

《实验动物与比较医学》第七届编辑委员会

特邀顾问	夏咸柱						
顾问	褚芳	高诚	顾为望	黄韧	肖杭	薛智谋	周光兴
名誉主编	李劲松						
主编	王健*						
执行主编	吴宝金*						
副主编	陈洪岩*	陈学进*	代解杰*	丁玉强*	富群华*	贺争鸣*	刘恩岐*
编委	秦川*	施标*	孙强*	徐平*	燕顺生*	姚明*	张周*
	艾志福	常艳	常在	陈真	陈国强	陈国元	陈鸿军*
	陈丽	陈民利*	崔东红	崔淑芳	戴建军	杜小燕	韩凌霞
	何远清	和占龙	姜宝红	赖国旗	冷颖	李善刚	李文德*
	李垚*	刘吉宏	刘少英	刘向云	刘忠华	卢静*	卢选成
	陆彩霞	陆尔奕	罗小泉	吕龙宝	潘登科	潘学营	庞万勇
	庞晓斌	师长宏*	施爱民*	宋国华*	宋晓明	孙兆增	谭毅
	唐炜	唐利军	唐元家	陶元清	王刚	王萧	王朝霞*
	王德军	王建飞	王可洲*	王胜昌	王玉娥*	魏强*	吴德国
	吴建辉	吴强	夏长友	肖君华*	谢建芸*	邢凤英	熊炜
	徐艺玫	许彤辉	闫明霞*	杨斐	杨伟敏	应华忠*	袁进
	张泉*	张笑人	张永斌	赵静	赵四海	赵彦光	郑和平
	周浩	周文江	周晓辉*	周正宇*	朱顺星	Fon Chang (美国)	
青年编委	卞勇	陈仁金	戴然然	邸亚男	冯洁	高彩霞	高静
	高巍	罕园园	黄镇	郎廷元	李静	李娜	李顺
	李长龙	林金杏	刘晓宇	刘颖	刘月环	刘真	卢晓
	陆涛峰	彭长庚	彭诗宇	沈如凌	史仍飞	宋宁宁	田雨光
	王春霞	王红平	王亮	王荣	王宇	魏盛	吴剑
	吴薇	谢淑武	徐丹	徐汪节	杨利峰	杨玉琴	叶茂青
	于士颜	于艳	于志锋	张磊	赵静洁	赵莹	庄乐南
	卓振建						
特邀审稿专家	陈振文	傅江南	金帆	饶军华	邵奇鸣	邵义祥	孙德明
	屠伟峰	王纯耀	王靖宇	王勇	吴永杰	谢家骏	徐彭
	薛整风	岳秉飞	曾林				

(*为常务编委)

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2期 (总第204期)

2024年4月25日出版

主管

上海科学院

主办

上海市实验动物学会
上海实验动物研究中心

编辑

《实验动物与比较医学》编辑委员会

主编

王健

执行主编

吴宝金

出版

《实验动物与比较医学》编辑部

地址: 上海市金科路3577号

邮编: 201203

电话: 021-50793657

E-mail: bjb50793657@163.com

网址: <http://www.slarc.org.cn/dwyx>

编辑部负责人

张俊彦

印刷

上海新开宝商务印刷有限公司

发行

上海市报刊发行局

范围: 国内公开发行人

邮发代号: 4-789

零售

《实验动物与比较医学》编辑部

201203, 上海市金科路3577号

电话: 021-50793657

联系人: 王伟民

定价

每期30.00元, 全年180.00元

中国标准连续出版物号

ISSN 1674-5817

CN 31-1954/Q

版权声明

本刊为开放获取期刊, 遵从CC BY-NC-ND 4.0协议。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

人类疾病动物模型

同种异体子宫内膜异位症大鼠模型用于GnRH激动剂类药物的药效评价研究

钟瑞华, 李国停, 杨文捷, 郭湘洁, 周洁芸, 胡颖怡, 倪其承,

杨野, 张敏, 朱焰 127

银杏内酯B通过调控脑内T细胞特性及与胶质细胞间相互作用促进缺血性脑卒中小鼠的神经功能恢复

刘佳, 叶岩荣, 沈赟, 唐启瑛, 陈梅卿, 易可慧, 陈少壮 139

葛根素对大鼠和小鼠骨密度影响的Meta分析

胡锦涛, 韩菁婕, 金旻, 胡滨, 娄月芬 149

玻璃海鞘作为模式生物的优势及其应用

李睿琪, 段涵, 甘罗, 郑媛, 杨文 162

基于动物模型的高尿酸肾病的病理及分子机制研究进展

包方奇, 屠海焯, 方明笋, 张倩, 陈民利 180

人与其他动物椎间盘解剖和组织学结构的比较医学研究进展

张莉, 韩凌霞, 匡宇 192

实验动物设施及管理

湖南省实验动物机构生物安全管理现状调查

刘美佟, 陈长, 张兆强, 范荻, 胡旂, 马海玲 202

四川省实验动物管理政策分析

陈兵, 邹弈星, 姚凌云, 王敬东 209

完善实验动物废物处置质量管理体系的思考: 以中国食品药品检定研究院为例

马丽颖, 赵明海, 梁春南, 岳秉飞, 王洪 214

实验动物设施智能控制系统建设与运行经验探讨: 以深圳市药品检验研究院为例

曾龙, 李俊鹏, 王晓炜, 陈宁, 王平, 秦美蓉 220

上海交通大学实验动物中心公共细胞培养平台管理经验探讨

彭丽娜, 张曼, 艾敏, 徐汪节 227

科普讲坛

如果动物实验不严谨

孙 强..... 234

科创团队推介

清华大学实验动物中心..... 238

华南农业大学实验动物中心/实验动物研究团队..... 240

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》2022—2023年优秀编委及优秀特邀审稿专家荣誉名单..... 英文目次页后插页(上)

《实验动物与比较医学》第4届(2023年)优秀审稿人获奖名单..... 英文目次页后插页(下)

《实验动物与比较医学》出版伦理声明..... 161

2024年版ICMJE推荐规范更新内容说明..... 179

《实验动物与比较医学》2024年征订启事..... 191

《实验动物与比较医学》常用英文缩略词表..... 219

《实验动物与比较医学》有关实验动物福利伦理内容的说明..... 226

《实验动物与比较医学》2024年刊务理事会名单..... 242

《实验动物与比较医学》第4届(2021—2023年)优秀论文获奖名单..... 后插1

广告..... 封二,前插1~7,后插2~8,封三,封底

期刊基本参数: CN 31-1954/Q*1981*b* 大 16*116*zh*P*¥30.00*2000*14* 2024-04

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

本期责任编辑 徐 平

本期审稿专家 包晶晶 陈国元 陈 蕾 崔轶凡 戴 炯 丁玉强 段晓春 富群华

金立伦 孔 琪 邝高艳 黎 明 李建军 李 垚 李 勇 林金杏

卢 静 潘登科 庞晓斌 施爱民 史仍飞 汤 静 王红平 王 健

王 婧 王玉珏 吴宝金 徐 平 杨伟敏 姚 明 张厚森 张少兵

张 周 赵 勇 郑和平 周晓辉 周正宇

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 干明红 李燕真 娄怡欣 陆佳雯 王 艳 吴昊晟 杨 悦 翟玉凤

张 萍 周 培 周 烁 周晓铤

LABORATORY ANIMAL AND COMPARATIVE MEDICINE

Bimonthly

Established in September, 1981

Volume 44, Issue 2

April 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, XU Ping

CONTENTS IN BRIEF

Animal Models of Human Diseases

Application of Allograft Endometriosis Rat Model in Pharmacodynamic Evaluation of
GnRH Agonists

ZHONG Ruihua, LI Guoting, YANG Wenjie, GUO Xiangjie, ZHOU Jieyun,
HU Yingyi, NI Qicheng, YANG Ye, ZHANG Min, ZHU Yan 127

Ginkgolide B Promotes Neural Function Recovery of Ischemic Stroke Mice by
Regulating Characteristics of Brain T Cells and Their Interactions with Glial Cells

LIU Jia, YE Yanrong, SHEN Yun, TANG Qiying, CHEN Meiqing, YI Kehui,
CHEN Shaozhuang 139

Effects of Puerarin on Bone Density in Rats and Mice: A Meta-analysis

HU Jinhua, HAN Jingjie, JIN Min, HU Bin, LOU Yuefen 149

Advantages of *Ciona intestinalis* as a Model Organism and Its Applications

LI Ruiqi, DUAN Han, GAN Luo, ZHENG Yuan, YANG Wen 162

Advances in Research on Pathological and Molecular Mechanism of Hyperuricemic
Nephropathy Based on Animal Models

BAO Fangqi, TU Haiye, FANG Mingsun, ZHANG Qian, CHEN Minli 180

Advances in Comparative Medical Research on Anatomy and Histological Structure of
Intervertebral Discs in Humans and Other Animals

ZHANG Li, HAN Lingxia, KUANG Yu 192

Facilities and Management for Laboratory Animals

Investigation on Current Biosafety Management Status in Laboratory Animal Institutions
in Hunan Province

LIU Meitong, CHEN Zhang, ZHANG Zhaoqiang, FAN Di, HU Zhan, MA Hailing 202

Research on Management Policies of Laboratory Animals in Sichuan Province

CHEN Bing, ZOU Yixing, YAO Lingyun, WANG Jingdong 209

Reflection on Improving the Quality Management System for Experimental Animal
Waste Disposal: National Institutes for Food and Drug Control as an Example

MA Liying, ZHAO Minghai, LIANG Chunnan, YUE Bingfei, WANG Hong 214

Discussion on the Construction and Operational Experience of Intelligent Control
Systems for Laboratory Animal Facilities: Shenzhen Institute for Drug Control as an
Example

ZENG Long, LI Junpeng, WANG Xiaowei, CHEN Ning, WANG Ping, QIN Meirong
..... 220

Discussion on Management Experience of Public Cell Culture Platform in Laboratory
Animal Center of Shanghai Jiao Tong University

PENG Lina, ZHANG Man, AI Min, XU Wangjie 227

《实验动物与比较医学》2022—2023年优秀编委

及优秀特邀审稿专家荣誉名单



代解杰

(副主编, 中国医学科学院
医学生物学研究所)



丁玉强

(副主编, 复旦大学)



孙强

(副主编, 中国科学院脑科学与
智能技术卓越创新中心)



徐平

(副主编, 上海吉祥实验
动物饲养有限公司)



陈国元

(编委, 中国科学院分子
细胞科学卓越创新中心)



陈民利

(编委, 浙江中医药大学)



李焱

(编委, 上海交通大学
医学院)



庞万勇

(编委, 赛诺菲全球研发中心)



师长宏

(编委, 空军军医大学)



宋国华

(编委, 山西医科大学)



王刚

(编委, 广东省医学
实验动物中心)



王可洲

(编委, 山东第一医科大学)



肖君华

(编委, 东华大学生物
与医学工程学院)



周晓辉

(编委, 上海市公共
卫生临床中心)



周正宇

(编委, 苏州大学)



孙德明

(特邀审稿专家, 国家卫生
健康委科学技术研究所)



谢家骏

(特邀审稿专家,
上海中医药大学)



岳秉飞

(特邀审稿专家, 中国
食品药品检定研究院)

《实验动物与比较医学》第4届(2023年)优秀审稿人获奖名单

王红平 四川省药品检验研究院/安全评价中心

卞勇 南京中医药大学实验动物中心

罕园园 中国医学科学院医学生物学研究所

李峰 上海市公共卫生临床中心

卢晓迪 迪哲(上海)医药有限公司

陶雨风 中国合格评定国家认可中心

王守立 苏州大学苏州医学院病理学系

邝高艳 湖南中医药大学第一附属医院

冯洁 中国科学院分子细胞科学卓越创新中心

刘晓宇 中国疾病预防控制中心职业卫生与中毒控制所

陈仁金 徐州医科大学生命科学院医学实验动物学教研室

李勇 四川省医学科学院·四川省人民医院实验动物研究所

叶茂青 复旦大学附属华东医院中心实验室/上海市老年医学临床重点实验室

包晶晶 西湖大学

高静 上海交通大学医学院临床研究中心

庞晓斌 河南大学药学院

宋晓明 杭州师范大学实验动物中心

卓振建 北京大学深圳研究生院



朱 焰, 博士, 研究员, 上海市生物医药技术研究院, 生殖药理研究组组长, 复旦大学生殖药理专业硕士生导师, 国家卫生健康委员会生育调节药械重点实验室课题组组长, 中国药理学会生殖药理专委会主任委员、中药与天然药物药理专委会委员, 中国优生优育协会生育力保护与修复专委会委员, 上海市药理学学会生殖药理专委会主任委员, 《中药药理与临床》杂志编委。擅长不孕不育治疗、避孕节育以及子宫内膜异位症、卵巢功能早衰等生殖系统疾病和生殖器官肿瘤动物模型的构建, 同时开展药效评价及药理机制研究。参与“十一五”~“十三五”国家支撑和重点研发项目, 负责上海市自然科学基金等多个研究项目。主持和参与完成50余项药物治疗效果和代谢动力学研究, 以及30余项临床前药物安全性评价工作。发表论文近100篇, 其中SCI论文近30篇; 获8项专利授权; 参编《药理实验方法学》等著作3部。

同种异体子宫内膜异位症大鼠模型用于GnRH激动剂类药物的药效评价研究

钟瑞华¹, 李国停¹, 杨文捷¹, 郭湘洁¹, 周洁芸¹, 胡颖怡¹, 倪其承^{1,2}, 杨 野^{1,2}, 张 敏³, 朱 焰¹

(1. 国家卫生健康委员会生育调节药械重点实验室, 上海生殖健康药具工程技术研究中心, 上海市生物医药技术研究院生殖药理组, 上海 200237; 2. 复旦大学药学院, 上海 200032; 3. 长春金赛药业有限公司, 长春 130012)

[摘要] **目的** 用同种异体移植的方法构建大鼠子宫内膜异位症模型, 并评价促性腺激素释放激素 (gonadotropin-releasing hormone, GnRH) 激动剂 GenSci006 对实验大鼠子宫内膜异位症模型的影响。**方法** 取供体 SPF 级雌性 SD 大鼠的子宫内膜移植于受体雌性大鼠的腹腔壁上, 构建同种异体的子宫内膜异位症模型。3 周后, 测量异位内膜的长、宽、高, 计算给药前异位内膜的体积 V_0 。将进行假手术操作的大鼠设为假手术组, 将造模大鼠随机分为模型组、曲普瑞林组 (0.25 mg/kg)、GenSci006-1 组 (0.125 mg/kg) 和 GenSci006-2 组 (0.25 mg/kg) 共 4 组, 每组大鼠 16 只。各组大鼠单次给予相应的药物, 假手术组和模型组给予同等体积的溶剂。3 周后, 再次测量异位内膜, 计算给药后异位内膜的体积 V_2 和抑制率; 通过比较脏器系数及病理切片的变化, 判断 GenSci006 对大鼠子宫和卵巢组织的影响; ELISA 法测定血清中雌二醇 (estradiol, E_2)、孕酮 (progesterone, P_4)、卵泡刺激素 (follicle stimulating hormone, FSH) 和黄体生成素 (luteinizing hormone, LH) 水平的变化; 实时荧光定量 PCR 法测定下丘脑和垂体中 GnRH 受体 (GnRH receptor, GnRHR) mRNA 的表达水平。蛋白质印迹法检测异位内膜组织中雌激素受体 (estrogen receptor, ER) α 、ER β 和孕激素受体 (progesterone receptor, PR) 蛋白的表达。**结果** 给药 3 周后发现, 与模型组相比, 曲普瑞林组和 GenSci006-2 组大鼠的体重显著增加 ($P < 0.05$), 而异位内膜的体积显著减小 ($P < 0.05$)。与假手术组相比, 模型组子宫、卵巢脏器系数及子宫内膜厚度无明显变化 ($P > 0.05$); 与模型组相比, 曲普瑞林组和 GenSci006-2 组子宫脏器系数及子宫内膜厚度显著降低 ($P < 0.05$)。与假手术组相比, 模型组血清中 E_2 、 P_4 、FSH、LH 水平无明显变化 ($P > 0.05$); 与模型组相比, 曲普瑞林组、GenSci006-1 组和 GenSci006-2 组大鼠的卵巢脏器系数和血清 P_4 水平均显著降低 ($P < 0.05$), 而 GenSci006-1 组大鼠的血清 LH 水平明显升高 ($P < 0.05$), 但各组血清 E_2 和 FSH 水平并无显著变化 ($P > 0.05$)。与模型组相比, 曲普瑞林组和 GenSci006-2 组大鼠垂体 GnRHR mRNA 表达水平显著下调 ($P < 0.05$); 各组大鼠下丘脑组织中 GnRHR mRNA 表达及异位内膜组织中 ER α 、ER β 、PR 蛋白表达水平无明显变化 ($P > 0.05$)。**结论** 大鼠同种异体子宫内膜异位症模型适宜作为筛选和评价子宫内膜异位症治疗药物的动物模型, 而且异位内膜体积、抑制率、子宫及卵巢脏器系数、血清 E_2 水平均可作为检测药物疗效的指标。

[关键词] 子宫内膜异位症; GenSci006; 曲普瑞林; 异位内膜; 大鼠

[中图分类号] R-332; Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2024)02-0127-12



[第一作者] 钟瑞华 (1988—), 女, 硕士, 助理研究员, 从事生殖药理学研究。E-mail: zrh8804@126.com

[通信作者] 朱 焰 (1970—), 女, 博士, 研究员, 从事生殖药理学研究。E-mail: zhuyan@sippr.org. ORCID: 0000-0001-5136-7601

Application of Allograft Endometriosis Rat Model in Pharmacodynamic Evaluation of GnRH Agonists

ZHONG Ruihua¹, LI Guoting¹, YANG Wenjie¹, GUO Xiangjie¹, ZHOU Jieyun¹, HU Yingyi¹, NI Qicheng^{1,2}, YANG Ye^{1,2}, ZHANG Min³, ZHU Yan¹

(1. NHC Key Laboratory of Reproduction Regulation, Shanghai Engineering Research Center of Reproductive Health Drug and Devices, Shanghai Institute for Biomedical and Pharmaceutical Technologies Laboratory of Reproductive Pharmacology, Shanghai 200237, China; 2. Pharmacy School, Fudan University, Shanghai 200032, China; 3. Changchun Gene Science Pharmaceutical Co., Ltd., Changchun 130012, China)

Correspondence to: ZHU Yan (ORCID:0000-0001-5136-7601), E-mail: zhuyan@sippr.org

[ABSTRACT] Objective To establish an allogeneic rat model of endometriosis and to evaluate the effects of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) agonist GenSci006 on experimental rat endometriosis. **Methods** Endometrium from SPF grade donor female SD rats were transplanted onto the abdominal wall of recipient female rats to construct an allogeneic endometriosis model. The rats undergoing sham surgery were divided into the sham group. Three weeks later, the length, width and height of the ectopic endometrium were measured, and the volume of the endometrium (V_1) was calculated before drug administration. The modeling rats were randomly divided into four groups: model group, triptorelin group (0.25 mg/kg), GenSci006-1 group (0.125 mg/kg) and GenSci006-2 group (0.25 mg/kg). Each group had 16 rats and received a single dose of the corresponding drug. The sham group and model group were administered an equal volume of solvent. Three weeks after administration, ectopic endometrium was measured to calculate the volume V_2 and inhibition rate. The effect of GenSci006 on rat uterus and ovarian tissues was assessed by comparing organ coefficients and changes in pathological sections. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to measure the levels of serum estradiol (E_2), progesterone (P_4), follicle stimulating hormone (FSH), and luteinizing hormone (LH). Real-time fluorescent quantitative PCR was used to detect the expression of GnRH receptor (GnRHR) mRNA in the hypothalamus and pituitary. Western blot was used to detect the expression of estradiol receptor alpha ($ER\alpha$), beta ($ER\beta$) and progesterone receptor (PR) in ectopic endometrium. **Results** Three weeks after administration, compared with the model group, the body weight of rats in the triptorelin and GenSci006-2 groups significantly increased ($P < 0.05$), while the volume of ectopic endometrium significantly decreased ($P < 0.05$). Compared with the sham group, the model group showed no significant changes in uterine and ovarian organ coefficients or endometrial thickness ($P > 0.05$). Compared with the model group, the uterine organ coefficients and endometrial thickness were significantly reduced in the triptorelin and GenSci006-2 groups ($P < 0.05$). Compared with the sham group, the serum levels of E_2 , P_4 , FSH and LH in the model group showed no significant changes ($P > 0.05$). Compared with the model group, the ovarian organ coefficient and serum P_4 levels of rats in the Triptorelin, GenSci006-1, and GenSci006-2 groups were significantly reduced ($P < 0.05$), while the serum LH levels of rats in the GenSci006-1 group were significantly increased ($P < 0.05$). However, there were no significant changes in serum E_2 and FSH levels in each group ($P > 0.05$). Compared with the model group, the expression levels of GnRHR mRNA in the pituitary tissue of rats in the triptorelin and GenSci006-2 groups were significantly downregulated ($P < 0.05$), with no significant changes in the hypothalamus ($P > 0.05$). There were no significant changes in the expression level of GnRHR mRNA in the hypothalamus or the protein levels of $ER\alpha$, $ER\beta$ and PR in the ectopic endometrial tissue in any group ($P > 0.05$). **Conclusion** The allogeneic endometriosis rat model is a suitable animal model for screening and evaluating drugs for treating endometriosis. The volume of ectopic endometrium, inhibition rate, uterine and ovarian organ coefficients, and serum E_2 levels may serve as indicators for detecting drug efficacy.

[Key words] Endometriosis; GenSci006; Triptorelin; Ectopic endometrium; Rat

子宫内膜异位症 (endometriosis, EMs) 是指子宫内 膜 (包括腺体和间质) 出现在子宫腔被覆内膜及子宫以外的部位, 并在新位置生长、浸润、出血, 进而引发疼痛、不孕、结节或包块等症状的育龄期妇科疾病^[1]。EMs 在育龄女性中的发病率为 5%~10%^[1-2], 主要的临床表现为继发渐进性痛经、慢性盆腔痛, 严重者可导致育龄期妇女不孕, 患者人群的不孕率高达 40%^[3], 严重影响女性的生活质量和生殖健康。目前治疗 EMs 的药物主要包括非甾体类抗炎药、口服避孕药、高效孕激素、雄激素衍生物和促性腺激素释放激素 (gonadotropin-releasing hormone, GnRH) 激动剂五大类^[4-5]。上述药物均能抑制异位内膜的生长, 减轻患者的疼痛, 但不能彻底治愈 EMs。因此, 建立规范的 EMs 动物模型是研究 EMs 发病机制、筛选治疗药物及评价药效的重要工具。

国内外已建立家兔、啮齿类和灵长类等多种 EMs 动物模型^[6]。啮齿类动物具有规律的动情周期且动情周期短、性成熟早、繁殖力强、价格低等优点, 是国内 EMs 相关研究最常用的实验动物。由于大鼠不能自发形成 EMs 模型, 故手术移植法是建立大鼠 EMs 动物模型的主要方法。手术移植法主要包括自体移植和同种异体移植两种方法。同种异体移植可以避免对受体实验大鼠子宫完整性的破坏, 与人类 EMs 患者的生殖系统结构完整性相一致。

虽然大鼠 EMs 模型使用最为广泛, 但在模型的构建过程中仍存在多种问题, 例如移植异位内膜的位置选择不统一、术后到模型成功的时间不统一、无确定的成模标准等。GenSci006 为 GnRH 激动剂, 能够通过 与垂体内的 GnRH 受体 (GnRH receptor, GnRHR) 结合, 使雌激素达到绝经期水平, 促进异位内膜出现萎缩甚至“死亡”。基于此现状, 本研究通过手术移植的方法构建同种异体 EMs 大鼠模型, 以曲普瑞林作为阳性对照, 评价 GnRH 激动剂 GenSci006 对大鼠 EMs 的治疗作用, 为有效筛选治疗 EMs 的药物提供规范的动物模型和实验方法。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级 Sprague-Dawley (SD) 雌性大鼠 130 只, 7~9 周龄, 体重 (190±20) g, 购自上海市计划生育科学研究所实验动物经营部 [SCXK (沪) 2018-0006], 质量合格证号为 20180006021381。所有实验大鼠饲养于上海市生物医药技术研究院 (原上海市计划生育科学

研究所) 的屏障环境实验动物设施 [SYXK (沪) 2019-0012] 大鼠笼内, 每笼饲养大鼠 4 只, 自由饮水、摄食。屏障系统中室温 20~26 °C, 相对湿度 40%~70%, 换气≥15 次/h, 全新风, 光照明暗各 12 h。本实验已获得上海市生物医药技术研究院实验动物伦理委员会审查批准 (批件号为 2020-09)。

1.2 试剂及材料

GnRH 激动剂 GenSci006 由长春金赛药业有限责任公司提供 (批号 006WQ202005001)。达菲林 (醋酸曲普瑞林) 购自法国 Ipsen Pharma Biotech 公司 (批号 P26437)。苯甲酸雌二醇购自宁波三生生物科技有限公司 (批号 B200501)。硫酸庆大霉素注射液购自山东辰欣药业股份有限公司 (批号 200619222)。异氟烷购自山东安特牧业科技有限公司 (批号 20200601)。黄体生成素 (luteinizing hormone, LH) ELISA 试剂盒购自美国 NOVUS 公司 (批号 NBP2-61257)。卵泡刺激素 (follicle stimulating hormone, FSH) ELISA 试剂盒购自中国台湾 Abnova 公司 (批号 KA2330)。雌二醇 (estradiol, E₂) 和孕酮 (progesterone, P₄) ELISA 试剂盒均购自美国 BioVision 公司 (批号分别为 K3831、K7416)。总 RNA 抽提试剂 TRIzol 购自美国 Ambion 公司 (批号 284909)。cDNA 试剂盒及实时荧光定量 PCR 试剂盒均购自日本 TaKaRa 公司 (批号分别为 RR047A、RR420A)。GnRHR 及内参 GAPDH 引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司设计及合成。RIPA 裂解液 (No. C500005)、BCA 蛋白质定量检测试剂盒 (No. C503021) 及 SDS-PAGE 变性聚丙烯酰胺凝胶快速制备试剂盒 (No. C631100) 均购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司。小鼠抗大鼠雌激素受体 (estrogen receptor, ER) α 抗体 (No. MAB57157) 购自美国 R&D 公司, 兔抗大鼠 ERβ 抗体 (No. NB120-3577) 购自美国 NOVUS 公司, 兔抗大鼠孕激素受体 (progesterone receptor, PR) 抗体 (No. ab33526) 购自英国 Abcam 公司, 兔抗大鼠 GAPDH 抗体 (No. 2118), 马抗小鼠 IgG (No. 7076) 和羊抗兔 IgG (No. 7074) 购自美国 Cell Signaling Technology 公司。

1.3 同种异体 EMs 模型的构建

参照本课题组之前的研究文献^[7], 将大鼠随机分为假手术组 (n=16)、内膜供体组 (n=28)、内膜受体组 (n=86) 共 3 组。术前 3 d 对每只大鼠每天肌肉注射硫酸庆大霉素 0.1 mL/d, 连续给药 3 d; 术前 2 d 对每只大鼠每天皮下注射苯甲酸雌二醇 10 μg/kg, 连续给药 2 d。将供体大鼠固定于手术台上, 用气体麻醉机

(Mss-35, 上海任谊生物科技有限公司)以异氟烷体积分数为5%、氧流量为1 L/min诱导麻醉,并以异氟烷体积分数为2%、氧流量为0.5 L/min维持麻醉。剪取供体大鼠子宫组织并分离肌层与内膜,将内膜切成约5 mm×5 mm。用同样的方法麻醉内膜受体大鼠后,将供体大鼠内膜组织缝合于受体大鼠的腹壁血管丰富处。缝合腹壁肌肉层皮肤并在切口处涂抹约0.1 mL的硫酸庆大霉素以预防伤口感染,缝合腹壁皮肤层。假手术组是将来自3只供体大鼠子宫周围的脂肪缝于大鼠腹壁。术后,所有大鼠都放置于新的垫料饲养笼内,覆盖医用纱布保暖。术后24 h内皮下注射苯甲酸雌二醇30 μg/kg,10 d后重复注射一次,以促进异位内膜的生长。

1.4 给药分组处理

移植手术3周后,再次对内膜受体大鼠进行麻醉后开腹,用电子游标卡尺测量受体组大鼠体内移植物的长径(d_1)、短径(d_2)和高度(d_3),按照 $V_1=0.52\times d_1\times d_2\times d_3$ [6] 计算异位内膜体积。 $V_1>13\text{ mm}^3$ 时判断造模成功,剔除造模不成功的大鼠,将造模成功的受体大鼠随机分成模型组、曲普瑞林组、GenSci006-1和GenSci006-2组,每组16只。曲普瑞林及GenSci006均用各自专用的溶剂配制注射液。曲普瑞林组肌肉注射曲普瑞林0.25 mg/kg,给药体积为1 mL/kg;GenSci006-1组肌肉注射GenSci006 0.125 mg/kg,GenSci006-2组肌肉注射GenSci006 0.25 mg/kg,给药体积均为1 mL/kg,给药频率为1次/3周。给药时间为造模成功后第3天。假手术组和模型组均肌肉注射相同体积的GenSci006专用溶剂。

1.5 实验取材

给药3周后,用异氟烷麻醉各组大鼠,开腹,再次测量异位内膜的长径(d'_1)、短径(d'_2)和高度(d'_3),计算体积 $V_2=0.52\times d'_1\times d'_2\times d'_3$;计算抑制率,抑制率 $= (1-V_2/V_1)\times 100\%$ 。经腹主动脉取血5 mL,离心取血清备用。取异位内膜组织,一部分样本先置于质量分数为4%的多聚甲醛溶液中保存,后进行组织学检查;剩余样本先置于液氮,后置于 $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 保存备用。取两侧的子宫和卵巢组织,分别称重,计算脏器系数:子宫脏器系数=子宫(g)/大鼠体重(g) $\times 100$;卵巢脏器系数=卵巢(g)/大鼠体重(g) $\times 100$ 。一侧组织样本置于4%多聚甲醛溶液中,进行组织学检查;剩余组织样本先置于液氮,后置于 $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 保存备用。

1.6 血清中 E_2 、 P_4 、FSH和LH水平的ELISA测定

随机选择每组8只大鼠的血清,参照ELISA试剂盒说明书中的方法,检测大鼠血清中 E_2 、 P_4 、FSH和LH的水平。

1.7 子宫、卵巢和异位内膜组织的HE染色

每组16只大鼠的子宫、卵巢、异位内膜组织用石蜡包埋后切片,参照HE染色操作流程进行HE染色,光学显微镜下观察染色结果,并测定子宫组织内膜厚度(μm)。内膜厚度的测量方法:取一只动物的子宫内膜中4个点,测量内膜厚度,计算平均值,该平均值为该动物的内膜厚度。

1.8 下丘脑、垂体组织中GnRHR mRNA表达水平的实时荧光定量PCR检测

随机选择每组6只大鼠的下丘脑和垂体组织样本,采用TRIzol法提取组织中总RNA,逆转录获得cDNA。用实时荧光定量PCR仪(LD480,上海罗氏制药有限公司)进行GnRHR mRNA的测定。目的基因GnRHR的正向引物序列为5'-GCTGCCTGTTTCATCA-TCCCTCTTC-3',反向引物序列为5'-GCTGTAGTTT-GCGTGGGTCCTG-3',扩增片段大小为102 bp;内参基因GAPDH的正向引物序列为5'-GACATGCCG-CCTGGAGAAAC-3',反向引物序列为5'-AGCCCA-GGATGCCCTTTAGT-3',扩增片段大小为92 bp。PCR反应体系为20 μL,包括cDNA 2 μL、上下游引物各0.4 μL、TB Green Premix Ex Taq (Tli RNaseH Plus) 10 μL和灭菌水7.2 μL。PCR反应流程:95 °C 30 s;95 °C 5 s,60 °C 30 s,40个循环;熔解95 °C 5 s,60 °C 1 min;95 °C,降温50 °C 30 s。用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因的相对表达量。

1.9 子宫组织中ER α 、ER β 和PR蛋白表达水平的蛋白质印迹测定

随机选择每组6只大鼠的异位内膜组织样本,用RIPA裂解液提取总蛋白,用BCA试剂盒测定蛋白浓度。蛋白样品加入上样缓冲液后,95 °C变性5 min。取80 μg蛋白样品,通过10%和5%的SDS-PAGE浓缩和分离后,转印至0.45 μm的PVDF膜(IPVH00010,德国Merck Drugs & Biotechnology公司)上。用5%脱脂牛奶封闭1 h后,加入ER α (1:500)、ER β (1:1000)、PR (1:1000)和GAPDH (1:1000)一抗,4 °C过夜;用TBST漂洗5 min $\times 3$ 次后,加入相应的二抗(1:1000),在室温下孵育1 h。TBST漂洗10 min $\times 3$ 次后,加入ECL超敏化学发光液,用Image lab 4.0成像分析系统成像及处理。测定目的蛋白条带与GAPDH

蛋白条带的灰度值比值，即为该目的蛋白的相对表达量。

1.10 统计学方法

采用 Graphpad Prism 8.0 软件进行统计分析。计量数据以平均数±标准差表示；符合正态分布时，多组间比较采用单因素方差分析，组内两两比较用 Tukey's 法检验；非正态分布时，采用 Kruskal-Wallis 非参数检验，组内两两比较用 Dunn's 法检验。抑制率比较采用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 时认为差异有统计学意义。

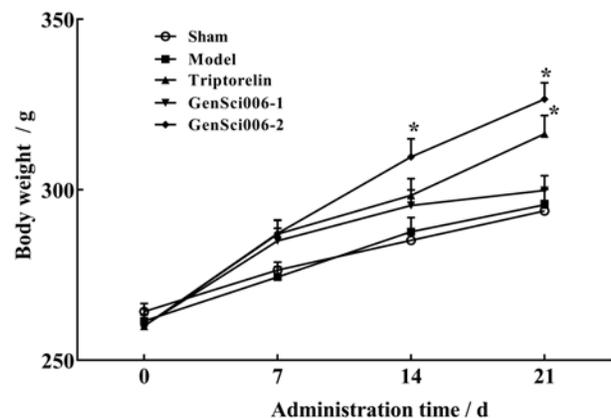
2 结果

2.1 GenSci006 对同种异体移植 EMs 模型大鼠体重及健康状况的影响

同种异体移植造模用的受体大鼠 86 只中，EMs 造模成功的为 64 只，造模成功率为 74.42%。给药期间假手术组、模型组、曲普瑞林组、GenSci006-1 和 GenSci006-2 组大鼠（每组各 16 只）均饮食、活动正常，被毛光泽。分别于给药前和给药后第 7 天、第 14 天、第 21 天对各给药组大鼠进行称重，观察大鼠的体重变化。结果发现 D0 和 D7 的各组大鼠体重无明显变化 ($P > 0.05$)；D14 时，与模型组相比，假手术组大鼠体重无明显变化 ($P > 0.05$)，曲普瑞林组和 GenSci006-1 组大鼠体重有所增加，但差异无统计学意义 ($P > 0.05$)，而 GenSci006-2 组大鼠的体重显著增加 ($P < 0.05$)；D21 时，与模型组相比，假手术组和 GenSci006-1 组大鼠体重无明显变化 ($P > 0.05$)，而曲普瑞林组和 GenSci006-2 组大鼠的体重显著增加 ($P < 0.05$) (图 1)。

2.2 GenSci006 对同种异体移植 EMs 模型大鼠异位内膜的影响

对给药前后各组大鼠体内的异位子宫内膜组织大小和病理学特征进行了肉眼观察比较，结果显示：与模型组相比，给药前各组异位内膜体积无明显变化 (图 2A)；给药 3 周后，与模型组相比，曲普瑞林组、GenSci006-1 组和 GenSci006-2 组的异位内膜出现不同程度萎缩 (图 2B)。进一步 HE 染色后可见，模型组异位内膜生长良好，细胞质丰富，腺体数量多，腺腔大，腔内有渗出物；而曲普瑞林组的异位内膜萎缩，囊内积液体积减小，间质疏松，腺腔明显萎缩；GenSci006-1 组和 GenSci006-2 组的异位内膜也体积变小，内膜上皮与腺体上皮细胞呈单层扁平样，间质细胞疏松，血管稀少 (图 2C)。



注：Sham 即假手术组，移植同种异体子宫周围的脂肪到大鼠腹壁，然后注射 GenSci006 专用溶剂；Model 即模型组，移植同种异体子宫内膜组织到大鼠腹壁，然后注射 GenSci006 专用溶剂；Triptorelin 即曲普瑞林组，移植同种异体子宫内膜组织到大鼠腹壁，然后注射曲普瑞林 0.25 mg/kg；GenSci006-1 和 GenSci006-2 组，移植同种异体子宫内膜组织到大鼠腹壁，然后分别注射 0.125 mg/kg 和 0.25 mg/kg 的 GenSci006。每组 16 只大鼠；与模型组相比， $P < 0.05$ 。

Note: Sham group ($n=16$), transplanted with fat tissues around the uterus and injected with GenSci006 specific solvent; Model group ($n=16$), xenografted with endometrial tissues and injected with GenSci006 specific solvent; Triptorelin group ($n=16$), xenografted with endometrial tissues and injected with 0.25 mg/kg triptorelin; GenSci006-1 and GenSci006-2 groups (each $n=16$), xenografted with endometrial tissues and injected with 0.125 mg/kg and 0.25 mg/kg GenSci006, respectively. Compared with the model group, $P < 0.05$.

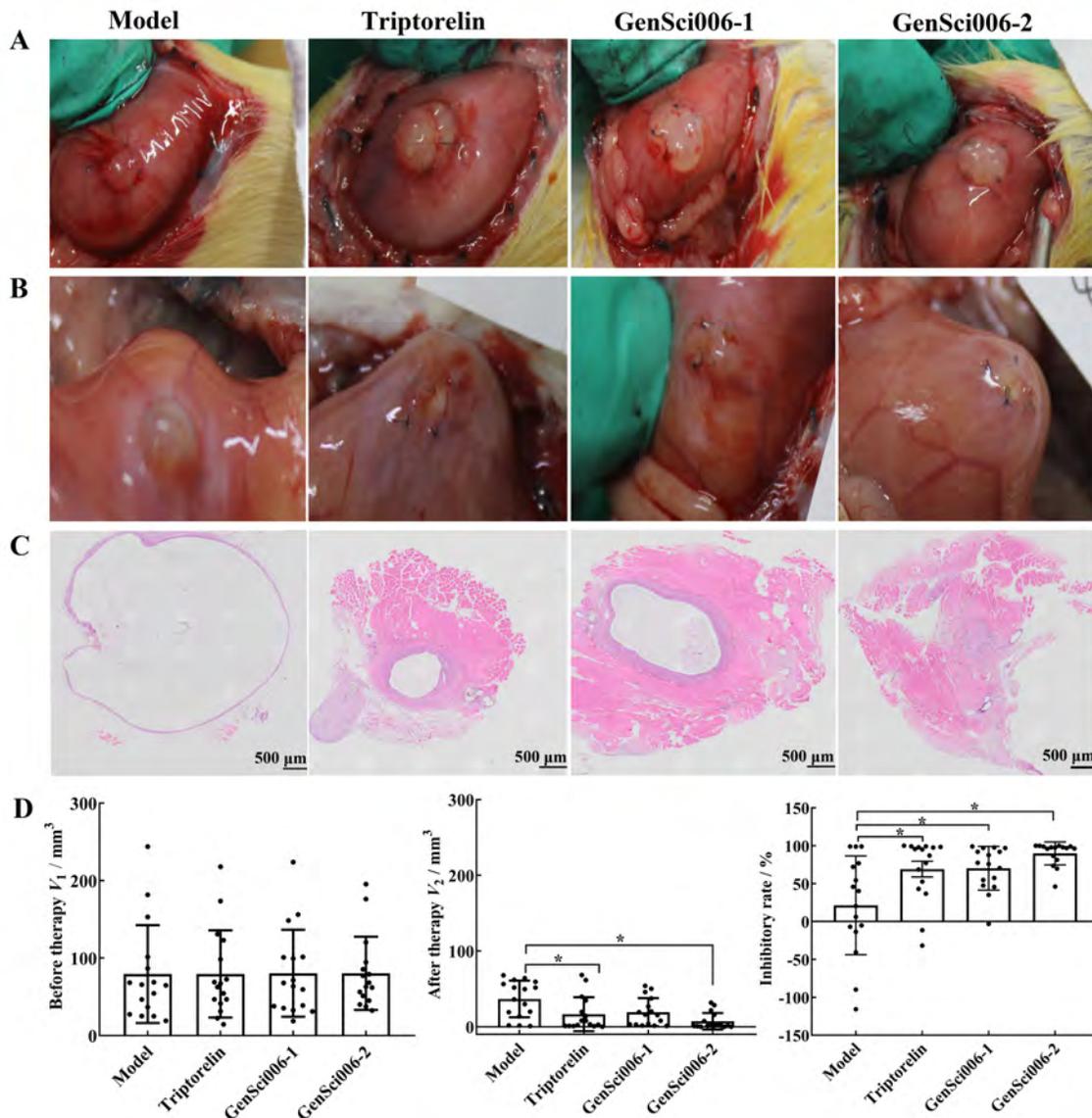
图 1 GenSci006 对同种异体移植子宫异位内膜症模型大鼠体重的影响

Figure 1 Effect of GenSci006 on body weight of allograft endometriosis rat model

通过测量给药前后的异位内膜体积发现：给药前，各组大鼠的异位内膜体积差异无统计学意义 ($P > 0.05$)；给药后，与模型组相比，曲普瑞林组和 GenSci006-2 组的异位内膜体积明显减小 ($P < 0.05$)，GenSci006-1 组的异位内膜体积也有所减小，但差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。进一步计算抑制率，结果显示：与模型组相比，曲普瑞林组、GenSci006-1 组和 GenSci006-2 组的异位内膜生长抑制率均显著升高 ($P < 0.05$, 图 2D)。

2.3 GenSci006 对同种异体移植 EMs 模型大鼠子宫和卵巢组织的影响

称重后计算结果显示，与模型组相比，假手术组大鼠的子宫脏器系数无明显变化 ($P > 0.05$)，曲普瑞林组和 GenSci006-2 组的子宫脏器系数明显减小 ($P < 0.05$)，GenSci006-1 组的子宫脏器系数降低，但差异



注：A，给药前各组大鼠的异位内膜图片；B，给药后各组大鼠的异位内膜图片；C，给药3周后各组大鼠的异位内膜病理学特征（HE染色， $\times 10$ ）；D，给药前、后各组大鼠的异位内膜体积及抑制率。Sham即假手术组，移植同种异体子宫周围的脂肪到大鼠腹壁，然后注射GenSci006专用溶剂；Model即模型组，移植同种异体子宫内膜组织到大鼠腹壁，然后注射GenSci006专用溶剂；Triptorelin即曲普瑞林组，移植同种异体子宫内膜组织到大鼠腹壁，然后注射曲普瑞林0.25 mg/kg；GenSci006-1和GenSci006-2组，移植同种异体子宫内膜组织到大鼠腹壁，然后分别注射0.125 mg/kg和0.25 mg/kg的GenSci006。每组16只大鼠；与模型组相比， $^*P < 0.05$ 。

Note: A, Pictures of ectopic endometrium before administration; B, Pictures of ectopic endometrium after administration; C, Pathological section of ectopic endometrium in endometriosis model rats (HE staining, $\times 10$); D, The volume of ectopic endometrium before and after administration and the inhibition rate. Sham group ($n=16$), transplanted with fat tissues around the uterus and injected with GenSci006 specific solvent; Model group ($n=16$), xenografted with endometrial tissues and injected with GenSci006 specific solvent; Triptorelin group ($n=16$), xenografted with endometrial tissues and injected with 0.25 mg/kg triptorelin; GenSci006-1 and GenSci006-2 groups (each $n=16$), xenografted with endometrial tissues and injected with 0.125 mg/kg and 0.25 mg/kg GenSci006, respectively. Compared with the model group, $^*P < 0.05$.

图2 GenSci006对同种异体移植子宫内膜异位症模型大鼠异位内膜的抑制作用

Figure 2 Inhibitory effect of GenSci006 on ectopic endometrium in allograft endometriosis rats

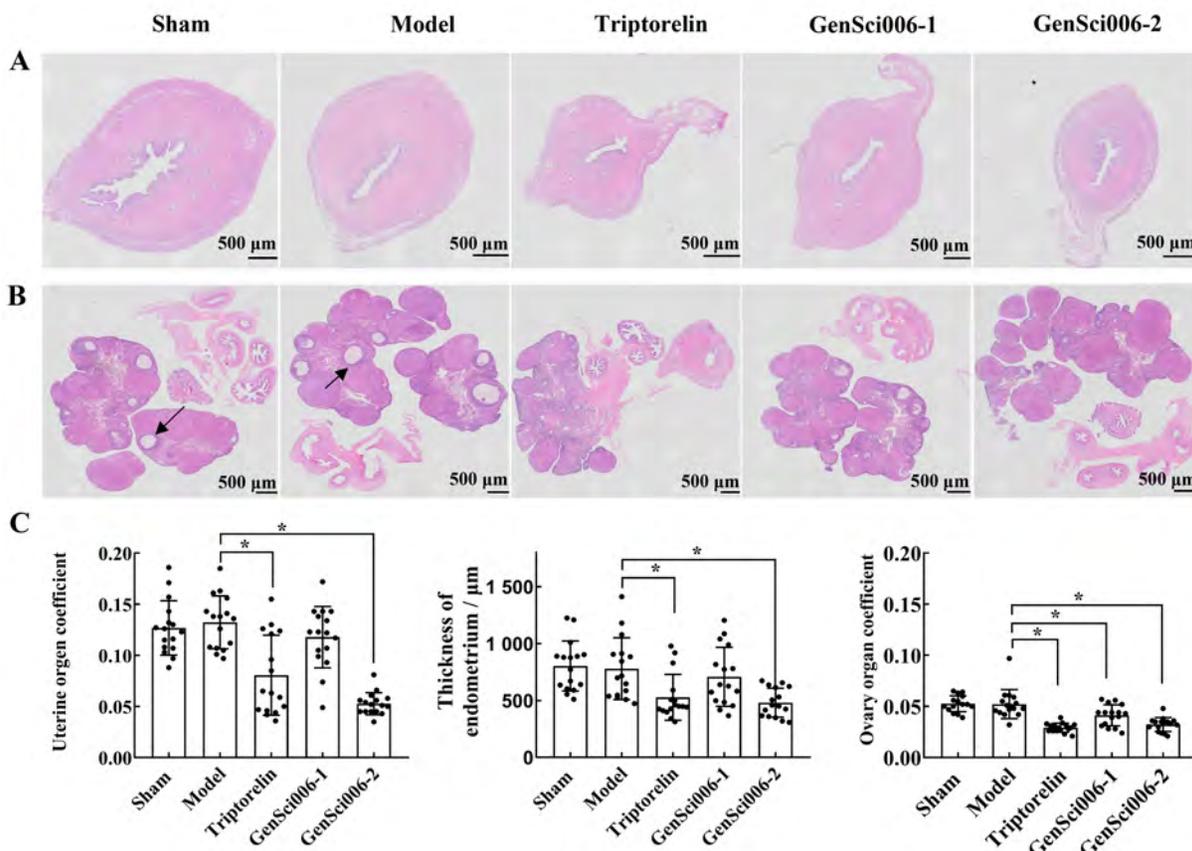
无统计学意义 ($P > 0.05$)；但与曲普瑞林组相比，GenSci006-2组的子宫脏器系数无明显变化 ($P > 0.05$) (图3A、C)。与模型组相比，假手术组大鼠的卵巢脏

器系数无明显变化 ($P > 0.05$)，曲普瑞林组、GenSci006-1组和GenSci006-2组的卵巢脏器系数明显减小 ($P < 0.05$)，但曲普瑞林组和GenSci006-2组之间

差异无统计学意义 ($P>0.05$) (图3B~C)。

HE染色病理检测结果显示,与模型组相比,曲普瑞林组和GenSci006-2组的子宫内膜厚度明显减小 ($P<$

0.05) (图3A、C);而且假手术组和模型组的大鼠卵巢中可见多个生长卵泡,而曲普瑞林组和GenSci006-2组中生长卵泡减少 (图3B)。



注: A示子宫组织病理切片 ($\times 10$); B示卵巢组织病理切片 ($\times 10$), 箭头所指处为生长卵泡; C示子宫、卵巢脏器系数和子宫组织的内膜厚度。Sham即假手术组, 移植同种异体子宫周围的脂肪到大鼠腹壁, 然后注射GenSci006专用溶剂; Model即模型组, 移植同种异体子宫内膜组织到大鼠腹壁, 然后注射GenSci006专用溶剂; Triptorelin即曲普瑞林组, 移植同种异体子宫内膜组织到大鼠腹壁, 然后注射曲普瑞林0.25 mg/kg; GenSci006-1和GenSci006-2组, 移植同种异体子宫内膜组织到大鼠腹壁, 然后分别注射0.125 mg/kg和0.25 mg/kg的GenSci006。每组16只大鼠; 与模型组相比, $^*P<0.05$ 。

Note: A, Pathological section of uterus in endometriosis model rats (HE staining, $\times 10$); B, Pathological section of ovary in endometriosis model rats (HE staining, $\times 10$); The arrow represents growth follicles; C, The coefficient of uterine organs, endometrial thickness and ovarian organ coefficient. Sham group ($n=16$), transplanted with fat tissues around the uterus and injected with GenSci006 specific solvent; Model group ($n=16$), xenografted with endometrial tissues and injected with GenSci006 specific solvent; Triptorelin group ($n=16$), xenografted with endometrial tissues and injected with 0.25 mg/kg triptorelin; GenSci006-1 and GenSci006-2 groups (each $n=16$), xenografted with endometrial tissues and injected with 0.125 mg/kg and 0.25 mg/kg GenSci006, respectively. Compared with the model group, $^*P<0.05$

图3 GenSci006对同种异体移植子宫内膜异位症模型大鼠子宫和卵巢的影响

Figure 3 Effect of GenSci006 on uterus and ovary in allograft endometriosis rats

2.4 GenSci006对同种异体移植EMs模型大鼠血清 E_2 、 P_4 、FSH和LH水平的影响

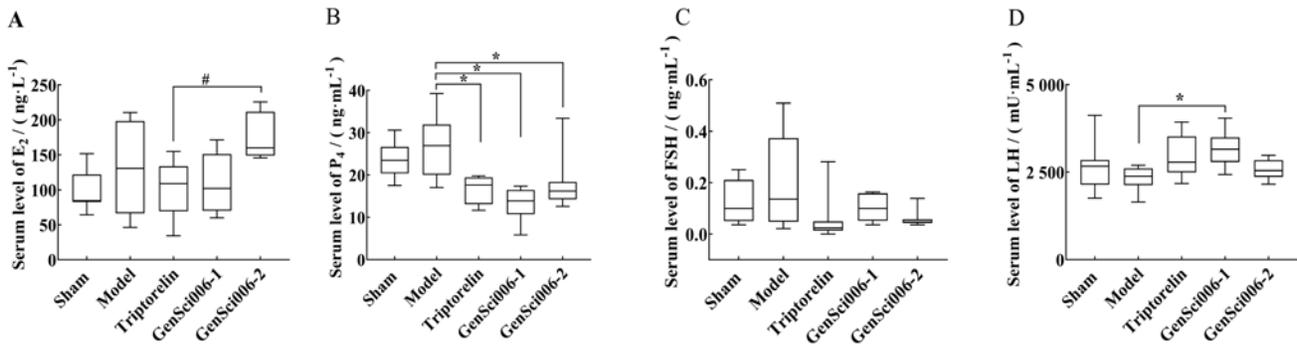
ELISA结果显示:与假手术组相比,模型组大鼠的血清 E_2 水平没有明显变化 ($P>0.05$);与模型组相比,曲普瑞林组和GenSci006-1组的血清 E_2 水平有所降低,GenSci006-2组的血清 E_2 水平略有升高,但差异

均无统计学意义 ($P>0.05$);但与曲普瑞林组相比,GenSci006-2组的血清 E_2 水平明显升高 ($P<0.05$) (图4A)。此外与假手术组相比,模型组大鼠的血清 P_4 水平无明显变化 ($P>0.05$);与模型组相比,曲普瑞林组、GenSci006-1组和GenSci006-2组的血清 P_4 水平均明显降低 ($P<0.05$);但与曲普瑞林组相比,

GenSci006-2 组的血清 P_4 水平无明显变化 ($P>0.05$) (图4B)。

各组大鼠的血清 FSH 水平差异均无统计学意义 ($P>0.05$) (图4C)。与假手术组相比, 模型组大鼠的血清 LH 水平无明显差异 ($P>0.05$); 与模

型组相比, GenSci006-1 组的血清 LH 水平明显升高 ($P<0.05$), 但曲普瑞林组与 GenSci006-2 组之间没有明显变化 ($P>0.05$); 与曲普瑞林组相比, GenSci006-2 组的血清 LH 水平也无明显差异 ($P>0.05$) (图4D)。



注: A, 血清中雌二醇 (E_2) 水平; B, 血清中孕酮 (P_4) 水平; C, 血清中卵泡刺激素 (FSH) 水平; D, 血清中黄体生成素 (LH) 水平。Sham 即假手术组, 移植同种异体子宫周围的脂肪到大鼠腹壁, 然后注射 GenSci006 专用溶剂; Model 即模型组, 移植同种异体子宫内膜组织到大鼠腹壁, 然后注射 GenSci006 专用溶剂; Triptorelin 即曲普瑞林组, 移植同种异体子宫内膜组织到大鼠腹壁, 然后注射曲普瑞林 0.25 mg/kg; GenSci006-1 和 GenSci006-2 组, 移植同种异体子宫内膜组织到大鼠腹壁, 然后分别注射 0.125 mg/kg 和 0.25 mg/kg 的 GenSci006。每组 8 只大鼠; 与模型组相比, $^*P<0.05$; 与曲普瑞林组相比, $^{\#}P<0.05$ 。

Note: A, Serum level of estradiol (E_2); B, Serum level of progesterone (P_4); C, Serum level of follicle stimulating hormone (FSH); D, Serum level of luteinizing hormone (LH). Sham group ($n=8$), transplanted with fat tissues and injected with GenSci006 specific solvent; Model group ($n=8$), xenografted with endometrial tissues around the uterus and injected with GenSci006 specific solvent; Triptorelin group ($n=8$), xenografted with endometrial tissues and injected with 0.25 mg/kg triptorelin; GenSci006-1 and GenSci006-2 groups (each $n=8$), xenografted with endometrial tissues and injected with 0.125 mg/kg and 0.25 mg/kg GenSci006, respectively. Compared with the model group, $^*P<0.05$; Compared with the triptorelin group, $^{\#}P<0.05$.

