相关的转录产物表达被显著抑制。这解答了新冠病毒感染后肝脏解毒能力下降的分子机制。

在新冠病毒感染严重的患者中, 各种皮疹被广泛报道。Mitamura 等^[6] 发现在新冠病毒感染引起的黄斑丘疹中, 炎症因子 (如 IL-6、IL-8 和 TNF)、I 型细胞因子和趋化因子 (如 IFN- γ 、CXCL9、CXCL10、CXCL11、2 型反应介质 IL-4、IL-5) 表达上调, 嗜酸性粒细胞的趋化性和抑制性免疫反应明显增强, 细胞因子风暴延长。伴有嗜酸性粒细胞增多和全身皮疹症状的新冠病毒感染严重患者具有细胞因子风暴相关的炎症, 且存在趋化因子上调的情况。这一发现表明新冠病毒感染表现出的皮疹可能是高炎症免疫反应的结果, 即由新冠病毒感染引起的强大系统性免疫反应引发或导致加剧。

在新冠病毒感染导致住院的患者中, 超过三分之一的患者患有急性肾损伤 (acute kidney injury, AKI)^[7]。Alexander 等^[8] 发现新冠病毒感染肾脏的转录组富集在炎症, 包括凋亡、自噬、主要组织相容性复合体 I 类和 II 类以及 1 型辅助 T 细胞分化, 提示新冠病毒感染导致的 AKI 和脓毒症相关 AKI 之间有相似性。

心血管系统同样受到新冠病毒感染影响, 并发症包括心肌损伤、心肌炎、急性心肌梗死等^[9]。基于 33 805 名患者的 150 项研究的系统性回顾分析表明, 许多新冠病毒感染患者表现出严重的心血管系统受累^[10]。Wiscovitch-Russo 等^[10] 确定, 新冠病毒诱发坏死性凋亡, 从而导致新冠病毒感染严重患者发生主

要不良心血管事件 (major adverse cardiac events, MACE)。通过下调混合谱系激酶域样蛋白 (mixed lineage kinase domain-like, MLKL) 抑制坏死性凋亡, 可能对于预防严重新冠病毒感染期间心脏损伤引起的急性和长期 MACE 具有临床意义。

3.2 揭示生物标志物及相关免疫反应并建立治疗干预策略

新冠病毒感染转录组数据分析可提供许多疾病信息。一种常见的应用是比较多组样本, 以获得基因表达特征。由此, 人们可以挖掘生物标志物, 深入了解免疫反应和治疗干预途径。

生物标志物对于追踪疾病发生发展具有重要意义, 一般具有诊断、预后、监测等不同作用。Chen 等^[11] 发现循环游离 DNA (circulating-free DNA, cfDNA) 能够作为检查疾病严重程度的非侵入性生物标志物。该研究确定 cfDNA 在轻度和重度病例之间具有明显不同的信号, 具有预测新冠病毒感染严重程度的潜力。Gómez-Carballea 等^[12] 对不同严重程度的新冠病毒感染患者的免疫相关基因进行了多组织分析, 发现 CCL3 等基因是严重新冠病毒感染患者鼻腔、口腔和血液中的生物标志物, 对于治疗过程监测具有一定意义。Krishnamoorthy 等^[13] 集成生物信息学和机器学习算法, 发现精氨酸酶 1 (arginase-1, ARG1) 等 7 个基因生物标志物可区分 SARS-CoV-2 相关的急性呼吸系统疾病 (acute respiratory illness, ARI) 和其他类型的 ARI, 且新冠病毒感染后失调的 7 个基因在新冠病毒感染康复期可恢复至正常水平, 表明其与感染的诊断高度相关。Clancy 等^[14] 通过外周血单核细胞和白细胞的转录组预测转化生长因子 β 诱导蛋白 (transforming growth factor beta induced protein, TGFBI)、蛋白 tweety 同源物 2 (protein tweety homolog 2, TTYH2) 和 CD4 参与免疫反应和炎症反应, 这 3 个转录生物标志物可作为药物治疗靶点, 从而推进新药开发。Liu 等^[15] 使用患者的外周血进行 RNA 测序, 发现与神经损伤相关的泛素羧基端酯酶 L1 (ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1, UCHL1) 表达增加与严重症状有关。这些生物标志物可作为治疗靶点并且用于评估新冠病毒感染患者预后, 具有临床治疗意义。

3.3 提示新冠病毒感染的独特免疫学特征

基因共表达分析可以揭示转录调控的分子机制, 可筛选表型性状相关的核心基因, 并预测基因间的调控关系和未知基因的功能。为了剖析新冠病毒感染驱

动的免疫宿主反应, Aschenbrenner 等^[16] 使用共表达分析鉴定了6个具有不同分子特征的新冠病毒疾病亚型。Zhang 等^[17] 对48名新冠病毒感染患者的PBMC转录组进行了全面分析, 确定与无症状、有症状和恢复期新冠病毒感染患者呈正相关的共表达模块, 提出无症状感染者中PBMC的免疫反应较弱, 复阳患者的PBMC具有高炎性免疫反应。Mukherjee 等^[18] 分析新冠病毒感染的A549细胞和患者支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid)的转录组数据, 得到细胞因子风暴激活背后与高炎性反应有关的分子相互作用。

Karami 等^[19] 构建了新冠病毒感染的加权基因共表达网络, 识别出肽聚糖识别蛋白4(peptidoglycan recognition protein 4, PGLYRP4)和类血红素1(hephaestin-like 1, HEPHL1)是支气管上皮细胞和肺癌A549细胞系在新冠病毒感染期间的中枢基因。Hu 等^[20] 使用基于加权基因共表达网络分析(weighted correlation network analysis, WGCNA)的一致聚类方法对新冠病毒感染患者的分子亚型进行分类, 发现了与每种亚型相关的特定基因。这些基因共表达网络把复杂的组学数据简化为几个功能模块, 将模块与表型信息相关联可以筛选出更具有生物学意义的模块。基因共表达网络可提供反映基因关系的全局视图, 但该类分析要求纳入大量样本, 以证明分析结果提供的是有用信息。

3.4 识别非编码RNA等转录调节的分子驱动因素

在GEO数据库中, 进行非编码RNA分析(包括通过阵列、基因组拼接阵列和非代码非编码RNA分析)的新冠病毒感染数据集有19个。非编码RNA不会被翻译成蛋白质, 但它是病毒感染和抗病毒免疫反应的重要调节器, 参与调节新冠病毒感染及患病后的生物过程。在细胞因子风暴调节方面, Paniri 等^[21] 提出IL-6和NOD样受体热蛋白结构域相关蛋白3(NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3, NLRP3)炎症小体阻断药物对炎症反应、病毒清除以及病理和临床表现具有潜在影响。Vishnubalaji 等^[22] 发现, 应对新冠病毒感染时NHBE细胞中转移相关性肺腺癌转录本1(metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1, MALAT1)和核富集丰度转录本1(nuclear enriched abundant transcript 1, NEAT1)两种长链非编码RNA水平明显上调。Tang

等^[23] 对从中重度新冠病毒感染的红细胞衰竭患者全血中分离获得的非编码RNA和mRNA进行了转录组分析, 发现miR-146-146a-5p、miR-21-5p和miR-142-3p是新冠病毒感染的潜在治疗靶点。非编码RNA参与了新冠病毒感染的进展和驱动转录调控, 但较少应用于临床策略研究, 因此今后应进一步发掘其治疗应用价值。

3.5 提示细胞变化和失调与新冠病毒感染的严重程度相关

单细胞转录组学是一种在感染期间识别最关键细胞类型的工具, 可用于大规模细胞图谱构建、细胞类型鉴定及细胞亚群细化、结合临床病理学辅助疾病分型等。新冠病毒感染导致细胞调节失常, 这是决定疾病严重程度的关键因素。通过分析同一细胞类型中不同亚型的比例变化, 可以鉴定与新冠病毒感染最相关的细胞类型, 从而确定预防和治疗新冠病毒感染的潜在靶点。

Liao 等^[24] 基于单细胞转录组分析发现, 严重新冠病毒感染患者的支气管肺泡灌洗液中富含促炎单核细胞衍生的巨噬细胞。Zhang 等^[25] 利用新冠病毒感染受体的表达信息进行了细胞间通信分析和轨迹分析, 发现M1型巨噬细胞和重度新冠病毒感染患者之间的关系最密切。

Filbin 等^[26] 分析单细胞RNA测序数据集, 提出髓细胞、上皮细胞和T细胞之间的相互作用可驱动组织损伤, 中性粒细胞在免疫损伤和急性肺损伤的发展中发挥作用。Carlos 等^[27] 发现, 与新冠病毒感染患者不同临床表现相关的分子变化涉及中性粒细胞活化, 严重程度的转折点与S100A9等8个中性粒细胞特征基因有关。Schimke 等^[28] 也发现, 在重症监护室的新冠病毒感染患者中, 中性粒细胞被高度激活。

Utrero-Rico 等^[29] 研究了新鲜血液样本中的循环单核细胞, 证实循环单核淋巴细胞的变化可预测新冠病毒感染的严重程度。Yang 等^[30] 分析来自对照组和新冠病毒感染患者的额叶皮质和脉络丛样本的转录组, 观察到新冠病毒感染后出现广泛的细胞扰动和外周T细胞浸润, 表明新冠病毒感染患者的脑和脉络丛细胞功能失调。需要指出, 目前的单细胞测序费用昂贵, 且存在假阴性, 下游的统计和计算分析比较复杂, 因此该方法具有一定局限性。但笔者推测, 随着单细胞测序成本降低以及相应的分析技术发展, 这项转录组检测方法将不断完善, 发挥出更大的作用。

4 新冠病毒感染不同物种的比较医学分析

4.1 病毒感染性差异

动物模型是研究疾病的重要工具，应根据研究目的和对象的不同使用合适的实验动物。国家动物模型资源共享信息平台（<https://www.namri.cn>）是由科技部指定中国医学科学院医学实验动物研究所建立的一个数据量庞大、信息全面的国家平台，广泛收录了国内外的动物模型等资源及相关信息^[31]。本研究使用国家

动物模型资源共享信息平台整理汇总常见的新冠病毒感染动物模型信息，比较不同物种的新冠病毒感染性差异，并在GEO数据库检索得到该物种相应的数据集数量，结果见表2。小鼠、仓鼠、雪貂、猴、水貂等为新冠病毒易感动物，其中恒河猴和食蟹猴与人的感染特征高度相似，可用于评价新冠疫苗免疫原性和保护效果。易感动物感染后普遍出现呼吸道症状和体重减轻的情况，仓鼠感染后还表现出肠道炎症等消化道症状，且在转录组数据集较为丰富，存在数据挖掘空间。

表2 不同物种的新冠病毒感染性差异
Table 2 Infectious differences of SARS-CoV-2 in different species

物种 Species	常用品种/品系 Breeds/ strains in common use	感染滴度或 剂量 Infection titer or dose	感染途径 Routes of infection	用途 Applications	优点 Advantages	缺点 Disadvantages	GEO数据 集数量 Number of GEO datasets
小鼠 Mice	hACE2转基因 小鼠	1×10 ⁵ TCID ₅₀	滴鼻	致病机制研究，疫苗 和药物评估	方便，便宜	耗时	21
小鼠 Mice	K18-hACE2小鼠	1×10 ² TCID ₅₀	滴鼻	致病机制研究，疫苗 和药物评估	方便，便宜	非致死模型	9
小鼠 Mice	hACE2-KI人源 化小鼠	4×10 ⁵ PFU	滴鼻	病毒感染抗体评价， 疫苗评价	方便，便宜	非致死模型	-
仓鼠 Hamsters	金黄地鼠	8×10 ⁴ TCID ₅₀	滴鼻	致病机制研究，疫苗 和药物评估	便宜，有消化系 统症状	操作不如小鼠方便，病 毒7 d清除，不致死	41
雪貂 Ferrets	-	1×10 ⁵ PFU	滴鼻	致病机制研究，疫苗 和药物评估	能通过直接接触 和气溶胶感染	检测不如小鼠经济	5
猴 Monkeys	恒河猴	1×10 ⁶ TCID ₅₀	经气管感染	致病机制研究，疫苗 和药物评估	与人类高度相似	价格昂贵	25
猴 Monkeys	食蟹猴	1×10 ⁶ PFU	气管、鼻腔、黏膜 联合感染	评价新冠药物与疫苗	与人类高度相似	价格昂贵	8
水貂 Minks	-	1×10 ⁶ TCID ₅₀	经气管感染	临床病理机制阐述， 药物和疫苗评价， 生物标志物筛选	与人类症状较为 相似	应用少，相关试剂较少	-
树鼩 Tree shrews	-	1×10 ⁷ TCID ₅₀	口、气管、眼联合 感染	药物筛选和疫苗评估	便宜，与灵长类 相似	没有纯遗传背景的品 系，个体差异较大	-

注：TCID₅₀，半数组织培养感染剂量；PFU，空斑形成单位。
Note: TCID₅₀, tissue culture infective dose 50% ; PFU, plaque forming unit.

4.2 病毒致病性差异

动物模型能够在一定程度上模拟新冠病毒感染症状，然而病毒在不同动物之间存在致病性差异。分析比较病毒的致病性差异有助于模型的选择，从而更充分地发挥实验动物的作用。本研究将人与实验动物的新冠病毒致病性差异情况进行了梳理，结果见表3。新冠病毒在hACE2转基因小鼠、仓鼠、雪貂、水貂和恒

河猴中的复制与人类的亚临床感染类似，复制部位以肺、气管等呼吸系统的器官为主，也在仓鼠和雪貂的肠道及水貂的耳部进行复制。各物种病理变化涵盖肺炎、急性呼吸窘迫综合征、弥漫性肺泡损伤等不同程度的呼吸道损伤。新冠病毒感染的仓鼠能够产生中和抗体，并保护其免受再次感染，可用于相关免疫应答研究。

表3 不同物种的新冠病毒致病性差异

Table 3 Pathogenic differences of SARS-CoV-2 infection in different species

物种 Species	病毒复制部位 Virus replication site	病理变化 Pathological change	免疫应答 Immune response	参考文献 References
人类 Human	主要在呼吸道和肠道	肺炎,急性呼吸窘迫综合征	产生针对S和N蛋白以及RBD的IgG抗体	[32]
小鼠(hACE2转基因小鼠) Mice(hACE2 transgenic mice)	肺	间质性肺炎	产生抗S蛋白的特异性抗体	[33]
仓鼠 Hamsters	肺、鼻甲、气管、肠道	肺炎,弥漫性肺泡损伤	中和抗体反应,IFN-R、IL-4、IL-6、TNF-α、IL-12p40上调中和抗体反应	[34]
雪貂 Ferrets	鼻甲、气管、肺、肠道	毛细支气管炎	-	[35]
水貂 Minks	鼻腔、直肠、耳	间质性肺炎,血管周炎,细支气管周炎,鼻黏膜损伤	-	[36]
恒河猴 Rhesus monkey	肺、气管、支气管	间质性肺炎	白细胞和中性粒细胞减少,淋巴细胞增加	[37]

注: RBD, 受体结合区域; IFN-R, 干扰素受体; IL-4, 白细胞介素4; IL-6, 白细胞介素6; TNF-α, 肿瘤坏死因子-α; IL-12p40, 白细胞介素 IL-12/P40。
Note: RBD, receptor-binding domain; IFN-R, interferon receptor; IL-4, interleukin-4; IL-6, interleukin-6; TNF-α, tumor necrosis -α; IL-12/P40, Interleukin 12 P40.

4.3 新冠病毒感染的比较转录组数据

COVID-CED (<https://covid.com-med.org.cn/#/>) 是一个基于公共数据库中冠状病毒感染动物模型相关开放数据集的比较转录组数据库^[38]。COVID-CED 对不同平台的测序数据进行质控、标准化、去除批次效应, 能够实现跨平台、跨物种的数据分析, 比较不同物种、毒株、剂量、时间点的表达差异。COVID-CED 目前收录了115个摘自GEO数据库的新冠病毒感染样本, 按类别和内容整理见表4。

在比较医学分析中, 本研究梳理了病毒感染和致病性在人和不同动物之间的差异。根据不同的研究目的, 比较医学分析能够为选用合适的动物模型提供支撑。然而, 新冠病毒感染转录组学鲜少应用于比较医学的分析研究。由于不同数据集间存在批次效应, 且需要消除自身对照的影响, 跨物种、跨毒株等比较转录组分析较为复杂。现有研究缺乏整合转录组数据集的比较分析结果, 在比较医学方面存在着很大的挖掘空间。未来, 人们可以运用转录组分析来更全面地研究新冠病毒感染不同物种的比较医学差异。

5 总结

已知转录组的应用与研究存在一定挑战, 需要考虑样本类型、数量及制定数据分析计划以减少批次影响。不过随着转录组技术的迅速发展, 成本逐渐降低, 应用也更加广泛深入。此外, 在数据库和在线平台中

表4 有关冠状病毒感染动物模型的COVID-CED数据整理

Table 4 Data collation of COVID-CED related to SARS-CoV-2 infectious animal model

类别 Category	内容 Content	数量 Number
物种 Species	人、雪貂	2
病毒亚型 Virus subtypes	野生型、USA-WA1型	2
细胞/组织类型 Tissue/ cell types	肺、气管、鼻腔, 肺癌 Calu3、A549、A549_oeACE2、H1299 细胞, 结肠直肠癌 Caco2 细胞, 正常人类支气管上皮细胞	9
时间点 Time point	4 h、8 h、12 h、24 h、36 h、72 h、7 d、14 d	8
感染剂量 Infection dose	0 MOI、0.2 MOI、0.3 MOI、2 MOI、 5×10 ⁴ PFU	5
数据集编号 Dataset number	GSE147507、GSE148729	2

注: USA-WA1, 一种新冠原始毒株; MOI, 病毒感染复数; PFU, 空斑形成单位。

Note: USA-WA1, an original strain of COVID-19 virus; MOI, multiplicity of infection; PFU, plaque forming unit.

储存了大量的开放访问数据, 已挖掘发表的数据也可从不同角度进行分析。而且转录组技术还能够与其他组学技术相结合, 形成新的探究复杂疾病的系统方法。因此, 转录组数据挖掘和分析的潜力巨大, 在揭示疾病发生发展过程及研究治疗对策中有重要价值。

本文分析了各数据库中新冠病毒感染转录组数据,对新冠病毒感染转录组学做了全面的解读。新冠病毒感染转录组数据样本来源以患者为主,感染组织类别大多定位在呼吸系统和神经系统。本研究围绕不同方面进行转录组分析,探讨了其临床意义,同时引入新冠病毒感染不同物种的比较转录组学分析,提示转录组学在比较医学中的潜在应用价值。

本文还分析了新冠病毒感染单细胞的转录组学数据,可用于不同细胞类型的差异基因、通路富集、时序分析、细胞通信分析等,探索各类细胞在疾病中的功能、状态和相互作用。使用单细胞转录组数据可解释 SARS-CoV-2 引起的免疫功能障碍,有助于深入理解新冠病毒感染机制,并开展进一步的预防、精确治疗和预后预测的研究。

新冠病毒感染是现代历史上最具破坏性的传染病之一,对人类生活的各个方面都产生了严重影响。自从新冠病毒感染爆发以来,人们不断尝试开发新的抗病毒药物或治疗策略。新冠病毒感染转录组数据分析为选择药物和疗法提供了建议和验证,尤其在阐明新冠病毒感染免疫特征和动态变化等方面具有突出优势。例如 Ren 等^[39]基于单细胞 RNA 测序创建拥有 146 万个细胞的综合免疫景观,确定了不同的外周免疫亚型变化与不同的临床特征(年龄、性别、严重程度等)有关。Meckiff 等^[40]首次开展免疫细胞应对新冠病毒感染的反应研究,发现新冠病毒感染严重患者产生了新的 T 细胞亚群,该亚群杀死 B 细胞并减少抗体产生。这些重大发现为新冠病毒感染研究提供了新的视角。

同类转录组数据分析从其他疾病入手,如自身免疫病^[41]、心血管疾病^[42]和哮喘^[43]等,大多以转录组的疾病诊断和预后意义为侧重点,部分研究仅关注单细胞转录组学。本文亮点在于整理了新冠病毒感染转录组数据资源与基于转录组的临床研究发现,并将二者关联,同时从比较医学角度提出转录组的潜在应用价值。本文整理了现有新冠病毒感染转录组数据的分布情况,从疾病表型、生物标志物、分子驱动因素等方面多维度分析转录组数据的临床意义,还将转录组数据研究和比较医学分析联系起来。笔者认为新冠病毒感染转录组数据的应用还可以在比较医学方面进一步拓展,例如对不同物种的转录组数据进行分析比较,将新冠病毒感染与其他病毒感染转录组进行比较,从而对新冠病毒感染的比较医学差异进行更深入的挖掘。目前鲜有新冠病毒感染的比较转录组研究,该方

面内容亟需被填补。

[作者贡献 Author Contribution]

冯婷婷构建文章主体框架,撰写初稿并修改;
李依桐查找及筛选相关文献;
吴玥和王珏参与数据整理分析;
孔琪审核、修改文章主体框架,审核、修改文稿。

[利益声明 Declaration of Interest]

所有作者均声明本文不存在利益冲突。

[参考文献 References]

- [1] LOWE R, SHIRLEY N, BLEACKLEY M, et al. Transcriptomics technologies[J]. PLoS Comput Biol, 2017, 13(5): e1005457. DOI: 10.1371/journal.pcbi.1005457.
- [2] 国家卫生健康委. «关于对新型冠状病毒感染实施"乙类乙管"的总体方案»解读问答[A/OL]. 2022-12-27[2023-10-01]. https://www.gov.cn/zhengce/2022-12/27/content_5733743.htm. National Health Commission of the People's Republic of China. Questions and answers on "overall plan of implementing 'class B management' for novel coronavirus infection"[J]. [A/OL]. 2022-12-27[2023-10-01]. https://www.gov.cn/zhengce/2022-12/27/content_5733743.htm.
- [3] JHA P K, VIJAY A, HALU A, et al. Gene expression profiling reveals the shared and distinct transcriptional signatures in human lung epithelial cells infected with SARS-CoV-2, MERS-CoV, or SARS-CoV: potential implications in cardiovascular complications of COVID-19[J]. Front Cardiovasc Med, 2021, 7: 623012. DOI: 10.3389/fcvm.2020.623012.
- [4] CROSS A R, DE ANDREA C E, VILLALBA-ESPARZA M, et al. Spatial transcriptomic characterization of COVID-19 pneumonitis identifies immune circuits related to tissue injury[J]. JCI Insight, 2023, 8(2): e157837. DOI: 10.1172/jci.insight.157837.
- [5] HAMMOUDEH S M, HAMMOUDEH A M, BHAMIDIMARRI P M, et al. Insight into molecular mechanisms underlying hepatic dysfunction in severe COVID-19 patients using systems biology[J]. World J Gastroenterol, 2021, 27(21): 2850-2870. DOI: 10.3748/wjg.v27.i21.2850.
- [6] MITAMURA Y, SCHULZ D, ORO S, et al. Cutaneous and systemic hyperinflammation drives maculopapular drug exanthema in severely ill COVID-19 patients[J]. Allergy, 2022, 77(2): 595-608. DOI: 10.1111/all.14983.
- [7] HIRSCH J S, NG J H, ROSS D W, et al. Acute kidney injury in patients hospitalized with COVID-19[J]. Kidney Int, 2020, 98(1): 209-218. DOI: 10.1016/j.kint.2020.05.006.
- [8] ALEXANDER M P, MANGALAPARTHI K K, MADUGUNDU A K, et al. Acute kidney injury in severe COVID-19 has similarities to sepsis-associated kidney injury: a multi-omics study[J]. Mayo Clin Proc, 2021, 96(10): 2561-2575. DOI: 10.1016/j.mayocp.2021.07.001.
- [9] LONG B, BRADY W J, KOYFMAN A, et al. Cardiovascular complications in COVID-19[J]. Am J Emerg Med, 2020, 38(7): 1504-1507. DOI: 10.1016/j.ajem.2020.04.048.

- [10] WISCOVITCH-RUSSO R, IBÁÑEZ-PRADA E D, SERRANO-MAYORGA C C, et al. Major adverse cardiovascular events are associated with necroptosis during severe COVID-19[J]. *Crit Care*, 2023, 27(1):155. DOI: 10.1186/s13054-023-04423-8.
- [11] CHEN X P, WU T, LI L G, et al. Transcriptional start site coverage analysis in plasma cell-free DNA reveals disease severity and tissue specificity of COVID-19 patients[J]. *Front Genet*, 2021, 12:663098. DOI: 10.3389/fgene.2021.663098.
- [12] GÓMEZ-CARBALLA A, RIVERO-CALLE I, PARDO-SECO J, et al. A multi-tissue study of immune gene expression profiling highlights the key role of the nasal epithelium in COVID-19 severity[J]. *Environ Res*, 2022, 210: 112890. DOI: 10.1016/j.envres.2022.112890.
- [13] KRISHNAMOORTHY P, RAJ A S, KUMAR H. Machine learning-driven blood transcriptome-based discovery of SARS-CoV-2 specific severity biomarkers[J]. *J Med Virol*, 2023, 95(2): e28488. DOI: 10.1002/jmv.28488.
- [14] CLANCY J, HOFFMANN C S, PICKETT B E. Transcriptomics secondary analysis of severe human infection with SARS-CoV-2 identifies gene expression changes and predicts three transcriptional biomarkers in leukocytes[J]. *Comput Struct Biotechnol J*, 2023, 21: 1403-1413. DOI: 10.1016/j.csbj.2023.02.003.
- [15] LIU Y, WU Y K, LIU B, et al. Biomarkers and immune repertoire metrics identified by peripheral blood transcriptomic sequencing reveal the pathogenesis of COVID-19[J]. *Front Immunol*, 2021, 12:677025. DOI: 10.3389/fimmu.2021.677025.
- [16] ASCHENBRENNER A C, MOUKTAROUDI M, KRÄMER B, et al. Disease severity-specific neutrophil signatures in blood transcriptomes stratify COVID-19 patients[J]. *Genome Med*, 2021, 13(1):7. DOI: 10.1186/s13073-020-00823-5.
- [17] ZHANG J Q, LIN D Z, LI K, et al. Transcriptome analysis of peripheral blood mononuclear cells reveals distinct immune response in asymptomatic and re-detectable positive COVID-19 patients[J]. *Front Immunol*, 2021, 12:716075. DOI: 10.3389/fimmu.2021.716075.
- [18] MUKHERJEE S, BANERJEE B, KARASIK D, et al. mRNA-lncRNA co-expression network analysis reveals the role of lncRNAs in immune dysfunction during severe SARS-CoV-2 infection[J]. *Viruses*, 2021, 13(3):402. DOI: 10.3390/v13030402.
- [19] KARAMI H, DERAKHSHANI A, GHASEMIGOL M, et al. Weighted gene co-expression network analysis combined with machine learning validation to identify key modules and hub genes associated with SARS-CoV-2 infection[J]. *J Clin Med*, 2021, 10(16):3567. DOI: 10.3390/jcm10163567.
- [20] HU R W, LIU C, YAN Y Y, et al. Identification of hub genes and molecular subtypes in COVID-19 based on WGCNA[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2021, 25(20): 6411-6424. DOI: 10.26355/eurrev_202110_27015.
- [21] PANIRI A, AKHAVAN-NIAKI H. Emerging role of IL-6 and NLRP3 inflammasome as potential therapeutic targets to combat COVID-19: role of lncRNAs in cytokine storm modulation[J]. *Life Sci*, 2020, 257: 118114. DOI: 10.1016/j.lfs.2020.118114.
- [22] VISHNUBALAJI R, SHAATH H, ALAJEZ N M. Protein coding and long noncoding RNA (lncRNA) transcriptional landscape in SARS-CoV-2 infected bronchial epithelial cells highlight a role for interferon and inflammatory response[J]. *Genes*, 2020, 11(7):760. DOI: 10.3390/genes11070760.
- [23] TANG H, GAO Y H, LI Z H, et al. The noncoding and coding transcriptional landscape of the peripheral immune response in patients with COVID-19[J]. *Clin Transl Med*, 2020, 10(6): e200. DOI: 10.1002/ctm2.200.
- [24] LIAO M F, LIU Y, YUAN J, et al. Single-cell landscape of bronchoalveolar immune cells in patients with COVID-19[J]. *Nat Med*, 2020, 26(6):842-844. DOI: 10.1038/s41591-020-0901-9.
- [25] ZHANG Z L, CUI F F, CAO C, et al. Single-cell RNA analysis reveals the potential risk of organ-specific cell types vulnerable to SARS-CoV-2 infections[J]. *Comput Biol Med*, 2021, 140:105092. DOI: 10.1016/j.compbimed.2021.105092.
- [26] FILBIN M R, MEHTA A, SCHNEIDER A M, et al. Longitudinal proteomic analysis of severe COVID-19 reveals survival-associated signatures, tissue-specific cell death, and cell-cell interactions[J]. *Cell Rep Med*, 2021, 2(5):100287. DOI: 10.1016/j.xcrm.2021.100287.
- [27] FUZO C A, FRAGA-SILVA T F C, MARUYAMA S R, et al. The turning point of COVID-19 severity is associated with a unique circulating neutrophil gene signature[J]. *Immunology*, 2023, 169(3):323-343. DOI: 10.1111/imm.13631.
- [28] SCHIMKE L F, MARQUES A H C, BAIOCCHI G C, et al. Severe COVID-19 shares a common neutrophil activation signature with other acute inflammatory states[J]. *Cells*, 2022, 11(5):847. DOI: 10.3390/cells11050847.
- [29] UTRERO-RICO A, GONZÁLEZ-CUADRADO C, CHIVITE-LACABA M, et al. Alterations in circulating monocytes predict COVID-19 severity and include chromatin modifications still detectable six months after recovery[J]. *Biomedicines*, 2021, 9(9): 1253. DOI: 10.3390/biomedicines9091253.
- [30] YANG A C, KERN F, LOSADA P M, et al. Publisher Correction: Dysregulation of brain and choroid plexus cell types in severe COVID-19[J]. *Nature*, 2021, 598(7882): E4. DOI: 10.1038/s41586-021-04080-3.
- [31] 吴玥, 薛婧, 魏强, 等. 国家动物模型资源共享信息平台的建立[J]. *中国实验动物学报*, 2022, 30(8): 1080-1086. DOI: 10.3969/j.issn.1005-4847.2022.08.009.
WU Y, XUE J, WEI Q, et al. Establishment of national infrastructure for an animal model resource platform[J]. *Acta Lab Animalis Sci Sin*, 2022, 30(8): 1080-1086. DOI: 10.3969/j.issn.1005-4847.2022.08.009.
- [32] ZHENG J X, DENG Y Y, ZHAO Z Y, et al. Characterization of SARS-CoV-2-specific humoral immunity and its potential applications and therapeutic prospects[J]. *Cell Mol Immunol*, 2022, 19(2):150-157. DOI: 10.1038/s41423-021-00774-w.
- [33] BAO L L, DENG W, HUANG B Y, et al. The pathogenicity of SARS-CoV-2 in hACE2 transgenic mice[J]. *Nature*, 2020, 583(7818):830-833. DOI: 10.1038/s41586-020-2312-y.
- [34] CHAN J F W, ZHANG A J, YUAN S F, et al. Simulation of the

- clinical and pathological manifestations of coronavirus disease 2019 (COVID-19) in a golden Syrian *Hamster* model: implications for disease pathogenesis and transmissibility[J]. Clin Infect Dis, 2020, 71(9): 2428-2446. DOI: 10.1093/cid/ciaa325.
- [35] KIM Y I, KIM S G, KIM S M, et al. Infection and rapid transmission of SARS-CoV-2 in ferrets[J]. Cell Host Microbe, 2020, 27(5):704-709.e2. DOI: 10.1016/j.chom.2020.03.023.
- [36] SHUAI L, ZHONG G X, YUAN Q, et al. Replication, pathogenicity, and transmission of SARS-CoV-2 in minks[J]. Natl Sci Rev, 2021, 8(3): nwaa291. DOI: 10.1093/nsr/nwaa291.
- [37] SHAN C, YAO Y F, YANG X L, et al. Infection with novel coronavirus (SARS-CoV-2) causes pneumonia in *Rhesus* macaques[J]. Cell Res, 2020, 30(8): 670-677. DOI: 10.1038/s41422-020-0364-z.
- [38] 吴玥, 向志光, 高蓓, 等. 冠状病毒感染动物模型比较转录组学数据库的建立[J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(1):92-99. DOI: 10.3969/j.issn.1005-4847.2022.01.012.
- WU Y, XIANG Z G, GAO R, et al. Establishment of a comparative transcriptomics database of coronavirus infected animal models[J]. Acta Lab Anim Sci Sinica, 2022, 30(1):92-99. DOI: 10.3969/j.issn.1005-4847.2022.01.012.
- [39] REN X W, WEN W, FAN X Y, et al. COVID-19 immune features revealed by a large-scale single-cell transcriptome atlas[J]. Cell, 2021, 184(7):1895-1913.e19. DOI: 10.1016/j.cell.2021.01.053.
- [40] MECKIFF B J, RAMÍREZ-SUÁSTEGUI C, FAJARDO V, et al. Imbalance of regulatory and cytotoxic SARS-CoV-2-reactive CD4+ T cells in COVID-19[J]. Cell, 2020, 183(5):1340-1353.e16. DOI: 10.1016/j.cell.2020.10.001.
- [41] NAGAFUCHI Y, YANAOKA H, FUJIO K. Lessons from transcriptome analysis of autoimmune diseases[J]. Front Immunol, 2022, 13:857269. DOI: 10.3389/fimmu.2022.857269.
- [42] ROBINSON E L, BAKER A H, BRITTAN M, et al. Dissecting the transcriptome in cardiovascular disease[J]. Cardiovasc Res, 2022, 118(4):1004-1019. DOI: 10.1093/cvr/cvab117.
- [43] PARK H W, WEISS S T. Understanding the molecular mechanisms of asthma through transcriptomics[J]. Allergy Asthma Immunol Res, 2020, 12(3): 399-411. DOI: 10.4168/aair.2020.12.3.399.
- (收稿日期:2023-06-16 修回日期:2023-10-13)
(本文编辑:张俊彦,富群华,丁宇菁,周培)

引用本文

冯婷婷, 李依桐, 吴玥, 等. 新冠病毒感染转录组学数据及比较医学分析[J]. 实验动物与比较医学, 2024, 44(1): 62-73. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2023.079.

FENG T T, LI Y T, WU Y, et al. Transcriptome data and comparative medical analysis of COVID-19 virus infection[J]. Lab Anim Comp Med, 2024, 44(1): 62-73. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2023.079.