图4 GenSci006 对同种异体移植子宫内膜异位症模型大鼠血清 E_2 、 P_4 、FSH 和 LH 水平的影响

Figure 4 Effect of GenSci006 on serum levels of E_2 , P_4 , FSH and LH in allograft endometriosis rats

2.5 GenSci006 对同种异体移植 EMs 模型大鼠下丘脑、垂体组织中 GnRHR mRNA 表达水平的影响

实时荧光定量 PCR 法检测各组大鼠下丘脑和垂体组织中 GnRHR mRNA 表达水平, 结果显示: 各组大鼠的下丘脑组织中 GnRHR mRNA 表达水平均无显著差异 ($P>0.05$) (图5A)。与假手术组相比, 模型组大鼠的垂体组织中 GnRHR mRNA 表达水平无明显变化 ($P>0.05$); 与模型组相比, 曲普瑞林组和 GenSci006-2 组大鼠的垂体组织中 GnRHR mRNA 表达水平均明显降低 ($P<0.05$), 而 GenSci006-1 组差异则没有统计学意义 (图5B)。

2.6 GenSci006 对同种异体移植 EMs 模型大鼠异位内膜组织中 $ER\alpha$ 、 $ER\beta$ 和 PR 蛋白表达的影响

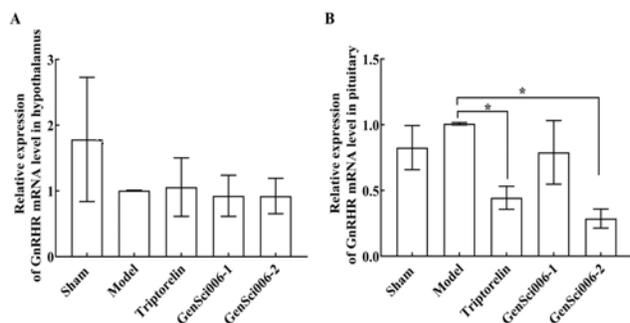
蛋白质印迹法检测结果显示: 与模型组相比, 曲普瑞林组、GenSci006-1 组和 GenSci006-2 组大鼠的异

位内膜组织中 $ER\alpha$ 、 $ER\beta$ 和 PR 蛋白表达水平差异均无统计学意义 ($P>0.05$); 而且与曲普瑞林组相比, GenSci006-2 组大鼠的异位内膜组织中 $ER\alpha$ 、 $ER\beta$ 和 PR 蛋白表达水平差异也无统计学意义 ($P>0.05$) (图6)。

3 讨论

本研究首先构建了同种异体移植的大鼠 EMs 模型, 并利用此模型评价了 GnRH 激动剂 GenSci006 的治疗效果, 并与曲普瑞林进行了比较。结果显示, 同种异体移植获得的 EMs 大鼠建模成功率为 74.42%, 而且 0.25 mg/kg 的曲普瑞林和 0.25 mg/kg 的 GnRH 激动剂 GenSci006 都能够有效抑制 EMs 大鼠体内异位内膜组织生长, 增加大鼠体重, 降低子宫和卵巢脏器系数, 并抑制垂体组织中 GnRHR mRNA 表达。

EMs 模型的成功建立对于研究 EMs 的发病机制和治疗方法以及相关药物疗效评价具有重要的意义。目

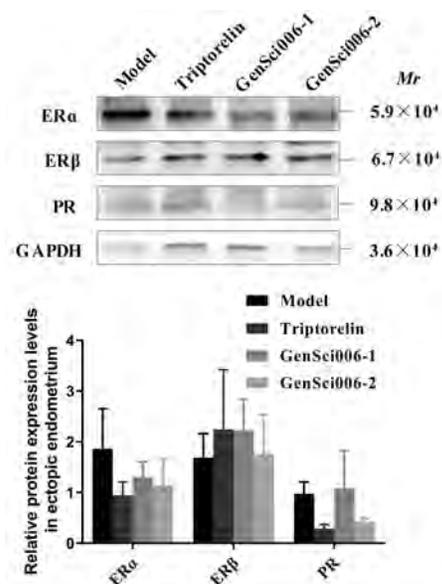


注：A，下丘脑组织中促性腺激素释放激素受体（GnRHR）mRNA 表达；B，垂体组织中GnRHR mRNA 表达。Sham 即假手术组，移植同种异体子宫周围的脂肪到大鼠腹壁，然后注射 GenSci006 专用溶剂；Model 即模型组，移植同种异体子宫内膜组织到大鼠腹壁，然后注射 GenSci006 专用溶剂；Triptorelin 即曲普瑞林组，移植同种异体子宫内膜组织到大鼠腹壁，然后注射曲普瑞林 0.25 mg/kg；GenSci006-1 和 GenSci006-2 组，移植同种异体子宫内膜组织到大鼠腹壁，然后分别注射 0.125 mg/kg 和 0.25 mg/kg 的 GenSci006。每组 6 只大鼠；与模型组相比， $^*P < 0.05$ 。

Note: A, Gonadotropin-releasing hormone receptor (GnRHR) mRNA expression in hypothalamus; B, GnRHR mRNA expression in pituitary. Sham group ($n=6$), transplanted with fat tissues and injected with GenSci006 specific solvent; Model group ($n=6$), xenografted with endometrial tissues around the uterus and injected with GenSci006 specific solvent; Triptorelin group ($n=6$), xenografted with endometrial tissues and injected with 0.25 mg/kg triptorelin; GenSci006-1 and GenSci006-2 groups (each $n=6$), xenografted with endometrial tissues and injected with 0.125 mg/kg and 0.25 mg/kg GenSci006, respectively. Compared with the model group, $^*P < 0.05$.

图5 GenSci006 对同种异体移植子宫内膜异位症模型大鼠下丘脑和垂体组织中 *GnRHR* 基因 mRNA 表达水平的影响
Figure 5 Effect of GenSci006 on *GnRHR* mRNA expression in hypothalamus and pituitary of allograft endometriosis rats

前，用于 EMs 造模的实验动物有狒狒、猴、巴马小型猪、兔、大鼠、小鼠、裸小鼠、SCID 小鼠等。造模方法包括自体移植、同种异体移植、异种异体移植等^[8-10]。其中，狒狒和猴像人一样有月经，是理想的动物模型，但由于其价格昂贵、饲养条件要求高的特点限制了应用。异种异体移植的 EMs 模型是将人的子宫内膜组织种植于裸小鼠或者 SCID 小鼠腹腔或者皮下；这种造模方法的缺点是裸小鼠价格较高，且免疫缺陷小鼠不能用于免疫机制的研究。大鼠是目前应用最广泛的 EMs 造模用实验动物，虽无月经，但其动情周期与人的月经相似，具有规律性，且饲养方便，价格实惠。Vernon 等^[11]首次采用外科手术方法，通过自体移植建立 EMs 大鼠模型；该方法不断被完善，成



注：ER α / β ，雌激素受体 α / β ；PR，孕激素受体。Model 即模型组，移植同种异体子宫内膜组织到大鼠腹壁，然后注射 GenSci006 专用溶剂；Triptorelin 即曲普瑞林组，移植同种异体子宫内膜组织到大鼠腹壁，然后注射曲普瑞林 0.25 mg/kg；GenSci006-1 和 GenSci006-2 组，移植同种异体子宫内膜组织到大鼠腹壁，然后分别注射 0.125 mg/kg 和 0.25 mg/kg 的 GenSci006。每组 6 只大鼠。

Note: ER α / β , Estradiol receptor α / β ; PR, Progesterone receptor. Model group ($n=6$), xenografted with endometrial tissues around the uterus and injected with GenSci006 specific solvent; Triptorelin group ($n=6$), xenografted with endometrial tissues and injected with 0.25 mg/kg triptorelin; GenSci006-1 and GenSci006-2 groups (each $n=6$), xenografted with endometrial tissues and injected with 0.125 mg/kg and 0.25 mg/kg GenSci006, respectively.

图6 GenSci006 对同种异体移植子宫内膜异位症模型大鼠异位内膜组织中 ER α 、ER β 、PR 蛋白表达的影响
Figure 6 Effect of GenSci006 on protein expression of ER α 、ER β 、PR in ectopic endometrial tissues of allograft endometriosis rat model

为构建 EMs 动物模型的常用方法。本实验室也通过自体移植法（取大鼠的一侧子宫内膜组织，移植至另一侧的腹壁处）成功构建了 EMs 模型^[12-13]。自体移植建立的 EMs 模型的特点是避免了免疫排斥反应，成模率较高，但此法会造成一侧子宫缺失，用于 EMs 引起的不孕症研究并不理想，而且手术过程时间较长、出血量多，不符合动物福利要求。

除了采用自体移植的方法构建 EMs 模型外，张薇等^[14-15]将大鼠供体的子宫组织种植于受体大鼠的左侧腹壁处，构建了同种异体 EMs 模型。崔金秀等^[16]将供体大鼠的子宫内膜种植于受体大鼠腹部皮下左上、右上、左下、右下 4 个部位，成功构建了同种异体 EMs 模型。同种异体移植法是取供体大鼠的子宫内膜组织

移植至受体大鼠腹壁等其他部位。目前国内对于同种异体EMs模型的构建较少。根据上述研究者及本课题组的经验,本研究构建了大鼠同种异体移植的EMs大鼠模型,造模成功率为74.42%,略高于崔金秀等^[12]的66.7%。

对比其他研究者构建的EMs的模型,本研究中EMs模型主要有以下几个方面的特点。第一,本研究中子宫内膜移植前将子宫的肌层剥离,只移植子宫内膜组织。研究发现,移植子宫组织和子宫内膜组织两种方法均能成功构建EMs模型,但移植子宫组织较移植内膜组织更易发生粘连^[17]。第二,本研究将内膜种植于腹壁。虽然异位内膜种植于皮下、腹壁、肠系膜、肠壁、卵巢等多个部位均能成功构建EMs的模型,但本研究异位种植的位置上内膜生长迅速,直观且易于测量^[17]。第三,本研究中使用公式 $V=0.52\times\text{长}\times\text{宽}\times\text{高}$ 计算异位内膜的体积。目前,关于异位内膜大小的计算方式尚存在争议。对于异位内膜的计算公式有: $V=\text{长}\times\text{宽}\times\text{高}$; $S=ab^2\times 0.5$ (a 、 b 分别代表异位内膜的长、短径); $V=\pi/6\times\text{长}\times\text{宽}\times\text{高}$ 。Tomayko等^[18]研究发现,以椭圆球体计算公式 $V=\pi/6\times\text{长}\times\text{宽}\times\text{高}$ 和排水法得到的肿瘤体积最为接近。因为大多数的异位内膜呈现椭圆形,故本研究中使用该方法计算异位内膜的体积。该计算方法也是和Uygur等^[19]的研究是一致的。第四,本研究在给药前对异位内膜的大小进行了筛选,设定造模3周后 $V_1<13\text{ mm}^3$ 的大鼠均为造模失败。而其他的文献中仅仅是排除异位内膜不生长的大鼠^[16,20]。本研究对异位内膜进行筛选的一个重要原因是体积偏小的异位内膜在给予供试品药物后,异位内膜的体积稍有变化,抑制率也会变化很大,不利于药物的筛选及评价;另一方面,体积过小会增大整体数据的标准差。

与自体移植构建EMs模型相比较,同种异体移植可以保留完整的子宫组织,有助于进一步探究EMs引起的不孕及盆腔疼痛等机制及治疗。另外,在同种异体移植EMs模型中,一只供体大鼠的子宫内膜可以构建4~6只EMs模型,缩短了实验的造模时间,可减少受体大鼠由于子宫缺失引起的出血现象,降低了感染风险。本研究中也发现,异体移植造模失败多数是由于异位内膜没有生长导致的。而自体移植造模失败多与异位内膜体积生长较小有关,推测原因是同种异体移植会存在一定的免疫排斥反应。另外需要说明的是,由于大鼠没有月经,需要通过手术构建模型,该过程与人体子宫内膜损伤后易于黏附的过程相似,但又不

完全相同。另外,大鼠与人存在种属差异,在大鼠模型上得到的实验结果还需要进一步研究验证^[21]。

同种异体EMs模型构建成功后,本研究探索了GnRH激动剂GenSci006的药效,同时用曲普瑞林作为阳性对照药。曲普瑞林也是一种合成的GnRH激动剂。与天然GnRH相比,曲普瑞林的亲和力强,其受体效价是天然GnRH的100倍,且具有更长的体内半衰期和更强的生物学稳定性^[22]。曲普瑞林能够通过与其体内的GnRHR结合,下调FSH和LH分泌,进而抑制卵泡发育及排卵,使雌激素达到绝经期水平,促进异位内膜出现萎缩甚至“死亡”。此外,GnRH可以有效抑制子宫内膜细胞生长,这不仅是通过其经典的垂体内分泌效应发挥作用,而且还通过减少炎症反应、降低血管生成、上调促凋亡蛋白Bax和FasL的表达以及下调抗凋亡蛋白Bcl-2的表达来抑制内膜细胞增殖^[23-24]。所以本课题以曲普瑞林作为阳性对照药来评估模型的有效性,同时佐证GenSci006的药效。本研究结果表明,与模型组相比,0.25 mg/kg的GenSci006和曲普瑞林均能够明显减小异位内膜的体积,提示GenSci006和曲普瑞林对异位内膜生长均具有抑制作用。从抑制率上看,0.25 mg/kg曲普瑞林对异位内膜的抑制率为64.66%,0.25 mg/kg GenSci006对异位内膜的抑制率为91.52%。结果提示,同等剂量的GenSci006和曲普瑞林在均能抑制异位内膜生长的条件下,GenSci006更能减小异位内膜的体积。上述结果说明异位内膜的体积及抑制率均可以作为监测药物治疗效果的主要指标。

药物在治疗EMs的同时可能会对子宫内膜及卵巢产生影响,因此子宫及卵巢也是药效学评价的重要指标。有研究发现,GnRH激动剂可以抑制各种类型的激素依赖性细胞(包括乳腺、卵巢和子宫内膜细胞)的增殖^[25-27]。本实验中,曲普瑞林和GenSci006在0.25 mg/kg时均能够显著降低子宫脏器系数,减少子宫内膜的厚度,降低卵巢脏器系数。这些结果提示,曲普瑞林和GenSci006在治疗EMs的同时均抑制了大鼠体内子宫和卵巢的生长,并且与同等剂量的对照药物曲普瑞林相比,GenSci006对子宫内膜的抑制作用更强。

EMs是雌激素依赖性疾病,可以通过ER介导的增殖信号机制,促进异位病灶生长。因此血清 E_2 水平可以作为药效观察的一个指标。本研究发现,相同剂量下,GenSci006-2组大鼠的血清 E_2 、 P_4 、FSH、LH水平均略高于曲普瑞林组,推测其原因可能是GnRH激动剂主要作用于垂体,由于给药初期的“点火”效应,

会促进FSH和LH升高,进而促进卵巢分泌 E_2 、 P_4 短暂升高,导致血清 E_2 和 P_4 水平呈现先上升后下降的趋势^[28]。

另外,已知曲普瑞林通过与GnRHR相结合来发挥作用。本研究用实时荧光定量PCR方法测定了各组EMs大鼠下丘脑和垂体组织中GnRHR mRNA的表达水平,结果发现与模型组相比,GnRHR在下丘脑的表达水平,无明显变化;而曲普瑞林组和GenSci006-2组中垂体GnRHR mRNA的表达量与模型组相比明显降低,且GenSci006-2对垂体GnRHR mRNA的抑制作用显著强于同剂量的曲普瑞林。此结果提示,GenSci006和曲普瑞林均不影响下丘脑GnRHR的表达,但可抑制垂体GnRHR的表达,表明GenSci006与其他GnRH类似物的作用机制是一致的^[29]。本实验还测定了异位内膜组织中 $ER\alpha$ 、 $ER\beta$ 和PR蛋白表达,探讨了GenSci006对异位内膜中 $ER\alpha$ 、 $ER\beta$ 、PR蛋白表达的影响。结果显示,GenSci006和曲普瑞林并不影响异位内膜的 $ER\alpha$ 、 $ER\beta$ 、PR蛋白表达,提示GenSci006对ER和PR表达均无明显影响。

综上所述,本研究结果表明同种异体EMs大鼠模型适宜作为筛选治疗EMs药物的动物模型,而且异位内膜体积、抑制率、子宫及卵巢脏器系数和血清 E_2 水平均可作为检测药物疗效的指标。

[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市生物医药技术研究院(原上海市计划生育科学研究所)实验动物伦理委员会审批通过(批件号为2020-09)。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 Laboratory Animal Ethics Committee of Shanghai Institute of Planned Parenthood Research (Approval Letter No. 2020-09). All experimental procedures were performed in accordance with the requirements of laws and regulations in China related to experimental animals, including *Animal Management Regulations* (01/03/2017) and *Laboratory Animal: Guideline for Ethical Review of Animal Welfare* (GB/T 35892-2018) and so on.

[作者贡献 Author Contribution]

钟瑞华负责实验操作、论文撰写、统计分析;

李国停、杨文捷、郭湘洁、周洁芸、胡颖怡、倪其承和杨野参与了动物实验工作;

张敏参与了GenSci006制剂保管和文章修改工作;

朱焰负责课题整体构思和文章修改工作。

[利益声明 Declaration of Interest]

长春金赛药业有限公司提供了GenSci006供试品,其员工张敏参与了本课题的实验研究;所有作者均声明不存在利益冲突。

[参考文献 References]

- [1] 中华医学会妇产科学分会子宫内膜异位症协作组. 子宫内膜异位症的诊治指南[J]. 中华妇产科杂志, 2015, 50(3):161-169. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0529-567x.2015.03.001. Endometriosis Collaborative Group of the Obstetrics and Gynecology Branch of the Chinese Medical Association. Guidelines for diagnosis and treatment of endometriosis[J]. Chin J Obstet Gynecol, 2015, 50(3):161-169. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0529-567x.2015.03.001.
- [2] TAYLOR H S, KOTLYAR A M, FLORES V A. Endometriosis is a chronic systemic disease: clinical challenges and novel innovations[J]. Lancet, 2021, 397(10276):839-852. DOI: 10.1016/S0140-6736(21)00389-5.
- [3] ALLAIRE C, BEDAIWY M A, YONG P J. Diagnosis and management of endometriosis[J]. CMAJ, 2023, 195(10): E363-E371. DOI: 10.1503/cmaj.220637.
- [4] RAFIQUE S, DECHERNEY A H. Medical management of endometriosis[J]. Clin Obstet Gynecol, 2017, 60(3): 485-496. DOI: 10.1097/GRF.0000000000000292.
- [5] CAPEZZUOLI T, ROSSI M, LA TORRE F, et al. Hormonal drugs for the treatment of endometriosis[J]. Curr Opin Pharmacol, 2022, 67:102311. DOI: 10.1016/j.coph.2022.102311.
- [6] KANELLOPOULOS D, KARAGIANNI D, PERGALLOTIS V, et al. The effect of endometriosis on fertility in an animal model[J]. J Med Life, 2022, 15(9):1170-1175. DOI: 10.25122/jml-2021-0391.
- [7] 钟瑞华,周颖颖,谢淑武,等. 坤泰胶囊对大鼠实验性子宫异位内膜生长及其妊娠结局的影响[J]. 生殖与避孕, 2015, 1(8):517-524. ZHONG R H, ZHOU X Y, XIE S W, et al. Effect of Kuntai capsule on ectopic endometrium and the pregnancy outcome in a rat of endometriosis[J]. Reprod Contracept, 2015, 1(8):517-524.
- [8] LI H, YANG H D, LU S Y, et al. Autophagy-dependent ferroptosis is involved in the development of endometriosis [J]. Gynecol Endocrinol, 2023, 39(1): 2242962. DOI: 10.1080/09513590.2023.2242962.
- [9] KARSLIOGLU T, KARASU A F G, YILDIZ P. The effects of micronized progesterone and cabergoline on a rat autotransplantation endometriosis model: a placebo controlled randomized trial[J]. J Invest Surg, 2021, 34(8):897-901. DOI: 10.1080/08941939.2019.1705442.
- [10] TEJADA M A, SANTOS-LLAMAS A I, ESCRIVA L, et al. Identification of altered evoked and non-evoked responses in a heterologous mouse model of endometriosis-associated pain[J]. Biomedicine, 2022, 10(2): 501. DOI: 10.3390/biomedicine10020501.
- [11] VERNON M W, WILSON E A. Studies on the surgical induction of endometriosis in the rat[J]. Fertil Steril, 1985, 44(5):684-694.
- [12] ZHONG R H, MA A Y, ZHU J P, et al. Kuntai capsule inhibited

- endometriosis via inducing apoptosis in a rat model[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2016, 2016:5649169. DOI: 10.1155/2016/5649169.
- [13] ZHANG J F, ZHU Y, ZHOU X Y, et al. Evaluation of biodegradable microspheres containing nomegestrol acetate in a rat model of endometriosis[J]. *Eur J Pharm Sci*, 2014, 65:15-20. DOI: 10.1016/j.ejps.2014.08.011.
- [14] 张薇, 邹移海, 胡海勋, 等. 同种异体移植子宫内异位症大鼠模型的建立[J]. *热带医学杂志*, 2010, 10(7):770-772. ZHANG W, ZOU Y H, HU H X, et al. Establishment of an allograft rat model for the study of endometriosis[J]. *J Trop Med*, 2010, 10(7):770-772.
- [15] 孙伟伟, 常欢, 赵瑞华. 活血消异方对子宫内异位症大鼠生育力和早期妊娠毒性的影响[J]. *药物评价研究*, 2019, 42(4):648-652. DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2019.04.008. SUN W W, CHANG H, ZHAO R H. Effect of Huoxue Xiaoyi Prescription on fertility and early pregnancy toxicity of rats with endometriosis[J]. *Drug Eval Res*, 2019, 42(4): 648-652. DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2019.04.008.
- [16] 崔金秀, 顾振鹏, 刘志慧, 等. 同种异体 Sprague-Dawley 大鼠子宫内异位症动物模型的建立[J]. *中华妇幼临床医学杂志(电子版)*, 2015, 11(3): 388-392. DOI: 10.3877/cma.j.issn.1673-5250.2015.03.022. CUI J X, GU Z P, LIU Z H, et al. Establishment of endometriosis model in allogeneic Sprague-Dawley rats[J]. *Chin J Obstet Gynecol Pediatr Electron Ed*, 2015, 11(3): 388-392. DOI: 10.3877/cma.j.issn.1673-5250.2015.03.022.
- [17] 崔阳阳, 孙伟伟, 赵瑞华. 子宫内异位症动物模型研究进展[J]. *中国实验动物学报*, 2013, 21(5):86-89, 94. DOI: 10.3969/j.issn.1005-4847.2013.05.018. CUI Y Y, SUN W W, ZHAO R H. Recent advances in research on animal models of endometriosis[J]. *Acta Lab Animalis Sci Sin*, 2013, 21(5):86-89, 94. DOI: 10.3969/j.issn.1005-4847.2013.05.018.
- [18] TOMAYKO M M, REYNOLDS C P. Determination of subcutaneous tumor size in athymic (nude) mice[J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 1989, 24(3): 148-154. DOI: 10.1007/BF00300234.
- [19] UYGUR D, AYTAN H, ZERGEROGLU S, et al. Leflunomide: an immunomodulator: induces regression of endometrial explants in a rat model of endometriosis[J]. *J Soc Gynecol Invest*, 2006, 13(5):378-383. DOI: 10.1016/j.jsg.2006.03.006.
- [20] 唐艳, 张莉, 刘海红. 川芎嗪抑制 TLR4/MyD88/NF- κ B 信号通路减轻子宫内异位症大鼠炎症反应[J]. *免疫学杂志*, 2023, 39(6): 469-477. DOI: 10.13431/j.cnki.immunol.j.20230061. TANG Y, ZHANG L, LIU H H. Ligustrazine mitigates inflammatory response in endometriosis rats by inhibiting TLR4/MyD88/NF- κ B signaling pathway[J]. *Immunol J*, 2023, 39(6):469-477. DOI: 10.13431/j.cnki.immunol.j.20230061.
- [21] 单婧, 程雯, 翟东霞, 等. 子宫内异位症啮齿类动物模型研究进展[J]. *生殖医学杂志*, 2017, 26(5):498-501. DOI: 10.3969/j.issn.1004-3845.2017.05.022. SHAN J, CHENG W, ZHAI D X, et al. Research progress of rodent model with endometriosis[J]. *J Reprod Med*, 2017, 26(5):498-501. DOI: 10.3969/j.issn.1004-3845.2017.05.022.
- [22] BERGQVIST A, BERGH T, HOGSTRÖM L, et al. Effects of triptorelin versus placebo on the symptoms of endometriosis [J]. *Fertil Steril*, 1998, 69(4):702-708. DOI: 10.1016/s0015-0282(98)00019-3.
- [23] TESONE M, BILOTAS M, BARAÑAO R I, et al. The role of GnRH analogues in endometriosis-associated apoptosis and angiogenesis[J]. *Gynecol Obstet Invest*, 2008, 66(Suppl 1):10-18. DOI: 10.1159/000148026.
- [24] KHAN K N, KITAJIMA M, HIRAKI K, et al. Changes in tissue inflammation, angiogenesis and apoptosis in endometriosis, adenomyosis and uterine myoma after GnRH agonist therapy [J]. *Hum Reprod*, 2010, 25(3): 642-653. DOI: 10.1093/humrep/dep437.
- [25] EMONS G, SCHALLY A V. The use of luteinizing hormone releasing hormone agonists and antagonists in gynaecological cancers[J]. *Hum Reprod*, 1994, 9(7):1364-1379. DOI: 10.1093/oxfordjournals.humrep.a138714.
- [26] GRÜNDKER C, GÜNTHERT A R, WESTPHALEN S, et al. Biology of the gonadotropin-releasing hormone system in gynecological cancers[J]. *Eur J Endocrinol*, 2002, 146(1):1-14. DOI: 10.1530/eje.0.1460001.
- [27] SUKUMAR J S, QUIROGA D, KASSEM M, et al. Patient preferences and adherence to adjuvant GnRH analogs among premenopausal women with hormone receptor positive breast cancer[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2021, 190(2):183-188. DOI: 10.1007/s10549-021-06368-4.
- [28] 郎景和, 冷金花, 王泽华, 等. 促性腺激素释放激素激动剂在子宫内异位症和子宫平滑肌瘤治疗中的应用专家意见[J]. *中华妇产科杂志*, 2017, 52(2):77-81. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0529-567x.2017.02.002. LANG J H, LENG J H, WANG Z H, et al. Expert opinion on the application of gonadotropin-releasing hormone agonist in the treatment of endometriosis and uterine leiomyoma[J]. *Chin J Obstet Gynecol*, 2017, 52(2):77-81. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0529-567x.2017.02.002.
- [29] BROWN J, PAN A, HART R J. Gonadotrophin-releasing hormone analogues for pain associated with endometriosis [J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2010, 2010(12): CD008475. DOI: 10.1002/14651858.CD008475.pub2.

(收稿日期:2023-11-03 修回日期:2024-02-01)

(本文编辑:张俊彦,富群华,丁宇菁,周烁)

[引用本文]

钟瑞华, 李国停, 杨文捷, 等. 同种异体子宫内异位症大鼠模型用于 GnRH 激动剂类药物的药效评价研究[J]. *实验动物与比较医学*, 2024, 44(2): 127-138. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2023.150.

ZHONG R H, LI G T, YANG W J, et al. Application of allograft endometriosis rat model in pharmacodynamic evaluation of GnRH agonists[J]. *Lab Anim Comp Med*, 2024, 44(2): 127-138. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2023.150.

银杏内酯 B 通过调控脑内 T 细胞特性及与胶质细胞间相互作用促进缺血性脑卒中小鼠的神经功能恢复

刘佳¹, 叶岩荣², 沈贇², 唐启瑛³, 陈梅卿², 易可慧⁴, 陈少壮²

(复旦大学附属中山医院厦门医院 1. 中西医结合科; 2. 药剂科; 3. 放射诊断科; 4. 神经内科, 厦门 361015)

[摘要] **目的** 探究银杏内酯 B 调控缺血性脑卒中恢复期小鼠的脑内 T 细胞生物学特性及 T 细胞与胶质细胞间的作用机制。**方法** 选取 36 只成年 C57BL/6 小鼠, 随机分为假手术组 (Sham 组)、对照组 (PBS 组) 和银杏内酯 B 组 (GB 组)。Sham 组仅给予假手术处理; PBS 组和 GB 组均采用线栓法制备大脑中动脉栓塞 (middle cerebral artery occlusion, MCAO) 损伤即缺血性脑卒中模型, 并于损伤后连续 14 d 分别鼻饲等体积的 PBS 和银杏内酯 B 溶液。采用转棒实验及神经功能评分法评估 3 组小鼠的神经功能变化; 并于实验第 15 天取 PBS 组和 GB 组小鼠脑损伤区及周边皮层、胼胝体及纹状体的新鲜组织, 采用单细胞测序方法评估该区域中 T 细胞及其亚群的生物学特性, 并进一步探索 T 细胞、小胶质细胞和少突胶质细胞之间的相互作用及机制。**结果** 与 Sham 组相比, PBS 组和 GB 组小鼠的神经功能评分均显著上升 ($P < 0.001$), 掉落前运动时程均显著降低 ($P < 0.001$); 与 PBS 组相比, GB 组在缺血性脑损伤后 5、10、15 d 的神经功能评分有下降趋势, 掉落前运动时程有上升趋势, 尤其 15 d 时的掉落前运动时程显著上升 ($P < 0.05$)。与 PBS 组相比, GB 组小鼠在脑损伤后 15 d 时脑内 T 细胞增殖活性显著升高 ($P < 0.05$), 增殖性 T 细胞数量及脂质代谢水平均显著上调 ($P < 0.05$), 所有 T 细胞的细胞外基质重塑显著增多 ($P < 0.05$); 同时, GB 组小鼠脑内 T 细胞与小胶质细胞、少突胶质细胞之间的相互作用以及小胶质细胞自身、小胶质细胞与少突胶质细胞之间的相互作用均显著增强, 主要表现为 CD74 与巨噬细胞迁移抑制因子 (macrophage migration inhibitory factor, MIF)、集落刺激因子 1 受体 (colony stimulating factor 1 receptor, CSF1R) 与集落刺激因子 1 (colony stimulating factor 1, CSF1) 的相互作用增强 ($P < 0.05$), 但 T 细胞的炎性水平与 PBS 组相比均无显著差异。**结论** 采用线栓法 MCAO 损伤手术可成功构建小鼠缺血性脑卒中疾病模型。银杏内酯 B 可能通过调控小鼠脑内 T 细胞生物学特性及其与胶质细胞间的互作关系, 促进小鼠脑损伤后的神经功能恢复。

[关键词] 银杏内酯 B; 缺血性脑卒中; T 细胞; 胶质细胞

[中图分类号] R-332; Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2024)02-0139-10



Ginkgolide B Promotes Neural Function Recovery of Ischemic Stroke Mice by Regulating Characteristics of Brain T Cells and Their Interactions with Glial Cells

LIU Jia¹, YE Yanrong², SHEN Yun², TANG Qiyang³, CHEN Meiqing², YI Kehui⁴, CHEN Shaozhuang²

[1. Department of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine; 2. Department of Pharmacy; 3. Department of Radiology; 4. Department of Neurology, Zhongshan Hospital (Xiamen), Fudan University, Xiamen 361015, China]

Correspondence to: CHEN Shaozhuang (ORCID: 0009-0009-5801-1582), E-mail: 394290375@qq.com

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the regulatory effects of Ginkgolide B on the biological characteristics of brain T cells and their interactions with glial cells during the recovery phase of ischemic

[基金项目] 2019 年厦门市医疗卫生科技计划项目“银杏内酯 B 调和胶质细胞‘阴阳’促进缺血性脑中风后白质功能恢复的研究” (3502220194027); 2022 年福建省医学科研项目“基于能谱 CT 的甲状腺乳头状癌淋巴结转移预测模型的建立与验证” (2022QN020)

[第一作者] 刘佳 (1988—), 女, 硕士, 主治医师, 研究方向: 中西医结合神经科学、中西医结合肿瘤学、中西医结合内科学、药物临床应用与研究。E-mail: z3335014322@sina.com

[通信作者] 陈少壮 (1994—), 男, 本科, 主管药师: 药理学、药剂学、药品的合理应用及指导、药物临床应用与研究、神经科学、肿瘤学。E-mail: 394290375@qq.com。ORCID: 0009-0009-5801-1582

stroke in mice. **Methods** 36 adult C57BL/6 mice were randomly assigned to three groups: sham-operated group (Sham group), control group (PBS group), and Ginkgolide B treatment group (GB group). The Sham group underwent only sham surgeries, whereas the PBS and GB groups were subjected to a middle cerebral artery occlusion (MCAO) model using the filament method, followed by intranasal administration of an equivalent volume of either PBS or Ginkgolide B solution for 14 days post-injury. Neurological function changes were evaluated in all three groups using the rotarod test and a neurological scoring system. On day 15, single-cell sequencing was performed on fresh tissues from the brain injury areas, surrounding cortex, corpus callosum, and striatum of mice in the PBS and GB group to assess the biological characteristics of T cells and their subpopulations, and further explore the interactions and mechanisms among T cells, microglia, and oligodendrocytes. **Results** Compared with the Sham group, both PBS and GB group exhibited significant improvements in neurological scores and reduced pre-fall motor durations ($P < 0.001$). Compared with the PBS group, the GB group showed a downward trend in neurological scores and an upward trend in pre-fall motor durations on days 5, 10, and 15 post-ischemic brain injury, with a significant increase in pre-fall motor duration on day 15 ($P < 0.05$). Compared with the PBS group, the GB group exhibited a significant increase in T cell proliferative activity in the brain 15 days post brain injury ($P < 0.05$). The number of proliferative T cells and the levels of lipid metabolism were significantly elevated ($P < 0.05$), and there was a significant increase in extracellular matrix remodeling in all T cells ($P < 0.05$). Additionally, the interactions between T cells and both microglia and oligodendrocytes, as well as among the microglia themselves and between microglia and oligodendrocytes, were significantly enhanced in the GB group. This was primarily evident in the strengthened interactions between CD74 and macrophage migration inhibitory factor (MIF), as well as colony stimulating factor 1 receptor (CSF1R) and colony stimulating factor 1 (CSF1) ($P < 0.05$). However, the inflammatory levels of T cells showed no significant differences compared with the PBS group. **Conclusion** A mouse model of ischemic stroke can be successfully established by MCAO operation. Ginkgolide B may promote neurological recovery post-brain injury in mice by modulating the biological characteristics of T cells within the brain and their interactions with glial cells.

[Key words] Ginkgolide B; Ischemic stroke; T cells; Glial cells

银杏内酯 B (ginkgolide B, GB) 是从银杏叶中提取出的一种天然化合物。作为银杏内酯类化合物的一员,它是一种具有酯结构的二萜化合物。GB 具有多种生物学活性,特别是在神经保护和血液循环改善方面展现出巨大潜力^[1]。最重要的是,GB 具有抗氧化和抗炎作用,可以减少自由基引起的细胞损伤,并保护细胞免受氧化应激的影响。另外,GB 还有助于改善血液循环,促进血管扩张,减少血小板聚集,防止血栓形成。这些作用使得 GB 在治疗心血管疾病和脑血管疾病方面具有潜在的临床应用价值^[2]。

缺血性脑卒中是由脑部血液供应中断或减少引起的脑组织损伤^[3]。在缺血性脑卒中恢复期(也被称为中风后期或后遗症期),患者经历了卒中中发作后的初期急性阶段,进入康复和恢复阶段^[4]。恢复期是脑卒中患者神经功能康复的重要阶段,通常为数周至数月的时间。大脑神经元在此期间能够通过建立新的连接、

重组回路和修复功能来适应损伤。已有多项研究证明,T细胞可以在缺血性脑卒中恢复期的患者康复和神经修复过程中发挥一定作用,例如:调节炎症反应,分泌不同类型的细胞因子调节炎症的平衡,通过识别和攻击异常细胞或损伤组织参与修复和再生、清除受损组织、修复神经元连接以及促进神经再生的过程等^[5-6]。

但是 GB 在缺血性脑卒中恢复期是否能产生确凿的保护作用,以及是否能对 T 细胞或其他细胞产生明确影响,目前都是未知的。因此,本研究构建了小鼠的缺血性脑卒中模型,然后探讨 GB 对小鼠脑内 T 细胞生物学特性的影响以及其与胶质细胞之间的调节作用,以期对 GB 的临床应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验动物

36 只雄性成年 SPF 级 C57BL/6 小鼠,3 月龄,体重

20~25 g, 购自斯贝福(北京)生物技术有限公司[SCXK(京)2019-0010], 动物质量合格(No. 110324220103126723)。实验过程中所有小鼠均饲养于福建安布瑞科技股份有限公司的实验动物屏障设施[SYXK(闽)2022-0002]中并用于实验, 5~6只/笼, 自由进食饮水, 12 h明暗交替光照。动物实验方案通过福建安布瑞生物实验动物伦理委员会的福利伦理审查(受理编号: IACUC FJABR2022052201)。

1.2 实验试剂及仪器

4-0型手术缝线、碘伏(500 mL/瓶, 批号20220711S)和麻醉剂异氟烷(100 mL/瓶, 批号20220101), 均购自上海玉研科学仪器有限公司; PBS(美国Thermo Fisher Scientific公司, 批号10010023); GB试剂(纯度98.00%, 美国MedChemExpress公司, 批号BN-52021); 细胞标志物CD3单克隆抗体(美国Proteintech Group公司, 批号60181-1-Ig, Clone: 3F3A1); CD3磁性珠子(美国Thermo Fisher Scientific公司, 批号00456107)。手术台、手术刀和剪刀(上海玉研科学仪器有限公司); 离心机(美国Thermo Fisher Scientific公司, 型号75007200); 磁珠分离装置(美国Thermo Fisher Scientific公司, 型号12301D); 动物行为学测试用转棒(美国Med Associates公司, 型号ENV-576M); 小鼠麻醉用面罩(淮北达斯加尔生物科技有限公司, 型号DS-MZ2); 动物呼吸机(上海奥尔科特生物科技有限公司, 型号ALC-V9); 多普勒脑血流检测仪(瑞典Perimed公司, 型号PF5000); 流式细胞仪(美国BD公司, 型号FACS Calibur)。

1.3 实验分组和处理

实验前小鼠适应性饲养1周, 然后随机分为假手术组(Sham组, $n=6$)、对照组(PBS组, $n=15$)和银杏内酯B组(GB组, $n=15$)。Sham组仅给予假手术处理, 即在颈部做正中切口, 分离皮下组织, 充分暴露左侧颈总动脉、颈外动脉和颈内动脉后, 再缝合切口; PBS组和GB组均采用线栓法构建缺血性脑卒中模型, 即进行大脑中动脉栓塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)损伤手术。手术操作前需要将手术器械浸泡在消毒剂中, 确保器械无菌。在对小鼠进行实验时, 采取以下步骤: 首先, 将小鼠放入通有终体积分数为1.0%~2.0%异氟烷的挥发罐中进行吸入麻醉, 并通过面罩给予吸氧; 接着, 将小鼠连接到呼吸机, 设定潮气量为4 mL, 呼吸频率为65次/min, 吸呼比为1:1。待夹尾反射消失后, 进行以下操作: 毛发清理, 清洁颈部皮肤; 在颈部做正中切口, 分离皮下

组织, 暴露左侧颈总动脉、颈外动脉和颈内动脉; 使用电凝进行颈外动脉分支的封闭, 在颈外动脉远心端处结扎, 并在近心端留置一根松散的缝线; 使用线结扎暂时阻断颈总动脉, 并在颈外动脉近心端留置的缝线与远心端结扎处之间剪开一小口, 将线栓放入其中, 再将预留的线结紧固; 沿着颈外动脉和颈内动脉导线栓, 直至达到大脑中动脉起始部, 并结合多普勒脑血流检测仪确认中动脉血流已下降至术前的80%以上; 阻断60 min后, 再次暴露颈部切口, 并缓慢拔出线栓, 结合多普勒脑血流检测仪确认中动脉血流已恢复至术前80%以上, 以证明已实现再灌注。最后用缝线将切口缝合起来, 确保伤口完全关闭。由于小鼠在麻醉过程中可能会失去体温调节能力, 因此应在术后置于恒温箱中恢复, 并观察其恢复情况。在MCAO损伤术后0~14 d行给药干预; GB组小鼠给予PBS溶解的质量分数为0.8%的GB溶液0.1 mL, 鼻饲进药; 对照组小鼠给予等量的PBS, 每12 h给药1次。

1.4 神经功能评估

采用转棒实验对3组小鼠进行MCAO损伤后的神经功能评估。实验在双盲情况下进行, 将小鼠置于塑料杆状转棒上, 该塑料杆在5 min内以4~40 r/min的速度旋转^[7]。为全面评估小鼠的运动神经功能, 记录了小鼠在转棒上运动直至掉落的时间, 以及掉落前在转棒上表现出的最高的运动评分: 正常行走为0分, 容易失去平衡为1分, 跌倒为2分, 很难站立为3分, 不能站立为4分, 不能进行自发运动为5分, 完全失去协调能力为6分。所有小鼠均在手术前以20 r/min的恒定速度适应转棒试验2 d, 并于术前1 d(转棒适应训练半小时后)及术后0、1、2、5、10、15 d进行上述神经功能测试。每只小鼠每天测试1次, 最长记录时间为300 s。

1.5 脑组织样本收集

造模后第15天(完成给药后次日), 用颈椎脱位法处死小鼠。断头后, 将小鼠头部放置在碎冰中的玻璃皿上, 快速且小心地剥离皮肤及颅骨, 取出完整的新鲜脑组织, 在冰上迅速剥离出左侧损伤区及周边区的皮层、胼胝体和纹状体组织, 迅速转移并贮存于-80℃冰箱中。

1.6 提取T细胞

随机将PBS组($n=6$)和GB组($n=6$)小鼠的脑组织样本转移到离心管中, 并添加合适的PBS保护细胞完整性。用剪刀或匀浆器将组织切碎, 并通过滤器(70 μm 滤网)过滤细胞悬浮液以去除固体碎片, 从而

将脑组织样本分离为单个细胞悬浮液。将细胞悬浮液与CD3磁性珠子混合、孵育30 min,使磁性珠子与T细胞上的目标表面标志物结合。在磁场作用下,使用磁珠分离装置将与磁珠结合的T细胞分离出来,留下未结合的细胞。用PBS对分离得到的T细胞进行3次洗涤。将纯化得到的T细胞收集到离心管中,最后对提取的T细胞进行计数。

1.7 单细胞测序

用CD3单克隆抗体对单个T细胞进行染色,使用流式细胞仪将单个T细胞分选到单个反应器中。使用Singleron Matrix®单细胞处理系统对每个反应器中的单个T细胞进行测序。对测序数据进行质量控制、去除噪声和基因表达计数归一化等预处理步骤,然后使用生物信息学工具将细胞划分为不同的簇或类别,并根据每个细胞的基因表达模式对其进行可视化、差异基因表达分析等,以识别不同的T细胞亚群,以及它与小胶质细胞和少突胶质细胞之间的相互作用。根据差异基因表达等结果进行功能富集和通路分析,以了解T细胞亚群的功能特性和调控通路。

使用“U score”对T细胞的免疫功能进行综合评估。“U”代表“Utility”(效用),包括以下方面:(1) T细胞产生细胞因子(如干扰素 γ 、白细胞介素等)的能力;(2) T细胞对靶细胞的杀伤能力(即细胞毒性);(3) T细胞产生并释放分泌性颗粒(如颗粒素等)的能力;(4) 评估T细胞内免疫信号转导的强度和效用;(5) 从T细胞的转录组数据中提取相关信息,以评估其功能状态。通过将这些功能特征进行综合评估,可以计算得到一个具体的分数,即U评分。该评分能帮助评估和比较不同T细胞亚群的免疫功能。

1.8 基于细胞类别的单细胞成像数据分析

使用R包FlowSOM插件计算每个细胞的细胞类型标签,使用注释细胞类型的标记将所有单元格聚类到一个100节点的图中,然后用FlowSOM函数QueryStarPlot计算每个节点和每个细胞类型的分数。首先对被定义的所有T细胞执行此过程,然后在抗体组合表示的每个细胞亚型内进行递归迭代。为了可视化数据,使用细胞类型调用作为目标指标,应用半监督均匀流形逼近与投影(uniform manifold approximation and projection, UMAP)进行降维。然后使用细胞标签来识别细胞类型之间的空间相互作用。最后将T细胞与小胶质细胞、少突胶质细胞之间的相互作用频率进行比较。

1.9 统计学处理

所有数据均采用R语言(v 3.6.3)软件进行分析。分类变量之间的差异使用Fisher精确检验进行测试,组间比较连续变量时使用 t 检验,组内比较采用两因素重复测量的方差分析,时间点之间的两两比较采用LSD- t 检验,所有样本的 t -CyCIF数据采用邻域统计分析。使用Wilcoxon检验和5% Bonferroni进行多重检验校正。 $P < 0.05$ 时认为差异有统计学意义。

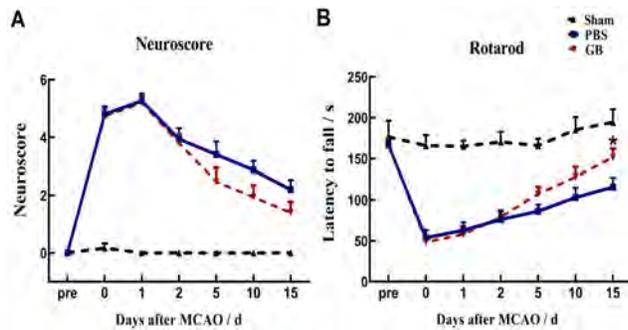
2 结果

2.1 GB促进缺血损伤后小鼠神经功能的恢复

采用转棒实验评估小鼠的神经功能,结果如图1所示。术后当天,与Sham组相比,PBS组和GB组的神经功能评分均显著上升($P < 0.001$),掉落前运动时程均显著缩短($P < 0.001$),证明MCAO造模成功,该损伤会引起显著的神经功能障碍(图1A)。PBS组与GB组之间的神经功能评分及掉落前运动时程无明显差异($P > 0.05$),证明MCAO的造模稳定,两组的神经功能损伤程度无明显差异。进一步观察术后小鼠的神经功能可见:与PBS组相比,GB组在损伤后5、10、15 d的神经功能评分有下降趋势,掉落前运动时程有上升趋势,尤其15 d时的掉落前运动时程较PBS组显著上升($P < 0.05$),证实GB给药14 d可显著促进MCAO损伤后小鼠神经功能的恢复(图1B)。

2.2 GB增强缺血损伤后小鼠脑内T细胞的增殖

随机选取上述行为学实验后的PBS组($n=6$)和GB组($n=6$)小鼠进行单细胞测序研究。采用 t -CyCIF进行单细胞成像,总共分析了2万个成功分割的单细胞(平均每个样本 2.1×10^4 个细胞,范围为 $1.2 \times 10^4 \sim 2.9 \times 10^4$)。用U score评估细胞周期中G2M期(有丝分裂期)和S期(DNA复制期)的细胞增殖活性。如图2A所示,GB组的T细胞增殖活性较PBS组显著升高($P < 0.05$)。然后,使用FlowSOM注释预定义的细胞类型,再使用半监督UMAP降维可视化数据(图2B)。UMAP可视化显示出所有T细胞,能够从单细胞维度观察细胞增殖情况。之后比较两组小鼠脑组织中CD8阳性(CD8⁺) T细胞、 $\gamma\delta$ T(GDT)细胞、辅助性T细胞、初始T细胞、自然杀伤(natural killer, NK)细胞、自然杀伤T(natural killer T, NKT)细胞、增殖性T细胞的U score,发现GB组较PBS组的增殖性T细胞显著增加($P < 0.05$),而两组间的其他细胞增殖情况无显著差异($P > 0.05$,图2C)。



注: A, 记录小鼠掉落前在转棒上表现出的最高的运动评分, 评分越高, 表示神经功能越差; 可见术后5、10、15 d时GB组的神经功能评分较PBS组有下降趋势, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。B, 记录小鼠在转棒上掉落前的运动时程, 时间越长, 表示神经功能恢复得越好; 可见术后5、10、15 d时GB组的掉落前运动时程较PBS组有上升趋势, 且在15 d时差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。Sham组 ($n=6$), 仅假手术处理; PBS组 ($n=15$), 采用线栓法制备MCAO模型, 并于损伤后连续14 d鼻饲PBS; GB组 ($n=15$), 采用线栓法制备MCAO模型, 并于损伤后连续14 d鼻饲银杏内酯B溶液。Note: A, The highest neurological scores of each mouse before falling from the rotarod were recorded. A higher score indicates poorer neurological function. It was observed that the neurological scores of the GB group showed a decreasing trend compared to the PBS group on days 5, 10, and 15 after MCAO, but there was no statistically significant difference ($P > 0.05$). B, The duration of motor activity on the rotarod before falling was recorded for mice. Longer durations indicated better recovery of neurological function. It was evident that on days 5, 10, and 15 after MCAO, the pre-fall motor durations of the GB group showed an increasing trend compared to the PBS group, and there was a statistically significant difference at day 15 ($P < 0.05$). Sham group ($n=6$): Received sham surgeries only. PBS group ($n=15$): Prepared with the filament method to create a model of MCAO, followed by daily intranasal administration of PBS for 14 days post-injury. GB group ($n=15$): Also prepared using the filament method for MCAO, followed by daily intranasal administration of ginkgolide B solution for 14 days post-injury.

图1 大脑中动脉栓塞(MCAO)损伤后各组小鼠神经功能的变化
Figure 1 Changes of neurological function of different groups of mice after middle cerebral artery occlusion (MCAO)

2.3 GB增强缺血损伤后小鼠脑内T细胞的细胞外基质重塑

用U score评估细胞质中特定蛋白质、细胞外小囊泡中的成分变化等, 可以揭示细胞外基质重塑在不同T细胞亚群中的差异与调控机制。如图3A所示, GB组小鼠脑内T细胞的细胞外基质重塑较PBS组显著增多 ($P < 0.05$)。使用FlowSOM注释预定义的细胞类型, 再使用半监督UMAP降维可视化数据(图3B)。UMAP可视化显示出所有T细胞, 从单细胞维度观察细胞外基质重塑情况。比较两组小鼠脑组织中CD8⁺T细胞、GDT细胞、辅助性T细胞、初始T细胞、NK细胞、

NKT细胞、增殖性T细胞的U score, 发现GB组的所有细胞外基质重塑较PBS组相比均显著增加 ($P < 0.05$, 图3C)。

2.4 GB增强缺血损伤后小鼠脑内T细胞的脂质代谢

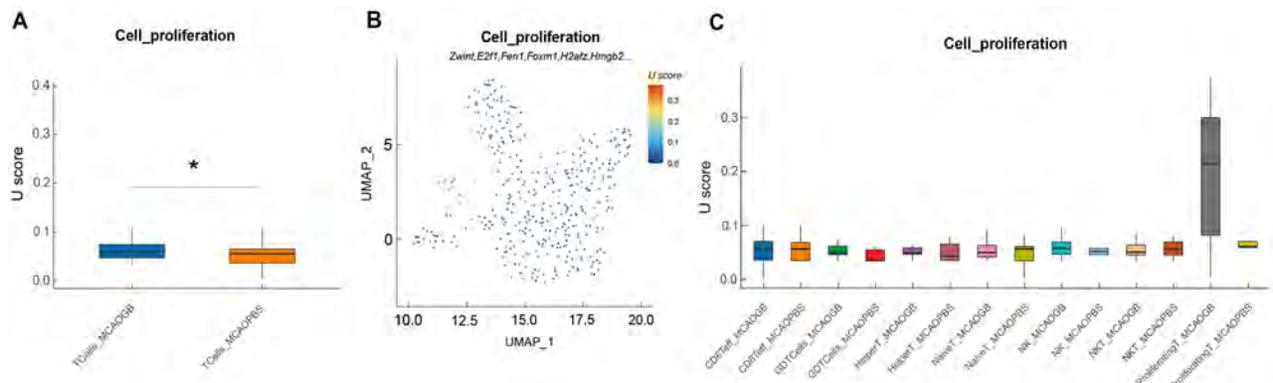
用U score评估单个T细胞中与脂质代谢相关的代谢途径的活性, 例如脂质合成途径(如酯化、甘油磷酸化等)和脂质降解途径(如 β 氧化等), 可以了解其脂质代谢的状态和重要途径的激活程度。如图4A所示, GB组小鼠脑内T细胞的脂质代谢水平较PBS组显著升高 ($P < 0.05$)。接下来, 使用FlowSOM注释预定义的细胞类型, 再使用半监督UMAP降维可视化数据。UMAP可视化显示出所有T细胞, 从单细胞维度观察细胞的脂质代谢水平(图4B)。之后比较两组小鼠脑组织中CD8⁺T细胞、GDT细胞、辅助性T细胞、初始T细胞、NK细胞、NKT细胞、增殖性T细胞的U score, 发现GB组较PBS组的增殖性T细胞的脂质代谢水平显著增加 ($P < 0.05$), 而两组之间其他细胞的脂质代谢水平无显著差异 ($P > 0.05$, 图4C)。

2.5 GB对缺血损伤后小鼠脑内T细胞的炎性水平无显著影响

用U score评估不同类型的T细胞亚群, 分析它们在炎症反应中的表达模式和功能差异。如图5A所示, GB组小鼠受损脑组织中T细胞的炎性水平与PBS组无显著差异 ($P > 0.05$)。用FlowSOM注释预定义的细胞类型, 再使用半监督UMAP降维可视化数据。如图5B所示, UMAP可视化显示出所有T细胞, 可从单细胞维度观察细胞的炎性水平。比较两组小鼠脑组织中反映CD8⁺T细胞、GDT细胞、辅助性T细胞、初始T细胞、NK细胞、NKT细胞、增殖性T细胞炎性水平的U score, 发现GB组与PBS组T细胞的炎性水平均无显著差异 ($P > 0.05$, 图5C)。

2.6 GB加强缺血损伤后小鼠脑内T细胞与小胶质细胞、少突胶质细胞之间的相互作用

对所有样本的t-CyCIF数据进行了邻域统计分析, 以确定细胞群之间的空间相互作用频率。然后将T细胞与小胶质细胞、少突胶质细胞这3种细胞之间的相互作用频率绘制成了点图, 主要通过细胞因子(图6A)和生长因子(图6B)的含量来判断。相比于PBS组, GB组小鼠脑内T细胞与小胶质细胞、少突胶质细胞之间的相互作用, 以及小胶质细胞自身、小胶质细胞与少突胶质细胞之间的相互作用均显著增强, 主要

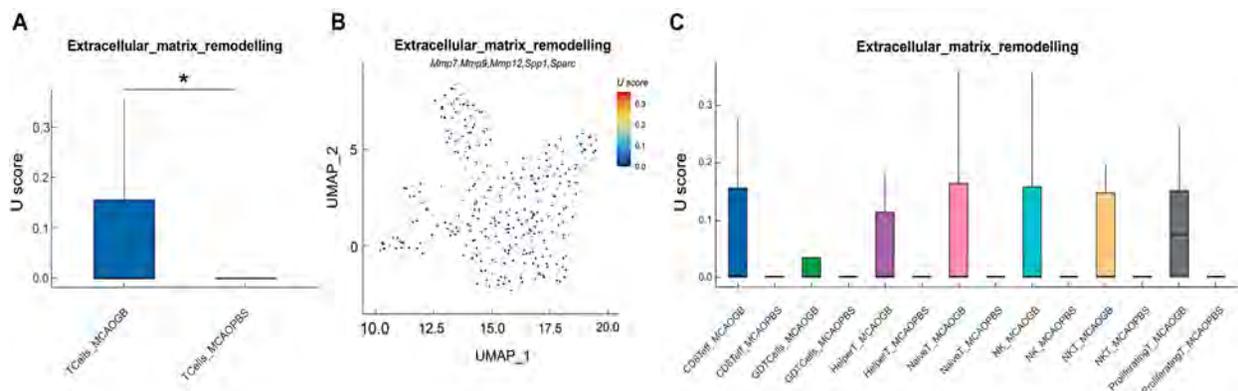


注：A，GB组和PBS组小鼠受损脑组织中总的T细胞U评分比较显示，GB组的T细胞增殖活性较PBS组显著升高（ $P < 0.05$ ）；B，半监督UMAP降维可视化数据显示出所有T细胞，从单细胞维度观察细胞增殖情况；C，比较两组小鼠脑组织中反映CD8⁺T细胞、 $\gamma\delta$ T（GDT）细胞、辅助性T细胞、初始T细胞、自然杀伤（NK）细胞、NKT细胞、增殖性T细胞增殖情况的U评分，GB组较PBS组的增殖性T细胞显著增加（ $P < 0.05$ ）。PBS组（ $n=6$ ），采用线栓法制备MCAO模型，并于损伤后连续14 d鼻饲PBS；GB组（ $n=6$ ），采用线栓法制备MCAO模型，并于损伤后连续14 d鼻饲银杏内酯B溶液。

Note: A, Comparison of overall T-cell U scores in the damaged brain tissues of the GB and PBS group revealed a significant increase in T-cell proliferative activity in the GB group compared to the PBS group ($P < 0.05$). B, Semi-supervised uniform manifold approximation and projection (UMAP) dimensionality reduction visualization displayed all T-cells, enabling observation of cellular proliferation at the single-cell level. C, Comparison of the proliferation of CD8⁺ T cells, $\gamma\delta$ T (GDT) cells, helper T cells, naive T cells, natural killer (NK) cells, NKT cells, and proliferative T cells in the brain tissues of both groups based on U scores revealed a significant increase in the proliferative T cells in the GB group compared to the PBS group ($P < 0.05$). PBS group ($n=6$): Prepared with the filament method to create a model of MCAO, followed by daily intranasal administration of PBS for 14 days post-injury. GB group ($n=6$): Also prepared using the filament method for MCAO, followed by daily intranasal administration of ginkgolide B solution for 14 days post-injury.

图2 U score评估大脑中动脉栓塞(MCAO)造模后各组小鼠脑内T细胞的增殖情况

Figure 2 U score assessment of T cells proliferation in the brains of mice after middle cerebral artery occlusion (MCAO)

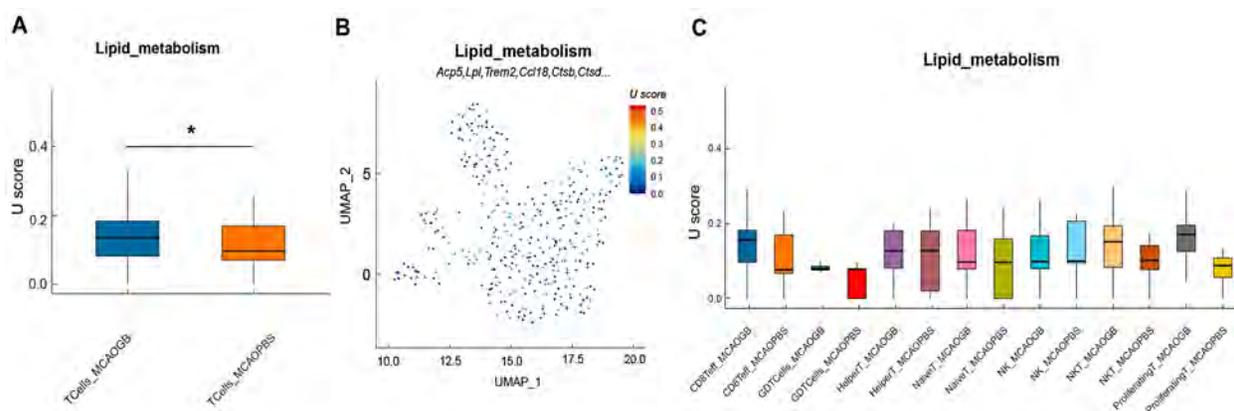


注：A，GB组和PBS组小鼠受损脑组织中反映T细胞细胞外基质重塑情况的U评分比较，GB组的T细胞的细胞外基质重塑较PBS组显著增多（ $P < 0.05$ ）；B，半监督UMAP降维可视化数据显示出所有T细胞，从单细胞维度观察细胞的细胞外基质重塑情况；C，比较两组小鼠脑组织中反映CD8⁺T细胞、 $\gamma\delta$ T（GDT）细胞、辅助性T细胞、初始T细胞、自然杀伤（NK）细胞、NKT细胞、增殖性T细胞的细胞外基质重塑情况的U评分，GB组所有细胞外基质重塑与PBS组相比均显著增加（ $P < 0.05$ ）。PBS组（ $n=6$ ），采用线栓法制备MCAO模型，并于损伤后连续14 d鼻饲PBS；GB组（ $n=6$ ），采用线栓法制备MCAO模型，并于损伤后连续14 d鼻饲银杏内酯B溶液。

Note: A, Comparison of U scores for extracellular matrix remodeling of T cells in the damaged brain tissues of the GB and PBS groups showed significantly increased remodeling in the GB group compared to the PBS group ($P < 0.05$). B, Semi-supervised UMAP dimensionality reduction visualization revealed all T cells, enabling observation of extracellular matrix remodeling at the single-cell level. C, Comparison of U scores for extracellular matrix remodeling among CD8⁺ T cells, $\gamma\delta$ T (GDT) cells, helper T cells, naive T cells, natural killer (NK) cells, NKT cells, and proliferative T cells in the brain tissues of both mouse groups showed a significant increase in extracellular matrix remodeling across all cell types in the GB group compared to the PBS group ($P < 0.05$). PBS group ($n=6$): Prepared with the filament method to create a model of MCAO, followed by daily intranasal administration of PBS for 14 days post-injury. GB group ($n=6$): Also prepared using the filament method for MCAO, followed by daily intranasal administration of ginkgolide B solution for 14 days post-injury.

图3 U score评估大脑中动脉栓塞(MCAO)造模后各组小鼠脑内T细胞的细胞外基质重塑情况

Figure 3 U score assessment for extracellular matrix remodeling of T cells after middle cerebral artery occlusion (MCAO)



注：A，GB组和PBS组小鼠受损脑组织中反映T细胞脂质代谢情况的U评分比较，GB组的T细胞脂质代谢水平较PBS组显著升高（ $P < 0.05$ ）；B，半监督UMAP降维可视化数据显示出所有T细胞，从单细胞维度观察细胞脂质代谢情况；C，比较两组小鼠脑组织中反映CD8⁺T细胞、 $\gamma\delta$ T（GDT）细胞、辅助性T细胞、初始T细胞、自然杀伤（NK）细胞、NKT细胞、增殖性T细胞脂质代谢情况的U评分，GB组较PBS组的增殖性T细胞的脂质代谢水平显著增加（ $P < 0.05$ ）。PBS组（ $n=6$ ），采用线栓法制备MCAO模型，并于损伤后连续14 d鼻饲PBS；GB组（ $n=6$ ），采用线栓法制备MCAO模型，并于损伤后连续14 d鼻饲银杏内酯B溶液。

Note: A, Comparison of U scores for overall T cell lipid metabolism in the damaged brain tissues of the GB and PBS groups showed a significant increase in lipid metabolism levels in T cells of the GB group compared to the PBS group ($P < 0.05$). B, Semi-supervised UMAP dimensionality reduction visualization displayed all T cells, enabling observation of lipid metabolism at the single-cell level. C, Comparison of U scores for lipid metabolism among CD8⁺ T cells, $\gamma\delta$ T (GDT) cells, helper T cells, naive T cells, natural killer (NK) cells, NKT cells, and proliferative T cells in the brain tissues of both mouse groups revealed a significant increase in lipid metabolism levels in proliferative T cells of the GB group compared to the PBS group ($P < 0.05$). PBS group ($n=6$): Prepared with the filament method to create a model of MCAO, followed by daily intranasal administration of PBS for 14 days post-injury. GB group ($n=6$): Also prepared using the filament method for MCAO, followed by daily intranasal administration of ginkgolide B solution for 14 days post-injury.

图4 U score评估大脑中动脉栓塞(MCAO)造模后的各组小鼠脑内T细胞的脂质代谢情况

Figure 4 U score assessment for lipid metabolism of T cells in the brains of mice after middle cerebral artery occlusion (MCAO)

表现为CD74与巨噬细胞迁移抑制因子（macrophage migration inhibitory factor, MIF）、集落刺激因子1受体（colony stimulating factor 1 receptor, CSF1R）与集落刺激因子1（colony stimulating factor 1, CSF1）的相互作用增强（ $P < 0.05$ ）。

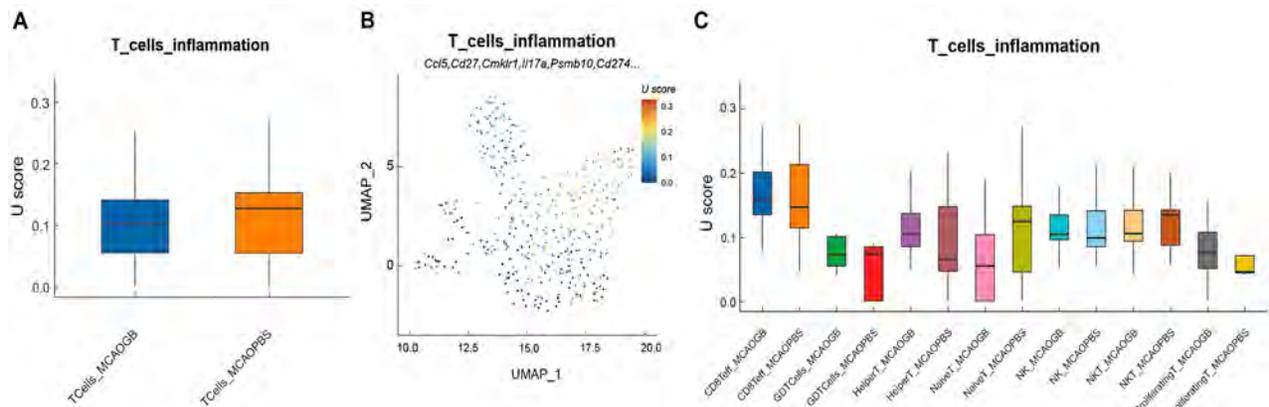
3 讨论

本研究发现，小鼠神经功能在缺血性脑损伤后的前2周里会逐渐改善，但是如果在此期间连续2周给予GB治疗，小鼠的神经功能可在第5天起趋于明显改善，并且在第15天时较未治疗组的神经功能出现显著增强，提示GB能有效改善小鼠运动神经功能。本研究结果依赖于转棒实验及神经功能评分，仅能从运动神经功能方面进行大体的评估，尚不能涵盖学习记忆、认知情绪等其他脑高级神经功能。

同时，本研究发现GB对小鼠T细胞的炎性水平无显著影响，可能原因是T细胞的炎性水平受多种因素影响。例如，T细胞的炎性水平可以受到外界刺激信号的影响，当T细胞接收到特定抗原的刺激时，会启

动炎症反应，释放炎症介质和细胞因子^[8]。炎症调节因子（如细胞因子和趋化因子）也可以直接或间接地影响T细胞的炎性水平。这些因子可以来自其他免疫细胞或局部组织，它们激活或抑制了T细胞的炎症反应。某些免疫调节细胞和分子，如调节性T细胞（regulatory T cells, Tregs）和抑制性细胞因子[如白细胞介素（interleukin, IL）-10和转化生长因子- β （transforming growth factor- β , TGF- β ）]，可以抑制T细胞的炎性水平，以维持免疫平衡和防止过度炎症反应^[9]。T细胞表面的受体和共刺激分子可以影响T细胞的炎性水平^[10]。例如，特定的共刺激信号可以激活T细胞并增强炎症反应^[11]。个体遗传因素也可能对T细胞的炎性水平产生影响，可能通过影响细胞表面受体的表达或功能来调控炎症反应的强度^[12]。另外，用U score评估不同类型的T细胞亚群在炎症反应中的表达模式和功能差异本身具有局限性。

正常情况下，T细胞与小胶质细胞、少突胶质细胞之间本身就存在多种相互作用，这些相互作用在免疫系统中起着重要的调节作用^[13]。例如，T细胞能够



注：A，GB组和PBS组小鼠受损脑组织中反映T细胞炎症水平的U评分比较，GB组T细胞的炎症水平与PBS组无显著差异（ $n^s P > 0.05$ ）；B，半监督UMAP降维可视化数据显示出所有T细胞，从单细胞维度观察细胞的炎症水平；C，比较两组小鼠脑组织中反映CD8⁺T细胞、 $\gamma\delta$ T（GDT）细胞、辅助性T细胞、初始T细胞、自然杀伤（NK）细胞、NKT细胞、增殖型T细胞炎症水平的U评分，GB组与PBS组T细胞的炎症水平均无显著差异。PBS组（ $n=6$ ），采用线栓法制备MCAO模型，并于损伤后连续14 d鼻饲PBS；GB组（ $n=6$ ），采用线栓法制备MCAO模型，并于损伤后连续14 d鼻饲银杏内酯B溶液。

Note: A, Comparison of U scores for the overall inflammatory levels of T cells in the damaged brain tissues of the GB and PBS groups showed no significant difference ($n^s P > 0.05$) in the inflammatory levels of T cells between the GB group and the PBS group. B, Semi-supervised UMAP dimensionality reduction visualization revealed all T cells, enabling observation of inflammatory levels from a single-cell perspective. C, Comparison of U scores for the inflammatory levels of CD8⁺ T cells, $\gamma\delta$ T (GDT) cells, helper T cells, naive T cells, natural killer (NK) cells, NKT cells, and proliferative T cells in the brain tissues of both mouse groups indicated no significant differences in the inflammatory levels of T cells between the GB and PBS groups. PBS group ($n=6$): Prepared with the filament method to create a model of MCAO, followed by daily intranasal administration of PBS for 14 days post-injury. GB group ($n=6$): Also prepared using the filament method for MCAO, followed by daily intranasal administration of ginkgolide B solution for 14 days post-injury.

图5 U score评估大脑中动脉栓塞（MCAO）造模后的GB组、PBS组T细胞的炎症水平

Figure 5 U score assessment for inflammatory levels of T cells in the brains of mice after middle cerebral artery occlusion (MCAO)

激活小胶质细胞和少突胶质细胞，使其释放细胞因子和其他免疫分子，从而促进炎症反应和免疫应答的发生；T细胞与小胶质细胞、少突胶质细胞之间通过细胞间的信号转导分子相互沟通，传递信息，并协调免疫应答的进程^[14]。T细胞可以调节小胶质细胞和少突胶质细胞的免疫活性，通过相互作用抑制或增强它们的功能，以维持免疫耐受的平衡。T细胞能够识别并杀伤感染了病毒的小胶质细胞，起到清除病毒感染的作用^[15]。此外，小胶质细胞和少突胶质细胞也能通过抗病毒细胞因子的分泌来协助T细胞的抗病毒免疫。T细胞与小胶质细胞、少突胶质细胞之间的相互作用还参与了组织修复过程，它们协同作用，促进伤口愈合和组织再生^[16]。

通过单细胞测序方法，可以降低分析细胞内转录组的动态变化。本研究发现，GB可促进缺血性脑卒中恢复期小鼠脑内T细胞的增殖活化，同时促进T细胞与小胶质细胞、少突胶质细胞之间的相互作用。其可能的原因有很多。首先，缺血性脑卒中后，脑组织会发生炎症反应^[17]。GB具有抗炎作用，可以抑制炎症细胞因子的释放，如肿瘤坏死因子- α 和IL-1 β ，从而减

轻炎症反应^[18-19]。这些炎症细胞因子可以影响T细胞增殖和活化，同时增强其与小胶质细胞、少突胶质细胞之间的相互作用。而GB的抗炎作用可能有助于维持正常的T细胞功能。其次，脑卒中会导致脑组织受氧化应激的影响，产生过多的自由基和氧化损伤^[20]。GB具有抗氧化作用，可以减少自由基的产生，并保护细胞免受氧化应激的损伤。GB的抗氧化作用可能有保护T细胞、小胶质细胞和少突胶质细胞的功能，由此增强它们之间的相互作用。另外，GB可能通过调节免疫反应来影响T细胞。GB可以增加Treg细胞的数量和活性，释放免疫调节性细胞因子，如TGF- β 和IL-10^[21]。Treg细胞可以抑制免疫反应和炎症反应，从而有助于维持正常的T细胞增殖和活化。小胶质细胞和少突胶质细胞是中枢神经系统中的主要免疫细胞，它们参与调节神经炎症和免疫反应^[22]。GB的抗炎作用可能减轻小胶质细胞、少突胶质细胞的激活和炎症反应，从而改善它们与T细胞的相互作用。

本研究探讨了GB对缺血性脑卒中小鼠恢复期脑内T细胞生物学特性的影响以及与胶质细胞之间的调节作用，阐明了GB对缺血性脑卒中模型的神经保护作用。

[作者贡献 Author Contribution]

刘佳、陈少壮负责实验设计与操作、数据检查、论文撰写、修改文稿；

陈梅卿、易可慧负责数据收集、数据整理与分析；

叶岩荣、沈赟、唐启瑛负责研究指导、资金支持，参与文章讨论。

[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] LV Z Y, YANG Y W, WANG J, et al. Optimization of the preparation conditions of borneol-modified ginkgolide liposomes by response surface methodology and study of their blood brain barrier permeability[J]. *Molecules*, 2018, 23(2):303. DOI: 10.3390/molecules23020303.
- [2] ZHU J L, JIN Z W, YANG L, et al. Ginkgolide B targets and inhibits creatine kinase B to regulate the CCT/TRiC-SK1 axis and exerts pro-angiogenic activity in middle cerebral artery occlusion mice[J]. *Pharmacol Res*, 2022, 180: 106240. DOI: 10.1016/j.phrs.2022.106240.
- [3] CAI W, SHI L G, ZHAO J Y, et al. Neuroprotection against ischemic stroke requires a specific class of early responder T cells in mice[J]. *J Clin Invest*, 2022, 132(15): e157678. DOI: 10.1172/JCI157678.
- [4] LIU R, SONG P, GU X, et al. Comprehensive landscape of immune infiltration and aberrant pathway activation in ischemic stroke[J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 766724. DOI: 10.3389/fimmu.2021.766724.
- [5] SHI L G, SUN Z Y, SU W, et al. Treg cell-derived osteopontin promotes microglia-mediated white matter repair after ischemic stroke[J]. *Immunity*, 2021, 54(7): 1527-1542. e8. DOI: 10.1016/j.immuni.2021.04.022.
- [6] XIA Y G, HU G W, CHEN Y, et al. Embryonic stem cell derived small extracellular vesicles modulate regulatory T cells to protect against ischemic stroke[J]. *ACS Nano*, 2021, 15(4): 7370-7385. DOI: 10.1021/acsnano.1c00672.
- [7] SHI W J, REN C H, ZHANG W, et al. Hypoxic postconditioning promotes angiogenesis after ischemic stroke[J]. *Neuroscience*, 2023, 526: 35-47. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2023.06.009.
- [8] MÜLLER M L, PEGLAU L, MOON L D F, et al. Neurotrophin-3 attenuates human peripheral blood T cell and monocyte activation status and cytokine production post stroke[J]. *Exp Neurol*, 2022, 347:113901. DOI: 10.1016/j.expneurol.2021.113901.
- [9] SONG L, SUN J M, SÖDERHOLM M, et al. Association of TIM-1 (T-cell immunoglobulin and mucin domain 1) with incidence of stroke[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2020, 40(7):1777-1786. DOI: 10.1161/ATVBAHA.120.314269.
- [10] AHNSTEDT H, PATRIZZ A, CHAUHAN A, et al. Sex differences in T cell immune responses, gut permeability and outcome after ischemic stroke in aged mice[J]. *Brain Behav Immun*, 2020, 87:556-567. DOI: 10.1016/j.bbi.2020.02.001.
- [11] BENAKIS C, SIMATS A, TRITSCHLER S, et al. T cells modulate the microglial response to brain ischemia[J]. *Elife*, 2022, 11: e82031. DOI: 10.7554/elife.82031.
- [12] WEITBRECHT L, BERCHTOLD D, ZHANG T, et al. CD4⁺ T cells promote delayed B cell responses in the ischemic brain after experimental stroke[J]. *Brain Behav Immun*, 2021, 91:601-614. DOI: 10.1016/j.bbi.2020.09.029.
- [13] SHI Z S, YU P, LIN W J, et al. Microglia drive transient insult-induced brain injury by chemotactic recruitment of CD8⁺ T lymphocytes[J]. *Neuron*, 2023, 111(5):696-710.e9. DOI: 10.1016/j.neuron.2022.12.009.
- [14] LU L, WANG Y P, ZHOU L N, et al. Vγ4 T cell-derived IL-17A is essential for amplification of inflammatory cascades in ischemic brain tissue after stroke[J]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 96:107678. DOI: 10.1016/j.intimp.2021.107678.
- [15] WANG M, WANG L J, PU L Y, et al. LncRNAs related key pathways and genes in ischemic stroke by weighted gene co-expression network analysis (WGCNA)[J]. *Genomics*, 2020, 112(3):2302-2308. DOI: 10.1016/j.ygeno.2020.01.001.
- [16] XIE L K, LI W J, HERSH J, et al. Experimental ischemic stroke induces long-term T cell activation in the brain[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2019, 39(11): 2268-2276. DOI: 10.1177/0271678X18792372.
- [17] ZHANG Y M, LI F S, CHEN C, et al. RAGE-mediated T cell metabolic reprogramming shapes T cell inflammatory response after stroke[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2022, 42(6):952-965. DOI: 10.1177/0271678X211067133.
- [18] PIEPKE M, CLAUSEN B H, LUDEWIG P, et al. Interleukin-10 improves stroke outcome by controlling the detrimental Interleukin-17A response[J]. *J Neuroinflammation*, 2021, 18(1): 265. DOI: 10.1186/s12974-021-02316-7.
- [19] LUO T, HAO Y N, LIN D D, et al. Ginkgolide B improved postoperative cognitive dysfunction by inhibiting microglia-mediated neuroinflammation in the hippocampus of mice[J]. *BMC Anesthesiol*, 2022, 22(1): 229. DOI: 10.1186/s12871-022-01750-1.
- [20] MENG H L, ZHAO H R, CAO X, et al. Double-negative T cells remarkably promote neuroinflammation after ischemic stroke[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2019, 116(12): 5558-5563. DOI: 10.1073/pnas.1814394116.
- [21] MIRÓ -MUR F, URRÁ X, RUIZ-JAÉN F, et al. Antigen-dependent T cell response to neural peptides after human ischemic stroke[J]. *Front Cell Neurosci*, 2020, 14: 206. DOI: 10.3389/fncel.2020.00206.
- [22] XIA Y G, CAI W, THOMSON A W, et al. Regulatory T cell therapy for ischemic stroke: how far from clinical translation? [J]. *Transl Stroke Res*, 2016, 7(5):415-419. DOI: 10.1007/s12975-016-0476-4.

(收稿日期:2023-08-30 修回日期:2024-02-18)

(本文编辑:张俊彦,富群华,丁宇菁,周培)

[引用本文]

刘佳, 叶岩荣, 沈赟, 等. 银杏内酯B通过调控脑内T细胞特性及与胶质细胞间相互作用促进缺血性脑卒中小鼠的神经功能恢复[J]. *实验动物与比较医学*, 2024, 44(2): 139-148. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2023.121.

LIU J, YE Y R, SHEN Y, et al. Ginkgolide B promotes neural function recovery of ischemic stroke mice by regulating characteristics of brain T cells and their interactions with glial cells[J]. *Lab Anim Comp Med* 2024, 44(2): 139-148. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2023.121.

葛根素对大鼠和小鼠骨密度影响的Meta分析

胡锦涛, 韩菁婕, 金旻, 胡滨, 娄月芬

(同济大学附属上海市第四人民医院药剂科, 上海 200434)

[摘要] **目的** 通过Meta分析评价葛根素对大鼠和小鼠骨密度的影响。**方法** 通过中国知网、中国生物医学文献、万方、维普、PubMed、EMBase、Web of Science、Cochrane 图书馆、Scopus 数据库中自建库至 2023 年 11 月 6 日收录的有关葛根素治疗对大鼠和小鼠骨密度影响的文献。文献纳入标准包括研究类型为随机对照试验 (对照为安慰剂或空白组), 研究对象为大鼠或小鼠, 干预措施为葛根素, 结果包含骨密度检测。文献排除标准包括葛根素联合其他药物治疗, 没有原始研究数据, 未公开发表, 骨密度检测部位为下颌骨。采用 SYRCL's RoB 工具对纳入文献中的研究进行风险偏倚评估, 采用 Stata 16.0 和 Rev Man 5.3 软件进行 Meta 分析。**结果** 经数据库检索共获得 429 篇文献, 根据纳入及排除标准最终纳入 42 篇文献。纳入文献中涉及 41 项研究, 共 925 只动物纳入数据分析。与对照组相比, 葛根素可改善大鼠和小鼠的骨密度: 股骨 37 项研究, $n=824$, 标准化均数差 (standardized mean difference, SMD) = 2.12, 95% 置信区间 (confidence interval, CI) = 1.69 ~ 2.54, $P < 0.0001$]; 腰椎 (13 项研究, $n=271$, $SMD=2.25$, 95% $CI=1.49 \sim 3.01$, $P < 0.0001$); 胫骨 (4 项研究, $n=95$, $SMD=0.94$, 95% $CI=0.05 \sim 1.83$, $P=0.04$) 和全身 (4 项研究, $n=94$, $SMD=1.89$, 95% $CI=0.50 \sim 3.29$, $P=0.008$) 的组间骨密度差异均具有统计学意义。**结论** 葛根素能够改善大鼠和小鼠的骨密度, 本研究可以为葛根素防治骨质疏松症的临床研究提供良好的参考。

[关键词] 葛根素; 骨密度; Meta分析; 大鼠; 小鼠

[中图分类号] Q95-22; R-332 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2024)02-0149-13



Effects of Puerarin on Bone Density in Rats and Mice: A Meta-analysis

HU Jinhua, HAN Jingjie, JIN Min, HU Bin, LOU Yuefen

(Department of Pharmacy, Shanghai Fourth People's Hospital Affiliated to Tongji University, Shanghai 200434, China)

Correspondence to: LOU Yuefen (ORCID: 0009-0005-9622-6059), E-mail: louyuefen@tongji.edu.cn

[ABSTRACT] **Objective** To evaluate the effects of puerarin on bone density in rats and mice through a meta-analysis. **Methods** The databases, including CNKI, SinoMed, Wanfang data, VIP, PubMed, EMBase, Web of Science, the Cochrane Library, and Scopus from their inception to November 6, 2023, were searched for literature on the effects of puerarin treatment on bone density in rats and mice. Inclusion criteria for the literature were randomized controlled trials with a placebo or blank control group; the subject animals were rats or mice; the intervention was puerarin; and the results included bone density measurements. Exclusion criteria included combination therapy with puerarin; lack of original research data; unpublished studies; and using mandible as the measurement site for bone density. Risks of bias were assessed using SYRCL's RoB tool. Data analysis was conducted with Stata 16.0 and Rev Man 5.3 software. **Results** After applying the inclusion and exclusion criteria, a total of 429 records were identified and 42 articles covering 41 studies were ultimately included. 925 animals were involved and the data analysis results indicated that puerarin improved bone density in rats and mice compared to the control group: femur [37 studies, $n=824$, standardized mean difference (SMD)=2.12, 95% confidence interval (CI)=1.69-2.54,

[基金项目] 上海市虹口区卫生健康委员会中医药科研项目“葛根素对小鼠间充质干细胞向成骨细胞和脂肪细胞分化的作用研究”(HKQ-ZYY-2021-32)

[第一作者] 胡锦涛(1989—),女,硕士,主管药师,从事临床药学研究。E-mail: hjhujinhua@163.com。

[通信作者] 娄月芬(1974—),女,硕士,主任药师,从事药事管理研究。E-mail: louyuefen@tongji.edu.cn。ORCID: 0009-0005-9622-6059

$P < 0.000 1$], lumbar spine (13 studies, $n=271$, $SMD=2.25$, 95% $CI=1.49-3.01$, $P < 0.000 1$), tibia (4 studies, $n=95$, $SMD=0.94$, 95% $CI=0.05-1.83$, $P=0.04$), and the whole body (4 studies, $n=94$, $SMD=1.89$, 95% $CI=0.50-3.29$, $P=0.008$), with all inter-group differences in bone density being statistically significant. **Conclusion** Puerarin can improve bone density in rats and mice. This study provides a valuable reference for clinical studies on the prevention and treatment of osteoporosis with puerarin.

[Key words] Puerarin; Bone density; Meta-analysis; Rats; Mice

葛根素 (puerarin) 是从野生葛 [*Pueraria montana* (Lour.) Merr.] 的干燥根茎中分离提取出的一种异黄酮类化合物单体, 化学名为4, 7-二羟基8- β -D吡喃葡萄糖基异黄酮。迄今为止, 科学研究发现葛根素具有多种生物学活性, 包括保护心血管、抗炎、抗氧化、改善微循环等。近年来, 葛根素对骨骼健康的影响似乎是一个新的关注点。葛根素被证实具有类似雌激素的作用^[1]。体外研究和动物模型研究数据提示, 葛根素可以刺激成骨标志物如骨碱性磷酸酶、I型胶原、骨保护素、骨钙素、骨桥蛋白等的表达^[2-7], 同时抑制破骨细胞形成和骨吸收标志物如I型胶原羧基端前肽 (C-telopeptide cross-link of type I collagen, CTX)、基质金属蛋白酶9 (matrix metalloproteinase 9, MMP-9) 表达^[5, 8-9]。推测葛根素可能是一种抑制骨吸收和改善骨结构的有效化合物^[10]。

目前有关葛根素对骨组织作用的动物研究尚缺乏规范的疗效评估。到目前为止, 少有研究和讨论葛根素对动物骨密度影响的综合评价报告。因此, 有必要进行系统性评价, 以确认葛根素干预的有效性。本文通过Meta分析相关文献, 评价葛根素对大鼠和小鼠骨密度影响的临床前研究, 旨在为进一步的临床研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 文献检索

检索数据库包含中国知网、万方、维普、中国生物医学文献、PubMed、EMBASE、Web of Science、Cochrane 图书馆和Scopus数据库。检索日期从建库至2023年11月6日。检索采取主题词和自由词相结合的方式。中文检索主题词为“骨密度”“葛根素”, 自由词为“葛根黄素”“葛根黄酮素”“葛藤素”“骨矿物质密度”“骨矿物密度”“骨质密度”“骨骼矿物质密度”。英文检索词为“Bone Density”“Bone Densities”“Density, Bone”“Bone Mineral Density”“Bone Mineral Densities”“Density, Bone Mineral”、“Bone Mineral Content”“Bone Mineral Contents”“Kakonein”“Puerarin”。

1.2 文献筛选

2名评价员独立进行文献筛选, 意见不一致时由第三人裁决。文献纳入标准: 研究类型为随机对照试验, 对照为安慰剂或空白组; 研究对象为大鼠或小鼠, 品种品系不限, 造模方式不限; 干预措施为葛根素单独给药, 葛根素试剂来源为高纯度的单体药物粉末或上市药品葛根素注射液; 结果必须包含骨密度检测。文献排除标准: 葛根素联合其他药物治疗; 没有原始研究数据; 学位论文、会议论文等未公开发表文献; 骨密度检测部位为下颌骨。

1.3 数据提取

2名评价员独立进行数据提取, 意见不一致时由第三人裁决。提取信息包含: 第一作者、发表时间、动物种类、样本量、实验周期、动物造模方式、给药方式、骨密度检测部位和参数等。

1.4 质量评价

2名评价员采用SYRCLE's RoB工具独立进行SYRCLE研究质量偏倚风险评估^[11], 意见不一致时由第三人裁决。该评估主要涵盖10项内容: (1) 随机序列产生方法; (2) 基线特征; (3) 分配隐藏; (4) 饲养环境; (5) 研究者盲法; (6) 随机结果评估; (7) 评估者盲法; (8) 数据完整性; (9) 选择性报告; (10) 其他偏倚。

1.5 统计分析

采用Stata 16.0和Rev Man 5.3软件进行统计分析。异质性检验采用 Q 统计量和 I^2 统计量。 $I^2 < 50\%$ 且 $P > 0.1$ 时, 提示异质性无统计学差异; $50\% \leq I^2 \leq 75\%$ 时, 提示中等异质性; $I^2 > 75\%$ 时, 提示高异质性。研究间存在中等异质性和高异质性时, 采取随机效应模型来定量合成标准化均数差 (standardized mean difference, SMD); 否则使用固定效应模型。使用Rev Man 5.3软件进行敏感性分析, 寻找异质性来源。使用漏斗图评价纳入文献的发表偏倚, 并进行Egger's检验; 研究数量少于10项时不做漏斗图检验。显著性检验水平 $\alpha=0.05$, $P < 0.05$ 时认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 文献检索结果

共检索到429篇文献，筛除重复收录文献217篇以及阅读标题和摘要后初筛不符合纳入标准的文献156篇，共获取56篇文献进行全文阅读。然后根据排除标准，排除不符合文献14篇，最终纳入42篇^[9,12-52]。文献筛选流程详见图1。

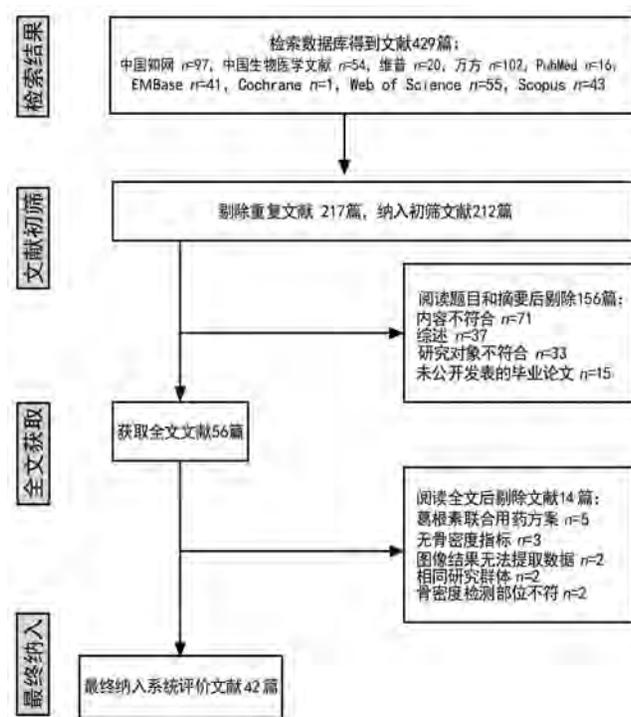


图1 有关葛根素对大鼠和小鼠骨密度影响的文献筛选流程
Figure 1 Literature screening process of puerarin on bone density in rats and mice

2.2 纳入研究的基本特征

本Meta分析共纳入42篇文献，涉及41项研究，包含925只动物的骨密度检测样本，见表1。干预措施为葛根素给药，剂量范围在1.3~500 mg/kg，给药方式以灌胃、腹腔注射和皮下注射为主。纳入研究包括股骨密度检测37项，腰椎骨密度检测13项，胫骨密度检测4项，全身骨密度检测4项。

2.3 文献质量评估

表2总结了纳入研究的偏倚风险评估结果。没有文献描述基线骨密度特征、分配隐藏、研究者盲法和评估者盲法信息。本项Meta分析纳入研究的质量评估得分在3~6分，平均为(4.51±0.64)分。

2.4 Meta分析结果

2.4.1 骨密度

汇总41项研究结果，与对照组比较，葛根素治疗可改善大鼠和小鼠的股骨密度(SMD=2.12, 95%CI=1.69~2.54, $P<0.0001$)、腰椎骨密度(SMD=2.25, 95%CI=1.49~3.01, $P<0.0001$)、胫骨密度(SMD=0.94, 95%CI=0.05~1.83, $P=0.040$)和全身骨密度(SMD=1.89, 95%CI=0.50~3.29, $P=0.008$)，差异均具有统计学意义，详见图2。

2.4.2 敏感性分析

各项骨密度研究结果显示，各研究间存在中等至极强异质性(股骨, $I^2=80%$, $P<0.01$; 腰椎, $I^2=81%$, $P<0.01$; 胫骨, $I^2=67%$, $P=0.03$; 全身, $I^2=86%$, $P<0.01$)。经敏感性分析删除任意一篇研究并没有发现对异质性产生重大影响，且删除单篇文献后骨密度作用结果未见重大翻转，结果见图3。

2.4.3 发表偏倚检验

对股骨和腰椎骨密度结果绘制漏斗图，进行发表偏倚检验，结果显示漏斗图均不对称(图4A~B)，两者Egger's检验的 $P<0.005$ ，说明存在发表偏倚。对股骨密度结果进行减补法校正，经过8次迭代后虚拟出9篇文献，新的统计结果略低于原始效应量(SMD=1.66, 95%CI=1.18~2.13, $P<0.0001$)。对腰椎骨密度结果进行减补法校正，经过2次迭代后虚拟出1篇文献，结果基本稳定(SMD=2.37, 95%CI=1.59~3.16, $P<0.0001$)。减补法校正后漏斗图均对称(图4C~D)。

2.4.4 亚组分析

采用Rev Man 5.3软件的 I^2 统计量进行纳入文献的异质性检验，结果显示，葛根素对大鼠、小鼠股骨密度和腰椎骨密度的作用在组间存在中等至极强的异质性。为探讨异质性的可能来源，对给药方式、给药剂量、治疗周期、动物造模方式和葛根素药物来源多项因素进行了亚组分析，但未能成功寻找到异质性的来源，结果见表3~4。

3 讨论

葛根素能预防实验动物的骨质疏松，提高骨量^[10]，但是目前的研究主要集中在细胞和动物水平上。一些研究提示葛根素能提高碱性磷酸酶和骨钙素活性，促进I型胶原分泌，上调骨形态发生蛋白2、Runt相关转录因子2、骨桥蛋白和骨保护素的表达水

表1 有关葛根素对大鼠和小鼠骨密度影响的纳入研究的基本信息

Table 1 Basic information of the included studies on the effects of puerarin on bone density in rats and mice

纳入研究 Included studies	动物 Animal	动物数量/只 Animal quantity <i>n</i>	周期/周 Period/ week	动物模型 Animal model	葛根素剂量/ (mg·kg ⁻¹) Puerarin dosage	检测部位 Detection site
Li B (2020) ^[12]	SD大鼠,雌	30	14	去卵巢骨质疏松模型	50 ~ 100 (ig qd)	股骨
Li B (2022) ^[13]	SD大鼠,雌	20	14	去卵巢骨质疏松模型	100 (ig qd)	股骨
Li BB (2014) ^[14]	SD大鼠,雌	6	12	去卵巢骨质疏松模型	50 (ip qod)	胫骨
Guo CJ (2019) ^[9]	SD大鼠,雌	12	14	链脉佐菌素诱导糖尿病模型	50 (ig qd)	股骨
QIN CY (2023) ^[15]	SD大鼠,雌	6	12	去卵巢骨质疏松模型	8 (ip qd)	股骨/腰椎
Yang D (2023) ^[16]	SD大鼠,雌	29	6	去卵巢骨质疏松模型	15 ~ 30 (ip qd)	股骨/腰椎
Wang GB (2020) ^[17]	SD大鼠,雌	40	6	去卵巢大鼠骨折模型	35 (ih qd)	股骨
Li H (2012) ^[18]	SD大鼠,雌	48	4 ~ 20	去卵巢骨质疏松模型	50 (ih qd)	股骨
Liang H (2012) ^[19]	SD大鼠,雌	18	12	去卵巢骨质疏松模型	20 (ig qd)	股骨/腰椎
Liu H (2012) ^[20]	SD大鼠,雌	20	12	去卵巢骨质疏松模型	5 (ip qd)	股骨
Huang HL (2011) ^[21]	SD大鼠,雌	20	10 ~ 20	去卵巢骨质疏松模型	50 (ih qd)	股骨
Xi HR(1) (2018) ^[22]	Wistar大鼠,雌	24	8	/	15.4 (ig qd)	股骨/椎骨/全身
Xi HR(2) (2018) ^[23]	Wistar大鼠,雌	20	12	/	15.4 (ig qd)	股骨/椎骨/全身
Yue HZ (2021) ^[24]	SD大鼠,雌	24	6	去卵巢骨质疏松模型	35 (ih qd)	股骨/腰椎
Li K (2019) ^[25-26]	Wistar大鼠,雌	20	4	废用性骨质疏松模型	15.4 (ig qd)	胫骨/腰椎
Xiao L (2009) ^[27]	大鼠,雌	24	12	去卵巢骨质疏松模型	50 (ih qd)	股骨/胫骨/腰椎
Xiao L (2020) ^[28]	C57BL/6J小鼠,雌	10	6	去卵巢骨质疏松模型	100 (ip qod)	股骨
Lyu LT (2022) ^[29]	KKAY45+C57BL/6J15小鼠	30	8	链脉佐菌素诱导糖尿病模型	1.3 (ig qd)	全身
Lyu LT (2023) ^[30]	Wistar大鼠,雌	30	4	去卵巢骨质疏松模型	80 (ih qd)	股骨
Wang PP (2012) ^[31]	SD大鼠,雌	8	12	去卵巢骨质疏松模型	20 (ig qd)	股骨
Tian Q (2006) ^[32]	SD大鼠,雌	26	7	去卵巢骨质疏松模型	20 ~ 100 (ih qd)	股骨/腰椎
Zhou Q (2006) ^[33]	SD大鼠,雌	40	8	去卵巢大鼠闭合性骨折模型	5 ~ 20 (ig qd)	股骨
Yu S (2019) ^[34]	SD大鼠,雌	16	8 ~ 16	去卵巢骨质疏松模型	40 (ih qd)	股骨
Zhou SH (2010) ^[35]	SD大鼠,雌	20	12	去卵巢骨质疏松模型	500 (ig qd)	腰椎
Zeng SL (2018) ^[36]	SD大鼠,雌	30	12	去卵巢骨质疏松模型	50 ~ 100 (ig qd)	股骨
Zeng SL (2019) ^[37]	SD大鼠	20	8	激素性股骨头坏死模型	200 (ip qd)	股骨
Yuan SY (2016) ^[38]	昆明小鼠,雌	32	4	去卵巢骨质疏松模型	2 ~ 8 (qd)	股骨
Niu SZ (2019) ^[39]	SD大鼠,雌	28	8	去卵巢骨质疏松模型	50 (ih qd)	股骨
Huang T (2010) ^[40]	SD大鼠,雌	40	12	去卵巢骨质疏松模型	5 ~ 20 (ig qd)	股骨
Tang WK (2020) ^[41]	SD大鼠,雄	15	4	股骨溶解模型	15.4 ~ 30.8 (ip qd)	股骨
Chen WM (2021) ^[42]	Wistar大鼠,雌	18	6	去卵巢骨质疏松模型	35 (ih qd)	股骨/腰椎
Yang X (2017) ^[43]	SD大鼠,雌	12	12	去卵巢骨质疏松模型	4 (ig qd)	股骨
Li XJ (2009) ^[44]	Wistar大鼠,雌	15	12	去卵巢骨质疏松模型	20 (ig qd)	股骨
Xu XS (2021) ^[45]	C57BL/6小鼠,雌	20	8	去卵巢骨质疏松模型	100 (ig qd)	股骨
Fang XY (2021) ^[46]	大鼠,雌	16	4 ~ 12	去卵巢骨质疏松模型	50 (ig qd)	股骨
Huang YL (2004) ^[47]	SD大鼠,雌	16	10	去卵巢骨质疏松模型	50 (ih qd)	股骨
Gao YM (2019) ^[48]	SD大鼠,雌	20	8	/	30.82 (ig qd)	股骨/全身
Qiu ZC (2022) ^[49]	SD大鼠,雌	45	5 ~ 12	去卵巢骨质疏松模型	50 ~ 150 (ig qd)	胫骨
Fang ZH (2020) ^[50]	SD大鼠,雌	15	3	去卵巢骨质疏松模型	50 ~ 75 (ih qd)	股骨
Wang ZH (2019) ^[51]	SD大鼠,雌	20	10	去卵巢骨质疏松模型	50 (ig qd)	股骨/腰椎
Yang ZH (2021) ^[52]	SD大鼠,雌	22	6	去卵巢骨质疏松模型	35 (ih qd)	股骨/腰椎

注: ig, 灌胃; ip, 腹腔注射; ih, 皮下注射; qd, 每日1次; qod, 隔日1次。

Note: ig, Intragastric administration; ip, Intraperitoneal injection; ih, Hypodermic injection; qd, Quaque die daily; qod, Quaque altera die every other day.

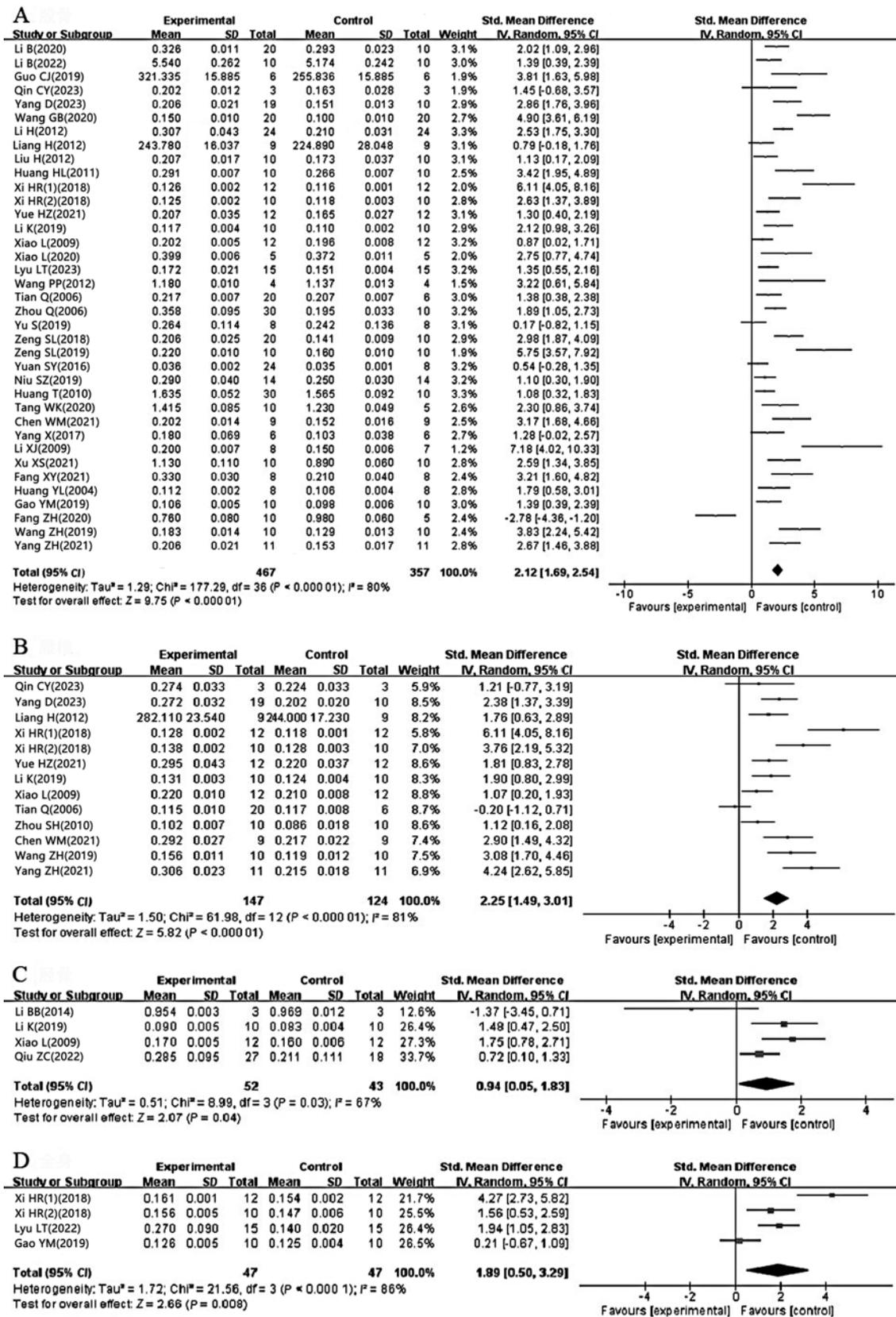
表2 有关葛根素对大鼠和小鼠骨密度影响的SYRCLE研究质量偏倚风险评估表

Table 2 SYRCLE's risks of bias assessment for studies on the effects of puerarin on bone density in rats and mice

纳入研究 Included studies	评估内容 Evaluation contents										评分 Score
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Li B (2020) ^[12]				√		√		√	√	√	5
Li B (2022) ^[13]				√		√		√	√	√	5
Li BB (2014) ^[14]				√		√			√	√	4
Guo CJ (2019) ^[9]				√		√			√	√	4
QIN CY (2023) ^[15]						√		√	√	√	4
Yang D (2023) ^[16]						√		√	√	√	4
Wang GB (2020) ^[17]						√		√	√	√	4
Li H (2012) ^[18]				√		√		√	√	√	5
Liang H (2012) ^[19]						√		√	√	√	4
Liu H (2012) ^[20]						√		√	√	√	4
Huang HL (2011) ^[21]				√		√		√	√	√	5
Xi HR(1) (2018) ^[22]	√			√		√		√	√	√	6
Xi HR(2) (2018) ^[23]	√					√		√	√	√	5
Yue HZ (2021) ^[24]	√					√		√	√	√	5
Li K (2019) ^[25-26]	√					√		√	√	√	5
Xiao L (2009) ^[27]				√		√		√	√	√	5
Xiao L (2020) ^[28]						√			√	√	3
Lyu LT (2022) ^[29]				√		√		√	√	√	5
Lyu LT (2023) ^[30]	√					√		√	√	√	5
Wang PP (2012) ^[31]						√		√	√	√	4
Tian Q (2006) ^[32]						√		√	√	√	4
Zhou Q (2006) ^[33]	√					√		√	√	√	5
Yu S (2019) ^[34]						√		√	√	√	4
Zhou SH (2010) ^[35]						√		√	√	√	4
Zeng SL (2018) ^[36]						√		√	√	√	4
Zeng SL (2019) ^[37]						√		√	√	√	4
Yuan SY (2016) ^[38]				√		√		√	√	√	5
Niu SZ (2019) ^[39]						√		√	√	√	4
Huang T (2010) ^[40]						√		√	√	√	4
Tang WK (2020) ^[41]						√		√	√	√	4
Chen WM (2021) ^[42]				√		√		√	√	√	5
Yang X (2017) ^[43]				√		√		√	√	√	5
Li XJ (2009) ^[44]						√		√	√	√	4
Xu XS (2021) ^[45]	√					√		√	√	√	5
Fang XY (2021) ^[46]				√		√		√	√	√	5
Huang YL (2004) ^[47]						√		√	√	√	4
Gao YM (2019) ^[48]						√		√	√	√	4
Qiu ZC (2022) ^[49]	√			√		√		√	√	√	6
Fang ZH (2020) ^[50]				√		√		√	√	√	5
Wang ZH (2019) ^[51]						√		√	√	√	4
Yang ZH (2021) ^[52]	√					√		√	√	√	5

注：1，随机序列产生方法；2，基线特征；3，分配隐藏；4，饲养环境；5，研究者盲法；6，随机结果评估；7，评估者盲法；8，数据完整性；9，选择性报告；10，其他偏倚。

Note: 1, Random sequence generation; 2, Baseline characteristics; 3, Allocation concealment; 4, Housing condition; 5, Investigator blinding; 6, Random outcome assessment; 7, Outcome assessor blinding; 8, Data integrity; 9, Selective reporting; 10, Other bias.