《实验动物与比较医学》2024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和2023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

围绝经期综合征动物模型的制备方法及评价指标分析

梁天薇, 邓亚胜, 黄 慧, 荣 娜, 刘 鑫, 王玉洁, 林 江

(广西中医药大学基础医学院, 南宁 530200)

[摘要] **目的** 对已报道的围绝经期综合征(perimenopausal syndrome, PS)动物模型制备方法进行综合分析, 比较模型制备各要素和检测指标的优缺点, 为优化相关动物模型并规范其在新药疗效评价中的运用提供有益参考。**方法** 采用文献研究方法, 以“围绝经期综合征”和“perimenopausal syndrome”等为主题词, 在中国知网、万方数据、PubMed等数据库中检索2016年1月—2023年2月发表的与PS动物模型制备相关的文献, 按照纳入标准和排除标准筛选出符合PS动物模型制备的实验文献, 梳理文献中详细记载的实验动物品系、造模方法、给药时长、阳性药物、检测指标等相关信息。将上述信息统一进行标准化处理后, 利用Excel2010表格建立PS动物模型数据库, 系统归纳总结模型制备要素和评价指标, 并用Excel 2010软件进行统计学处理和分析。**结果** 共筛选出247篇文献。制备PS动物模型常选用SD大鼠(164次, 65.86%)和Wistar大鼠(35次, 14.06%)。造模方法常选择双侧卵巢摘除法(139次, 53.87%)和自然老化法(43次, 16.80%)。用于建模的大鼠年龄从7周龄~18月龄不等, 其中以3月龄大鼠(22次, 21.78%)最常用。关于检测指标, 大多采用血清生化、阴道脱落细胞涂片、组织形态学、一般情况观察、行为学观察以及脏器组织蛋白免疫印迹等多指标进行综合评价。检验模型是否成功制备常选用西医评价指标, 西医常用阴道脱落细胞涂片方法判定动情周期(125次, 85.04%), 待实验者观察到实验动物动情周期紊乱或不规则即可认为模型制备成功; 同时也有部分文献通过检测发现血清雌二醇含量明显降低来判定造模成功(5次, 3.04%)。中医证型评价常采用中西医评价指标相结合的方法进行综合评价, 实验者通过阴道脱落细胞涂片辅以一般情况观察判断中医证型(3次, 2.04%)。**结论** 目前已有的PS动物模型制备方法较多, 但相关研究在动物种属选择、动物年龄、造模成功标准、中医证型评价等方面仍存在较大差异。

[关键词] 围绝经期综合征; 动物模型; 制备方法; 评价指标

[中图分类号] R-332; Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2024)01-0074-11



Preparation Methods and Evaluation Criteria Analysis of Animal Models for Perimenopausal Syndrome

LIANG Tianwei, DENG Yasheng, HUANG Hui, RONG Na, LIU Xin, WANG Yujie, LIN Jiang

(School of Basic Medical Science, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, China)

Correspondence to: LIN Jiang (ORCID: 0009-0009-6182-2335), E-mail: 1713552545@qq.com

[ABSTRACT] **Objective** To comprehensively analyze the reported preparation methods for animal models of perimenopausal syndrome (PS), to compare the advantages and disadvantages of various preparation elements and detection indexes, so as to provide useful references for the optimization of the relevant animal models as well as the standardization of their application in the efficacy evaluation of new drugs. **Methods** In this paper, literature research methods were applied using "perimenopausal syndrome" as the subject term. The publication period of the literature was limited to January 2016 to February 2023. Relevant literature on the preparation of PS animal models was retrieved from databases such as China

[基金项目] 全国高校黄大年式教师团队——广西中医药大学中西医基础课程教师团队(教育部教师函[2022]2号); 广西名中医林江传承工作室(桂中医药科教发[2021]6号); 广西一流学科建设项目——广西中医药大学中医学(桂教科研[2022]1号); 广西中医药多学科交叉创新团队项目“中医药活性传承的广西海洋健康产业产品与装备创新团队”(GZKJ2302); 广西中医药大学国家级大学生创新创业训练计划项目(2022106000)

[第一作者] 梁天薇(1997—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 特色方剂配伍及成药化研究。E-mail: 1959494476@qq.com

[通信作者] 林 江(1963—), 女, 博士, 教授, 博士生导师, 全国第七批名老中医药专家学术经验继承工作指导老师, 研究方向: 方剂组方原理、临床应用及实验研究。E-mail: 1713552545@qq.com。ORCID: 0009-0009-6182-2335

National Knowledge Infrastructure, Wanfang database, and PubMed. After screening the experimental literature that met the inclusion and exclusion criteria, detailed information on experimental animal strains, modeling methods, duration of drug administration, positive drugs, detection indexes and other relevant information were collected. After the above information was standardized, the PS animal model database was established using Excel 2010 software. The model preparation elements and evaluation indexes were summarized systematically, and the statistical results were processed and analyzed using Excel 2010 software. **Results** A total of 247 articles were screened. SD rats (164 times, 65.86%) and Wistar rats (35 times, 14.06%) were often used to prepare PS animal models. Bilateral ovariectomy (139 times, 53.87%) and natural aging (43 times, 16.80%) were chosen as modeling methods. The ages of rats used for modeling ranged from 7 weeks to 18 months, with 3-month-old rats (22 times, 21.78%) being the most common. The detection indexes were comprehensively evaluated from multiple perspectives, including serum biochemistry, vaginal exfoliated cell smear, histomorphology, general observation, behavioral observation, and organ tissue protein immunoblotting. Western medical evaluation indexes were commonly used to test the successful preparation of models, with vaginal exfoliated cell smears being the most frequently used method (125 times, 85.04%). A model was considered successfully prepared when estrous cycle disorder or irregularity was observed. Some literature also determined modeling success by detecting a significant decrease in serum estradiol levels (5 times, 3.04%). Traditional Chinese medicine (TCM) syndrome evaluation often used a combination of Chinese and Western medical evaluation indexes for comprehensive evaluation, with researchers determining the TCM syndrome through vaginal exfoliated cell smears supplemented by general observation (3 times, 2.04%). **Conclusion** There are many methods for preparing PS animal models, but there are still significant differences in the selection of animal species, age, criteria for successful modeling, and TCM syndrome evaluation in the related literature.

[Key words] Perimenopausal syndrome; Animal model; Preparation method; Evaluation index

围绝经期综合征 (perimenopausal syndrome, PS) 又称更年期综合征, 是指女性在围绝经时期由于雌激素水平降低而出现的一系列精神心理疾患和身体症状^[1]。围绝经期是每个女性必经的关键时期。受工作压力、家庭因素等外界因素的影响, 近年来PS患者数量逐年上升。据资料显示, 每年健康女性中约有60%患有PS, 发病年龄从50~60岁不等, 病程长短不一, 最短为1年, 最长可达10年之久^[2]。由于大部分患者的发病时间较长, PS对正常工作和生活造成了严重的影响, 极大降低了患者的生活质量。因此, 临床上需要对该疾病及早发现和治疗, 从而促进PS患者的身心健康^[3]。

深入研究疾病的生理病理过程是治疗疾病的重要前提, 而建立具有重塑性高、与临床疾病特征相符且稳定的动物模型是进行药物作用机制研究和保证新药疗效及安全性的重要基础。本文从国内外各大数据库如中国知网 (CNKI)、万方、PubMed等整理了研究PS动物模型的相关文献, 筛选出应用范围较广的动物模型制备方法及其评价指标, 然后分析总结PS动物模型的制备方法和相关要素, 以期推动PS动物模型制备的

规范化进程, 促进临床药物联合应用和新药研发。

1 材料与方法

1.1 文献资料来源和检索方法

在中国知网 (CNKI)、万方数据、PubMed数据库收集近7年关于PS动物模型的文献。在中国知网和万方平台以“围绝经期综合征”或“更年期综合征”或“绝经综合征”或“围绝经期”或“更年期”或“去卵巢”和“动物模型”或“鼠”或“兔”或“猴”或“犬”或“羊”为主题词, 在PubMed数据库以“perimenopausal syndrome” or “menopausal syndrome” or “climacteric syndrome” and “animal model” or “rat” or “mice” or “mouse” or “rabbit” or “monkey” or “dog” or “sheep”等为主题词进行检索。文献发表时间均限制在2016年1月1日至2023年2月28日。

1.2 文献纳入和排除标准

文献纳入标准: (1) 关于PS动物模型的实验性文献; (2) 造模时间明确、评价指标清楚且检测指标信息完整的文献。排除标准: (1) 合并有其他疾病或者

症状的文献；(2) 体外实验；(3) 毕业论文、会议论文及综述等类型文献；(4) 重复文献；(5) 无法获取全文的文献。

1.3 数据资料整理和统计

将文献中包含动物种属、造模方法、阳性药、检测指标等的信息录入 Excel 2010 软件，建立 PS 动物模型数据库。实验动物种类、命名均参照《实验动物和动物实验技术》^[4] 进行规范化处理，然后归纳总结纳入文献中 PS 动物模型的制备要素及评价指标。使用 Microsoft Excel 2010 软件进行结果整理和统计分析。

2 结果

2.1 动物选择

本次研究中共纳入文献 247 篇，其中中文 136 篇，英文 113 篇。经统计，有 2 篇文献同时用了 2 种动物，实验动物总使用频次为 249；其中使用频率≥20 的动物分别是 SD 大鼠（164 次，占比 65.86%）、Wistar 大鼠（35 次，占比 14.06%）和 ICR 小鼠（20 次，占比 8.03%），具体见表 1。

2.2 造模方法

对 247 篇纳入文献中的造模方法进行规范处理，经统计分析发现，有 5 篇文献采用 2 种方法造模，有 2 篇采用 3 种方法制备模型，造模方法共计 256 次。根据造模原理区分，主要有卵巢去势法、自然老化法、化学药物法、环境化学物质四大类；在此基础上加入各种因素，制备复合模型和病证结合模型。将所涉及的实验模型进行统计分类后筛选出 20 种造模方法，其中使用频率排名前三的分别是双侧卵巢摘除手术法（139 次，占比 53.87%）、自然老化法（43 次，占比 16.66%）和双侧卵巢摘除手术联合慢性不可预知刺激法（15 次，占比 5.81%），详见表 2。

2.3 月龄选择

2.3.1 卵巢摘除法动物月龄选择

由表 1 和表 2 可知，在动物种类选择上偏向于用鼠类，造模方法中卵巢去势法占比最多。但进一步分析发现，PS 造模时对动物年龄的选择存在较大差异。故将文献中标明使用鼠类动物的年龄进行分类统计（同一篇中使用多个年龄则分别计入），发现大鼠不同月龄（周龄）选择有 33 种，累计 101 次；小鼠不同月龄（周龄）选择则为 14 种，累计 21 次。将动物月（周）龄使用频次为 1 的数据排除后得到表 3，应用最多的是 3 月龄大鼠。

表 1 围绝经期综合征模型的动物使用情况分布

Table 1 Distribution of animal usage of PS models

动物 Animals	使用频次/次 Frequency/time	百分比/% Percentage/%
SD 大鼠 Sprague-Dawley rats	164	65.86
Wistar 大鼠 Wistar rats	35	14.06
ICR 小鼠 ICR mice	20	8.03
C57BL/6 小鼠 C57BL/6 mice	9	3.62
KM 小鼠 KM mice	7	2.81
C57BL/6N 小鼠 C57BL/6N mice	3	1.21
C57BL/6J 小鼠 C57BL/6J mice	3	1.21
BALB/c 小鼠 BALB/c mice	2	0.80
基因敲除小鼠 Knockout mice	2	0.80
ddY 小鼠 ddY mice	1	0.40
Fischer-344-CDF 大鼠 Fischer-344-CDF rats	1	0.40
褐家鼠 <i>Rattus norvegicus</i>	1	0.40
狨猴 Marmosets	1	0.40

2.3.2 自然老化法动物月龄选择

由表 2 可知，自然老化法是使用频次排列第二的造模方法。对该造模方法中明确动物月龄的文献进行统计，结果发现大鼠在月龄选择上有 19 种，涵盖的月龄从 10~18 月不等，使用频次共 50 次；小鼠则有 6 种，使用频次共 11 次。将使用频次为 1 的数据排除后得到表 4，从表中可知采用自然老化法建模时多选择 12 月龄左右的大鼠。

2.4 阳性对照药物

将 247 篇归纳文献进行统计后发现，动物实验采用阳性药物做比对的文献累计 141 篇，占比 59.84%；有 28 篇文献涉及 2 种阳性药物，2 篇文献采用 3 种阳性药物，故阳性药物使用总频次为 173 次。其中使用最多的阳性药物为戊酸雌二醇（54 次，占比 31.21%）、雌二醇（17.34%，占比 30 次）和更年安片（14 次，8.09%）。阳性对照药物使用频次及百分比详见表 5。

表2 围绝经期综合征动物模型造模方法分布

Table 2 Distribution of modeling methods for perimenopausal syndrome animal models

造模因素 Modeling factors	造模方法 Modelling method	频数/次 Frequency/time	百分比/% Percentage/%
卵巢去势 Ovariectomy	双侧卵巢摘除术	139	54.30
	一侧完全摘除, 另一侧摘除80%	4	1.56
	一侧完全摘除, 另一侧摘除50%	2	0.78
	一侧完全摘除, 另一侧摘除20%	1	0.39
自然老化 Natural aging method	自然老化法	43	16.80
环境化学物质 Environmental chemicals	注射4-二氧化乙烯基环己烯(VCD)	11	4.30
化学药物 Chemical drugs	超促排卵药物	4	1.56
	卵巢注射无水乙醇	2	0.78
	灌服雷公藤多苷片	1	0.39
复合因素 Compounding factors	双侧卵巢摘除术联合慢性束缚法	1	0.39
	双侧卵巢摘除术联合慢性不可预知刺激	10	3.91
	双侧卵巢摘除术联合电刺激	2	0.78
	双侧卵巢摘除术加高脂饮食	1	0.39
	双侧卵巢摘除术联合CO ₂ 刺激	1	0.39
	双侧卵巢摘除术加睡眠剥夺	1	0.39
	注射VCD联合慢性束缚法	2	0.78
病证结合 Disease-syndrome combination	自然老化加注射氢化可的松	13	5.08
	自然老化联合慢性束缚刺激	8	3.13
	双侧卵巢摘除术加灌服热性中药	5	1.95
	双侧卵巢摘除术联合慢性不可预知刺激	5	1.95

表3 卵巢摘除法建立围绝经期综合征动物模型的动物年龄分布

Table 3 Distribution of animal age in ovariectomy-induced perimenopausal syndrome animal model

动物 Animals	年龄 Age	频数/次 Frequency/ time	百分比/% Percentage/%
大鼠 Rat	6周龄	5	4.95
	7周龄	4	3.96
	6~8周龄	3	2.97
	8周龄	11	10.89
	8~10周龄	2	1.98
	10周龄	6	5.94
	11周龄	2	1.98
	12周龄	9	8.92
	2月龄	5	4.95
	2~3月龄	2	1.98
	3月龄	22	21.78
	3~4月龄	2	1.98
	4月龄	5	4.95
	6月龄	4	3.96
小鼠 Mouse	7周龄	2	9.53
	8周龄	7	33.33

表4 自然老化法建立围绝经期综合征动物模型的动物月龄分布

Table 4 Distribution of animal age in perimenopausal syndrome animal model established by natural aging method

动物 Animals	月龄 Months of age	频数/次 Frequency/time	百分比/% Percentage/%
大鼠 Rat	10~12	4	8.00
	11	2	4.00
	11~12	5	10.00
	12	9	18.00
	11~14	3	6.00
	13	6	12.00
	12~14	3	6.00
	14	2	4.00
	13~15	2	4.00
	11~15	2	4.00
	12~13	2	4.00
	13~16	2	4.00
	16	2	4.00
小鼠 Mouse	11	4	36.36
	12	4	36.36

表5 围绝经期综合征动物模型建立时阳性对照药物使用频数分布

Table 5 Frequency distribution of positive control drugs used in the establishment of perimenopausal syndrome animal model

阳性对照药物 Positive control drugs	频数/次 Frequency/ time	百分比/% Percentage/%
戊酸雌二醇 Estradiol valerate tablets	54	31.21
雌激素 Estrogen	30	17.92
更年安片 Gengnianan tablet	14	8.09
替勃龙 Tibolone	12	6.93
结合雌激素 Conjugated equine estrogen	7	4.05
己烯雌酚 Diethylstilbestrol	6	3.47
坤宝丸 Kunbao pill	6	3.47
教材方 Teaching materials	5	2.88
大豆异黄酮 Soybean isoflavones	5	2.88
右归丸 Yougui Pill	4	2.31
尼尔雌醇 Nilestriol	3	1.73
坤泰胶囊 Kuntai Capsule	3	1.73
莉芙敏 Remifemin	3	1.73
苯甲酸雌二醇 Estradiol benzoate	2	1.16
17 α -乙炔雌二醇 17 α -Ethinyl oestradiol	2	1.16
染料木黄酮 Genistein	2	1.16
六味地黄丸 Liuwei Dihuang Pills	2	1.16
地西洋 Diazepam	2	1.16
静心口服液 Jingxin oral liquid	1	0.58
红三叶草提取物 Red clover dry extracts	1	0.58
雷洛昔芬 Raloxifen	1	0.58
黄芪精口服液 Milkvetch root oral liquids	1	0.58
滋肾养阴汤 Zishen yangyin decoction	1	0.58
市售蜂蜜 Commercially available honey	1	0.58
柴胡疏肝散 Chaihu Shugan Powder	1	0.58
左归丸 Zougui Pill	1	0.58
更年欣胶囊 Gengnianxin capsule	1	0.58
更年乐片 Gengnianle tablet	1	0.58

2.5 检测指标

将247篇文献中PS动物模型检测指标进行统一规范分类，如遇到同一组织检测方法不同，则分开计算；若同一检测方法检测不同指标，如检测血清的促黄体生成素（luteinizing hormone，LH）、促卵泡生成激素（follicle stimulating hormone，FSH）、5-羟色胺（5-hydroxytryptamine，5-HT）含量，则归纳为一类^[5]。对检测指标进行归纳整理后，选取频次≥5的检测指标见表6，其中血清生化指标应用频率最高（190次，占比19.09%），其次是阴道脱落细胞涂片检查（140次，占比14.07%）。

表6 围绝经期综合征动物模型建立后的高频检测指标分布
Table 6 Distribution of high frequency detection indexes in perimenopausal syndrome animal models

高频检测指标 High frequency detection indexes	频数/次 Frequency/time	百分比/% Percentage/%
血清生化指标 Serum biochemical indicators	190	19.09
阴道脱落细胞涂片 Shed cell of vaginal smears	140	14.07
脏器形态学观察 Morphology observation of organs	92	9.24
一般情况(体重、饮水量、外观、活动等) General condition (weight, water intake, appearance, activity, etc.)	84	8.44
行为学观察 Behavioral observation	68	6.83
脏器免疫组化 Immunohistochemistry	56	5.62
脏器组织蛋白质印迹 Western blotting	54	5.42
实时定量PCR检测相关mRNA表达 Real-time quantitative PCR of mRNA expression	54	5.42
脏器湿重 Organ wet weight	51	5.12
脏器指数(系数) Visceral index (factor)	50	5.02
脏器组织匀浆生化 Biochemicals of organ tissue homogenates	42	4.22
尾部皮肤和肛门温度 Tail skin and rectal temperature	21	2.11
CT扫描骨形态计量学参数 Bone histomorphometric parameters by CT scan	12	1.20
TUNEL染色检测脏器细胞凋亡 TUNEL staining of organ cell apoptosis	11	1.10
免疫荧光法检测相关蛋白分布 Immunofluorescence assay for protein distribution	9	0.90
戊巴比妥钠睡眠试验 Pentobarbital sodium sleep test	7	0.70
代谢组学 Metabolomics	6	0.60
肠道菌群 Intestinal flora	5	0.50
X线测骨密度 Bone density measured by X-Ray	5	0.50
原位杂交法检测相关mRNA表达 In situ hybridization of mRNA expression	5	0.50

2.6 造模成功评价指标

2.6.1 西医评价指标

通过整理文献发现, 仅有 147 篇涉及模型评价指标检测, 其中大部分文献均以观察阴道脱落细胞涂片发现动情周期紊乱或不规则作为 PS 造模成功标准 (125 次, 占比 85.04%), 另外有 3.4% (5 次) 的研究将检测血清雌二醇 (estradiol, E₂) 水平较正常明显降低 (< 20 ng/mL、< 100 pg/mL) 作为判断造模成功的标准, 见表 7。

表 7 围绝经期综合征动物模型建立成功的西医评价指标分布
Table 7 Distribution of evaluation indexes for successful establishment of perimenopausal syndrome animal models in Western medicine

西医评价指标 Western medicine evaluation indexes	频数/次 Frequency/ time	百分比/% Percentage / %
阴道脱落细胞涂片 Shed cell of vaginal smears	125	85.04
阴道脱落细胞涂片+血清雌二醇 Shed cell of vaginal smears and estradiol	5	3.40
血清雌二醇 Serum estradiol	5	3.40
行为学+一般情况 Behavioral and general condition	1	0.68
阴道脱落细胞涂片+行为学 Shed cell of vaginal smears and behavioral observations	5	3.40
阴道脱落细胞涂片+一般情况 Shed cell of vaginal smears and general condition	3	2.04
阴道电阻法 Vaginal electrical resistance method	1	0.68
尾部皮肤和肛门温度 Tail skin and anal temperature	1	0.68
阴道脱落细胞涂片+肛温 Shed cell of vaginal smears and anal temperature	1	0.68

2.6.2 中医评价指标

现有文献中针对病证结合模型的研究较少, 仅有少数研究者通过灌服热性中药使大鼠出现舌红、肛温上升以及饮水量增加等表现时判定为阴虚内热证 [6-7]; 或者通过注射氢化可的松诱导大鼠出现精神萎靡、怕冷、反应迟钝等符合中医肾阳虚的证候表现 [8], 再联合双侧卵巢摘除术或自然老化法构建阴虚内热证或肾

阳虚证 PS 动物模型。另外也有部分研究者采用行为学实验对肝郁证 PS 动物模型进行评分, 合格则视为造模成功 [9]。

2.7 PS 患者与动物模型的疾病特征和检测指标比较

为了评价动物模型的病理特征是否与 PS 患者的临床症状相符, 笔者参照《妇产科学 (第九版)》中 PS 患者的具体临床表现和检测指标 [10], 比较分析了 PS 患者与各类 PS 动物模型在主要病理特征和检测指标等方面的异同点, 整理汇总见表 8。

3 讨论

3.1 实验动物选择

经过对文献的归纳和分析, 发现目前大部分研究者选择用于模型制备的动物种类主要是鼠类, 也有一篇文献采用绒猴进行造模 [11]。选取鼠类作为主要造模动物的原因在于繁殖周期稳定, 且饲养成本低。此次研究中还发现大部分文献使用 SD 大鼠和 Wistar 大鼠制备动物模型, 可能与这两类大鼠的海马区含有丰富的脑神经细胞, 记忆和学习能力受外界因素影响较大, 更有利于观察相关症状有关 [12]。

3.2 造模方法选择

PS 动物模型制备方法较多, 通过对造模方法整理分析发现, 双侧卵巢摘除术和自然老化法使用频率较高, 在此基础上加入各种干预方法形成复合模型或者病证结合模型。大部分研究选用卵巢摘除手术法, 其原理是用手术方法摘除卵巢, 人为模拟人类在围绝经期时性激素水平失衡的特点, 可直观地体现雌激素撤退后对全身各系统的影响, 更能反映该病的特点, 是最基础的 PS 模型造模方法之一。据资料显示, 卵巢摘除手术法与自然老化法均能反映 PS 的性激素水平变化特点 [13-14]。卵巢摘除手术的实验周期短, 对实验鼠的月龄要求不高, 故大部分研究者选择此法进行造模。由于实验鼠在卵巢摘除后体内的雌激素极度匮乏, 缺失人类围绝经期卵巢功能衰退的渐变过程, 不符合自然状态下的人类围绝经期变化特点 [15], 因此也有部分研究者采用部分卵巢切除法 [16-17] 或自然老化法 [18-19]。自然老化法是选取 12 月龄左右的自然衰老动物, 经阴道脱落细胞涂片评价为合格的动物即被选为 PS 动物。自然老化法在激素水平变化方面比卵巢摘除手术法更显著 [20], 造模过程相对简单, 而且还能有效避免手术风险和药物的毒性作用和不良反应, 是部分研究者的

表8 围绝经期综合征患者与动物模型的疾病特征和检测指标比较

Table 8 Comparison of disease characteristics and detection indexes between perimenopausal syndrome patients and model animals

分类 Categories	PS患者 PS patients	PS模型动物 PS animals
临床表现 Clinical manifestation	同:均可出现情绪抑郁或急躁不安、失眠等精神神经症状和毛发稀疏脱落等表现	
病理学观察 Pathological observations	异:涉及多系统病变,症状复杂,如同时出现潮热汗出、失眠等症状	异:症状不如人类明显,部分症状无法直接观察,如排尿困难、潮热汗出等,需通过检测相关指标来判断
生化指标 Biochemical indexes	同:均检测阴道脱落细胞涂片	异:暂无相关研究
影像学检查 Imaging examination	异:均出现激素水平异常,如促黄体生成素(luteinizing hormone, LH)、促卵泡激素(follicle stimulating hormone, FSH)升高,雌二醇(estradiol, E ₂)、5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)降低	异:可见脏器有不同程度萎缩,部分细胞数量减少
	异:大部分仅检查血清性激素水平,即LH、FSH升高, E ₂ 降低,绝经后FSH > 40 U/L,且E ₂ < 10 ~ 20 pg/mL提示卵巢功能衰竭	异:检测指标较人类多,增加性激素、神经递质、炎症因子等指标,如造模后动物体内的多巴胺(dopamine, DA)、白细胞介素-2(interleukin-2, IL-2)水平降低,促性腺激素释放激素(gonadotropin-releasing hormone, GnRH)升高
	同:CT或X线检查均可发现骨小梁稀疏,骨密度下降	
	异:大部分仅通过CT或X线检查发现骨密度下降和骨小梁稀疏	异:部分实验采用X线检查发现骨小梁稀发且结构紊乱;CT检查发现骨形态计量学参数减低;电镜检查发现下丘脑线粒体和内质网损伤等

首选方法。也有少数研究者选用环境污染物4-乙烯基环己烯(4-vinylcyclohexene diepoxide, VCD)损害卵巢功能^[21-22],或者用超促排卵药^[23-24]促使卵巢功能衰竭来进行PS造模,但上述两种方法对给药剂量和给药时间较难把握,尚无统一的标准用量,故不常被选用。

在制备复合模型过程中,大部分文献选择双侧卵巢摘除手术联合慢性不可预知刺激和自然老化联合慢性束缚刺激的方法制备动物模型。此外,多数研究者从病因发展过程出发,在双侧卵巢摘除或自然衰老的基础上,采取加入外部刺激的方式模拟PS女性患者受到的社会压力或刺激的特点,建立围绝经期精神神经症状模型^[25-26]。由于以上造模方法要求实验者在造模过程中严格观察大鼠的一般状态和控制造模因素,增加了造模难度,因此只有部分研究者采用此类方法。与此同时,部分研究者在造模过程中模糊了疾病与症状之间的概念,PS精神神经症状可表现情绪抑郁,在造模过程中易与围绝经期抑郁症混淆。故笔者认为,造模过程中的病症区分将是后续研究的主要方向之一。另外在病证结合方面,研究者可通过采取灌服热性中药或者注射氢化可的松的方式制备出符合中医证候特点的病证结合模型,该模型的成功制备有助于从病证层面探讨中医药治疗PS的作用机制。但在本次文献统计中发现,大多数文献对中医证型的判断仅仅通过实验者的主观评定,缺乏证候评分。故笔者建议,后续

研究者可采取建立证候评分表的方法来确认PS动物的中医证型。

3.3 动物年龄选择

由表3和表4可知,大部分文献选择3月龄成年大鼠和8周龄小鼠作为双侧卵巢切除术的实验对象。有资料显示该年龄大鼠或小鼠进入成熟期,性周期处于稳定状态,卵巢内分泌功能已经完善^[27-28],可作为实验用鼠;若此时摘除双侧卵巢会导致大、小鼠体内的激素水平显著下降,继而引发PS^[29]。自然老化法则选用11~12月龄大、小鼠。研究表明,处于该时期的大、小鼠出现卵巢功能逐渐减退的趋势,与围绝经期女性的性激素水平下降过程相似,故常用于制备PS模型动物^[30-31]。由于不同年龄动物对雌激素敏感性不同,选择合适时期进行造模才能更贴近患者临床真实状态,更易观察指标变化^[32]。

3.4 阳性对照药选择

研究者建立PS模型的最主要目的是研发新药和进行药效学评价,故研究中往往涉及阳性对照药物的选择。由表5可知目前涉及的阳性药物种类颇多,不仅包含了中药、西药,还包括了中药提取物。其中,西药以戊酸雌二醇为主,是临床中最为常用的激素替代药物^[33],原理是通过人为补充雌激素来缓解PS;中药则选用更年安片,其从中医的角度是通过施以滋阴补肾、安神除烦中药而起到平衡体内肾阴肾阳,减轻患者不适感的作用,临床常用于治疗心肾不交型PS患

者, 效果明显^[34]。

3.5 检测指标选择

本研究结果显示, 阴道脱落细胞涂片使用频率最高, 可直接选取阴道脱落细胞涂片观察动物的动情周期变化, 操作简便, 具有重复性高的特点。因此, 国内外学者多选用此指标作为建模成功评价标准。其次是血清生化指标, 因为血清生化水平的变化可直接判定药物干预效果, 也间接反映本病的发生原因^[35]; 其中血清性激素水平变化可作为核心指标直接判定PS^[36]。组织形态学可直接反映PS对全身各个脏器组织的损害程度, 体现PS患病特点, 可进一步辅助实验者判断模型是否与临床病理特点相符合或者是否达到用药效果, 因此在实验中可选择脏器的病理学检查作为评估用药效果的指标之一。随着研究手段不断深入, 研究层面也从细胞跨越到分子水平, 不少研究者开始通过检测关键通路蛋白或者mRNA表达差异来探究信号通路对PS的影响^[37-38], 或通过蛋白质组学或代谢组学、肠道菌群检测等新兴技术来深入研究PS发病机制和治疗策略^[39-40]。

另外, 由于PS临床症状特殊, PS患者常可见精神神经症状或骨质疏松症状等^[41-42], 故根据实验目的不同选择不同检测方法, 如针对PS出现的骨质疏松症时则多选择X线、CT检查骨相关参数^[43-44], 出现相关精神症状时则会辅以行为学评价进行综合评价。当然动物的一般情况变化同样也可反映其精神状态改变^[45], 但单纯记录一般情况变化具有主观性, 并不能反映建模成功, 此时应选用可量化的评价指标, 如加以行为学实验检测指标进行综合判断^[46]。由于PS发病机制尚未明确, 临床症状涉及心血管、神经、内分泌等多个系统, 研究者不能使用单一指标的检测结果作为判断造模成功的标准; 需要选择对症的多指标进行检测, 其中血清生化、组织形态学以及一般情况观察是3个最主要的检测方面。

3.6 模型评价方法选择

模型成功制备是后续研究药物作用机制的必要条件。在模型评价方面, 多数研究者通过阴道脱落细胞涂片判定动情周期, 待实验者观察到实验动物出现动情周期紊乱或不规则, 即视为制备模型成功^[47-48]。观察涂片可因实验者操作原因存在一定主观性, 但目前资料显示阴道脱落细胞涂片是评价PS动物模型最常用的检测方法, 具有简单易行的特点^[49]。若实验条件允许, 可选用血清性激素水平作为客观指标, 更准确地

反映PS动物卵巢功能的变化以及造模结果^[50-51]。在此次文献研究中, 中医病证结合模型研究仅占少数, 多数研究者仅对动物的中医证候表现进行主观判断, 并未对中医证候进行评分证实动物符合该证型。

3.7 PS患者与动物模型的疾病特征和检测指标比较

PS患者与动物模型之间均存在激素和情绪方面的变化, 但PS患者因受外界环境因素的影响, 症状存在复杂多变的特点; 而动物饲养环境固定, 与患者实际生存环境存在差异, 形成症状较单一的特点。此外, 动物恢复能力较患者强, 实验过程中无法评估药物的治疗效果, 故部分动物实验对动物加用各种压力因素来模拟患者受到的社会压力, 以期该模型能更好地反映疾病的真实变化情况。在指标检测方面, PS患者仅通过检测血清性激素水平的变化进行评估^[10], 再结合病史即可诊断疾病; 而动物模型可通过结合各种检测指标来评价模型。患者因检测费用高或检测标本难获取等原因, 所采用的辅助检查较少, 增加了诊疗难度; 动物实验则在标本数量充足、标本易获取方面具有一定优势, 因此脏器组织形态学检查、脏器组织匀浆生化指标等检测的相关报道明显增加^[52], 再结合代谢组学、肠道菌群^[39]等现代新兴检测技术, 可开展多维度深层次的研究, 更有助于深入探讨PS的发病机制, 从而更好地指导临床用药。

4 总结与展望

综上, 通过对PS模型制备要素和评价指标进行归纳总结, 分析发现常用的PS动物模型多选SD大鼠进行造模; 造模方法则优先考虑卵巢摘除手术法和自然老化法, 其中卵巢摘除手术法大部分选用3~4月大鼠或8周龄小鼠, 而自然老化法则常用11~12月龄左右的大、小鼠; 在阳性药选择上, 西医常用戊酸雌二醇, 中医则是更年安片; 判断模型是否成功多以动情周期紊乱或不规则为标准, 常选取的检测指标是阴道脱落细胞涂片、血清生化指标、脏器组织形态学变化等。

笔者根据本团队的研究经验, 对PS动物模型制备过程中存在的问题提出一些看法: (1) 在明确模型评价的文献中, 大部分文献以动情周期不规则或者紊乱作为成模标准, 但对于动情周期紊乱程度未有统一标准; (2) 仅有少数文献将动物血清E₂水平降低作为模型评价指标, 但由于PS症状的复杂性, 建议后续可从性激素、动情周期、行为学等方面相结合来评价;

(3) 目前多数研究者在动物年龄的选择上存在较大差异, 由于不同年龄的大、小鼠对药物的敏感度以及对检测指标的灵敏度不同, 故此应后应对动物年龄选择进行规范化; (4) 整理文献过程中发现只有 59.84% 的文献涉及阳性药物对照组, 多数研究者仅设立正常对照组、模型组和受试药物组, 缺少阳性药物对照, 这一一定程度上降低了实验结果的可靠性, 故应在后续实验中注意加入阳性对照组以证明受试药物的优势; (5) 构建中医病证结合动物模型的证型研究尚未完善, 且证型判断缺乏客观指标, 今后应开展更多的中医病证结合模型研究, 以此来对其进行量化标准评分和证型判定。

[作者贡献 Author Contribution]

梁天薇负责初稿写作并修改;
邓亚胜和黄慧负责文献数据收集、数据检查;
荣娜和刘鑫负责数据整理和分析;
王玉洁提供资助和参与文章讨论;
林江审核和修改文稿。

[利益声明 Declaration of Interest]

所有作者均声明本文不存在利益冲突。

[参考文献 References]

- [1] 世界中医药学会联合会, 中华中医药学会. 国际中医临床实践指南更年期综合征(2020-10-11)[J]. 世界中医药, 2021, 16(2): 190-192. DOI: 10.3969/j.issn.1673-7202.2021.02.002.
World Federation of Chinese Medicine Societies, China Association of Chinese Medicine. International guide to clinical practice of traditional Chinese medicine: climacteric syndrome (October-November, 2020) [J]. World Chin Med, 2021, 16(2): 190-192. DOI: 10.3969/j.issn.1673-7202.2021.02.002.
- [2] NUDY M, ARAGAKI A K, JIANG X Z, et al. The severity of individual menopausal symptoms, cardiovascular disease, and all-cause mortality in the Women's Health Initiative Observational Cohort[J]. Menopause, 2022, 29(12): 1365-1374. DOI: 10.1097/GME.0000000000002089.
- [3] NAPPI R E, KROLL R, SIDDIQUI E, et al. Global cross-sectional survey of women with vasomotor symptoms associated with menopause: prevalence and quality of life burden[J]. Menopause, 2021, 28(8): 875-882. DOI: 10.1097/GME.0000000000001793.
- [4] 苗明三. 实验动物和动物实验技术[M]. 北京: 中国中医药出版社, 1997.
MIAO M S. Laboratory animals and animal experimental techniques[M]. Beijing: China Press of Traditional Chinese Medicine, 1997.
- [5] 范星宇, 廖晓倩, 王梓仪, 等. 基于数据挖掘的原发性痛经动物模型分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29(2): 166-174.
FAN X Y, LIAO X Q, WANG Z Y, et al. Primary dysmenorrhea animal models based on data mining[J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2023, 29(2): 166-174.
- [6] 辛伟, 徐欢, 杨倩, 等. 夏冬季节气温变化对绝经期大鼠尾温变化的影响研究[J]. 时珍国医国药, 2021, 32(4): 1013-1016. DOI: 10.3969/j.issn.1008-0805.2021.04.71.
- [7] XIN W, XU H, YANG Q, et al. Effect of seasonal temperature change in Xia Dong on tail temperature change of menopausal rats[J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2021, 32(4): 1013-1016. DOI: 10.3969/j.issn.1008-0805.2021.04.71.
- [7] 余庆涛, 葛亚中. 墨旱莲丹参覆盆子口服液对更年期阴虚内热型大鼠的药理影响研究[J]. 海峡药学, 2021, 33(12): 10-12. DOI: 10.3969/j.issn.1006-3765.2021.12.003.
- [8] YU Q T, GE Y Z. Effect of MoHanLian DanShen FuPengZi oral liquid on model rats about the imitating-syndrome of fever due to Yin-deficiency in menopause[J]. Strait Pharm J, 2021, 33(12): 10-12. DOI: 10.3969/j.issn.1006-3765.2021.12.003.
- [8] ZHANG F, CAO J Y, ZHANG X, et al. Efficacy of self-made Gengnian Decoction on phosphatidylinositol 3-kinases/protein kinase B/mammalian target of rapamycin signaling pathway in perimenopausal rats[J]. J Tradit Chin Med, 2019, 39(6): 861-866.
- [9] 谢冰颖, 谢丽华, 许惠娟, 等. 疏肝法对围绝经期综合征肝郁证模型大鼠卵巢黄体生成素受体及促卵泡生成素受体的影响[J]. 国际中医中药杂志, 2018, 40(2): 143-147. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4246.2018.02.012.
- [10] XIE B Y, XIE L H, XU H J, et al. Effects of liver-soothing therapy on the luteotropic hormone receptor and follicle stimulating hormone receptor of perimenopausal syndrome rats with liver qi stagnation[J]. International J Tradit Chin Med, 2018, 40(2): 143-147. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4246.2018.02.012.
- [10] 谢幸, 孔北华, 段涛. 妇产科学[M]. 9版. 北京: 人民卫生出版社, 2018.
- [11] XIE X, KONG B H, DUAN Z. Obstetrics and gynecology[M]. 9th ed. Beijing: People's Health Publishing House, 2018.
- [11] GERVAIS N J, VIECHWEG S S, MONG J A, et al. The middle-aged ovariectomized marmoset (*Callithrix jacchus*) as a model of menopausal symptoms: preliminary evidence[J]. Neuroscience, 2016, 337: 1-8. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2016.08.056.
- [12] 孙侠, 刘科, 杨林, 等. 6种常用 SPF 级大小鼠繁殖性能测定与分析[J]. 中国比较医学杂志, 2016, 26(10): 9-13. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.10.003.
- [13] SUN X, LIU K, YANG L, et al. Measurement and analysis of the reproductive performance in six commonly used SPF mice and rats[J]. Chin J Comp Med, 2016, 26(10): 9-13. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.10.003.
- [13] 王铁枫, 刘雁峰, 辛明蔚, 等. 交通心肾中药对更年期大鼠性激素及神经递质的影响[J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(4): 1340-1343.
- [14] WANG T F, LIU Y F, XIN M W, et al. Effects of Jiaotong Xinshen Decoction of coordinating heart and kidney on sex hormone and neurotransmitters in climacteric rats[J]. China Ind Econ, 2018, 33(4): 1340-1343.
- [14] 马娟, 傅萍, 凌博越, 等. 自然衰老 ICR 小鼠围绝经期模型的建立与评价[J]. 中华中医药杂志, 2016, 31(6): 2394-2397. DOI: 10.3969/j.issn.1673-7717.2008.05.030.
- [15] MA X, FU P, LING B Y, et al. Establishment and evaluation of perimenopausal model of ICR mice with natural aging[J]. China J Tradit Chin Med Pharm, 2016, 31(6): 2394-2397. DOI: 10.3969/j.issn.1673-7717.2008.05.030.
- [15] 臧凯, 罗小光, 李伟, 等. 围绝经期综合征渐衰动物模型选择[J]. 贵州医科大学学报, 2017, 42(11): 1262-1265. DOI: 10.19367/j.cnki.1000-2707.2017.11.005.

- ZANG K, LUO X G, LI W, et al. Selection of fading animal models with perimenopausal syndrome[J]. J Guizhou Med Univ, 2017, 42(11): 1262-1265. DOI: 10.19367/j.cnki.1000-2707.2017.11.005.
- [16] TIAN S, MIAO M S, LI X M, et al. Study on neuroendocrine-immune function of Phenylethanoid Glycosides of Desertliving *Cistanche* herb in perimenopausal rat model[J]. J Ethnopharmacol, 2019, 238: 111884. DOI: 10.1016/j.jep.2019.111884.
- [17] 周勇, 陈刚. 二仙汤对围绝经期综合征模型大鼠卵巢中凋亡蛋白 Bcl-2、Bax 的作用研究[J]. 时珍国医国药, 2020, 31(2):320-323. DOI: 10.3969/j.issn.1008-0805.2020.02.020.
- ZHOU Y, CHEN G. Effect of Erxian Decoction on apoptosis proteins bcl-2 and bax in ovary of perimenopausal syndrome model rats[J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2020, 31(2):320-323. DOI: 10.3969/j.issn.1008-0805.2020.02.020.
- [18] LI Y, MA H, LU Y, et al. Menoprogen, a TCM herbal formula for menopause, increases endogenous E2 in an aged rat model of menopause by reducing ovarian granulosa cell apoptosis [J]. Biomed Res Int, 2016, 2016: 2574637. DOI: 10.1155/2016/2574637.
- [19] WANG S W, WU F H, ZHANG Y B, et al. Ameliorating effect of *Erxian* decoction combined with *Fructus Schisandrae chinensis* (*Wu Wei Zi*) on menopausal sweating and serum hormone profiles in a rat model[J]. Chin Med, 2016, 11:47. DOI: 10.1186/s13020-016-0117-6.
- [20] 马娟, 傅萍, 凌博越, 等. 自然衰老法与卵巢去势法建立围绝经期小鼠模型的比较研究[J]. 中华中医药学刊, 2017, 35(3):551-554. DOI: 10.13193/j.issn.1673-7717.2017.03.010.
- MA X, FU P, LING B Y, et al. Comparative study on the establishment of perimenopausal mouse model by natural aging method and ovariectomy method[J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2017, 35(3):551-554. DOI: 10.13193/j.issn.1673-7717.2017.03.010.
- [21] RODRIGUES-SANTOS I, KALIL-CUTTI B, ANSELMO-FRANCI J A. Low corticosterone response to stress in a perimenopausal rat model is associated with the hypoactivation of PaMP region of the paraventricular nucleus and can be corrected by exogenous progesterone supplementation[J]. Neuroendocrinology, 2022, 112(5): 467-480. DOI: 10.1159/000518336.
- [22] KIM D, LIU Q F, JEONG H J, et al. A modified formulation of sutaehwan ameliorates menopausal anxiety, depression and heart hypertrophy in the VCD-induced menopausal mouse model[J]. Biol Pharm Bull, 2019, 42(9):1471-1481. DOI: 10.1248/bpb.b19-00056.
- [23] CHEN J M, WANG H H, DONG Z Y, et al. GnRH-a-induced perimenopausal rat modeling and black cohosh preparations' effect on rat's reproductive endocrine[J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2021, 12: 683552. DOI: 10.3389/fendo.2021.683552.
- [24] 于鑫梅, 杨溢铎, 李洁. 超促排卵诱导制备大鼠围绝经期动物模型的研究[J]. 中华中医药杂志, 2020, 35(8):4211-4214. DOI: 10.3969/j.issn.1005-9903.2007.10.023.
- YU X M, YANG Y D, LI J. Study on perimenopausal mice model induced by superovulation[J]. China J Tradit Chin Med Pharm, 2020, 35(8):4211-4214. DOI: 10.3969/j.issn.1005-9903.2007.10.023.
- [25] ZHOU X D, YANG X J, ZHENG Y, et al. Jie-yu pill, A proprietary herbal medicine, ameliorates mood disorder-like behavior and cognitive impairment in estrogen-deprived mice exposed to chronic unpredictable mild stress: implication for a potential therapy of menopause syndrome[J]. Front Psychiatry, 2020, 11:579995. DOI: 10.3389/fpsy.2020.579995.
- [26] LAN J J, WU C M, LIANG W N, et al. An effective treatment of perimenopausal syndrome by combining two traditional Prescriptions of Chinese botanical drugs[J]. Front Pharmacol, 2021, 12:744409. DOI: 10.3389/fphar.2021.744409.
- [27] 刘旭, 马瑞红. 雌性大鼠增龄与卵巢储备功能之间的关系[J]. 中国妇幼保健, 2016, 31(23):5151-5153. DOI: 10.7620/zgfybj.j.issn.1001-4411.2016.01.93.
- LIU X, MA R H. Relationship between aging and ovarian reserve function in female rats[J]. Matern Child Health Care China, 2016, 31(23):5151-5153. DOI: 10.7620/zgfybj.j.issn.1001-4411.2016.01.93.
- [28] LLIBEROS C, LIEW S H, ZAREIE P, et al. Evaluation of inflammation and follicle depletion during ovarian ageing in mice[J]. Sci Rep, 2021, 11(1): 278. DOI: 10.1038/s41598-020-79488-4.
- [29] ZINGUE S, MICHEL T, TCHATCHOU J, et al. Estrogenic effects of *Ficus umbellata* Vahl. (Moraceae) extracts and their ability to alleviate some menopausal symptoms induced by ovariectomy in Wistar rats[J]. J Ethnopharmacol, 2016, 179:332-344. DOI: 10.1016/j.jep.2016.01.004.
- [30] 刘晓宇, 王娇, 钱欣, 等. 围绝经期大鼠动情周期变化的研究[J]. 哈尔滨医科大学学报, 2014(5):358-360.
- LIU X Y, WANG J, QIAN X, et al. Changes of estrous cycle of perimenopausal rats[J]. J Harbin Med Univ, 2014(5):358-360.
- [31] BELLOFIORE N, GEORGE E, VOLLENHOVEN B, et al. Reproductive aging and menopause-like transition in the menstruating spiny mouse (*Acomys cahirinus*) [J]. Hum Reprod, 2021, 36(12): 3083-3094. DOI: 10.1093/humrep/deab215.
- [32] HABERMEHL T L, UNDERWOOD K B, WELCH K D, et al. Aging-associated changes in motor function are ovarian somatic tissue-dependent, but germ cell and estradiol independent in post-reproductive female mice exposed to young ovarian tissue[J]. GeroScience, 2022, 44(4): 2157-2169. DOI: 10.1007/s11357-022-00549-9.
- [33] ZHANG J F, SHAO S R, YE C H, et al. A clinical study of the effect of estradiol valerate on sleep disorders, negative emotions, and quality of life in perimenopausal women[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2021, 2021: 8037459. DOI: 10.1155/2021/8037459.
- [34] 葛容辉. 更年期安片治疗妇女更年期综合征的临床效果观察[J]. 中国现代药物应用, 2020, 14(23):137-139. DOI: 10.14164/j.cnki.cn11-5581/r.2020.23.061.
- GE R H. Clinical effect of Gengnian'an Tablets in the treatment of climacteric syndrome[J]. Chin J Modern Drug Application, 2020, 14(23): 137-139. DOI: 10.14164/j.cnki.cn11-5581/r.2020.23.061.
- [35] 中华中医药学会中药实验药理专业委员会. 围绝经期综合征动物模型制备规范(草案)[J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(3):996-1000. DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2011.03.019.
- Traditional Chinese Medicine Experimental Pharmacology Professional Committee, China Association of Chinese

- Medicine. Standard for preparation of animal model of perimenopausal syndrome (draft)[J]. China J Tradit Chin Med Pharm, 2018, 33(3): 996-1000. DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2011.03.019.
- [36] 李艺, 黄露, 王红. 血清性激素水平与更年期综合征的相关性[J]. 中国老年学杂志, 2020, 40(14):3042-3045.
- YI, LU H, HONG W. 血清性激素水平与更年期综合征的相关性[J]. Chin J Gerontol, 2020, 40(14):3042-3045.
- [37] LI J L, HE P Y, ZHANG J, et al. Orcinol glucoside improves the depressive-like behaviors of perimenopausal depression mice through modulating activity of hypothalamic-pituitary-adrenal/ovary axis and activating BDNF- TrkB-CREB signaling pathway[J]. Phytother Res, 2021, 35(10): 5795-5807. DOI: 10.1002/ptr.7237.
- [38] TANG B X, MENG Q Y, XIE C, et al. Ziyin Bushen Decoction alleviates perimenopausal syndrome in rats by enhancing estradiol production[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2020, 2020:8895809. DOI: 10.1155/2020/8895809.
- [39] JIANG H, BAI W P, WANG W J, et al. Proteomics in plasma of ovariectomized rats and those exposed to estradiol valerate [J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 2018, 178:1-12. DOI: 10.1016/j.jsbmb.2017.10.015.
- [40] WU X G, KIM M J, YANG H J, et al. Chitosan alleviated menopausal symptoms and modulated the gut microbiota in estrogen-deficient rats[J]. Eur J Nutr, 2021, 60(4): 1907-1919. DOI: 10.1007/s00394-020-02382-2.
- [41] 石玉梅, 李诗哲, 耿佃涛, 等. 围绝经期及绝经后女性血红蛋白和血脂与骨质疏松的相关性[J]. 中国骨质疏松杂志, 2023, 29(2): 195-198, 208. DOI: 10.3969/j.issn.1006-7108.2023.02.008.
- SHI Y M, LI S Z, GENG D T, et al. Relationship between hemoglobin and blood lipids and osteoporosis in perimenopausal and postmenopausal women[J]. Chin J Osteoporos, 2023, 29(2):195-198, 208. DOI: 10.3969/j.issn.1006-7108.2023.02.008.
- [42] 杨文佳, 赵娜, 于心同, 等. "补肾安神"法针刺治疗肾阴虚型围绝经期失眠: 随机对照试验[J]. 中国针灸, 2023, 43(6):634-638.
- YANG W J, ZHAO N, YU X T, et al. Bushen Anshen acupuncture for perimenopausal insomnia of kidney-Yin deficiency: a randomized controlled trial[J]. Chin Acupunct Moxibustion, 2023, 43(6):634-638.
- [43] LEE E, JANG M, LIM T G, et al. Selective activation of the estrogen receptor- β by the polysaccharide from *Cynanchum wilfordii* alleviates menopausal syndrome in ovariectomized mice[J]. Int J Biol Macromol, 2020, 165(Pt A):1029-1037. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.09.165.
- [44] LEE M, PARK S J, MOON Y J, et al. Combination of *Sargassum fusiforme* and *Pueraria lobata* extracts alleviates postmenopausal symptoms in ovariectomized rats[J]. J Med Food, 2020, 23(7):735-744. DOI: 10.1089/jmf.2019.4555.
- [45] CHEN X Q, WU C M, LIANG W N, et al. The metabolomic rationale for treating perimenopausal syndrome as kidney deficiency[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2020, 2020:8568353. DOI: 10.1155/2020/8568353.
- [46] 阮璐薇, 张鹏横, 黄睿婷, 等. 去势法联合慢性不可预知性温和应激法建立围绝经期综合征肝郁证动物模型的研究[J]. 中华中医药杂志, 2021, 36(1):394-397.
- RUAN L W, ZHANG P H, HUANG R T, et al. Castration combined with chronic unpredictable mild stress to establish animal model of liver depression pattern of perimenopausal syndrome[J]. China Ind Econ, 2021, 36(1):394-397.
- [47] 赵元, 郑红霞, 徐颖, 等. 青盐方治疗围绝经期焦虑症的网络分析及实验验证[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(17):4129-4139. DOI: 10.19540/j.cnki.cjcmm.20200622.401.
- ZHAO Y, ZHENG H X, XU Y, et al. Network analysis and experimental verification of Qingyan Formula in treatment of perimenopausal anxiety disorder[J]. China J Chin Materia Med, 2020, 45(17): 4129-4139. DOI: 10.19540/j. cnki. cjcmm. 20200622.401.
- [48] 唐雨晴, 张东伟, 孙雪娇, 等. 补肾活血方对去卵巢大鼠子宫 ER 及 Cyclin B 表达影响的实验研究[J]. 北京中医药大学学报, 2016, 39(4):281-287. DOI: 10.3969/j.issn.1006-2157.2016.04.004.
- TANG Y Q, ZHANG D W, SUN X J, et al. Effects of Bushen Huoxue Formula on estrogen receptor and Cyclin B in uteri of ovariectomized rats[J]. J Beijing Univ Tradit Chin Med, 2016, 39(4):281-287. DOI: 10.3969/j.issn.1006-2157.2016.04.004.
- [49] 闫丽, 温和, 唐桂毅, 等. 大鼠阴道细胞涂片不同染色方法在动情周期判定中的价值[J]. 药物评价研究, 2020, 43(1):72-76. DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2020.01.012.
- YAN L, WEN H, TANG G Y, et al. Diagnostic value of three staining methods for rat vaginal cell smears in determination of estrous cycle[J]. Drug Eval Res, 2020, 43(1):72-76. DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2020.01.012.
- [50] CHEUNG H P, WANG S W, NG T B, et al. Comparison of chemical profiles and effectiveness between Erxian Decoction and mixtures of decoctions of its individual herbs: a novel approach for identification of the standard chemicals [J]. Chin Med, 2017, 12:1. DOI: 10.1186/s13020-016-0123-8.
- [51] 赵磊, 黄赫, 慕杨娜, 等. 济阴颗粒对围绝经期综合征大鼠卵巢 Caspase 依赖性细胞凋亡通路的影响[J]. 北京中医药大学学报, 2018, 41(5):372-375. DOI: 10.3969/j.issn.1006-2157.2018.05.004.
- ZHAO L, HUANG H, MU Y N, et al. Influence of Ji Yin Capsule on apoptosis pathway of ovarian caspase de-pendent cells in rats with peri-menopausal syndrome[J]. J Beijing Univ Tradit Chin Med, 2018, 41(5):372-375. DOI: 10.3969/j.issn.1006-2157.2018.05.004.
- [52] PARK D R, YEO C H, YOON J E, et al. *Polygonatum sibiricum* improves menopause symptoms by regulating hormone receptor balance in an ovariectomized mouse model[J]. Biomed Pharmacother, 2022, 153: 113385. DOI: 10.1016/j.biopha.2022.113385.

(收稿日期:2023-05-11 修回日期:2023-08-04)

(本文编辑:张俊彦,富群华,丁宇菁,郭家欣)

【引用本文】

梁天薇, 邓亚胜, 黄慧, 等. 围绝经期综合征动物模型的制备方法及评价指标分析[J]. 实验动物与比较医学, 2024, 44(1): 74-84. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2023.062.

LIANG T W, DENG Y S, HUANG H, et al. Preparation methods and evaluation criteria analysis of animal models for perimenopausal syndrome[J]. Lab Anim Comp Med, 2024, 44(1): 74-84. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2023.062.

清华大学实验动物中心小鼠自动饮水系统漏水情况统计分析

唐倩倩, 张秀莉, 常 在

(清华大学生命科学学院, 北京 100084)

[摘要] **目的** 统计清华大学实验动物中心小鼠自动饮水系统漏水情况, 评估自动饮水设备安全性, 为动物设施自动饮水系统的选用和使用维护管理提供参考。**方法** 本文以清华大学实验动物中心二期动物设施南、北两个屏障饲养区的小鼠自动饮水系统为研究对象, 分别进行了为期3年、1年半的漏水情况监测记录。通过统计分析监测期内两个屏障饲养区漏水事件发生案例, 将漏水原因分为人员误操作、动物行为、异物阻塞、配件变形4种, 计算南、北区自动饮水系统因前述4种漏水原因造成的总日漏水率, 以及因设备自身质量问题即异物阻塞和配件变形两种漏水原因造成的日漏水率, 并进一步对漏水原因以及漏水给设施带来的影响进行分析讨论。同时, 统计在监测期末, 未使用自动饮水的一期设施和使用自动饮水系统的二期设施的动物饲养量和饲养人员数量, 计算两种饲养模式下人均负责笼位数的差异。**结果** 监测期内两个区域共发生漏水52起, 总日漏水率为0.000 13%。其中, 人员误操作导致的漏水有31起, 约占漏水总发生量的60%, 在加强培训、监督检查和有效提醒措施下, 可降低人员误操作导致漏水的发生率; 动物行为导致的漏水有2起; 异物阻塞导致漏水0起; 因设备质量原因导致的漏水有19起, 日漏水率为0.000 07%。根据清华大学实验动物中心的运行数据统计, 使用自动饮水系统的二期设施人均负责笼位数为908笼, 而未使用自动饮水系统的一期设施人均负责笼位数为570笼, 在使用自动饮水的条件下人均负责笼位数增加约59%。**结论** 清华大学实验动物中心自动饮水系统日漏水率远低于设备理论设计值0.003%, 进一步证明了自动饮水系统的安全性和有效性。同时, 自动饮水系统的使用可以大幅提升饲养工作效率, 除购入自动饮水系统需投入采购成本外, 饲养用工成本将随着工作效率的提升而不断下降, 从而降低设施整体运行成本。在现代化动物设施建设背景下, 自动饮水系统将会成为动物设施设计和运行的重要考量因素之一。

[关键词] 实验动物; 动物设施; 自动饮水; 漏水率; 小鼠

[中图分类号] R-332; G482 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2024)01-0085-07



Statistical Analysis of the Leakage Situation in the Automated Watering System for Mice in Tsinghua University Laboratory Animal Resources Center

TANG Qianqian, ZHANG Xiuli, CHANG Zai

(School of Life Sciences, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Correspondence to: CHANG Zai (ORCID: 0009-0007-6605-2128), E-mail: changzai@mail.tsinghua.edu.cn

[ABSTRACT] **Objective** To calculate the leakage rate of the automated watering system in Tsinghua University Laboratory Animal Resources Center, to evaluate the safety of the system, and provide references for selection, maintenance, and management of automated watering systems in animal facilities. **Methods** This study investigated the automated watering system installed in South and North Barriers of Tsinghua University Laboratory Animal Resources Center (Phase II). Water leakage monitoring was conducted over two periods, one over a period of 3 years and the other over 1.5 years. The occurrence of water leakage events at the two barriers during the monitoring period was statistically analyzed, classifying the causes into four categories: mishandling by personnel, animal behavior, obstruction by

[第一作者] 唐倩倩(1993—), 女, 硕士, 工程师, 研究方向: 实验动物饲养管理。E-mail: tangqianqian@mail.tsinghua.edu.cn

[通信作者] 常 在(1979—), 男, 博士, 高级工程师, 研究方向: 实验动物设施运行管理与技术服务体系建立。E-mail: changzai@mail.tsinghua.edu.cn. ORCID: 0009-0007-6605-2128

foreign objects, and deformation of fittings. The total daily leakage rate due to these causes and the daily leakage rate caused by quality issues, i.e. obstruction by foreign objects and deformation of fittings were calculated. Further analysis and discussion focused on the causes of water leakage and its impact on the facilities. At the same time, the number of caretakers at the end of the monitoring period in the Phase I facility without automated watering system and the Phase II facility with automated watering system were counted. Finally the difference in the number of cages per capita under the two watering systems was calculated. **Results** A total of 52 water leakage incidents occurred in both areas during the monitoring period, with a total daily leakage rate of 0.000 13%. Among them, 31 were caused by personnel mishandling, accounting for approximately 60% of total leakages. Enhanced training, supervision, inspection, and effective reminder measures could reduce leakage caused by personnel mishandling. There were 2 cases of water leakages caused by animal behavior, 0 leakage due to obstruction by foreign objects, and 19 leakages due to system quality issues, with a daily leakage rate of 0.000 07%. According to the operation data of Tsinghua University Laboratory Animal Resources Center, the average number of cages managed per person in facilities equipped with the automated watering system was 908, compared to 570 cages in facilities without the automated watering system. This represents an approximate 59% increase in the number of cages managed per person with the adoption of the automated watering system. **Conclusion** The daily leakage rate of the automated watering system in the Tsinghua University Laboratory Animal Resources Center is significantly lower than the theoretical design rate of 0.003%, which demonstrates the system's safety and effectiveness. Additionally, the adoption of an automated watering system can significantly enhance caretaking efficiency. While initial investments in the system are required, the subsequent increase in efficiency leads to a continuous decrease in labor costs, thereby reducing the total operational expenses of the facility. In the context of modernizing animal facility construction, automated watering systems are becoming an essential consideration in facility design and operation.

[Key words] Laboratory animal; Animal facility; Automated watering system; Leaking rate; Mice

实验动物是现代生命科学、医学和药学等多门学科发展与研究的重要实验材料。随着生命科学相关研究的迅猛发展,研究者对实验动物的使用需求越来越大、质量要求越来越高^[1]。以清华大学实验动物中心为例,实验小鼠的饲养量从2011年的1 600笼逐年增长至2022年的39 000余笼,11年间饲养量增长了23倍之多。面对如此庞大的动物饲养量,提高饲养活动的机械化水平是提升效率、降低人工成本的有效方法^[1]。除了在洗消区域配备含自动灌装垫料功能的隧道式洗笼机、脏垫料回收机以及柜式洗笼机等自动化洗消设备外,自动饮水系统的使用同样大幅度提升了饲养工作效率。也有报道称自动饮水系统在饮水安全、防止微生物污染、提升效率和减少运营成本等方面,有着绝对明显的优势^[2]。

传统的饮水瓶饲养模式一般是周期性更换,在使用过程中饮用水较长时间存在饮水瓶中,容易滋生细菌等对动物有害的物质,影响动物健康。而且饮水瓶每次更换时需要进行清洗、灭菌和重新灌装等过程,饲育程序繁杂,增加了过程中的污染风险和人工成本。

相比较之下,自动饮水设备具有持续提供质量稳定的动物饮水、有利于维护动物质量、降低饲育成本、保障人员职业健康安全等诸多优势,但是也偶见漏水事故,甚至导致动物被淹死的情况,这让人们对自动饮水系统的安全性持怀疑态度^[3]。国内自动饮水自2008年开始逐步推广,但是关于自动饮水系统的使用管理鲜有报道,难以对自动饮水系统的使用情况和安全性进行综合评价,导致动物设施在自动化建设或改造过程中缺乏参考。清华大学实验动物中心的自动饮水系统自投入使用已达3年时间,运行基本平稳。针对行业内大家关心的漏水问题,我们进行了经验总结与情况分析,希望能够为国内实验动物设施自动饮水系统的选用和日常管理提供一些参考。

1 材料与方法

1.1 设施设备

清华大学实验动物中心一期(位于西北门西侧)设施为传统饮水瓶饲养模式,设施建筑面积约2 900 m²,主要功能设计为外购动物的饲养和实验区;设计小鼠笼

位10 528个,在养小鼠7 000余笼。二期(位于生物医学馆地下U4)设施自2019年底投入使用,目前已平稳运行3年时间。二期设施建筑面积4 900 m²,包含南、北两个屏障区域,主要用于SPF级小鼠的饲养繁育,设计笼位41 200个,在养小鼠30 000余笼。

二期设施配备美国Edstrom公司的自动饮水系统(定制,饮水阀为固定式,非快接)。该套系统包括水处理设备、减压站、内联站、饮水阀、清洗消毒装置等,按照动物设施的房间布局 and 独立通风笼具

(independent ventilation cage, IVC) 数量来定制设计^[4]。减压站在保证动物饮水压力适中的前提下,同时配备了压力、流量等监测和控制功能。房间内的动物笼架通过弹簧软管连接无菌水管道的内联站,实验动物通过舔舐饮水阀,可在笼盒内实现自由饮水。为了适应笼架周期性清洗的流程和房间分区域启动的规划,系统还配有清洗消毒装置,可按需清洗和消毒。如有特殊饮水实验需要,可以通过饮水阀堵头实现单个笼位特殊水控制。自动饮水系统的连接示意图见图1。



图1 自动饮水系统的连接示意图

Figure 1 Schematic diagram of the connection of the automated watering system

1.2 监测时间

南区屏障设施自2019年12月启用自动饮水设备饲养小鼠,北区屏障设施自2021年7月启用自动饮水。南区屏障设施的监测时间是2020年1月—2022年12月,共3年;北区屏障设施的监测时间是2021年7月—2022年12月,共1年零6个月。

1.3 分析方法

参考文献报道和实践经验,已知造成饮水阀漏水的原因主要包括人员误操作、动物行为、异物阻塞、配件变形这4种^[5]。本研究所讨论的漏水率主要是指由于产品本身质量问题造成的漏水情况,即异物阻塞

和配件变形两种原因,排除人员误操作、动物行为造成的漏水情况,以客观公正地评判自动饮水设备自身的安全性和有效性。日漏水率=统计周期内的漏水饮水阀数量/[日平均笼位数×统计周期(d)]。通过对受检设施投入使用自动饮水系统运行情况进行观察记录,统计截至2022年12月31日饮水阀的漏水数量,各区域笼位数,按公式计算日漏水率,分析漏水原因。

通过对监测期内一、二期设施动物饲养量和饲养人员数量的统计,计算饲养员人均负责笼位量情况(人均负责笼位数=设施笼位量/饲养员数量),比较使用自动饮水系统对饲养效率和成本控制的影响。

2 结果

2.1 南、北区屏障设施 2020—2022 年饮水阀漏水情况

二期设施南、北区屏障分别于 2020 年 1 月和 2021 年 7 月开始,通过日常工作检查、自动饮水报警系统等方式获知饮水阀漏水情况,每次发生漏水后及时对漏水原因进行分析,根据原因类别分类进行统计。截至 2022 年 12 月 31 日,南、北区屏障共计发生漏水事件 52 起,其中人员误操作原因漏水有 31 起,动物行为原因漏水 2 起,异物阻塞原因漏水 0 起,配件变形原因

漏水 19 起。根据统计数据不难看出,自动饮水漏水事件中,约 60% 是由于人员误操作造成的。

动物行为以及异物阻塞原因造成漏水的发生率相对较低,这与自动饮水设备的结构设计密不可分,饮水阀阀杆长度的控制和屏蔽支架横截面积大小的设计等均使得自动饮水阀不易被动物误触,垫料等异物也不易从饮水阀前端进入,所以这两种原因引起的设备漏水情况很少。而配件变形是仅次于人员误操作导致漏水发生的第二大原因,配件变形的原因可能是安装过程中损坏、高温高压或不当使用等。监测期内南、北区饮水阀漏水情况统计结果见表 1。

表 1 清华大学实验动物中心南、北区屏障设施 2020—2022 年饮水阀漏水情况统计
Table 1 Statistics on the leakage of drinking water valves in the south and north barriers of Tsinghua University Laboratory Animal Resources Center from 2020 to 2022

饮水阀漏水原因 Causes for Drinking Water Valve leakage	2020	2021		2022	
	南区 South barrier	南区 South barrier	北区 North barrier	南区 South barrier	北区 North barrier
1)人员误操作 Personnel mistake	14	9	2	5	1
2)动物行为 Animal behavior	1	1	0	0	0
3)异物阻塞 Obstruction	0	0	0	0	0
4)配件变形 Deformation	5	2	0	12	0
合计 Total	20	12	2	17	1

注:北区 2020 年未启用自动饮水系统。
Note: Automated watering system was not activated in North Barrier in 2020.

2.2 南、北区屏障设施 2020—2022 年日漏水率

统计南、北区 2020—2022 年监测期内的日平均笼位数,根据日漏水率计算公式,用日平均笼位数乘以统计周期天数即得到笼盒日。结合表 1 漏水饮水阀数量的统计,计算出监测期内每年所有原因(漏水原因 1~4)造成漏水发生的总日漏水率和仅质量原因(漏水原因 3 和 4)造成漏水发生的日漏水率,计算不分时间、不分区域的平均总日漏水率为 0.000 13%,质量原因造成的日漏水率为 0.000 07%,均远低于设备设计理论参考值 0.003%。南、北区日漏水率计算结果见表 2。

2.3 一、二期设施的人均负责笼位量比较

通过对监测期末的一期、二期设施饲养量和饲养员数量进行统计,计算一期设施和二期设施在两种动

物饮水模式下,饲养员人均负责的笼位数。结果显示,一期设施笼位量为 7 417 笼,饲养员共计 13 人,人均负责笼位数 570 笼;二期设施笼位量为 32 695 笼,饲养员共计 36 人,人均负责笼位数 908 笼。结果提示,相较于使用饮水瓶饲养模式的一期设施,使用了自动饮水系统的二期设施中饲养员人均负责笼位数提升了 59%。

3 讨论

本研究统计数据显示,清华大学实验动物中心受检设施由于自动饮水设备质量原因造成的日平均漏水率为 0.000 07%。据了解,同样使用 Edstrom 自动饮水系统的美国波士顿儿童医院(Boston Children's Hospital)和英国剑桥 MRC 阿瑞斯动物设施(The MRC

表2 清华大学实验动物中心南、北区屏障设施2020—2022年日漏水率计算

Table 2 Calculation of the daily leakage rate in south and north barriers of Tsinghua University Laboratory Animal Resources Center from 2020 to 2022

统计时间 Time	2020	2021		2022		平均日漏水率 Average daily leakage rate
	南区 South barrier	南区 South barrier	北区 North barrier	南区 South barrier	北区 North barrier	
日平均笼位数 Average number of cages per day	24 670	24 575	6 200	25 382	6 678	-
年度笼盒总数 Total number of cages per year	9 004 550	8 969 875	1 131 500	9 264 430	2 437 470	-
总故障饮水阀数(含漏水原因1~4) Total number of faulty drinking water valves (including causes 1-4)	20	12	2	17	1	-
总日漏水率/(含漏水原因1~4) Total daily leakage rate /% (including causes 1-4)	0.000 2	0.000 13	0.000 02	0.000 18	0.000 04	0.000 13
质量问题造成的故障饮水阀数量(含漏水原因3、4) Number of malfunctioning drinking water valves due to quality issue (including causes 3, 4)	5	2	0	12	0	-
日漏水率/(含漏水原因3、4) Daily leakage rate/% (including causes 3, 4)	0.000 06	0.000 02	0	0.000 13	0	0.000 07

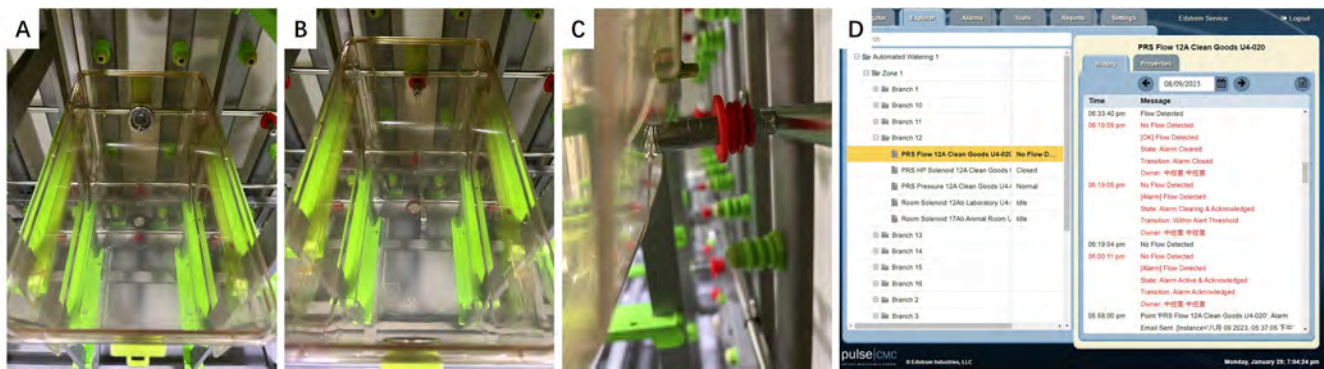
Ares Building in Cambridge) 在内部报告中曾提及其自动饮水日漏水率低于0.001%，美国索尔克生物研究所(Salk Institution for Biological Studies)的这一数值为0.000 168%。这些数据均验证了自动饮水系统的安全性和有效性。

同时,使用了自动饮水系统的二期设施中饲养员人均负责笼位数比采用饮水瓶饲养模式的一期设施中饲养员人均负责笼位数提升了59%,说明自动饮水系统的使用可大幅度提高饲养工作效率。除购入自动饮水系统需投入采购成本外,饲养用工成本将随着工作效率的提升而不断下降,从而降低设施整体运行成本。

3.1 漏水原因分析

3.1.1 人员误操作

31起人员误操作导致的漏水情况中,有28起是由于笼盒插反造成的。在自动饮水笼盒使用过程中,经常由于使用人员粗心,将笼盒插反,使饮水阀抵在没有不锈钢盖片的盒壁上,再野蛮用力将笼盒强行推回IVC笼架后,饮水阀导杆在盒壁作用下发生偏移,于是该笼位的自动饮水阀发生漏水,如图2A~C所示。当漏水达到一定量时,会触发报警系统,如图2D所示。这种漏水如果不能够被及时发现,水流会滴漏到下方笼位动物笼盒上,由笼盒生命窗过滤膜浸入笼盒



注: A, 正确放置的笼具底盒; B和C, 插反的笼具底盒; D 自动饮水报警系统。

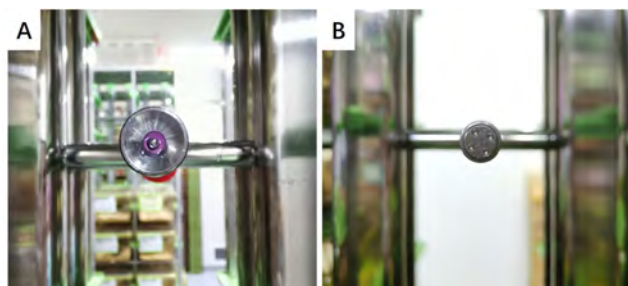
Note: A, Cage in correct placement; B and C, Cage inserted backwards; D, Automated watering alarm system.

图2 笼盒插反导致自动饮水阀漏水及自动饮水报警系统

Figure 2 Leaking valve caused by cage being inserted backwards and automated watering alarm system

内, 从而发生动物被淹死的严重后果。

另外3起人为导致的漏水事故是由于自动饮水阀堵头的错误使用。由于在实验研究中, 经常有使用特殊饮水的需求, 而IVC笼架通常是一个架子整体接入一套饮水管道, 如果其中的某个笼位需要使用饮水瓶供水, 则需要使用自动饮水阀堵头, 如图3所示。同样由于使用人员粗心或者培训不到位, 堵头容易被错误使用, 从而导致漏水。建议在笼位充足的情况下, 可以单独将特殊饮水的动物集中到一个IVC笼架上, 该笼架不接入自动饮水, 全部使用饮水瓶模式, 这样就不会发生此类人员误操作而导致的漏水事故。如果笼位紧张, 使用自动饮水阀堵头仍是一种有效的解决方法, 但是需要使用人员接受专业的操作培训, 同时在使用过程中加强监督和检查。



注: A, 未使用堵头的饮水阀; B, 使用堵头的饮水阀。

Note: A, Automatic drinking water valves without deprivation cap; B, Automatic drinking water valves with deprivation cap.