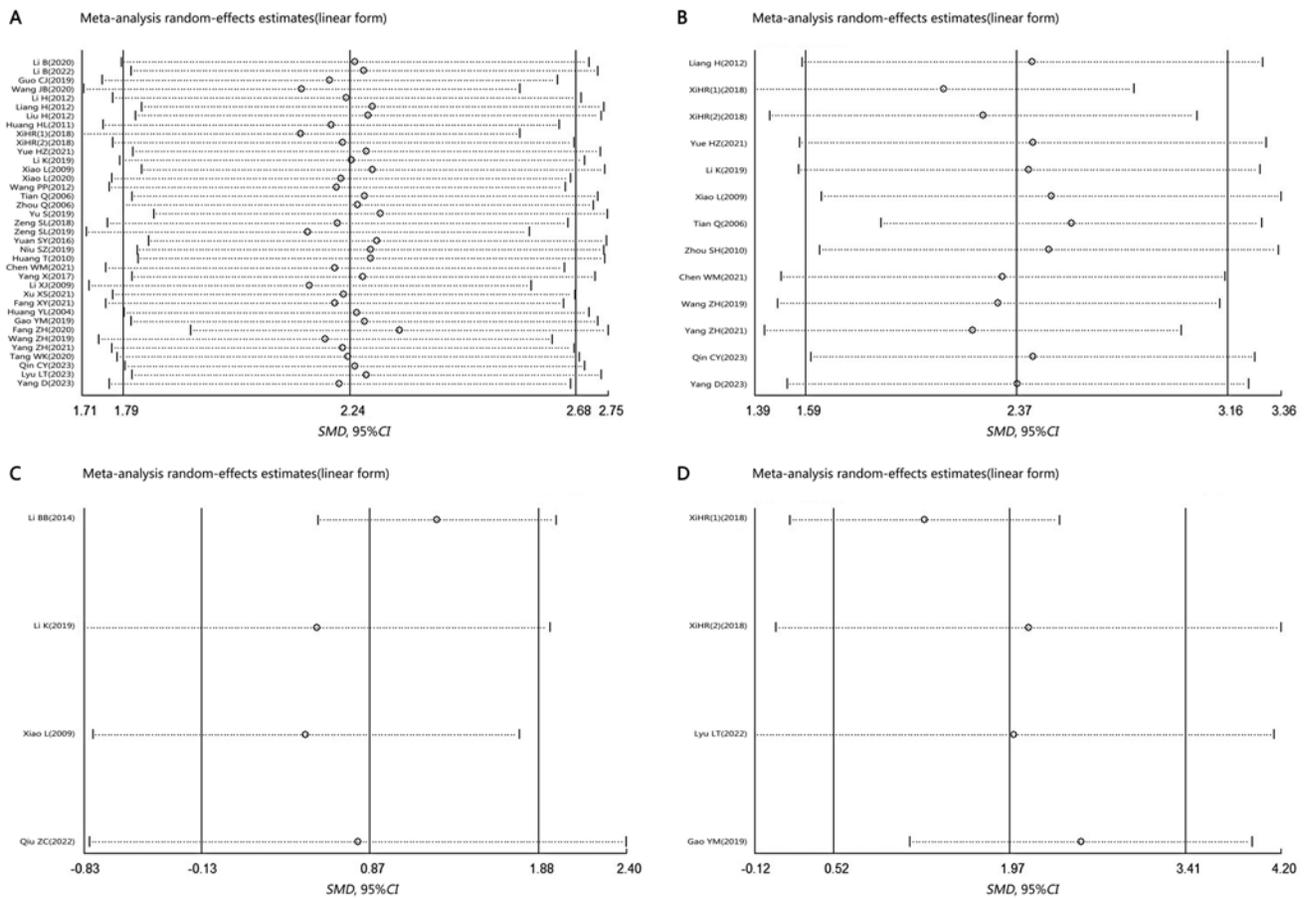


注: A, 股骨; B, 腰椎骨; C, 胫骨; D, 全身。

Note: A, Femur; B, Lumbar spine; C, Tibia; D, Whole body.

图2 葛根素对大鼠和小鼠各部位骨密度作用的森林图

Figure 2 Forest plot of the effects of puerarin on bone mineral density at various parts in rats and mice



注：A，股骨；B，腰椎骨；C，胫骨；D，全身。SMD，标准化均数差；95%CI，95%置信区间。

Note: A, Femur; B, Lumbar spine; C, Tibia; D, Whole body. SMD, Standardized mean difference; 95% CI, 95% confidence interval.

图3 葛根素对大鼠和小鼠骨密度作用的敏感性分析

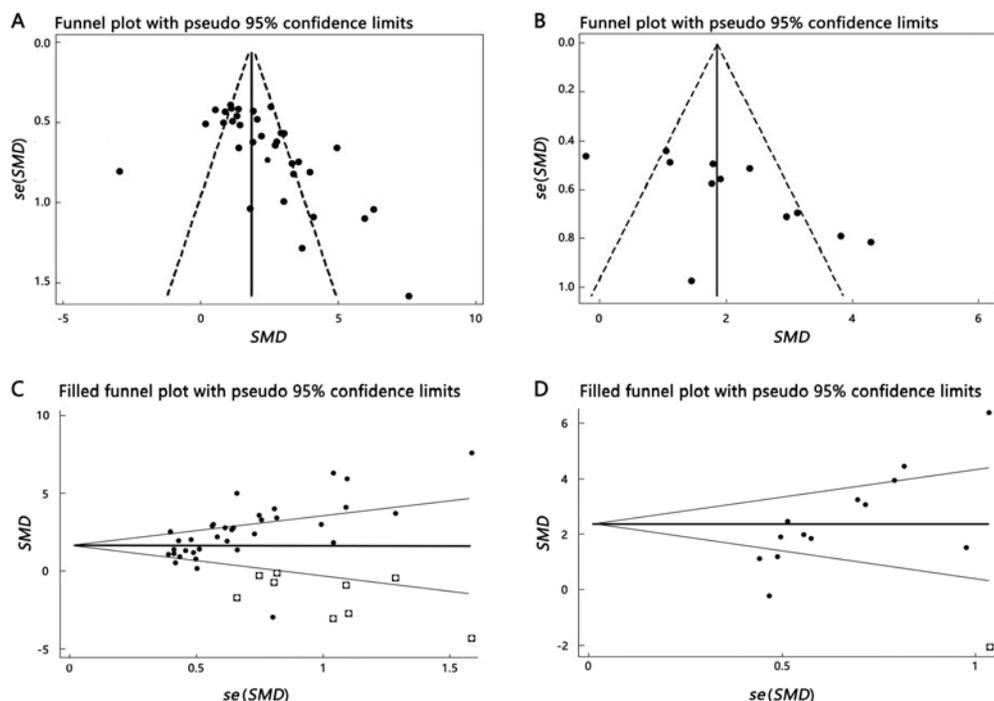
Figure 3 Sensitivity analysis of the effects of puerarin on bone mineral density in rats and mice

平，促进基质矿化等，加速成骨细胞的增殖、分化和成熟^[3,53-54]；同时，葛根素也抑制破骨细胞活化和骨吸收能力，减少骨量的丢失^[41,49]。关于葛根素的具体作用通路，目前尚不清楚，相关研究提示：葛根素通过NO/cGMP、MEK/ERK、PI3K/Akt、ER、p38 MAPK、Wnt/ β -catenin等信号途径诱导成骨细胞的增殖和分化^[55-56,31]；葛根素通过NF- κ B/RANKL、TRAF6/ROS/MAPK/NF- κ B和Akt/LPS信号途径抑制破骨细胞生成^[17,41,57]；葛根素通过阻断整合素 β 3-Pyk2/Src/Cbl通路，阻止破骨细胞活化^[49]。关于葛根素防治骨质疏松的分子机制，仍然需要更多的有力证据来证实。

虽然本研究显示葛根素能够提高大鼠和小鼠的骨密度水平，但是相关的临床研究证据较少。个别临床研究报道，葛根素与骨吸收抑制剂阿仑膦酸钠联合用药可治疗妇女绝经后的骨质疏松，其效果优于单用阿仑膦酸钠^[58-60]。目前还没有更多的有关葛根素单药治

疗骨质疏松的临床研究，也没有葛根素与经典抗骨质疏松药物（如雌激素、骨吸收抑制剂）的疗效比较、头对头研究。葛根素治疗骨质疏松疾病的临床有效性有待进一步验证。

为了进一步明确葛根素对骨密度的影响，本研究针对动物体内研究文献开展了此项Meta分析。根据分析结果可见，葛根素对大鼠和小鼠具有提高骨密度的作用，包括四肢骨、脊椎和全身骨量，尤其改善股骨和腰椎骨密度的效果更明显。亚组分析结果显示，葛根素使用后改善大鼠和小鼠股骨、腰椎骨密度的疗效，在去卵巢骨质疏松模型上并不优于未造模小鼠，提示葛根素可能对绝经后骨质疏松的疗效并不十分突出。将葛根素与双膦酸盐等抗骨质疏松药物疗效进行头对头比较，将会是一项有意义的研究。此外，亚组分析的结果也提示了一些有趣的信息：葛根素对大鼠和小鼠骨密度的改善效果在给药方式和药物来源方面有差



注：A 股骨密度漏斗图，B 腰椎骨密度漏斗图，C 股骨减补漏斗图，D 腰椎减补漏斗图。SMD，标准化均数差；se，标准误。

Note: A, Funnel plot of bone mineral density at femur; B, Funnel plot of bone mineral density at lumbar spine; C, Filled funnel plot at femur; D, Filled funnel plot at lumbar spine. SMD, Standardized mean difference; se, Standard error.

图4 葛根素对大鼠和小鼠骨密度作用的相关研究文献发表偏倚检验

Figure 4 Publication bias test of related research studies on the effects of puerarin on bone density in rats and mice

异，葛根素皮下注射的效果劣于口服给药和腹腔注射，高纯度的葛根素药物单体的疗效优于葛根素注射液；在每天 >50 mg/kg 的给药剂量下，葛根素对腰椎骨密度的改善作用无统计学意义，而且每天 >50 mg/kg 的治疗剂量对股骨密度的改善并不明显优于每天 ≤ 50 mg/kg 的治疗剂量。

本研究存在一些局限性。第一，纳入的研究间存在着较高的异质性。本研究试图采用 Meta 回归分析和亚组分析从疗程、造模方法、葛根素剂量、给药方法和葛根素试剂等因素查找异质性的来源，却未能成功。第二，纳入研究的方法学质量不高。纳入文献中动物研究的随机序列产生方法、分配隐藏、盲法等关键信息均不清楚，可能存在选择偏倚和测量偏倚。第三，研究结果存在发表偏倚。股骨和腰椎骨密度分析的漏斗图明显不对称，减补以后得到的股骨密度效应量低于原始值，说明目前纳入的研究可能高估了葛根素对骨密度的作用效果。笔者推测发表偏倚存在的可能原因有：本研究纳入文献中小样本量研究居多；存在基于发表时间—效应量间的研究偏倚；纳入研究仅 3 篇为阴性结果，阳性结果更容易发表。

综上所述，现有研究提示，与对照组相比，葛根素能够显著改善大鼠和小鼠的骨密度。本研究可以为葛根素防治骨质疏松症的临床研究提供良好的参考。但是需要指出，目前的研究数量和质量都有欠缺，还需要更多高质量、大样本的研究纳入分析。

[作者贡献 Author Contribution]

胡锦涛负责数据合成分析，撰写初稿；
韩菁婕和金旻负责筛查文献，数据提取，文献质量评价；
胡滨负责文献筛选和质量评价结果仲裁；
娄月芬负责确定文章主题和设计，审核并修改文稿。

[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]

- 李斌斌, 于世凤. 葛根素调控骨代谢的体外实验研究[J]. 北京大学学报(医学版), 2003, 35(1): 74-77. DOI: 10.19723/j.issn.1671-167x.2003.01.022.
LI B B, YU S F. Effect of puerarin on the bone metabolism *in vitro*[J]. J Beijing Med Univ, 2003, 35(1): 74-77. DOI: 10.19723/j.issn.1671-167x.2003.01.022.
- TIYASATKULKOVIT W, CHAROENPHANDHU N, WONGDEE K, et al. Upregulation of osteoblastic differentiation marker

表3 葛根素对股骨密度作用的亚组分析

Table 3 Subgroup analysis of the effects of puerarin on bone mineral density at femur

分组 Group	纳入研究/篇 Included studies/piece	动物数量/只 Animal quantity (n)	I^2 值 /square	效应模型 Effect model	效应量 Effect size	效应量(95%CI) Effect size (95% confidence interval)	P值 P value
给药方式 Types of administration							
口服 Oral	18	397	75	随机效应	SMD	2.30 (1.73, 2.88)	<0.001
皮下注射 Hypodermic injection	13	327	86	随机效应	SMD	1.68 (0.90, 2.45)	<0.001
腹腔注射 Intraperitoneal injection	6	100	71	随机效应	SMD	2.57 (1.43, 3.70)	0.004
给药剂量 Dosage							
≤20 mg/kg	15	296	75	随机效应	SMD	2.00 (1.35, 2.64)	<0.001
20 ~ 50 mg/kg	23	476	80	随机效应	SMD	2.23 (1.65, 2.80)	<0.001
> 50 mg/kg	6	104	89	随机效应	SMD	2.29 (0.29, 4.28)	0.020
治疗周期 Therapy period							
≤8 weeks	22	487	83	随机效应	SMD	2.11 (1.50, 2.72)	<0.001
> 8 weeks	18	353	70	随机效应	SMD	2.06 (1.53, 2.58)	<0.001
动物模型 Animal model							
未造模 Blank model	3	64	88	随机效应	SMD	3.21 (0.93, 5.49)	0.006
去卵巢 Ovariectomized	30	693	79	随机效应	SMD	1.90 (1.45, 2.35)	<0.001
其他模型 Other models	4	67	69	随机效应	SMD	3.28 (1.79, 4.77)	<0.001
葛根素来源 Source of puerarin							
单体成分 Monomer component	18	396	77	随机效应	SMD	2.36 (1.76, 2.96)	<0.001
药品注射剂 Drug injection	15	344	85	随机效应	SMD	1.86 (1.11, 2.61)	<0.001
其他 Others	4	84	64	随机效应	SMD	1.93 (0.87, 2.99)	<0.001

注: SMD, 标准化均数差。

Note: SMD, Standardized mean difference.

表4 葛根素对腰椎骨密度作用的亚组分析

Table 4 Subgroup analysis of the effects of puerarin on bone mineral density at lumbar spine

分组 Group	纳入研究/篇 Included studies/piece	动物数量/只 Animal quantity (n)	I^2 值 /square	效应模型 Effect model	效应量 Effect size	效应量(95%CI) Effect size (95% confidence interval)	P值 P value
给药方式 Types of administration							
口服 Oral	6	122	80	随机效应	SMD	2.76 (1.58, 3.93)	<0.001
皮下注射 Hypodermic injection	5	114	86	随机效应	SMD	1.85 (0.53, 3.17)	0.006
腹腔注射 Intraperitoneal injection	2	35	6	固定效应	SMD	2.14 (1.24, 3.04)	<0.001
给药剂量 Dosage							
≤20 mg/kg	7	119	84	随机效应	SMD	1.87 (1.37, 2.37)	<0.001
20 ~ 50 mg/kg	7	140	87	随机效应	SMD	1.85 (1.39, 2.31)	<0.001
> 50 mg/kg	2	34	40	固定效应	SMD	0.68 (-0.24, 1.60)	0.150
治疗周期 Therapy period							
≤8 weeks	8	169	85	随机效应	SMD	1.91 (1.48, 2.34)	<0.001
> 8 weeks	5	102	71	随机效应	SMD	1.73 (1.24, 2.22)	<0.001
动物模型 Animal model							
未造模 Blank model	2	44	69	随机效应	SMD	4.83 (2.54, 7.13)	<0.001
去卵巢 Ovariectomized	10	207	76	随机效应	SMD	1.85 (1.11, 2.60)	<0.001
其他模型 Other models	1	20	/	/	/	1.90 (0.80, 2.99)	<0.001
葛根素来源 Source of puerarin							
单体成分 Monomer component	6	128	89	随机效应	SMD	2.60 (1.05, 4.14)	0.001
药品注射剂 Drug injection	6	123	66	随机效应	SMD	2.20 (1.34, 3.05)	<0.001
其他 Others	1	20	/	/	/	1.12 (0.16, 2.08)	0.020

注: SMD, 标准化均数差。

Note: SMD, Standardized mean difference.

- mRNA expression in osteoblast-like UMR106 cells by puerarin and phytoestrogens from *Pueraria mirifica*[J]. *Phytomedicine*, 2012, 19(13): 1147-1155. DOI: 10.1016/j.phymed.2012.07.010.
- [3] SHAN Z M, CHENG N, HUANG R, et al. Puerarin promotes the proliferation and differentiation of MC3T3-E1 cells via microRNA-106b by targeting receptor activator of nuclear factor- κ B ligand[J]. *Exp Ther Med*, 2018, 15(1): 55-60. DOI: 10.3892/etm.2017.5405.
- [4] TIYASATKULKOVIT W, MALAIVIJITNOND S, CHAROENPHANDHU N, et al. *Pueraria mirifica* extract and puerarin enhance proliferation and expression of alkaline phosphatase and type I collagen in primary baboon osteoblasts[J]. *Phytomedicine*, 2014, 21(12): 1498-1503. DOI: 10.1016/j.phymed.2014.06.019.
- [5] WANG N, WANG X L, CHENG W X, et al. Puerarin promotes osteogenesis and inhibits adipogenesis *in vitro*[J]. *Chin Med*, 2013, 8(1):17. DOI: 10.1186/1749-8546-8-17.
- [6] LI H, CHEN B P, PANG G F, et al. Anti-osteoporotic activity of puerarin 6"-O-xyloside on ovariectomized mice and its potential mechanism[J]. *Pharm Biol*, 2016, 54(1):111-117. DOI: 10.3109/13880209.2015.1017885.
- [7] LEE M R, KIM B, LEE Y J, et al. Ameliorative effects of *Pueraria lobata* extract on postmenopausal symptoms through promoting estrogenic activity and bone markers in ovariectomized rats[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2021, 2021:7924400. DOI: 10.1155/2021/7924400.
- [8] ZHOU G N, AN Z P, ZHAO W J, et al. Sex differences in outcomes after stroke among patients with low total cholesterol levels: a large hospital-based prospective study [J]. *Biol Sex Differ*, 2016, 7:62. DOI: 10.1186/s13293-016-0109-3.
- [9] GUO C J, XIE J J, HONG R H, et al. Puerarin alleviates streptozotocin (STZ)-induced osteoporosis in rats through suppressing inflammation and apoptosis via HDAC1/HDAC3 signaling[J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 115: 108570. DOI: 10.1016/j.biopha.2019.01.031.
- [10] KULCZYŃSKI B, GRAMZA-MICHAŁOWSKA A, SULIBURSKA J, et al. Puerarin—an isoflavone with beneficial effects on bone health[J]. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2021, 26(12):1653-1667. DOI: 10.52586/5058.
- [11] HOOIJMANS C R, ROVERS M M, DE VRIES R B M, et al. SYRCLE's risk of bias tool for animal studies[J]. *BMC Med Res Methodol*, 2014, 14:43. DOI: 10.1186/1471-2288-14-43.
- [12] LI B, LIU M Y, WANG Y, et al. Puerarin improves the bone micro-environment to inhibit OVX-induced osteoporosis via modulating SCFAs released by the gut microbiota and repairing intestinal mucosal integrity[J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 132: 110923. DOI: 10.1016/j.biopha.2020.110923.
- [13] LI B, WANG Y, GONG S Q, et al. Puerarin improves OVX-induced osteoporosis by regulating phospholipid metabolism and biosynthesis of unsaturated fatty acids based on serum metabolomics[J]. *Phytomedicine*, 2022, 102: 154198. DOI: 10.1016/j.phymed.2022.154198.
- [14] LI B B, LIU H, JIA S N. Puerarin enhances bone mass by promoting osteoblastogenesis and slightly lowering bone marrow adiposity in ovariectomized rats[J]. *Biol Pharm Bull*, 2014, 37(12):1919-1925. DOI: 10.1248/bpb.b14-00513.
- [15] 覃成禹, 周昊楠, 陈远明. 葛根素对绝经后骨质疏松大鼠不同部位骨骼的抗骨质疏松作用差异的研究[J]. *中华老年骨科与康复电子杂志*, 2023, 9(1):23-27. DOI: 10.3877/cma.j.issn.2096-0263.2023.01.005.
- QIN C Y, ZHOU H N, CHEN Y M. The difference of anti-osteoporosis effect of Puerarin on different parts of bone in postmenopausal osteoporosis rats[J]. *Chin J Geriatr Orthop Rehabil Electron Ed*, 2023, 9(1):23-27. DOI: 10.3877/cma.j.issn.2096-0263.2023.01.005.
- [16] 杨砥, 关智宇. 葛根素基于 PPAR- γ /Axin2/Wnt 信号通路对去卵巢骨质疏松大鼠的干预作用[J]. *中国老年学杂志*, 2023, 43(13): 3228-3232. DOI: 10.3969/j.issn.1005-9202.2023.13.041.
- YANG D, GUAN Z Y. Intervention of puerarin on ovariectomized osteoporosis rats based on PPAR- γ /Axin2/wnt signal pathway[J]. *Chin J Gerontol*, 2023, 43(13): 3228-3232. DOI: 10.3969/j.issn.1005-9202.2023.13.041.
- [17] 王国波, 罗波, 苟印尧, 等. 葛根素联合雌二醇对大鼠骨质疏松性骨折愈合的影响[J]. *中国临床药理学杂志*, 2020, 36(14):2052-2055. DOI: 10.13699/j.cnki.1001-6821.2020.14.039.
- WANG G B, LUO B, GOU Y R, et al. Effect of puerarin combined with estradiol on the healing of osteoporotic fracture in rats[J]. *Chin J Clin Pharmacol*, 2020, 36(14):2052-2055. DOI: 10.13699/j.cnki.1001-6821.2020.14.039.
- [18] 李海, 王金花, 黄海玲, 等. 葛根素联合雌二醇对去卵巢大鼠骨质疏松的治疗作用[J]. *中国老年学杂志*, 2012, 32(18):3950-3952. DOI: 10.3969/j.issn.1005-9202.2012.18.039.
- LI H, WANG J H, HUANG H L, et al. Effect of Puerarin combined estradiol on ovariectomized osteoporosis[J]. *Chin J Gerontol*, 2012, 32(18):3950-3952. DOI: 10.3969/j.issn.1005-9202.2012.18.039.
- [19] 梁恒, 邝志强, 王攀攀, 等. 葛根素通过 BMP-2 调节去卵巢大鼠骨代谢[J]. *广州医学院学报*, 2012, 40(3):1-4.
- LIANG H, KUANG Z Q, WANG P P, et al. Puerarin regulates bone metabolism via bone morphogenic protein-2 in ovariectomized rats[J]. *Acad J Guangzhou Med Coll*, 2012, 40(3):1-4.
- [20] 刘浩, 李斌斌. 葛根素预防雌激素缺乏性骨质疏松的机制探讨 [J]. *中国比较医学杂志*, 2012, 22(6):16-20. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7856.2012.06.005.
- LIU H, LI B B. Effect of puerarin on the osteoporosis resulted from ovariectomy in rats[J]. *Chin J Comp Med*, 2012, 22(6):16-20. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7856.2012.06.005.
- [21] 黄海玲, 李海, 王金花, 等. 雌激素与不同剂量的葛根素联合对去卵巢大鼠骨质疏松的影响[J]. *中国妇幼保健*, 2011, 26(33):5228-5231.
- HUANG H L, LI H, WANG J H, et al. Effect of estradiol combined with different doses of puerarin on osteoporosis of ovariectomized rats[J]. *Matern Child Health Care China*, 2011, 26(33):5228-5231.
- [22] 蒯慧荣, 李文苑, 杨芳芳, 等. 中药葛根素对青年大鼠峰值骨量的

- 影响研究[J]. 中国骨质疏松杂志, 2018, 24(4):514-519. DOI: 10.3969/j.issn.1006-7108.2018.04.019.
- XI H R, LI W Y, YANG F F, et al. Effect of Puerarin on peak bone mass in young rats[J]. Chin J Osteoporos, 2018, 24(4): 514-519. DOI: 10.3969/j.issn.1006-7108.2018.04.019.
- [23] 蒽慧荣, 杨芳芳, 高玉海, 等. 葛根素和白藜芦醇对青年大鼠峰值骨量的影响研究[J]. 中国骨伤, 2018, 31(7):635-641. DOI: 10.3969/j.issn.1003-0034.2018.07.010.
- XI H R, YANG F F, GAO Y H, et al. Resveratrol and puerarin on peak bone mass in young rats[J]. China J Orthop Traumatol, 2018, 31(7):635-641. DOI: 10.3969/j.issn.1003-0034.2018.07.010.
- [24] 岳海振, 蔡军, 马新强, 等. 葛根素对绝经后骨质疏松大鼠骨代谢、骨密度及骨生物力学的影响[J]. 中国骨质疏松杂志, 2021, 27(1):77-81. DOI: 10.3969/j.issn.1006-7108.2021.01.017.
- YUE H Z, CAI J, MA X Q, et al. Effect of puerarin on bone metabolism, bone mineral density, and bone biomechanics in postmenopausal osteoporosis rats[J]. Chin J Osteoporos, 2021, 27(1):77-81. DOI: 10.3969/j.issn.1006-7108.2021.01.017.
- [25] 李凯, 秦荣, 邵佳乐, 等. 葛根素对废用性骨质疏松大鼠模型的防治作用及机制研究[J]. 中国中药杂志, 2019, 44(3):535-540. DOI: 10.19540/j.cnki.cjcmm.20181012.003.
- LI K, QIN R, SHAO J L, et al. Preventive effect and mechanism of puerarin on rat models of disuse osteoporosis[J]. China J Chin Mater Med, 2019, 44(3): 535-540. DOI: 10.19540/j.cnki.cjcmm.20181012.003.
- [26] 李凯, 高玉海, 王玺, 等. 葛根素对尾吊大鼠发生废用性骨质疏松的防治作用[J]. 中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志, 2019, 12(1):50-57. DOI: 10.3969/j.issn.1674-2591.2019.01.007.
- LI K, GAO Y H, WANG X, et al. Effects of puerarin on prevention of disuse osteoporosis in hindlimb suspension rats[J]. Chin J Osteoporos Bone Miner Res, 2019, 12(1):50-57. DOI: 10.3969/j.issn.1674-2591.2019.01.007.
- [27] 肖兰, 李靖. 有氧运动配合葛根素对去卵巢大鼠骨密度、血清细胞因子和骨代谢相关生化指标的影响[J]. 西安体育学院学报, 2009, 26(5):575-579, 601. DOI: 10.3969/j.issn.1001-747X.2009.05.017.
- XIAO L, LI J. Effect of exercise training and puerarin on bone mineral density, cytokine, bone metabolism index in ovariectomized rats[J]. J Xi'an Phys Educ Univ, 2009, 26(5): 575-579, 601. DOI: 10.3969/j.issn.1001-747X.2009.05.017.
- [28] XIAO L, ZHONG M D, HUANG Y, et al. Puerarin alleviates osteoporosis in the ovariectomy-induced mice by suppressing osteoclastogenesis via inhibition of TRAF6/ROS-dependent MAPK/NF- κ B signaling pathways[J]. Aging, 2020, 12(21):21706-21729. DOI: 10.18632/aging.103976.
- [29] 吕立桃, 范卫闯, 白彦彦, 等. 葛根素对糖尿病性骨质疏松小鼠骨密度及氧化应激的影响[J]. 新中医, 2022, 54(21):7-12. DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2022.21.002.
- LYU L T, FAN W C, BAI D Y, et al. Effect of puerarin on bone mineral density and oxidative stress in mice with diabetic osteoporosis[J]. N Chin Med, 2022, 54(21):7-12. DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2022.21.002.
- [30] 吕立桃, 范卫闯. 葛根素对去卵巢大鼠骨代谢平衡的影响[J]. 西部中医药, 2023, 36(7):27-30. DOI: 10.12174/j.issn.2096-9600.2023.07.06.
- LYU L T, FAN W C. Influence of puerarin on bone metabolic equilibrium in ovariectomized rats[J]. West J Tradit Chin Med, 2023, 36(7):27-30. DOI: 10.12174/j.issn.2096-9600.2023.07.06.
- [31] WANG P P, ZHU X F, YANG L, et al. Puerarin stimulates osteoblasts differentiation and bone formation through estrogen receptor, p38 MAPK, and Wnt/ β -catenin pathways [J]. J Asian Nat Prod Res, 2012, 14(9):897-905. DOI: 10.1080/10286020.2012.702757.
- [32] 田泉, 汤旭磊, 白孟海, 等. 葛根素对去卵巢大鼠骨质疏松和血脂的作用[J]. 中华老年医学杂志, 2006, 25(7):543-545. DOI: 10.3760/j.issn:0254-9026.2006.07.023.
- TIAN Q, TANG X L, BAI M H, et al. Effects of puerarin on osteoporosis and blood lipids in ovariectomized rats[J]. Chin J Geriatr, 2006, 25(7):543-545. DOI: 10.3760/j.issn:0254-9026.2006.07.023.
- [33] 周强, 付庭斌. 葛根素对去卵巢大鼠骨质疏松性骨折愈合的促进作用[J]. 中国临床康复, 2006, 10(27):45-47.
- ZHOU Q, FU T B. Effect of puerarin on the healing of osteoporotic fracture in ovariectomized rats[J]. Chin J Clin Rehabil, 2006, 10(27):45-47.
- [34] 遇实, 李庆辉, 王婧, 等. 葛根素联合雌激素对PMOP大鼠治疗作用及机制实验研究[J]. 黑龙江医药科学, 2019, 42(4):213-215, 217.
- YU S, LI Q H, WANG J, et al. Experimental study on therapeutic effect and mechanism of puerarin combined with estrogen on PMOP rats[J]. Heilongjiang Med Pharm, 2019, 42(4):213-215, 217.
- [35] 周胜虎, 刘兴炎, 王湘辉, 等. 葛根素对卵巢切除大鼠血清E2、腰椎BMD及骨髓细胞IL-6 mRNA表达的影响[J]. 中国骨质疏松杂志, 2010, 16(12):946-948. DOI: 10.3969/j.issn.1006-7108.2010.12.011.
- ZHOU S H, LIU X Y, WANG X H, et al. Effects of puerarin on the level of serum E2, bone mineral density of the lumbar vertebrae, and the mRNA expression of interleukin 6 in ovariectomized rats[J]. Chin J Osteoporos, 2010, 16(12):946-948. DOI: 10.3969/j.issn.1006-7108.2010.12.011.
- [36] 曾锁林, 施熊兵. 葛根素对去势雌性大鼠骨质疏松症及PI3K/AKT信号转导通路的影响[J]. 河北医药, 2018, 40(23):3566-3569. DOI: 10.3969/j.issn.1002-7386.2018.23.010.
- ZENG S L, SHI X B. Effects of puerarin on osteoporosis and PI3K/AKT signaling pathway in ovariectomized female rats[J]. Hebei Med J, 2018, 40(23):3566-3569. DOI: 10.3969/j.issn.1002-7386.2018.23.010.
- [37] 曾锁林, 施熊兵, 刘异. 葛根素对激素性股骨头坏死大鼠骨组织及PI3K/Akt信号转导通路的影响[J]. 蚌埠医学院学报, 2019, 44(11):1441-1444. DOI: 10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2019.11.002.
- ZENG S L, SHI N B, LIU Y. Effect of puerarin on the bone tissue and PI3K/Akt signal transduction pathway in rats with femoral head osteonecrosis induced by hormone[J]. J Bengbu Med Coll, 2019, 44(11):1441-1444. DOI: 10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2019.11.002.
- [38] YUAN S Y, SHENG T, LIU L Q, et al. Puerarin prevents bone loss in ovariectomized mice and inhibits osteoclast formation *in vitro*[J]. Chin J Nat Med, 2016, 14(4):265-269. DOI:

- 10.1016/S1875-5364(16)30026-7.
- [39] 牛士贞, 牛通, 倪勇, 等. 葛根素注射液联合雌二醇注射液对大鼠骨质疏松性骨折愈合的影响[J]. 中国临床药理学杂志, 2019, 35(23):3077-3080. DOI: 10.13699/j.cnki.1001-6821.2019.23.034. NIU S Z, NIU T, NI Y, et al. Effect of puerarin injection combined with estradiol injection on healing of osteoporotic fracture in rats[J]. Chin J Clin Pharmacol, 2019, 35(23):3077-3080. DOI: 10.13699/j.cnki.1001-6821.2019.23.034.
- [40] 黄彤, 金邦荃, 孙桂菊, 等. 葛根素对去卵巢大鼠骨密度和骨强度的改善[J]. 现代预防医学, 2010, 37(20):3894-3896. HUANG T, JIN B Q, SUN G J, et al. Effects of puerarin on osteoporosis of ovariectomized rats[J]. Mod Prev Med, 2010, 37(20):3894-3896.
- [41] TANG W K, XIAO L, GE G R, et al. Puerarin inhibits titanium particle-induced osteolysis and RANKL-induced osteoclastogenesis via suppression of the NF- κ B signaling pathway[J]. J Cell Mol Med, 2020, 24(20):11972-11983. DOI: 10.1111/jcmm.15821.
- [42] 陈文明, 胡芯源. 葛根素联合阿仑膦酸钠对绝经后骨质疏松大鼠氧化应激、炎症反应及骨代谢的影响[J]. 中国骨质疏松杂志, 2021, 27(1): 73-76, 100. DOI: 10.3969/j.issn.1006-7108.2021.01.016. CHEN W M, HU X Y. Effect of puerarin combined with alendronate on oxidative stress, inflammation reaction, and bone metabolism in postmenopausal osteoporotic rats[J]. Chin J Osteoporos, 2021, 27(1):73-76, 100. DOI: 10.3969/j.issn.1006-7108.2021.01.016.
- [43] YANG X, YANG Y, ZHOU S, et al. Puerarin stimulates osteogenic differentiation and bone formation through the ERK1/2 and p38-MAPK signaling pathways[J]. Curr Mol Med, 2018, 17(7):488-496. DOI: 10.2174/1566524018666171219101142.
- [44] 李旭炯, 张翠英. 葛根素对去卵巢大鼠骨密度及血清IL-6的影响[J]. 长治医学院学报, 2009, 23(1):13-15. DOI: 10.3969/j.issn.1006-0588.2009.01.005. LI X J, ZHANG C Y. Effects of puerarin on bone mineral density and IL-6 in ovariectomized rats[J]. J Changzhi Med Coll, 2009, 23(1): 13-15. DOI: 10.3969/j.issn.1006-0588.2009.01.005.
- [45] 许晓山, 庞正宝, 杨军, 等. 葛根素治疗去卵巢小鼠骨量丢失的疗效及对RANKL/RANK/OPG信号通路的影响[J]. 浙江医学, 2021, 43(5): 471-474, 481. DOI: 10.12056/j.issn.1006-2785.2021.43.5.2020-2134. XU X S, PANG Z B, YANG J, et al. Effect of puerarin on bone loss in ovariectomized mice and its effect on RANKL/RANK/OPG signaling pathway[J]. Zhejiang Med J, 2021, 43(5): 471-474, 481. DOI: 10.12056/j.issn.1006-2785.2021.43.5.2020-2134.
- [46] 方晓燕, 李海, 顾建忠, 等. 山茶籽与葛根素对去卵巢大鼠骨质疏松的防治作用比较[J]. 中国老年学杂志, 2021, 41(2):343-345. DOI: 10.3969/j.issn.1005-9202.2021.02.034. FANG X Y, LI H, GU J Z, et al. Comparison of effects of camellia seed and puerarin on osteoporosis in ovariectomized rats[J]. Chin J Gerontol, 2021, 41(2): 343-345. DOI: 10.3969/j.issn.1005-9202.2021.02.034.
- [47] 黄廷玲, 石凤英. 葛根素对去卵巢大鼠骨密度和骨代谢生化指标的影响[J]. 中国临床康复, 2004, 8(12):2307-2309. HUANG Y L, SHI F Y. Effects of puerarin on the bone mineral density and biochemical markers of bone metabolism in ovariectomized rats[J]. Chin J Clin Rehabil, 2004, 8(12):2307-2309.
- [48] 高玉海, 杨芳芳, 游丽娟, 等. 淫羊藿苷与葛根素的复方药对生长期大鼠峰值骨量的影响[J]. 中华内分泌代谢杂志, 2019, 35(2): 148-152. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1000-6699.2019.02.011. GAO Y H, YANG F F, YOU L J, et al. Effects of compound medicine of icariin and puerarin on peak bone mass in growing rats[J]. Chin J Endocrinol Metab, 2019, 35(2):148-152. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1000-6699.2019.02.011.
- [49] QIU Z C, LI L, HUANG Y Y, et al. Puerarin specifically disrupts osteoclast activation via blocking integrin- β 3 Pyk2/Src/Cbl signaling pathway[J]. J Orthop Translat, 2022, 33:55-69. DOI: 10.1016/j.jot.2022.01.003.
- [50] 方志辉, 张天锋. 葛根素对骨质疏松大鼠成骨细胞增殖和活性的影响及其作用机制[J]. 广西医学, 2020, 42(20):2680-2684. DOI: 10.11675/j.issn.0253-4304.2020.20.16. FANG Z H, ZHANG T F. Effect of puerarin on osteoblast proliferation and activity and its action mechanism in rats with osteoporosis[J]. Guangxi Med J, 2020, 42(20):2680-2684. DOI: 10.11675/j.issn.0253-4304.2020.20.16.
- [51] 王振昊, 林涨源. 葛根素联合锌治疗去势大鼠骨质疏松症的实验研究[J]. 中华全科医学, 2019, 17(9):1450-1453. DOI: 10.16766/j.cnki.issn.1674-4152.000967. WANG Z H, LIN Z Y. Experimental study on treatment of osteoporosis with puerarin and zinc in ovariectomized rats[J]. Chin J Gen Pract, 2019, 17(9):1450-1453. DOI: 10.16766/j.cnki.issn.1674-4152.000967.
- [52] 杨占华, 郝连升, 张建新. 葛根素对骨质疏松大鼠氧化应激反应、骨代谢和骨密度的影响[J]. 中国骨质疏松杂志, 2021, 27(3):413-417. DOI: 10.3969/j.issn.1006-7108.2021.03.020. YANG Z H, HAO L S, ZHANG J X. Effects of puerarin on oxidative stress response, bone metabolism, and bone mineral density in osteoporotic rats[J]. Chin J Osteoporos, 2021, 27(3):413-417. DOI: 10.3969/j.issn.1006-7108.2021.03.020.
- [53] YANG Y R, CHEN D Y, LI Y L, et al. Effect of Puerarin on Osteogenic Differentiation *in vitro* and on New Bone Formation *in vivo*[J]. Drug Des Devel Ther, 2022, 16: 2885-2900. DOI: 10.2147/DDDT.S379794.
- [54] 周昊楠, 陈远明. 葛根素防治绝经后骨质疏松症的研究进展[J]. 广西医学, 2019, 41(7):878-883. DOI: 10.11675/j.issn.0253-4304.2019.07.20. ZHOU H N, CHEN Y M. Research progress of puerarin in prevention and treatment of postmenopausal osteoporosis [J]. Guangxi Med J, 2019, 41(7): 878-883. DOI: 10.11675/j.issn.0253-4304.2019.07.20.
- [55] LV H H, CHE T J, TANG X L, et al. Puerarin enhances proliferation and osteoblastic differentiation of human bone marrow stromal cells via a nitric oxide/cyclic guanosine monophosphate signaling pathway[J]. Mol Med Rep, 2015, 12(2):2283-2290. DOI: 10.3892/mmr.2015.3647.
- [56] WANG Y, WANG W L, XIE W L, et al. Puerarin stimulates

- proliferation and differentiation and protects against cell death in human osteoblastic MG-63 cells via ER-dependent MEK/ERK and PI3K/Akt activation[J]. *Phytomedicine*, 2013, 20(10):787-796. DOI: 10.1016/j.phymed.2013.03.005.
- [57] ZHANG Y, YAN M, YU Q F, et al. Puerarin prevents LPS-induced osteoclast formation and bone loss via inhibition of Akt activation[J]. *Biol Pharm Bull*, 2016, 39(12):2028-2035. DOI: 10.1248/bpb.b16-00522.
- [58] 罗琳. 葛根素联合阿仑膦酸钠治疗绝经后骨质疏松症的效果观察[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2018, 24(7):930-933, 943. DOI: 10.3969/j.issn.1006-7108.2018.07.019.
- LUO L. Observation on the effect of puerarin combined with alendronate in the treatment of postmenopausal osteoporosis[J]. *Chin J Osteoporos*, 2018, 24(7):930-933, 943. DOI: 10.3969/j.issn.1006-7108.2018.07.019.
- [59] 彭诗洁. 葛根素配合阿仑膦酸钠治疗绝经后骨质疏松症的效果观察[J]. *西南国防医药*, 2019, 29(5):543-546. DOI: 10.3969/j.issn.1004-0188.2019.05.010.
- PENG S J. Observation on the effect of Puerarin combined with alendronate sodium in the treatment of postmenopausal osteoporosis[J]. *Med J Natl Defending Forces Southwest China*, 2019, 29(5): 543-546. DOI: 10.3969/j.issn.1004-0188.2019.05.010.
- [60] 申彦菊, 沈亚非. 葛根素联合阿仑膦酸钠对绝经后骨质疏松症患者骨密度的影响[J]. *北方药学*, 2019, 16(7):93-94. DOI: 10.3969/j.issn.1672-8351.2019.07.065.
- SHEN Y J, SHEN Y F. Effect of puerarin combined with alendronate on bone mineral density in postmenopausal osteoporosis patients[J]. *J N Pharm*, 2019, 16(7):93-94. DOI: 10.3969/j.issn.1672-8351.2019.07.065.
- (收稿日期: 2023-09-14 修回日期: 2024-02-07)
(本文编辑: 张俊彦, 富群华, 丁宇菁, 陆佳雯)

【引用本文】

胡锦涛, 韩菁婕, 金旻, 等. 葛根素对大鼠和小鼠骨密度影响的 Meta 分析[J]. *实验动物与比较医学*, 2024, 44(2): 149-161. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2023.127.

HU J H, HAN J J, JIN M, et al. Effects of puerarin on bone density in rats and mice: a Meta-analysis[J]. *Lab Anim Comp Med*, 2024, 44(2): 149-161. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2023.127.

《实验动物与比较医学》出版伦理声明

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

1. 所有来稿必须是作者的原创作品, 如文中使用先前发表的观点和数据等应准确引用, 如使用图片和表格则需要提供相关的版权及许可证明。

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

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

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

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

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

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

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

9. 所有来稿若涉及学术不端行为 (《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



杨文, 博士, 研究员。本科毕业于复旦大学, 之后在加拿大 McGill 大学获得博士学位, 并于哈佛大学医学院完成博士后研究工作, 2017 年入职上海交通大学医学院。一直致力于线粒体代谢与衰老相关疾病关系的分子机制研究, 重点关注线粒体蛋白稳态在细胞代谢、细胞器互作以及衰老及其相关疾病中的作用。近年来得到国家自然科学基金面上项目、重点课题、重大研究计划和国家高层次人才项目的基金资助共 4 项。主要研究成果包括发现翻译后水平的线粒体膜电势差通过 SIRT3 调控代谢稳态的新机制, 发现线粒体过氧化物自由基通过凋亡相关途径延缓线虫衰老、通过直接氧化修饰调节蛋白翻译和整合应激反应等的有益作用, 开发人工养殖玻璃海鞘作为新型衰老研究模式生物等。在 *Cell*、*Aging Cell*、*PLoS Biology*、*Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*、*Theranostics*、*Advanced Healthcare Materials*、*Molecular Therapy: Nucleic Acids*、*Cell Death and Diseases* 等学术期刊上以第一作者或通信作者发表论文 20 余篇。参与撰写书籍《铁死亡》(科学出版社)、《医学遗传学基础与进展》(研究生教材, 科学出版社) 和 *Introductory Review on Sirtuins in Biology, Aging, and Disease* (Elsevier 出版)。获得授权专利 2 项。

郑媛, 理学博士, 助理研究员。长期从事海洋生物离体细胞研究平台的构建及其应用研究工作。自 2018 年以来, 主要专注于玻璃海鞘人工养殖品系的构建, 并尝试应用于衰老生物学机制的探究; 目前, 已成功培育出可在全人工环境下稳定繁育的玻璃海鞘品系, 并获得了其全基因组信息, 为进一步开展该动物模型的生物学基础研究奠定了坚实基础。此外, 主持完成 1 项国家博士后基金和 1 项国家自然科学基金原创类项目, 并参与 3 个海洋生物相关课题(包括国家 973 项目和 863 高技术计划)的研究工作。作为第一作者或共同作者发表论文 6 篇, 并参与发表 2 篇; 其中 SCI 论文 7 篇。此外, 获得 2 项国家发明专利, 并参编 1 项国家标准。



玻璃海鞘作为模式生物的优势及其应用

李睿琪, 段涵, 甘罗, 郑媛, 杨文

(上海交通大学医学院基础医学院, 上海 200025)

[摘要] 随着实验生物学的持续发展, 常用模式生物的应用局限日益凸显。由于实验动物和人类的相关研究之间存在差异, 严重影响到动物实验研究结果的转化应用。本文介绍了一种在进化上与脊椎动物亲缘关系最近的无脊椎动物, 同时也是脊椎动物的姊妹分支——尾索动物玻璃海鞘 (*Ciona intestinalis*)。本综述通过总结近年来玻璃海鞘在各领域的研究进展, 说明其作为新型模式生物具有的优势与巨大应用前景。玻璃海鞘的研究进展主要包括: (1) 玻璃海鞘全基因组测序完成并建立了许多相关数据库, 多种胚胎基因编辑技术已经在玻璃海鞘中成功应用, 使玻璃海鞘成为易于遗传学操作且能够直观研究目的基因功能和相互作用的动物模型。(2) 神经生物学领域, 玻璃海鞘具有与脊椎动物相似的中枢神经系统组织结构且拥有众多同源神经肽和激素分子, 使其在研究内分泌与神经内分泌相关分子的作用机制、功能进化方面具有优越性。同时, 玻璃海鞘幼虫对光刺激的敏感性与习惯性可用于探索行为可塑性相关机制。(3) 免疫学领域, 玻璃海鞘已有成熟的固有免疫系统, 并进化出部分适应性免疫系统相关基因的前体, 加之编码免疫相关基因较简单, 故而可以作为免疫领域研究较理想的模式生物。(4) 发育生物学领域, 众多研究聚焦玻璃海鞘的脊索发育过程和其中的表达调控机制, 提示脊索动物共同的进化发育策略。另外有关心脏发育方向的研究则对人类心脏发育基因网络的理解做出重要贡献。(5) 医学领域中, 玻璃海鞘的神经复合体和虹吸管具有再生能力, 以及心脏在严重损伤后仍然可以存活并恢复收缩功能, 使得玻璃海鞘可作为研究再生问题和心脏受损的动物模型。同时玻璃海鞘作为阿尔茨海默病的研究模型在新药开发方面也有其独特优势。此外, 玻璃海鞘的完整生

[基金项目] 国家自然科学基金项目“基于玻璃海鞘 (*Ciona intestinalis*) 的衰老对心肌细胞凋亡作用初步研究”(31900377)

[第一作者] 李睿琪(2001—), 女, 临床医学八年制在读, 研究方向: 临床医学。E-mail: lrq.seven@sjtu.edu.cn。ORCID: 0009-0004-1379-0555;

段涵(2002—), 女, 临床医学八年制在读, 研究方向: 临床医学。E-mail: dhhhh020606@sjtu.edu.cn。ORCID: 0009-0006-6080-0896

[通信作者] 杨文(1979—), 男, 博士, 研究员, 研究方向: 线粒体代谢与衰老。E-mail: yangwen@shsmu.edu.cn。ORCID: 0000-0002-2032-1982;

郑媛(1979—), 女, 博士, 助理研究员, 研究方向: 玻璃海鞘实验动物模型的构建及其在衰老生物学研究中的应用。E-mail: zhengyuan@shsmu.edu.cn。ORCID: 0009-0007-6016-548X

命周期仅5个月左右,便于用其观察记录衰老全过程,探索不同因子的衰老效应。总之,本综述旨在说明玻璃海鞘作为模式动物具有独特的优越性并且有望在更多的科学研究方面发挥重要作用。

[关键词] 玻璃海鞘; 模式生物; 神经生物学; 免疫学; 发育生物学

[中图分类号] Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2024)02-0162-18



Advantages of *Ciona intestinalis* as a Model Organism and Its Applications

LI Ruiqi, DUAN Han, GAN Luo, ZHENG Yuan, YANG Wen

(Shanghai Jiao Tong University College of Basic Medicine Sciences, Shanghai 200025, China)

Correspondence to: YANG Wen (ORCID: 0000-0002-2032-1982), E-mail: yangwen@shsmu.edu.cn;

ZHENG Yuan (ORCID: 0009-0007-6016-548X), E-mail: zhengyuan@shsmu.edu.cn

[ABSTRACT] With the continuous development of experimental biology, the limitations of commonly utilized model organisms are becoming increasingly apparent. Discrepancies between research conducted on laboratory animals and humans significantly impede the translational application of findings derived from animal experiments. This review introduces ascidian *Ciona intestinalis* as a novel model organism, an invertebrate that is evolutionarily closest to vertebrates and is a sister group to vertebrates. The review summarizes recent research progress on *Ciona intestinalis* in various fields to illustrate the significant advantages and promising application prospects of it as a model organism. The research progress outlined in the review mainly encompasses: (1) The whole-genome sequencing of *Ciona intestinalis* has been determined and numerous related databases have been established. Various embryonic gene editing technologies have been successfully applied, making it an animal model easy to manipulate genetically and study the functions and interactions of target genes visually. (2) In the field of neurobiology, *Ciona intestinalis* boasts a central nervous system structure similar to that of vertebrates and possesses numerous homologous neuropeptides and hormone molecules. These features grant it an edge in exploring the mechanisms and functional evolution of endocrine and neuroendocrine-related molecules. Additionally, the sensitivity and habituation of its larvae to light stimulation provide an avenue for exploring mechanisms related to behavioral plasticity. (3) In the field of immunology, *Ciona intestinalis* possesses a mature innate immune system and has evolved precursor genes to the adaptive immune system, with a relatively simple coding of immune-related genes. These features make it an exemplary model organism for immunological studies. (4) In the field of developmental biology, many studies have focused on the notochord development process in *Ciona intestinalis* and the regulatory mechanisms of gene expression within it, indicating common evolutionary developmental strategies among chordates. Additionally, insights into its heart development also significantly enhance our comprehension on the genetic network of human heart development. (5) In medical research, the ability of *Ciona intestinalis* to regenerate its neural complex and siphon, as well as the resilience of its heart to recover contractile function from substantial damage, renders it a valuable animal model for the study of regeneration and heart injury. It also has unique advantages as a research model for Alzheimer's disease and new drug development. Furthermore, its brief five-month lifespan facilitates the observation and recording of the entire aging process and the exploration of the effects of various factors on aging. In summary, this review aims to demonstrate that *Ciona intestinalis* stands out as a model organism with unique attributes and is expected to play a significant role in a wider range of scientific research areas.