图3 使用和未使用堵头的自动饮水阀

Figure 3 Automatic drinking water valves with and without deprivation cap

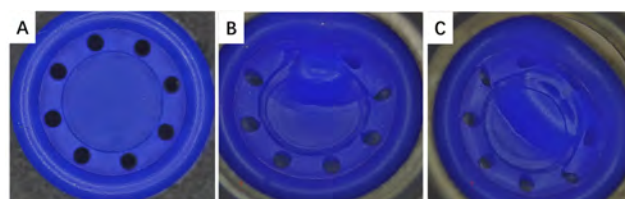
人员误操作在所有漏水事件中所占比例约60%, 因此如何降低人为因素带来的自动饮水使用安全风险成为设施管理者最为关心的问题。本研究中, 北区自动饮水系统启用晚于南区, 通过对南区自动饮水系统使用过程中的漏水事件尤其是人员误操作导致的漏水事故进行总结分析, 我们不断完善对使用人员的培训和监督检查制度, 每次漏水发生后, 都会要求违规实验者再次接受实验动物屏障使用培训, 同时, 通过电子屏幕等设备滚动播放自动饮水系统的正确使用方法, 加强对实验者规范操作的提醒。另外由于北区笼位总量低于南区, 人员进出频次相对较低, 而且在监测期内北区并未发生质量原因导致的漏水事件。因此从监测期的数据(表2)可以看出, 北区自动饮水日漏水发生率低于南区, 侧面说明加强培训和监督提醒可以有效降低人员误操作导致的漏水发生率。

3.1.2 异物阻塞

管道内异物堵塞是导致漏水事故发生的另一重要原因。这种情况发生通常是由于在饮水阀杆的腔体内, 进入了垫料或金属碎屑等异物, 异物导致阀杆偏移, 造成持续性的漏水, 如果发现不及时, 该笼盒内的动物将面临被淹死的风险。异物可以从饮水阀的前端或后端进入。由前端进入主要有两种原因: 一是垫料灌装过多, 铺在盒底的垫料高度接近饮水阀的位置, 小鼠在笼内活动时, 极易将垫料带入饮水阀腔体内; 二是垫料太细小, 这种情况下, 即使垫料灌装高度是适宜的, 也有可能发生堵塞漏水的情况。一般认为直径小于3 mm的垫料颗粒极易发生堵塞情况^[6]。异物由后端进入, 则可能是在清洗消毒过程中被带入, 或自动饮水管路中残留金属碎屑经循环水流带入。

3.1.3 配件变形

高温高压、长期使用、频繁拔插笼盒和动物啃咬等行为均会导致饮水阀配件变形, 出现连接不牢固而发生漏水的情况。在监测期内共计有19个饮水阀配件变形导致慢漏情况的发生。但由于自动饮水系统及时发出警报, 未造成动物死亡。厂家对这19个变形配件进行了故障分析, 并给出分析报告, 其中大部分故障原因是饮水阀后端的隔膜变形, 如图4所示。



注: A, 正常隔膜; B和C, 隔膜变形。

Note: A, Normal diaphragm; B and C, Diaphragm deformation

图4 自动饮水阀隔膜

Figure 4 Automated drinking water valve diaphragm

3.1.4 动物行为

由于动物自身行为导致漏水的现象也时有发生。监测期内曾发生过2起由于小鼠玩水导致的漏水事故, 且两次事故均造成了动物死亡。由于不易触发报警, 该种类型的漏水情况极易造成动物死亡。这一现象可能与小鼠品系有关, 某些特定品系的小鼠更容易出现玩水行为。此外, 使用塑料玩具, 小鼠将其抵在饮水阀处, 引发漏水。小鼠做窝, 将饮水阀下方垫料堆积较高, 从而导致饮水阀腔体内进入垫料等异物造成漏水。以上这些都是应当考虑的动物行为造成自动饮水漏水发生的原因。

3.2 漏水对设施运行的影响

3.2.1 对动物安全的影响

漏水现象如果发现不及时,极有可能造成动物淹死。该套自动饮水设备有自动报警功能,水流量异常,超过报警阈值时,相关负责人可以收到报警提醒,以保证能够及时发现漏水情况,避免影响动物安全^[7]。但是,如何设定报警限值,则需要厂家技术人员根据设施运行情况,综合考虑饲养量等因素进行判断,报警限值设定过高,无法及时触发报警;设定过低,易引发频繁误报警。

3.2.2 对人员的影响

经过分析讨论,我们认为虽然自动饮水系统的安全性和有效性值得信赖,但仍有发生漏水的可能。由于人员误操作导致的漏水情况更多,因此自动饮水系统对使用人员提出了更高的要求,所有人员都应该在接受专业培训后方可操作配备自动饮水系统的饲养笼具。同时,饲养人员需要在日常工作中加强对笼盒的巡查和异常情况鉴别,发现垫料异常湿润或房间地面出现积水现象时应及时关注自动饮水系统。

3.2.3 对屏障环境的影响

漏水发生后,屏障环境湿度增加。湿度过高时霉菌等微生物易于繁殖,这些微生物对动物质量和环境安全是巨大的威胁,饲料和垫料易霉变,动物室空气中的细菌数与氨浓度也明显增加,容易引发动物呼吸系统疾病^[8]。

4 总结

综上所述,自动饮水系统在清华大学实验动物中心使用是安全有效的,在过去3年的使用时间里,平均总日漏水率为0.000 13%;而在造成漏水事故的原因中,大部分是人为因素造成,除人员误操作和动物行为外,仅统计设备质量缺陷造成的漏水,则日漏水率下降到0.000 07%,远低于设计理论参考值0.003%,也证实了该套系统的安全性。自动饮水系统的使用不仅大幅提升了饲养效率,而且对设施运行成本控制同样具有明显优势。在现代化、自动化程度越来越高的动物设施建设背景下,相信自动饮水会逐渐成为实验动物设施设计和运行管理过程中一个重要的选择因素。

[作者贡献 Author Contribution]

唐倩倩主笔撰写与修改;
张秀莉参与文章思路讨论及数据的收集整理;
常在负责指导整体文章框架和文章审核定稿。

[利益声明 Declaration of Interest]

所有作者均声明本文不存在利益冲突。

[参考文献 References]

- [1] 胡建武,车路平,卢胜明,等.北京部分屏障实验动物设施环境参数监测结果[J].实验动物科学,2009,26(6):38-42. DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2009.06.010.
HU J W, CHE L P, LU S M, et al. Determinations of environmental parameters of barrier facilities for SPF laboratory animal in Beijing area[J]. Lab Anim Sci, 2009, 26(6): 38-42. DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2009.06.010.
- [2] MEIER T R, MAUTE C J, CADILLAC J M, et al. Quantification, distribution, and possible source of bacterial biofilm in mouse automated watering systems[J]. J Am Assoc Lab Anim Sci, 2008, 47(2):63-70.
- [3] GORDON A, WYATT J. The water delivery system affects the rate of weight gain in C57BL/6J mice during the first week after weaning[J]. J Am Assoc Lab Anim Sci, 2011, 50(1):37-40.
- [4] 郑艳茹,李臣亮,王彦峰,等.实验动物室可自动饮水式IVC独立通风鼠笼的开发与应用[J].中国现代教育装备,2021(7):59-61. DOI: 10.13492/j.cnki.cmee.2021.07.019.
ZHENG Y R, LI C L, WANG F F, et al. Development and application of IVC independent ventilation cage with automatic drinking water in laboratory animal room[J]. China Mod Educ Equip, 2021(7): 59-61. DOI: 10.13492/j.cnki.cmee.2021.07.019.
- [5] GONZALEZ D M, GRACIANO S J, KARLSTAD J, et al. Failure and life cycle evaluation of watering valves[J]. J Am Assoc Lab Anim Sci, 2011, 50(5):713-718.
- [6] 李树梅,胡建武.啮齿类实验动物垫料的研究进展[J].实验动物科学,2018,35(1):76-82. DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2018.01.015.
LI S M, HU J W. Research progress on bedding materials of laboratory rodents[J]. Lab Anim Sci, 2018, 35(1):76-82. DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2018.01.015.
- [7] EVANS M. Water flow monitoring for automated systems: Edstrom FloSense™ [J]. Lab Anim, 2017, 46(11): 436-437. DOI: 10.1038/labani.1369.
- [8] ROSENBAUM M D, VANDEWOUDE S, VOLCKENS J, et al. Disparities in ammonia, temperature, humidity, and airborne particulate matter between the micro- and macro-environments of mice in individually ventilated caging[J]. J Am Assoc Lab Anim Sci, 2010, 49(2):177-183.

(收稿日期:2023-09-25 修回日期:2023-11-26)

(本文编辑:张俊彦,富群华,丁宇菁,郭家欣)

[引用本文]

唐倩倩,张秀莉,常在.清华大学实验动物中心小鼠自动饮水系统漏水情况统计分析[J].实验动物与比较医学,2024,44(1):85-91. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2023.132.
TANG Q Q, ZHANG X L, CHANG Z. Statistical analysis of the leakage situation in the automated watering system for mice in Tsinghua University Laboratory Animal Resources Center[J]. Lab Anim Comp Med, 2024, 44(1): 85-91. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2023.132.

实验动物设施运行维护和保养模式探讨

黄 跃¹, 董 烨², 舒加乐¹

(1. 临港实验室, 上海 200031; 2. 上海脑科学与类脑研究中心, 上海 210602)

[摘要] 随着我国生物医药产业的蓬勃发展, 实验动物行业进入快速发展阶段, 相应的设施运行系统建设也更加自动化和智能化。与传统的实验动物设施相比, 新设施在送排风、空调、自控及整个屏障的维护方面均需要更加专业的技术团队。临港实验室实验动物设施涵盖大、小动物饲养和实验等功能区域。该设施管理团队总结日常维护经验, 并结合实验室运行特点, 调研探索多种运行维护模式, 然后通过分析3种常见模式的优劣势, 为实验动物设施管理提出新的思路, 也为同行选择最适合的专业维护保养模式提供参考。

[关键词] 实验动物设施; 维护和保养模式; 维护和保养服务

[中图分类号] Q95-33; R-331 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2024)01-0092-05



Discussion on the Operation, Maintenance and Care Modes of Laboratory Animals Facilities

HUANG Yue¹, DONG Ye², SHU Jiale¹

(1. Lin Gang Laboratory, Shanghai 200031, China; 2. Shanghai Center for Brain Science and Brain-Inspired technology, Shanghai 210602, China)

Correspondence to: SHU Jiale (ORCID: 0009-0008-6924-8529), E-mail: jlshu@lglab.ac.cn

[ABSTRACT] With the rapid development of the biopharmaceutical industry in China, the laboratory animal sector has entered a stage of rapid growth, and the construction of facility operation systems has become increasingly automated and intelligent. Compared to traditional laboratory animal facilities, new facilities require a more specialized technical team for the maintenance of air supply and exhaust systems, air conditioning, automated control, and the entire barrier system. The Lingang Laboratory's animal facilities accommodate both large and small animals for feeding and experimental purposes. The facility management team has summarized daily maintenance experiences and explored various operational and maintenance modes based on the characteristics of laboratory operation. After analyzing the advantages and disadvantages of three common modes, this paper provides new ideas for the management of these laboratory animal facilities, and offers guidance for peers in choosing the most appropriate professional maintenance mode.

[Key words] Laboratory animal facilities; Maintenance mode; Maintenance service

实验动物设施是指用于研究、试验、教学, 以及生物制品、药品及相关产品生产、检定等进行实验动物试验及生产的建筑和设备的总和^[1]。新冠疫情暴发及党的二十大召开以来, 习近平总书记提出加快建设科技强国, 实现高水平科技自立自强^[2]。各部委、省市对生物医药、科学研究等相关行业的投入不断加大, 各单位开始争相建立规模更大、管理更加智能化的实验动物设施。设计阶段, 在满足用户需求的前提下, 需充分考虑消防、市政、环保要求^[3]。设计和施

工是决定实验动物设施建设质量的基础条件。目前越来越多的设施在建设中设置了自控系统、异常报警系统、饲养设备监测系统、自动化清洗系统等诸多智能化的系统。然而, 设施建成后诸多系统间能否兼容和统一管理是日常运行维护的关键, 这直接关系到整个设施运行的稳定性和安全性^[4]。目前设施使用方多为生物医药类专业人员, 但设施运行维护和保养方的专业性不强^[5], 相关问题尤为突出; 运行维护的商业化服务在近年来虽然正蓬勃发展, 但良莠不齐。因此,

[第一作者] 黄 跃(1990—), 男, 本科, 研究方向: 实验动物管理。E-mail: huangyue@lglab.ac.cn

[通信作者] 舒加乐(1979—), 男, 硕士研究生, 研究方向: 实验动物管理。E-mail: jlshu@lglab.ac.cn。ORCID: 0009-0008-6924-8529

本文通过调研多个动物设施运行维护模式并加以分析,结合临港实验室经验,对设施运行模式展开了新思考,以期提高行业内实验动物设施维护保养的质量,并为我国实验动物行业发展提供助力。

1 动物设施运行维护模式分析

经多方调研和交流总结,明确实验动物设施维护和保养的范围一般不含空调主机、高压灭菌器等关键设备的维修。分析发现,目前市场上主要的3种针对实验动物设施的运行维护保养方式包括:全委托模式^[6]、分项分包模式、自建团队模式。现就3种模式的优劣进行分析。

1.1 全委托模式

维护保养服务是在自建团队及分项分包的基础上进行整合,继而产生的新兴服务行业。此类公司的优点是将实验动物设施中常见的各系统进行分项整合,继而汇集财务、采购、暖通、水电、弱电、自控等各专业领域的人才组建核心团队。在此基础上培训项目团队,一般采用项目经理加技术人员的团队构成。在派驻到各单位后,为遵守劳动法规,项目团队至少由4~5人构成。按合同约定执行24 h值班,每2 h进行一次巡更值勤,观察空调、送排风、纯水等运行情况,并记录屏障内温湿度、压力变化等数据^[7]。实际运行中如发现问题,会通过微信、电话等方式通知管理团队。每半年提交一次环境自检报告,总结经验,分析隐患,努力减少设施故障率,确保设施良好运行。此类公司通常能弥补技术支撑、耗材采购、应急支援等自建团队及分项分包无法解决的绝大部分问题,且有合同约束维护保养公司,保障其提供的维护保养服务,督促其按时完成各项维护保养工作。缺点是这类公司往往收费较高,且会让用户对其维护保养服务产生依赖性,一旦原维护保养公司撤出后,新的维护保养公司将面临重新熟悉设施的难题。

1.2 分项分包模式

分项分包模式是放弃统一维护保养单位,将动物设施的各组成系统,如通风空调系统、给排水及供气系统、电力供应及照明系统、自控视讯系统、安防系统、洗消设备、饲养系统、高压灭菌器、自控系统^[7]等的维护保养服务分项采购。其中,大型设备多数偏好以原厂家进行专业维护保养,一般约定每月进行1~2次维护保养自检,工程师电话值班,承诺出现问题一天内到达现场处置,简单问题几小时内解决,大问题几天内解决;其他如净化工程系统(如自控、送排风、

暖通等)委托给不同专业公司;外围区域管理、环境温湿度监测、设备巡检等工作交由物业管理,其余则委托维护保养人员维修,如洁净灯、紫外灯的维修,初、中、高效过滤器的定期更换等。该模式的优点是可以通过缩减维护保养人员数量,将屏障环境监测任务与物业巡更、监控任务合并,由物业统一进行监测,达到节约运行成本的效果。缺点是分项分包采购招标项目数量多、横跨时间长,对于采购审批手续多的单位会非常繁琐。另外存在各分包方无法第一时间赶到现场,需要设施工作人员亲自进行应急处理,以及后续责任认定等问题。该模式要求实验动物设施运行方管理团队的责任意识强、业务能力高,对设施情况完全掌握,具有运行决策权,否则容易阻滞设施正常运行。

1.3 自建团队模式

自建团队人员一般由各单位自行招聘、雇佣。优点是团队人员相对稳定,人员流动性小。维护保养人员需能按录用目的完成固定业务,如24 h值班、每2 h一次的巡检、记录环境数据、故障处置等。但缺点也同样明显,团队人员随着时间增加往往会出现安于现状、应对维修不重视、保养不到位等问题。另外,全部维修支出均需要在单位内进行采购审批,项目多、数量大,可能对于一些紧急抢修情况会存在时效性问题。同时,随着行业发展,动物设施内的设备不断更新换代,对维护保养人员的专业性要求也不断提高^[8]。因此,该模式的维护保养团队更应具备全面的运行维护技能以应对各类检修任务,所有易损耗材都要了解型号和采购方式以确保检修的时效性。自建团队受限于收入、年龄及学习能力,会逐渐表现出专业技术能力提升慢的缺点,继而丧失对环境设施的完全掌控,容易诱发安全隐患。因此,近年来选择完全自建团队的单位正变得越来越少。

3种运行维护模式的优缺点对比见表1。其中,自建团队的管理难度最高,而分项分包的运行效率最低且管理难度高,正逐渐被淘汰。全委托模式的维护保养效率最高,相应的运行成本也最高,但同样存在核心系统、专业系统的维修保养需要厂家进行等限制。调研发现,目前新建实验动物设施通常具有设施体量大、系统种类多的特点^[9]。新设施运行初期尚能依靠核心设备自带的保修条款以低成本运行,但随着运行时间的增加,若只选择某一种单纯的运行维护模式是不能保障设施正常运行的,甚至可能还会大幅度增加中期运行成本,这时就需要探索一种新的运行维护模式。

表1 三种实验动物设施运行维护和保养模式的优缺点对比

Table 1 Comparison of advantages and disadvantages of three maintenance modes for laboratory animals

维护保养模式 Maintenance mode	每日巡检记录 Daily inspection records	核心设备检修能力 Core equipment maintenance capability	24 h 值班 24 h on duty	响应速度 Response speed	紧急情况处置能力 Emergency response capability	运行风险 Operating risk
自建团队 Self-built team	有	无	有	较快	较小	大
分项分包 Subcontracting by items	无	有	无	慢	无	较小
全委托 Full outsourcing	有	无	有	快	大	小

2 临港实验室运行维护概况

临港实验室成立于2021年，脑科学分部的实验动物设施主要有SPF级鼠房及普通级猴房，服务于脑科学研究[不开展药物非临床研究GLP（Good Laboratory Practice）实验]，设施由旧厂房改造而成。运行之初，临港实验室实验动物中心管理团队在调研各单位的维护保养情况后，用半年时间对设计、施工遗留的各种问题进行了整改。调研中发现，近年来随着净化公司业务面的拓展，这类公司开始打造动物设施从设计到建设以及后期运行维护的全生命周期服务；同时，越来越多的设施运行方为了简化管理、节省成本，将运行维护管理从传统的分项分包模式转向了维护保养公司全委托模式。本管理团队在充分考虑不同维护保养方式的优劣后，决定采用行业普遍做法，同时为了动物设施能更好运行，一并开展了新模式探索。现将我们实践探索2年多的经验总结如下，希望能为同行选择适合的维护保养模式提供参考。

2.1 维护保养服务需求

临港实验室的实验动物设施维护保养服务需求包括：（1）人员配置应符合劳动法，白天至少2名维护保养人员在岗，夜间至少1人在岗；（2）24 h值班，每2 h按巡检路线对设施巡检一次，能及时发现问题；（3）15 min响应机制，杜绝消极怠工；（4）每2 h抄写自控实时记录，分析温湿度、压差变化对屏障是否有潜在危害；（5）做好设施日常巡检计划和保养维修计划，严格按计划执行，确保设施处于良好的运行状态；（6）定期检测及保养主要设备，及时消除安全隐患；（7）统计分析设施运行数据，即根据设备运行参数记录，汇总分析设施设备运行状态，研判运行风险；（8）送排风机组常见问题2 h内解决，特殊情况12 h内应急恢复；（9）每半年对设施自检一次，出具检测报告。

2.2 全委托服务内容及存在问题

临港实验室的实验动物设施维护保养服务内容包括：风冷式冷热水机组巡检/维护、溶液空调机组巡检、温湿度控制系统巡检/维护、水系统巡检、净化送风机组巡检、净化排风机组巡检/维护、自动控制系统维护、装饰系统维护、各类仪器设备运行维护、电力系统巡检、环境监测、过滤器更换等其他零星工作。

目前，临港实验室的实验动物设施硬件条件能满足使用需求，但动态运行中维护保养仍存在问题，分列如下。

2.2.1 维护保养范围如何界定

实验动物设施一般分为屏障饲养区域、配套辅助区域、外围实验区域及业务办公区域^[5]。不同的区域对运行维护的要求不一致。其中，屏障饲养区域对自控系统的专业性要求高；而配套辅助区域的部分关键大型设备如溶液空调、高压灭菌器、自动化清洗机等维护保养的专业性要求高，必须与生产厂家或指定供应商签订维护保养合同，这是设施运行安全的基石；其他区域则可通过常规的检修服务满足维护需求。所以，就整个动物设施的运行维护而言，目前很难只对接唯一的维护保养方就能实现全方面的维护保养覆盖。

2.2.2 维护保养人员水平存在差异

为了防止意外情况对设施的影响，保证人员及设施的安全，实验动物设施运行方往往要求维护保养人员有严格的安全（风险）控制处理能力^[10]。目前，维护保养公司在前期沟通及确定委托项目的时候均承诺派遣有经验有技术的维护保养人员驻场服务，但基本在中后期涉及人员变动时就指派新人接手相关工作，这些新的人员往往都是公司就地招募，经短暂培训后即进入岗位，由于入行时间短，他们对动物设施不了解，屏障维护经验不足，工作态度和责任心也无法令人满意，因此不能很好地保持较高的运行维护水准。

用户方虽可按合同提出要求,不接受这种新老交替的派遣工作方式,但是维护保养人员的专业水平并不能精确衡量,所以基本无法改变实质性的现状。该人员安排方式在工作交接、应急故障抢修中尤显弊端,会导致日常运行维护工作出现疏漏、突发故障抢修不及时、故障原因调查慢等问题^[11]。

2.2.3 维修耗材费用归属及质量差异

临港实验室的实验动物设施选择维护保养公司全委托模式,签订1年的维护保养服务合同。合同费用包含屏障区域的人员驻场、日常维护、系统设备故障维修等服务费用,其他还覆盖单价200元以下零部件的购买费用,单价超过200元的零部件采购费用则由实验室承担。维护保养总面积为4 200 m²,包括鼠房屏障和辅助区域约2 200 m²,猴房饲养区和辅助区域约2 000 m²。2022年维护保养价格在70万左右,2023年指定耗材及品牌后的维护保养价格在80万左右。2022年度常见日常维修项目包括:每周更换4~5根紫外线灯管、2~3个洁净灯和8~10个整流器,每月更换1~2个时控开关。虽然明确地归属了限额,但是零配件质量有优劣之分,价格区间在200元以下的大部分零部件的价格会直接反映材质优劣,而维护保养单位往往会选用相对低价的产品以保证公司利润,在实际使用中很快会损坏,这势必会增加大量的维护保养工作量。2023年度指定品牌后,目前的故障率同比下降50%以上。因此,在拟定招标文件内容时需注明“200元以下零部件采购品牌由用户方指定”,以避免出现上述问题。另外,一些特殊设备、核心设备如空调机组、灭菌器、洗笼机等一旦出现核心故障,维护保养公司并无维修能力,本实验室参照行业普遍做法与厂家签订了全包或半包式的维护保养合同。

3 实验动物设施维护保养管理模式新思考

3.1 合理规划维护保养范围,融入智能化管理新理念

实验动物设施的运行维护保养涉及项目多、工作量大,应根据实际情况合理划分项目。同时,针对日常维护和值班等技术含量低但工作量大的工作,建议引入智能化报警系统、日常巡检打卡上报系统等智能化管理系统^[12],在减少人力的同时,每条异常情况均由系统记录以避免巡检人员出错遗漏,能极大提高日常维护保养工作的效率。在此基础上,年度外包可以只包含维护保养值班巡逻、日常监控报警、设备日常保养清洁以及屏障硬件的维修等工作。而针对大型运

行系统及设备如高压灭菌器、空调系统,则交由厂家维护保养,明确检修职责。这样既可解决维护保养公司核心系统维修不专业、厂家维修不及时等问题,亦可降低运行风险。而且维护保养服务的内容和工作量将更加固定,易于管理且费用稳定。

3.2 建设在线管理系统,提升维护保养工作效率

在线管理系统是衡量一个企业是否实现现代化管理的一项指标,过去的外包维护保养工作往往与内部管理系统没有交集。因此,如能建设一套集成式的管理软件,将维护保养管理纳入其中,可解决维护保养任务在派工单、电话发布中存在的“统计难”问题。通过将维护保养任务数字化,管理人员可以更加精确地掌握维护保养过程中产生的工作量、耗材数量、故障率、故障频率等数据,使维护保养工作更加易于管理。

另外,对于具有多名维护保养人员的设施可考虑引入“美团”“饿了么”等企业的抢单模式,赋予维护保养绩效成绩。管理人员通过在线派单—维护保养抢单—报修人员完成后确认—管理审核维修结果—最终获得绩效的流程管理,既可提升维护保养人员的工作积极性,也可掌握维护保养的工作进度。

3.3 组建高水平管理团队,加强监督与沟通

实验动物设施的维护保养工作涉及给排水、暖通、电气等大小十几个专业^[8]。日常运行中需要专业的管理人员进行日常的管理工作,数字化、智能化管理,低碳运行是今后实验动物设施管理的发展方向。以更加节能环保的空调机组如低能耗的溶液空调机组为例,通过APP实时接收设备运行数据、报警信息,设备可实现24 h数据监测^[13]。一旦在设备运行时发现问题,管理人员及维护保养人员通过对APP实时数据进行分析,可在厂家指导下完成对该设备的应急处理,这样就解决了最难的维护保养问题^[14]。需要指出的是,维护保养作业时,管理团队应在事前、事后进行维护保养通知,做好细节把控,以避免作业对空间环境、设备产生影响而妨碍正常工作。每季度,管理团队要对过去一段时间的维护保养工作进行总结,严格按照实验人员进出流程培训维护保养人员,综合评估维护保养难度并进行工作优化;同时,维护保养公司应根据业务评估,定期组织员工学习维护保养技能,提升维护保养服务质量。

综上所述,同行单位可以从自身设施实际出发,考虑设施硬件选型,提高团队管理水平,因地制宜地平衡技术、经费和管理成本,最大程度地降低设施运行风险,选择最合适的维护保养模式。

[作者贡献 Author Contribution]

黄跃查找及筛选文献,撰写及修改初稿;

董烨调查研究;

舒加乐负责方案策划及初稿审核。

[利益声明 Declaration of Interest]

所有作者均声明本文不存在利益冲突。

[参考文献 References]

- [1] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局,中国国家标准化管理委员会.实验动物环境及设施:GB 14925—2010[S].北京:中国标准出版社,2010.
General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the people's Republic of China; China National Standardization Administration. Laboratory animal—Requirements of environment and housing facilities:GB/T 14925-2010[S]. Beijing: China Standards Press, 2010.
- [2] 杨玉琴.实验动物屏障设施管理中面临的生物安全问题及对策探讨[J].实验动物与比较医学,2022,42(2):95-101. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2021.164.
YANG Y Q. Biosafety problems and countermeasures in the management of barrier facilities for laboratory animals[J]. Lab Anim Comp Med, 2022, 42(2): 95-101. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2021.164.
- [3] 林惠然,刘朝霞,冯小彪,等.适用于高校及科研院所的实验动物设施建设经验探讨[J].实验动物与比较医学,2022,42(5):453-457. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2022.042.
LIN H R, LIU Z X, FENG X B, et al. Discussion on the construction experience of laboratory animal facilities in universities and research institutes[J]. Lab Anim Comp Med, 2022, 42(5): 453-457. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2022.042.
- [4] 陈秋荷,刘晓玲.浅谈实验动物屏障设施的建设及管理体会:以广州中医药大学中药学院实验动物屏障设施为例[J].中国比较医学杂志,2022,32(5):98-101. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.05.014.
CHEN Q H, LIU X L. Construction and management experience of laboratory animal barrier facilities: case study of specific pathogen-free barrier facility for laboratory animals in the School of Pharmaceutical Sciences of Guangzhou University of Chinese Medicine[J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(5): 98-101. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.05.014.
- [5] 王莹,王洪军.高校动物实验管理向社会化服务模式转变的思考[J].实验室研究与探索,2017,36(3):266-268,273. DOI: 10.3969/j.issn.1006-7167.2017.03.064.
WANG Y, WANG H J. Reflection on transforming management mode of experimental animal management in university to social service[J]. Res Explor Lab, 2017, 36(3): 266-268, 273. DOI: 10.3969/j.issn.1006-7167.2017.03.064.
- [6] 吴强,任倩,华晨,等.高校实验动物设施维护保养采用社会化服务模式的实践与思考[J].实验动物与比较医学,2022,42(1):81-85. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2021.183.
WU Q, REN Q, HUA C, et al. Practice and reflection on socialized service of laboratory animal facility maintenance in colleges and universities[J]. Lab Anim Comp Med, 2022, 42(1): 81-85. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2021.183.
- [7] 李秀荣,黄治朝,李妍涵,等.无特定病原体级实验动物屏障环境设施独立通风笼系统的运行与维护[J].中国医学装备,2019,16(8):132-134. DOI: 10.3969/J.ISSN.1672-8270.2019.08.036.
LI X R, HUANG Z C, LI Y H, et al. Operation and maintenance of IVC system of barrier environment facility for SPF experimental animals[J]. China Med Equip, 2019, 16(8): 132-134. DOI: 10.3969/J.ISSN.1672-8270.2019.08.036.
- [8] 任萍萍,程津津,史晓萍.屏障系统实验动物环境设施建设及运行维护模式[J].实验动物科学,2011,28(6):57-58. DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2011.06.015.
REN P P, CHENG J J, SHI X P. Construction, Operation and Maintenance Mode of Laboratory Animal Environmental Facilities in specific pathogen free[J]. Lab Anim Sci, 2011, 28(6): 57-58. DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2011.06.015.
- [9] 王漪,张道茹,戴玉英,等.我国实验动物科学技术的基础与前沿:实验动物发展的战略思考:实验动物设施的设计特点和建议[J].中国比较医学杂志,2011,21(S1):61-65.
WANG Y, ZHANG D R, DAI Y Y, et al. The basis and frontier of laboratory animal science and technology—the strategic thinking of laboratory animal development—the design features and recommendations of laboratory animal facilities [J]. Chin J Comp Med, 2011, 21(S1): 61-65.
- [10] 赵东岳,林丹枫.实验动物屏障设施的灾难评估及灾后紧急处理[J].实验室科学,2022,25(6):214-216. DOI: 10.3969/j.issn.1672-4305.2022.06.055.
ZHAO D Y, LIN D F. Disaster assessment, prevention and emergency treatment of barrier facilities of laboratory animal [J]. Lab Sci, 2022, 25(6): 214-216. DOI: 10.3969/j.issn.1672-4305.2022.06.055.
- [11] 施赫赫,施美莲,王文健,等.新建实验动物屏障设施暖通空调自控系统的调试[J].现代畜牧科技,2023(1):19-21. DOI: 10.19369/j.cnki.2095-9737.2023.01.006.
SHI H H, SHI M L, WANG W J, et al. Debugging of HVAC automatic control system in newly built barrier facility for experimental animal[J]. Mod Anim Husb Sci Technol, 2023(1): 19-21. DOI: 10.19369/j.cnki.2095-9737.2023.01.006.
- [12] 张炜,谭莹,师廷川,等.实验动物环境设施指标集成在线监测技术探讨[J].科技风,2023(9):4-7,53. DOI: 10.19392/j.cnki.1671-7341.202309002.
ZHANG W, TAN Y, SHI T C, et al. Discussion on integrated on-line monitoring technology of environmental facilities indicators of experimental animals[J]. Technol Wind, 2023(9): 4-7, 53. DOI: 10.19392/j.cnki.1671-7341.202309002.
- [13] 李海翔,张婷,从琳,等.溶液式空调系统在实验动物中心的应用[J].暖通空调,2017,47(3):85-89.
LI H X, ZHANG T, CONG L, et al. Application of liquid desiccant air conditioning system to laboratory animal centers[J]. Heat Vent Air Cond, 2017, 47(3): 85-89.
- [14] 孙洪计,沙蕊,李祥子.SPF级实验动物屏障环境设施技术指标的检测及分析[J].包头医学院学报,2023,39(4):56-61. DOI: 10.16833/j.cnki.jbmc.2023.04.012.
SUN H J, SHA R, LI X Z. Detection and analysis of technical indicators of SPF laboratory animal barrier environmental facilities[J]. J Baotou Med Coll, 2023, 39(4): 56-61. DOI: 10.16833/j.cnki.jbmc.2023.04.012.

(收稿日期:2023-06-16 修回日期:2023-10-16)

(本文编辑:张俊彦,富群华,丁宇菁,任益凡)

[引用本文]

黄跃,董烨,舒加乐.实验动物设施运行维护和保养模式探讨[J].实验动物与比较医学,2024,44(1):92-96. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2023.078.

HUANG Y, DONG Y, SHU J L. Discussion on the operation, maintenance and care modes of laboratory animals facilities[J]. Lab Anim Comp Med, 2024, 44(1): 92-96. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2023.078.

不同麻醉通气方法在胸外科微创手术培训中的应用与比较

刘意抒¹, 赵善民², 蔡丽萍³

(1. 海军军医大学第三附属医院医学模拟中心, 上海 200438; 2. 海军军医大学基础医学院实验动物学教研室, 上海 200433; 3. 海军军医大学第一附属医院临床教育中心, 上海 200433)

[摘要] **目的** 对比单肺通气和小潮气量双肺通气麻醉方法在实验猪胸外科微创手术培训中的应用效果和安全性。**方法** 将40例接受手术机器人胸外科手术的实验猪随机分为双肺通气组 ($n=20$) 和单肺通气组 ($n=20$)。双肺通气组施行单腔气管插管, 术中使用小潮气量快呼吸频率联合二氧化碳气胸的麻醉通气方法。单肺通气组在纤维支气管镜引导下放置双腔支气管导管进行单肺通气。比较两组动物的麻醉实施指标, 包括术中心率 (heart rate, HR)、无创平均血压 (mean blood pressure, MAP)、呼气末二氧化碳 (end-tidal carbon dioxide, ETCO₂) 和血氧饱和度 (oxygen saturation, SpO₂) 等生命体征数值以及手术培训考核情况。**结果** 两组动物的插管成功率均为100%, 术中均无动物死亡。双肺通气组插管完成时间短于单肺通气组 ($P < 0.001$)。组内比较中, 双肺通气组在胸科手术开始后30 min (T_1) 和手术完成时 (T_3) 的SpO₂含量显著高于手术开始60 min (T_2) ($P < 0.05$), T_2 和 T_3 的ETCO₂、HR和MAP显著高于 T_1 ($P < 0.05$); 单肺通气组中, T_1 和 T_3 的SpO₂含量显著高于 T_2 ($P < 0.05$), ETCO₂含量随时间逐渐上升 ($P < 0.05$)。在同一时间点的组间比较中, 双肺通气组的SpO₂含量在所有时间点 (T_1 、 T_2 、 T_3) 均显著高于单肺通气组 ($P < 0.05$)。**结论** 单肺通气和双肺通气的麻醉方法都具有对术中动物生命体征的影响可控且对手术操作培训的影响较小的优点, 皆可满足胸外科手术机器人培训需求。单肺通气在肺叶切除术中体验感更好, 而使用小潮气量双肺通气的麻醉方法较单肺通气具有实施简便、无需额外购置设备的优点, 可作为实验猪胸腔镜手术时的一种麻醉补充选择。

[关键词] 实验猪; 麻醉; 胸腔镜手术; 气道管理; 手术机器人培训

[中图分类号] R-332 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2024)01-0097-08



Application and Comparison of Different Anesthetic Ventilation Methods in Minimally Invasive Thoracic Surgery Training

LIU Yishu¹, ZHAO Shanmin², CAI Liping³

(1. Medical Simulation Center of the Third Affiliated Hospital of Naval Medical University, Shanghai 200438, China; 2. Department of Laboratory Animal Science, College of Basic Medical Sciences, Naval Medical University, Shanghai 200433, China; 3. Clinical Education Center of the First Affiliated Hospital of Naval Medical University, Shanghai 200433, China)

Correspondence to: CAI Liping (ORCID: 0009-0003-5485-5506), E-mail: ccg9115@126.com

[ABSTRACT] **Objective** To compare the effectiveness and safety of one-lung ventilation and small tidal volume two-lung ventilation anesthesia methods in the training of minimally invasive thoracic surgery on experimental pigs. **Methods** Forty experimental pigs undergoing robotic thoracic surgery were randomly divided into two groups: two-lung ventilation group ($n=20$) and one-lung ventilation group ($n=20$). The two-lung ventilation group underwent single-lumen tracheal intubation, utilizing a small tidal volume with a fast respiratory rate combined with carbon dioxide pneumothorax for anesthesia ventilation during the operation. The one-lung ventilation group received one-lung ventilation using a double-lumen bronchial catheter placed under fiberoptic bronchoscopic guidance. The anesthesia implementation indexes from

[第一作者] 刘意抒(1988—), 女, 硕士, 讲师, 研究方向: 医学模拟教育、院校教育。E-mail: yishu1128@163.com。ORCID: 0009-0002-2989-4557

[通信作者] 蔡丽萍(1983—), 女, 硕士, 主管技师, 研究方向: 实验动物应用研究、医学模拟教育。E-mail: ccg9115@126.com。ORCID: 0009-0003-5485-5506

the two groups were compared, including the values of vital signs such as operative heart rate (HR), noninvasive mean blood pressure (MAP), end-tidal carbon dioxide (ETCO₂), and oxygen saturation (SpO₂), as well as the assessment of surgical training performance. **Results** The intubation success rate for animals in both groups was 100%, with no intraoperative deaths. The intubation completion time was significantly shorter in the two-lung ventilation group compared to the one-lung ventilation group ($P < 0.001$). Within each group, SpO₂ levels were significantly higher in the two-lung ventilation group at 30 minutes after the start of thoracic surgery (T₁) and at surgery completion (T₃) compared to 60 minutes after the start of surgery (T₂) ($P < 0.05$). ETCO₂, HR, and MAP were significantly higher at T₂ and T₃ compared to T₁ ($P < 0.05$). In the one-lung ventilation group, SpO₂ levels were significantly higher at T₁ and T₃ compared to T₂ ($P < 0.05$), while ETCO₂ levels gradually increasing over time ($P < 0.05$). In the between-group comparisons at the same time points, SpO₂ levels of the two-lung ventilation group were significantly higher than those of the one-lung ventilation group at all time points (T₁, T₂, T₃) ($P < 0.05$). **Conclusion** Both one-lung ventilation and two-lung ventilation anesthesia methods are effective and safe for use in surgical training, with controllable effects on intraoperative animal vital signs and minimal impact on surgical operation training, meeting the needs of robotic thoracic surgery training. One-lung ventilation provides a better experience during pneumonectomy procedures, while small tidal volume two-lung ventilation is easier to implement and does not require additional equipment purchase, making it a feasible supplemental anesthesia option for thoracoscopic surgery on experimental pigs.