[Key words] *Ciona intestinalis*; Model organism; Neurobiology; Immunology; Developmental biology

在现代生物学领域的研究中,模式生物是揭示具有普遍规律的生命现象的载体。常用的模式生物包括

线虫、果蝇、小鼠、斑马鱼等。其中,线虫匹配到的人类同源基因可靠性不强,果蝇与人类同源基因相似

性较差;而在实际应用中,小鼠也存在诸多不足,如饲养成本较高、生命周期较长、配对繁殖过程相对复杂等问题。

模式动物玻璃海鞘 (*Ciona intestinalis*) 和脊椎动物同属于脊索动物门。作为脊椎动物的姊妹分支,玻璃海鞘的胚胎透明、发育快,而且幼虫具有脊索结构,这使得其成为研究胚胎发育、脊索发育的良好模型。玻璃海鞘成体具有与脊椎动物相似的器官组织构成,其基因组构成与人类等脊椎动物相比有较高的相似性,并且更为紧凑。这些特点使得玻璃海鞘逐渐成为发育生物学研究的重要模型。玻璃海鞘还具有一定的组织器官再生能力,并且寿命较短,因此该模型也在再生研究中得到应用。目前,随着前期研究的积累以及组学技术的应用,该动物模型各个器官发育的细胞谱系信息、染色体水平的精细基因组、基因表达谱等基础生物学信息数据已近于完善,且有成熟的基因编辑技术可供应用,使得玻璃海鞘用于开展生命科学研究具有较强的可操作性。但是,迄今为止,由于人工养殖的玻璃海鞘群体存活率和性成熟比例较低,该动物的

实验材料依赖于采集天然野生个体,而采集野生个体所带来的地域局限性和较高的遗传背景多态性严重限制了该动物模型的应用和推广。因此,亟须培育可在实验室内连续稳定繁殖传代的玻璃海鞘人工养殖品系,以用作实验材料。下文将综述无脊椎动物玻璃海鞘的生物学特点和组织结构,总结并叙述其作为模式动物独特的优势以及在众多领域中的应用研究进展。

1 玻璃海鞘简介

1.1 进化地位

玻璃海鞘属于脊索动物门尾索动物亚门海鞘纲玻璃海鞘属。近年来已经陆续完成了包括玻璃海鞘在内的几种尾索动物和以文昌鱼 (*Branchiostoma floridae*) 为代表的几种头索动物的基因组测序^[1]。基于这些物种的基因组和蛋白质组数据对比,尾索动物被认为是与脊椎动物在进化上亲缘关系最近的无脊椎动物^[2](图1)。因此,玻璃海鞘所在的尾索动物也被称为是脊椎动物的姊妹分支。

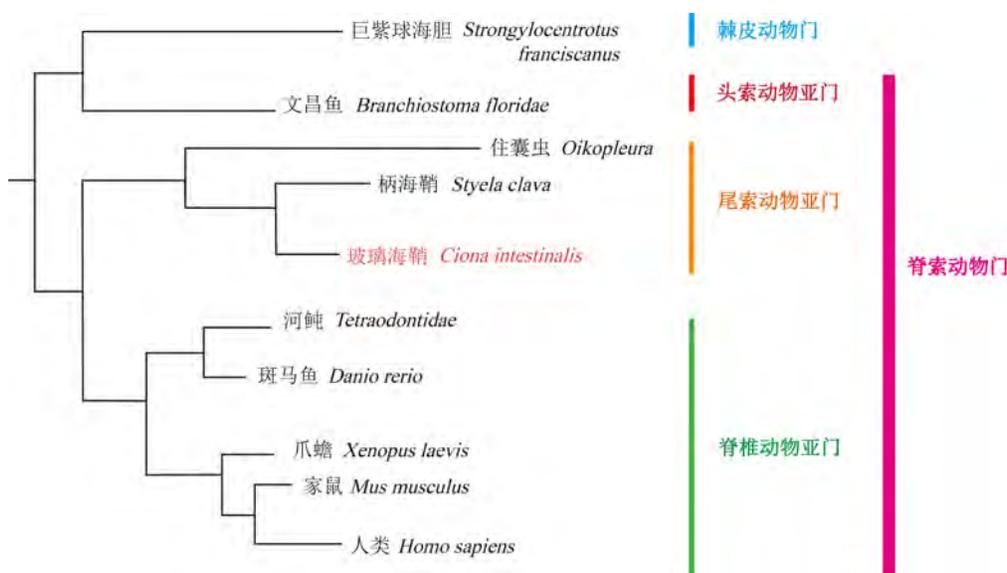


图1 从系统进化树看玻璃海鞘的进化地位

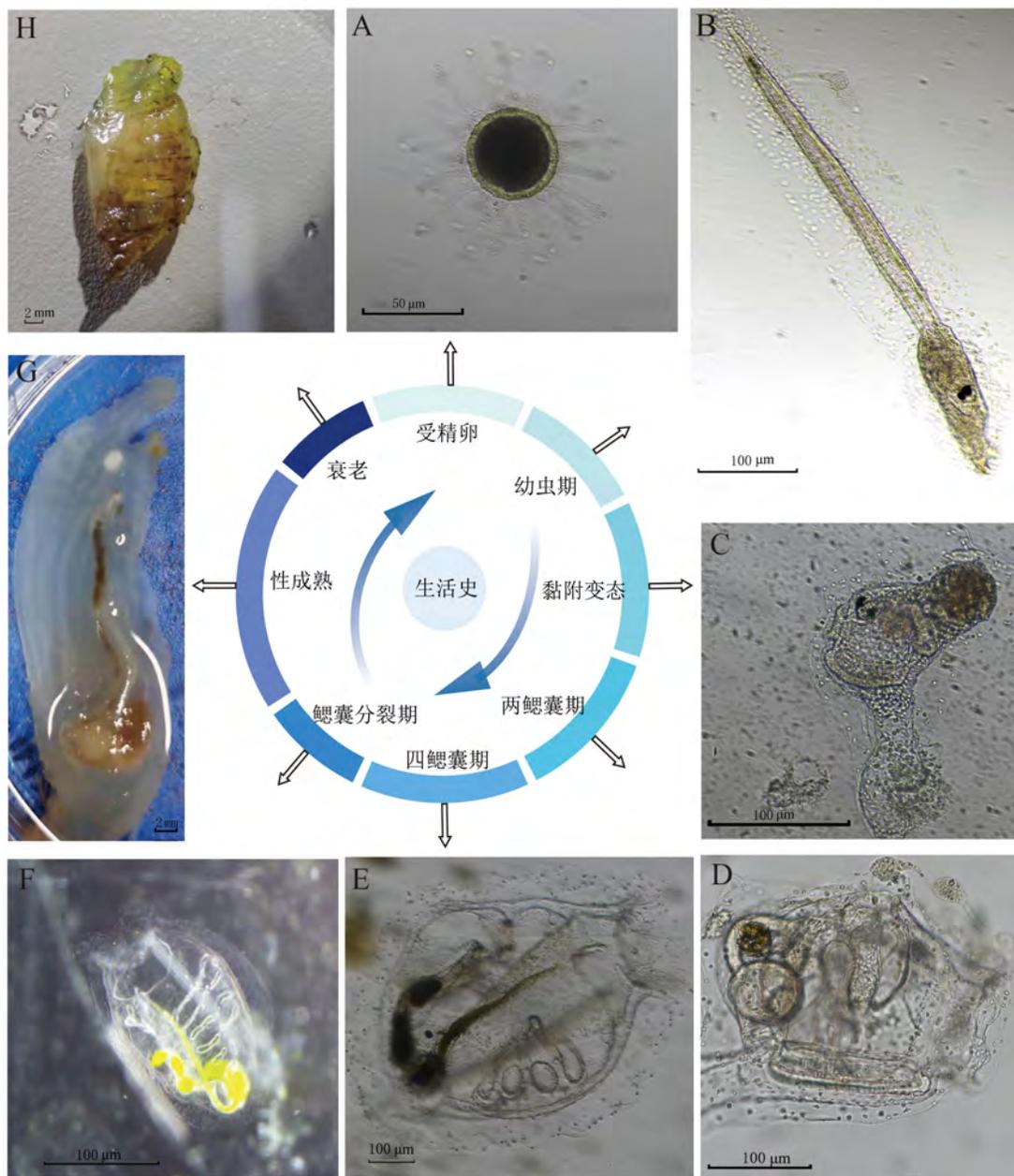
Figure 1 Evolutionary status of *Ciona intestinalis* in the phylogenetic tree

1.2 生物学特征

玻璃海鞘成体固着于自然或者人工基质中生活,雌雄同体,自交或杂交均存在。玻璃海鞘的受精卵以及胚胎透明(图2A),成体结构简单。玻璃海鞘的生长发育过程中,先由卵裂球发育成为蝌蚪状幼虫(图

2B),幼虫可以在水环境中自由游动1~5 d,然后经变态后成为稚体(图2C~D),稚体经生长发育为成体,并逐渐衰老(图2E~H)。

玻璃海鞘幼虫有6种组织,包括表皮、间充质(mesenchyme)、内胚层(endoderm)、肌肉组织、脊索



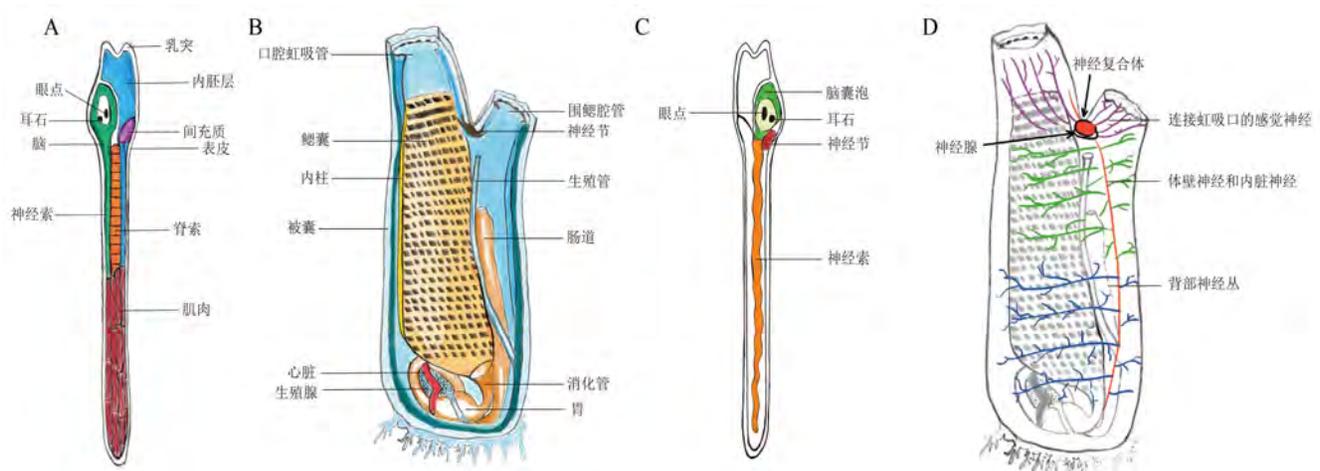
注：A, 受精卵 (标尺: 50 μm); B, 贴壁的幼虫 (标尺: 100 μm); C, 变态期稚体 (标尺: 100 μm); D, 二鳃囊期稚体 (标尺: 100 μm); E, 四鳃囊期稚体 (标尺: 100 μm); F, 鳃囊分裂期稚体 (标尺: 100 μm); G, 性成熟成体 (标尺: 2 mm); H, 衰老成体 (标尺: 2 mm)。
 Note: A, Fertilized egg (scale bar: 50 μm); B, Attached larva (scale bar: 100 μm); C, Juvenile during metamorphosis (scale bar: 100 μm); D, Two-branched sac stage larva (scale bar: 100 μm); E, Four-branched sac stage larva (scale bar: 100 μm); F, Juvenile during branchial sac division (scale bar: 100 μm); G, Sexually mature adult (scale bar: 2 mm); H, Aged adult (scale bar: 2 mm).

图2 玻璃海鞘生活史

Figure 2 Life history of *Ciona intestinalis*

和中枢神经系统 (图3A)。幼虫自由游动, 并对光有敏感性。成体外表类似于桶状, 最外层有被囊覆盖, 被囊表面有结节状突起 (tubercular prominences) 生长, 另有口腔虹吸管 (oral siphon) 和围鳃腔管 (atrial siphon) 与外界相通, 用于吸入食物以及排出代谢物。内部结构有心脏、鳃囊 (branchial sac)、内柱

(endostyle)、消化管 (oesophagus)、胃 (stomach)、肠道 (intestine)、生殖腺 (gonad)、生殖管 (gonoduct) 和神经节 (neural ganglion) 等, 以及位于口腔虹吸管和围鳃腔管末端的橙色的感觉器官——口腔虹吸管色素器官 (oral siphon pigment organs, OPOs) 和心房虹吸管色素器官 (atrial siphon pigment organs, APOs) (图3B)。



注: A, 幼虫结构示意图, 6种幼虫组织分别为内胚层(蓝色)、间充质(紫色)、中枢神经系统(绿色)、脊索(橙色)、肌肉(红棕色)以及最外层的表皮; B, 成体内部结构示意图, 中枢神经系统包括感觉囊泡(脑, 其中包括眼点和耳石等感觉器官)、神经索和神经节; C, 幼虫神经系统的示意图; D, 成体的神经系统示意图。

Note: A, Schematic diagram of larval structure depicting six tissues: the endoderm (blue), mesenchyme (purple), central nervous system (green), notochord (orange), muscle (reddish-brown), and the outermost layer of epidermis; B, Schematic diagram of the adult's internal structure, showing the central nervous system consisting of sensory vesicles (the brain, which includes sensory organs such as ocellus and otolith), nerve cords, and ganglia; C, Schematic diagram of the larval central nervous system; D, Schematic diagram of the adult central nervous system.

图3 玻璃海鞘幼虫及成体的结构示意图和中枢神经系统示意图

Figure 3 Structural diagrams and central nervous system diagrams of *Ciona intestinalis* larva and adult

2 玻璃海鞘作为模式生物的优势

玻璃海鞘作为模式生物的优势体现在许多方面, 例如其基因组较小、与脊椎动物亲缘关系近、多个器官的组织结构与脊椎动物相似、生命周期相对短且易于实验室养殖与研究等。

2.1 胚胎发育快速, 成体较透明, 生命周期较短

玻璃海鞘的胚胎具有大而明确的细胞和细胞核、快速的有丝分裂周期和较少的细胞数量, 这些特点为应用复杂的实时成像方法开展细胞生物学研究提供了便利。2021年Treen等^[3]应用活的海鞘胚胎做了一项表达实验, 研究基因沉默后的抑制蛋白分布; 结果提示DNA模板作为抑制因子Hes凝聚物形成的支架, 限制了转录抑制因子在基因组不需要区域的分布。海鞘成体由于外覆被囊, 透明度下降; 但心脏、胃肠道、性腺等器官肉眼可见, 易于观察多种体征, 如心跳、胃肠消化过程、性腺发育过程等。这些体征数据可以更灵敏、精准地反映不同因素在海鞘上的作用效果。

另外, 玻璃海鞘的胚胎发育期短, 由卵裂球发育为幼虫用时仅需18 h (在18 °C下养殖)。成体海鞘的生命周期是4~5个月, 比小鼠、斑马鱼等经典模式动物的生命周期更短。性成熟个体的繁殖期约为2个月, 成体海鞘一生大约可产生数千个胚胎, 因此易在较短

时间内获得大量实验样本, 便于作为生物模型研究有关全生命周期的科学问题。

2.2 遗传构成与人类等脊椎动物的相似性高

玻璃海鞘的基因组测序工作在2002年已经完成, 并基于2018年的Hi-C数据, 基因组序列信息得到了进一步的完善^[4]。海鞘的基因组大概有123 Mb, 包含大约13 799个蛋白编码基因, 其中50%左右的基因可以在人类等其他脊椎动物中找到^[5]。脊椎动物的基因家族通常以简化形式存在于海鞘中。测序结果表明在目前所涉及的脊索实验动物中, 玻璃海鞘与脊椎动物的亲缘关系最近。借助完善的基因数据, 结合最新组装的一个高质量版本的基因/转录模型集^[6], 可以识别海鞘与包括小鼠、人等在内的已研究生物的同源基因, 有助于开展发育生物学和进化研究。同时, 海鞘基因组较小, 单拷贝, 基因组构成紧凑, 可以更简便地研究某些基因的功能和相互作用。

目前, 玻璃海鞘全基因组序列已公布, 可通过多个网站查询, 如<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/taxonomy/7719/>^[7]。还可利用Ensembl (<http://asia.ensembl.org/index.html>) 等网站将玻璃海鞘基因与人类或其他模式生物的基因组数据库进行比对, 寻找同源基因。表1总结了玻璃海鞘基因组相关的常用数据库, 可供参考。

表1 玻璃海鞘生物信息相关的数据库

Table 1 Genome-related databases of *Ciona intestinalis*

资源名称	网址	类型	主要内容
Resource names	Website	Type	Main content
Joint genome institute	https://genome.jgi.doe.gov/portal/	数据库	基因组
Ghost Database	http://ghost.zool.kyoto-u.ac.jp/cgi-bin/gb2/gbrowse/kh	数据库(日语)	基因组和cDNA
Aniseed genome browser	http://www.aniseed.cnrs.fr/	数据库	基因组
Smith research lab	http://labs.mcdb.ucsb.edu/smith/william	公众号	神经系统发育和功能
UniProt	https://www.uniprot.org/	数据库	蛋白质组
Ensemble	http://asia.ensemble.org	数据库	基因组
NCBI	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST/dbEST_summary.html	数据库	基因的时空表达信息
NBRP	http://nbrp.jp/	数据库(日语)	cDNA
Database of Tunicate Gene Regulation	http://dbtgr.hgc.jp/	数据库	组织特异性基因5'侧翼的顺式调控元件数据库
NCBI	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/	数据库	基因表达谱
Tefor	http://crispor.tefor.vet	数据库	CRISPOR引物在线设计
PrimerX	http://www.bioinformatics.org/primerx/cgi-bin/DNA_1.cgi	数据库	基因突变引物在线设计
EDomics	http://edomics.qnlm.ac/#/home	数据库	基因组和转录组等

2.3 相似的器官组织构成和较少的细胞数量

玻璃海鞘幼虫和成体的器官组织结构都与脊椎动物有很多相似性。玻璃海鞘的消化系统具有高度发达和分区化的肠道，在消化食物过程中，肠道菌群起着重要的辅助作用。玻璃海鞘的免疫系统虽然没有B细胞、T细胞等适应性免疫系统成分，但已经建立起用以抵御外界有害物质的稳定黏膜环境和固有免疫体系。目前研究人员已经确定玻璃海鞘肠道黏膜表面存在众多免疫相关分子，如Toll样受体(Toll-like receptor, TLR)、补体(complement)等^[8]。对于中枢神经系统，玻璃海鞘幼虫与其他脊椎动物在形态与发育方面有较强的相似性，并且已研究发现玻璃海鞘成体内含有40多种神经肽与肽激素^[9]。玻璃海鞘的循环系统是开放的，会周期性地改变心脏跳动的方向，从而改变全身血液的流动方向；这种周期性方向变化的机制仍未明确，但有可能与其心脏存在“自动中心”、交替工作和心脏收缩周期性逆转有关^[10]。玻璃海鞘成体的心脏是一个简单的V形管，由单层横纹肌细胞组成，被覆单层心包上皮^[11]。另外，玻璃海鞘的内柱被认为与脊椎动物的甲状腺同源，可以摄入碘并维持体内碘高浓度，产生甲状腺激素^[12]。

另外，玻璃海鞘细胞数量少。幼虫完全发育时只有6种组织，全部细胞数仅大约2500个，其中脊索仅有40个细胞，神经元大约有100个^[13]。因此，便于研究玻璃海鞘具体的发育过程并进行精细调控。

2.4 遗传操作的优势

玻璃海鞘的受精卵透明，易于遗传学操作。通过

显微注射和电穿孔可以将核酸(DNA、RNA)引入玻璃海鞘胚胎中，研究其器官的发育过程、体内蛋白的表达等；或者对玻璃海鞘胚胎的基因进行编辑，研究其基因的功能。目前，玻璃海鞘可在人工养殖体系中存活并进行传代，这为该动物模型的应用研究提供了保障。

目前，主要有4种基因编辑技术已经在玻璃海鞘中成功应用，分别为转录激活因子样效应物核酸酶(transcriptional activator-like effector nucleases, TALENs)技术、成簇规律间隔短回文重复序列(clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR)/CRISPR相关蛋白9(CRISPR-associated protein 9, Cas9)转基因编辑技术、吗啉基寡核苷酸(morpholino oligonucleotides)基因沉默技术和转座子转基因技术。

CRISPR/Cas9和TALENs被广泛用于海鞘遗传功能的研究。TALENs技术是通过构建有特异性的核酸酶蛋白，剪切DNA特定序列，实现基因编辑^[14]；该技术在2004年成功应用于海鞘纤维素合成酶(cellulose synthase)基因的剪切^[15]。CRISPR技术来源于原核生物免疫系统，可以识别和剪切特定基因^[16]。例如，最近有研究就应用CRISPR方法探究Tbx1/10-Ebf-Mrf网络在咽肌分化中的功能，以及Wnt-Tcf在心脏发育中的功能^[17]。相较于TALENs，CRISPR技术具有更高的精确性和可控性，且操作更简单，但会导致更多的非靶向基因敲除，即“脱靶效应”。此外，与TALENs比较，CRISPR/Cas9的突变率低。因此，对于组织特异性敲除，即使CRISPR/Cas9方法构建更容易，仍建议

使用TALENs技术^[17]。尽管后来出现了一种针对有效变异基因的优化的CRISPR/Cas9方法,而且构建CRISPR/Cas9比构建TALENs容易,但是使用优化的CRISPR/Cas9方法也不容易实现对玻璃海鞘的组织特异性敲除时,TALENs技术仍然非常有用^[17]。

吗啉基寡核苷酸可与靶序列结合,通过空间位阻效应,阻断蛋白质翻译过程,抑制目标基因的表达。在海鞘受精卵中注射吗啉基寡核苷酸可在海鞘发育成幼虫阶段时,抑制特定蛋白的表达^[18]。吗啉基寡核苷酸技术能较好地抵抗核酸酶的作用,不引起目标基因的mRNA降解,特异性好,但价格较高。该技术于2001年被证实可抑制海鞘内源、外源基因的表达,通过注释目的基因的mRNA可回补对应的吗啉基寡核苷酸的抑制效果,如 β -catenin mRNA能解除吗啉基的抑制作用。转座子通过携带特定基因并调控后者表达,向基因组引入外源基因;该技术于2010年成功应用于绿色荧光蛋白的表达^[19]。

向海鞘的卵或胚胎引入外源基因的技术主要有显微注射和电转2种。显微注射是经典且常用的核酸输送方式,也是最早被应用于海鞘的转基因技术。该技术可在体视镜下,通过显微针头注射,将核酸片段注入海鞘卵或胚胎中。显微注射仅需较小的核酸,且可以明确注射的位置和转入外源基因的量,确保以比电穿孔更少的镶嵌方式引入核酸;但是此方法操作难度较高且速度慢^[20]。电转是通过电穿孔使卵摄入外源质粒DNA,常用于研究发育过程中的基因调节。电转虽然可以同时很多卵进行操作,但需较大的核酸,且无法确定注射的位置和转入外源基因的量^[21]。同时,很多胚胎未实现外源基因整合,而在实现了外源基因整合的胚胎中,有很大一部分为嵌合胚胎,即胚胎中部分卵裂球实现了外源基因整合,但部分卵裂球并无外源基因整合,因此在观察表型之前,需要通过参考报告评估基因的表达水平,从而选择转基因嵌合性较低的动物个体^[17]。

3 玻璃海鞘作为模式生物的已有研究方向

作为脊椎动物的姊妹分支,玻璃海鞘具有与脊椎动物类似的器官组织结构且生命周期较短,可用作神经生物学、免疫学、发育生物学等研究方向的基础模型。

3.1 神经生物学

3.1.1 玻璃海鞘的神经系统构成

海鞘幼虫的中枢神经系统(central nervous system,

CNS)由感觉囊泡、神经节和神经索3部分组成(图3C)。类比人类的中枢神经系统,海鞘大脑就是感觉囊泡,其中包含耳石和单眼等感觉器官^[22]。神经节包括5对胆碱能神经元,其中有能够支配尾部肌肉的运动神经元^[23-24]。神经索沿着尾巴的背侧区域排布,其中包含4排室管膜细胞;神经元几乎不存在^[23]。在分子水平上对海鞘和脊椎动物的中枢神经系统进行比较后发现,海鞘幼虫中枢神经系统的组织结构与脊椎动物的组织结构非常相似。例如,脊椎动物的前脑和中脑对应海鞘的感觉囊泡;脊椎动物的中后脑组织边界(mid-hindbrain boundary, MHB)对应海鞘的神经节;脊椎动物的后脑和脊髓对应海鞘脊索^[25-26]。此外,海鞘幼虫的整合转录组/连接组脑图显示,其具有与脊椎动物下丘脑不同区域相关的几种细胞类型,包括乳状核、弓形核和大细胞神经元;并且对比转录组分析确定,海鞘幼虫有小鼠下丘脑不同区域神经元的同源细胞类型。这些观察结果为下丘脑先于脊椎动物大脑的进化提供了证据^[27]。所以,研究玻璃海鞘的神经系统发育、再生等方面内容可为开展脊椎动物的神经系统研究提供思路。

变态后的成体海鞘的神经系统由神经复合体、神经腺(图3D)、连接虹吸口的感觉神经、体壁神经、内脏神经以及背部神经丛组成,神经复合体和神经腺位于两个虹吸管之间的体壁上。位于神经复合体内的脑神经节包括了中枢神经系统的大部分神经细胞体。在这些成分中,脑神经节、背部神经和内脏神经形成背神经系统,被认为可以调节食物摄入、排泄和生殖等生物过程^[28]。这可以被认作是脊椎动物神经系统控制机体调节某些生物过程的原始程序,或者说是起始点。

3.1.2 玻璃海鞘幼虫神经系统的光行为

海鞘幼虫具有一系列的视觉运动行为,其中特征性行为模式包括向上游动的初始时期和向下游动或者下沉的时期。许多研究者注意到,光照会导致同一年龄段不同幼虫个体之间的运动行为有显著区别。研究表明,幼虫在接受反复光刺激后表现出不同的光行为,这些行为强烈依赖于光的强度和幼虫自身所处的发育阶段。这种差异是基于幼虫行为的敏感性(不同个体对不同强度光的敏感度)和习惯性(幼虫本身见到光会停止运动,在反复光刺激下,对光的响应逐渐减弱,最终见到光不会停止)而产生的。但是这种光行为只能产生在孵化4 h以上的幼虫身上,并且这种习惯性的

记忆大约只能保持 1 min^[29]。玻璃海鞘幼虫对光刺激的敏感性与习惯性提示其可以用来帮助了解短期和长期行为可塑性的细胞和生化基础,其具有的简单神经系统也可以被用于习惯化、致敏和经典条件反射的还原论分析。此外,玻璃海鞘拥有一种已知最简单的神经系统,这种简单性促进了将行为和神经回路联系起来的研究。研究发现,海鞘幼虫的两种不同的视觉运动行为,即隐现的阴影反应和负趋光性,是由不同的光感受器簇启动的独立神经回路介导后,投射到被称为脑后囊泡 (posterior brain vesicle, pBV) 的中枢神经系统结构所产生。pBV 汇集多个感觉系统的输入,这提示了 pBV 很可能是感觉整合与处理的场所,进一步支持了 pBV 和脊椎动物的脑之间共同起源的理论^[30]。

3.1.3 玻璃海鞘神经系统的神经肽、肽激素及同源体

在海鞘中,已经发现了 40 种神经肽、肽激素和几种同源受体。迄今为止,海鞘神经肽包括 4 类:第一类是脊椎动物肽的同源序列、受体及其信号通路,同源序列包含胆囊收缩素 (cholecystokinin, CCK)。第二类是脊椎动物肽的同系物或者雏形,例如促性腺激素释放激素 (gonadotropin-releasing hormone, GnRH)、速激肽 (tachykinin, TK)、胰岛素/松弛素 (insulin, INS/relaxin, RLX) 旁系同源物、降钙素 (calcitonin, CT) 和甘丙肽 (galanin, GAL),这些肽在原口动物中未被鉴定到。第三类多肽属于保守家族,但含有特异性的基本序列或活性,如 Ci-GnRH-X (一种结构相关的海鞘 GnRH 肽) 和海鞘血管升压素 (*Ciona* vasopressin, Ci-VP)。同源受体包括离子蛋白受体 (*Cionin* receptor, CioR)、促性腺激素释放激素受体 (GnRH receptor, GnRHR)、海鞘速激肽受体 (*Cionin*-TK receptor, Ci-TK-R) 和海鞘血管升压素受体 (Ci-VP-receptor, Ci-VP-R) 等。序列相似性和分子系统发育树证明海鞘的肽和受体与脊椎动物有着共同的祖先。第四类是通过肽表达谱鉴定到的新发现的海鞘特异性肽,特征是羧基端的氨基酸序列包含 YFV/Ls (Tyr-Phe-Val/Leu) 肽家族和 LF (Leu-Phe) 家族。这些肽及其前体与已知神经肽无序列同源性。因此,这些神经肽被认为是在海鞘特异的世系中逐渐形成的,可能在海鞘特异的功能中发挥作用。这些肽的受体尚未被确定^[31]。

作为脊椎动物的姊妹分支,玻璃海鞘不仅在研究各种生物过程内在的神经肽和激素分子机制方面有应

用优势,而且在研究内分泌、神经内分泌和神经系统的分子、功能进化和多样化上具有优越性。例如,海鞘速激肽 (Ci-TK) 可以通过激活若干蛋白酶诱导卵巢二期卵黄细胞的滤泡生长,从而上调卵母细胞的生长^[32];海鞘神经紧张素样肽 6 (*Ciona*-neurotensin-like peptide-6, Ci-NLTP-6) 下调海鞘卵黄卵母细胞生长,其生物学机制已被阐明^[33]。由于玻璃海鞘没有与脊椎动物垂体和产生分泌性类固醇激素相对应的器官,提示在脊椎动物进化获得垂体器官和分泌性类固醇激素之前,神经肽也许在共同祖先的卵巢滤泡发育中是主要的调节因子。海鞘神经肽能卵泡发育系统是整个脊索动物中保守的进化起源。高等的促性腺激素系统即下丘脑-垂体-性腺 (hypothalamus-pituitary-gonad axis, HPG) 轴,是随着垂体器官和相关垂体激素或性类固醇激素的获得而建立的。根据相关研究结果推测,玻璃海鞘已经进化出神经肽能 GnRH 直接调节卵巢的机制。这可能是脊椎动物 GnRH 能介导相关内分泌调节的前身,以及神经内分泌系统 (HPG 轴) 的前身^[9]。通常, GnRH 是脊椎动物生殖成熟所必需的,而 γ -氨基丁酸 (gamma aminobutyric acid, GABA) 是青春期下丘脑 GnRH 的重要兴奋性调节因子。2020 年 Hozumi 等^[34]通过研究海鞘变态,揭示了 GABA-GnRH 轴在脊索动物胚胎后发育调控中的另一个作用,即作为海鞘变态的关键调节因子;虽然 GABA 通常被认为是一种抑制性神经递质,但在海鞘变态中 GnRH 是 GABA 的下游神经肽, GABA 通过促代谢的 GABA 受体正向调节 GnRH 分泌。

3.2 免疫学

海鞘在脊椎动物免疫系统的进化中占有重要地位^[35]。海鞘有成熟的固有免疫系统。随着玻璃海鞘基因组序列的发布,目前可以基本排除海鞘存在适应性免疫;但是玻璃海鞘已进化出部分适应性免疫系统相关基因的前体,如原始的主要组织相容性复合体 (major histocompatibility complex, MHC)^[35],而且海鞘编码免疫相关基因相对简单^[36]。以上研究结果提示海鞘可以成为免疫领域研究中潜在的理想模式生物。

3.2.1 玻璃海鞘固有免疫系统

海鞘的咽部和肠道是最容易受到海洋环境微生物侵袭的身体结构,被认为是主要的免疫器官。已知源自体腔细胞或血细胞的吞噬活性在无脊椎和脊椎动物的固有免疫中发挥重要作用。海鞘的内部防御主要依靠在咽部血管中循环和在非血管的被囊基质中分散的

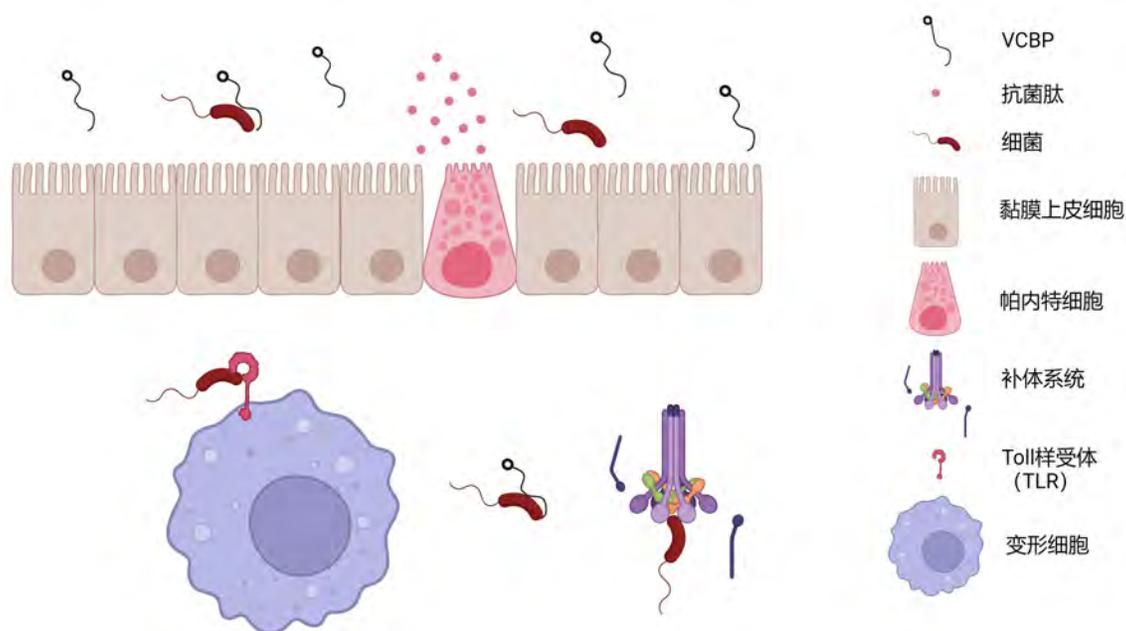
不同类型的血细胞、在血淋巴和咽中循环的血细胞，以及位于肠道固有层的血细胞完成，它们是感知自我或识别非自我的先天免疫能力的幕后主角^[37-38]。

先天免疫是所有后生动物门的特征，不同种类的分子作为种系编码受体发挥作用，可以识别出非常不同的分子结构。海鞘先天免疫系统的组成部分似乎与脊椎动物是共同的，提示在原脊索动物和脊椎动物的共同祖先中，至少已经存在一些与脊椎动物免疫有关的遗传回路^[37]。

玻璃海鞘固有免疫系统中的免疫分子同源物主要包括补体系统、Toll样受体和参与免疫反应的细胞内信号转导相关基因，并与脊椎动物比较表现出扩张和意想不到的多样性^[35,37]。同时，在具有免疫球蛋白超家族可变区-V结构域的基因中，海鞘具有文昌鱼含几丁质结合蛋白的可变区（variable region-containing chitin-binding proteins, VCBP）的同源物，即分泌免

疫球蛋白的含几丁质结合蛋白的可变区（*Ciona robusta* variable region-containing chitin-binding proteins, CrVCBPs），其两个N端V结构域与几丁质结合结构域相连，与脊椎动物的含V区抗体和T细胞抗原受体不同，CrVCBPs不经历体细胞重排，但可以表现出区域化的超多态性^[35,37]。作为免疫受体分子，VCBP在海鞘肠道稳态调节中发挥了重要作用，但它不存在于脊椎动物中^[37]。

海鞘体腔细胞具有调理素依赖性和非依赖性吞噬作用，具有6个整合素 α （integrin α ）基因和5个整合素 β （integrin β ）基因。免疫细胞主要包括变形细胞和帕内特细胞（图4）。有关海鞘免疫系统及其与人类免疫系统进化关系的比较分析见表2。从进化的视角看，海鞘的TLR、补体系统和跨膜信号转导基因均在进化上保守；尽管海鞘无适应性免疫系统，但其已进化出了部分适应性免疫系统相关分子的前体^[38]。



注：黏膜免疫包括黏膜上皮细胞分泌黏液，以及帕内特细胞分泌抗菌肽；固有免疫是由Toll样受体（TLR）、含几丁质结合蛋白的可变区（VCBP）和补体系统等机制介导变形细胞吞噬作用。

Note: Mucosal immunity includes the secretion of mucus by mucosal epithelial cells and the secretion of antimicrobial peptides by Paneth cells. The innate immunity is mediated by Toll-like receptors (TLR), variable region-containing chitin-binding proteins (VCBP), and the complement system, which facilitate the phagocytic activity of amoebocytes.

图4 玻璃海鞘的固有免疫系统对消化道的保护机制

Figure 4 Protective mechanism of the innate immune system to the digestive tract of *Ciona intestinalis*

哺乳动物基因组编码若干个TLR，每一个TLR负责检测对应的病原体相关分子。人类拥有9种亚型的TLR基因。通过细胞外富含亮氨酸的重复基序和细胞

内的Toll/IL-1R结构域鉴定到海鞘仅有3个TLR基因，仅编码2种亚型的TLR分子，即主要表达于海鞘消化道和血细胞中的TLR1和TLR2^[38]。小鼠的RP105蛋白

表2 海鞘免疫系统与人类免疫系统的比较

Table 2 Comparison of immune systems between *Ciona intestinalis* and human

免疫系统组成 Immune system composition	玻璃海鞘 <i>Ciona intestinalis</i>		人 <i>Homo sapiens</i>		进化差别 Evolutionary difference
	分子 Molecules	作用 Function	分子 Molecules	作用 Function	
免疫识别分子 Immune recognition molecules	TLR	介导免疫应答	TLR	介导免疫应答	人类TLR具有更多亚型 不存在同源分子
	凝集素	特异性结合糖蛋白	-	-	不存在同源分子
	酚氧化酶	杀死细菌,合成黑色素	-	-	不存在同源分子
	CrPxt	介导细胞-细胞,细胞-细胞外基质之间的黏附	-	-	
	CrPtx-like	参与体液免疫	C反应蛋白	参与固有免疫反应	同源
	补体系统分子C3、CFB、MASP等	调理作用、炎症反应	补体系统分子C3、CFB、MASP等	调理作用、炎症反应、溶解细胞	同源
细胞因子 Cytokine	TNF- α	参与细菌的免疫反应	TNF- α	识别病原体,激活NF- κ B	同源
	IL-17	介导抗真菌和细菌的保护性免疫	IL-17	介导抗真菌和细菌的保护性免疫,也与多种自身免疫性和慢性炎症性疾病相关	同源
	CiTGF- β	参与免疫应答,激活免疫细胞	hTGF- β	调节炎症过程	同源
组织重构与伤口愈合相关因子 Factors related to tissue remodeling and wound healing	MMP-9样分子	胚胎发生、组织重构、血管生成、伤口愈合	MMP-9	胚胎发生、组织重构、血管生成、伤口愈合	同源
	MIF	介导免疫反应	MIF	介导固有免疫和适应性免疫反应	同源
顺式调控元件 Cis-regulatory element	Cr8long、Cr8short	功能尚不明确	RTP	与嗅觉相关	同源
	CrCAP	免疫应答调控	GALT复合物	免疫应答调控	同源
抗菌肽 Antimicrobial peptide	Ci-MAM-A、Ci-PAP-A	参与初次免疫应答	-	-	不存在同源分子

注: TLR为Toll样受体; CrPxt为海鞘细胞黏附蛋白; CrPtx-like为海鞘的穿透素样组分; C3为补体C3; CFB为补体B因子; MASP为甘露聚糖结合蛋白-凝集素相关丝氨酸蛋白酶2; TNF- α 为肿瘤坏死因子 α ; IL-17为白细胞介素17; CiTGF- β 为海鞘转化生长因子- β ; hTGF- β 为人转化生长因子- β ; MMP-9为基质金属蛋白酶-9; MIF为巨噬细胞迁移抑制因子; RTP为受体转运蛋白家族; GALT复合物为干扰素(IFN)- γ 激活的翻译抑制复合物; Cr8long、Cr8short、CrCAP、Ci-MAM-A及Ci-PAP-A均为玻璃海鞘中发现的蛋白质或肽段的直接命名。

Note: TLR, Toll-like receptor; CrPxt, *Ciona peroxinectin*; CrPtx-like, Pentraxin-like component of *Ciona intestinalis*; C3, Complement C3; CFB, Complement factor B; MASP, Mannose-binding protein-associated serine protease; TNF- α , Tumor necrosis factor α ; IL-17, Interleukin-17; CiTGF- β , Transforming growth factor- β of *Ciona intestinalis*; hTGF- β , Human transforming growth factor- β ; MMP-9, Matrix metalloproteinase-9; MIF, Macrophage migration inhibitory factor; RTP, Receptor transporter protein family; GALT, Interferon (IFN)- γ -activated translational inhibitory complex; Cr8long, Cr8short, CrCAP, Ci-MAM-A, and Ci-PAP-A are named after proteins or peptides identified in *Ciona intestinalis*.

属于非典型的哺乳动物TLR家族成员,拥有多个LRR基序,缺少Toll/IL-1R结构域。在海鞘中鉴定到10个与RP105蛋白相似结构域基因^[35]。

人类的补体系统主要有调理作用、参与炎症反应和细胞溶解3种作用。海鞘的补体系统包括补体C3(complement 3)、FB(factor B)、甘露糖结合蛋白-凝集素相关丝氨酸蛋白酶[mannose-binding protein(MBP)-associated serine proteases, MASPs]、甘露聚

糖结合凝集素(mannan-binding lectin, MBL)、纤维胶凝蛋白(ficolin)、补体3受体的 α 和 β 链(the alpha and beta chain of the receptor of complement 3, CR3 α 和CR3 β)等,可发挥调理作用和介导炎症反应。包含的识别分子有MBP、ficolin和C1q(补体系统经典途径的识别分子)。哺乳动物的晚期补体组分在病原体细胞膜上形成膜攻击复合物(membrane attack complex, MAC),从而导致细胞溶解。这些MAC的组分和穿孔

素 (perforin) 具有特有的 MAC/perforin 结构域。虽然由于缺少补体 C6 (complement 6) 基因, 海鞘的补体系统不能引发细胞溶解^[35], 但是在海鞘中也发现了类似的结构域。值得注意的是, 所有的 C6 样基因都有相应的 EST 序列。系统发育分析表明 C6 样基因在海鞘谱系得到扩张。哺乳动物的补体系统包括调节子, 可抑制不需要的对抗自身细胞的补体激活。大多数的补体调节子由重复的 SCR 结构域组成, 在海鞘中其补体调节子也包含 132 个具有 SCR 结构域基因模型^[35]。

此外, 抗菌肽能抵御细菌、病毒、真菌的感染。海鞘的免疫系统中已发现 2 种抗菌肽, 即抵御微生物的海鞘分子 A (*Ciona*-molecule against microbes, Ci-MAM-A) 和海鞘假定的抗菌肽 A (*Ciona*-putative antimicrobial peptide, Ci-PAP-A)。这两种抗菌肽主要存在于被膜上和发生炎症反应的组织的粒细胞中^[39]。

3.2.2 适应性免疫系统

适应性免疫仅存在于有颌脊椎动物中, 可以通过重组机制产生特异性识别。免疫球蛋白和 T 细胞抗原受体作为介质, 其特异性会受到体细胞在可变 (V) 结构域的变异影响。玻璃海鞘缺乏在脊椎动物适应性免疫系统中发挥关键作用的重要基因, 但是根据分子进化相关研究, 玻璃海鞘含有与脊椎动物 MHC 抗原加工和/或呈现系统相关基因具有显著同源性的基因, 例如适应性免疫的关键基因 T 细胞受体、二聚体免疫球蛋白分子、MHC I 类和 II 类基因、参与 Ig 和 TCR 重排的 RAG1 和 RAG2、末端脱氧核苷酸转移酶 (将核苷酸添加到重新排列的 VDJ 元件中创造受体多样性), 以及 V 区亚基因元件 (编码 T 细胞和 Ig 抗原受体结构域)、VLR 样免疫受体元件等^[37]。另外, 在海鞘内还鉴定到一些可以与 C 型凝集素受体 (C-type lectin receptors, CLRs) 耦联的免疫受体酪氨酸基抑制基序 (immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif, ITIMs) 和免疫受体酪氨酸基激活基序 (immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif, ITAMs)^[35,37,40], 而 C 型凝集素受体在脊椎动物中可以参与细胞内信号转导, 触发细胞因子产生及诱导适应性免疫反应。其次, 脊椎动物的适应性免疫系统需通过重组激活基因 (recombination activating genes, RAG) 编码的重组酶对胚系基因片段进行重排, 进而实现适应性免疫识别分子的特异性和多样性; 而对玻璃海鞘基因组的分析表明, 海鞘不仅具有可作为 RAG 介导的转位事件靶点的 V 结构域, 而且具有类似于 C1 集的 C 结构域, 这是抗

原受体的另一个核心元件^[40]。由于海鞘尚未进化出重组激活基因, 所以其已进化出的适应性免疫系统相关分子前体尚不能像在脊椎动物中那样发挥适应性免疫作用^[35]。但玻璃海鞘中上述结构域序列的相似性以及其与脊椎动物中对应系统发育的关系为免疫相关基因的进化研究提供了一些线索。

3.2.3 免疫系统对消化道菌群的选择性调控

海鞘的消化系统是由咽部、食管、胃、肠道 4 部分构成的 U 型消化管道, 相比于常用的模式生物如线虫、果蝇等, 更接近人类消化系统。海鞘的肠道核心菌群包括革兰阴性菌属的变形菌门、拟杆菌门、梭杆菌门和疣微菌门, 以及革兰阳性菌属的厚壁菌门和放线菌门等; 这些细菌在其他动物 (包括人类) 的肠道中也具有十分重要的作用^[8]。

海鞘固有免疫系统对消化道的保护机制包括由黏膜上皮细胞分泌的黏液、抗菌肽, 以及由模式识别受体 (pattern recognition receptor, PRR)、VCBP 和补体系统等机制介导的变形细胞吞噬作用^[8]。

免疫系统对消化道微生物的识别和选择性调控主要体现在: PRR 与消化道微生物相互作用, 若识别该菌为消化道益生菌, 则不产生免疫应答, 支持其在胃肠道寄生繁殖; 若识别该菌为病原体, 则产生炎症反应, 通过固有免疫应答予以清除^[41]。

海鞘固有免疫系统与肠道菌群相互作用的主要分子为 VCBP-C。该蛋白介导无脊椎动物变形细胞的吞噬调理作用。体外实验已证实, VCBP-C 可选择性地与部分细菌结合并将其清除, 而不与某些细菌作用, 为这些细菌在肠道寄生提供可能。同时, 海鞘肠道中表达的 TLR 除固有免疫识别外, 还可以识别不同微生物, 并有选择地维护肠道益生菌^[8]。有关 TLR 对不同菌株的识别和选择性调控的机制, 目前尚无研究做出明确阐述。

3.2.4 免疫系统应答病原菌感染的炎症反应

有关固有免疫系统对病原体的识别和应答研究主要聚焦在海鞘咽部感染后由内柱 (endostyle) 介导的炎症反应。当前, 研究人员已发现了许多对脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 炎症反应发挥应答效应的分子, 如属于过氧化物酶-环氧化酶基因超家族成员的海鞘细胞黏附蛋白 (*Ciona* peroxinectin, CrPxt), 其在 LPS 接种后表达上调, 聚集于发炎的被囊基质和内柱的 7、8、9 区的血细胞、血管上皮和单室折射性粒细胞中^[42]。海鞘在接种 LPS 后 1 h 出现 CrPxt 表达峰值,

且 MD-2 相关脂类识别蛋白 (MD-2-related Lipid-recognition, ML) 超家族成员和尼曼病蛋白 C2 (Niemann-Pick type C, NPC2) 优先在血管腔内的血细胞中表达^[43]。有研究通过比较对照组和 LPS 接种组的整个咽部转录本发现, 2 和 4 亚家族的细胞色素 P450 成分表达下调; 另外通过 miRNA 网络相互作用发现, 不同的保守性和物种特异性 miRNA 参与细胞色素基因的转录后调控, 并且在海鞘炎症反应中, 调节炎症和细胞色素分子的特异性 miRNA 之间可能存在相互作用^[44]。另外有研究者发现, LPS 诱导产生的短 mRNA (Ci8 short) 派生的短肽能够与人类 MHC 的 I 类和 II 类等位基因特异性结合, 从而调节人类适应性免疫系统的多个重要反应^[45]。

海鞘现已成功应用于固有免疫应答机制和免疫基因进化的相关研究。例如: 针对海鞘炎症反应介导的转录和转录后基因调控机制的研究发现, TLR/髓样分化因子 88 (myeloid differentiation factor 88, MyD88) 依赖性信号通路组分 (Tlr2, MyD88 和 Irak4) 与核因子 κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 信号通路组分 (Nf- κ B, I κ B α 和 I κ k α) 之间存在功能上的联系; 在炎症反应中, 巨噬细胞移动抑制因子 (macrophage migration inhibitory factor, MIF) 比炎症介质或效应分子 [如 IL-17s、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)、基质金属蛋白酶 9 (matrix metalloprotein 9, MMP9)、Tlrs、MyD88、白细胞介素受体相关激酶 (interleukin receptor-associated kinase 4, Irak4)、NF- κ B 和凝集素 (galectins)] 更频繁地表达, 这表明在炎症反应的双相激活中, Mif 细胞因子和 NF- κ B 信号通路组分之间存在密切的相互作用。针对 Tlr2、MyD88、核因子 κ B 抑制因子 α (inhibitor kappa B alpha, I κ B α)、I κ B 激酶 (I κ B kinase, I κ k) 和 NF- κ B 转录本的 3'-UTR 分析显示, 海鞘中存在 γ 干扰素激活/翻译抑制 (interferon- γ -activated inhibitor of translation, GAIT) 元件, 已知该元件在人类免疫基因特异性翻译的调节中起关键作用; 这表明, 海鞘和人类一样, 复杂的转录和转录后控制机制参与了若干炎症基因的调节^[46]。海鞘的穿透素样 (pentraxin-like, Ptx-like) 组分具有 C 端 PTX 结构域 [与人类 C 反应蛋白 (C-reactive protein, CRP) 的短 PTX 同源] 和典型的长 PTXs 的长 N 端结构域, 参与了在体的 LPS 免疫反应; Ptx-like 在咽部血管内的血细胞簇 (主要是粒细胞) 表达, 且这

些粒细胞在肌肉组织和循环系统的腔隙中流动, 参与炎症反应的初始阶段和次要阶段, 实现基质重塑和稳态。这些证据表明 Ptx-like 是海鞘免疫防御反应系统对抗细菌感染的急性期反应的潜在分子^[47]。

此外, 人类甲状腺是由内柱进化而来^[42]。人类甲状腺是将碘元素作为产生甲状腺激素的原料, 而玻璃海鞘的内柱也可以利用碘元素^[5]。故不仅限于免疫反应, 深入研究玻璃海鞘内柱的其他功能也可能促进人们对甲状腺功能和甲状腺疾病的深入理解。

3.3 发育生物学

海鞘有其独特的系统发育位置, 以及简单的典型脊索动物的身体结构^[7]。脊索是脊索动物的重要特征, 可作为器官发育分化的组织中心支持身体结构, 并可以分泌一些信号因子传递到周围组织中, 诱导其他组织的发育分化, 并为其定位提供必要信息^[48]。玻璃海鞘的脊索只在幼体中存在, 且结构简单, 由 40 个细胞组成, 并分别来自两个细胞谱系。玻璃海鞘的脊索细胞数目少、个体大, 可作为脊索发育研究的模式生物, 很早就受到关注, 研究成果颇丰^[49]。一方面, 研究聚焦于脊索形成的细胞过程, 利用实时影像、共聚焦显微镜等技术观察脊索发育过程的细胞变化, 包括形状排列、定向迁移、细胞间黏附和相互作用等^[50-51]。研究发现海鞘脊索的管腔形成依赖于各种常见的基本细胞生物学过程, 包括细胞形态变化、顶端膜的生物发生、细胞间黏附重塑、动态细胞爬行和管腔基质分泌等^[50]。而一些脊椎动物 (如斑马鱼) 的肠道形成也是通过这一管腔形成方式完成的^[52], 这为研究生物管腔形成模式提供了新的见解。人类等脊椎动物的大多数器官 (包括肺、肾和脉管系统) 主要或完全由管道组成, 生物管腔在机体内发挥运输、交换等重要作用。人类的许多疾病如多囊肾病和动脉粥样硬化性心脏病, 本质上都是管道缺陷。深入理解管腔发生的分子机制可能会为诊断和治疗这些疾病提供新的方法。另一方面, 部分研究关注更深层面的控制脊索发育的基因表达调控网络。有研究者发现, 阻断双特异性酪氨酸磷酸化调节激酶 (dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase, DYRK1) 的活性可以抑制海鞘脊索的发育, 并在抑制 DYRK1 活性后通过磷酸化蛋白质组学和脊索特异性蛋白质组学相结合鉴定出相当多的磷酸化差异蛋白, 这些磷酸化蛋白参与介导与脊索管腔形成有关的囊泡运输、离子跨膜运输等过程, 提示脊索发育分子机制与 DYRK1 密切相关^[53]。

在海鞘基因组测序结果的基础上,研究者通过精细的分子实验揭示,玻璃海鞘基因组中有限的转录因子可以通过不同组合产生复杂的发育结果^[54]。运用多种基因编辑技术如CRISPR/Cas系统可以调控单细胞阶段的受精卵,从而观察表型变化;单细胞转录组测序技术(single cell RNA-seq, scRNAseq)可以研究特定细胞群的转录组,从而探索影响发育过程的基因网络。再加上实时成像技术和计算方法,可以对脊索动物进化过程中的发育策略有更进一步的认识。比如意大利那不勒斯安东·多恩动物学院生物与海洋生物进化系的Olivo等^[55]在单细胞水平上描述了海鞘感觉器官色素细胞和光感受细胞谱系的发育程序,揭示了基本的脊索动物色素和感光细胞形成的发育机制,以及高等脊椎动物构建更复杂结构的共同或不同的进化策略。

此外,作为动物模型,海鞘对人类理解心脏发育基因网络也做出了重要贡献。在观察到转录因子*Ci-es1/2*和*Ci-mesp*表达可促使海鞘产生心脏祖细胞后,研究人员将人皮肤成纤维细胞转分化为心脏祖细胞。这一独特发现为人类细胞培养中细胞谱系的重新编程提供了方向^[56]。Wang等^[57]在2020年采用单细胞基因组学方法,重建了形成第一和第二心脏谱系和咽肌前体的发育轨迹,并表征了心咽命运选择的分子基础。

3.4 其他有潜力的应用研究方向

3.4.1 玻璃海鞘作为再生研究的模型

玻璃海鞘可以作为模式生物用于再生机制研究,其优势不仅是海鞘基因组已经完成测序和注释,而且已经发现了关于其发育的大量信息,例如,胚胎细胞谱系可以揭示哪些胚胎细胞产生了参与再生过程的多能细胞。另外,基因编辑可以实现在海鞘特定组织中表达某些分子标志,这些标志可以用来追踪海鞘的再生过程,从而对海鞘的再生进行跟踪探索,例如Auger等^[58]运用在整个神经系统中表达绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)的转基因海鞘探究口腔虹吸管不同部位截短后的再生能力。海鞘虹吸管也可以作为外植体培养^[58],便于在体外研究再生或者进行再生过程的基因分析。玻璃海鞘的神经复合体(即神经系统)和虹吸管具有再生能力,并且被证明具有近端身体部位再生远端器官的能力^[59]。海鞘与脊椎动物具有较近的亲缘关系,对海鞘再生机制的研究有可能揭示包括人在内脊椎动物的再生机制。

部分有关海鞘再生的研究集中于以口腔虹吸管作为模型^[58,60]。口腔虹吸管沿其边缘有OPOs,其管中

具有肌纤维网络。由顶部、管部或底部的口腔虹吸管截断触发不同的再生过程。一种是通过直接分化位于局部的干细胞,或从鳃囊迁移的干细胞直接分化来替代OPOs,而无需新的细胞分裂;另一种是通过由鳃囊干细胞产生的祖细胞的迁移来参与芽基形成^[61]。当玻璃海鞘被垂直纵轴截断时,近端如口腔虹吸管和神经复合体可以再生远端组织,但远端碎片不能再生近端器官,即使远端含有一部分鳃囊干细胞^[60,62]。因此,2023年Jeffery等^[63]通过分离损伤海鞘的鳃囊、测序后转录组数据分析,鉴定出两大类差异表达基因:与再生有关的上调基因和与代谢稳态相关的下调基因。其中热休克70 kDa蛋白(heat shock 70 kDa protein, *hsp70*)、DnaJ热休克蛋白家族(Hsp40)成员B4[DnaJ heat shock protein family (Hsp40) member B4, *dnaJb4*]基因表达水平在远端损伤后的鳃囊中显著上调,并且通过siRNA敲低验证了*hsp70*和*dnaJb4*是再生所必需的。由于两种基因在远端碎片中都没有显著表达,但在热休克处理远端碎片后表达激活,因此提示应激反应可诱导鳃囊细胞增殖,促进组织再生。这对理解包括脊椎动物在内的其他动物的有限再生有一定启示意义。

新的实用的中枢神经系统再生模型及其分子工具和资源对于研究神经再生至关重要。在脊索动物中,玻璃海鞘具有再生神经元和完整成体中枢神经系统的能力。因此,神经复合体也是研究海鞘再生的关注点。海鞘的神经节具有新的快速的再生模式,即在完全消融后28~35 d内形成一个全新的神经复合物。在健康成体中,表达物质P样(substance P-like, SP-li)、胆囊收缩素样和胰岛素样的免疫反应性神经元细胞体在神经节皮质皮层中表现出明确的定位模式,并具有贯穿整个神经堆的由核周引起的特征性长突起。某些递质如GnRH、5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)、物质P(substance-P, SP)的表达模式也在新的神经节中恢复,但新生神经节会小于原始的神经节^[64]。海鞘的神经系统再生被分为4个不同阶段:愈合(第I期)、神经合并(第II期)、结构再生(第III期)和功能再生(第IV期),这种划分有助于我们更清楚地观察在此过程中发生的复杂的时间和空间变化^[65],从而为理解普遍的再生过程奠定基础。

需要说明的是,现有的关于再生的研究大部分是在野生个体中按照体长来确定年龄,因此相关研究结果需要在人工养殖过程中用精确年龄的个体进行验证。

3.4.2 玻璃海鞘在疾病研究方面的应用

随着基因编辑技术的进步,当模式动物拥有与人类相似的同源基因时,可以在其基因组中模拟人类疾病发生的基因突变以构建疾病模型,模拟人类疾病的发生机制,提供更精细的模拟和分析研究^[66]。海鞘的优势在于:相比于其他无脊椎动物,它与人类有着较多的同源基因,并且透明度高,便于成像和进行基因编辑等操作,同时还具有寿命短、实验可操作性较强等优势,有助于人们理解细胞或组织在正常和病理条件下所发生的相应变化。以玻璃海鞘在阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)相关研究中的应用为例,各种遗传学和临床证据表明 β -淀粉样蛋白(β -protein, A β)、 β -淀粉样前体蛋白(amyloid precursor protein, APP)^[67]和包含异常磷酸化的微管相关tau蛋白的神经纤维缠结(neurofibrillary tangles, NFTs)^[68]是AD的主要病理性标志。海鞘基因组包含所有AD相关基因的同源物,如NFTs的主要成分tau蛋白和 α -分泌酶等。转基因海鞘幼虫可以适当表达人类APP695(与家族性AD相关的人类APP695变体),产生A β 肽,并且A β 可以迅速聚集形成淀粉样斑块,斑块沉积,进而影响幼虫附着变态。而对幼虫进行抗淀粉样蛋白治疗可改善这些AD样病状^[69]。虽然作为无脊椎动物,玻璃海鞘模型无法准确模拟复杂的哺乳动物神经系统和行为,但仍然可以帮助理解AD背后的分子细胞生物学过程,以及快速清晰地观察AD相关表型^[70]。将玻璃海鞘作为AD的研究模型,有可能在药物开发过程早期对筛选治疗AD的候选化合物发挥重要作用^[69]。

众所周知,人类心肌梗死后无法愈合,这促使生物医学领域对心脏受损再生相当关注。斑马鱼和新生小鼠等脊椎动物的心脏修复依赖于支持心肌细胞增殖的剩余心脏组织。与之不同的是,玻璃海鞘在心脏完全化学消融和功能丧失后仍可存活,并能恢复心脏组织和其收缩力。这提示玻璃海鞘可作为研究心脏受损和再生问题的动物模型。此外,玻璃海鞘与脊椎动物的心脏再生均依赖于骨形态发生蛋白信号介导的心肌细胞增殖,然而,玻璃海鞘心脏在完全消融后,新的心肌细胞可以从内胚层谱系出现,这是一个全新的心脏再生发生的案例^[71],提示可以利用玻璃海鞘确定内胚层细胞如何在体内转分化为心肌细胞的具体机制。

3.4.3 玻璃海鞘活性成分为开发新药提供思路

玻璃海鞘作为海洋生物,其本身具有的各种生物活性成分可以为新药研发提供材料。沿海地区有十分

丰富易得的海鞘资源,如果其活性成分具备开发成药物的可能性,那么对海鞘的有效利用将进一步扩展。

6-硫酸盐化葡萄糖基神经酰胺(6-sulfated glucosylceramide, 6-sulfatide)是从玻璃海鞘中分离出的一种活性物质。目前已知内源性的3-硫酸盐半乳糖神经酰胺(3-sulfated galactosylceramide, 3-sulfatide)参与肿瘤细胞转移的调节^[72]。而合成的6-sulfatide和3-sulfatide可以显著抑制小鼠黑色素瘤细胞B16F10在纤维连接蛋白包被的组织板上黏附,通过作用于细胞迁移和侵袭相关蛋白如抑制整合素 α (5)、 β (1)的表达,抑制局灶黏附激酶和Akt的表达以及细胞外信号调节激酶信号通路的激活,从而抑制肿瘤细胞的运动和侵袭^[73]。因此,这些硫脂化合物有望成为治疗肿瘤转移的候选药物。此外有研究发现,一种从玻璃海鞘中分离出的水化合物CI431可以通过线粒体介导途径诱导人肝癌细胞株Bel-7402细胞凋亡,推测CI431有可能被开发为一种新型的抗癌药物^[74]。

玻璃海鞘的固有免疫系统中天然存在抗菌肽,可以抵御外界细菌,维持自身环境的稳定。有研究人员根据玻璃海鞘血细胞中的天然肽合成了一种特殊耐盐肽Ci-MAM-A24(Ciona-molecule against microbes-A24,即海鞘抗微生物分子A24)^[75],其可以有效杀死耻垢分枝杆菌和牛分枝杆菌卡介苗^[76]。推测这一基于玻璃海鞘天然肽合成的化合物可以作为开发新的分枝杆菌抑制药物的基础。

4 展望

目前被应用的脊索实验动物中,玻璃海鞘的进化地位与人类亲缘关系最近,其器官组成也与人类有较大相似性。玻璃海鞘5个月左右的生命周期更使其成为观察衰老全过程的理想模式动物,具有极好的时间效益优势。另外,玻璃海鞘身体透明,心脏、胃肠道、性腺等器官肉眼可见,易于观察多种体征的特征;其中,与衰老有关的表型可以更敏锐地反映个体衰老情况,进而在衰老研究过程中更精准地体现不同因素的作用效果。海鞘的进化地位较为原始,其基因组组成较简单,可以通过转录组测序技术比较不同生命阶段个体的基因表达情况,从而确定玻璃海鞘中可能与衰老有关的基因和通路。此外,玻璃海鞘具有与人类等脊椎动物同源的基因,脊椎动物基因家族通常以简化形式在海鞘中存在,其生物信息的网络资源已基本完善。因此,相关基因研究结果不仅可以拓展到小鼠或者人

类的同源基因及其通路是否对衰老有独特作用，还可以用于研究在高等生物的复杂生物学机制中保守基因的作用。例如，有研究人员通过收集小鼠不同组织和器官的基因组数据生成单细胞转录图谱，评估不同年龄不同类型细胞的特异性表型，分析其基因表达变化与衰老的关系^[77]。因此，可以通过单细胞的时空转录组学，将玻璃海鞘与小鼠和人类生命周期过程中相关基因组进行比对，以寻找进化上相对保守的生物学过程；同时，相关研究内容也可以进一步拓展到细胞增殖、分化等方面。现已开展的以玻璃海鞘作为模式生物的研究内容涉及神经、免疫、发育和再生等领域，其中将玻璃海鞘与脊椎动物的蛋白质组进行比较，将人类再生医学等领域提供更多的新思路。另外，玻璃海鞘体内的某些活性成分可以为新药研发提供思路。目前对于玻璃海鞘，仍有相当大的研究空间亟待探索，以玻璃海鞘为模式动物的研究将会在更多的科学领域中发挥重要作用。

[作者贡献 Author Contribution]

李睿琪检索文献,制作图1~4,撰写和修改文稿;
段涵检索文献,制作图5及表1~2,撰写和修改文稿;
甘罗检索文献,参与修改文稿;
郑媛指导文献选择,提供海鞘生活史图片,参与指导文章选题及修改;
杨文确定文章选题和大纲,指导写作和修改。

[利益声明 Declaration of Interest]

所有作者均声明本文不存在利益冲突。

[参考文献 References]

- [1] DENOUEUD F, HENRIET S, MUNGPAKDEE S, et al. Plasticity of animal genome architecture unmasked by rapid evolution of a pelagic tunicate[J]. *Science*, 2010, 330(6009):1381-1385. DOI: 10.1126/science.1194167.
- [2] DELSUC F, BRINKMANN H, CHOURROUT D, et al. Tunicates and not cephalochordates are the closest living relatives of vertebrates[J]. *Nature*, 2006, 439(7079):965-968. DOI: 10.1038/nature04336.
- [3] TREEN N, SHIMOBAYASHI S F, EEFTENS J, et al. Properties of repression condensates in living *Ciona* embryos[J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1):1561. DOI: 10.1038/s41467-021-21606-5.
- [4] SATOU Y, NAKAMURA R, YU D L, et al. A nearly complete genome of *Ciona intestinalis* type A (*C. robusta*) reveals the contribution of inversion to chromosomal evolution in the genus *Ciona*[J]. *Genome Biol Evol*, 2019, 11(11):3144-3157. DOI: 10.1093/gbe/evz228.
- [5] DEHAL P, SATOU Y, CAMPBELL R K, et al. The draft genome of *Ciona intestinalis*: insights into chordate and vertebrate origins[J]. *Science*, 2002, 298(5601): 2157-2167. DOI: 10.1126/science.1080049.
- [6] SATOU Y, TOKUOKA M, ODA-ISHII I, et al. A manually curated gene model set for an ascidian, *Ciona robusta* (*Ciona intestinalis* type a)[J]. *Zool J Linn Soc*, 2022, 39(3): 253-260. DOI: 10.2108/zs210102.
- [7] SATOH N, SATOU Y, DAVIDSON B, et al. *Ciona intestinalis*: an emerging model for whole-genome analyses[J]. *Trends Genet*, 2003, 19(7): 376-381. DOI: 10.1016/S0168-9525(03)00144-6.
- [8] LIBERTI A, NATARAJAN O, ATKINSON C G F, et al. Reflections on the use of an invertebrate chordate model system for studies of gut microbial immune interactions[J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 642687. DOI: 10.3389/fimmu.2021.642687.
- [9] MATSUBARA S, KAWADA T, SAKAI T, et al. The significance of *Ciona intestinalis* as a stem organism in integrative studies of functional evolution of the chordate endocrine, neuroendocrine, and nervous systems[J]. *Gen Comp Endocrinol*, 2016, 227:101-108. DOI: 10.1016/j.ygcen.2015.05.010.
- [10] HAYWOOD C A, MOON H P, MILLAR R H. Reversal of the heart-beat in Tunicates[J]. *Nature*, 1953, 172(4366):40-41. DOI: 10.1038/172040b0.
- [11] KALK M. The organization of a tunicate heart[J]. *Tissue Cell*, 1970, 2(1):99-118. DOI: 10.1016/s0040-8166(70)80010-6.
- [12] EALES J G. Iodine metabolism and thyroid-related functions in organisms lacking thyroid follicles: are thyroid hormones also vitamins?[J]. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1997, 214(4):302-317. DOI: 10.3181/00379727-214-44098.
- [13] PASSAMANECK Y J, DI GREGORIO A. *Ciona intestinalis*: chordate development made simple[J]. *Dev Dyn*, 2005, 233(1): 1-19. DOI: 10.1002/dvdy.20300.
- [14] YOSHIDA K, TREEN N. TALEN-based knockout system[M]// SASAKURA Y, ed. *Transgenic Ascidians*. Singapore: Springer, 2018:131-139. DOI: 10.1007/978-981-10-7545-2_12.
- [15] NAKASHIMA K, YAMADA L, SATOU Y, et al. The evolutionary origin of animal cellulose synthase[J]. *Dev Genes Evol*, 2004, 214(2):81-88. DOI: 10.1007/s00427-003-0379-8.
- [16] GANDHI S, RAZY-KRAJKA F, CHRISTIAEN L, et al. CRISPR knockouts in *Ciona* embryos[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2018, 1029: 141-152. DOI: 10.1007/978-981-10-7545-2_13.
- [17] SASAKURA Y, HORIE T. Improved genome editing in the ascidian *Ciona* with CRISPR/Cas9 and TALEN[J]. *Methods Mol Biol*, 2023, 2637: 375-388. DOI: 10.1007/978-1-0716-3016-7_28.
- [18] SATOU Y, IMAI K S, SATOH N. Action of morpholinos in *Ciona* embryos[J]. *Genesis*, 2001, 30(3):103-106. DOI: 10.1002/gene.1040.
- [19] HOZUMI A, KAWAI N, YOSHIDA R, et al. Efficient transposition of a single Minos transposon copy in the genome of the ascidian *Ciona intestinalis* with a transgenic line expressing transposase in eggs[J]. *Dev Dyn*, 2010, 239(4): 1076-1088. DOI: 10.1002/dvdy.22254.
- [20] KOBAYASHI K, SATOU Y. Microinjection of exogenous nucleic acids into eggs: *Ciona* species[M]//SASAKURA Y. *Transgenic Ascidiens*. Singapore: Springer, 2018:5-13.10.1007/

- 978-981-10-7545-2_2.
- [21] ZELLER R W. Electroporation in ascidians: history, theory and protocols[M]//SASAKURA Y. Transgenic Ascidians. Singapore: Springer, 2018:37-48. DOI: 10.1007/978-981-10-7545-2_5.
- [22] HORIE T, NAKAGAWA M, SASAKURA Y, et al. Cell type and function of neurons in the ascidian nervous system[J]. Dev Growth Differ, 2009, 51(3): 207-220. DOI: 10.1111/j. 1440-169X.2009.01105.x.
- [23] HORIE T, NAKAGAWA M, SASAKURA Y, et al. Simple motor system of the ascidian larva: neuronal complex comprising putative cholinergic and GABAergic/glycinergic neurons[J]. Zool Sci, 2010, 27(2):181-190. DOI: 10.2108/zsj.27.181.
- [24] STOLFI A, LEVINE M. Neuronal subtype specification in the spinal cord of a protovertebrate[J]. Development, 2011, 138(5): 995-1004. DOI: 10.1242/dev.061507.
- [25] IKUTA T, SAIGA H. Dynamic change in the expression of developmental genes in the ascidian central nervous system: revisit to the tripartite model and the origin of the midbrain-hindbrain boundary region[J]. Dev Biol, 2007, 312(2): 631-643. DOI: 10.1016/j.ydbio.2007.10.005.
- [26] IMAI K S, STOLFI A, LEVINE M, et al. Gene regulatory networks underlying the compartmentalization of the *Ciona* central nervous system[J]. Development, 2009, 136(2): 285-293. DOI: 10.1242/dev.026419.
- [27] LEMAIRE L A, CAO C, YOON P H, et al. The hypothalamus predates the origin of vertebrates[J]. Sci Adv, 2021, 7(18): eabf7452. DOI: 10.1126/sciadv.abf7452.
- [28] OSUGI T, SASAKURA Y, SATAKE H. The nervous system of the adult ascidian *Ciona intestinalis* Type A (*Ciona robusta*): insights from transgenic animal models[J]. PLoS One, 2017, 12(6): e0180227. DOI: 10.1371/journal.pone.0180227.
- [29] TSUDA M, KAWAKAMI I, SHIRAIISHI S. Sensitization and habituation of the swimming behavior in ascidian larvae to light[J]. Zool Sci, 2003, 20(1):13-22. DOI: 10.2108/zsj.20.13.
- [30] BORBA C, KOURAKIS M J, SCHWENNICKE S, et al. Fold change detection in visual processing[J]. Front Neural Circuits, 2021, 15:705161. DOI: 10.3389/fncir.2021.705161.
- [31] SATAKE H, MATSUBARA S, SHIRAIISHI A, et al. Neuropeptides, peptide hormones, and their receptors of a tunicate, *Ciona intestinalis*[J]. Results Probl Cell Differ, 2019, 68:107-125. DOI: 10.1007/978-3-030-23459-1_5.
- [32] AOYAMA M, KAWADA T, FUJIE M, et al. A novel biological role of tachykinins as an up-regulator of oocyte growth: identification of an evolutionary origin of tachykinergic functions in the ovary of the ascidian, *Ciona intestinalis*[J]. Endocrinology, 2008, 149(9):4346-4356. DOI: 10.1210/en.2008-0323.
- [33] KAWADA T, OGASAWARA M, SEKIGUCHI T, et al. Peptidomic analysis of the central nervous system of the protochordate, *Ciona intestinalis*: homologs and prototypes of vertebrate peptides and novel peptides[J]. Endocrinology, 2011, 152(6): 2416-2427. DOI: 10.1210/en.2010-1348.
- [34] HOZUMI A, MATSUNOBU S, MITA K R, et al. GABA-induced GnRH release triggers chordate metamorphosis[J]. Curr Biol, 2020, 30(8):1555-1561.e4. DOI: 10.1016/j.cub.2020.02.003.
- [35] AZUMI K, DE SANTIS R, DE TOMASO A, et al. Genomic analysis of immunity in a Urochordate and the emergence of the vertebrate immune system: "waiting for Godot"[J]. Immunogenetics, 2003, 55(8): 570-581. DOI: 10.1007/s00251-003-0606-5.
- [36] SATAKE H, MATSUBARA S, SHIRAIISHI A, et al. Peptide receptors and immune-related proteins expressed in the digestive system of a urochordate, *Ciona intestinalis*[J]. Cell Tissue Res, 2019, 377(3): 293-308. DOI: 10.1007/s00441-019-03024-8.
- [37] LONGO V, PARRINELLO D, LONGO A, et al. The conservation and diversity of ascidian cells and molecules involved in the inflammatory reaction: the *Ciona robusta* model[J]. Fish Shellfish Immunol, 2021, 119: 384-396. DOI: 10.1016/j.fsi.2021.10.022.
- [38] SATOH N. Innate immune system and blood cells[M/OL]// SATOH N. Developmental genomics of ascidians. Hoboken: John Wiley & Sons, Inc., 2013:159-165. (2013-12-05) [2023-11-01]. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9781118656129.ch15>.
- [39] DI BELLA M A, FEDDERS H, DE LEO G, et al. Localization of antimicrobial peptides in the tunic of *Ciona intestinalis* (Ascidacea, Tunicata) and their involvement in local inflammatory-like reactions[J]. Results Immunol, 2011, 1(1):70-75. DOI: 10.1016/j.rinim.2011.09.001.
- [40] KASAHARA M, SUZUKI T, PASQUIER L D. On the origins of the adaptive immune system: novel insights from invertebrates and cold-blooded vertebrates[J]. Trends Immunol, 2004, 25(2):105-111. DOI: 10.1016/j.it.2003.11.005.
- [41] DISHAW L J, CANNON J P, LITMAN G W, et al. Immune-directed support of rich microbial communities in the gut has ancient roots[J]. Dev Comp Immunol, 2014, 47(1): 36-51. DOI: 10.1016/j.dci.2014.06.011.
- [42] VIZZINI A, PARRINELLO D, SANFRATELLO M A, et al. *Ciona intestinalis* peroxinectin is a novel component of the peroxidase-cyclooxygenase gene superfamily upregulated by LPS[J]. Dev Comp Immunol, 2013, 41(1):59-67. DOI: 10.1016/j.dci.2013.03.015.
- [43] VIZZINI A, BONURA A, LONGO V, et al. Isolation of a novel LPS-induced component of the ML superfamily in *Ciona intestinalis*[J]. Dev Comp Immunol, 2015, 53(1): 70-78. DOI: 10.1016/j.dci.2015.06.018.
- [44] VIZZINI A, BONURA A, LA PAGLIA L, et al. Transcriptomic analyses reveal 2 and 4 family members of cytochromes P450 (CYP) involved in LPS inflammatory response in pharynx of *Ciona robusta*[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(20):11141. DOI: 10.3390/ijms22011141.
- [45] BONURA A, VIZZINI A, VLAH S, et al. Ci8 short, a novel LPS-induced peptide from the ascidian *Ciona intestinalis*, modulates responses of the human immune system[J]. Immunobiology, 2018, 223(2): 210-219. DOI: 10.1016/j.imbio.2017.10.024.
- [46] ARIZZA V, BONURA A, LA PAGLIA L, et al. Transcriptional

- and in silico analyses of MIF cytokine and TLR signalling interplay in the LPS inflammatory response of *Ciona robusta* [J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 11339. DOI: 10.1038/s41598-020-68339-x.
- [47] VIZZINI A, DUMAS F, DI FALCO F, et al. Evolutionary and transcriptional analyses of a pentraxin-like component family involved in the LPS inflammatory response of *Ciona robusta* [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2021, 111: 94-101. DOI: 10.1016/j.fsi.2021.01.014.
- [48] STEMPLE D L. Structure and function of the notochord: an essential organ for chordate development[J]. *Development*, 2005, 132(11):2503-2512. DOI: 10.1242/dev.01812.
- [49] LU Q X, BHATTACHAN P, DONG B. Ascidian notochord elongation[J]. *Dev Biol*, 2019, 448(2): 147-153. DOI: 10.1016/j.ydbio.2018.11.009.
- [50] DONG B, HORIE T, DENKER E, et al. Tube formation by complex cellular processes in *Ciona intestinalis* notochord [J]. *Dev Biol*, 2009, 330(2): 237-249. DOI: 10.1016/j.ydbio.2009.03.015.
- [51] MUNRO E M, ODELL G M. Polarized basolateral cell motility underlies invagination and convergent extension of the ascidian notochord[J]. *Development*, 2002, 129(1):13-24. DOI: 10.1242/dev.129.1.13.
- [52] BAGNAT M, CHEUNG I D, MOSTOV K E, et al. Genetic control of single lumen formation in the zebrafish gut[J]. *Nat Cell Biol*, 2007, 9:954-960. DOI: 10.1038/ncb1621.
- [53] WANG Z Q, OUYANG X K, TAN Z C, et al. Quantitative phosphoproteomics reveals the requirement of DYRK1-mediated phosphorylation of ion transport- and cell junction-related proteins for notochord lumenogenesis in ascidian[J]. *Cells*, 2023, 12(6):921. DOI: 10.3390/cells12060921.
- [54] DI G A. The notochord gene regulatory network in chordate evolution: conservation and divergence from *Ciona* to vertebrates[J]. *Curr Top Dev Biol*, 2020, 139: 325-374. DOI: 10.1016/bs.ctdb.2020.01.002.
- [55] OLIVO P, PALLADINO A, RISTORATORE F, et al. Brain sensory organs of the ascidian *Ciona robusta*: structure, function and developmental mechanisms[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9:701779. DOI: 10.3389/fcell.2021.701779.
- [56] ISLAS J F, LIU Y, WENG K C, et al. Transcription factors ETS2 and MESP1 transdifferentiate human dermal fibroblasts into cardiac progenitors[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(32): 13016-13021. DOI: 10.1073/pnas.1120299109.
- [57] WANG W, NIU X, STUART T, et al. A single-cell transcriptional roadmap for cardiopharyngeal fate diversification[J]. *Nat Cell Biol*, 2019, 21(6):674-686. DOI: 10.1038/s41556-019-0336-z.
- [58] AUGER H, SASAKURA Y, JOLY J S, et al. Regeneration of oral siphon pigment organs in the ascidian *Ciona intestinalis*[J]. *Dev Biol*, 2010, 339(2): 374-389. DOI: 10.1016/j.ydbio. 2009. 12.040.
- [59] JEFFERY W R. Closing the wounds: one hundred and twenty five years of regenerative biology in the ascidian *Ciona intestinalis*[J]. *Genesis*, 2015, 53(1): 48-65. DOI: 10.1002/dvg. 22799.
- [60] JEFFERY W R. Distal regeneration involves the age dependent activity of branchial sac stem cells in the ascidian *Ciona intestinalis*[J]. *Regeneration*, 2015, 2(1): 1-18. DOI: 10.1002/reg2.26.
- [61] JEFFERY W R. Regeneration, stem cells, and aging in the tunicate *Ciona*: insights from the oral siphon[J]. *Int Rev Cell Mol Biol*, 2015, 319:255-282. DOI: 10.1016/bs.ircmb.2015.06.005.
- [62] JEFFERY W R, GORIČKI Š. Apoptosis is a generator of Wnt-dependent regeneration and homeostatic cell renewal in the ascidian *Ciona*[J]. *Biol Open*, 2021, 10(4): bio058526. DOI: 10.1242/bio.058526.
- [63] JEFFERY W R, LI B, NG M, et al. Differentially expressed chaperone genes reveal a stress response required for unidirectional regeneration in the basal chordate *Ciona*[J]. *BMC Biol*, 2023, 21(1):148. DOI: 10.1186/s12915-023-01633-y.
- [64] BOLLNER T, BEESLEY P W, THORNDYKE M C. Pattern of substance P- and cholecystokinin-like immunoreactivity during regeneration of the neural complex in the ascidian *Ciona intestinalis*[J]. *J Comp Neurol*, 1992, 325(4): 572-580. DOI: 10.1002/cne.903250409.
- [65] DAHLBERG C, AUGER H, DUPONT S, et al. Refining the *Ciona intestinalis* model of central nervous system regeneration[J]. *PLoS One*, 2009, 4(2): e4458. DOI: 10.1371/journal.pone.0004458.
- [66] JOLY J S. Aquatic model organisms in neurosciences: the genome-editing revolution[M]// *Genome Editing in Neurosciences*. Cham: Springer, 2017:21-29.10.1007/978-3-319-60192-2_2.
- [67] HARDY J A, HIGGINS G A. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis[J]. *Science*, 1992, 256(5054):184-185. DOI: 10.1126/science.1566067.
- [68] SCHNABEL J. Amyloid: little proteins, big clues[J]. *Nature*, 2011, 475(7355): S12-S14. DOI: 10.1038/475S12a.
- [69] VIRATA M J, ZELLER R W. Ascidiaceans: an invertebrate chordate model to study Alzheimer's disease pathogenesis [J]. *Dis Model Mech*, 2010, 3(5-6): 377-385. DOI: 10.1242/dmm.003434.
- [70] GÖTZ J, STREFFER J R, DAVID D, et al. Transgenic animal models of Alzheimer's disease and related disorders: histopathology, behavior and therapy[J]. *Mol Psychiatry*, 2004, 9(7):664-683. DOI: 10.1038/sj.mp.4001508.
- [71] SCHUSTER K J, CHRISTIAEN L. The chordate origins of heart regeneration[J]. *bioRxiv*, 2023:2023.09.19.558507. DOI: 10.1101/2023.09.19.558507.
- [72] GARCIA J, CALLEWAERT N, BORSIG L. P-selectin mediates metastatic progression through binding to sulfatides on tumor cells[J]. *Glycobiology*, 2007, 17(2):185-196. DOI: 10.1093/glycob/cwl059.
- [73] OZAWA H, SONODA Y, KATO S, et al. Sulfatides inhibit adhesion, migration, and invasion of murine melanoma B16F10 cell line *in vitro*[J]. *Biol Pharm Bull*, 2012, 35(11):2054-2058. DOI: 10.1248/bpb.b12-00492.
- [74] CHENG L Y, LIU M, WANG C C, et al. Cl₄31, an aqueous compound from *Ciona intestinalis* L., induces apoptosis

- through a mitochondria-mediated pathway in human hepatocellular carcinoma cells[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2011, 2011:292873. DOI: 10.1155/2011/292873.
- [75] FEDDERS H, MICHALEK M, GRÖTZINGER J, et al. An exceptional salt-tolerant antimicrobial peptide derived from a novel gene family of haemocytes of the marine invertebrate *Ciona intestinalis*[J]. *Biochem J*, 2008, 416(1):65-75. DOI: 10.1042/BJ20080398.
- [76] JENA P, MISHRA B, LEIPPE M, et al. Membrane-active antimicrobial peptides and human placental lysosomal extracts are highly active against mycobacteria[J]. *Peptides*, 2011, 32(5):881-887. DOI: 10.1016/j.peptides.2011.03.002.
- [77] CONSORTIUM T M. A single-cell transcriptomic atlas

characterizes ageing tissues in the mouse[J]. *Nature*, 2020, 583(7817):590-595. DOI: 10.1038/s41586-020-2496-1.

(收稿日期:2023-11-13 修回日期:2024-02-09)

(本文编辑:张俊彦,富群华,丁宇菁,张萍)

[引用本文]

李睿琪, 段涵, 甘罗, 等. 玻璃海鞘作为模式生物的优势及其应用[J]. *实验动物与比较医学*, 2024, 44(2): 162-179. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2023.159.

LI R Q, DUAN H, GAN L, et al. Advantages of *Ciona intestinalis* as a model organism and its applications[J]. *Lab Anim Comp Med*, 2024, 44(2): 162-179. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817. 2023.159.

2024年版 ICMJE 推荐规范更新内容说明

2024年1月, 国际医学期刊编辑委员会(International Committee of Medical Journal Editors, ICMJE)发布《学术研究实施与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》(*Recommendations for the Conduct, Reporting, Editing and Publication of Scholarly Work in Medical Journals*) 更新版, 简称“2024年版 ICMJE 推荐规范”。现将主要的更新内容(下文划线部分)介绍如下。完整的中文翻译版和正式的英文原版请见 www.icmje.org。若需引用, 请用英文官方版本。

更新主题1: 为什么作者署名很重要(II.A.1)

II.A.1节新增: 当数据来自中低收入国家(LMIC)时, 编辑应警惕将LMIC的研究人员排除在作者署名之外的做法。纳入当地作者增加了研究的公平性、背景和影响。没有将当地研究人员纳入作者应引起质疑, 并可能导致拒稿。

更新主题2: 如何描述人工智能辅助技术下进行的工作(II.A.3、II.A.4和IV.A.3.d)

II.A.3节新增: 使用人工智能(AI)辅助写作应在致谢部分报告。

II.A.4节修改: 使用这些技术的作者应该在投稿函和所提交稿件的适当部分酌情描述他们是如何使用的。例如, 如果AI用于写作辅助, 应在致谢部分描述这一点(见II.A.3节)。如果AI用于数据收集、分析或图形生成, 作者应在方法中描述这些用法(见IV.A.3.d节)。

IV.A.3.d节新增: 使用AI技术进行研究的作者应该在方法部分充分详细地描述其使用情况, 包括所使用的工具、版本和合适的提示词, 以使该方法可以被重复。

更新主题3: 审稿过程中使用人工智能技术(II.C.2.a和II.C.3)

II.C.2.a节新增: 编辑应注意, 在处理稿件时使用AI技术可能会违反保密性。

II.C.2.a节新增: 审稿人指南应包括有关AI使用的指导。

II.C.3节新增: 审稿人必须先征得期刊的许可, 才能使用AI技术来帮助审稿。

更新主题4: 医学出版和碳排放(II.D.1)

II.D.1节新增: 医学出版导致碳排放, 加剧气候变化, 这对人类福祉和地球健康构成了紧迫威胁。编辑、出版商、期刊所有者和其他利益相关者应共同努力, 立即制定减少碳排放的策略, 以实现净零碳排放的目标。

更新主题5: 资助声明(II.B和IV.A.3.b)

II.B节新增: 潜在利益冲突的申报视情况而定, 而且申报内容不仅是对这项研究工作的直接支持。在稿件中, 资助声明应只描述对所述工作的直接支持, 个人因该工作而获取的资助也要如此报告。机构对作者所投入时间的一般性支持应区别于直接的总体资金资助。一份合适的资助声明可以这样写: “这项研究由A资助; F博士对于这项工作的时间投入得到了B的支持。”

IV.A.3.b节新增: 资助声明应只描述对所述工作的直接支持。机构对作者所投入时间的一般性支持应区别于直接的总体资助。一份合适的资助声明可以这样写: “本研究由ABC资助; F博士的工作时间投入得到了XYZ的支持。”

更新主题6: 受试者保护(II.E)

II.E节修改: 所有作者都应当征求独立的地方、区域或国家审查机构(例如, 伦理委员会、机构审查委员会)批准其实施研究, 并根据编辑要求提供文件。

更新主题7: 参考文献(IV.A.3.g)

IV.A.3.g节修改: 作者应该尽可能直接引用原始研究作为参考文献, 而且应尽可能参考已发表的文章, 而非仅参考摘要。

(张俊彦、于笑天、汪源摘译)

基于动物模型的高尿酸肾病病理及分子机制研究进展

包方奇¹, 屠海焯², 方明笋³, 张倩³, 陈民利³

(1. 复旦大学附属华山医院, 上海 200032; 2. 浙江中医药大学药学院, 杭州 310053; 3. 浙江中医药大学中医药科学院, 杭州 310053)

[摘要] 尿酸是人类嘌呤代谢的终产物, 其过度积累会导致高尿酸血症。高尿酸血症与慢性肾病的关系密切, 被认为是后者的独立危险因素, 因此由高尿酸血症诱导的慢性肾病也被称为高尿酸肾病。21世纪以来, 随着尿酸致病作用研究逐渐深入, 以及高尿酸血症动物模型构建的发展, 尿酸的致病机制逐渐被揭开, 对其诱导慢性肾病的病理生理机制研究也有了重要进展, 但对其病理分子机制的认识仍有很大不足。因此, 新型的动物模型或造模方式或许能够给高尿酸血症及相关慢性肾病的机制研究提供更好的契机。本文从氧化应激、炎症、自噬、纤维化和肠道微生物等方面介绍高尿酸肾病病理分子机制的研究进展: 氧化应激方面, 尿酸在细胞内通过黄嘌呤氧化酶、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶、线粒体诱导氧化应激并损伤细胞; 炎症方面, 尿酸晶体可以激活 NLRP3 炎症小体并启动炎症瀑布, 但关于游离尿酸的促炎作用尚存争议; 自噬方面, 有研究支持促进自噬可缓解尿酸诱导的炎症, 也有研究支持完全相反的结论; 纤维化方面, 上皮间质转化是尿酸引起肾小球硬化和肾小管间质纤维化的重要机制, 大量研究寻找了尿酸引起肾组织上皮间质转化的不同信号通路; 肠道微生物方面, 有益的菌群可通过合成短链脂肪酸、减少尿素肠肝循环、减少尿酸生成保护肾脏。本文旨在帮助人们理解高尿酸血症与慢性肾病之间的复杂关系, 为进一步进行相关研究和新药研发提供参考。

[关键词] 高尿酸血症; 高尿酸肾病; 病理机制; 动物模型

[中图分类号] Q95-33; R-332 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2024)02-0180-12



Advances in Research on Pathological and Molecular Mechanism of Hyperuricemic Nephropathy Based on Animal Models

BAO Fangqi¹, TU Haiyao², FANG Mingsun³, ZHANG Qian³, CHEN Minli³

(1. Huashan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China; 2. College of Pharmacy, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China; 3. Academy of Chinese Medicine, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China)

Correspondence to: CHEN Minli (ORCID: 0000-0003-1911-9397), E-mail: cml991@126.com

[ABSTRACT] Uric acid (UA), the final product of human purine metabolism, can cause hyperuricemia (HUA) when excessively accumulated. HUA is closely linked to chronic kidney diseases (CKD) and is considered an independent risk factor. Hyperuricemic nephropathy, a form of CKD induced by HUA, has seen significant advances in understanding through research into the pathogenic roles of uric acid and the development of HUA animal models. Although progress has been made in understanding the pathophysiological mechanisms by which UA induces CKD, much remains to be learned about its pathological molecular mechanisms. New approaches in animal modeling or the selection of model animals may potentially lead to significant breakthroughs in research on hyperuricemia as well as related CKD. This paper reviews the research progress on the molecular mechanisms of hyperuricemic nephropathy, focusing on oxidative stress, inflammation, autophagy, fibrosis, and gut microbiota. Oxidative

[基金项目] 浙江省基础公益研究计划项目“多因素诱导高尿酸肾病大鼠模型方法的改良与评价研究”(LTGD23C040003)

[第一作者] 包方奇(2000—),男,复旦大学临床五年制华山班在读本科生,专业方向:临床医学。E-mail: fq15888947763@126.com

[通信作者] 陈民利(1963—),女,硕士,博士研究生导师,教授,研究方向:实验动物与比较医学。E-mail: cml991@126.com。ORCID: 0000-0003-1911-9397

stress is induced by uric acid intracellularly through xanthine oxidase, NADPH oxidases, and mitochondria, leading to cellular damage. In terms of inflammation, uric acid crystals can activate the NLRP3 inflammasome, triggering an inflammatory cascade. The role of free uric acid as a pro-inflammatory agent, however, remains controversial. Depending on the study conducted, autophagy has been found to either alleviate or exacerbate inflammation induced by uric acid. Fibrosis, particularly through epithelial-mesenchymal transition (EMT), is a major mechanism by which uric acid causes glomerulosclerosis and tubulointerstitial fibrosis. Extensive research has explored various signaling pathways involved in uric acid-induced EMT. Beneficial gut microbiota protect the kidneys by synthesizing short-chain fatty acids, reducing urea's enterohepatic circulation, and decreasing uric acid production. This paper aims to enhance understanding of the complex relationships between HUA and CKD, serving as a reference for further research and new drug development.

[Key words] Hyperuricemia; Hyperuricemic nephropathy; Pathological mechanism; Animal model

在人类和部分灵长类动物体内，尿酸是嘌呤的代谢终产物，主要在肝脏、肠道和血管内皮中生成^[1]。大多数哺乳动物与人类不同，它们体内的尿酸氧化酶 (urate oxidase, UOX) 能将尿酸分解成尿囊素，并进一步将尿囊素分解成尿素。因此，人类的血清尿酸水平一般比其他哺乳动物高出3~10倍^[2]。当人类血清中尿酸浓度过高时，即可诊断为高尿酸血症 (hyperuricemia, HUA)。HUA可引起痛风和尿路结石等疾病，并与糖尿病、心血管疾病和肾脏疾病等息息相关。

HUA与慢性肾病 (chronic kidney disease, CKD) 正向相关早已被公认，但是二者的因果关系尚有争议，在不同研究中还出现了不一致的结果^[3-7]。主流观点认为，HUA是慢性肾病的独立危险因素，由HUA诱导的慢性肾病也被称为高尿酸肾病，降尿酸治疗可以作为慢性肾病的防治手段之一^[8]。随着对尿酸致病作用的深入研究以及HUA动物模型构建的发展，尿酸诱导慢性肾病的病理生理学机制也逐渐清晰。本文综述了高尿酸肾病的病理分子机制以及相关动物模型的最新研究进展，一方面有助于人们从微观角度理解HUA与慢性肾病的复杂关系，另一方面也为高尿酸肾病的防治研究和药物研发提供新的思路。

1 HUA与高尿酸肾病及其相关的动物模型

1.1 HUA

HUA的定义是血清中尿酸质量浓度大于6.8 mg/dL^[9]。当尿酸浓度大于该值时，尿酸将以尿酸单钠盐晶体 (monosodium urate, MSU) 的形式析出。HUA的病因是尿酸过度生成或排泄障碍。高嘌呤饮食、骨髓增殖性疾病、遗传病、肿瘤溶解综合征、过量果糖和

乙醇摄入等都会导致尿酸生成增加^[10]。肾脏是尿酸的主要排泄器官 (约70%)，其次是肠道 (约30%)^[11]。尿酸在肾脏排泄包括分泌与重吸收两个过程。分泌相关的蛋白主要是有机阴离子转运蛋白1和3 (organic anion transporter 1和3, OAT1和OAT3)、人类多药抗性蛋白4 (multidrug resistance protein 4/ATP binding cassette subfamily G member 4, MRP4/ABCG4) 及乳腺癌耐药蛋白 (breast cancer resistance protein/ATP binding cassette subfamily G member 2, BCRP/ABCG2)。重吸收蛋白主要包括位于近端肾小管上皮细胞顶端膜上的尿酸阴离子转运蛋白1 (urate anion transporter 1, URAT1)、有机阴离子转运蛋白4 (organic anion transporter 4, OAT4) 和同时重吸收尿酸和葡萄糖的葡萄糖转运蛋白9 (glucose transporter 9, GLUT9)^[12-13]。分泌和重吸收蛋白的缺陷会导致HUA。例如，*Abcg-2* 基因敲除的小鼠由于肠道尿酸排泄减少，血清尿酸升高^[10]；胰岛素抵抗可上调URAT1表达，增强尿酸重吸收，进而引起HUA^[14]。

HUA最典型的并发症是痛风和痛风性关节炎。除此之外，HUA还与代谢综合征、心脑血管疾病和肾脏疾病等有很高的相关性。在20世纪末，人们曾否认过HUA对肾脏的致病作用^[10]。但自21世纪以来，越来越多的证据表明尿酸是慢性肾病的独立危险因素，这才引起了人们对高尿酸肾病、血尿酸干预临界点的全新讨论^[13,15]。

1.2 高尿酸肾病

广义的高尿酸肾病包括继发于肿瘤溶解综合征的急性肾损伤、尿酸结石引起的尿路梗阻，以及长期HUA引起的慢性肾病^[13]。本文讨论的是狭义的高尿酸肾病，即长期HUA引起的慢性肾病。高尿酸肾病的

症状与一般慢性肾病相同, 常见表现为镜下血尿和蛋白尿、水肿、肾性高血压、多饮多尿, 有进展为终末期肾病的风险^[16]。近年来, 慢性肾病的危害性使人们反复讨论HUA与慢性肾病的关系, 以期深入探究HUA引发慢性肾病的具体机制。

1.3 HUA动物模型

啮齿类是常用的HUA造模动物。目前用以定义小鼠HUA的确切浓度尚无定论^[9]。通常用以升高啮齿类动物尿酸浓度的方法有抗UOX、增加尿酸合成、抑制尿酸排泄。

抗UOX方面, 第一类方法是基因修饰。*Uox*基因敲除可使129/SvEv小鼠的血清尿酸质量浓度升高至(8.7±2.3) mg/dL (雄) 或(7.1±1.6) mg/dL (雌) 水平[野生型为(0.9±0.3) mg/dL], 符合人类HUA标准。但由于尿酸盐沉积, 这种方法建模的动物肾脏损伤严重, 小鼠死亡率高; 而且*Uox*基因缺失的纯合子具有胚胎致死性。因此, *Uox*基因敲除模型并非理想的HUA造模方法^[9]。第二类方法是使用氧嗉酸钾(oxonic acid potassium salt)抑制UOX, 可引起血清尿酸浓度升高2~3倍, 继而可出现UOX代偿性升高导致的血尿酸浓度下降。因此, 单独使用氧嗉酸钾的HUA造模并不稳定^[17]。

目前, 最常见的稳定造模方法是在用氧嗉酸钾抗UOX的基础上增加尿酸合成。常见的增加尿酸合成的方法有酵母膏饲喂, 以及腺嘌呤、次黄嘌呤饲喂或腹腔注射。

抑制尿酸排泄也有基因修饰与药物应用两种方法。前者的代表性工作是, DeBosch等^[18]使用Cre-LoxP技术在C57BL/6小鼠中肠道特异性地敲除*GLUT9*基因。*GLUT9*蛋白在肾脏中重吸收尿酸, 却在肠道中负责尿酸排泄。因此, 肠道*GLUT9*基因敲除可升高血尿酸, 并引起代谢综合征, 包括自发性高血压、高脂血症和体脂增加等。抑制尿酸排泄的常用药物为乙胺丁醇^[19]。乙胺丁醇是抗结核药, 临床发现使用乙胺丁醇抗结核治疗的患者出现了血尿酸升高和尿酸排泄分数显著减少的情况, 然而其确切机制尚未阐明^[20]。

长期的HUA可诱发肾损伤, 因而维持高浓度的血尿酸即可作为高尿酸肾病的造模方法。但值得注意的是, 腺嘌呤具有较强的肾毒性, 在高尿酸肾病造模过程中应谨慎使用。

此外, 在长期的进化中, 啮齿类动物已经与UOX存在及很低的血尿酸浓度相适应。6.8 mg/dL是人类

HUA的诊断临界点, 但是也许远小于6.8 mg/dL的血尿酸也足以对实验动物产生潜在损害。因此, 研究者们尚不能确定啮齿类动物HUA的确切标准。幸运的是, 新的研究发现, 除了啮齿类动物外, 鸟类也具有HUA造模的潜力。例如, Hong等^[21]报道了仅高蛋白喂饲可诱导家鸡出现长期稳定的HUA, 且并发了痛风和肾损伤; 这与人类临床HUA的发病原理相似。当然, 考虑到鸟类与人类在物种谱系上相距较远, 研究者们尚需进一步研究以确定鸟类HUA造模的意义。

2 高尿酸肾病的病理学分子机制

2.1 HUA诱导的氧化应激损伤肾脏

人们早已认识到尿酸在细胞内外表现出不同的氧化特性, 即在细胞外表现出抗氧化性, 而在细胞内则诱导氧化应激。尿酸诱导的氧化应激对血管内皮细胞和肾小管上皮细胞产生损伤被认为是高尿酸肾病的重要致病机制^[22]。目前, 人们认为尿酸是通过黄嘌呤氧化酶(xanthine oxidase, XO)、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶[nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase, NOX]和线粒体3种途径诱导氧化应激^[23]。

黄嘌呤氧化还原酶(xanthine oxidoreductase, XOR)有黄嘌呤脱氢酶(xanthine dehydrogenase, XDH)和XO两种存在形式, 作用是氧化黄嘌呤和次黄嘌呤生成尿酸, 区别是XDH用NAD⁺为底物并产生NADH, 而XO用O₂为底物产生O₂⁻或H₂O₂。血管内皮中, XOR多以XO形式存在。生理条件下, XO产生适量的活性氧(reactive oxygen species, ROS), 而ROS在血管中起抗感染作用^[23]; 在病理条件下, XO大量氧化黄嘌呤, 生成过多尿酸和ROS, 引起继发损伤。更有趣的是, 其他来源的ROS可以增强XO活性, 并通过XO产生更多的ROS^[24]。这种ROS生成的正反馈是一种抗感染机制, 但也会成为细胞损伤的帮手^[25]。这也意味着, 在一些细胞中XO即使少量, 也可能被ROS过度激活, 而成为产生ROS的主要来源^[26]。

NOX的主要功能是催化ROS生成。NOX2在中性粒细胞中大量表达, 激活时产生的大量ROS可杀伤病原体, 起到防御功能。NOX4在成人肾中表达最多, 在内皮细胞、平滑肌细胞和成纤维细胞中也有表达。在针对尿酸与动脉粥样硬化关系的研究中发现, 尿酸可刺激各种细胞中NOX产生ROS, 引起细胞内NO生物利用度降低、内皮素-1(endothelin-1, EP-1)表达增加、蛋白硝基化和脂质过氧化^[22,27]等, 这些都是引

发炎症和内皮病变的上游因素。值得注意的是, ROS 不仅是一种效应分子, 还是细胞信号转导的第二信使。例如, Chao 等^[27] 通过体外实验发现, 在人动脉平滑肌细胞中, 尿酸刺激产生的 ROS 通过细胞外信号调节激酶 (extracellular regulated protein kinases, ERK) - 激活蛋白 1 (activator protein-1, ERK-AP1) 诱导 ET1 表达; Sautin 等^[22] 发现尿酸通过激活 NOX 产生的 ROS 在脂肪细胞中可引起丝裂原活化蛋白激酶 p38 和 ERK1/2 表达增加; Zhuang 等^[28] 研究显示, 尿酸刺激产生的 ROS 通过激活 ERK1/2 引起肾系膜细胞增殖。事实上, Sautin 等^[22] 研究还发现, 在前脂肪细胞中, 尿酸无法通过 NOX 增加 ROS, 这可能是由于成熟脂肪细胞有更多的基础 ROS。总的来说, 尿酸与 NOX-ROS 系统之间的交互作用比较复杂; 由于 NOX 在肾脏中具有特异性, 因此推测进一步研究肾 NOX4 也许可以帮助人们更深刻地了解高尿酸肾病发生过程中的氧化应激现象。

线粒体作为细胞能量代谢的中心和氧化磷酸化的场所, 其通过电子传递产生 ROS。许多研究显示, 长期的 HUA 会导致线粒体紊乱。Cristóbal-García 等^[29] 同时建立了大鼠的短期和长期 HUA 模型, 研究认为 HUA 是通过长期氧化应激导致线粒体紊乱; Hong 等^[30] 的体外实验结果显示, 尿酸通过未知方式改变人脐静脉内皮细胞的线粒体钠钙交换蛋白通透性, 引起线粒体钙超载; Su 等^[31] 则认为, Rho 及其相关激酶 (Rho-associated kinase, ROCK) 信号通路发挥作用。作为细胞能量代谢中心, 线粒体与细胞凋亡、5' 磷酸腺苷活化的蛋白激酶 [adenosine 5'-monophosphate (AMP) -activated protein kinase, AMPK] 通路、哺乳动物雷帕霉素靶向蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 等都有密切联系, 尿酸通过线粒体途径产生的 ROS 将对细胞产生深远影响^[32]。

继发于氧化应激的肾损伤表现在很多方面, 包括炎症因子释放、干扰 NO 功能、DNA 损伤、诱导细胞凋亡等^[32-33]。值得一提的是, Komori 等^[34] 通过体外研究发现了一个继发于氧化应激的细胞内尿酸累积机制, 即人脐静脉内皮细胞中尿酸诱导的 ROS 抑制蛋白激酶 B (protein kinase B, PKB, 即 Akt) 磷酸化, 导致膜定位的 ABCG2 减少, 进而使尿酸外排受阻并在细胞内积累, 最终引起内皮细胞功能障碍。

2.2 HUA 引起肾脏炎症

2.2.1 尿酸晶体引起的炎症

MSU 的促炎作用是公认的^[35]。MSU 是一种损伤相关分子模式 (damage associated molecular pattern,

DAMP) 分子, 会被抗原呈递细胞表面的模式识别受体 (pattern recognition receptor, PPR) 识别, 由此激活免疫系统^[36]。在这个过程中, 巨噬细胞可能起到了关键作用, 包括核因子 κ B (nuclear factor kappa-B, NF- κ B) 通路激活、趋化因子释放与炎症细胞募集、高迁移率族蛋白 B1 (high mobility group box 1 protein, HMGB1) 及炎症因子的释放等^[37-38]。Valimäki 等^[39] 通过体外实验发现, MSU 能强化由脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 激活的人原代巨噬细胞, 通过 Src/富含脯氨酸的蛋白酪氨酸激酶 2 (proline-rich tyrosine kinase 2, Pyk2) /磷脂酰肌醇-3-激酶 (phosphoinositide 3-kinase, PI3K) 信号通路分泌组织蛋白酶 (cathepsin)、白细胞介素 (interleukin, IL)、干扰素 (interferon, IFN) 等, 产生更强大的炎症风暴。NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 (NOD-like receptor protein 3, NLRP3) 是人类先天免疫的重要组成部分, 近年来其在肾炎中的作用备受关注。NLRP3 小体有 3 个部分: 核苷酸结合寡聚化结构域 (nucleotide-binding oligomerization domain, NOD) 样受体蛋白、衔接蛋白即凋亡相关斑点样蛋白 (apoptosis-associated speck-like protein containing CARD, ASC) 和效应蛋白即半胱天冬酶 1 前体 (procaspase-1)^[40]。MSU 作为 DAMP, 可以被 NOD 样受体识别, 激活 NLRP3, 而后 ASC 的 C 端募集并剪切 procaspase-1 为 caspase-1, 后者进一步剪切 IL-1 和 IL-18 的前体 proIL-1 和 proIL-18 为 IL-1 和 IL-18, 产生下游的炎症瀑布。而 proIL-1 和 proIL-18 可以来自 MSU 介导 Toll 样受体 (toll-like receptor, TLR) 对 NF- κ B 的激活^[41]。活化的 caspase-1 还可以将活化的消皮素 (gasdermin D, GSDMD) 剪切为 GSDMD-N, 启动细胞焦亡^[42]。除了激活先天免疫外, MSU 还激活适应性免疫。与经典的 T 细胞活化途径不同, MSU 在没有抗原呈递细胞的情况下能直接激活 T 细胞并刺激其增殖^[43]。最后, 值得一提的是, MSU 引起细胞损伤的机制并不完全依赖于炎症反应, 它还可以通过氢键和疏水键黏附在肾脏上皮细胞上, 从而引起细胞损伤^[44]。

2.2.2 游离尿酸引起的炎症

游离尿酸能否引起炎症尚存在争议, 但大量的证据使人们倾向于认为游离尿酸具有促炎作用^[45]。上文已经提到尿酸在细胞内的促氧化作用及其与 NOX、ERK9 通路的联系, 而 ROS 激活 NLRP3 的机制尚不清楚^[33]。一种可能的解释是, ROS 增加促使硫氧还蛋白相互作用蛋白 (thioredoxin interacting protein, TXNIP)

与NLRP3结合,并激活NLRP3^[46]。有趣的是,线粒体与NLRP3具有关联性。首先,损伤的线粒体通过释放ROS激活NLRP3;其次,损伤的线粒体导致乙酰化 α 微管蛋白累积,有助于ASC以动力蛋白依赖的方式靠近NLRP3^[47];再者,线粒体本身通过内膜心磷脂向外膜转移,提供信号平台参与NLRP3的活化^[40,48]。由此可见,游离尿酸、ROS、线粒体、NLRP3这4者之间的关系是非常复杂的。最后,Xiao等^[49]使用人原代近端小管上皮细胞进行体外实验发现,TLR4在游离尿酸激活NLRP3的过程中是不可或缺的;Crisan等^[50]发现,游离尿酸破坏人外周血单核细胞中IL-1 β /IL-1受体拮抗剂(interleukin-1 receptor antagonist, IL-1Ra)平衡。以上这些研究均有待动物实验的证实。

AMPK是一种丝氨酸/苏氨酸激酶,可感受细胞能量代谢并做出调节。活化的AMPK通过抑制mTOR1来抑制缺氧诱导因子1 α (hypoxia inducible factor-1 alpha, HIF-1 α)和NOX。许多研究认为,游离的尿酸抑制了AMPK活化,增加了HIF-1 α 和NOX来源的ROS^[51],进而激活NLRP3。事实上,HIF-1 α 也是促进细胞上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)和纤维化的因子之一^[52]。Yang等^[53]用脂联素激活近端肾小管上皮细胞中的AMPK,观察到在体外尿酸引起的肾近端小管上皮细胞炎症得到缓解。

Yin等^[54]发现在人脐静脉内皮细胞中,游离尿酸也可能通过K⁺外流促进NLRP3小体激活,但尚不清楚ROS在这一过程中发挥的作用。值得注意的是,Na⁺-K⁺-ATP酶(NKA)的损伤可能同时造成了K⁺外流与NLRP3的激活。Xiao等^[55]发现,尿酸引起近端肾小管上皮细胞中NKA活性下降,后者与Src蛋白解偶联,Src蛋白被激活,进而激活NLRP3炎症小体。Xiao等^[56]进一步研究发现,AMPK的激活可以逆转上述过程。考虑到线粒体为NKA提供ATP,研究人员认为尿酸可能是通过线粒体对NKA产生损伤的。

近年来,也有研究提出了不支持游离尿酸促炎作用的证据。例如,Ma等^[57]通过*Glut9*基因敲除小鼠实验,试图说明尿酸在肾功能不全中充当先天免疫的负向调节剂;Sellmayr等^[58]同样使用*Glut9*基因敲除小鼠进行实验,结果显示游离尿酸对慢性肾病的进展无促进作用;Alberts等^[59]在体外培养条件下用游离尿酸刺激人原代单核细胞和人急性单核细胞白血病细胞系,实验结果支持游离尿酸不激活先天免疫;而且Brovold等^[35]使用健康男性来源的全血悬液,得到了