[Key words] Experimental pig; Anesthesia; Thoracoscopy surgery; Airway management; Surgical robot training

达芬奇手术机器人凭借对肺癌、食管癌、纵隔肿瘤等手术治疗的显著优势^[1],在胸外科手术领域日益被广泛应用。因此,外科医生使用手术机器人的培训需求也逐年攀升。在进行胸外科专项训练时,通常使用实验猪模拟患者,进行机器人胸腔镜下肺叶切除术、淋巴清扫等操作。按照培训要求,兽医需迅速确定适用于胸腔镜的麻醉方案,维持培训过程中动物生命体征稳定,同时要确保手术视野。2017年国内首个达芬奇手术机器人国际培训中心在海军军医大学第一附属医院正式投入使用^[2],这是国内第一家使用实验猪进行达芬奇手术机器人标准化培训的平台。然而如何选择符合机器人胸腔镜下动物麻醉培训需求的麻醉方法,尚无可供参考的资料。为了填补这一领域的空白,本研究选取了40例手术机器人胸外科专项培训用猪,探讨人体临床上应用的单肺通气和双肺通气麻醉模式^[3-6]在实验猪胸腔镜手术中的应用效果,以期寻求更适合实验猪胸腔镜手术的麻醉策略,从而提高实验猪胸腔镜手术的安全性和动物福利水平。

1 材料与方法

1.1 实验动物

雌性实验用长白猪40头,3月龄,体质量为

(28±3) kg,购自上海甲干生物科技有限公司[SCXK(沪)2020-0006],饲养与实验均在海军军医大学实验动物中心普通级实验室[SYXK(沪)2022-0011]进行。所有动物健康状态良好,适应性饲养14 d且检疫合格后施行胸腔镜手术培训。按照数字表法随机将动物分为双肺通气组和单肺通气组,每组各20例。实验时两组动物体重分别为(29.55±0.80) kg和(29.70±0.72) kg,组间无明显差异($P > 0.05$)。本研究通过长海医院医学伦理委员会实验动物伦理审查并批准[CHEC(A.E)2023-012]。

1.2 实验药品与设备

舒泰50(注射用盐酸替来他明盐酸唑拉西泮)规格为替来他明125 mg+唑拉西泮125 mg(批号BN8KM7A,法国Virbac公司);硫酸阿托品注射液规格为2 mL:1 mg(批号20220312,上海全宇生物科技驻马店动物药业有限公司);兽用异氟烷规格为100 mL(批号20211101,江苏恒丰强生物技术有限公司);托芬那酸注射液规格为50 mL:2 g(批号202209161,山东信得科技股份有限公司);氯化钾注射液规格为10 mL:1 g(批号20220504,吉林省华牧动物保健品有限公司)。实验设备包括动物专用呼吸麻醉机(迈瑞EX20-Vet);生命体征监护仪(迈瑞BeneView T5);气

腹机系统（德国STORZ公司，26430520-1）；支气管镜（日本Olympus公司，cv-290）；单腔气管导管（柯惠医疗，6.5号，批号2230444FED）；双腔气管导管（柯惠医疗，32Fr/Ch-10.7mm，批号202106317X）；听诊器及达芬奇手术机器人Si系统（美国Intuitive Surgical公司，Da Vinci Si IS3000型）。

1.3 麻醉药品、用量及实验方法

两组实验猪术前禁食12 h，禁水4 h。麻醉实施前20 min经肌内注射0.04 mg/kg阿托品注射液。颈后肌内注射0.4 mg/kg舒泰进行镇定和麻醉诱导，待动物失去抵抗力后采取仰卧位固定于动物用手术床。开放耳缘静脉通路，肌内注射8 mg/kg托芬那酸注射液施行镇痛，经尿道放置导尿管。持续监护动物的心率（heart rate，HR）、无创平均血压（mean blood pressure，MAP）、呼气末二氧化碳（end-tidal carbon dioxide，ETCO₂）和血氧饱和度（oxygen saturation，SpO₂）等生命体征数值。手术结束后，调节异氟烷浓度至最高6%至少5 min，待动物进入深度麻醉后静脉注射1 g/kg氯化钾注射液实施安乐死。所有动物尸体按规定进行无害化处理。

1.3.1 双肺通气组

实验猪经口插入单腔气管导管，门齿深度24~26 cm，使用听诊器确定导管置入肺内位置，连接动物麻醉机进行麻醉维持。胸科手术操作前使用常规双肺通气，设置潮气量10~15 mL/kg，通气频率12~15次/min，呼吸比1:2。胸科手术时先暂停机械通气，开放气道后注入压力设定值为4~6 mmHg（1 mmHg=0.133 kPa）的CO₂实现人工气胸，待右侧肺塌陷后与呼吸麻醉机连接，调整为小潮气量双肺通气模式，设置潮气量4~6 mL/kg，呼吸频率20~22次/min，呼吸比1:2，异氟烷浓度2%~3%。

1.3.2 单肺通气组

实验猪经口插入左侧双腔支气管导管，利用纤维支气管镜引导确定左双腔支气管导管球囊的位置，于侧管开口处能够看到气管隆嵴及部分支气管内套囊标注为插管成功。胸科手术时开放右侧气道，注入压力设定值为4~6 mmHg的CO₂，待右侧肺完全塌陷后，封堵右侧肺通气，施行左侧肺通气模式，潮气量设置为7~9 mL/kg，频率15~18次/min，呼吸比1:2，2%~3%异氟烷进行麻醉维持。

1.4 观察指标

比较两组动物麻醉插管完成时间（min）、插管成

功率（%）、人工气胸建立后15 min（T₁）、30 min（T₂）及手术完成（T₃）时的HR、MAP、ETCO₂和SpO₂等生命体征数值，以及手术过程中机械臂碰撞次数（次）、术中出血量（mL）、手术完成时间（min）、动物死亡率（%）和中转开胸率（%）等手术操作指标。

1.5 统计学方法

采用SPSS 26.0统计学软件进行数据分析，计量资料用平均数±标准差（ $\bar{x} \pm s$ ）表示。两组间比较采用独立样本 t 检验，两组内不同时间比较采用重复测量方差分析，组间比较采用Duncan检验，以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组动物麻醉实施效果比较

双肺通气组和单肺通气组各20只动物的体重差异无统计学意义，动物体型基本一致。2组动物的插管成功率均为100%（表1）。双肺通气组使用喉镜将气管导管经声门放入气管内，无需借助额外设备即可完成气管插管术，操作简便。因此，与使用纤维支气管镜定位的单肺通气组相比，双肺通气组的插管时间更短。统计学分析显示，两组之间的插管时间存在极显著差异（ $P < 0.001$ ）。

2.2 两组动物生命体征指标比较

在双肺通气组内不同时间下，人工气胸建立后15 min（T₁）和手术完成（T₃）的SpO₂含量显著高于人工气胸建立后30 min（T₂）（ $P < 0.05$ ）；T₂和T₃的ETCO₂含量、HR和MAP均显著高于T₁（ $P < 0.05$ ），但T₂和T₃之间差异无统计学意义（ $P > 0.05$ ）。在单肺通气组内不同时间下，T₁和T₃的SpO₂含量显著高于T₂（ $P < 0.05$ ），但T₁和T₂之间差异无统计学意义（ $P > 0.05$ ）；ETCO₂含量随时间变化逐渐上升，各时间之间相比差异有统计学意义（ $P < 0.05$ ）；但HR和MAP在不同时间下差异无统计学意义（ $P > 0.05$ ）（图1）。

在同一时间下，除双肺通气组的SpO₂含量在所有时间（T₁、T₂、T₃）均显著高于单肺通气组外（ $P < 0.05$ ），双肺通气组和单肺通气组之间的ETCO₂含量、HR、MAP差异均无统计学意义（ $P > 0.05$ ）。

2.3 两组动物手术培训考核情况比较

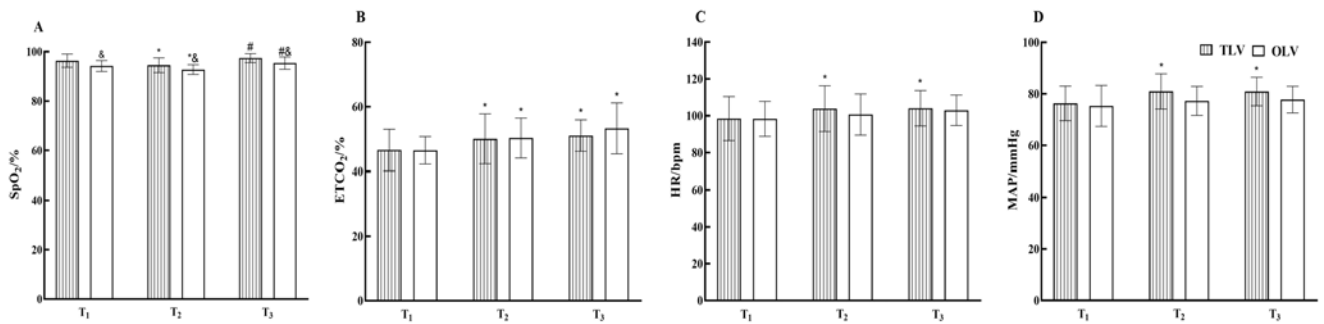
双肺通气组和单肺通气组的机械臂碰撞次数、手术时间、出血量差异均无统计学意义（ $P > 0.05$ ）；2组间的死亡率和转开放手术率均为0%，差异也均无统计学意义（ $P > 0.05$ ）（图2）。达芬奇手术机器人在操作过

表1 两组动物麻醉实施指标比较

Table 1 Comparison of anesthesia implementation indexes between two groups of animals

($\bar{x} \pm s$)

指标 Indexes	双肺通气组 (n=20) Two-lung ventilation group	单肺通气组 (n=20) One-lung ventilation group	t值	P值
动物体质量/kg Animal body weight/kg	29.55±0.80	29.70±0.72	0.625	0.535
插管用时/min Intubation time/min	5.25±1.30	14.35±3.27	-11.557	<0.001
插管成功率/% Intubation success rate/%	100±0	100±0	-	-



注：A~D，人工气胸建立后15 min (T₁)、30 min (T₂)及手术完成 (T₃)时的血氧饱和度 (SpO₂)、呼气末二氧化碳 (ETCO₂)、心率 (HR)、平均血压 (MAP) 数值结果。TLV为双肺通气组 (n=20)，OLV为单肺通气组 (n=20)。与T₁比较，*P<0.05；与T₂比较，#P<0.05；与TLV比较，&P<0.05。

Note: A-D, the numerical values of blood oxygen saturation (SpO₂), end-expiratory carbon dioxide (ETCO₂), heart rate (HR), and mean blood pressure (MAP) at 15 minutes (T₁), 30 minutes (T₂) after the establishment of artificial pneumothorax, and completion of surgery (T₃). TLV represents the two-lung ventilation group (n=20), while OLV represents the one-lung ventilation group (n=20). Compared with T₁, *P<0.05; Compared with T₂, #P<0.05; Compared with the TLV group, &P<0.05.

图1 两组动物的生命体征指标比较

Figure 1 Comparison of vital signs indices between two groups of animals

程中，由于视野受阻或操作空间狭小，机械臂碰撞的风险会增加，从而导致机器损坏或手术风险增加，甚至可能导致术中严重出血，迫使转为开放手术。本研究两组机械臂碰撞数据均较低且无明显差异，术中出血量和手术时间也未出现明显差异，表明两种麻醉通气方法均能提供良好的手术视野和操作空间。另外，两组动物的死亡率和术中转开放率均为0%，说明两种麻醉通气方法都能提供培训所需的操作空间。

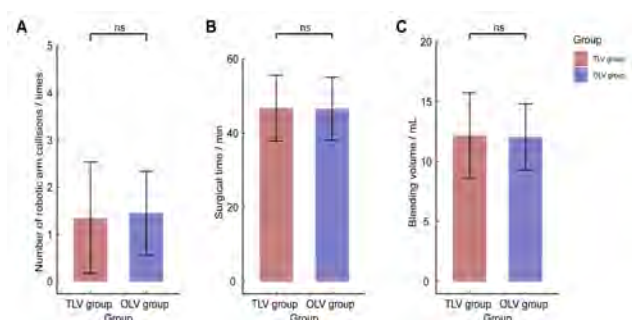
2.4 两组动物胸腔镜下手术视野比较

根据达芬奇手术机器人培训实施要求，动物在进行胸腔镜手术时应选择适当的麻醉通气方式，以确保手术视野充分暴露，并避免因视野被阻挡或操作空间狭小而增加机械臂碰撞次数或术中出血量。研究结果显示，两组机械臂碰撞数据均较低且无统计学意义的

差异，表明两种麻醉通气方法均能提供良好的手术视野和操作空间，对分离、切除等培训操作没有影响。具体视野如图3所示。在单肺通气中，由于完全封堵术侧肺通气，仅向对侧肺脏进行通气，因此术中术野不受通气因素的影响，能保持相对静止。而在双肺通气时，术侧肺脏采用小潮气持续通气模式，术侧肺脏虽未完全萎陷和静止，但未对手术操作造成不良影响。

2.5 手术机器人培训的实验猪麻醉策略与方法

两组动物手术数据对比证实了单肺通气或小潮气量双肺通气联合CO₂气胸模式都可满足培训麻醉需求，我们据此制定了适用于手术机器人培训的实验猪麻醉策略与方法，见图4。在完成动物麻醉诱导后，可以根据培训内容选择适合的动物麻醉通气方式。对于食管

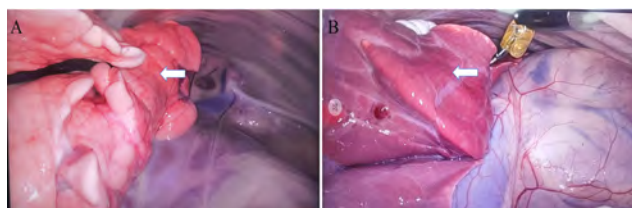


注：A~C，手术过程中机械臂碰撞次数（次）、手术时间（min）和出血量（mL）数值结果比较。TLV为双肺通气组（ $n=20$ ），OLV为单肺通气组（ $n=20$ ）。与双肺通气组相比， $^{ns}P>0.05$ 。

Note: A-C, the number of robotic arm collisions (times), surgical time (min), and blood loss (mL) during the surgical procedure. TLV represents the two-lung ventilation group ($n=20$), while OLV represents the one-lung ventilation group ($n=20$). $^{ns}P>0.05$, vs TLV group.

图2 两组动物手术培训考核情况比较

Figure 2 Comparison of surgical training assessment between the two groups of animal surgeries



注：A为双肺通气组胸腔镜下视野，其中白色箭头指示小潮气量通气模式下的肺叶。B为单肺通气组胸腔镜下视野，其中白色箭头指示已塌陷的肺叶。

Note: Figure A shows the view under thoracoscopy of the two-lung ventilation group, with the white arrow indicating the lung lobe under low tidal volume ventilation mode. Figure B shows the view under thoracoscopy of the one-lung ventilation group, with the white arrow indicating the collapsed lung lobe.

图3 两组动物胸腔镜下手术视野比较

Figure 3 Comparison of the thoracoscopic surgical field between the two groups of animals

切除术、纵隔淋巴清扫等对术侧肺塌陷和视野静止度要求不高的术式，可以选择双肺通气，并插入6.5号单腔气管导管。而对于部分肺叶切除术，可选择单肺通气，并插入32 Fr/Ch双腔支气管导管至左肺支气管，以获得术中相对静止稳定的视野。在进行胸腔手术前，两组都需要先暂停常规双肺通气，开放气道后实施二氧化碳气胸使术侧肺脏塌陷。双肺组调整通气方式，术中持续实施小潮气量快呼吸频率联合二氧化碳的麻醉通气方法。单肺通气组封堵右肺通气，实施左肺通气模式。术中持续监测动物的生命体征。完成培训后，调整异氟烷浓度至6%，持续至少5 min后，通过静脉

注射1 g/kg氯化钾实施安乐死术，统一采取无害化处理。

3 讨论

作为微创外科最先进的技术，以达芬奇机器人手术为代表的机器人辅助胸科手术凭借其高清立体的手术视野、高度灵活的机械臂和仿真手腕、有效滤除人手自然颤动等优势，在外科领域逐渐被认可并广泛应用^[7-9]。达芬奇手术机器人是目前国际上应用最广泛的手术机器人系统。该系统已在全世界范围内广泛应用于肺、食管、纵隔等胸外科常规手术，特别是在一些空间相对狭小的胸外科手术场景中可能优于传统胸科手术^[10]。手术机器人培训中心用实验猪模拟临床手术环境^[11]，对兽医麻醉操作时间、动物术中状态，以及充分暴露目标脏器提供手术视野等有一定要求。目前国内外对适用于手术机器人培训的实验动物麻醉方法和策略，尤其是胸腔镜下实验猪的麻醉，尚无可参考的文献或实施建议。

人体临床上的胸腔镜手术中一般采用双腔支气管插管的方式实现健侧单肺通气及术侧肺脏塌陷的麻醉方法，让手术视野暴露更充分，方便手术操作^[12-14]。但支气管导管定位不准确易造成患者术中出现低氧血症、气道压升高、CO₂蓄积等并发症^[15]，且双腔支气管插管的管体粗、放置位置深，必须使用纤维支气管镜辅助定位。该方法操作繁琐、耗时长，若无纤维支气管镜设备则成功率更低。另外在手术过程中因体位翻转可能导致导管移位，影响麻醉管理，严重时甚至影响手术治疗效果^[16-17]。近年来有文献报告，在胸腔镜手术中使用小潮气量双肺通气联合CO₂气胸的麻醉方法也可提供安全有效的气道管理。

本研究显示，双肺通气组和单肺通气组虽然插管成功率都是100%，但是双肺通气组只需要将单腔气管插管置入气管内，无需额外借助纤维支气管镜定位，操作较单肺通气组简便、用时短，两组间插管时间具有极显著统计学差异（ $P<0.001$ ）。在麻醉诱导过程中，迅速建立气管通道可满足培训要求，对于应对动物突发性呼吸骤停也具有重要作用，其能有效降低动物意外死亡率，保证动物福利。如图1所示，建立气管通道时间对SpO₂含量、ETCO₂含量、HR、MAP的影响明显（ $P<0.001$ ）；SpO₂含量在两组间比较差异明显（ $P<0.005$ ）；时间×组别的交互作用则对ETCO₂含量、HR、MAP的影响不明显（ $P>0.05$ ）。

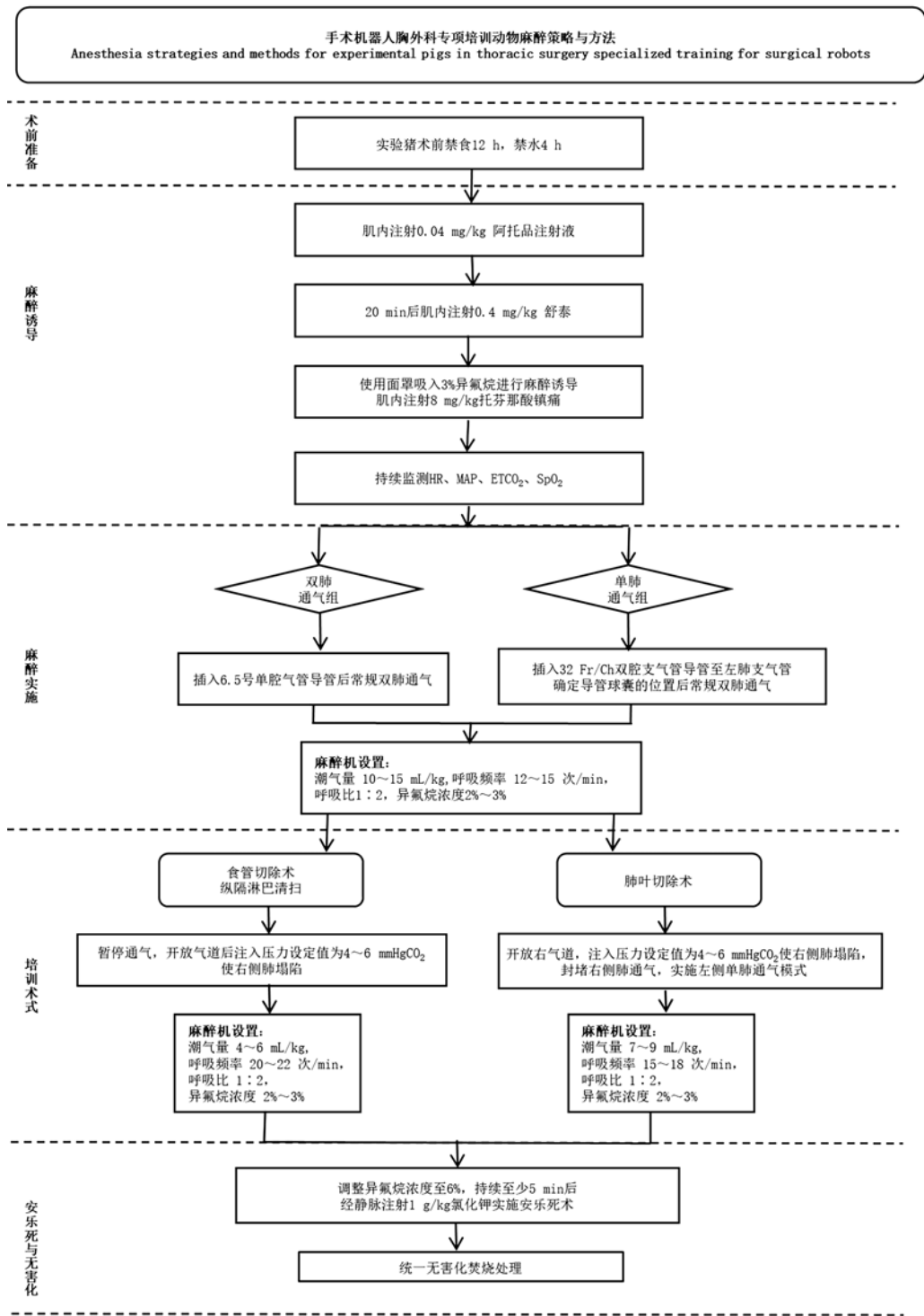


图4 手术机器人胸外科专项培训中实验猪的麻醉策略与方法

Figure 4 Anesthesia strategies and methods for experimental pigs in specialized training for robotic thoracic surgery

手术中两组动物的SpO₂都在人工气胸建立后30 min (T₂) 时下降 (P<0.05), 双肺通气组的SpO₂含量在所有时间段 (T₁、T₂、T₃) 均显著高于单肺通气组 (P<0.05)。SpO₂是血液中氧含量的估计值, 通过监护仪等设备采用非侵入性方法可方便持续估测氧血红蛋白

白相对于血液中血红蛋白总量的百分比值, 这是评估呼吸系统功能的重要指标。T₂时因部分肺组织切除造成肺功能受损, 机体处于高应激状态下, 释放大量的血管活性物质导致肺泡上皮和血管内皮通透性增高, 诱发大量炎症因子, 刺激呼吸中枢导致缺血缺氧^[18]。

本研究显示 T_2 时 SpO_2 值虽显著下降,但仍在安全范围内。双肺通气组因术侧部分仍有机械通气和血流供氧,较单肺通气组降低了低氧血症的发生率,因此双肺通气组同时时间段的 SpO_2 值高于单肺通气组。

两组动物的 $ETCO_2$ 值均随着时间变化逐渐上升,人工气胸建立后30 min (T_1)和手术完成(T_3)高于人工气胸建立后15 min (T_1) ($P<0.05$)。 $ETCO_2$ 作为一种新型的无创监测技术,被广泛应用于术中监护,通过监测能够直观地显示出患者的肺血流及通气状况,降低了不良事件的发生概率^[19]。手术中向胸腔内注入 CO_2 气体促使术侧肺脏塌陷,提供手术操作空间,在一定程度上会降低肺的顺应性,增加气道阻力和无效腔的气体量,从而导致通气障碍的发生^[20]。手术过程中胸腔内注入的 CO_2 经肺部创面吸收导致 $ETCO_2$ 值升高。两组动物的HR和MAP数值在同组的不同时间段内随着时间延长而增加 ($P<0.01$ 和 $P<0.05$),提示在术中动物出现了血流动力学指标的波动,其原因可能是胸腔压力的增加使心脏搏动产生压迫,继而出现HR代偿性增加。但总体分析,无论是HR还是MAP,都在正常可接受范围内,未引起循环障碍。由此可知,两组动物在术中的生命体征都符合培训要求。

两组动物的死亡率和术中转开放率都为0,说明两种麻醉通气方法是安全可行的。术中出血量和手术时间也未有明显差异,提示无论是双肺通气组还是单肺通气组都符合胸外科手术机器人培训的实施要求。

综上所述,实施单肺通气时,因术侧肺脏被封堵,术中未产生通气,因此在整个手术过程中得到清晰且相对静止的手术视野,且完全塌陷后的术侧肺脏体积小,占据术中视野较少,对于切除肺脏术的操作干扰较小,术者体验感更好,可作为肺叶切除术的首选麻醉方法。实施双肺通气时,使用单腔气管插管具有操作简单、完成插管耗时短、技术易掌握、无需添置额外纤维支气管镜设备等优势。术中持续通气的方法虽然可以提升动物的 SpO_2 ,但无法做到术侧肺脏相对静止,术者的体验感会比单侧通气组降低。在食管切除术或纵隔淋巴清扫等手术中,双肺通气方法对手术目标脏器的感官体验感影响不大且操作方便,可作为首选麻醉方法。

[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长海医院伦理委员会审查批准[CHec(A.E)2023-012]。所有实验过程均遵照中国实验动物相关法律法规条例要求进行。

All experimental animal protocols in this study were reviewed and approved by the Shanghai Changhai Hospital Ethics Committee[No.CHEC(A.E)2023-012]. All experimental procedures were performed in accordance with the requirements of laws and regulations in China related to experimental animals.

[作者贡献 Author Contribution]

刘意抒负责论文撰写、投稿及修稿;
赵善民负责实验方案构思与设计、数据分析与统计;
蔡丽萍负责实验实施与相关指标检测、论文中结果图的制作与修改、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] 方学森,李少军,陈平,等.机器人手术在胸外科的应用进展[J]. 机器人外科学杂志(中英文), 2022, 3(3):235-239. DOI:10.12180/j.issn.2096-7721.2022.03.012.
FANG X S, LI S J, CHEN P, et al. Application progress of surgical robot in thoracic surgery[J]. Chin J Rob Surg, 2022, 3(3):235-239. DOI:10.12180/j.issn.2096-7721.2022.03.012.
- [2] 李建萍,刘意抒,蔡丽萍,等.达芬奇手术机器人国际培训中心建设[J]. 解放军医院管理杂志, 2017, 24(12):1156-1158. DOI:10.16770/j.cnki.1008-9985.2017.12.016.
LI J P, LIU Y S, CAI L P, et al. Construction of the da vinci surgical robot international training center[J]. Hosp Adm J Chin People's Liberation Army, 2017, 24(12):1156-1158. DOI:10.16770/j.cnki.1008-9985.2017.12.016.
- [3] 张维峰,殷国平,邓友明,等.小潮气量肺保护性通气策略在胸腔镜下行肺结核纤维板剥脱术患者的应用价值[J]. 江苏医药, 2022, 48(9): 935-938. DOI: 10.19460/j. cnki. 0253-3685.2022.09.017.
ZHANG W F, YIN G P, DENG Y M, et al. Application value of protective strategy of low tidal volume lung ventilation in patients undergoing pulmonary tuberculosis fiberboard exfoliation under thoracoscopy[J]. Jiangsu Med J, 2022, 48(9): 935-938. DOI:10.19460/j.cnki.0253-3685.2022.09.017.
- [4] 张幸.胸腔镜食管癌根治术采用小潮气量快频率双肺通气联合右美托咪定效果观察[J]. 辽宁医学杂志, 2022, 36(2):12-15.
ZHANG X. Thoracic mirror esophageal cancer cure using low tide gas volume fast frequency double lung ventilation combined right metometomoto effect observation[J]. Med J Liaoning, 2022, 36(2): 12-15.
- [5] 孙清超,程虎,宗亮,等.双肺通气联合 CO_2 气胸对胸腹腔镜食管癌根治术患者血气分析及血流动力学的影响[J]. 实用临床医药杂志, 2022, 26(1): 67-70. DOI: 10.7619/jcmp.20213678.
SUN Q C, CHENG H, ZONG L, et al. Influence of bipulmonary ventilation combined with CO_2 pneumothorax on blood gas analysis and hemodynamics in patients with thoracoscopic radical resection for esophageal cancer [J]. J Clin Med Pract, 2022, 26(1): 67-70. DOI: 10.7619/jcmp.20213678.
- [6] 张梦,刘妹女,张焕焕,等.肺开放通气策略对胸腔镜肺癌根治术

- 老年患者术后认知功能的影响[J]. 中国医药, 2023, 18(3): 360-364. DOI: 10.3760/j.issn.1673-4777.2023.03.009.
- ZHANG M, LIU M N, ZHANG H H, et al. The effect of open-lung approach on postoperative cognitive function in elderly patients undergoing thoracoscopic lung cancer radical surgery[J]. China Med, 2023, 18(3): 360-364. DOI: 10.3760/j.issn.1673-4777.2023.03.009.
- [7] 贾昱欣, 张亚杰, 李鹤成. 机器人手术在胸外科的应用现状与进展[J]. 机器人外科学杂志(中英文), 2022, 3(5):367-375. DOI: 10.12180/j.issn.2096-7721.2022.05.003.
- JIA Y X, ZHANG Y J, LI H C. Applications and advances of robotic surgical system in thoracic surgery[J]. Chin J Rob Surg, 2022, 3(5):367-375. DOI: 10.12180/j.issn.2096-7721.2022.05.003.
- [8] 李艳君, 谭祥秀. 机器人辅助胸腔镜手术在胸外科的应用现状及展望[J]. 中国医学创新, 2023, 20(15): 170-174. DOI: 10.3969/j.issn.1674-4985.2023.15.041.
- LI Y J, TAN X X. Application status and prospect of robot-assisted thoracoscopic surgery in thoracic surgery[J]. Med Innov China, 2023, 20(15): 170-174. DOI: 10.3969/j.issn.1674-4985.2023.15.041.
- [9] 陈康, 阿布都买拉木·阿布都吾甫尔, 马金山, 等. 机器人与胸腔镜手术治疗早期肺癌的疗效对比[J]. 新疆医学, 2022(10):1139-1144, 1174.
- CHEN K, ABUDUMAILAMU A, MA J S, et al. Comparison about efficacy between Robot-assisted and thoracoscopic radical operation of early stage lung cancer[J]. Xinjiang Medical Journal, 2022(10):1139-1144, 1174.
- [10] 马洪海, 胡坚. 发展前进中的胸外科手术机器人[J]. 机器人外科学杂志(中英文), 2022, 3(1):1-3, 85. DOI: 10.12180/j.issn.2096-7721.2022.01.001.
- MA H H, HU J. Advancing thoracic surgical robot[J]. Chin J Rob Surg, 2022, 3(1):1-3, 85. DOI: 10.12180/j.issn.2096-7721.2022.01.001.
- [11] 刘意抒, 蔡丽萍, 李建萍, 等. 达芬奇手术机器人培训开展情况分析[J]. 解放军医院管理杂志, 2018, 25(7):652-654. DOI: 10.16770/j.cnki.1008-9985.2018.07.016.
- LIU Y S, CAI L P, LI J P, et al. Analysis and thinking on the development of da vinci surgical robot training project[J]. Hosp Adm J Chin People's Liberation Army, 2018, 25(7):652-654. DOI: 10.16770/j.cnki.1008-9985.2018.07.016.
- [12] 吕艳辉. 纤维支气管镜引导下双腔支气管导管插管在胸外科手术麻醉中的应用效果[J]. 中国医药指南, 2021, 19(15):55-56. DOI: 10.15912/j.cnki.gocm.2021.15.022.
- LYU Y H. Application effect of double-cavity bronchial catheter intubation guided by fiberoptic bronchoscopy in thoracic surgical anesthesia[J]. Guide China Med, 2021, 19(15): 55-56. DOI: 10.15912/j.cnki.gocm.2021.15.022.
- [13] 买买提艾力·阿不都哈得尔. 双腔支气管插管在胸外科手术麻醉中的应用价值分析[J]. 临床合理用药杂志, 2020, 13(23):165-167. DOI: 10.15887/j.cnki.13-1389/r.2020.23.079.
- MAIMAITIALI A. Application value analysis of double-lumen bronchial intubation in thoracic surgery anesthesia[J]. Chin J Clin Ration Drug Use, 2020, 13(23): 165-167. DOI: 10.15887/j.cnki.13-1389/r.2020.23.079.
- [14] MARCHANT B E, MILLER S A, ROYSTER R L. Cerebral desaturation and one-lung ventilation[J]. J Cardiothorac Vasc Anesth, 2021, 35(2):551-554. DOI: 10.1053/j.jvca.2020.09.098.
- [15] 杜素贞, 王茜, 马洪涛, 等. 胸腔镜手术中可视双腔支气管导管插管学习曲线的建立[J]. 中国现代医药杂志, 2021, 23(5):58-60.
- DU S Z, WANG Q, MA H T, et al. Establishment of learning curve for intubation of visual double-lumen bronchial catheter in thoracoscopic surgery[J]. Mod Med J China, 2021, 23(5):58-60.
- [16] 史志国, 韩毅, 高广阔, 等. 可视双腔支气管导管在肥胖患者单肺通气中的应用效果观察[J]. 实用临床医药杂志, 2021, 25(10):37-39, 44. DOI:10.7619/jcmp.20211361.
- SHI G Z, HAN Y, GAO G K, et al. Observation on effect of visual double-lumen bronchial catheter in one-lung ventilation of obese patients[J]. J Clin Med Prac 2021, 25(10): 37-39, 44. DOI:10.7619/jcmp.20211361.
- [17] 王植, 李汝泓, 杨雷. 全麻诱导期机械通气不同吸呼比对氧储备的影响[J]. 世界复合医学, 2022, 8(10): 98-101. DOI: 10.11966/j.issn.2095-994X.2022.08.10.25.
- WANG Z, LI R H, YANG L. Effects of different breathing ratios of mechanical ventilation on oxygen reserve during induction of general anesthesia[J]. World J Complex Med, 2022, 8(10): 98-101. DOI: 10.11966/j.issn.2095-994X.2022.08.10.25.
- [18] 鲍巧珍, 姜宁宁, 黄麟英. ICU 脑梗死患者合并肺部感染的独立危险因素分析[J]. 中国公共卫生管理, 2022, 38(5):695-698. DOI: 10.19568/j.cnki.23-1318.2022.05.0032.
- BAO Q Z, JIANG N N, HUANG G Y. Analysis of independent risk factors of pulmonary infection in patients with cerebral infarction in ICU[J]. Chin J Public Health Manag, 2022, 38(5): 695-698. DOI: 10.19568/j.cnki.23-1318.2022.05.0032.
- [19] 丁丽红. 临床麻醉中呼气末二氧化碳分压监测的临床应用及意义[J]. 中国现代药物应用, 2018, 12(16):69-70. DOI: 10.14164/j.cnki.cn11-5581/r.2018.16.040.
- DING L H. Clinical application and significance of monitoring end-expiratory carbon dioxide partial pressure in clinical anesthesia[J]. Chin J Mod Drug Appl, 2018, 12(16):69-70. DOI: 10.14164/j.cnki.cn11-5581/r.2018.16.040.
- [20] RIJKENHUIZEN A B M, LICHTENBERG D, WEITKAMP K. Cystic intra-abdominal testicles: standing laparoscopic removal in two colts[J]. Equine Vet Educ, 2020, 32(8): e130-e135. DOI: 10.1111/eve.13030.
- (收稿日期:2023-09-27 修回日期:2023-12-04)
(本文编辑:张俊彦, 富群华, 丁宇菁, 周烁)
- [引用本文]**
刘意抒, 赵善民, 蔡丽萍. 不同麻醉通气方法在胸外科微创手术培训中的应用与比较[J]. 实验动物与比较医学, 2024, 44(1): 97-104. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2023.135.
- LIU Y S, ZHAO S M, CAI L P. Application and comparison of different anesthetic ventilation methods in minimally invasive thoracic surgery training[J]. Lab Anim Comp Med, 2024, 44(1): 97-104. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2023.135.