与Alberts一致的结论。最值得注意的是,Ma等^[60]提出不同的游离尿酸制备方法是不同实验产生矛盾结果的原因。有的方法会导致微小MSU析出,以致于被有的实验误认为是由游离尿酸引起的致炎作用,实际上是由微小MSU产生的。

2.3 HUA引起的自噬对肾病的影响

自噬是一种细胞自净行为,该过程通过溶酶体途径降解受损细胞器和错误折叠的蛋白,对细胞起保护作用^[61]。自噬与炎症具有拮抗关系。自噬激活后通过靶向泛素化炎症小体,促进后者降解以缓解尿酸导致的炎症,包括减少ROS产生和阻断下游炎症反应^[62-63]。Hu等^[64]通过大鼠实验进一步支持了这一点。需要指出的是,AMPK是自噬的重要激活剂。作为细胞能量代谢的监察者,AMPK被AMP/ATP的失衡激活,通过磷酸化Unc-51样激酶1(UNC-51-like Kinase 1, ULK1)、抑制mTOR1、磷酸化叉头转录因子O亚型(forkhead box O 3, FOXO)激活自噬^[65]。激活AMPK可缓解尿酸引起的炎症也可能与自噬有关。

有趣的是,许多研究发现了自噬对高尿酸肾病的负面作用。Bao等^[63]同时做了大鼠肾间质成纤维细胞的体外实验和大鼠体内实验,证实自噬抑制剂3-MA可缓解高尿酸肾病大鼠的肾纤维化。对此可能的解释是,在尿酸对细胞的长期刺激过程中,自噬通过长期抑制急性炎症,诱使细胞在表观遗传学层面发展为慢性低度炎症。Hu等^[66]通过体外实验提出了另一个解释:研究人员发现抑制自噬避免了人肾近曲小管上皮细胞系HK-2细胞的焦亡,认为自噬引起炎症的原因可能是破裂的自噬泡释放了组织蛋白酶B(cathepsin B, CTSB),后者是NLRP3的强激活剂。Hu与先前Maejima的观点部分冲突。Maejima等^[36]认为MSU作为异常入侵物被溶酶体识别并包裹,但溶酶体并不能降解MSU。当溶酶体被内含的MSU损伤时,另一个溶酶体会来吞噬这个受损的溶酶体,从而避免溶酶体酶的外释^[67]。

2.4 高尿酸肾病中的肾纤维化

肾纤维化是慢性肾病的终末期表现,包括肾小球硬化和肾小管间质纤维化。有证据表明,HUA通过肾小球硬化和肾小管间质纤维化引起或加剧慢性肾病^[36]。

2.4.1 肾小球硬化

上皮间质转化(endothelial-to-mesenchymal transition, EndoMT)是肾小球硬化以及肾纤维化的重要原因。上文已提到尿酸对血管内皮细胞的影响包括

促进ROS生成、降低NO生物利用度、增加ET-1表达等。ET-1是缩血管剂，NO是扩血管剂，二者的长期失衡可能引起继发于高血压的肾小球动脉硬化^[68]，后期可导致EndoMT。近年来，Yang等^[69]通过体外实验证明，尿酸激活了人脐静脉内皮细胞的RAS系统，提高了肾素（原）受体〔（pro）renin receptor, PRR〕的表达，而PRR被认为是促进肾纤维化的因素之一^[70]。Ko等^[71]兼顾了体内体外实验，发现尿酸通过诱导氧化应激和糖萼脱落诱导人脐静脉内皮细胞的间质化转变。总的来说，尿酸对EndoMT的作用机制尚需进一步阐明。另外，尿酸对肾小球系膜细胞（glomerular mesangial cells, MCs）的影响也可能参与了肾小球硬化的过程。上文已提到，Zhuang等^[28]认为尿酸通过NOX-ROS激活ERK1/2，扩增了MCs，而Albertoni等^[72]则认为血管紧张素II在系膜细胞增殖中起到了关键作用。

2.4.2 肾小管间质纤维化

尿酸诱导的肾小管间质纤维化中，EMT起到了重要的作用^[73]。EMT发生的经典途径是，转化生长因子（transforming growth factor β , TGF- β ）激活TGF- β 受体复合物，磷酸化Samd2/3，后者从受体上解离并与细胞质中的Samd4形成复合物，在细胞核中作用于转录调节因子Slug/Snail，而Slug/Snail抑制E-钙黏蛋白（E-cadherin, E-Cad）表达，诱发EMT^[74]。Jak/信号传导和转录激活因子（janus kinase/signal transducers and activators of transcription, STAT）通路与TGF- β /Samd通路有交叉。Ren等^[75]用非瑟汀同时抑制高尿酸肾病模型小鼠的Jak/STAT与TGF- β /Samd通路或许能佐证这一点。Wang等^[76]用基因敲除小鼠证明，NLRP3通过增强TGF- β 1信号转导和激活Smad2/3来促进肾小管EMT，且该作用仅需要NLRP3而不是完整的炎症小体参与，提示尿酸介导NLRP3启动EMT的途径。事实上，先前Romero等^[77]就已经发现了Samd与NLRP3的共定位作用，尽管至今不知道二者产生联系的具体机制。Tao等^[78]研究发现，用ERK1/2抑制剂可减轻尿酸诱导的大鼠肾上皮EMT，并且ERK1/2可以直接与Snail启动子区域结合，调节Snail表达。Zha等^[79]认为ERK1/2的活化促进了ET-1的表达，进而诱导EMT发生。有趣的是，ERK1/2还通过调节其配体Jagged-1的表达来调节Notch信号转导，并通过多个反馈回路与Wnt/ β -catenin通路相连^[78]。 β -catenin是一种完整的E-钙黏蛋白。E-钙黏蛋白是snail的下游产物之一，也是EMT的标志物之一。研究表明，Wnt/ β -catenin

通路在肾小管上皮细胞中与MMPs有关，且持续激活会损伤肾小管细胞^[80]。另外，Zhao等^[81]通过大鼠模型研究发现，血清反应蛋白（serum response factor, SRP）在尿酸所致的肾小管上皮EMT中发挥作用。Shi等^[82]通过体内体外实验发现，抑制zeste同源物2增强子可缓解EMT，这为治疗HUA诱发的慢性肾脏疾病提供了新思路。

2.5 HUA通过改变肠道微生物损害肾脏

人肠道微生物有约1950种^[83]，它们维持着肠道环境稳态并影响宿主的新陈代谢，另外有1/3的尿酸通过肠道排泄。随着高尿酸患者与正常人之间肠道菌群存在显著差异的报道以及“肠-肾轴”的提出^[84-85]，人们推测研究肠道微生物群在高尿酸肾病中的作用或许能给高尿酸肾病的预防和治疗带来新的可能性。首先，因为短链脂肪酸（short chain fatty acids, SCFAs）对慢性肾病具有保护作用，生产SCFAs的相关菌株丢失可能是高尿酸肾病的致病因素之一^[86]。SCFAs的作用包括：丙酸盐和丁酸盐（2种SCFAs）为肠上皮细胞提供了能量，以促进尿酸通过主动转运排泄^[87]；丁酸能调节免疫细胞，减少炎症反应^[88]；SCFAs通过改善胰岛素抵抗，降低血尿酸。其次，肠道微生物改变会影响尿酸的肠肝循环。Pan等^[89]发现，高尿酸肾病大鼠肠道中能分解尿酸的菌株丰度显著增加，这会促进尿素肠肝循环，导致血清尿素升高，加重肾损伤。再次，病理状态下的肠道微生物群通过破坏肠壁来促进高尿酸肾病：肠道菌群失调使肠壁受损，通透性增加，细菌或细菌产物（如脂多糖）入血，促进炎症反应，而慢性炎症又进一步使肠道微生物失调，形成恶性循环^[90]。最后，Zhao等^[91]发现一些乳酸杆菌通过与XO竞争性地消化嘌呤而减少尿酸生成，而乳酸杆菌是常见的益生菌，这提示高嘌呤饮食引起的HUA可能与肠道微生物分解嘌呤过少有关。

上述这些机制研究结果说明不良的肠道微生物群对肾产生负面影响，但不能回答这样的不良微生物群究竟是继发于HUA还是继发于肾损伤，又或是造成HUA的原因同时引起了肠道微生物改变。Liu等^[92]将HUA造模大鼠的粪便移植到用抗生素喂养的非造模大鼠肠道内，发现后者的血清尿酸升高，但尿素氮（blood urea nitrogen, BUN）、血清肌酐（serum creatinine, Scr）等肾功能指标没有显著改变，这说明HUA对肾的致病作用至少不完全依赖肠道微生物；同时，他们发现与不饲喂抗生素的HUA大鼠相比，饲喂抗生素的HUA大鼠显示有更低的血尿酸浓度，但肾功能指标没

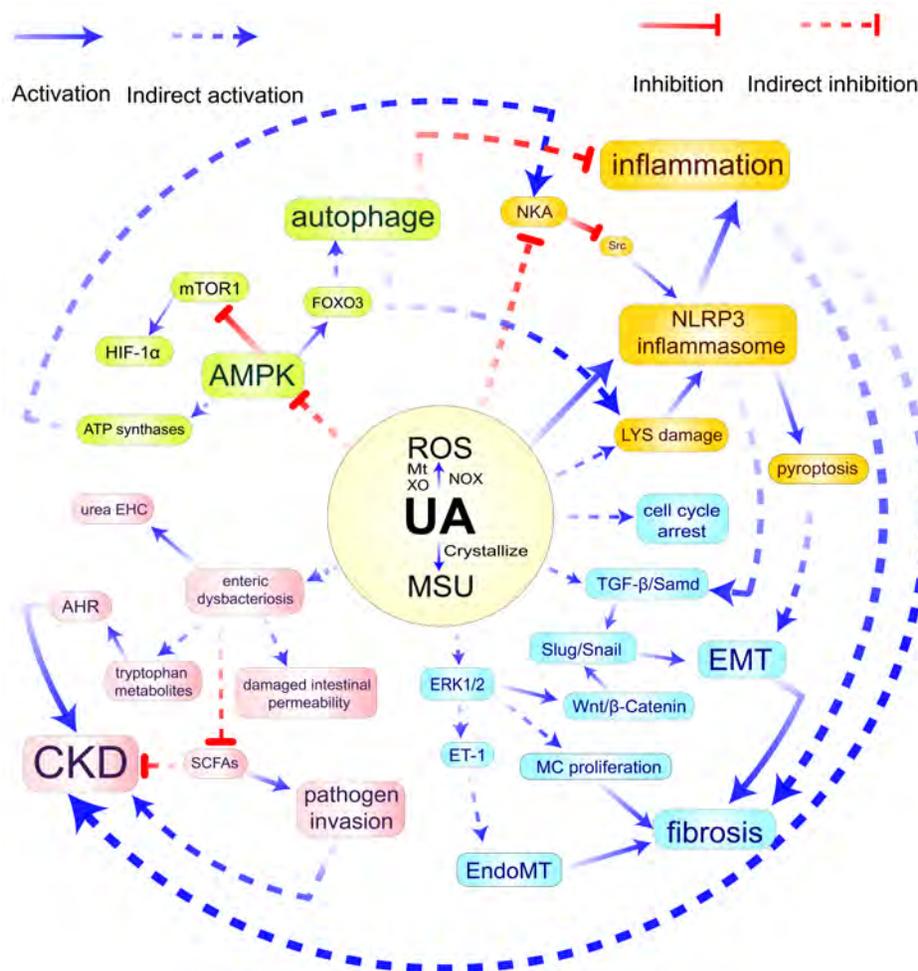
有显著差别, 这或许提示高尿酸诱导肾病过程中肠道微生物的作用很有限。当然, 以上推论尚缺乏进一步的研究支持。值得一提的是, 由于技术限制, 目前大量研究仅在“属”水平以上讨论微生物。在未来, 为了进一步探究血尿酸、肠道微生物和慢性肾炎之间的因果联系, 解释肠道微生物群被影响和产生影响的分子机制, 定位特定菌株是必要的。

3 总结与展望

以上从氧化应激、炎症、自噬和纤维化几个方面回顾了近年来人们对高尿酸肾病病理学分子机制的研究进展, 总结如图1所示。随着高尿酸肾病受重视程

度的增加、基础医学的发展和组学技术的进步, 高尿酸肾病的致病机制将在微观上被阐释得越来越清晰, 这对讨论HUA与慢性肾病之间的因果关系, 尤其是关于游离性尿酸促炎作用的微观解释具有重要意义, 因为这决定了轻度/无症状HUA是否是慢性肾病的独立致病因素, 也将决定相关指南对HUA管理的临床建议。

目前, 美国风湿病学会推荐将别嘌醇或非布索坦作为一线降酸药^[93], 这两种药物也是治疗高尿酸肾病的最常用药。然而, 别嘌醇容易引起严重的过敏反应, 且其排泄依赖于肾功能的完整性, 所以其使用往往有剂量限制^[15]。非布索坦则被报道有可能与心血管疾病意外的发生率相关, 并且相比别嘌醇而言,



注: HUA, 高尿酸血症; NOX, 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶; Mt, 线粒体; XO, 黄嘌呤氧化酶; MSU, 单钠尿酸盐; LYS, 溶酶体; EMT, 上皮间质转化; MC, 肾小球系膜细胞; EndoMT, 血管内皮细胞间质化; SCFAs, 短链脂肪酸; AHR, 芳香族氨基酸受体; ET-1, 内皮素-1; NKA, 钠钾ATP酶; urea EHC, 尿素肠肝循环; ROS, 活性氧; CKD, 慢性肾病。

Note: HUA, Hyperuricemia; NOX, Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase; Mt, Mitochondria; XO, Xanthine oxidase; MSU, Monosodium urate; LYS, Lysosome; EMT, Epithelial-mesenchymal transition; MC, Mesangial cells; EndoMT, Endothelial-to-mesenchymal transition; SCFAs, Short-chain fatty acids; AHR, Aryl Hydrocarbon receptor; ET-1, Endothelin-1; NKA, Sodium-potassium ATPase; urea EHC, Urea enterohepatic circulation; ROS, Reactive oxygen species; CKD, Chronic kidney disease.

图1 高尿酸肾病的病理学分子机制示意图

Figure 1 Pathological molecular mechanism of hyperuricemic nephropathy

其全因死亡率和心血管相关的死亡率有所提升^[94]。实际临床上,因考虑到HUA患者常合并有代谢综合征、高血压、心肾疾病等心血管意外危险因素,非布索坦已很少被使用^[15]。本文中所述的高尿酸肾病病理学分子机制研究结果提示,有一些蛋白或许具有成为新药靶点的潜力,可以通过减少ROS生成、灭活炎症小体、调节自噬、阻断EMT等预防、缓解或逆转HUA引起的慢性肾病。

此外,中药对高尿酸肾病的疗效也值得关注。如Liu等^[95]通过大鼠实验证明,“滋肾清热通络药方”可调节TGF- β -Smad通路,改善肾脂肪氧化与纤维化;Li等^[96]肯定了石菖介导尿酸盐转运蛋白的降尿酸作用。另外,肠道微生物群失调是高尿酸肾病的发病机制之一,对此已经发现一些中草药或药方可通过调节肠道微生物起到降酸和抗炎作用,如山茶^[97]、“祛浊通痹汤”^[98]。

目前,研究人员对高尿酸肾病的病理机制研究还存在争议和疑问。因此,对高尿酸肾病病理机制的研究思路需进一步拓展。在氧化应激方面,尿酸是如何损伤线粒体的?在炎症方面,游离的尿酸到底有没有起作用?在自噬方面,自噬到底起到了正面还是负面的效果?在肾纤维化方面,尿酸到底如何启动肾小管上皮EMT?肠道微生物方面,究竟是哪种菌株,造成了什么程度的影响?这些将是下一阶段的研究方向。值得一提的是,在高尿酸肾病研究中,离体实验与动物实验的模型都远较临床简单,大多不能体现出临床情况的复杂性。时常有研究人员能在离体的人脐静脉内皮细胞或肾小管上皮细胞研究中得出积极的结果,但难以在动物体内得到验证。考虑到在长期进化中机体与尿酸氧化酶具有协同作用,啮齿类动物的实验结果亦可能与灵长类相去甚远。因此,造模方式或者造模动物的新选择或许能够给高尿酸相关的研究带来质的飞跃。

[作者贡献 Author Contribution]

包方奇负责论文撰写和修改;
屠海焯、方明笋和张倩参与论文撰写讨论和修改;
陈民利提出撰写思路,并负责撰写指导。

[利益声明 Declaration of Interest]

所有作者均声明本文不存在利益冲突。

[参考文献 References]

[1] EL RIDI R, TALLIMA H. Physiological functions and pathogenic potential of uric acid: a review[J]. *J Adv Res*, 2017,

8(5):487-493. DOI: 10.1016/j.jare.2017.03.003.

- [2] DEMIRAY A, AFSAR B, COVIC A, et al. The role of uric acid in the acute myocardial infarction: a narrative review[J]. *Angiology*, 2022, 73(1):9-17. DOI: 10.1177/00033197211012546.
- [3] ZOPPINI G, TARGHER G, CHONCHOL M, et al. Serum uric acid levels and incident chronic kidney disease in patients with type 2 diabetes and preserved kidney function[J]. *Diabetes Care*, 2012, 35(1):99-104. DOI: 10.2337/dc11-1346.
- [4] BADVE S V, PASCOE E M, TIKU A, et al. Effects of allopurinol on the progression of chronic kidney disease[J]. *N Engl J Med*, 2020, 382(26):2504-2513. DOI: 10.1056/NEJMoa1915833.
- [5] DORIA A, GALECKI A T, SPINO C, et al. Serum urate lowering with allopurinol and kidney function in type 1 diabetes[J]. *N Engl J Med*, 2020, 382(26): 2493-2503. DOI: 10.1056/NEJMoa1916624.
- [6] BELLOMO G, VENANZI S, VERDURA C, et al. Association of uric acid with change in kidney function in healthy normotensive individuals[J]. *Am J Kidney Dis*, 2010, 56(2):264-272. DOI: 10.1053/j.ajkd.2010.01.019.
- [7] GOLDBERG A, GARCIA-ARROYO F, SASAI F, et al. Mini review: reappraisal of uric acid in chronic kidney disease[J]. *Am J Nephrol*, 2021, 52(10-11):837-844. DOI: 10.1159/000519491.
- [8] SATO Y, FEIG D I, STACK A G, et al. The case for uric acid-lowering treatment in patients with hyperuricaemia and CKD [J]. *Nat Rev Nephrol*, 2019, 15(12):767-775. DOI: 10.1038/s41581-019-0174-z.
- [9] LU J, DALBETH N, YIN H Y, et al. Mouse models for human hyperuricaemia: a critical review[J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2019, 15(7):413-426. DOI: 10.1038/s41584-019-0222-x.
- [10] YANAI H, ADACHI H, HAKOSHIMA M, et al. Molecular biological and clinical understanding of the pathophysiology and treatments of hyperuricemia and its association with metabolic syndrome, cardiovascular diseases and chronic kidney disease[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(17):9221. DOI: 10.3390/ijms22179221.
- [11] MACÍAS N, GOICOECHEA M, DE VINUESA M S, et al. Urate reduction and renal preservation: what is the evidence? [J]. *Curr Rheumatol Rep*, 2013, 15(12): 386. DOI: 10.1007/s11926-013-0386-3.
- [12] RAFAY M A, LIPKOWITZ M S, LEAL-PINTO E, et al. Uric acid transport[J]. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2003, 12(5): 511-516. DOI: 10.1097/00041552-200309000-00005.
- [13] EJAZ A A, NAKAGAWA T, KANBAY M, et al. Hyperuricemia in kidney disease: a major risk factor for cardiovascular events, vascular calcification, and renal damage[J]. *Semin Nephrol*, 2020, 40(6):574-585. DOI: 10.1016/j.semnephrol.2020.12.004.
- [14] MCCORMICK N, O'CONNOR M J, YOKOSE C, et al. Assessing the causal relationships between insulin resistance and hyperuricemia and gout using bidirectional Mendelian randomization[J]. *Arthritis Rheumatol*, 2021, 73(11):2096-2104. DOI: 10.1002/art.41779.
- [15] RAMOS G K, GOLDFARB D S. Update on uric acid and the kidney[J]. *Curr Rheumatol Rep*, 2022, 24(5): 132-138. DOI:

- 10.1007/s11926-022-01069-3.
- [16] 张璐, 杨定位. 高尿酸血症肾病的诊治进展[J]. 中华临床医师杂志(电子版), 2019, 13(6):457-462. DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2019.06.011.
ZHANG L, YANG D W. Progress in diagnosis and treatment of hyperuricemic nephropathy[J]. Chin J Clin Electron Ed, 2019, 13(6):457-462. DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2019.06.011.
- [17] 卢忠英, 郁建平, 朱梦琪, 等. 不同组合造模剂诱导大鼠高尿酸血症模型的比较研究[J]. 山地农业生物学报, 2014, 33(5):40-42, 67. DOI: 10.15958/j.cnki.sdnyswxb.2014.05.009.
LU Z Y, YU J P, ZHU M Q, et al. Comparative study of different combinations of modeling agent-induced rat model of hyperuricemia[J]. J Mt Agric Biol, 2014, 33(5):40-42, 67. DOI: 10.15958/j.cnki.sdnyswxb.2014.05.009.
- [18] DEBOSCH B J, KLUTH O, FUJIWARA H, et al. Early-onset metabolic syndrome in mice lacking the intestinal uric acid transporter SLC2A9[J]. Nat Commun, 2014, 5: 4642. DOI: 10.1038/ncomms5642.
- [19] ZHU L R, DONG Y F, NA S, et al. Saponins extracted from *Dioscorea collettii* rhizomes regulate the expression of urate transporters in chronic hyperuricemia rats[J]. Biomed Pharmacother, 2017, 93: 88-94. DOI: 10.1016/j.biopha.2017.06.022.
- [20] BEN SALEM C, SLIM R, FATHALLAH N, et al. Drug-induced hyperuricaemia and gout[J]. Rheumatology, 2017, 56(5): 679-688. DOI: 10.1093/rheumatology/kew293.
- [21] HONG F, ZHENG A J, XU P F, et al. High-protein diet induces hyperuricemia in a new animal model for studying human gout[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(6): 2147. DOI: 10.3390/ijms21062147.
- [22] SAUTIN Y Y, NAKAGAWA T, ZHARIKOV S, et al. Adverse effects of the classic antioxidant uric acid in adipocytes: NADPH oxidase-mediated oxidative/nitrosative stress[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2007, 293(2): C584-C596. DOI: 10.1152/ajpcell.00600.2006.
- [23] KIMURA Y, TSUKUI D, KONO H. Uric acid in inflammation and the pathogenesis of atherosclerosis[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(22):12394. DOI: 10.3390/ijms222212394.
- [24] WAHEED Y, YANG F, SUN D. Role of asymptomatic hyperuricemia in the progression of chronic kidney disease and cardiovascular disease[J]. Korean J Intern Med, 2021, 36(6):1281-1293. DOI: 10.3904/kjim.2020.340.
- [25] GHERGHINA M E, PERIDE I, TIGLIS M, et al. Uric acid and oxidative stress-relationship with cardiovascular, metabolic, and renal impairment[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(6):3188. DOI: 10.3390/ijms23063188.
- [26] ELEFTHERIADIS T, PISSAS G, ANTONIADI G, et al. Allopurinol protects human glomerular endothelial cells from high glucose-induced reactive oxygen species generation, p53 overexpression and endothelial dysfunction[J]. Int Urol Nephrol, 2018, 50(1):179-186. DOI: 10.1007/s11255-017-1733-5.
- [27] CHAO H H, LIU J C, LIN J W, et al. Uric acid stimulates endothelin-1 gene expression associated with NADPH oxidase in human aortic smooth muscle cells[J]. Acta Pharmacol Sin, 2008, 29(11): 1301-1312. DOI: 10.1111/j.1745-7254.2008.00877.x.
- [28] ZHUANG Y B, FENG Q C, DING G X, et al. Activation of ERK1/2 by NADPH oxidase-originated reactive oxygen species mediates uric acid-induced mesangial cell proliferation[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2014, 307(4): F396-F406. DOI: 10.1152/ajprenal.00565.2013.
- [29] CRISTÓBAL-GARCÍA M, GARCÍA-ARROYO F E, TAPIA E, et al. Renal oxidative stress induced by long-term hyperuricemia alters mitochondrial function and maintains systemic hypertension[J]. Oxid Med Cell Longev, 2015, 2015: 535686. DOI: 10.1155/2015/535686.
- [30] HONG Q, QI K, FENG Z, et al. Hyperuricemia induces endothelial dysfunction via mitochondrial $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger-mediated mitochondrial calcium overload[J]. Cell Calcium, 2012, 51(5):402-410. DOI: 10.1016/j.ceca.2012.01.003.
- [31] SU Y, HU L T, WANG Y N, et al. The Rho kinase signaling pathway participates in tubular mitochondrial oxidative injury and apoptosis in uric acid nephropathy[J]. J Int Med Res, 2021, 49(6): 3000605211021752. DOI: 10.1177/03000605211021752.
- [32] YANG L J, CHANG B C, GUO Y L, et al. The role of oxidative stress-mediated apoptosis in the pathogenesis of uric acid nephropathy[J]. Ren Fail, 2019, 41(1): 616-622. DOI: 10.1080/0886022X.2019.1633350.
- [33] BRAGA T T, FORNI M F, CORREA-COSTA M, et al. Soluble uric acid activates the NLRP3 inflammasome[J]. Sci Rep, 2017, 7:39884. DOI: 10.1038/srep39884.
- [34] KOMORI H, YAMADA K, TAMAI I. Hyperuricemia enhances intracellular urate accumulation via down-regulation of cell-surface BCRP/ABCG2 expression in vascular endothelial cells [J]. Biochim Biophys Acta Biomembr, 2018, 1860(5): 973-980. DOI: 10.1016/j.bbmem.2018.01.006.
- [35] BROVOLD H, LUND T, SVISTOUNOV D, et al. Crystallized but not soluble uric acid elicits pro-inflammatory response in short-term whole blood cultures from healthy men[J]. Sci Rep, 2019, 9:10513. DOI: 10.1038/s41598-019-46935-w.
- [36] SU H Y, YANG C, LIANG D, et al. Research advances in the mechanisms of hyperuricemia-induced renal injury[J]. Biomed Res Int, 2020, 2020: 5817348. DOI: 10.1155/2020/5817348.
- [37] YE Y, ZHANG Y, WANG B, et al. CXCR1/CXCR2 antagonist G31P inhibits nephritis in a mouse model of uric acid nephropathy[J]. Biomed Pharmacother, 2018, 107: 1142-1150. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.07.077.
- [38] CHOE J Y, CHOI C H, PARK K Y, et al. High-mobility group box 1 is responsible for monosodium urate crystal-induced inflammation in human U937 macrophages[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2018, 503(4):3248-3255. DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.08.139.
- [39] VÄLIMÄKI E, MIETTINEN J J, LIETZÉN N, et al. Monosodium urate activates Src/Pyk2/PI₃ kinase and cathepsin dependent

- unconventional protein secretion from human primary macrophages[J]. *Mol Cell Proteomics*, 2013, 12(3): 749-763. DOI: 10.1074/mcp.M112.024661.
- [40] WANG M, LIN X, YANG X M, et al. Research progress on related mechanisms of uric acid activating NLRP3 inflammasome in chronic kidney disease[J]. *Ren Fail*, 2022, 44(1):615-624. DOI: 10.1080/0886022X.2022.2036620.
- [41] ISAKA Y, TAKABATAKE Y, TAKAHASHI A, et al. Hyperuricemia-induced inflammasome and kidney diseases [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2016, 31(6):890-896. DOI: 10.1093/ndt/gfv024.
- [42] WANG G H, ZUO T, LI R. The mechanism of Arhalofenate in alleviating hyperuricemia-activating PPAR γ thereby reducing caspase-1 activity[J]. *Drug Dev Res*, 2020, 81(7):859-866. DOI: 10.1002/ddr.21699.
- [43] ELEFTHERIADIS T, PISSAS G, SOUNIDAKI M, et al. Urate crystals directly activate the T-cell receptor complex and induce T-cell proliferation[J]. *Biomed Rep*, 2017, 7(4):365-369. DOI: 10.3892/br.2017.960.
- [44] KOKA R M, HUANG E, LIESKE J C. Adhesion of uric acid crystals to the surface of renal epithelial cells[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2000, 278(6): F989-F998. DOI: 10.1152/ajprenal.2000.278.6.F989.
- [45] JOOSTEN L A B, CRIŞAN T O, BJORNSTAD P, et al. Asymptomatic hyperuricaemia: a silent activator of the innate immune system[J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2020, 16(2):75-86. DOI: 10.1038/s41584-019-0334-3.
- [46] ZHOU R B, TARDIVEL A, THORENS B, et al. Thioredoxin-interacting protein links oxidative stress to inflammasome activation[J]. *Nat Immunol*, 2010, 11(2):136-140. DOI: 10.1038/ni.1831.
- [47] MISAWA T, TAKAHAMA M, KOZAKI T, et al. Microtubule-driven spatial arrangement of mitochondria promotes activation of the NLRP3 inflammasome[J]. *Nat Immunol*, 2013, 14(5):454-460. DOI: 10.1038/ni.2550.
- [48] ELLIOTT E I, MILLER A N, BANOTH B, et al. Cutting edge: mitochondrial assembly of the NLRP3 inflammasome complex is initiated at priming[J]. *J Immunol*, 2018, 200(9): 3047-3052. DOI: 10.4049/jimmunol.1701723.
- [49] XIAO J, ZHANG X L, FU C S, et al. Soluble uric acid increases NALP3 inflammasome and interleukin-1 β expression in human primary renal proximal tubule epithelial cells through the Toll-like receptor 4-mediated pathway[J]. *Int J Mol Med*, 2015, 35(5):1347-1354. DOI: 10.3892/ijmm.2015.2148.
- [50] CRIŞAN T O, CLEOPHAS M C, OOSTING M, et al. Soluble uric acid primes TLR-induced proinflammatory cytokine production by human primary cells via inhibition of IL-1Ra[J]. *Ann Rheum Dis*, 2016, 75(4): 755-762. DOI: 10.1136/annrheumdis-2014-206564.
- [51] KIMURA Y, YANAGIDA T, ONDA A, et al. Soluble uric acid promotes atherosclerosis via AMPK (AMP-activated protein kinase)-mediated inflammation[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2020, 40(3):570-582. DOI: 10.1161/ATVBAHA.119.313224.
- [52] DE FRANCESCO E M, MAGGIOLINI M, MUSTI A M. Crosstalk between Notch, HIF-1 α and GPER in breast cancer EMT[J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(7):2011. DOI: 10.3390/ijms19072011.
- [53] YANG Q M, FU C S, ZHANG X L, et al. Adiponectin protects against uric acid-induced renal tubular epithelial inflammatory responses via the AdipoR1/AMPK signaling pathway[J]. *Int J Mol Med*, 2019, 43(3):1542-1552. DOI: 10.3892/ijmm.2019.4072.
- [54] YIN W, ZHOU Q L, OUYANG S X, et al. Uric acid regulates NLRP3/IL-1 β signaling pathway and further induces vascular endothelial cells injury in early CKD through ROS activation and K⁺ efflux[J]. *BMC Nephrol*, 2019, 20(1):319. DOI: 10.1186/s12882-019-1506-8.
- [55] XIAO J, ZHANG X L, FU C S, et al. Impaired Na⁺-K⁺-ATPase signaling in renal proximal tubule contributes to hyperuricemia-induced renal tubular injury[J]. *Exp Mol Med*, 2018, 50(3): e452. DOI: 10.1038/emm.2017.287.
- [56] XIAO J, ZHU S B, GUAN H C, et al. AMPK alleviates high uric acid-induced Na⁺-K⁺-ATPase signaling impairment and cell injury in renal tubules[J]. *Exp Mol Med*, 2019, 51(5):1-14. DOI: 10.1038/s12276-019-0254-y.
- [57] MA Q Y, IMMMLER R, PRUENSTER M, et al. Soluble uric acid inhibits β 2 integrin-mediated neutrophil recruitment in innate immunity[J]. *Blood*, 2022, 139(23): 3402-3417. DOI: 10.1182/blood.2021011234.
- [58] SELLMAYR M, HERNANDEZ PETZSCHE M R, MA Q Y, et al. Only hyperuricemia with crystalluria, but not asymptomatic hyperuricemia, drives progression of chronic kidney disease [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2020, 31(12): 2773-2792. DOI: 10.1681/ASN.2020040523.
- [59] ALBERTS B M, BARBER J S, SACRE S M, et al. Precipitation of soluble uric acid is necessary for *in vitro* activation of the NLRP3 inflammasome in primary human monocytes[J]. *J Rheumatol*, 2019, 46(9):1141-1150. DOI: 10.3899/jrheum.180855.
- [60] MA Q Y, HONARPISHEH M, LI C Y, et al. Soluble uric acid is an intrinsic negative regulator of monocyte activation in monosodium urate crystal-induced tissue inflammation[J]. *J Immunol*, 2020, 205(3): 789-800. DOI: 10.4049/jimmunol.2000319.
- [61] CHOI A M K, RYTER S W, LEVINE B. Autophagy in human health and disease[J]. *N Engl J Med*, 2013, 368(7): 651-662. DOI: 10.1056/NEJMra1205406.
- [62] SHI C S, SHENDEROV K, HUANG N N, et al. Activation of autophagy by inflammatory signals limits IL-1 β production by targeting ubiquitinated inflammasomes for destruction[J]. *Nat Immunol*, 2012, 13(3):255-263. DOI: 10.1038/ni.2215.
- [63] BAO J F, SHI Y F, TAO M, et al. Pharmacological inhibition of autophagy by 3-MA attenuates hyperuricemic nephropathy [J]. *Clin Sci*, 2018, 132(21):2299-2322. DOI: 10.1042/CS20180563.
- [64] HU J C, WU H, WANG D C, et al. Weicao capsule ameliorates renal injury through increasing autophagy and NLRP3 degradation in UAN rats[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2018, 96:1-8. DOI: 10.1016/j.biocel.2018.01.001.

- [65] HERZIG S, SHAW R J. AMPK: guardian of metabolism and mitochondrial homeostasis[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2018, 19(2):121-135. DOI: 10.1038/nrm.2017.95.
- [66] HU Y, SHI Y F, CHEN H, et al. Blockade of autophagy prevents the progression of hyperuricemic nephropathy through inhibiting NLRP3 inflammasome-mediated pyroptosis[J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 858494. DOI: 10.3389/fimmu.2022.858494.
- [67] MAEJIMA I, TAKAHASHI A, OMORI H, et al. Autophagy sequesters damaged lysosomes to control lysosomal biogenesis and kidney injury[J]. *EMBO J*, 2013, 32(17): 2336-2347. DOI: 10.1038/emboj.2013.171.
- [68] COELHO S C, BERILLO O, CAILLON A, et al. Three-month endothelial human endothelin-1 overexpression causes blood pressure elevation and vascular and kidney injury[J]. *Hypertension*, 2018, 71(1): 208-216. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.117.09925.
- [69] YANG X L, GU J, LV H C, et al. Uric acid induced inflammatory responses in endothelial cells via up-regulating(pro)renin receptor[J]. *Biomedicine Pharmacother*, 2019, 109: 1163-1170. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.10.129.
- [70] REYES-MARTINEZ C, NGUYEN Q M, KASSAN M, et al. (pro) renin receptor-dependent induction of profibrotic factors is mediated by COX-2/EP4/NOX-4/smad pathway in collecting duct cells[J]. *Front Pharmacol*, 2019, 10: 803. DOI: 10.3389/fphar.2019.00803.
- [71] KO J, KANG H J, KIM D A, et al. Uric acid induced the phenotype transition of vascular endothelial cells via induction of oxidative stress and glycocalyx shedding[J]. *FASEB J*, 2019, 33(12):13334-13345. DOI: 10.1096/fj.201901148R.
- [72] ALBERTONI G, MAQUIGUSSA E, PESSOA E, et al. Soluble uric acid increases intracellular calcium through an angiotensin II-dependent mechanism in immortalized human mesangial cells[J]. *Exp Biol Med*, 2010, 235(7): 825-832. DOI: 10.1258/ebm.2010.010007.
- [73] RYU E S, KIM M J, SHIN H S, et al. Uric acid-induced phenotypic transition of renal tubular cells as a novel mechanism of chronic kidney disease[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2013, 304(5): F471-F480. DOI: 10.1152/ajprenal.00560.2012.
- [74] LOVISA S, ZEISBERG M, KALLURI R. Partial epithelial-to-mesenchymal transition and other new mechanisms of kidney fibrosis[J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2016, 27(10):681-695. DOI: 10.1016/j.tem.2016.06.004.
- [75] REN Q, TAO S B, GUO F, et al. Natural flavonol fisetin attenuated hyperuricemic nephropathy via inhibiting IL-6/JAK2/STAT3 and TGF- β /SMAD3 signaling[J]. *Phytomedicine*, 2021, 87:153552. DOI: 10.1016/j.phymed.2021.153552.
- [76] WANG W J, WANG X Y, CHUN J, et al. Inflammasome-independent NLRP3 augments TGF- β signaling in kidney epithelium[J]. *J Immunol*, 2013, 190(3):1239-1249. DOI: 10.4049/jimmunol.1201959.
- [77] ROMERO C A, REMOR A, LATINI A, et al. Uric acid activates NLRP3 inflammasome in an *in-vivo* model of epithelial to mesenchymal transition in the kidney[J]. *J Mol Histol*, 2017, 48(3):209-218. DOI: 10.1007/s10735-017-9720-9.
- [78] TAO M, SHI Y F, TANG L X, et al. Blockade of ERK1/2 by U0126 alleviates uric acid-induced EMT and tubular cell injury in rats with hyperuricemic nephropathy[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2019, 316(4): F660-F673. DOI: 10.1152/ajprenal.00480.2018.
- [79] ZHA D Q, WU S Q, GAO P, et al. Telmisartan attenuates uric acid-induced epithelial-mesenchymal transition in renal tubular cells[J]. *Biomed Res Int*, 2019, 2019: 3851718. DOI: 10.1155/2019/3851718.
- [80] SCHUNK S J, FLOEGE J, FLISER D, et al. WNT- β -catenin signalling—a versatile player in kidney injury and repair[J]. *Nat Rev Nephrol*, 2021, 17(3):172-184. DOI: 10.1038/s41581-020-00343-w.
- [81] ZHAO L, LI C Y, ZHOU B, et al. Crucial role of serum response factor in renal tubular epithelial cell epithelial-mesenchymal transition in hyperuricemic nephropathy[J]. *Aging*, 2019, 11(22):10597-10609. DOI: 10.18632/aging.102479.
- [82] SHI Y F, XU L Q, TAO M, et al. Blockade of enhancer of zeste homolog 2 alleviates renal injury associated with hyperuricemia[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2019, 316(3): F488-F505. DOI: 10.1152/ajprenal.00234.2018.
- [83] ALMEIDA A, MITCHELL A L, BOLAND M, et al. A new genomic blueprint of the human gut microbiota[J]. *Nature*, 2019, 568(7753):499-504. DOI: 10.1038/s41586-019-0965-1.
- [84] STAVROPOULOU E, KANTARTZI K, TSIGALOU C, et al. Focus on the gut-kidney axis in health and disease[J]. *Front Med*, 2021, 7:620102. DOI: 10.3389/fmed.2020.620102.
- [85] WEI J, ZHANG Y Q, DALBETH N, et al. Association between gut microbiota and elevated serum urate in two independent cohorts[J]. *Arthritis Rheumatol*, 2022, 74(4): 682-691. DOI: 10.1002/art.42009.
- [86] WANG J, CHEN Y, ZHONG H, et al. The gut microbiota as a target to control hyperuricemia pathogenesis: potential mechanisms and therapeutic strategies[J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2022, 62(14): 3979-3989. DOI: 10.1080/10408398.2021.1874287.
- [87] NIEUWDORP M, GILIJAMSE P W, PAI N, et al. Role of the microbiome in energy regulation and metabolism[J]. *Gastroenterology*, 2014, 146(6): 1525-1533. DOI: 10.1053/j.gastro.2014.02.008.
- [88] HE Y, FU L H, LI Y P, et al. Gut microbial metabolites facilitate anticancer therapy efficacy by modulating cytotoxic CD8⁺ T cell immunity[J]. *Cell Metab*, 2021, 33(5): 988-1000. e7. DOI: 10.1016/j.cmet.2021.03.002.
- [89] PAN L B, HAN P, MA S R, et al. Abnormal metabolism of gut microbiota reveals the possible molecular mechanism of nephropathy induced by hyperuricemia[J]. *Acta Pharm Sin B*, 2020, 10(2):249-261. DOI: 10.1016/j.apsb.2019.10.007.
- [90] XU D X, LV Q L, WANG X F, et al. Hyperuricemia is associated with impaired intestinal permeability in mice[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2019, 317(4): G484-G492. DOI: 10.1152/ajpgi.00151.2019.

- [91] ZHAO H Y, CHEN X Y, ZHANG L, et al. *Lactocaseibacillus rhamnosus* Fmb14 prevents purine induced hyperuricemia and alleviate renal fibrosis through gut-kidney axis[J]. *Pharmacol Res*, 2022, 182: 106350. DOI: 10.1016/j.phrs.2022.106350.
- [92] LIU X, LV Q L, REN H Y, et al. The altered gut microbiota of high-purine-induced hyperuricemia rats and its correlation with hyperuricemia[J]. *PeerJ*, 2020, 8: e8664. DOI: 10.7717/peerj.8664.
- [93] NUKI G. An appraisal of the 2012 American college of rheumatology guidelines for the management of gout[J]. *Curr Opin Rheumatol*, 2014, 26(2): 152-161. DOI: 10.1097/BOR.000000000000034.
- [94] WHITE W B, SAAG K G, BECKER M A, et al. Cardiovascular safety of febuxostat or allopurinol in patients with gout[J]. *N Engl J Med*, 2018, 378(13): 1200-1210. DOI: 10.1056/NEJMoa1710895.
- [95] LIU P, WANG C, WANG Y, et al. Zishen Qingre Tongluo formula improves renal fatty acid oxidation and alleviated fibrosis via the regulation of the TGF- β 1/Smad3 signaling pathway in hyperuricemic nephrology rats[J]. *Biomed Res Int*, 2021, 2021:2793823. DOI: 10.1155/2021/2793823.
- [96] LI X Q, CHEN Y H, GAO X X, et al. Antihyperuricemic effect of green *Alga Ulva lactuca* ulvan through regulating urate transporters[J]. *J Agric Food Chem*, 2021, 69(38):11225-11235. DOI: 10.1021/acs.jafc.1c03607.
- [97] WU D, CHEN R H, LI Q H, et al. Tea (*Camellia sinensis*) ameliorates hyperuricemia via uric acid metabolic pathways and gut microbiota[J]. *Nutrients*, 2022, 14(13): 2666. DOI: 10.3390/nu14132666.
- [98] WEN X H, LOU Y, SONG S Y, et al. Qu-Zhuo-Tong-Bi Decoction alleviates gouty arthritis by regulating butyrate-producing bacteria in mice[J]. *Front Pharmacol*, 2021, 11: 610556. DOI: 10.3389/fphar.2020.610556.

(收稿日期:2023-09-01 修回日期:2023-11-24)

(本文编辑:张俊彦,富群华,丁宇菁,张萍)

[引用本文]

包方奇,屠海焯,方明笋,等.基于动物模型的高尿酸肾病病理及分子机制研究进展[J].*实验动物与比较医学*, 2024, 44(2): 180-191. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2023.123.

BAO F Q, TU H Y, FANG M S, et al. Advances in research on pathological and molecular mechanism of hyperuricemic nephropathy based on animal models[J]. *Lab Anim Comp Med*, 2024, 44(2): 180-191. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2023.123.

《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



匡宇, 女, 硕士, 中国农业大学动物医学院解剖及组织胚胎教研组副教授, 硕士生导师。曾在原北京实验动物研究中心从事(specific pathogen-free, SPF)动物饲养、SPF鸡疾病监测及其试剂制作工作, 后在北京生化免疫试剂中心研制人乙型肝炎酶联免疫吸附法诊断试剂盒。目前在中国农业大学动物医学院从事动物解剖学、组织学和病理学相关的教学及科研工作, 同时在农业农村部农产品质量监督检验测试中心(北京)从事农产品安全评价相关的组织病理检测工作。主译《禽病手册》, 参编《畜禽解剖学》(第3版)第II分册、《动物组织胚胎学》等图书, 参编教材《彩图动物组织学与胚胎学实验指导》并获北京市高等教育优质教材奖。参与国家重点研发计划、科技支撑计划和国家自然科学基金资助项目等10余项, 在国内外学术期刊发表论文10余篇。



韩凌霞, 女, 博士, 北京维通利华实验动物技术有限公司服务业务部质量负责人, 维通利华实验动物使用与管理委员会(Institutional Animal Care and Use Committee, IACUC)主席。长期从事实验动物的培育、质量控制与应用研究。主持并成功选育国内首个对禽肿瘤病敏感的主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC)单倍型无特定病原体SPF鸡品系, 成功选育对鸭病毒性肝炎敏感的SPF鸭品系, 参与培育中国首个SPF小型猪和SPF农业猪群的建立。曾任或现任中国实验动物学会农业实验动物专业委员会、实验动物资源鉴定与评价工作委员会、实验动物福利伦理专业委员会、实验动物标准化技术委员会、实验动物教学工作委员会和实验动物检测工作委员会等委员, 黑龙江省实验动物标准化技术委员会秘书长、黑龙江省实验动物学会常务理事, 以及农业农村部实验动物质量监督检验测试中心(哈尔滨)暨黑龙江实验动物物质

质量监督检验测试站副主任兼质量负责人。先后主持国家和省部级项目十余项。在国内外核心期刊发表论文140多篇, 出版专著15部。培养硕士研究生50多名。

人与其他动物椎间盘解剖和组织学结构的比较医学研究进展

张莉¹, 韩凌霞², 匡宇¹

(1. 中国农业大学动物医学院, 北京 100193; 2. 北京维通利华实验动物技术有限公司, 北京 100012)

[摘要] 《2023年中国退行性脊柱健康报告》提到35岁以下患者的腰椎手术比例近年来显著增加, 颈、腰椎病有年轻化的趋势。椎间盘突出症成为最困扰大众的疾病之一, 研究椎间盘退变的发病机制和治疗方法有着重要的临床意义。目前人类椎间盘相关疾病多采用影像学诊断, 由于脊柱的组织样本不易得到, 实验动物以成本低、周期短、易获取的优点, 成为替代性研究对象。人与其他动物的椎间盘有着结构和生理上的差异, 比较人与其他动物的椎间盘结构和病理生理特点是研究的基础和关键。本文综述了不同动物椎间盘解剖与组织学结构相关研究文献并进行比较分析, 分别从椎间盘的高度、椎间盘的几何形状、腰椎间盘软骨终板特征、椎间盘内细胞外基质组分4个角度比较了不同动物的椎间盘特点。分析结果表明: 人类、袋鼠、绵羊、猪、大鼠在第六颈椎至第七颈椎处的椎间盘相对高度数值最接近; 与人类腰部椎间盘几何形状最为相似的是小鼠腰椎间盘; 与其他动物相比, 人类的软骨终板最厚, 细胞密度最小; 猪纤维环内部的胶原蛋白与人类的差异最大, 但猪、绵羊、兔、大鼠的髓核含水量与人类相比无差异性。在此基础上, 本文还阐述了人与其他动物之间椎间盘退变的共性和差异表现, 也对不同实验动物椎间盘退变的造模方法进行了总结, 旨在为椎间盘退变研究选择合适的实验动物模型提供基础数据。

[关键词] 椎间盘; 退变; 比较医学; 动物模型; 解剖与组织学

[中图分类号] Q95-33; R-332 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2024)02-0192-10



[基金项目] 浙江维通利华实验动物技术有限公司高新项目“自然衰老老龄小鼠生理变化动态规律的研究”(ZJRD202310)

[第一作者] 张莉(2000—), 女, 硕士研究生, 专业方向: 动物医学专业。E-mail: zhangli2_11@163.com。ORCID: 0009-0000-5365-7987

[通信作者] 韩凌霞(1971—), 女, 博士, 副研究员, 专业方向: 实验动物的生产与使用质量控制。E-mail: lingxia.han@river.cn。ORCID: 0000-0002-0186-0032;

匡宇(1969—), 女, 硕士, 副教授, 研究生导师, 专业方向: 解剖与组织胚胎学、组织病理学。E-mail: kuangyu@cau.edu.cn。ORCID: 0000-0002-9531-0049

Advances in Comparative Medical Research on Anatomy and Histological Structure of Intervertebral Discs in Humans and Other Animals

ZHANG Li¹, HAN Lingxia², KUANG Yu¹

(1. College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100193, China; 2. Beijing Vital River Laboratory Animal Technology Co., Ltd., Beijing 100012, China)

Correspondence to: HAN Lingxia (ORCID: 0000-0002-0186-0032), E-mail: lingxia.han@criver.cn;

KUANG Yu (ORCID: 0000-0002-9531-0049), E-mail: kuangyu@cau.edu.cn

[ABSTRACT] The 2023 China Health Report on Spine Degeneration noted a significant increase in lumbar surgery among patients under 35 years old in recent years, indicating a trend towards younger onset of cervical and lumbar diseases. Lumbar intervertebral disc herniation has become a major concern, making the study of disc degeneration pathogenesis and treatment methods clinically significant. At present, human intervertebral disc diseases are primarily diagnosed through imaging due to the challenges of obtaining tissue samples from the spine. Therefore, experimental animals have emerged as alternative research subjects because they are cost-effective, have short experimental cycles, and are easily accessible. Given the structural and physiological differences between human and other animal intervertebral discs, comparing their anatomy and histological characteristics forms the foundation of research into human disc degeneration. The purpose of this paper is to collect and review relevant studies on anatomical and histological structures of intervertebral discs in different animals and conduct a comparative analysis from four aspects, namely, intervertebral disc height, lumbar disc geometry, lumbar disc cartilaginous endplate characteristics, and extracellular matrix components. The results show that humans, kangaroos, sheep, pigs, and rats exhibit similar relative heights between the sixth and seventh cervical vertebrae. Mice possess lumbar disc geometries most akin to humans. Compared to other animals, humans have the thickest cartilaginous endplates and the lowest cell densities. The collagen within the fibrous annulus differs most notably in pigs compared to humans, while water content in the nucleus pulposus is consistent across pigs, sheep, rabbits, rats, and humans. Additionally, this paper describes the commonalities and discrepancies in disc degeneration manifestations between humans and animals, and summarizes modeling methods for disc degeneration in different experimental animals. Ultimately, the aims of this paper is to provide fundamental data for selecting suitable experimental animal models for the study of intervertebral disc degeneration.