庞万勇, 兽医学博士, 中国实验动物学会认证的实验动物高级医师, 美国实验动物医学学会认证的实验动物专科兽医师, 以及中国兽医病理学家分会认证的兽医病理师。中国实验动物学会常务理事、实验动物医师工作委员会主任委员、实验动物福利伦理专业委员会秘书长, 中国合格评定国家认可委员会实验动物专业委员会委员, 中华医学会医师培训工程-中华医学人文培训工程专家委员会委员, 国际AAALAC认可委员会委员, 世界兽医协会理事 (代表实验动物专科兽医师)。本科和硕士毕业于中国农业大学动物医学院, 博士毕业于爱尔兰国立都柏林大学兽医学院, 曾在丹麦哥本哈根大学从事实验动物医学博士后研究。现任赛诺菲公司全球研发中心转化体内模型研究平台总监, 负责该公司在全球范围内动物实验外包和合作业务的动物福利合规事务, 并协调该公司在中国的临床申报项目中的临床前研究部分。发表论文36篇, 其中SCI论文20篇。



陶雨风, 日本京都大学博士, 中国合格评定国家认可委员会 (CNAS) 高级工程师。CNAS兽医领域实验室认可高管, 动植物检疫专业委员会委员及秘书, 主任评审员。国家认监委认证认可国际组织人才库专家, 亚太认可合作组织 (APAC) 国际同行评审员。参与国家重点研发计划重点专项“食品安全检验在线质控系统研究2018YFC1603400”、基础科研条件与重大科学仪器设备研发2022年度重点专项“实验动物共性关键质量评价技术标准研究2022YFF0711000”等研究工作。主持制定认可文件CNAS-CL01-A013《检测和校准实验室能力认可准则在动物检疫领域的应用说明》、CNAS-CL01-A023《检测和校准实验室能力认可准则在实验动物检测领域的应用说明》和CNAS-CL01-A012、CNAS-CL01-A014、CNAS-GL043、CNAS-GL041等。近5年发表核心期刊论文15篇, 主要研究方向为实验室认可技术及质量控制。

马政文, 神经生物学博士, 中国神经科学学会会员 (CSFN)、美国神经科学学会会员 (SFN)。从本科到博士均就读于上海交通大学医学院, 其间曾赴美在肯塔基州路易斯维尔大学脊髓损伤研究中心 (Kentucky Spinal Cord Injury Research Center) 研究脊髓损伤。回国后根据研究发展和临床治疗的需要, 研究方向由啮齿类动物转向灵长类动物, 参与欧洲天使基金会的猴脊髓损伤课题, 获得“上海市高校优秀青年教师”称号。现任上海交通大学医学院副研究员, 主持二项国家自然科学基金项目, 至今在国内外学术期刊上发表论文50余篇, 其中以第一作者或通信作者身份发表论文14篇, 申请专利2项, 参编著作3部。



《动物研究:体内实验报告》即ARRIVE 2.0指南的解释和阐述(五)

马政文¹, 李夏莹², 刘晓宇³, 李 喆¹, 王 剑¹, 卢 今¹, 陈国元⁴, 卢 晓⁵, 白 玉⁶, 卢选成⁷, 刘永刚⁸, 陶雨风⁹, 庞万勇¹⁰

(1. 上海交通大学医学院实验动物科学部, 上海 200025; 2. 北京大学 生命科学学院 实验动物中心, 北京 100871; 3. 中国疾病预防控制中心职业卫生与中毒控制所, 北京 100050; 4. 中国科学院分子细胞科学卓越创新中心动物实验技术平台, 上海 200031; 5. 迪哲医药股份有限公司, 上海 201203; 6. 北京诺和诺德医药科技有限公司, 北京 102206; 7. 中国疾病预防控制中心, 传染病溯源预警与智能决策全国重点实验室, 北京 102206; 8. 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所, 哈尔滨 150001; 9. 中国合格评定国家认可中心, 北京 100062; 10. 赛诺菲公司全球研发中心转化体内模型研究平台, 北京 100022)

[摘要] 提高生物医学研究结果的可重复性是一项重大挑战, 研究人员透明且准确地报告其研究过程有利于读者对

[基金项目] 国家重点研发计划“实验动物共性关键质量评价技术标准研究”(2022YFF0711000); 中国科学技术期刊编辑学会2023年翰笔计划医学中青年编辑科研项目“动物实验医学研究及报告规范化的国际对标(指南汉化推广)”(HBJH-2023-A16)

[第一作者] 马政文(1972—), 女, 博士, 副研究员, 研究方向: 神经生物学、实验动物医学。E-mail: mazhengwen@shsmu.edu.cn。ORCID: 0009-0001-6224-5789

[通信作者] 陶雨风(1970—), 女, 博士, 高级工程师, 研究方向: 分子免疫学。E-mail: taoyf@cnas.org.cn。ORCID: 0000-0003-1925-1048; 庞万勇(1974—), 男, 兽医学博士, 研究方向: 实验动物医学。E-mail: pang1yong@outlook.com。ORCID: 0000-0002-0724-2016

该研究结果的可靠性进行评估,进而重复该实验或在该成果的基础上进一步探索。ARRIVE 2.0 指南是英国国家 3Rs 中心 (NC3Rs) 于 2019 年组织发布的一份适用于任何与活体动物研究报告相关的指导性清单,用以提高动物体内实验设计、实验实施和实验报告的规范性,以及动物实验结果的可靠性、可重复性和临床转化率。ARRIVE 2.0 指南的使用不仅可以丰富动物实验研究报告的细节,确保动物实验结果信息被充分评估和利用,还可以使读者准确且清晰地了解作者所表述的内容,促进基础研究评审过程的透明化和完整性。本文是在国际期刊遵循 ARRIVE 2.0 指南的最佳实践基础上,对 2020 年发表于 *PLoS Biology* 期刊上的 ARRIVE 2.0 指南完整解读版 (<https://arriveguidelines.org>) 第五部分包括“推荐 11 条”里的第 6~11 条:“动物照护和监测”、“解析/科学阐释”、“可推广性/转化”、“研究方案注册”、“数据获取”和“利益冲突声明”等内容进行了编译、解释和阐述,以期促进国内研究人员充分理解并使用 ARRIVE 2.0 指南,提高实验动物研究及报告的规范性,助推我国实验动物科技与比较医学研究的高质量发展。

[关键词] 动物实验; ARRIVE 2.0 指南; ARRIVE 推荐 11 条; 疼痛管理; 动物照护和监测

[中图分类号] R-332 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2024)01-0105-10



Interpretation and Elaboration for the ARRIVE Guidelines 2.0—Animal Research: Reporting *In Vivo* Experiments (V)

MA Zhengwen¹, LI Xiaying², LIU Xiaoyu³, LI Yao¹, WANG Jian¹, LU Jin¹, CHEN Guoyuan⁴, LU Xiao⁵, BAI Yu⁶, LU Xuancheng⁷, LIU Yonggang⁸, TAO Yufeng⁹, PANG Wanyong¹⁰

(1. Department of Laboratory Animal Science, School of Medicine, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200025, China; 2. Peking University, School of Life Science, laboratory research Center, Beijing 100871, China; 3. National Institute for Occupational Health and Poison Control, Beijing 100050, China; 4. Center for Excellence in Molecular Cell Science, Chinese Academy of Science, Shanghai 200031, China; 5. Dizal Pharmaceuticals Co., Ltd., Shanghai 201203, China; 6. Novo Nordisk Research Centre China, Beijing 102206, China; 7. National Key Laboratory of Intelligent Tracking and Forecasting for Infectious Diseases (NITFID), Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China; 8. Harbin Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150001, China; 9. China National Accreditation Service for Conformity Assessment, Beijing 100062, China; 10. Translational *In Vivo* Model Research Platform, Sanofi G&D, Beijing 100022, China)

Correspondence to: TAO Yufeng (ORCID: 0000-0003-1925-1048), E-mail: taoyf@cnas.org.cn;

PANG Wanyong (ORCID: 0000-0002-0724-2016), E-mail: pang1yong@outlook.com

[ABSTRACT] Improving the reproducibility of biomedical research results is a major challenge. Transparent and accurate reporting of the research process enables readers to evaluate the reliability of the research results and further explore the experiment by repeating it or building upon its findings. The ARRIVE 2.0 guidelines, released in 2019 by the UK National Centre for the Replacement, Refinement and Reduction of Animals in Research (NC3Rs), provide a checklist that is applicable to any *in vivo* animal research report. These guidelines aim to improve the standardization of experimental design, implementation, and reporting, as well as enhance the reliability, repeatability, and clinical translation of animal experimental results. The use of the ARRIVE 2.0 guidelines not only enriches the details of animal experimental research reports, ensuring that information on animal experimental results is fully evaluated and utilized, but also enables readers to understand the content expressed by the author accurately and clearly, promoting the transparency and completeness of the fundamental research review process. At present, the ARRIVE 2.0 guidelines have been widely adopted by international biomedical journals. This article is based on the best practices following the ARRIVE 2.0 guidelines in international journals, and it interprets, explains, and elaborates in Chinese the fifth part of the comprehensive version of the ARRIVE 2.0 guidelines published in *PLoS Biology* in 2020 (the original text can be found at <https://arriveguidelines.org>). This section includes the items 6-11 of Recommended 11 section, covering "Animal Care and Monitoring", "Interpretation/Scientific Implications", "Generalisability/Translation", "Protocol Registration", "Data

Access" and "Declaration of Interests". Its aim is to promote a comprehensive understanding and use of the ARRIVE 2.0 guidelines among domestic researchers, to enhance the standardization of experimental animal research and reporting, and to promote high-quality development of experimental animal sciences and comparative medicine research in China.

[Key words] Animal experiment; ARRIVE 2.0 guidelines; ARRIVE Recommended set; Pain management; Animal care and monitoring

透明且准确的报告对于提高生物科学研究结果的可重复性是至关重要的,它有助于研究人员评估研究方法的严谨性、研究结果的可靠性,进而重复该实验或在该成果的基础上进行深入探索。英国国家3Rs中心(NC3Rs)在2010年发布了ARRIVE指南即《动物研究:体内实验报告》(*Animal Research: Reporting In Vivo Experiments*)^[5]。2020年对该指南进行修订,并于*PLoS Biology*期刊发表了ARRIVE 2.0指南及其完整解读版^[13-14](与前文可见<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000411>)。该指南陈列了一份适用于活体动物研究报告的指导性清单和详细说明,用以指导实验设计、实验实施和实验报告等整个动物实验研究过程的规范性和准确性。其中“关键10条”构成了研究报告的最低要求,而“推荐条目集”则为所述研究提供了更多的背景内容。《实验动物与比较医学》于2023年第43卷第1~4、6期分别对ARRIVE 2.0指南的相关信息^[15]以及关键10条^[103-104,155]和推荐11条中部分内容进行了详细解读^[219]。本文将继续对“推荐11条”中的第6~11条(即条目16~21),包括“动物照护和监测”、“解析/科学阐释”、“可推广性/转化”、“研究方案注册”、“数据获取”和“利益冲突声明”等内容进行相应编译介绍,以期促进国内研究人员充分理解ARRIVE 2.0指南,从而将指南建议应用到研究设计中,并在研究实施过程中遵循指南、收集报告所需的信息,以提高动物实验研究及报告的准确性、规范性和可重复性。

2.6 条目16:动物照护和监测

2.6.1 子条目16a:描述在实验方案中未减轻动物疼痛、折磨和苦难而采取的任何干预性措施或步骤

解释:一个安全有效的镇痛方案对缓解动物疼痛、折磨和苦难是至关重要的。未经处治的疼痛会影响动物的生理习性,同时增加实验的可变性。然而,某些特定的疼痛管理方案也会引入可变性,从而影响实验数据^[220-221]。同时,对动物福利管理方案的报告不足也导致实验方法不合规、镇痛及其他福利措施不到位或不适当等现象长期存在^[221]。因此,对缓解疼痛、

折磨和苦难方案的详细描述可以为研究人员提供实用的信息以重复该方法。

应明确描述疼痛管理策略,包括:特异性镇痛药;给药方法(例如配方、途径、剂量、浓度、体积、频率、时机和使用的设备);选择理由(例如动物模型、疾病/病理、方案、作用机制、药代动力学、人员安全);减轻疼痛的修正方案(例如更改麻醉方案、增加监测频率、修改方案、适应性训练等)。

在实验/手术过程中,如果由于实验原因而没有使用合理预期该用的止痛剂或其他福利措施,则应提供科学依据^[222]。

报告示例1:“如果仔猪出现腹泻,给予电解质溶液并补充水;如果腹泻在48 h内无好转,给予仔猪单剂量的头孢噻呋(5.0 mg/kg,商品名Excede,美国Zoetis公司)肌肉注射;如果治疗后继续失液,则给予仔猪单剂量磺胺甲恶唑和甲氧苄啶口服混悬液(50 mg/mL和8 mg/mL,美国Hi-Tech Pharmacal公司),连续3 d口服治疗。”^[223]

报告示例2:“如前所述,手术前1 h,给予小鼠含有1 mg/kg丁丙诺啡(商品名Temgesic;比利时Schering-Plough Europe公司)的坚果酱(即榛子酱,意大利Ferrero公司),让小鼠主动摄取。小鼠在术前2 d已经习惯纯坚果酱。”^[224]

报告示例3:“如果术后的格拉斯哥综合疼痛测量量表(Glasgow Composite Pain Scale, GCPS)评分等于或大于6分(总分24分),则额外给予美沙酮0.1 mg/kg肌肉注射(或在需要时静脉注射)镇痛。30 min后重新评估疼痛情况。记录美沙酮的使用剂量和次数。”^[225]

2.6.2 子条目16b:报告任何预期或非预期的不良事件

解释:报告不良事件可以使其他研究人员在该研究中(以此作参考)设计适当的福利评估,并将此类事件发生的风险降至最低。如果该实验是测试某种治疗的效果,那么不良事件的发生可能会改变治疗获益与风险^[226]之间的平衡。

应报告在研究中出现的任何对动物福利有负面影响的不良事件（如：心血管和呼吸抑制、中枢神经系统紊乱、体温过低、摄食量减少），并注明这些不良事件是预期的还是意外的。如果在研究期间没有观察到或没有记录不良事件，则需要明确说明。

报告示例 1：“在接受了 N2 转导的人类细胞的 12 只小鼠中，11 只出现了小鼠淋巴结肿瘤。该 *neo* 基因在小鼠细胞和人类细胞中都能被检测到，但明显的淋巴细胞增生仅见于小鼠的前 T 细胞，小鼠在 5 个月后发生白血病。发病小鼠迅速表现出严重的疾病症状，12 只小鼠中有 5 只在同一天濒临死亡，另外 6 只在 1 个月内濒临死亡。在接受了 N2 转导的人类细胞的 12 只小鼠中，11 只因为出现了明显的淋巴结和脾肿大、弓背、体重下降等现象而不得提前安乐死。在 14 个月内仔细观察第 12 只小鼠，它没有显示任何白血病或其他不良事件的迹象，解剖时也没有见到异常组织。每天至少观察小鼠 1 次以发现疾病迹象，即以下任何一种或多种症状：体重减轻、弓背、嗜睡、快速呼吸、皮肤变色或不规则、腹胀、半麻痹、淋巴结明显肿大，以及皮下可见实体肿瘤。在实验中出现任何疾病迹象都会被记录为“不良事件”，随即处死小鼠并进行尸检，以确定病因。”^[227]

报告示例 2：“尽管实验方案参考了文献报道，但方案 1 中的犬表现出了高水平应激，大都有过呕吐。这导致我们需要将实验方案做较大改动，以优化我们的空腹和餐后代谢研究方案。”^[228]

2.6.3 子条目 16c: 描述为研究建立的人道终点、监测指征和监测频率。如果研究未设置人道终点, 请予以说明

解释：人道终点是预先确定的形态学、生理学和/或行为指标，定义在这些情况下动物将从实验研究中被移除。使用人道终点有助于在实现科学目标的同时使动物伤害最小化^[229]。报告为特定研究、物种和品系所建立的人道终点，应包括临床体征监测的明确标准^[230]和需要实施安乐死或其他既定措施的临床症状标准，还应包括诸如一般福利指标（如体重减轻、摄食量减少、异常身体姿势）和特定方案的福利指标（如癌症研究中的肿瘤大小^[231]、卒中研究中的感觉运动缺陷^[232]）等细节。

应报告监测的时间和频率，同时应考虑到动物的正常昼夜节律和科学研究方案所需时间，以及监测频率增加情况（例如，术后恢复、疾病研究期间的关键

时期，或在观察到不良事件后）。发布所监测的临床体征评分表^[233]有助于指导其他研究人员建立临床相关的福利评估方案，特别是对于报告新方案的研究。

即使没有动物达到人道终点，也应该报告这些信息。如果没有为某项研究建立人道终点，则需要明确说明这一点。

报告示例 1：“研究小组成员和兽医每天都对动物进行 2 次监测。通过对动物体重（每周 2 次）、食物和水的摄入量，以及动物的活动、喘气和皮毛状况进行常规评估来监测动物的健康状况。在执行安乐死前，允许肿瘤在小鼠体内生长的最大体积为 2 000 mm³”。^[234]

2.7 条目 17: 解析/科学阐释

2.7.1 子条目 17a: 结合本研究目标和假设、现有理论和文献中其他相关研究来解释结果

解释：对研究结果的解释应该是在研究目标的背景下（详见条目 13: 研究目标）进行，这点很重要。对于假设检验研究而言，对结果的解释应集中于主要结果（详见条目 6: 结果测量），而从其他结果衍生出的探索性结果不应作结论性的描述，因为其统计学效力可能不足或不可靠。

应在当前理论背景下讨论所发现的研究结果，最好参考相关的系统综述，因为单个研究并不能提供一个完整的体系。如果没有系统综述，那么应注意避免选择性地引用支持自己结果的研究或仅引用那些有统计学意义的研究报告^[235]。

在适当情况下，应详细描述实验方法或研究发现对提高动物福利标准或减少未来研究中使用动物数量的意义（例如，由于使用一种新方法而减少了结果的可变性，从而可以在不失去统计学效力的情况下使用更小样本的动物数量）。虽然这些技术的改进可能不是研究的主要焦点，但将之付诸报告并发布可以使之在科学界得以更广泛地传播和运用。

报告示例 1：“有文献报道，系统性红斑狼疮小鼠 MRL^{lpr} 中，IL-18 表达缺失可选择性地降低 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞在肾内的比例，而其他白细胞群，如粒细胞、单核细胞和巨噬细胞不受其影响。这与我们研究中‘肾内 IL-18 过表达’模型提供的数据相反，提示本研究中 IL-18 浓度已超过生理范围。”^[236]

报告示例 2：“这个新设备显示在多个记忆评估中具有显著减少动物使用数量的潜力，这些记忆评估任务专门用于检测新药是否可能导致失忆。……在过去的 5 年里，大约有 43 000 只动物被用于这些检测任务，但

如果用这个连续试验设备,我们估计动物使用量可能会减少到26 000只。……新的范例显示,在获得可靠结果并维持任务统计学效力的同时,所需动物数量可以被大幅减少。”^[237]

报告示例3:“总之,我们的研究结果显示,老龄合并症动物大脑再灌注时或3 h后外周给药白细胞介素1受体拮抗剂(interleukin-1 receptor antagonist, IL-1Ra),可以防止脑损伤并减少神经炎症。这些发现解决了最近的系统综述中有关IL-1Ra用于卒中治疗所担忧的问题,并为IL-1Ra作为缺血性脑卒中治疗的首选候选药物提供了进一步的支持性证据。”^[238]

2.7.2 子条目17b:评价研究的局限性,包括潜在的偏倚来源、动物模型的局限性,以及与结果相关的不精确性

解释:讨论研究工作的局限性,对于将研究结果置于一定背景中、解释结果的有效性并赋予其结论可信度水平而言至关重要^[239]。局限性在科学研究中是不可避免的,描述它们对于分享经验、指导最佳实践和帮助设计未来实验都是必不可少的^[240]。

应对研究中所呈现的证据质量进行讨论,并考虑动物模型对具体研究问题的合适程度。讨论分离因果关系(也称为内部效度^[241])的研究设计时应该包括是否考虑了潜在的偏差风险(详见条目2~5:样本量;纳入和排除标准;随机化;盲法)。

报告示例1:“虽然在这项研究中,我们没有对畜群源进行抽样,但鉴于中西部地区甲型流感病毒(influenza A virus, IAV)感染的普遍性,推测这些种群呈IAV阳性的可能性很高。……然而,我们不能完全排除后备母猪在到达畜群后感染常驻病毒的可能性。虽然新到的后备母猪被安置在指定隔离区域,并制定了相关方案以尽量减少疾病传播(例如,隔离并接种疫苗),但是这些区域或方案可能依旧无法完全防止感染仅局限在指定区域。”^[242]

报告示例2:“尽管本研究数据表明,在我们建立的基因靶向舒张性心衰模型中,持续的全身性toll样受体9(Toll-like receptor 9, TLR9)刺激加重了舒张性心衰,但在因果关系的机制解释以及临床炎症性疾病状态和其他心衰状况的推断中仍存在一些局限性。首先,我们建立的药理学炎症模型尚无法区分由心脏TLR9刺激引起的直接效应和由全身炎症介导的间接效应。其次,尽管一些全身性炎症条件具有先天免疫系统紊乱的重要特征,其中一些又特别包含了TLR9信号

转导失真,但持续的TLR9刺激并不一定代表临床相关的炎症状况。最后,心肌细胞肌质网钙离子ATP酶(sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase, SERCA2a)基因敲除模型不能充分代表舒张性心衰的分子基础或临床特征。”^[243]

2.8 条目18:可推广性/转化

评论这项研究的结果是否具有普适性,以及如何外推到其他物种或实验条件,包括任何与人类生物学的关联(适用时)。

解释:研究成果发表的一个重要目的是为未来的研究提供信息。就动物研究而言,它可以为开展进一步的体内研究或其他研究领域(例如,人体临床试验)提供参考信息。考虑周全必要的,因为额外的、不必要的动物研究是一种浪费且不道德的行为。同样地,基于证据不充分或误导性的动物研究而启动的人体临床试验会增加研究浪费,并对研究参与者的风险-获益平衡产生负面影响^[241,244]。

评估研究结果的意义时,应考虑其研究类型。设计良好的假设检验研究比探索性研究更能提供可靠的证据(详见条目13:研究目的)。一项新颖的探索性研究的发现可能为未来类似背景下的研究提供信息,或者文献中可能已经积累了足够的证据以证明在其他物种或人类中进行进一步研究是合理的。应讨论将研究成果推广或转化时需要开展哪些进一步的研究(若有)。还应讨论和阐释与现有证据相关的结果,特别是其他研究小组是否报告了类似的或其他支持性的发现^[245-246]。也可以讨论观察到的某种效应所处条件的范围,以及可能调节这种效应的因素。这些因素可能包括:种群情况(如年龄、性别、品系、物种),干预措施(如同类别的不同药物),测量结果(如评估记忆的不同方法)。

报告示例1:“我们的研究结果表明,海马体脑深部刺激(hippocampal deep brain stimulation, hDBS)可以有效地调节中脑边缘网络。这一发现可能对hDBS用于一些癫痫病例治疗具有临床意义,因为已有证据表明该神经网络的连通性在内侧颞叶癫痫(mesial temporal lobe epilepsy, MTLE)中受到抑制,不过还需要进一步研究hDBS恢复MTLE诱导中脑边缘结构功能连接缺失的潜能。”^[247]

报告示例2:“生长停滞特异性基因1(growth arrest specific gene 1, GAS1)的肿瘤抑制作用曾在细胞培养或异种移植模型中被报告过,但本研究报告小鼠

Gas1 基因对体内原发性肿瘤的抑制活性尚属首次。最近有关转基因传送安全载体设计的研究进展可能会将我们的研究结果推广到人类身上, 从而在肝脏肿瘤疾病领域显现出一个很有前途的研究方向。”^[248]

2.9 条目 19: 研究方案注册

提供一份声明, 说明是否在研究实施前制订了研究方案 (包括研究问题、关键设计特征和分析计划), 以及该方案是否进行了注册, 在何处注册。

解释: 与临床试验的做法类似, 动物研究方案注册已经成为一种可能提高动物研究透明度的机制^[244, 249–250]。在实验开始前注册一份研究方案, 不仅使研究人员能够证明其假设、方法和分析都是预先计划好的, 而不是由实验中出现的数据决定的; 而且这样可以提高科学的严谨性, 同时保护研究者免受选择性报告结果的质疑^[251–252]。研究方案应包括: (1) 所要解决的问题和研究的关键特征, 例如要验证的假设、主要结果指标 (如果适用) 和统计分析方法; (2) 开展该研究所采用的实验流程。

研究方案可以按照不同的完整度进行注册。例如, 在越来越多的期刊提供的注册报告格式中, 声明研究方案经过同行评议, 无论研究结果如何, 一旦被接受, 该期刊都承诺发表已完成的研究^[249]。

其他在线资源包括开放科学框架 (Open Science Framework, OSF)^[253], 适合于存放 PHISPS (Population; Hypothesis; Intervention; Statistical Analysis Plan; Primary; Outcome Measure; Sample Size Calculation) 方案^[254], 并为研究人员提供了针对预先注册内容的灵活性浏览权限, 在研究发表之前不对公众开放, 并有选择地与审稿人及编辑分享信息。还可以使用实验设计辅助系统 (Experimental Design Assistant, EDA) 生成带时间戳的 PDF, 其中可列出实验设计的关键要素^[255], 可用以证明研究的实施、分析和报告都是预先设计的, 没有被新出现的数据过度驱动。我们建议注册方案至少应包含所有 PHISPS 要素: 种群、研究假设、干预措施、统计分析计划、主要结局指标和样本量计算。

投稿时应提供一份声明, 说明是否在研究之前准备了研究方案; 如果适用, 还需提供带有时间戳的注册方案或说明注册地点。当研究方案发生了偏离, 应在文章中描述这些变化的原因, 以便读者在评估研究结果时能够考虑到这一点。

报告示例 1: “所有研究方案的详细描述都可以在注册报告 (Kandela 等, 2015) 中找到。其他详细的实

验笔记、数据和分析可在开放科学框架 (OSF) [研究资源识别码 (research resource identifier, RRID): SCR_003238] (<https://osf.io/xu1g2/>) 上获得。”^[256]

报告示例 2: “为了最大限度地提高研究的客观性, 我们在开始收集数据之前预先注册了包括两种假设、预设方法和数据分析完整计划的研究方案 (<https://osf.io/eb8ua/register/565fb3678c5e4a66b5582f67>, 可访问日期开始于 2017 年 12 月 29 日)。我们严格执行了该方案, 所有的统计分析都严格遵循了我们预先注册的数据分析计划 (<https://osf.io/eb8ua/>)。”^[257]

报告示例 3: “我们在开放科学框架 (OSF) 上预先注册了分析方案 (Sheldon 和 Griffith, 2017), 这有助于科学研究的可重复性和开放合作。进行预注册是为了限制进行分析的数量, 并验证我们对先验假设的有限数量进行测试的承诺。我们使用的方法与预先注册的方法一致。”^[258]

2.10 条目 20: 数据获取

提供一份声明, 说明研究数据是否可以共享, 以及可以在哪里获取。

解释: 数据共享声明可以描述其他人如何获取论文所呈现的数据。共享带有充分注释的数据可以使其他人重复这些数据分析, 从而独立地测试和验证该研究结果。数据共享也允许对数据进行重新利用, 并通过组合来自多个研究的数据, 创建新的数据集 (例如用于二次分析)。这使得其他研究者可以探索新的主题, 并增加该研究的影响力, 潜在地防止非必要的动物使用, 并提高研究资金的利用价值。另外, 获取原始数据也有助于进行文本和自动化数据的挖掘^[259]。

越来越多的出版商和资助机构要求作者或被资助人公开他们的数据^[260]。附带有相关数据的期刊文章可能会被更频繁地引用^[261–262]。数据集本身也可以被独立引用, 这为作者提供了额外的学术声望。而这种做法正在被越来越多地认可和接受^[263]。

在可能的情况下, 应分享有助于推导出论文中主要结论的所有数据。数据应遵循 FAIR (findability, accessibility, interoperability, and reusability) 的指导原则^[264], 即数据可查询、可获取 (不要使用过时的文件类型)、可交互操作 (可用于多个平台和多个软件包)、可重复使用 (具有足够的数据描述符)。

数据可以从结构化的、专业的 (特定领域的)、开放获取的数据库中公开访问, 例如由美国国家生物技术信息中心 (NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 或欧

洲生物信息学研究所 (EBI, <https://www.ebi.ac.uk/>) 维护的数据库。如果这样的数据库不可用, 则可以将数据存储在非结构化但公开可用的数据库中, 例如 Figshare (<https://figshare.com/>)、Dryad (<https://datadryad.org/>) 和 Zenodo (<https://zenodo.org/>), 或开放科学框架 (OSF, <https://osf.io/>)。还有一些具有严格标准的搜索平台可以用以识别相关的数据库, 例如 FairSharing (<https://fairsharing.org/>) 和 re3data (<https://www.re3data.org/>)。

报告示例 1: “数据可用性: 所有数据均可从 Figshare 网站 (<http://dx.doi.org/10.6084/m9.figshare.1288935>) 获得。”^[265]

报告示例 2: “生成这个数据集的一个基本目标是方便外部合作者和研究人员访问非洲刺毛鼠 (spiny mouse) 转录序列信息。序列读取和元数据可从 NCBI (PRJNA342864) 获得, 组装转录组 (Trinity_v2.3.2 和 tr2aacds_v2) 可以从 Zenodo 存储库 (<https://doi.org/10.5281/zenodo.808870>) 获得。然而, 对于缺乏生物信息学专业知识的研究人员来说, 访问和使用这些数据可能具有挑战性。为了解决这个问题, 我们托管了一个

“SequenceServer…BLAST” – 搜索网站 (<http://spiny mouse.erc.monash.edu/sequenceserver/>)。该网站提供了一个对用户友好的界面, 可访问 tr2aacds_v2 组装的序列信息 (以探索带标记的蛋白质编码转录本) 和/或 Trinity_v2.3.2 组装的序列信息 (以探索非编码转录本)。”^[266]

2.11 条目 21:利益冲突声明

2.11.1 子条目 21a: 声明任何潜在的利益冲突, 包括经济上的和非经济上的。如果不存在利益冲突, 则应予以说明

解释: 利益冲突是指干扰 (或可能被视为干扰) 研究的完整及客观呈现、分析和解释的任何因素。利益冲突可以是经济上的或非经济上的, 专业上的或个人的。它们可以存在于机构中、团队中, 也可以存在于个人。在同行评审、编辑和出版决策中都应考虑潜在的利益冲突, 其目的是确保透明度。在大多数情况下, 利益冲突声明不会妨碍出版或评审过程。

表 4 提供了几种常见的利益冲突相关声明案例。如果不确定, 则需要声明所有潜在的利益冲突, 包括认为可能存在的和真实存在的利益冲突^[267]。

表 4 有关竞争性或利益冲突的声明案例

Table 4 Examples of competing or conflict of interest declaration

类别 Category	内容 Content
经济利益 Financial	作者因该项研究发表而直接收到或预期收到的经济资助或其他款项, 或从对研究成果感兴趣的组织获得资助或其他款项
非经济利益 Nonfinancial	研究者个人或机构可获得非经济形式的实物或其他利益, 这包括研究者在政府、非政府组织或商业组织中担任无薪顾问职位
从属关系 Affiliations	研究者受雇于顾问委员会, 或是对该研究工作结果感兴趣的组织
知识产权 Intellectual property	该研究涉及某人或其组织拥有的专利或商标, 还包括所报告的科学进展对于该机构、作者或研究资助者的潜在开发价值
个人关系 Personal	朋友、家人、人际关系和其他可能从研究中获得经济或其他方面利益的亲密关系人
意识形态 Ideology	与研究工作相关的信仰 (如政治或宗教), 或是相关宣传或游说组织成员

注: 英文原表请见 <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000411.t002>。
Note: The original table is from <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000411.t002>.

报告示例 1: “这项研究是由 Gubra ApS 公司资助的。作者 LSD、PJP、GH、KF 和 HBH 均受雇于 Gubra ApS 公司。作者 JJ 和 NV 是 Gubra ApS 公司的所有者。GubraApS 公司为作者 LSD、PJP、GH、KF、HBH、JJ 和 NV 等提供了研究材料和工资。”^[268]

报告示例 2: “作者声明不存在竞争性利益

冲突。”^[269]

2.11.2 子条目 21b: 列出所有的资金来源 (包括课题识别号), 以及资助者在研究设计、分析和报告中所起的作用

解释: 标明资助来源可使读者评估所有利益冲突和潜在偏倚来源。例如, 与其他来源资助的研究相比,

由产业资助的临床研究倾向于报告更有利的结果, 存在选择性报告的偏倚^[270-272]。临床前研究的证据也表明, 资金来源可能影响研究结果的解释^[267, 273]。

还应报告其他资助信息, 包括资助机构和基金编号。如果该研究得到了多个来源的资金资助, 则需列出所有来源, 包括内部基金。明确资助人在设计、分析、报告和/或出版决策中所发挥的作用。如果研究没有获得特定的资助, 而是作者工作职责的一部分, 则需要列出作者的所在单位。

报告示例 1:“意大利卫生部的当前研究基金 PRC 2010/001 (<http://www.salute.gov.it/>) 为作者 MG 提供了资助。资助者在研究设计、数据收集和分析、发表决策或手稿编写方面未担任任何角色。”^[274]

报告示例 2:“这项研究得到了 Tabriz 大学医学院结核病和肺研究中心以及 Tabriz 大学研究委员会的资助。资助者没有参与研究设计、数据收集和分析、出版决定或手稿准备等任何方面。”^[275]

报告示例 3:“这项工作是由支付给作者 AEW 的薪水支持完成。资助单位在研究设计、数据收集和分析、出版决定或手稿准备中无任何作用。”^[276]

[作者贡献 Author Contribution]

马政文负责 ARRIVE 2.0 指南完整版第五部分即“推荐 11 条”中第 6~11 条内容的编译初稿和修改, 为第一作者;
李垚负责 ARRIVE 2.0 指南完整版中文编译工作的策划、组织, 以及对 ARRIVE 2.0 指南完整版提出关键性修改建议;
王剑、卢今参与 ARRIVE 2.0 指南完整版“推荐 11 条”中第 6~11 条内容的翻译初稿审定;
李夏莹、刘晓宇和刘永刚负责对 ARRIVE 2.0 指南完整版“推荐 11 条”中第 6~11 条编译内容提出关键性修改建议;
陈国元、卢晓、白玉和卢选成负责对 ARRIVE 2.0 指南完整版中文编译内容提出关键性修改建议;
陶雨风负责对 ARRIVE 2.0 指南完整版“推荐 11 条”中第 6~11 条编译内容提出关键性修改建议, 并提供基金支持;
庞万勇负责 ARRIVE 2.0 指南完整版中文编译工作的指导, 以及全部内容的审定。

[利益声明 Declaration of Interest]

本文所有作者均声明不存在利益冲突

[参考文献 References]

- [5] KILKENNY C, BROWNE W J, CUTHILL I C, et al. Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research[J]. PLoS Biol, 2010, 8(6): e1000412. DOI: 10.1371/journal.pbio.1000412.
- [13] 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.
- [14] DU SERT N P, AHLUWALIA A, ALAM S, et al. Reporting animal research: explanation and elaboration for the ARRIVE

guidelines 2.0[J]. PLoS Biol, 2020, 18(7): e3000411. DOI: 10.1371/journal.pbio.3000411.

- [15] 张俊彦, 刘晓宇, 李垚, 等. 动物实验研究报告的国际指南 ARRIVE 2.0 介绍及期刊实施计划[J]. 实验动物与比较医学, 2023, 43(1): 86-94. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2023.014.
- ZHANG J Y, LIU X Y, LI Y, et al. Introduction to the international guide for animal research reporting ARRIVE 2.0, and its implementation plan in the journal[J]. Lab Anim Comp Med, 2023, 43(1): 86-94. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2023.014.
- [103] 王剑, 卢今, 马政文, 等. «动物研究: 体内实验报告»即 ARRIVE 2.0 指南的解释和阐述(一)[J]. 实验动物与比较医学, 2023, 43(2): 213-224. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2023.043.
- WANG J, LU J, MA Z W, et al. Explanation and elaboration for the ARRIVE guidelines 2.0—reporting animal research and *in vivo* experiments(I) [J]. Lab Anim Comp Med, 2023, 43(2): 213-224. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2023.043.
- [104] 陈国元, 卢晓, 白玉, 等. «动物研究: 体内实验报告»即 ARRIVE 2.0 指南的解释和阐述(二)[J]. 实验动物与比较医学, 2023, 43(3): 323-331. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2023.042.
- CHEN G Y, LU X, BAI Y, et al. Explanation and elaboration 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.
- [155] 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.
- [219] 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.
- [220] JIRKOF P. Side effects of pain and analgesia in animal experimentation[J]. Lab Anim, 2017, 46(4): 123-128. DOI: 10.1038/labani.1216.
- [221] CARBONE L, AUSTIN J. Pain and laboratory animals: publication practices for better data reproducibility and better animal welfare[J]. PLoS One, 2016, 11(5): e0155001. DOI: 10.1371/journal.pone.0155001.
- [222] GASPARI L, BIANCHI M, LIMIROLI E, et al. The analgesic drug tramadol prevents the effect of surgery on natural killer cell activity and metastatic colonization in rats[J]. J Neuroimmunol, 2002, 129(1-2): 18-24. DOI: 10.1016/s0165-5728(02)00165-0.
- [223] GETTY C M, DILGER R N. Moderate perinatal choline deficiency elicits altered physiology and metabolomic profiles in the piglet[J]. PLoS One, 2015, 10(7): e0133500. DOI: 10.1371/journal.pone.0133500.
- [224] TEILMANN A C, FALKENBERG M K, HAU J, et al. Comparison of silicone and polyurethane catheters for the catheterization of small vessels in mice[J]. Lab Anim, 2014, 43

- (11):397-403. DOI: 10.1038/labani.570.
- [225] BUSTAMANTE R, DAZA M A, CANFRÁN S, et al. Comparison of the postoperative analgesic effects of cimicoxib, buprenorphine and their combination in healthy dogs undergoing ovariohysterectomy[J]. *Vet Anaesth Analg*, 2018, 45(4):545-556. DOI: 10.1016/j.vaa.2018.01.003.
- [226] MUHLHAUSLER B S, BLOOMFIELD F H, GILLMAN M W. Whole animal experiments should be more like human randomized controlled trials[J]. *PLoS Biol*, 2013, 11(2): e1001481. DOI: 10.1371/journal.pbio.1001481.
- [227] BAUER G, DAO M A, CASE S S, et al. *In vivo* biosafety model to assess the risk of adverse events from retroviral and lentiviral vectors[J]. *Mol Ther*, 2008, 16(7):1308-1315. DOI: 10.1038/mt.2008.93.
- [228] BELLANGER S, BENREZZAK O, BATTISTA M C, et al. Experimental dog model for assessment of fasting and postprandial fatty acid metabolism: pitfalls and feasibility[J]. *Lab Anim*, 2015, 49(3): 228-240. DOI: 10.1177/0023677214566021.
- [229] HENDRIKSEN C, MORTON D, CUSSLER K. Use of humane endpoints to minimise suffering[M]//The COST Manual of Laboratory Animal Care and Use. Boca Raton: CRC Press, 2016:333-353. DOI: 10.1201/b13591-14.
- [230] HAWKINS P, MORTON D B, BURMAN O, et al. A guide to defining and implementing protocols for the welfare assessment of laboratory animals: eleventh report of the BVAAWF/FRAME/RSPCA/UFOW Joint Working Group on Refinement[J]. *Lab Anim*, 2011, 45(1): 1-13. DOI: 10.1258/la.2010.010031.
- [231] WORKMAN P, ABOAGYE E O, BALKWILL F, et al. Guidelines for the welfare and use of animals in cancer research[J]. *Br J Cancer*, 2010, 102(11):1555-1577. DOI: 10.1038/sj.bjc.6605642.
- [232] DU SERT N P, ALFIERI A, ALLAN S M, et al. The IMPROVE guidelines (ischaemia models: procedural refinements of *in vivo* experiments)[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2017, 37(11): 3488-3517. DOI: 10.1177/0271678X17709185.
- [233] MORTON D B. A systematic approach for establishing humane endpoints[J]. *ILAR J*, 2000, 41(2):80-86. DOI: 10.1093/ilar.41.2.80.
- [234] MUSCELLA A, VETRUGNO C, COSSA L G, et al. *In vitro* and *in vivo* antitumor activity of [Pt(O, O'-acac) (γ-acac) (DMS)] in malignant pleural mesothelioma[J]. *PLoS One*, 2016, 11(11): e0165154. DOI: 10.1371/journal.pone.0165154.
- [235] GLASZIOU P, ALTMAN D G, BOSSUYT P, et al. Reducing waste from incomplete or unusable reports of biomedical research[J]. *Lancet*, 2014, 383(9913): 267-276. DOI: 10.1016/S0140-6736(13)62228-X.
- [236] SCHIRMER B, WEDEKIND D, GLAGE S, et al. Deletion of IL-18 expression ameliorates spontaneous kidney failure in MRL^{lpr} mice[J]. *PLoS One*, 2015, 10(10): e0140173. DOI: 10.1371/journal.pone.0140173.
- [237] AMEEN-ALI K E, EACOTT M J, EASTON A. A new behavioural apparatus to reduce animal numbers in multiple types of spontaneous object recognition paradigms in rats[J]. *J Neurosci Methods*, 2012, 211(1):66-76. DOI: 10.1016/j.jneumeth.2012.08.006.
- [238] PRADILLO J M, DENES A, GREENHALGH A D, et al. Delayed administration of interleukin-1 receptor antagonist reduces ischemic brain damage and inflammation in comorbid rats[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2012, 32(9):1810-1819. DOI: 10.1038/jcbfm.2012.101.
- [239] IOANNIDIS J P A. Limitations are not properly acknowledged in the scientific literature[J]. *J Clin Epidemiol*, 2007, 60(4):324-329. DOI: 10.1016/j.jclinepi.2006.09.011.
- [240] PUHAN M A, AKL E A, BRYANT D, et al. Discussing study limitations in reports of biomedical studies- the need for more transparency[J]. *Health Qual Life Outcomes*, 2012, 10: 23. DOI: 10.1186/1477-7525-10-23.
- [241] WIESCHOWSKI S, CHIN W W L, FEDERICO C, et al. Preclinical efficacy studies in investigator brochures: do they enable risk-benefit assessment?[J]. *PLoS Biol*, 2018, 16(4): e2004879. DOI: 10.1371/journal.pbio.2004879.
- [242] DIAZ A, PEREZ A, SREEVATSAN S, et al. Association between influenza A virus infection and pigs subpopulations in endemically infected breeding herds[J]. *PLoS One*, 2015, 10(6): e0129213. DOI: 10.1371/journal.pone.0129213.
- [243] DHONDUP Y, SJAASTAD I, SCOTT H, et al. Sustained toll-like receptor 9 activation promotes systemic and cardiac inflammation, and aggravates diastolic heart failure in SERCA2a KO mice[J]. *PLoS One*, 2015, 10(10): e0139715. DOI: 10.1371/journal.pone.0139715.
- [244] CHALMERS I, BRACKEN M B, DJULBEGOVIC B, et al. How to increase value and reduce waste when research priorities are set[J]. *Lancet*, 2014, 383(9912):156-165. DOI: 10.1016/S0140-6736(13)62229-1.
- [245] VOELKL B, VOGT L, SENA E S, et al. Reproducibility of preclinical animal research improves with heterogeneity of study samples[J]. *PLoS Biol*, 2018, 16(2): e2003693. DOI: 10.1371/journal.pbio.2003693.
- [246] MUNAFÒ M R, DAVEY SMITH G. Robust research needs many lines of evidence[J]. *Nature*, 2018, 553(7689): 399-401. DOI: 10.1038/d41586-018-01023-3.
- [247] VAN DEN BERGE N, VANHOVE C, DESCAMPS B, et al. Functional MRI during hippocampal deep brain stimulation in the healthy rat brain[J]. *PLoS One*, 2015, 10(7): e0133245. DOI: 10.1371/journal.pone.0133245.
- [248] SACILOTTO N, CASTILLO J, RIFFO-CAMPOS Á L, et al. Growth arrest specific 1 (Gas1) gene overexpression in liver reduces the *in vivo* progression of murine hepatocellular carcinoma and partially restores gene expression levels[J]. *PLoS One*, 2015, 10(7): e0132477. DOI: 10.1371/journal.pone.0132477.
- [249] CHAMBERS C D, FEREDOS E, MUTHUKUMARASWAMY S D, et al. Instead of "playing the game" it is time to change the rules: registered Reports at *AIMS Neuroscience* and beyond [J]. *AIMS Neurosci*, 2014, 1(1): 4-17. DOI: 10.3934/neuroscience.2014.1.4.
- [250] NOSEK B, LAKENS D. Registered reports: a method to increase the credibility of published results[J]. *Soc Psychol*, 2014, 45(3):137-141.
- [251] KAPLAN R M, IRVIN V L. Likelihood of null effects of large NHLBI clinical trials has increased over time[J]. *PLoS One*, 2015, 10(8): e0132382. DOI: 10.1371/journal.pone.0132382.
- [252] ALLEN C, MEHLER D M A. Open science challenges, benefits

- and tips in early career and beyond[J]. PLoS Biol, 2019, 17(5): e3000246. DOI: 10.1371/journal.pbio.3000246.
- [253] NOSEK B A, EBERSOLE C R, DEHAVEN A C, et al. The preregistration revolution[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2018, 115(11):2600-2606. DOI: 10.1073/pnas.1708274114.
- [254] MACLEOD M, HOWELLS D. Protocols for laboratory research [J]. Evid Based Preclin Med, 2016, 3(2): e00021. DOI:10.1002/ebm2.21.
- [255] PERCIE DU SERT N, BAMSEY I, BATE S T, et al. The experimental design assistant[J]. PLoS Biol, 2017, 15(9): e2003779. DOI: 10.1371/journal.pbio.2003779.
- [256] MANTIS C, KANDELA I, AIRD F, et al. Replication Study: Coadministration of a tumor-penetrating peptide enhances the efficacy of cancer drugs[J]. eLife, 2017, 6: e17584. DOI: 10.7554/eLife.17584.
- [257] JERÓNIMO S, KHADRAOUI M, WANG D P, et al. Plumage color manipulation has no effect on social dominance or fitness in zebra finches[J]. Behav Ecol, 2018, 29(2): 459-467. DOI: 10.1093/beheco/arx195.
- [258] SHELDON E L, GRIFFITH S C. Embryonic heart rate predicts prenatal development rate, but is not related to post-natal growth rate or activity level in the zebra finch (*Taeniopygia guttata*) [J]. Ethology, 2018, 124(11): 829-837. DOI: 10.1111/eth.12817.
- [259] KAFKAFI N, MAYO C L, ELMER G I. Mining mouse behavior for patterns predicting psychiatric drug classification[J]. Psychopharmacology, 2014, 231(1): 231-242. DOI: 10.1007/s00213-013-3230-6.
- [260] STODDEN V, GUO P X, MA Z K. Toward reproducible computational research: an empirical analysis of data and code policy adoption by journals[J]. PLoS One, 2013, 8(6): e67111. DOI: 10.1371/journal.pone.0067111.
- [261] PIWOWAR H A, DAY R S, FRIDSMA D B. Sharing detailed research data is associated with increased citation rate[J]. PLoS One, 2007, 2(3): e308. DOI: 10.1371/journal.pone.0000308.
- [262] MCKIERNAN E C, BOURNE P E, BROWN C T, et al. How open science helps researchers succeed[J]. eLife, 2016, 5: e16800. DOI: 10.7554/eLife.16800.
- [263] Data Citation Synthesis Group. Joint declaration of data citation principles[EB/OL]. MARTONE M, ed. San Diego CA: FORCE11, 2014[2023-10-22]. <https://doi.org/10.25490/a97f-egykh>.
- [264] WILKINSON M D, DUMONTIER M, JSBRAND JAN AALBERSBERG I, et al. The FAIR Guiding Principles for scientific data management and stewardship[J]. Sci Data, 2016, 3:160018. DOI: 10.1038/sdata.2016.18.
- [265] FEDERER L M, LU Y L, JOUBERT D J, et al. Biomedical data sharing and reuse: attitudes and practices of clinical and scientific research staff[J]. PLoS One, 2015, 10(6): e0129506. DOI: 10.1371/journal.pone.0129506.
- [266] MAMROT J, LEGAIE R, ELLERY S J, et al. De novo transcriptome assembly for the spiny mouse (*Acomys cahirinus*)[J]. Sci Rep, 2017, 7(1):8996. DOI: 10.1038/s41598-017-09334-7.
- [267] BERO L, ANGLEMYER A, VESTERINEN H, et al. The relationship between study sponsorship, risks of bias, and research outcomes in atrazine exposure studies conducted in non-human animals: systematic review and meta-analysis [J]. Environ Int, 2016, 92-93: 597-604. DOI: 10.1016/j.envint.2015.10.011.
- [268] DALBØGE L S, PEDERSEN P J, HANSEN G, et al. A Hamster model of diet-induced obesity for preclinical evaluation of anti-obesity, anti-diabetic and lipid modulating agents[J]. PLoS One, 2015, 10(8): e0135634. DOI: 10.1371/journal.pone.0135634.
- [269] GARCIA DE LA SERRANA D, VIEIRA V L A, ANDREE K B, et al. Development temperature has persistent effects on muscle growth responses in gilthead sea bream[J]. PLoS One, 2012, 7(12): e51884. DOI: 10.1371/journal.pone.0051884.
- [270] LUNDH A, SISMONDO S, LEXCHIN J, et al. Industry sponsorship and research outcome[J]. Cochrane Database Syst Rev, 2012, 12: MR000033. DOI: 10.1002/14651858.MR000033.pub2.
- [271] POPELUT A, VALET F, FROMENTIN O, et al. Relationship between sponsorship and failure rate of dental implants: a systematic approach[J]. PLoS One, 2010, 5(4): e10274. DOI: 10.1371/journal.pone.0010274.
- [272] LEXCHIN J, BERO L A, DJULBEGOVIC B, et al. Pharmaceutical industry sponsorship and research outcome and quality: systematic review[J]. BMJ, 2003, 326(7400):1167-1170. DOI: 10.1136/bmj.326.7400.1167.
- [273] KRAUTH D, ANGLEMYER A, PHILIPPS R, et al. Nonindustry-sponsored preclinical studies on statins yield greater efficacy estimates than industry-sponsored studies: a meta-analysis [J]. PLoS Biol, 2014, 12(1): e1001770. DOI: 10.1371/journal.pbio.1001770.
- [274] GENCHI M, PRATI P, VICARI N, et al. Francisella tularensis: No evidence for transovarial transmission in the tularemia tick vectors Dermacentor reticulatus and Ixodes ricinus[J]. PLoS One, 2015, 10(8): e0133593. DOI: 10.1371/journal.pone.0133593.
- [275] KOLAHIAN S, SADRI H, SHAHBAZFAR A A, et al. The effects of leucine, zinc, and chromium supplements on inflammatory events of the respiratory system in type 2 diabetic rats[J]. PLoS One, 2015, 10(7): e0133374. DOI: 10.1371/journal.pone.0133374.
- [276] EYRE-WALKER A, STOLETZKI N. The assessment of science: the relative merits of post-publication review, the impact factor, and the number of citations[J]. PLoS Biol, 2013, 11(10): e1001675. DOI: 10.1371/journal.pbio.1001675.

(收稿日期: 2023-10-23 修回日期: 2023-12-23)

(本文编辑: 张俊彦, 富群华, 丁宇菁, 崔占鼎)

【引用本文】

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. Interpretation and elaboration for the ARRIVE Guidelines 2.0—Animal Research: Reporting *In Vivo* Experiments (V)[J]. Lab Anim Comp Med, 2024, 44(1): 105-114. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2023.146.

深切缅怀李厚达教授

薛整风¹, 钱莉², 高慧², 宗卫峰³, 吴宝金⁴, 邢华¹, 贺争鸣⁵, 邵义祥⁶, 李劲松⁴

(1. 扬州大学兽医学院, 扬州 225009; 2. 扬州大学医学院, 扬州 225009; 3. 江苏省食品药品监督检验研究院, 南京 210008; 4. 中国科学院分子细胞科学卓越创新中心, 上海 200031; 5. 中国食品药品检定研究院实验动物资源研究所, 北京 102629; 6. 南通大学实验动物中心, 南通 226001)

[中国分类号] R-332 [文献标志码] B [文章编号] 1674-5817(2024)01-0115-06



2022年12月30日, 敬爱的长者、慈爱的老师、杰出的实验动物科学家及教育家李厚达教授永远离开了我们。2023年12月16日, 在先生仙逝一周年之际, 扬州大学兽医学院举办了实验动物学专业人才发展暨科技创新论坛, 并隆重开展了“致敬李厚达教授”的追思活动。来自全国各地的200余名知名学者、扬州大学实验动物专业的毕业生及李厚达教授的挚友齐聚扬州, 深切缅怀李厚达教授积极进取、艰苦创业、成果卓著的精彩人生。

追思活动由扬州大学兽医学院党委书记蔡丽娅主持。扬州大学党委书记焦新安教授、兽医学院院长王志强教授先后作了发言, 高度赞扬了李厚达先生在实验动物学学科建设、人才培养和科学研究等方面所做出的重要贡献, 并对李先生致以崇高敬意。作为李厚达先生的第一位硕士研究生, 李劲松院士分享了自己扬州大学求学时的经历, 感激先生对他独特的教学启蒙方式, 引领他走上了克隆技术的科研生涯。李院士的每一言每一语都流露了对先生的真情厚意, 每一字每一词皆载满了对先生的真挚怀念。李院士还倡议设立“李厚达教育基金”, 以此激励更多后辈, 为中国实验动物科技事业发展做出更大贡献。中国食品药品检定研究院实验动物资源研究所原所长贺争鸣研究员回忆了自己参与原国家科学技术委员会条件局委托扬州大学于1983年举办的第一届全国实验动物科学技术人员进修班的点滴经历, 以及辅助李厚达先生编撰《中国大百科全书》第三版兽医学学科实验动物学分册的故事。他表示:“行动是致敬李厚达先生最好的方式。希望在日后工作中用实际行动, 加倍努力工作, 创造出更多更好的成果, 竭力推动我国实验动物科学的发展。”



图1 李厚达教授在不同时期(依次为青年、中年、晚年)的留影

先生已去, 离开了他为之奉献一生的事业, 但先生永远活在学生们的心中。他的多位学生分别用文字表达了对先生的敬仰与怀念, 从中可以窥见先生鲜活丰满的形象和崇高的风范。

第一篇:我第一次和李厚达老师去上海出差——薛整风教授(扬州大学兽医学院比较医学中心原主任)

1983年4月, 江苏农学院正式承担了原国家科委举办“第一期全国实验动物专业技术培训班”的任务后, 李厚达老师就紧锣密鼓地为9月开班做了大量筹备工作。其中有师资队伍的组织、教材编写和刻印、学员食宿的安排、实验室和实验课程的准备等一系列工作。当时有一件困扰所有老师的事——大家对实验动物科学的专业知识了解甚少, 也没有饲养过大、小

鼠, 严重缺乏感性认识。为了解决这一困惑, 李老师联系了上海的相关单位, 组织相关教师实地考察, 现场学习。

学校放暑假的第二天, 李厚达老师就带我去上海出差。这是我第一次和李老师一起出差, 虽然此事已过去40年了, 但至今记忆犹新。当年, 从扬州到上海可不简单, 直达的只有公共汽车, 一天也只有2个班次, 扬州人去上海大多数是过江到镇江然后乘火车。那次出差李老师申请使用了校车, 是一辆金杯牌面包车。同行的老师有严忠慎、朱模中、李国忠、吴云霞、

潘瑞荣、徐少浦、李厚达和我。早晨7:00从学校出发,中午从八圩汽渡过江,到达上海已是下午4:30。

在上海,李老师带领我们先后拜访了施履吉老师、刘瑞三老师,在舒家模、胡开元、王楠田、陈天培、金蓓蕾等老师的热情接待下,对原上海第一医学院实验动物科学部、第二军医大学动物中心、上海生物制品研究所动物室、中科院上海实验动物中心进行了参观学习。

参观学习结束后,我留在了上海,被安排到上海生物制品研究所动物室和原上海第一医学院实验动物科学部学习实验动物的饲养管理、无菌隔离器的操作与管理。在学习期间,我又认识了皇甫在、周光兴、陆志刚、潘振业等老师。整个暑假我都在上海学习。暑假结束前,我带了4笼盒(4个品系)小鼠回学校,李厚达老师亲自去镇江火车站接我,然后一起乘校车回到扬州。

这次在上海的参观学习,使我认识了许多上海实验动物科学领域里的前辈和同行,也看到了当年在瓦罐里饲养小鼠,在楼梯洞里养犬的情景。我深刻体会到李厚达老师白手起家,创建实验动物科学人才培养基地的艰辛。自此,我一直跟随李厚达老师,从事实验动物科学的教学与研究,直至2021年退休。

第二篇:厚待学子,达济同行——钱莉教授(扬州大学医学院院长,2001级硕士生)

2001年有幸成为李厚达老师的硕士研究生,成为李老师课题组这个大家庭中的一员,感受到的是浓浓的团结、和谐、奋发的氛围。李老师人如其名。“厚”:为人厚道,待人宽容。作为临床医学本科毕业的我,没有任何的科研基础,进入实验动物这个研究领域,几乎什么也不懂。但李老师每次对我提出的问题都是用不紧不慢的语调,细致耐心地解答,现在回想起来,仍然心存温暖。李老师对事业的追求,对实验动物学科的热爱,对后辈的提携也深深感染着我。当我成了老师后,始终以李老师为我的人生榜样,即使只能学到李老师的一点皮毛,也会终身受益。“达”:穷则独善其身,达则兼济天下。医学院的学位点建设起步较晚,2001年我本科毕业时医学院还没有硕士学位授权点,依托于李老师建立的实验动物学科,医学院的很多老师和学生都成了实验动物学方向的硕士研究生和博士研究生,不仅对我们个人的成长,也对医学院的科研和学科建设起到了极大的促进作用。

第三篇:亲爱的导师,感恩有您——高慧教授、主任医师(扬州大学医学院临床医学系,2002级博士生)

我的导师李厚达,正如您的名字一样,宽厚、豁达。李老师是我们学生心目中最伟大的导师,是我们知识的源泉和智慧的引领者。您不仅以卓越的学识和丰富的经验为我们传授知识,教会我们学术上的技能和理论,更以宽广的胸襟和温暖的胸怀塑造我们的品格,引领我们树立正确的价值观,注重人文关怀和社会责任,使我们在专业能力提升的同时,也成长为有道德情操和社会担当的人才。您不仅在自己的研究领域硕果累累,而且致力于培养学术接班人,传承学术智慧。学子们受益于您的深厚知识和教学经验,您的学术影响力将长久传世。您是我们前进道路上的灯塔,是我们终身学习的榜样。感恩有您!

第四篇:学业导师,人生榜样——宗卫峰主任药师(江苏省食品药品监督检验研究院,2000级硕士)

李老师不仅是我学习上的导师,更是我人生的榜样。他不仅具有严谨求实的治学精神,而且对实验动物学科的发展有着独特的前瞻性眼光,总能敏锐地发现实验动物研究的新动向。他对我的关爱之情,至今历历在目:我读研一的时候,李老师就让我查询克隆的研究进展,在课题组内进行汇报前,先单独试听我的讲解,指出需要改进的部分,汇报后又给予肯定,让我感受到自己的进步和成长。另外,我还记得他送我现在这家单位来面试的情景,从扬州来南京的路上对我千嘱咐万叮咛地交代着面试时的注意事项,使我信心大增,顺利通过面试;而且同一天送我面试之余,他还到动管办、检测站、南师大等单位交流沟通,这种敬业精神也给我留下了深刻印象。还有他孜孜不倦的创新精神也让我深感敬佩:李老师在快退休时还参与申请了国家小鼠遗传工程资源库项目,并积极推动实验动物科技产业转化工作,这在当年是很具有超前眼光的。李老师,您的言传身教将永远影响着我們。

第五篇:师恩难忘——吴宝金研究员(中国科学院分子细胞科学卓越创新中心动物平台主任,2001级博士生)

1993年本科毕业之后,我在扬州大学医学院从事人体解剖学教学工作,由于每年同样的内容要给不同班级的学生讲解好多遍,我很快便对解剖学教学失去

了兴趣。在2000年获得解剖学硕士学位后,我还梦想着去做一名临床医生,但是那个年代考研是需要介绍信的,想通过考博改变专业几乎是不可能的。我在迷茫失落之际,恰好在校内宣传橱窗看到李老招招收“比较医学”方向研究生的信息,突然间就有了努力的方向。我第一次拜访李老师就得到了热情接待,李老师让我恶补实验动物专业知识并指导我准备应试。最终我有幸做了他的第一个博士生。

先生育人最大的特点是以身作则,言传身教。先生的以身作则首先体现在工作细节上,比如他经常亲自背着液氮罐出差运标本,还亲自带学生到邵伯湖养鸭场采集血液标本,总是和学生一起参与动物实验取材,喜欢带着学生到优秀实验室参观学习等等。先生的以身作则更体现在对待名利的态度上。先生数十年一直居住在学校分配的苏农五村家属楼,同事们、学生们换再大的房子,他都毫不羡慕。在我学习期间,李老师的实验室大约有30个研究生,经费压力巨大。先生承接了很多横向课题,所得资金全部用于学生的科研工作,丝毫没考虑过改善自己的居住条件。因为跟学校借款建设比较医学中心,有很长一段时间,单位每月只发给先生2000元工资让他维持基本生活。即便如此,先生也毫无怨言,他的心思全在教书育人上。李老师的高尚人格,是我终生学习的榜样。

先生一生育人无数,我应该是获益最大的一个。读博期间,先生根据我的医学背景,让我做乙酰基亚硝基脲诱变培育人类疾病小鼠模型开发。这项工作需要大规模饲养小鼠及大量的经费支撑,对此先生是完全放手,毫不吝啬,鼎力支持。我博士毕业之际,先生尽心尽力地帮我设计了不同的发展道路:曾经尝试把我留在兽医学院比较医学中心,推荐我到中国医学科学院医学实验动物研究所,还推荐我到同济大学动物中心。在我回原单位工作之后,李老师将我博士期间培育的数十个小鼠品系和资料全部交给我,还把自己办公室的钥匙给了我,好让我有条件继续从事原来的科研工作。我原以为是先生偏爱我,后来才渐渐明白,无论你是什么年龄、身份及背景,只要有求于先生,他都会有求必应答,并平等对待,无条件提供帮助。

2014年我到中国科学院生化与细胞所工作以后,李老师正好也居住在上海,我们便有了较多的交流机会。我每年都会到先生家走动几次,当面聆听先生的教诲。从本单位动物房的管理,到坚持科研工作的重要性,甚至做人做事的原则,先生都毫无保留分享了

他的真知灼见。最后一次和先生一起工作,是共同编著《中国大百科全书》第三版兽医学学科实验动物学分册,李老师是主编,我是副主编。大概有十多次,他一个人坐一个多小时地铁到我的办公室,“固执”地坚持他的想法和标准,有效保证了编写词条的质量。我们通常一起在单位食堂共进午餐,同事们也都知道,这位敦厚慈祥的老者是我的老师。五十多岁的我还能和七十多岁的老师在一起工作,想来也是十分幸运和幸福。新冠疫情的几年里,李老师和师母回到扬州养老,我们见面机会变少,和劲松师兄一起回扬州为先生祝寿应该是最后一次见面。防疫封控放开之后,先生却跟着疫情走了。在那个非常时期,我没能送先生最后一程,这是我永远的遗憾。

第六篇:永远的恩师——邢华教授(扬州大学兽医学院实验室管理中心原主任,2003级博士生)

我作为李厚达先生的学生,在本科阶段的1980年就亲耳聆听了先生主讲的“畜牧机械化”课程,感受到了现代化的养殖业模式;参加工作后,恰逢先生创建扬州大学实验动物学学科,有幸加入其团队学习相关研究的思路和方法,是先生将我带进实验动物科学的大门,并使之成为了我的主要研究方向;2003年又到先生门下攻读博士学位,跟随先生开展其主持的国家“973”项目“转基因高等动物的创建与高级脑功能分析”之“犬生殖生理与转基因犬构建的研究”课题研究,系统学习了先进的理论、技术。我的学习、工作生涯基本是在先生身边度过的。

先生对生物科学前沿动态的敏锐洞察力,敢为人先、“摸着石头过河”的创新意识,充分运用一切资源、抢抓机遇建立平台的行动力,精准把控研究大方向、为学生营造宽松学术环境的人才培养模式,……,这些永远是我学习的榜样!

李老师,2022年7月21日学生陪您进入您学习、工作、生活了60余年的校园。尽管当时您对许多事情的记忆已不太清晰,但谈起实验动物学科创立的点点滴滴,您却滔滔不绝、如数家珍。当看到动物房等设施,当听到您开创的实验动物学科人才济济、成果丰硕时,您的兴奋之情溢于言表。不承想,这竟成了您进入校园的最后一次,与为之奋斗一生的事业最后道别。还记得2022年11月3日陪师母去养老院送药、探望,您的精神、身体状况还很好,还向护理员介绍“这是我的学生”,笑谈学科建立、国家级重大科研项

目申报与中标的趣事。不承想,这竟成了我们师生的最后一次见面。在这次见面的57天后,李老师永远离开了我们。

敬爱的李老师,我们永远怀念您!

第七篇:加倍努力工作是对李厚达老师的最好追忆——贺争鸣研究员(中国食品药品检定研究院实验动物资源研究所,第1期全国实验动物科学技术人员进修班学员)

我是原国家科委条件局在江苏农学院举办的第一期全国实验动物科学技术人员进修班的学员。当时我的领导兼老师即我国实验动物领域老前辈孙靖先生与进修班班主任李厚达老师关系很好,因而使我对李老师有着更多的了解和敬佩。在20世纪80年代,我国实验动物科技工作刚刚起步,没有完整的师资队伍和适用教材,也没有教学大纲和专业的实习场所,要组织举办时间长达一年的进修班谈何容易。就是在这样困难的条件下,李老师精心组织,事无巨细,亲力亲为,硬是把来自全国几十个单位的实验动物技术人员汇集起来,邀请全国实验动物领域知名专家莅临授课,组织专业人员翻译和编写教材,带领全体学员去上海和苏州有关机构实地学习,在主管部门的支持下成功举办了国内首届实验动物技术人员的高水平进修班。进修班学员在回到单位后均成为业务骨干,在各自的工作岗位上为我国实验动物科技事业发展做出了重要贡献。

后因一些项目工作与李老师的接触更多了一些。在与李老师一起工作接触过程中,我学习到李老师很多的优秀品质和专业知識。比如:2001年3月12日,由李厚达教授和高翔教授联名提出了“建立国家小鼠遗传资源中心的建议”,其中就明确了“借机孵化、洋为中用、股份制产业化、两条腿走路”19字的基本思路,这在当时是一个很大胆的突破。在国家遗传工程小鼠资源库的建设过程和最后验收阶段,我曾多方面与李老师一起工作,他的为人处世、做事风格、学识水平和创新求实的风格深深感染着我,使我受益匪浅。

最后一次与李厚达老师一起工作是2017年3月17日,在扬州大学参加由李厚达老师任主编的《中国大百科全书》第三版兽医学学科实验动物学分册的第二次工作会议。李老师思维敏捷、考虑全面,对编写框架和具体条目都提出了明确要求。虽然这是我第三次参加这类内容的编写,但李老师的见地使我受益良多。

对李厚达老师的最好追忆就是加倍努力工作,做

好我们每一天应该做好的事情,竭力推进我国实验动物科学事业发展,为我国科技创新和高质量发展贡献我们的力量。

第八篇:儒雅学者,敬业楷模——忆恩师李厚达教授——邵义祥教授(南通大学实验动物中心原主任,2002级博士生)

“玉壶存冰心,朱笔写师魂”。

1978年10月,我踏进这令人神往的校园——江苏农学院,并在此度过了大学四年的美好学习时光。在畜牧兽医系畜牧专业学习的四年里,李厚达老师是最令我难忘的恩师之一。“畜牧业机械化”课程的主讲人就是李厚达老师。那时的李老师,年轻、英俊、帅气、儒雅,讲课别具一格,从不照本宣科,而是结合实际,善于举例,讲解机械化自动化的意义、作用及发展前景,引人入胜。这样的课令我十分感兴趣,也很受启发。其中,倒顺开关工作原理、继电器工作原理、行程开关、速度控制原理、拖拉机发动机四冲程工作原理等都是通过实验课进行设计、拆解、操作来讲解和实践的,让我印象深刻。这些知识使我获益多多,对我后来从事实验动物设施管理工作助力颇大。

大学毕业后,我被分配到南通医学院设备科动物场工作(1992年更名为实验动物中心,科级建制;2005年更名为南通大学实验动物中心,副处级建制)。踏上工作岗位之后,李老师仍给予我很多关心、厚爱、支持和帮助,引领我不断取得新的进步。

2002年,我考取李老师的博士研究生,研究方向为疾病动物模型。在三年半的博士生学习研究中,李老师总是言传身教、悉心指导,还给我配备了得力的实验助手。我不仅顺利完成学业,获得双证,而且更重要的是,我的学术领悟力、创新能力得到了全面提升,管理能力和协调能力等也得到加强。

李老师的爱岗敬业、拼搏进取、刻苦钻研及诲人不倦都对我产生了深刻的影响。他的正直性格、诚信品格、敬业精神、求实作风都令我由衷地敬佩。举一个例子:我在申报教授职称时,提交的代表作恰巧是李老师评审的。李老师不因为我是他的学生就网开一面,而是公正无私,严格按照要求给予评价。同时他亦将实情告知于我,指出我的文章不成系列,其中有篇文章属于教学管理成果,不能体现科研创新能力和专业水平,因此作为科研代表作不很恰当。他勉励我要继续潜心科研,重新发表一篇同一研究系列的高水平

论文，下次再重新申报。李老师还帮助我分析现有研究结果，指导我如何凝练方向、如何撰写高水平论文、如何向高水平刊物投稿。正是他的一丝不苟和严格要求，让我充分认识到自身的不足，从而明确了努力方向。虽然我的教授职称晚评了两年，但从中得到的启发、受到的触动、获得的教益却很大，让我真正领悟到了授人以渔的真谛。

李老师曾多次来南通大学指导和讲学，也曾携师母一起来南通游览观光。在交谈中，他多次讲到江苏农学院与南通医学院的渊源关系。他对张謇先生的功绩和精神也了解颇多，对南通充满感情，对南通的发展甚为关注。他还告诉我，师母也是南通（如皋）人呢。他非常感慨，说张謇先生在中国历史上是位了不起的人物，功勋卓著，南通的发展也得益于张謇的建设基础。

江苏省乃至我国实验动物科学事业能有今天的成就，得益于李老师等先贤们的坚持、坚守和持之以恒，得益于他们长期的辛勤耕耘和艰苦努力。作为我国实验动物科学学科建设的奠基人之一，李老师为实验动物人才的培养做了大量卓有成效的工作，立体式、全方位地培养了大批实验动物科技人才。例如，举办各种形式的实验动物科技人才培训班，建立实验动物方向本科专业，培养实验动物方向硕士、博士研究生，为我国各高校、科研院所、生命科学领域、生物医药行业输送了大批合格的实验动物科技人才。李老师誉满天下，桃李满天下。

我将先生作为学习的楷模，在人才培养中严格要求，在实验动物学教学、科研、管理上全身心投入，兢兢业业工作，踏踏实实做人。我曾主持南通大学实验动物中心工作30年，我和我们团队积极进取，爱岗敬业，真诚奉献，各项工作都取得了长足的发展，受到学校领导、师生的广泛好评，也得到省内外同行的充分肯定。我们的人才培养也成效显著：与实验动物相关的本科专业从无到有，从有到好；研究生培养也令人欣慰，指导毕业的14届研究生如今都在各自的岗位上为教书育人，为实验动物科学发展、为生物医药研发贡献力量。学生们没有辜负恩师的栽培和殷切期望。让我们以此来告慰恩师的英灵吧，这也是我们献给恩师最好的礼物。

恩师虽然离开了我们，但其事业仍福泽社会、惠及后人。恩师精神与日月同辉，与山河同在！

敬爱的李厚达老师永垂不朽！您永远活在我们心中！

第九篇：怀念恩师李厚达先生——李劲松研究员（中国科学院院士，中国科学院分子细胞科学卓越创新中心，1993级硕士生）

1993年9月我进入扬州大学畜牧兽医学院，跟随李厚达老师攻读硕士研究生。1996年7月毕业留校任教，在李老师的教研组负责“细胞生物学”教学工作。1999年考入中科院动物研究所攻读陈大元老师的博士研究生。2002年赴美国洛克菲勒大学从事博士后研究。2007年回到中科院生化与细胞所开展独立科研至今。回顾我的科研生涯，扬州大学是我科研的启蒙之地，李厚达老师是我的科学引路人。

李老师是我科学的引路人，在李老师的引导下，我从事与动物克隆相关的研究直至今日。记忆犹新的是，在入校没多久，李老师递给我一本美国生殖生物学年会的会议摘要，指着其中的几篇关于动物克隆研究的文献，告诉我动物克隆是前沿和热点，要好好学习 and 了解。这件事在我的内心深处埋下了一粒种子，并随着时间的推移，逐渐生根发芽，长成了一棵大树。在攻读硕士期间，基于李老师的悉心指导与热心鼓励，我主要研究小鼠胚胎的玻璃化冷冻，掌握了基本的小鼠胚胎操作技术，为今后的科研道路奠定了坚实基础。李老师鼓励学术自由，对新的技术充满兴趣，他不会对学生们研究设限，并始终鼓励学生知识破圈、放开手脚、大胆钻研。在这样严谨但自由的科研氛围的影响下，我对科学研究产生了浓厚的兴趣，快速成长，顺利完成课题。同时，这段经历对我今后的科研活动也产生着深远的影响。在随后的科研训练中，我掌握了更多的动物克隆相关技术。2012年，我率领团队创建了半克隆技术，如今半克隆技术已经在构建复杂编辑小鼠模型中发挥着重大作用。从克隆到半克隆，既是科学的传承，又是站在巨人肩膀上的一次科学突破。这一切都源于最初李老师给我的一本会议摘要。

李老师在我学术生涯的早期提供了几个关键的机会，为我在科研道路上的成长奠定了重要基础。因为当时的扬州大学实验动物中心饲养着大量的乙型肝炎病毒（HBV）转基因小鼠，李老师为我设计了研究生课题“HBV转基因小鼠的胚胎冷冻”，研究期间开展了HBV转基因小鼠相关特性的分析研究。在科研生涯的起始阶段就接触到至今仍然非常热门的转基因相关研究，这段经历让我受益终身。1997年3月，在李老师的安排下，我去北京大学旁听本科生的“细胞生物学”课程，同时利用课余时间到中国科学院动物研究所陈

大元老师实验室学习动物克隆相关的知识和技术。后来李老师还亲自带着我去北京拜访陈大元老师，开启了我从事动物克隆研究的序幕。回顾至今，我能够在科学上做出一些成绩，都是源于李老师当年提供给我的机会。

李老师一生都致力于实验动物学科研和教育工作，从无到有地创办了扬州大学实验动物专业，为中国实验动物科技事业的发展培养了一大批优秀的专业人才，是中国实验动物学开拓者之一。何其有幸，我能成为李老师招收的第一位硕士研究生，这是我人生中无比珍贵的一段经历。先生对工作的执着热情，“一生只做一件事”的精神，以及博大的育人胸怀都在潜移默化中深深影响着我和学术生涯。

恩师已逝，精神长存。缅怀先生是为了更好地传承先生的精神，我辈当继续努力，为中国实验动物科技事业发展做出更多贡献。



图2 李厚达教授八十华诞合影留念(2022年4月)

附:李厚达教授生平

李厚达先生1942年4月22日出生于南京；1965年苏北农学院兽医专业毕业，毕业后留校任教，先后从事过兽医外科学、兽医外科手术学和畜牧业机械化的教学工作；自1983年开始从事实验动物学的教学科研工作；1986—1987年作为访问学者赴美国密歇根州立大学进修实验动物；2007年退休；2022年12月30日因病医治无效在扬州逝世，享年81岁。先生曾任扬州大学比较医学中心主任、农学院实验动物教研室主任、农业部全国农业院校教学指导委员会兽医学科组第1、2届委员，中国实验动物学会第1、2、3届理事及第4、5、6届常务理事，中国动物学会1996—2000届理事，江苏省动物学会1992—2008年4届常务理事、副理事长，第1~4届江苏省实验动物专业委员会主任，江苏省实验动物管理委员会第1、2届副主任兼专家组组长。

1983—1985年，李厚达先生受原国家科委委托，在江苏农学院举办了两期全国实验动物科学技术人员进修班，培养了我国最早一批实验动物学人才，其中包括贺争鸣、仇志华、刘年双、施张奎、孔利佳、卢笑丛、刘迪文等一大批优

秀的实验动物科学骨干，为我国实验动物科学的发展奠定了坚实的基础。先生以办实验动物人才培训班为契机，开创了扬州大学实验动物学教学与科研工作。在李厚达先生的主导下，扬州大学（当时为苏北农学院）于1984年率先在全国兽医、畜牧等本科专业中开设了实验动物学课程，1992年开始招收实验动物学硕士研究生，1997年设立实验动物学硕士研究生培养点并受国家科技部委托举办实验动物科学专业证书班，1999年起开设实验动物学本科专业，2000年开始招收博士研究生。李厚达先生一生为我国实验动物学科学事业培养了实验动物学本科专业学生150多人，博硕士研究生40余人，其中包括李劲松、孙强、徐向明、吴宝金、邵义祥、张泉、钱莉等新一代实验动物科技工作者。扬州大学因此成为我国实验动物人才培养上具有重要地位的高等学府，实验动物学专业毕业生的就业率达100%，在2023年软科中国大学专业排名中，该校实验动物学荣获A+等级，排名全国第一。

李厚达先生是实验动物科技战线上的积极分子。在1985年召开的全国第二次实验动物科技工作会议上，为推动我国实验动物科学工作的发展，李先生起草了给“党中央和国务院的紧急建议书”，与会代表100多人在“建议书”上签名。这份“建议书”反映了当时全国实验动物科技工作者的心愿，为我国实验动物科学事业的发展留下了闪光的一笔。他在1985年发起并组织成立了江苏省实验动物专业委员会，在担任专业委员会主任及省实验动物管理委员会专家组组长期间，大力组织、参与了《江苏省实验动物笼器具地方标准》的编写，江苏省实验动物质量检测一站、二站以及江苏省实验动物大鼠、小鼠、兔、毕格犬饲养基地的建立，以及《江苏省实验动物管理办法》的起草，为江苏省实验动物科技工作规范化、质量标准化做出了贡献。退休之后，先生仍关心关注实验动物事业的发展，长期指导中国科学院神经所及生化细胞所的动物平台管理工作，有力推动了采用胚胎操作技术进行实验小鼠的保种和微生物净化工作。

李厚达先生白手起家建立了扬州大学实验动物学科和科研团队，先后主持并完成了国家“九五”科技重点攻关“白血病、鼻咽癌转基因动物模型，人消化系统肿瘤模型及质控大鼠肿瘤动物模型的建立”课题；完成国家“十五”科技重点攻关“国家遗传工程小鼠资源库的建立”项目（李厚达为项目第二主持人）；承担国家“973”规划“转基因高等动物的创建与高级脑功能分析”项目，主持“犬生殖生理与转基因犬构建的研究”课题；参加江苏省和农业部的多个研究项目；在国内首先开展ENU诱变工作，培育了30余个突变系小鼠，定位鉴定了近20个突变基因；发表论文50余篇；为了实验动物科技人才培养，先生非常重视实验动物科技教材编写工作，主编了第1~3版的江苏省实验动物从业人员培训教材、《实验动物质量检测程序与方法》、《实验动物疾病及其检测》、《实验动物寄生虫》、《实验动物解剖学》等10多部书籍，第1~2版农业部全国教材《实验动物学》，以及《中国大百科全书》第三版兽医学学科实验动物学分册。

(收稿日期:2024-01-02 修回日期:2024-02-08)

(本文由李劲松、吴宝金整理)

(本文编辑:张俊彦,富群华)

[引用本文]

薛整风, 钱莉, 高慧, 等. 深切缅怀李厚达教授[J]. 实验动物与比较医学, 2024, 44(1): 115-120. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.022.



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(神经科学研究所)非人灵长类研究平台主任。国家杰出青年基金获得者, 科技部中青年科技创新领军人才, 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。中国实验动物学会理事, 中国实验动物学会灵长类实验动物专业委员会常务理事, 上海市实验动物学会理事, 上海市实验动物学会生物安全专业委员会委员。长期致力于实验动物管理和模式动物构建及相关技术的研发工作, 为了向公众普及实验动物相关知识, 坚持实验动物科普写作多年, 为“实验动物那些事儿”公众号主要作者之一, 发表科普文章70余篇。

[写在前面] 一年多前, 杂志编辑部俊彦老师就曾和我商量, 是否可以在《实验动物与比较医学》上以科普专栏的形式, 向读者朋友们介绍一下实验动物及这个行业的特点和贡献。之前出于两个考量一直没敢接这个任务: 其一是时间有限; 其二是虽对实验动物和动物实验的很多话题有所了解, 但大多还不够深入。2023年9月在西双版纳召开的实验动物资源及应用学术研讨会期间, 俊彦老师再次提出邀请, 盛情难却下我答应准备一段时间后可以开此栏目。由于时间精力限制, 目前我还没有一个清晰完整的计划和目标, 只做到想到哪写到哪的打算。最大的可能是将本人在微信公众号“实验动物那些事儿”上发表过的内容进行重新整理和汇总, 使之更加系统和完整。另外, 对文章的长短也没有固定要求, 希望能够做到尽可能完整地阐述一个主题。实验动物对生物医学研究至关重要, 但公众对其的了解仍不够深入。这里再次感谢俊彦老师和杂志给我这个机会, 让我能以这样的方式和广大读者朋友们探讨实验动物和动物实验相关问题。

为什么要开展动物实验

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】R-332; Q95-33 【文献标志码】B 【文章编号】1674-5817(2024)01-0121-06



过去一个多世纪以来, 医学和生命科学取得了飞跃式的发展, 人类不仅建立了麻醉、安全输血、器官移植、人工心脏瓣膜等医疗技术和手段, 还研发出了抗生素、疫苗和各种药物, 从而消灭或控制了多种曾经严重威胁人类生命和健康的疾病。所有这些成就的取得都离不开动物实验的贡献。但绝大多数公众在享受动物实验科研成果所带来的健康和福祉时, 却并不了解动物实验及其在历史和当前背景下对生命科学和医学研究及药物研发的重要性。在某些情况下, 社会大众甚至一些科研工作者出于同情动物(尤其是人类伴侣动物, 如犬和猫), 对使用实验动物开展科学研究不理解, 甚至一些实验动物和动物实验从业人员也或多或少地在潜意识里对开展动物实验的合理性有所怀疑。与此同时, 一些主张“动物权利”的文章往往对动物实验做片面性、误导性解读, 也很容易让不了解全部事实真相的公众或者虽然了解但不够深入的从业人员对动物实验产生误解。例如, 2023年国内外出现的有关哈佛大学Livingstone M S教授发表于*PNAS*上一篇题为“Triggers for mother love”的文章^[1]的伦理争

议, 无论是国外科学界的联名撤稿信^[2], 还是国内科学媒体报道, 都反映出人们对当下动物实验必要性和合理性的认识不足。因此, 本专栏的第一篇文章将通过列举动物实验的几个重要贡献来阐述为何要开展动物实验。

众所周知, 出于伦理考量, 很多介入性的实验都无法在人体中进行, 而诸如小鼠、大鼠、兔、猪、猫、犬和猴等实验动物不仅在遗传组成上与人类高度同源, 而且具有和人类相似的组织器官和系统。这些遗传同源且结构相似的组织器官不仅以相同的方式执行着其生理功能, 而且在遗传和环境作用下会发生类似的各种疾病, 因此科学家可以用实验动物来模拟人类的生理活动以及疾病的发生和发展过程。基于以上原因, 过去几个世纪以来, 动物实验几乎充斥于生命科学和医学研究的每个领域。以诺贝尔生理学或医学奖为例, 截至2023年, 在已颁发的全部114个奖项中, 有101个与动物实验相关, 其研究成果都是基于动物实验而来。这里我们不妨选取几个有代表性的工作来一瞥动物实验所发挥的作用。

1 恐怖的细菌感染与血清疗法

1.1 白喉治疗

2023年9月,英国《卫报》(*The Guardian*)报道了尼日利亚白喉疫情暴发事件^[3]。这次疫情导致7200人感染,453人死亡,让白喉这一传染病重新进入了公众视野。其实,早在一百多年前的20世纪初,白喉曾是导致一半儿童死亡的罪魁祸首,被称为“儿童绞杀天使”。白喉病的传染性强,致死率高,10岁以下儿童感染后死亡率高达80%,故成为当时儿童健康的主要威胁,仅美国每年就有10万~20万人发病,其中死亡约1.5万人,而在欧洲每年因感染白喉而死亡的人数更是达到了5万人,其中绝大多数为儿童。

白喉是由白喉杆菌引起的一种急性呼吸道传染病,因其感染后可在患者喉咙处形成灰色或白色斑块肿胀而得名。由于这种肿胀会封闭呼吸道而令患者窒息,部分患者最终会因呼吸困难而被活活憋死。在白喉流行的年代,由于没有其他的有效治疗方案可以选择,医生有时甚至会使用锋利的尖刺直接穿破封锁气道的肿块来为患者保命,这个治疗过程是非常痛苦的。

19世纪末,随着显微镜的发明,科学家们终于找到了导致该病的元凶——白喉杆菌;此后,又很快地搞清楚了白喉毒素是白喉杆菌致病的主要原因。接着,德国科学家埃米尔·阿道夫·冯·贝林(Emil Adolf von Behring)发现,用白喉杆菌培养肉汤(含有白喉毒素)接种豚鼠后,不仅可以刺激被接种动物产生抗白喉毒素血清(抗体),进而中和掉白喉毒素的毒性,抵抗白喉感染,而且这种抗毒素血清对其他白喉感染动物也有治疗作用,并建立了针对白喉的血清疗法。

在动物实验成功后,贝林很快开始使用抗白喉毒素血清开展人体试验。然而,由于血清数量和质量问题,该测试的成功率并不高。其后,拥有大型动物实验经验的保罗·埃尔利希(Paul Ehrlich)开发出了标准化血清生产技术,并通过给马接种白喉毒素来生产大量高质量抗白喉毒素血清。在使用马抗白喉毒素血清后,人体试验才真正取得成功。1894年的一份报告中显示,对220名白喉儿童进行马抗白喉毒素血清治疗后总体治愈率达到了77%,而且其治愈率取决于治疗开始时间;如果是在确诊后的前2天开始治疗,成功率可接近100%;如果是确诊后的第6天才开始治疗,则成功率会下降到50%^[4]。

1901年,冯·贝林因该工作获得了首届诺贝尔

生理学或医学奖。正是因为冯·贝林基于豚鼠动物实验建立的抗白喉毒素血清疗法,终于为白喉这一严重威胁人类尤其是儿童健康的疾病找到了有效的治愈方法。虽然这一疗法仍存在外来血清抗体具有抗原性且可能是潜在过敏源等问题,但在没有其他可用疗法的年代,这毕竟是一种可以救命的有效疗法。

1.2 破伤风治疗

当你不小心被钉子扎伤且伤口很深,去医院处理伤口时,医生一般会建议你打一针抗破伤风针,其主要成分是抗破伤风毒素血清。这是因为环境中广泛分布的厌氧致病菌——破伤风梭菌,非常容易经由皮肤或黏膜伤口侵入人体,在伤口内的缺氧环境下会迅速生长繁殖,并通过产生毒素侵袭运动神经元,从而导致咬肌、背棘肌、腹肌和四肢肌等肌肉痉挛,引发患者出现牙关紧闭、阵发性痉挛和强直性痉挛等临床症状。

破伤风梭菌和它的孢子广泛存在于与我们工作和生活密切相关的土壤、灰尘以及动物和人类的粪便中,极易通过刺穿伤、撕裂伤、皮肤破损、感染的注射器接种或昆虫叮咬进入体内。由于感染源在环境中广泛分布,加之伤者认为个别小伤微不足道而忽视,未做及时处理,最后很容易导致破伤风感染。

破伤风感染的致死率极高,不经治疗的患者死亡率几乎是100%。在抗生素被发现和疫苗被广泛应用前,破伤风与结核、白喉一样,曾是人类生命和健康的最大威胁之一。如今在使用含破伤风类毒素的疫苗大规模免疫接种后,破伤风感染已经逐年减少,现存病例主要集中在不洁分娩的母婴中。根据世界卫生组织的统计,2018年仍有2.5万名新生儿死于破伤风,但相较于1988年的83万人,已减少了近97%。

与白喉杆菌一样,既然破伤风梭菌也是通过产生毒素致病的,那么血清疗法是否同样有效呢?其实针对破伤风毒素的血清疗法建立的时间比针对白喉毒素血清疗法的建立时间还要早。

1889年日本细菌学家北里柴三郎(Kitasato Shibasaburo)成功获得破伤风梭菌纯培养物,并证明其是导致破伤风的病原体。1890年,北里柴三郎和冯·贝林合作发表了通过动物血清转移破伤风毒素和白喉毒素免疫力的研究结果,开启了血清疗法的时代。然而,与白喉毒素抗血清相反,破伤风抗血清在用于治疗目的时相对无效。其原因是破伤风梭菌经伤口进入人体后,早期通常没有明显的感染症状,只有当毒

素经血液循环达到中枢神经系统后,感染者才会显现出明显症状。而此刻即便使用抗破伤风血清治疗也为时已晚。再加上当时破伤风感染的病例远低于白喉感染病例,因此并没有引起科学家的广泛关注。

正当破伤风感染的血清疗法几乎要淡出人们视线时,来自法国巴斯德研究所的兽医和微生物学家埃德蒙·诺卡德(Edmond Nocard)却利用这个方法成功治愈了感染破伤风梭菌的马。马匹在当时具有极其重要的经济和战略意义,不仅作为人类耕作和运输等生产活动中重要的畜力被大量饲养,而且战马也是当时重要的战略资源。由于厌氧的破伤风梭菌会在马粪中大量繁殖,马匹常常会因为蒺藜扎伤等轻微伤或常规绝育手术而感染破伤风^[5]。与此同时,相较于包括人类在内的其他哺乳动物,马还是对破伤风毒素最敏感的物种。因此,即便在感染早期,马也会显现出一些症状,这就给了使用抗破伤风毒素血清对其进行有效治疗的机会。通过对马匹进行抗破伤风毒素血清治疗的结果也让科学界发现,在潜在的破伤风梭菌感染患者中,使用抗毒素血清进行预防性接种仍然有效。这一预防性接种的理念很快在第一次世界大战中得到了证实,并挽救了大量伤兵的生命。

1914—1918年的第一次世界大战,是人类战争史上最残酷和致命的战争之一,造成数千万军民受伤和两千万士兵死亡^[6]。除子弹和炸弹致死之外,伤口感染在士兵死亡原因中排名第一,而导致死亡的主要感染是气性坏疽和破伤风,因为在泥泞或灰尘漫天的战场环境中破伤风孢子无处不在,其感染也就成了家常便饭。战争初期,在没有使用破伤风毒素抗血清进行预防性接种时,受伤士兵的破伤风感染率非常高。如1914年8—10月期间,德国第15军到军医院就诊的伤兵中破伤风感染率高达6.3%,在英国军队中受伤士兵的破伤风发病率也有3.2%^[7]。1914年,在欧洲西线战场上感染破伤风的德国伤员死亡率从75%到100%不等,同样在海外受伤的英国士兵感染破伤风后死亡率也高达78.2%。其后,交战双方都进行了针对受伤士兵的破伤风毒素抗血清预防性接种,从而令冲突双方的破伤风发病率急剧下降。保守估计,抗破伤风毒素抗血清预防接种挽救了数十万伤员的生命^[7]。

与此同时,为了满足破伤风毒素抗血清生产需求,大量马匹被接种破伤风培养物肉汤(含有破伤风毒素)用来生产抗毒素血清。而战后,抗破伤风毒素血清接种也成为军马和农业用马受伤后的常规处置措施,极

大地减少了伤马因感染破伤风而死亡的比例。因此,在血清疗法的临床应用中,马不仅是破伤风毒素抗血清的生产者,也是受益者。这是动物实验同时让人类和动物受益的一个经典案例。

2 病毒性疾病及疫苗研发

2.1 脊髓灰质炎疫苗

20世纪被称为“夏日幽灵”的脊髓灰质炎(国内俗称小儿麻痹症)曾肆虐全球,可导致感染者瘫痪、呼吸困难甚至死亡。而如今这种传染病在多数国家已经被消灭,这要得益于美国科学家乔纳斯·索尔克(Jonas Salk)和阿尔伯特·萨宾(Albert Sabin)的疫苗研发工作。由于脊髓灰质炎病毒只感染灵长类动物,因此在疫苗研发和早期的疫苗生产过程中使用了大量实验猴。中国医学科学院昆明医学生物学研究所的非人灵长类实验动物设施就是在这样的背景下建立的,其帮助我国基本消灭了脊髓灰质炎病毒感染。

脊髓灰质炎是一种具有高度传染性的病毒性疾病,主要影响5岁以下儿童。脊髓灰质炎病毒主要通过粪口途径在人与人之间传播,也较少通过常见媒介(例如受污染的水或食物)传播,后在肠道中繁殖,进而侵入被感染者的神经系统并导致全身麻痹。19世纪末20世纪初,脊髓灰质炎疫情频发,成为世界上最可怕的疾病之一。1916年美国纽约市的一次大爆发就导致了2 000多人死亡。高峰期的1952年,仅美国就报告有57 000多人感染。许多在脊髓灰质炎病毒感染中幸存下来的患者,由于脊髓中控制下肢的神经受损导致腿部变形而无法行走,或控制自主呼吸的神经受损而无法呼吸,需要终生依靠呼吸机辅助呼吸。到20世纪中叶,脊髓灰质炎病毒已遍布世界各地,每年导致超过50万人死亡或瘫痪。由于缺乏有效的治疗方法且流行病例不断增加,因此迫切需要研发针对该病毒的有效疫苗。

在脊髓灰质炎早期研究工作中,从认识病毒感染途径,到了解病毒感染后的病理特征,甚至病毒培养和传代都离不开灵长类动物。如研究发现该病毒具有3种不同的免疫学毒株,所有这些毒株均可导致被感染者出现不可逆的麻痹甚至死亡^[8]。同时科学家认识到初始感染发生在胃肠道的淋巴组织,并且病毒血症对于中枢神经系统感染至关重要^[9]。这些发现都是基于非人灵长类动物研究获得的。后期疫苗的研发和生产同样离不开非人灵长类动物。在阐明了脊髓灰质炎的

发病机制后,首个成功的脊髓灰质炎疫苗由索尔克研发出来,并于1955年4月成功完成人体临床试验^[10]。这个疫苗的生产是在猴肾原代细胞培养扩增病毒的基础上完成的。后续萨宾又成功研发出口服减毒疫苗,并在其推出后的前两年,就避免了近50万人死亡和500万例脊髓灰质炎病例的发生^[11]。为满足大量的疫苗生产需求,据估算仅在美国和欧洲就使用了超过一百万只实验猴^[12]。因此,可以说离开非人灵长类动物,就不可能有脊髓灰质炎疫苗的成功研发和批量生产,并最终控制甚至在全球绝大多数国家根除了脊髓灰质炎。据世界卫生组织估计,自2000年以来,疫苗已使全球约1 300万名儿童免于脊髓灰质炎爆发而导致的死亡。自1988年以来,全球脊髓灰质炎病毒感染人数已从350 000例下降到2016年报告的37例,下降了约99.99%。

2.2 麻疹病毒疫苗

大约在研发脊髓灰质炎疫苗的同时,非人灵长类动物也被用于麻疹病毒的研究和疫苗研发工作中。通过空气传播的麻疹病毒是传染性最强的人类病原体之一,由于频繁爆发,其发病率和死亡率都很高^[13-15]。小鼠等小型实验动物对麻疹病毒通常不易感,也不会出现灵长类动物中常见的复杂病理变化,因此非人灵长类动物是研究麻疹病毒的首选模型。基于在非人灵长类动物上的研究结果,科学家建立了体外连续培养麻疹病毒技术,为20世纪60年代成功研发出减毒麻疹疫苗奠定了基础^[16]。虽然可以在细胞系、原代细胞、类器官或组织培养物中开展麻疹病毒的研究,但是只有通过非人灵长类动物进行在体实验,才能准确确定病毒是如何进入机体、如何导致疾病发展和传播,以及由此引发的涉及多器官和系统的免疫变化。此外,基于非人灵长类动物模型的研究结果也已被用于优化现有的麻疹疫苗,提供更优的疫苗递送模式,并为开发其他疫苗提供了参考。

2.3 埃博拉病毒疫苗

埃博拉病毒可能是目前发现的最致命的病毒,它会引起急性出血热,人类感染后致死率高达50%。与人类一样,非人灵长类动物也容易感染埃博拉病毒,且其感染后的发病机制(包括临床表现、化学和血液学指标以及最终死亡率)都与人类非常相似^[17-18]。使用啮齿类动物模型开发和测试的埃博拉病毒候选疫苗在非人灵长类动物测试中发现没有保护作用,最终还得通过使用非人灵长类动物模型才成功开发出了埃博

拉病毒疫苗^[19]。因此,非人灵长类动物模型对于评估埃博拉病毒的候选疫苗和药物治疗价值非凡,并充分反映了其具有更高的临床转化价值的特点^[20]。另外,黑猩猩感染埃博拉病毒后死亡率约为77%,大猩猩感染后的死亡率更是高达95%,都远高于人类感染埃博拉病毒后的死亡率。20世纪90年代至今,埃博拉病毒已经导致全球1/3的大猩猩和黑猩猩死亡。因此,这些基于动物实验开展的疫苗研发工作,在让人类受益的同时,也能让动物受益。抗埃博拉病毒疫苗的研发过程正说明,动物实验在帮助人类的同时,对挽救已处于濒危状态下的人类近亲——大猩猩和黑猩猩至关重要。

3 糖尿病与胰岛素的发现

糖尿病是一种慢性代谢性疾病,其特征是血糖水平升高,且随着时间的推移,高血糖会对心脏、血管、眼睛、肾脏和神经造成严重损害。世界卫生组织对糖尿病的统计数据显示:全球约有4.22亿人患有糖尿病,其中大多数生活在低收入和中等收入国家,每年有150万人死亡直接归因于糖尿病。在过去的几十年里,糖尿病的病例数量和患病率都在稳步增加^[21]。

众所周知,胰腺对维持血糖的稳定至关重要。胰腺对维持血糖水平稳定至关重要。早在1889年,德国医生约瑟夫·冯·梅林(Baron Joseph von Mering)和奥斯卡·明科夫斯基(Oscar Minkowski)发现犬在切除胰腺后出现了糖尿病的所有症状和体征,从而明确胰腺与循环系统内糖代谢具有密切关系。那么胰腺是如何调控血糖的呢?这个问题的答案是由一名年轻的加拿大外科医生弗雷德里克·格兰特·班廷(Frederick Grant Banting)找到的。

1921年,班廷来到了多伦多大学约翰·詹姆斯·里卡德·麦克劳德(John James Rickard Macleod)教授的实验室开展胰腺中血糖调控成分的分离工作。凭借其出色的外科手术技能,班廷通过结扎犬胰管使胰腺外分泌细胞(内含多种蛋白水解酶)退化而得到了胰岛。班廷的助手查尔斯·贝斯特(Charles Best)利用其扎实的化学分析技术,成功从胰岛中分离出了可以降低犬血糖的有效成分——胰岛素,之后在麦克劳德指派的生物化学家詹姆斯·科利普(James Collip)的帮助下,进一步将胰腺中提取的胰岛素纯化到了临床可用纯度。1923年1月,多伦多医院的一名患糖尿病的14岁男孩接受了胰岛素注射治疗,24 h后他的血糖

从 520 mg/dL 降至 120 mg/dL, 尿酮也随之消失。班廷和麦克劳德因这项工作分享了 1923 年的诺贝尔生理学或医学奖, 获奖后班廷将他的一半奖金分给了贝斯特, 而麦克劳德则将他的一半奖金分给了科利普^[22]。另外, 班廷、贝斯特和科利普共同分享了胰岛素专利, 并以 1 美元的价格卖给了多伦多大学。

胰岛素的发现极大地改善了糖尿病患者的生活质量, 也推动了糖尿病相关研究, 而犬一直是糖尿病研究的首选动物模型。之后, 同样基于犬模型, 阿根廷内分泌学家贝尔纳多·阿尔贝托·豪赛 (Bernardo Alberto Houssay) 进一步研究了胰岛素的产生机制, 发现垂体前叶可以通过分泌激素调节胰岛素分泌, 并因此获得 1947 年的诺贝尔生理学或医学奖。

不仅仅是人类, 宠物同样会患糖尿病。来自美国的统计数据显示: 1/300 的犬和 1/230 的猫一生中会患糖尿病^[23]; 且宠物糖尿病的发生率在近十年来呈上升趋势, 其中犬患病率上升了 80%, 猫患病率上升了 18%^[24]。因此, 胰岛素的发现和糖尿病的机制解析在为人类生命健康作出重要贡献的同时, 也保障了动物尤其是人类的主要伴侣动物即宠物犬和猫的健康。

4 结语

近 2 个世纪以来, 人类在疾病防控上取得的几乎所有辉煌成就都离不开动物实验研究, 除了药物及疫苗研发外, 在临床上开展的诸如麻醉、输血、镇静和外科手术等诊疗技术也都是在动物实验基础上建立的。但至今人类还面临着诸如 HIV 病毒、Zika 病毒和埃博拉病毒等严重传染病的威胁, 也没有攻克恶性肿瘤和阿尔茨海默病等重大疾病。而体外培养细胞还不能反映其来源组织器官的功能和形态, 计算机也无法模拟心脏或肾脏等器官的完整功能, 因此动物实验在目前及未来很长一段时间内仍然是必不可少的。

同时, 需强调的是, 基于动物实验建立的疾病防控及诊疗技术不仅让人类受益, 动物也是受益者。宠物和家畜的药物和疫苗研发同样依赖于动物实验, 例如通过接种炭疽、牛瘟和猪丹毒疫苗, 已经拯救了数以亿计的动物生命。基于动物实验的研究甚至是挽救濒危动物必须和必要的手段, 人类有责任和义务通过开展基于动物实验的科学研究, 尽快开发出有效的防控手段, 保护地球生命共同体。

现在我们可以给“为何要开展动物实验”一个答案了, 那就是为了人类和动物的健康!

(2023 年 12 月 9 日星期六, 写于强业路 500 号)

【参考文献 References】

- [1] LIVINGSTONE M S. Triggers for mother love[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2022, 119(39): e2212224119. DOI: 10.1073/pnas.2212224119.
- [2] GRIMM D. Harvard studies on infant monkeys draw fire[J]. *Science*, 2022, 378(6618): 341-342. DOI: 10.1126/science.adf4960.
- [3] WANNEKANMA B, FALAJU J. Nigeria records 7,200 cases of diphtheria, 453 deaths[N/OL]. *The Guardian*, 2023-09-30. <https://guardian.ng/news/nigeria-records-7200-cases-of-diphtheria-453-deaths/>.
- [4] KAUFMANN S H E. Remembering emil von Behring: from tetanus treatment to antibody cooperation with phagocytes [J]. *mBio*, 2017, 8(1): e00117-e00117. DOI: 10.1128/mBio.00117-17.
- [5] TOOP C R. Tetanus in farm animals[J/OL]. *Journal of the Department of Agriculture Western Australia, Series 4*, 1960, 1 (4): 347-351. https://library.dpird.wa.gov.au/cgi/viewcontent.cgi?article=1709&context=journal_agriculture4.
- [6] WEVER P C, VAN BERGEN L. Prevention of tetanus during the first world war[J]. *Med Humanit*, 2012, 38(2): 78-82. DOI: 10.1136/medhum-2011-010157.
- [7] AUBERT N, BRACHET-BOTINEAU M, DE OLIVERA PRETO G E, et al. History, extensive characterization and challenge of anti-tetanus serum from World War I: exciting remnants and deceived hopes: Centenarian IgGs lost their neutralization capacity[J]. *Immunol Res*, 2020, 68(1): 7-12. DOI: 10.1007/s12026-020-09121-z.
- [8] GARDNER M B, LUCIW P A. Macaque models of human infectious disease[J]. *ILAR J*, 2008, 49(2): 220-255. DOI: 10.1093/ilar.49.2.220.
- [9] NATHANSON N. David Bodian's contribution to the development of poliovirus vaccine[J]. *Am J Epidemiol*, 2005, 161(3): 207-212. DOI: 10.1093/aje/kwi033.
- [10] LAURENCES W L. Salk polio vaccine proves success; millions will be immunized soon; city schools begin shots April 25[N/OL]. *New York Times*, 1955-04-13. <http://www.medicine.mcgill.ca/epidemiology/hanley/bios601/Polio/NYTimes.pdf>
- [11] Speaking of Research. Albert Sabin and the monkeys who gave summer back to the children[A/OL]. 2023-01-10. <https://speakingofresearch.com/2011/02/01/the-monkeys-who-gave-summer-back-to-the-children/>.
- [12] LECORNU A, ROWAN A N. The use of non-human Primates in the development and production of poliomyelitis vaccines [J]. *Altern Lab Anim*, 1979, 7(2_suppl): 77-89. DOI: 10.1177/026119297900702s12.
- [13] MORENS D M. The past is never dead—measles epidemic, Boston, Massachusetts, 1713[J]. *Emerg Infect Dis*, 2015, 21(7): 127-1260. DOI: 10.3201/eid2107.150397.
- [14] MORENS D M, TAUBENBERGER J K. A forgotten epidemic that changed medicine: measles in the US Army, 1917–18[J]. *Lancet Infect Dis*, 2015, 15(7): 852-861. DOI: 10.1016/S1473-3099(15)00109-7.
- [15] ROTA P A, MOSS W J, TAKEDA M, et al. Measles[J]. *Nat Rev*

- Dis Primers, 2016, 2:16049. DOI: 10.1038/nrdp.2016.49.
- [16] DE SWART R L. Measles: what we have learned from non-human primate models[J]. Drug Discov Today Dis Models, 2017, 23:31-34. DOI: 10.1016/j.ddmod.2018.01.002.
- [17] GEISBERT T W, PUSHKO P, ANDERSON K, et al. Evaluation in nonhuman Primates of vaccines against Ebola virus[J]. Emerg Infect Dis, 2002, 8(5): 503-507. DOI: 10.3201/eid0805.010284.
- [18] ST CLAIRE M C, RAGLAND D R, BOLLINGER L, et al. Animal models of ebolavirus infection[J]. Comp Med, 2017, 67(3): 253-262.
- [19] GEISBERT T W. First Ebola virus vaccine to protect human beings? [J]. Lancet, 2017, 389(10068): 479-480. DOI: 10.1016/S0140-6736(16)32618-6.
- [20] ROOZENDAAL R, HENDRIKS J, VAN EFFELTERRE T, et al. Nonhuman primate to human immunobridging to infer the protective effect of an Ebola virus vaccine candidate[J]. NPJ Vaccines, 2020, 5(1):112. DOI: 10.1038/s41541-020-00261-9.
- [21] WHO. Diabetes[EB/OL]. (2023-12-01) [2023-04-05]. https://www.who.int/health-topics/diabetes?gclid=CjwKCAiAmsurBhBvEiwA6e-WPFKW6SOSWk0HxTg4KcNL44akrs7eDJ7ZGNFHVwAtLSNkKj0_JVe0uRoCuiAQAvD_BwE#tab=tab_1.
- [22] TAN S Y, MERCHANT J. Frederick Banting (1891 – 1941): discoverer of insulin[J]. Smedj, 2017, 58(1): 2-3. DOI: 10.11622/smedj.2017002.
- [23] PETERSON J. The prevalence of pet diabetes in the United States[EB/OL]. (2023-12-01) [2023-11-01]. <https://www.pattersonvet.com/blog/the-prevalence-of-pet-diabetes-in-the-united-states>.
- [24] Banfield Pet Hospital. State of pet health* 2016 report[R/OL]. (2024-02-01). <https://www.banfield.com/pet-health/State-of-pet-health>.
- (收稿日期:2023-12-08 修回日期:2024-02-01)
(本文编辑:张俊彦,富群华)
- 【引用本文】
孙强. 为什么要开展动物实验[J]. 实验动物与比较医学, 2024, 44(1): 121-126. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2023.177.

书讯:电子实验手册《实验动物胚胎操作实验手册》正式发布

在生命科学的探索旅程中,胚胎学以其悠久的历史 and 不断涌现的创新成果,占据着一个不可或缺的位置。为了支持科研工作者深入这一复杂而精细的领域,中国科学院分子细胞科学卓越创新中心动物实验技术平台主任吴宝金研究员和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孙强研究员担任主编,与国内14家单位的82位科研工作者合作,编纂了胚胎学领域内首部中文电子实验手册《实验动物胚胎操作实验手册》(ISBN:978-1-951285-07-4)。该实验手册于2024年1月5日在美国Bio-protocol旗下的Bio-101平台正式在线发布。同日,该手册在2023年度上海市实验动物学会学术年会上举行了首发仪式。

本手册共分9个章节,包含57个详尽的胚胎操作实验方案,覆盖了11种实验动物,包括小鼠、长爪沙鼠、犬、猪、猴、树鼩、鸡、斑马鱼、果蝇、牛及羊。其中,小鼠胚胎操作实验方案(13个)及长爪沙鼠实验方案(7个)主要围绕基因修饰小鼠制备、品种品系冷冻保种及病原净化控制;犬、猪、猴等大动物胚胎操作方案各有5~6条,内容围绕体细胞克隆及显微注射法制备基因修饰动物;树鼩胚胎操作方案(4个)着重于通过精原干细胞制备基因修饰动物;鸡胚胎操作方案(7个)偏重鸡胚的应用;斑马鱼胚胎操作技术(5个)围绕品系保存及基因修饰鱼的制备;果蝇(3个)、牛(1个)、羊(1个)则是简单介绍了有关受精卵的基本操作。以上实验方案均由国内高水平科研单位的一线科技工作者提供,不仅有已被国家级实验动物种质资源中心及各单位实验动物支撑平台广泛采用的成熟的胚胎操作技术体系,而且有国内科学家开发、优化的创新技术,如体细胞克隆猴的诞生、精原干细胞介导基因修饰树鼩的培育,以及通过人工精子改造培育健康小鼠等。本手册的科学顾问是中国科学院分子细胞科学卓越创新中心李劲松院士和中国科学院广州生物医药与健康研究院赖良学教授,他们的实验室为本手册贡献了多篇高质量的实验方案,保证了这本实验指南的科学水准。

读者可以通过访问Bio-101平台https://cn.bio-protocol.org/bio101/special_issue.aspx?siid=95,查看该手册的完整内容。在Bio-101平台上,您也可以通过每篇文章的“Q&A”板块与作者直接交流相关问题。欢迎各位读者提出任何意见和建议,以促进本手册的未来更新和扩展。