[Key words] Intervertebral disc; Degeneration; Comparative medicine; Animal model; Anatomy and histology

人类椎间盘随着年龄增长会发生间质细胞老化, 进而引起结构渐进性的异常变化, 医学上称这种现象为椎间盘退变 (intervertebral disc degeneration)。椎间盘退变是导致椎间盘突出、髓核含水量和应变力降低、椎间盘高度下降, 造成或加重背腰痛、椎间盘突出症等一系列脊柱相关疾病的重要因素^[1]。引起椎间盘退变的原因有多种, 已被证实的因素有遗传、年龄、代谢异常和压力载荷, 还可能包括动脉粥样硬化、肥胖、职业、吸烟和性别等因素^[2-3], 其准确的发病机制至今尚不明确。由于人类椎间盘样本有限且难以获取, 椎间盘

退变诊疗相关的体内外研究更依赖于来自模型动物的实验结果, 那么建立可靠的动物模型就成为深入研究椎间盘退变机制、椎间盘疾病治疗方法的关键。由于不同物种间的椎间盘大小、形状等各有差异, 科学家们已经对恒河猴、犬、绵羊、牛、猪、兔、小鼠和大鼠开展了大量的比较医学研究, 更多的中大型动物如马、袋鼠、美洲驼等也逐步进入了人们的视野^[4]。本文对此进行文献检索分析, 以了解常用的实验动物与人类的椎间盘结构和生理差异, 以及椎间盘退变动物模型的研究进展, 期望为椎间盘退变研究提供参考。

1 脊椎动物的椎间盘结构

脊椎动物的脊柱分为颈椎 (cervical vertebra, C)、胸椎 (thoracic vertebra, T)、腰椎 (lumbar vertebra, L)、骶椎 (sacral vertebra, S) 和尾椎 (caudal vertebra, CA) 五部分。椎间盘 (intervertebral disc) 存在于除一、二颈椎外的所有椎体间软骨连接, 是由上下软骨终板、中央髓核 (nucleus pulposus) 和四周包绕的纤维环 (annulus fibrosus) 构成的“三明治”样封闭结构, 共同构成了椎间盘整体高度。椎间盘坚韧而富有弹性, 在维持椎骨的连接、保持脊柱的灵活性、脊柱的减震方面有着重要作用。

软骨终板由透明软骨细胞和丰富的细胞外基质构成, 细胞外基质主要成分为蛋白聚糖、胶原 (II、X 型胶原) 和水分^[5]。软骨终板形似中间凹陷的圆饼状海绵, 在中心区域分布大量的孔隙, 从中间到软骨终板边缘的孔隙数量逐渐减少^[6]。大部分孔隙中存在毛细血管, 有利于营养物质从外周脉管系统扩散到髓核。

椎间盘中央的髓核结构源于脊索细胞, 是无血管的凝胶状结构, 其细胞外基质含大量蛋白聚糖、水分, 在椎体间缓解牵拉力, 起缓冲作用。另外, 细胞外基质还含有 II 型胶原, 使椎间盘具有机械强度和弹性。

纤维环由同心圆排列的片状纤维层堆积组成, 环内部是纤维软骨细胞产生的 II 型胶原, 外部为成纤维细胞样细胞产生的 I 型胶原^[7]。纤维层之间通过弹性纤维、I 型胶原、IV 型胶原和丰富的蛋白聚糖组成的横桥连接, 可在有限范围内相对滑动^[8]。其中, 弹性纤维能够减少片状纤维层间的相对膨胀, 降低径向拉伸的延展性, 增加周向剪切的剪切模量^[9]。片状纤维层向垂直轴倾斜而产生的夹角能够使纤维环在外力作用下具有各向异性^[10], 帮助脊柱完成屈伸和侧屈等动作。

2 人与其他动物的椎间盘结构差异

2.1 椎间盘的高度

椎间盘的厚薄或高度决定了脊柱活动的范围。根据 Pfirrmann 分级, 人类腰椎间盘高度与椎间盘退变程度之间呈负相关, 即椎间盘高度越小, 椎间盘退变程度就越高^[11]。现有研究中针对椎间盘相关解剖结构的尺寸测量手段主要是尸体标本测量、X 光片或磁共振成像测量。其中, 尸体标本的水分丢失会影响测量数据的准确性, 而 X 光片不能测量颈椎间盘的矢径和横径, 较准确的脊椎解剖结构数据来自磁共振成像。文献中可查到的椎间盘高度的测量数据多来自体成熟的

动物尸体标本。

各种动物的椎骨数量和种类不同, 椎间盘相对高度 (即椎间盘绝对高度与前一个椎体长度的比值) 存在较大差异 (表 1)。比较不同动物与人类相同部位椎间盘相对高度的相似度, 发现: 与人类颈椎 C3~C7 最接近的是大鼠 (C3~C4, 0.32-0.30=0.02; C4~C5, 0.29-0.28=0.01; C6~C7, 0.23-0.22=0.01); 与人类颈椎 C5 至胸椎 T1 最接近的是袋鼠 (C5~C6, 0.25-0.25=0; C6~C7, 0.24-0.23=0.01; C7~T1, 0.27-0.26=0.01); 猪 (C5~C6, 0.25-0.23=0.02) 和绵羊 (C6~C7, 0.23-0.21=0.02) 均各只在一处椎间盘与人类略为接近; 之后, 直到胸椎 T12 和 T13, 只有袋鼠 (0.26) 略与人类 (0.29) 接近 (0.29-0.26=0.03)。

人类由于直立行走, 颈椎间盘高度随着年龄增加会出现先增高再降低的趋势, 在 39~48 岁时该数值最大。这是由于人类幼龄时颈椎骨骼还未完全定型, 尚能生长, 随着年龄增长, 椎间盘逐渐增大; 超过一定年龄后, 颈椎由于保持固定姿势而长期受压, 椎间盘内部分软组织出现退化、水分流失, 椎间盘高度明显降低^[21]。

2.2 椎间盘几何形状

不同动物的椎间盘形状不同, 与受力时抵抗弹性变形的能力有关, 常用于脊柱侧弯病变模型^[22]。通过测量椎间盘高度与横径的比值、椎间盘纵向宽度与横径宽度的比值、髓核面积占椎间盘总面积的比例等参数, 最终得出兔、大鼠和小鼠的不同部位的椎间盘参数与人类腰椎间盘参数的平均偏差值, 数值大小代表着与人类腰椎间盘几何形态差异的程度。其中, 小鼠的腰椎间盘与人类腰椎间盘的几何形状最为相似 (与人类参数的平均偏差为 12%), 大鼠的尾椎间盘几何形状与人类腰椎间盘几何形状差异最大 (与人类参数的平均偏差为 46%) (表 2)^[23]。

2.3 腰椎间盘软骨终板特征

文献检索人类与猪、兔及大鼠等实验动物 L1~L7 部分腰椎间盘软骨终板的特征^[24], 相关数据整理成表 3。通过对比腰椎间盘中心区和边缘区的软骨终板的厚度、细胞密度、胶原蛋白分布特征和胶原纤维直径等参数可见, 人类软骨终板最厚, 细胞密度最小^[25], 胶原纤维平行排列, 间隙小于其他动物, 而胶原纤维直径与其他动物差异不大。终板的厚度明显可能与成年人类不存在生长板, 软骨终板钙化成骨性终板的特点有关。

表1 人与其他动物颈胸腰各段的椎间盘相对高度值的比较

Table 1 Comparison of relative height values of intervertebral discs in the cervical, thoracic, and lumbar segments between humans and other animals

部位 Level	人 ^[12-14] (n=20 ~ 615) Human	袋鼠 ^[15] (n=8) Kangaroo	绵羊 ^[16] (n=7 ~ 14) Sheep	猪 ^[17-18] (n=10) Pig	大鼠 ^[19-20] (n=5 ~ 19) Rat
C2 ~ C3	0.29	-	0.12	-	-
C3 ~ C4	0.30	-	0.15	0.24	0.32
C4 ~ C5	0.29	0.21	0.16	0.25	0.28
C5 ~ C6	0.25	0.25	0.17	0.23	0.21
C6 ~ C7	0.23	0.24	0.21	0.20	0.22
C7 ~ T1	0.26	0.27	0.20	0.14	0.51
T1 ~ T2	0.31	0.19	0.19	0.11	-
T2 ~ T3	0.30	0.14	0.13	0.14	-
T3 ~ T4	0.22	0.16	0.11	0.13	-
T4 ~ T5	0.21	0.15	0.11	0.13	-
T5 ~ T6	0.19	0.11	0.10	0.12	-
T6 ~ T7	0.22	0.11	0.11	0.10	-
T7 ~ T8	0.26	0.13	0.11	0.11	-
T8 ~ T9	0.25	0.14	0.11	0.11	-
T9 ~ T10	0.31	0.15	0.01	0.09	-
T10 ~ T11	0.28	0.18	0.11	0.11	-
T11 ~ T12	0.37	0.22	0.11	0.09	-
T12 ~ T13	0.29	0.26	0.12	0.11	-
T13 ~ T14/L1	/	0.28	0.13	0.10	-
T14 ~ T15	/	/	/	0.12	/
T15 ~ L1	/	/	/	0.12	/
L1 ~ L2	0.41	0.27	0.13	0.11	0.17
L2 ~ L3	0.43	0.25	0.12	0.12	0.17
L3 ~ L4	0.49	0.23	0.12	0.11	0.17
L4 ~ L5	0.60	0.24	0.11	0.11	0.19
L5 ~ L6	0.61	0.26	0.11	0.12	0.16
L6 ~ L7/S1	/	0.41	0.11	0.12	/
L7 ~ S1	/	/	-	/	/

注：表格中数据均取自前侧椎间盘高度测量值和前侧/腹侧椎体长度。C，颈椎；T，胸椎；L，腰椎；S，骶椎。“-”代表无数据；“/”代表无此结构。加粗黑体字表示与人类对应部位的数值最接近。

Note: All the data were obtained from measurements of anterior disc heights and anterior/vertebral body length. C, cervical vertebrae; T, thoracic vertebrae; L, lumbar vertebrae; S, sacral vertebrae. "-" indicates no data; "/" indicates the absence of this structure. Bold font indicates values closest to corresponding human index.

2.4 椎间盘内细胞外基质组分

蛋白聚糖、胶原蛋白和水分等是构成椎间盘细胞外基质的主要成分，其含量和种类的变化会影响椎间盘的功能。基质中丰富的蛋白聚糖形成的亲水性环境使椎间盘组织能够承受高负荷压缩力，产生抵抗脊柱压力的支持力，如果这一环境发生变化会导致椎间盘机械性能降低^[26]。胶原纤维的类型和含量显著影响椎间盘的极限拉伸能力，胶原纤维排列的方向与椎间盘整体的抗破裂能力相关^[27]。从猪、山羊、绵羊、兔、

大鼠与人类腰椎间盘的胶原蛋白、蛋白聚糖、水分含量数据^[28-29]来看，如果忽略腰椎的位置，猪的纤维层内部的胶原蛋白含量占比与人类的差异最显著；兔的胶原蛋白和蛋白聚糖含量与人类的接近；猪、绵羊、兔、大鼠髓核的蛋白聚糖含量占比与人类的相似（表4）。人与猪、绵羊的腰椎、大鼠的尾椎的纤维环内外层的含水量具有差异。与人类相比，猪、绵羊、兔、大鼠的髓核中含水量均无差异。因此，在研究髓核的抗压能力时可选择的动物模型范围较广泛。

表2 人与其他动物腰椎间盘几何形状对比

Table 2 Comparison of lumbar intervertebral disc morphology between humans and other animals

物种 Species	部位 Level	高度/横向宽度 Height/ lateral width	纵向宽度/横向宽度 Anteroposterior width/ lateral width	髓核面积/椎间盘面积 Nucleus pulposus area/ disc area	与人类参数的平均偏差/% Average deviation from human parameters/%
人类 (n=3) Human	L4 ~ L5	0.20	0.67	0.28	-
兔 (n=3) Rabbit	L4 ~ L5	0.11	0.52	0.25	26.00
大鼠 (n=3) Rat	L4 ~ L5	0.16	0.75	0.25	15.00
小鼠 (n=3) Mouse	L3 ~ L4	0.17	0.67	0.18	12.00
大鼠 (n=3) Rat	CA10 ~ CA11	0.29	1.07	0.37	46.00
小鼠 (n=3) Mouse	CA9 ~ CA10	0.20	1.08	0.30	18.00

注: L, 腰椎; CA, 尾椎。本表数据来源于参考文献^[23]。

Note: L, lumbar vertebra; CA, caudal vertebra. The data in the table were compiled from the reference^[23].

表3 人与其他动物的部分腰椎间盘软骨终板特征比较

Table 3 Comparison of characteristics of partial lumbar intervertebral disc cartilage endplates between humans and other animals

物种 Species	部位 Level	中心区 Central area				边缘区 Edge area			
		厚度/mm Thickness/ mm	细胞密度/mm ² Cellular density/ mm ²	胶原分布 特征 Collagen distribution feature	胶原纤维直 径/nm Collagen fiber diameter/ nm	厚度/mm Thickness/ mm	细胞密度/ mm ² Cellular density/ mm ²	胶原分布特 征 Collagen distribution feature	胶原纤维直 径/nm Collagen fiber diameter/ nm
人类 (n=5) Human	L1 ~ L5	855.58±24.37**	259.00±31.00**	平行排列, 间隙较小	57.18±17.11	938.31±108.44	203.00±36.00	平行排列, 间隙较小	67.58±30.48
猪 (n=8) Pig	L2 ~ L6	304.80±17.47**	605.00±132.00**	相互缠绕, 间隙较大	57.53±24.10*	279.24±27.72	409.00±67.00	平行排列, 间隙较大	63.46±19.05
兔 (n=8) Rabbit	L3 ~ L7	69.41±9.79	991.00±200.00	聚集成束并 发生交联	60.83±18.64**	73.81±11.27	868.00±192.00	聚集成束并 发生交联	77.06±21.92
大鼠 (n=8) Rat	L2 ~ L5	288.96±49.00**	603.00±93.00**	网状交织	45.06±8.98**	209.10±18.16	762.00±81.00	网状交织	107.25±42.74

注: 每个物种的软骨终板中心和边缘区域参数比较, *P<0.05, **P<0.01。本表数据来源于参考文献^[24]。

Note: Comparison of parameters in the central and peripheral regions of cartilaginous endplate of each species, *P<0.05; **P<0.01. The data in the table were compiled from the reference^[24].

3 人与其他动物的椎间盘退变表现差异

3.1 椎间盘退变的病变部位

不同物种之间的椎间盘退变表现出不同的临床症状。人类椎间盘退变引发的椎间盘突出常发生于颈部和腰部; 胸椎间盘突出症较罕见, 发病率仅为1/10⁶^[30]。而犬的椎间盘突出常发于胸腰脊柱交界处^[31]。人类退变椎间盘的前后部位病变程度较均一, 而恒河猴在脊柱前缘出现的骨赘增生和退变更严重^[32]。

3.2 椎间盘退变中软骨终板的变化

人类与其他动物椎间盘退变的组织学变化基本一致, 例如软骨终板的厚度、轴向面积和横向宽度减少^[33]。细胞外基质中蛋白聚糖含量降低, 胶原蛋白含量增高, 水合作用降低。椎间盘退变前期的软骨终板中细胞密度降低, 退变后期细胞密度增加, 椎间盘退变期间的基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMP) -1、MMP-3、MMP-10、肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF) - α 、白细胞介素 (interleukin, IL) -6 等细胞因子表达上调^[34]。人类的椎间盘退变表现也具

表4 人与其他动物椎间盘中胶原蛋白、蛋白聚糖、水分含量的比较

Table 4 Comparison of collagen, glycosaminoglycan, and water content in intervertebral discs between humans and other animals

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

物种 Species	部位 Level	胶原蛋白占比/($\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$) Collagen content /($\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$)			蛋白聚糖占比/($\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$) GAG content/($\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$)			含水量/% Water content/%		
		髓核 Nucleus pulposus	纤维环内部 Inner annulus fibrosus	纤维环外部 Outer annulus fibrosus	髓核 Nucleus pulposus	纤维环内部 Inner annulus fibrosus	纤维环外部 Outer annulus fibrosus	髓核 Nucleus pulposus	纤维环内部 Inner annulus fibrosus	纤维环外部 Outer annulus fibrosus
		人类 ($n=3$) Human	L3 ~ L4 L4 ~ L5	15.6 \pm 4.0 -	47.9 \pm 3.0 -	102.6 \pm 18.9 -	- 466.0 \pm 205.0	- 377.0 \pm 185.0	- 161.0 \pm 31.9	- 81.0 \pm 3.0
猪 ($n=5$) Pig	L1 ~ L2	5.8 \pm 2.9	108.7 \pm 6.4***	122.4 \pm 22.8	379.0 \pm 160.0	150.0 \pm 19.7*	71.8 \pm 13.5	83.0 \pm 2.0	69.0 \pm 3.0*	59.0 \pm 2.0*
山羊 ($n=5$) Goat	L4 ~ L5	18.5 \pm 5.8	26.4 \pm 15.7	52.7 \pm 13.9*	-	-	-	-	-	-
绵羊 ($n=5$) Sheep	L3 ~ L4	19.2 \pm 10.6	66.8 \pm 11.1	106.9 \pm 18.4	547.0 \pm 69.5	260.0 \pm 55.5*	122.0 \pm 32.6	75.0 \pm 3.0	66.0 \pm 3.0*	57.0 \pm 3.0*
兔 ($n=5$) Rabbit	L4 ~ L5	-	34.0 \pm 17.2	77.9 \pm 19.2	579.0 \pm 158.0	372.0 \pm 132.0	160.0 \pm 102.0	82.0 \pm 5.0	73.0 \pm 5.0	62.0 \pm 9.0*
大鼠 ($n=5$) Rat	L3 ~ L4	-	-	-	384.0 \pm 108.0	165.0 \pm 27.9*	47.1 \pm 10.9*	82.0 \pm 9.0	71.0 \pm 9.0*	65.0 \pm 3.0

注：与人类参数比较，* $P<0.05$ ，*** $P<0.001$ ；“-”代表无数据。本表数据来源于参考文献^[28-29]。Note: Comparison with human parameters, * $P<0.05$, *** $P<0.001$; "-" indicates no data. The data in the table were compiled from the references^[28-29].

有特异性，人类腰椎间盘的软骨终板有骨性终板和软骨终板两层结构，双层终板的孔隙比单层终板多，更薄，髓核中的蛋白聚糖含量更高，有生物力学优势，营养容易平衡^[35]。小鼠的腰椎间盘只有一层软骨，而尾椎间盘有两层，多了一层钙化软骨^[36]，钙化软骨会阻碍营养的扩散^[37]。在相同的使用时间（物种寿命）内，人类腰椎间盘的病变程度低于小鼠，退变软骨终板的孔隙数量增加，其内部存在的毛细血管数量减少^[38-39]。

3.3 椎间盘退变中髓核的变化

随着年龄的增长，人类髓核中的软骨样细胞取代脊索细胞，脊索细胞最终耗尽^[40]。牛腰椎间盘的脊索细胞类似于人类，最终也会消失。大鼠、兔的腰椎间盘在退变过程中仍存在脊索细胞^[41]，同时伴随髓核纤维化，胶原蛋白含量减少，II型胶原被I型胶原替代，髓核与纤维环之间的界限模糊^[42]。在犬椎间盘退变中，髓核发生软骨样化生，未见纤维变性^[43]，胶原蛋白种类和含量有无变化尚不清楚。

3.4 椎间盘退变中纤维环的变化

椎间盘纤维环中的血管在胎儿发育过程中深入纤维环内，在出生后随生长过程逐渐消退，在老年后的

椎间盘退化期间血管会重新出现并伴有神经化^[44-45]。退化过程中纤维环的细胞变得更圆，结构紊乱，出现裂缝，纤维环层间黏合强度降低导致分层^[46-47]。在退变早期，纤维环细胞中所有蛋白聚糖的mRNA和蛋白质含量显著增加，而在退变严重的纤维环组织中则含量减少^[48]。退变的纤维环基质中蛋白聚糖和水分含量下降，降低了纤维环抵抗弹性的能力，但刚性增加，因此在相同的压力下退变的纤维环比健康的纤维环更容易断裂。

以上软骨终板、髓核、纤维环等结构变化的共同作用，导致了椎间盘整体高度下降，而且这些结构变化已经被证明与腰背疼痛相关^[49]。

3.5 椎间盘退变中细胞外基质的变化

一般来说，在退变的椎间盘中细胞外基质如蛋白聚糖、水分含量最终均会减少。在马的椎间盘退变研究中，髓核和纤维环的糖胺聚糖含量和水合作用却没有变化^[50]。冲刺运动不会影响幼龄动物的关节软骨中糖胺聚糖的含量，并且接受高强度跑步训练比接受低强度跑步训练的马的软骨具有更高的糖胺聚糖含量^[51]。结合饲养管理特点推测，大量的奔跑训练也许能够使马属动物的椎间盘中含水量和糖胺聚糖增加。

4 椎间盘退变研究中实验动物的选择及造模方法

目前,椎间盘退变研究中的实验动物多选择啮齿类,主要是沙鼠、小鼠和大鼠。沙鼠是一种自发性椎间盘退变的小型动物,在4月龄时开始发生椎间盘退变,能够较好地模拟人类慢性椎间盘退变的过程^[52]。另外,结节性硬化症(tuberous sclerosis complex 1, *TSC1*)基因敲除小鼠^[53]、富含半胱氨酸的分泌型酸性蛋白(secreted protein acidic and rich in cysteine, *SPARC*)基因敲除小鼠^[54]、SM/J品系小鼠^[55]、胰岛素样生长因子1受体(insulin-like growth factor 1 receptor, *IGF1R*)^{+/-}小鼠^[56]也已被证实可以作为椎间盘退变动物模型。其中,*TSC1*基因敲除小鼠的实验周期最长,在9月龄时椎间盘退变严重。而SM/J品系小鼠在4周龄时就已经开始出现椎间盘退行性变化。

椎间盘退变动物模型的造模方法包含物理造模和化学诱导。物理造模的策略主要是改变动物的生物力学:(1)切除小鼠^[57]或大鼠^[58]腰椎旁肌肉和韧带,造成腰椎不稳定,1周后可出现椎间盘退变的症状,避免了对椎间盘的直接损伤;(2)小鼠^[59]和大鼠^[60]前肢截肢,联合纤维环穿刺,模拟人类的双足站立模型,截肢的大鼠虽被迫站立,加速了颈椎的退化,但是根据三维脊柱运动模式,四足行走变成两足行走时由于双臂的摆动,腰椎的横向弯曲转换为轴向旋转^[61],因此该模型不能直接延伸成人类的情况;(3)切除大鼠臂丛神经,模拟人类直立的状态,结合轴向震动的方式造模,实验周期为11周^[62];(4)利用压缩装置对大鼠尾进行静态弯曲和压缩^[63],模拟脊柱屈曲姿势下人体的椎间盘负荷;(5)缝合两侧皮肤压缩尾椎间盘^[64],避免机械装置限制鼠尾运动的问题;(6)切除小鼠的双侧卵巢,然后联合针刺旋切髓核法^[65],其中最常见的是对大鼠进行纤维环穿刺^[66];(7)通过对兔椎体间进行融合手术的建模方法^[67]虽然解决了纤维环穿刺方法可能造成神经损伤的问题,但是仅限于对脊柱融合后邻近节段疾病的研究;(8)将兔放置于长筒中,迫使其保持直立状态,并自颈部施以轴向压力,发现内层纤维环明显增生,髓核区域缩小^[68];(9)在兔腰椎植入剪切应力的加载装置^[69],纤维环组织排列紊乱,髓核细胞明显减少。化学诱导即给椎间盘注射化学试剂,包括环亮氨酸^[70]、无水乙醇^[71]、碘乙酸钠^[72]和纤连蛋白片段^[73]等。

5 结论与展望

基于人与其他动物椎间盘的上述参数的比较结果,可知以单一参数选择椎间盘退变造模动物是不准确的。椎间盘退变模型各有千秋,需要根据研究目的来选择相近特点的动物模型。

明确人类与其他种属动物椎间盘的差异是选择动物模型时应考虑的重要因素。袋鼠、猪、大鼠的颈部椎间盘相对高度与人类的接近,说明颈椎的生理弯曲可能类似于人类。大鼠和小鼠的腰椎、小鼠的尾椎与人类腰椎间盘的几何形状最为相似。猪、山羊、绵羊、兔、大鼠与人类腰椎间盘的细胞外基质成分具有不同特点的差异性。不同动物椎间盘软骨细胞外基质中含水量与人类的差异较小。因此,在研究髓核的抗压能力时,可选择的动物模型范围较广泛。大鼠的尾椎间盘中蛋白聚糖、水分含量较人类的差异显著,在选择鼠尾作为椎间盘的代谢和生物力学研究时,要着重注意鼠尾椎间盘与人类腰椎间盘的差异性。在检索不同物种的椎间盘成分含量的研究中发现,目前尚缺乏小鼠的相关数据,未来可考虑对比研究小鼠的椎间盘成分。

毋庸置疑,四足动物与直立行走的人类在运动学上有本质差异,反映在脊柱各椎骨的解剖学结构和组分上千差万别。结合动物的遗传均一性、个体重复性、经济成本,推测大鼠和小鼠的尾椎对于人类椎间盘病变研究可能更具有优势^[74]。因此,在未来开展椎间盘退变机制研究时,大鼠和小鼠的尾椎或许是可以深入探讨的切入点。

[作者贡献 Author Contribution]

张莉查找及筛选相关文献,撰写初稿并修改;
韩凌霄审核文稿并给予指导;
匡宇参与文稿修订,给予修改意见。

[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] XIN J G, WANG Y J, ZHENG Z, et al. Treatment of intervertebral disc degeneration[J]. *Orthop Surg*, 2022, 14(7): 1271-1280. DOI: 10.1111/os.13254.
- [2] HOFFELD K, LENZ M, EGENOLF P, et al. Patient-related risk factors and lifestyle factors for lumbar degenerative disc disease: a systematic review[J]. *Neuro-Chirurgie*, 2023, 69(5): 101482. DOI: 10.1016/j.neuchi.2023.101482.
- [3] 宋继鹏,林万程,姚思远,等. 2型糖尿病与腰椎间盘退变的相关性分析[J]. *中日友好医院学报*, 2023, 37(3):144-148. DOI: 10.3969/j.issn.1001-0025.2023.03.004.

- SONG J P, LIN W C, YAO S Y, et al. Study on the relationship between type 2 diabetes and degeneration of single segmental lumbar inter-vertebral disc[J]. *J China Jpn Friendsh Hosp*, 2023, 37(3):144-148. DOI: 10.3969/j.issn.1001-0025.2023.03.004.
- [4] ALINI M, DIWAN A D, ERWIN W M, et al. An update on animal models of intervertebral disc degeneration and low back pain: exploring the potential of artificial intelligence to improve research analysis and development of prospective therapeutics[J]. *JOR Spine*, 2023, 6(1): e1230. DOI: 10.1002/jsp2.1230.
- [5] LAKSTINS K, ARNOLD L, GUNSCH G, et al. Characterization of the human intervertebral disc cartilage endplate at the molecular, cell, and tissue levels[J]. *J Orthop Res*, 2021, 39(9): 1898-1907. DOI: 10.1002/jor.24854.
- [6] FU B, JIANG H Y, CHE Y J, et al. Microanatomy of the lumbar vertebral bony endplate of rats using scanning electron microscopy[J]. *Orthop Traumatol Surg Res*, 2020, 106(4):731-734. DOI: 10.1016/j.otsr.2019.12.026.
- [7] MCALINDEN A, HUDSON D M, FERNANDES A A, et al. Biochemical and immuno-histochemical localization of type IIA procollagen in annulus fibrosus of mature bovine intervertebral disc[J]. *Matrix Biol Plus*, 2021, 12: 100077. DOI: 10.1016/j.mbplus.2021.100077.
- [8] TAVAKOLI J, ELLIOTT D M, COSTI J J. Structure and mechanical function of the inter-lamellar matrix of the annulus fibrosus in the disc[J]. *J Orthop Res*, 2016, 34(8):1307-1315. DOI: 10.1002/jor.23306.
- [9] SUN Z W, MI C W. On the identification of the ultra-structural organization of elastic fibers and their effects on the integrity of annulus fibrosus[J]. *J Biomech*, 2023, 157: 111728. DOI: 10.1016/j.jbiomech.2023.111728.
- [10] TAMOUD A, ZAÏRI F, MESBAH A, et al. Modeling multi-axial damage regional variation in human annulus fibrosus[J]. *Acta Biomater*, 2021, 136:375-388. DOI: 10.1016/j.actbio.2021.09.017.
- [11] VIRK S, MEYERS K N, LAFAGE V, et al. Analysis of the influence of species, intervertebral disc height and Pfirrmann classification on failure load of an injured disc using a novel disc herniation model[J]. *Spine J*, 2021, 21(4): 698-707. DOI: 10.1016/j.spinee.2020.10.030.
- [12] LU J, EBRAHEIM N A, YANG H, et al. Anatomic bases for anterior spinal surgery: surgical anatomy of the cervical vertebral body and disc space[J]. *Surg Radiol Anat*, 1999, 21(4): 235-239. DOI: 10.1007/BF01631392.
- [13] KUNKEL M E, HERKOMMER A, REINEHR M, et al. Morphometric analysis of the relationships between intervertebral disc and vertebral body heights: an anatomical and radiographic study of the human thoracic spine[J]. *J Anat*, 2011, 219(3): 375-387. DOI: 10.1111/j.1469-7580.2011.01397.x.
- [14] AMONOO-KUOFI H S. Morphometric changes in the heights and anteroposterior diameters of the lumbar intervertebral discs with age[J]. *J Anat*, 1991, 175:159-168.
- [15] WILKE H J, BETZ V M, KIENLE A. Morphometry of the kangaroo spine and its comparison with human spinal data [J]. *J Anat*, 2021, 238(3):626-642. DOI: 10.1111/joa.13323.
- [16] WILKE H J, KETTLER A, WENGER K H, et al. Anatomy of the sheep spine and its comparison to the human spine[J]. *Anat Rec*, 1997, 247(4): 542-555. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0185(199704)247:4<542::AID-AR13>3.0.CO;2-P.
- [17] BOZKUS H, CRAWFORD N R, CHAMBERLAIN R H, et al. Comparative anatomy of the porcine and human thoracic spines with reference to thoracoscopic surgical techniques [J]. *Surg Endosc*, 2005, 19(12):1652-1665. DOI: 10.1007/s00464-005-0159-9.
- [18] BUSSCHER I, PLOEGMAKERS J J W, VERKERKE G J, et al. Comparative anatomical dimensions of the complete human and porcine spine[J]. *Eur Spine J*, 2010, 19(7):1104-1114. DOI: 10.1007/s00586-010-1326-9.
- [19] FLYNN J R, BOLTON P S. Measurement of the vertebral canal dimensions of the neck of the rat with a comparison to the human[J]. *Anat Rec*, 2007, 290(7): 893-899. DOI: 10.1002/ar.20523.
- [20] JAUMARD N V, LEUNG J, GOKHALE A J, et al. Relevant anatomic and morphological measurements of the rat spine: considerations for rodent models of human spine trauma[J]. *Spine*, 2015, 40(20): E1084-E1092. DOI: 10.1097/BRS.0000000000001021.
- [21] 刘伟强, 蒲婷, 顾洪生, 等. 中国人颈椎间盘尺寸分析[J]. *清华大学学报(自然科学版)*, 2014, 54(2):172-177. DOI: 10.16511/j.cnki.qhdxxb.2014.02.018.
- LIU W Q, PU T, GU H S, et al. Geometric parameter analysis of Chinese cervical discs[J]. *J Tsinghua Univ Sci Technol*, 2014, 54(2):172-177. DOI: 10.16511/j.cnki.qhdxxb.2014.02.018.
- [22] SULLIVAN T B, BASTROM T P, REIGHARD F, et al. Changes in peri-apical vertebral body and intervertebral disc shape in both the sagittal and coronal planes correlate with scoliosis severity: a 3D study of 397 patients[J]. *Spine Deform*, 2021, 9(4):959-967. DOI: 10.1007/s43390-021-00293-8.
- [23] O'CONNELL G D, VRESILOVIC E J, ELLIOTT D M. Comparison of animals used in disc research to human lumbar disc geometry[J]. *Spine*, 2007, 32(3): 328-333. DOI: 10.1097/01.brs.0000253961.40910.c1.
- [24] LI Y H, WU H L, LI Z, et al. Species variation in the cartilaginous endplate of the lumbar intervertebral disc[J]. *JOR Spine*, 2022, 5(3): e1218. DOI: 10.1002/jsp2.1218.
- [25] ZHANG Y J, LENART B A, LEE J K, et al. Histological features of endplates of the mammalian spine: from mice to men[J]. *Spine*, 2014, 39(5): E312-E317. DOI: 10.1097/BRS.0000000000000174.
- [26] BEZCI S E, ELESWARAPU A, KLINEBERG E O, et al. Contribution of facet joints, axial compression, and composition to human lumbar disc torsion mechanics[J]. *J Orthop Res*, 2018,36(8): 2065-2312. DOI: 10.1002/jor.23870.
- [27] GHEZELBASH F, SHIRAZI-ADL A, BAGHANI M, et al. On the modeling of human intervertebral disc annulus fibrosus: elastic, permanent deformation and failure responses[J]. *J Biomech*, 2020, 102: 109463. DOI: 10.1016/j.jbiomech.2019.109463.
- [28] BECKSTEIN J C, SEN S, SCHAER T P, et al. Comparison of animal discs used in disc research to human lumbar disc: axial compression mechanics and glycosaminoglycan content[J]. *Spine*, 2008, 33(6): E166-E173. DOI: 10.1097/BRS.0b013e318166e001.

- [29] SHOWALTER B L, BECKSTEIN J C, MARTIN J T, et al. Comparison of animal discs used in disc research to human lumbar disc: torsion mechanics and collagen content[J]. Spine, 2012, 37(15): E900-E907. DOI: 10.1097/BRS.0b013e31824d911c.
- [30] COURT C, MANSOUR E, BOUTHORS C. Thoracic disc herniation: surgical treatment[J]. Orthop Traumatol Surg Res, 2018, 104(1S): S31-S40. DOI: 10.1016/j.otsr.2017.04.022.
- [31] 马琳珊, 周程远, 吴礼平, 等. 147 例犬椎间盘疝出疾病回顾性分析[J]. 畜牧与兽医, 2022, 54(8):120-124.
MA L S, ZHOU C Y, WU L P, et al. Retrospective analysis of 147 cases of canine intervertebral disc herniation[J]. Anim Husb Vet Med, 2022, 54(8):120-124.
- [32] BAILEY J F, FIELDS A J, LIEBENBERG E, et al. Comparison of vertebral and intervertebral disc lesions in aging humans and rhesus monkeys[J]. Osteoarthritis Cartilage, 2014, 22(7): 980-985. DOI: 10.1016/j.joca.2014.04.027.
- [33] DELUCCA J F, PELOQUIN J M, SMITH L J, et al. MRI quantification of human spine cartilage endplate geometry: comparison with age, degeneration, level, and disc geometry [J]. J Orthop Res, 2016, 34(8):1410-1417. DOI: 10.1002/jor.23315.
- [34] ARIKAKA S S, BECH-AZEDDINE R, JØRGENSEN L M, et al. The expression of metalloproteinases in the lumbar disc correlates strongly with Pfirrmann MRI grades in lumbar spinal fusion patients[J]. Brain Spine, 2022, 2: 100872. DOI: 10.1016/j.bas.2022.100872.
- [35] FIELDS A J, SAHLI F, RODRIGUEZ A G, et al. Seeing double: a comparison of microstructure, biomechanical function, and adjacent disc health between double- and single-layer vertebral endplates[J]. Spine, 2012, 37(21): E1310-E1317. DOI: 10.1097/BRS.0b013e318267bcfc.
- [36] BRENDLER J, WINTER K, LOCHHEAD P, et al. Histological differences between lumbar and tail intervertebral discs in mice[J]. J Anat, 2022, 240(1):84-93. DOI: 10.1111/joa.13540.
- [37] REN P L, CHEN P, REEVES R A, et al. Diffusivity of human cartilage endplates in healthy and degenerated intervertebral disks[J]. J Biomech Eng, 2023, 145(7): 071006. DOI: 10.1115/1.4056871.
- [38] RODRIGUEZ A G, RODRIGUEZ-SOTO A E, BURGHARDT A J, et al. Morphology of the human vertebral endplate[J]. J Orthop Res, 2012, 30(2):280-287. DOI: 10.1002/jor.21513.
- [39] BONNHEIM N B, WANG L, LAZAR A A, et al. The contributions of cartilage endplate composition and vertebral bone marrow fat to intervertebral disc degeneration in patients with chronic low back pain[J]. Eur Spine J, 2022, 31(7): 1866-1872. DOI: 10.1007/s00586-022-07206-x.
- [40] GAO B, JIANG B, XING W H, et al. Discovery and application of postnatal nucleus pulposus progenitors essential for intervertebral disc homeostasis and degeneration[J]. Adv Sci, 2022, 9(13): e2104888. DOI: 10.1002/advs.202104888.
- [41] MIYAZAKI T, KOBAYASHI S, TAKENO K, et al. A phenotypic comparison of proteoglycan production of intervertebral disc cells isolated from rats, rabbits, and bovine tails; which animal model is most suitable to study tissue engineering and biological repair of human disc disorders?[J]. Tissue Eng Part A, 2009, 15(12):3835-3846. DOI: 10.1089/ten.tea.2009.0250.
- [42] ZELDIN L, MOSLEY G E, LAUDIER D, et al. Spatial mapping of collagen content and structure in human intervertebral disk degeneration[J]. JOR Spine, 2020, 3(4): e1129. DOI: 10.1002/jsp2.1129.
- [43] HANSEN T, SMOLDERS L A, TRYFONIDOU M A, et al. The myth of fibroid degeneration in the canine intervertebral disc: a histopathological comparison of intervertebral disc degeneration in chondrodystrophic and nonchondrodystrophic dogs[J]. Vet Pathol, 2017, 54(6):945-952. DOI: 10.1177/0300985817726834.
- [44] LAMA P, LE MAITRE C L, HARDING I J, et al. Nerves and blood vessels in degenerated intervertebral discs are confined to physically disrupted tissue[J]. J Anat, 2018, 233(1): 86-97. DOI: 10.1111/joa.12817.
- [45] SUN Z, ZHAO H, LIU B, et al. AF cell derived exosomes regulate endothelial cell migration and inflammation: implications for vascularization in intervertebral disc degeneration[J]. Life Sci, 2021, 265: 118778. DOI: 10.1016/j.lfs.2020.118778.
- [46] ASHINSKY B G, GULLBRAND S E, WANG C, et al. Degeneration alters structure-function relationships at multiple length-scales and across interfaces in human intervertebral discs[J]. J Anat, 2021, 238(4): 986-998. DOI: 10.1111/joa.13349.
- [47] GHELANI R N, ZWAMBAG D P, GREGORY D E. Rapid increase in intradiscal pressure in porcine cervical spine units negatively impacts annulus fibrosus strength[J]. J Biomech, 2020, 108:109888. DOI: 10.1016/j.jbiomech.2020.109888.
- [48] CS-SZABO G, JUAN D R S, TURUMELLA V, et al. Changes in mRNA and protein levels of proteoglycans of the annulus fibrosus and nucleus pulposus during intervertebral disc degeneration[J]. Spine, 2002, 27(20): 2212-2219. DOI: 10.1097/00007632-200210150-00006.
- [49] VINCENT K F, BUNDOCK J, DONA C P G, et al. Loss of lumbar disc height with age and its impact on pain and sensitivity associated behaviors in mice[J]. Eur Spine J, 2023, 32(3):848-858. DOI: 10.1007/s00586-023-07545-3.
- [50] BERGMANN W, DE LEST C V, PLOMP S, et al. Intervertebral disc degeneration in warmblood horses: Histological and biochemical characterization[J]. Vet Pathol, 2022, 59(2): 284-298. DOI: 10.1177/03009858211067463.
- [51] LOGAN A A, NIELSEN B D, MANFREDI J M, et al. Sprint exercise of juvenile animals does not impact cartilage glycosaminoglycan or synovial fluid neopeptide collagenase cleavage of type I and II collagen content[J]. J Equine Vet Sci, 2021, 101:103405. DOI: 10.1016/j.jevs.2021.103405.
- [52] GRUBER H E, JR HANLEY E N. Morphologic features of spontaneous annular tears and disc degeneration in the aging sand rat (*Psammodomys obesus obesus*) [J]. Biotech Histochem, 2017, 92(6): 402-410. DOI: 10.1080/10520295.2017.1337227.
- [53] HEY H W D, LAM W M R, CHAN C X, et al. Paraspinal myopathy-induced intervertebral disc degeneration and thoracolumbar kyphosis in TSC1mKO mice model-a preliminary study[J]. Spine J, 2022, 22(3):483-494. DOI: 10.1016/j.spinee.2021.09.003.
- [54] LI Z Y, ZHOU A F, LI G, et al. Chronic spinal cord compression

- associated with intervertebral disc degeneration in SPARC-null mice[J]. *Neural Regen Res*, 2023, 18(3): 634-642. DOI: 10.4103/1673-5374.350210.
- [55] CHOI H, TESSIER S, SILAGI E S, et al. A novel mouse model of intervertebral disc degeneration shows altered cell fate and matrix homeostasis[J]. *Matrix Biol*, 2018, 70: 102-122. DOI: 10.1016/j.matbio.2018.03.019.
- [56] LI B, ZHENG X F, NI B B, et al. Reduced expression of insulin-like growth factor 1 receptor leads to accelerated intervertebral disc degeneration in mice[J]. *Int J Immunopathol Pharmacol*, 2013, 26(2): 337-347. DOI: 10.1177/039463201302600207.
- [57] LIU S F, SUN Y L, DONG J C, et al. A mouse model of lumbar spine instability[J/OL]. *J Vis Exp*, 2021(2021-04-23)[2023-10-10]. <https://doi.org/10.3791/61722>.
- [58] ZHU D C, MIAO Z M, DONG M W, et al. Development of a novel rat intervertebral disc degeneration model by surgical multifidus resection-induced instability[J]. *World Neurosurg*, 2022, 165: e357-e364. DOI: 10.1016/j.wneu.2022.06.051.
- [59] AO X, WANG L, SHAO Y, et al. Development and characterization of a novel bipedal standing mouse model of intervertebral disc and facet joint degeneration[J]. *Clin Orthop Relat Res*, 2019, 477(6): 1492-1504. DOI: 10.1097/CORR.0000000000000712.
- [60] 孙孝先, 白雪, 刘孟敏, 等. 双上肢去势联合椎间盘刺破诱导建立大鼠椎间盘退变模型[J]. *中国组织工程研究*, 2023, 27(35):5616-5621. DOI:10.12307/2023.845.
- SUN X X, BAI X, LIU M M, et al. Establishing a rat model of intervertebral disc degeneration by castration of both upper limbs combined with intervertebral disc puncture[J]. *Chin J Tissue Eng Res*, 2023, 27(35): 5616-5621. DOI: 10.12307/2023.845.
- [61] REITMAIER S, SCHMIDT H. Review article on spine kinematics of quadrupeds and bipeds during walking[J]. *J Biomech*, 2020, 102: 109631. DOI: 10.1016/j.jbiomech. 2020. 109631.
- [62] LIANG X, SHEN H, SHI W D, et al. Effect of axial vertical vibration on degeneration of lumbar intervertebral discs in modified bipedal rats: an *in-vivo* study[J]. *Asian Pac J Trop Med*, 2017, 10(7):714-717. DOI: 10.1016/j.apjtm.2017.07.014.
- [63] JI Y C, ZHU P F, ZHANG L L, et al. A novel rat tail disc degeneration model induced by static bending and compression[J]. *Animal Model Exp Med*, 2021, 4(3): 261-267. DOI: 10.1002/ame2.12178.
- [64] LIU Z C, ZHOU Q, ZHENG J C, et al. A novel *in vivo* mouse intervertebral disc degeneration model induced by compressive suture[J]. *Exp Cell Res*, 2021, 398(1):112359. DOI: 10.1016/j.yexcr.2020.112359.
- [65] TIAN T, WANG H D, LI Z H, et al. Intervertebral disc degeneration induced by needle puncture and ovariectomy: a rat coccygeal model[J]. *Biomed Res Int*, 2021, 2021:5510124. DOI: 10.1155/2021/5510124.
- [66] 陈莎, 王诗忠, 邓德万. 大鼠腰椎间盘退变模型的建立及其形态学观察[J]. *福建中医药*, 2021, 52(9):39-40. DOI: 10.3969/j.issn.1000-338X.2021.09.011.
- CHEN S, WANG S Z, DENG D W. Establishment of rat lumbar intervertebral disc degeneration model and its morphological observation[J]. *Fujian J Tradit Chin Med*, 2021, 52(9):39-40. DOI: 10.3969/j.issn.1000-338X.2021.09.011.
- [67] CHEN S, SUO S Q, XIE Z T, et al. Establishment of an animal model of adjacent segment degeneration after interbody fusion and related experimental studies[J]. *J Orthop Surg Res*, 2023, 18(1):666. DOI: 10.1186/s13018-023-04072-1.
- [68] 白雪东, 王德利, 侯黎升, 等. 直立体位下无创轴向加载建立兔椎间盘退变动物模型[J]. *中国脊柱脊髓杂志*, 2017, 27(6):545-552. DOI: 10.3969/j.issn.1004-406X.2017.06.12.
- BAI X D, WANG D L, HOU L S, et al. Upright posture combined with noninvasive axial loading-induced rabbit intervertebral disc degeneration[J]. *Chin J Spine Spinal Cord*, 2017, 27(6):545-552. DOI: 10.3969/j.issn.1004-406X.2017.06.12.
- [69] 夏冬冬, 林胜磊, 赵浩增, 等. 建立剪切应力导致椎间盘退变模型[J]. *医用生物力学*, 2013, 28(5):490-495. DOI: 10.16156/j.1004-7220.2013.05.014.
- XIA D D, LIN S L, ZHAO H Z, et al. Development of shear force-induced intervertebral disc degeneration model[J]. *J Med Biomech*, 2013, 28(5):490-495. DOI: 10.16156/j.1004-7220.2013.05.014.
- [70] CHEN P B, SHI G X, LIU T, et al. Oxidative stress aggravates apoptosis of nucleus pulposus cells through m⁶A modification of MAT2A pre-mRNA by METTL16[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2022, 2022:4036274. DOI: 10.1155/2022/4036274.
- [71] 白荣飞, 张震, 林一峰, 等. 三种方法建立大鼠腰椎间盘退变模型[J]. *中国组织工程研究*, 2018, 22(16):2514-2519. DOI: 10.3969/j.issn.2095-4344.0221.
- BAI R F, ZHANG Z, LIN Y F, et al. Establishing a rat model of intervertebral disc degeneration using three methods[J]. *Chin J Tissue Eng Res*, 2018, 22(16):2514-2519. DOI: 10.3969/j.issn.2095-4344.0221.
- [72] SUH H R, CHO H Y, HAN H C. Development of a novel model of intervertebral disc degeneration by the intradiscal application of monosodium iodoacetate (MIA) in rat[J]. *Spine J*, 2022, 22(1):183-192. DOI: 10.1016/j.spinee.2021.06.008.
- [73] 王娜, 吴成爱, 赵丹慧, 等. 应用纤连蛋白片段建立椎间盘退变动物模型[J]. *中国脊柱脊髓杂志*, 2013, 23(1):47-53. DOI: 10.3969/j.issn.1004-406X.2013.01.11.
- WANG N, WU C A, ZHAO D H, et al. Experimental intervertebral disc degeneration induced by fibronectin fragment in rabbit[J]. *Chin J Spine Spinal Cord*, 2013, 23(1):47-53. DOI: 10.3969/j.issn.1004-406X.2013.01.11.
- [74] BALDIA M, MANI S, WALTER N, et al. Development of a unique mouse intervertebral disc degeneration model using a simple novel tool[J]. *Asian Spine J*, 2021, 15(4):415-423. DOI: 10.31616/asj.2020.0366.

(收稿日期: 2023-10-15 修回日期: 2024-02-06)

(本文编辑: 张俊彦, 富群华, 丁宇菁, 吴昊晟)

【引用本文】

张莉, 韩凌霞, 匡宇. 人与其他动物椎间盘解剖和组织学结构的比较医学研究进展[J]. *实验动物与比较医学*, 2024, 44(2): 192-201. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2023.141.

ZHANG L, HAN L X, KUANG Y. Advances in comparative medical research on anatomy and histological structure of intervertebral discs in humans and other animals[J]. *Lab Anim Comp Med*, 2024, 44(2): 192-201. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2023.141.



马海玲, 女, 公共卫生硕士, 主任技师, 现任湖南省疾病预防控制中心党委委员, 副主任。历任邵阳市疾控中心党办主任、湖南省预防医学会办公室主任、湖南省疾控中心办公室主任。社会兼职主要有中国健康产业协会实验室建设分会副会长, 湖南省预防医学会微生物检验专业委员会主任委员, 湖南省有害生物防制协会常务副会长, 湖南省实验室生物安全专家库专家等。主要研究方向为病原微生物检验、传染病防治和生物安全管理。主持2021年湖南省卫生健康委重点课题“湖南省新发病毒传染病的监测及分子溯源研究”和2022年湖南省科技厅普惠性政策与创新环境建设计划课题项目“湖南省实验动物生物安全监管与突发事件应急预案研究”等。主持的课题曾获湖南省预防医学科技奖二等奖, 在核心期刊发表多篇学术论文, 参编专著1部。

湖南省实验动物机构生物安全管理现状调查

刘美佟, 陈 长, 张兆强, 范 荻, 胡 旃, 马海玲

(湖南省疾病预防控制中心, 长沙 410153)

[摘要] **目的** 通过问卷调查, 进一步了解湖南省实验动物机构在生物安全管理方面的现状, 查找管理工作中的“短板”, 针对性地提出改进意见和建议。**方法** 2023年7月对湖南省内40家实验动物机构发放调查问卷, 内容主要包括实验室管理体系建立和整体运行情况、突发事件应急管理、医疗废弃物处置、实验动物运输管理、从业人员管理、环境设施消毒及设备使用维护等情况; 同时在每家单位至少抽取1名实验动物饲养或实验操作人员, 对共计50名从业人员的生物安全意识、动物咬伤情况和疫苗接种情况进行问卷调查。结合文献查阅和比较研究等方法, 从生物安全管理体系、人员培训、环境设施消毒及废弃物处置等方面, 对湖南省实验动物生产、运输和使用过程中生物安全管理现状进行剖析并提出建议。**结果** 在湖南省40家实验动物机构中, 有39家(97.5%)建立了实验室管理体系, 37家(92.5%)建立了实验动物突发事件应急预案, 15家(37.5%)有完整的实验动物生物安全应急演练记录, 39家(97.5%)建立了实验动物尸体及废弃物管理处置制度, 26家(65.0%)有实验室生物安全风险评估报告。在8家生产单位中, 4家(50.0%)制定了实验动物运输途中应急预案, 7家(87.5%)使用专用车辆运输实验动物。在50名实验动物饲养或实验操作人员中, 2人(4.0%)不了解实验动物应急预案或处置程序, 6人(12.0%)未能做到在进行实验动物操作时穿戴个人防护装备, 38人(76.0%)有被实验动物咬伤或抓伤经历。调查发现, 湖南省内在实验动物突发事件应急管理、运输管理、人员管理等方面尚待完善, 建议相关职能部门加大监督管理力度, 建立本省的实验动物运输管理规范, 督促各单位严格执行相关文件并开展应急演练, 加强从业人员培训。**结论** 湖南省40家实验动物机构的日常管理总体较为规范, 运行情况良好, 但在突发事件应急管理、运输管理、人员管理等方面仍需进一步加强, 逐步提升实验动物安全管理水平, 共同维护公共卫生安全。

[关键词] 实验动物; 生物安全; 安全管理; 湖南省

[中图分类号] Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2024)02-0202-07



Investigation on Current Biosafety Management Status in Laboratory Animal Institutions in Hunan Province

LIU Meitong, CHEN Zhang, ZHANG Zhaoqiang, FAN Di, HU Zhan, MA Hailing

(Hunan Provincial Center for Disease Control and Prevention, Changsha 410153, China)

Correspondence to: MA Hailing, E-mail: 1179090555@qq.com

[基金项目] 湖南省科技厅普惠性政策与创新环境建设计划-科技创新决策咨询研究项目“湖南省实验动物生物安全监管与突发事件应急预案研究”(2022ZL3021)

[第一作者] 刘美佟(1991—), 女, 硕士, 主管技师, 研究方向: 实验室生物安全和质量管理。E-mail: 814536355@qq.com。ORCID: 0009-0004-7439-402X

[通信作者] 马海玲(1972—), 女, 硕士, 主任技师, 研究方向: 微生物检验。E-mail: 1179090555@qq.com

[ABSTRACT] Objective This study aimed to investigate the current status of biosafety management in laboratory animal institutions in Hunan Province, identify management shortcomings, and provide targeted recommendations for improvement. **Methods** A questionnaire survey was conducted in July 2023 among 40 laboratory animal institutions in Hunan Province, covering topics such as the establishment of laboratory management system and its overall operation status, emergency management for incidents, medical waste disposal, animal transportation, personnel practitioner management, environmental disinfection, and equipment maintenance. The awareness of biosafety, animal bite incidents, and vaccination history was surveyed from at least one animal feeder or experimental operation practitioner from each institution, totaling 50 practitioners. Through literature review and comparative analysis, this paper analyzed the current status of biosafety management in production, transportation, and use of laboratory animals in Hunan Province from aspects such as biosafety management systems, personnel training, disinfection of environmental facilities and waste disposal, and provided recommendations. **Results** Among the 40 laboratory animal institutions in Hunan Province, 39 institutions (97.5%) had established laboratory management systems, 37 (92.5%) had emergency response plans for incidents of to transport laboratory animals, 15 (37.5%) had complete records of emergency drills for laboratory animal biosafety, and 39 (97.5%) had established protocols for carcass and waste management. Moreover, 26 institutions (65.0%) had laboratory biosafety risk assessment reports. 4 out of 8 (50.0%) production units had emergency plans for animal transportation, with 7 (87.5%) using special vehicles to transport laboratory animals. 2 (4.0%) of the 50 practitioners were unaware of emergency response plans, 6 participants (12.0%) did not consistently wear personal protective equipment, and 38 participants (76.0%) had been bitten or scratched by laboratory animals. The results of the survey showed that emergency management, transportation management and personnel management of laboratory animal incidents still need improvement in Hunan Province. Relevant functional departments should strengthen supervision and management efforts, establish local regulations for the transportation management of laboratory animals, ensure strict compliance with relevant documents, conduct emergency drills in all units, and strengthen training for practitioners. **Conclusion** While daily management practices in the 40 laboratory animal institutions in Hunan Province are generally satisfactory, there remains a need for further improvement in emergency management, transportation management, personnel management, etc. Gradually enhancing the level of laboratory animal safety management is essential to collectively safeguard public health safety.

[Key words] Laboratory animals; Biosafety; Safety management; Hunan Province

实验动物是生命科学原始创新的重要载体，同时也是生物技术基础性突破的支撑要素，以及生物医药产业能级跃升的保障基石。随着生命科学研究的快速发展，实验动物被越来越广泛地应用，其生物安全问题近年来也得到了相关部门和社会各界的高度重视。为进一步了解湖南省实验动物机构在生物安全管理方面的现状，查找管理工作中的“短板”，有针对性地提出改进意见和建议，本课题组在全省范围内开展了实验动物机构生物安全管理现状调查，现汇报如下。

1 数据调查对象

在实验动物许可证查询管理系统中查询到，截至2023年7月，湖南省发放的有效期内实验动物许可证共58份，其中使用许可证43份，生产许可证15份。

共涉及40家单位，其中仅使用的单位有32家，仅生产的单位有5家，既生产又使用的单位有3家。其中，长沙市天勤生物技术有限公司有5份生产许可证；湖南安生美药物研究院有限公司有3份使用许可证；湖南斯莱克景达实验动物有限公司有2份生产许可证和1份使用许可证；湖南普瑞玛药物研究中心有限公司、湖南省疾病预防控制中心、湖南师范大学医学院、湖南远泰生物技术有限公司、湖南中医药大学第一附属医院和南华大学分别有2份使用许可证；湖南嘉泰实验动物有限公司和湖南太平生物科技有限公司分别有2份生产许可证；湖南赛诺生物科技股份有限公司、南岳生物制药有限公司分别有1份生产许可证和1份使用许可证。按单位性质划分，生物医药公司21家(52.5%)，高校/科研机构11家(27.5%)，医院/疾控中

心8家(20.0%)。

本次调查于2023年7月开展,对全省40家实验动物机构管理人员发放《实验动物机构生物安全管理现状调查问卷》,进行全样本调查。同时,在每家单位至少抽取1名实验动物饲养或实验操作人员,在具有多份许可证的单位抽取多名工作人员,发放《实验动物饲养或实验操作人员生物安全意识调查问卷》。

2 调查方法及内容

根据《中华人民共和国生物安全法》《实验动物管理条例》《湖南省实施〈实验动物管理条例〉办法》《湖南省实验动物许可证管理实施细则》等法律法规和规定,以及《实验室生物安全通用要求》(GB 19489—2008)和《实验动物 环境及设施》(GB 14925—2023)等国家标准,以“实验动物”、“生物安全”和“应急预案”为关键词在中国知网、中国生物医学数据库和Pubmed数据库进行文献检索,了解国内外实验动物及其相关生物安全管理工作的发展情况,并征集专家意见,设计调研问卷。

对实验动物机构管理情况的调查内容主要包括实验室管理体系建立和整体运行情况,突发事件应急管理,医疗废弃物处置情况,实验动物运输管理,从业人员管理,环境设施消毒及设备的使用、维护情况等。对实验动物饲养或实验操作人员的调查主要包括生物安全意识、动物抓伤/咬伤情况、个人防护装备穿戴和疫苗接种情况等。

3 调查结果

对湖南省40家实验动物机构管理人员发放问卷共40份,回收有效问卷40份。对实验动物饲养或实验操作人员发放问卷共58份,回收有效问卷50份。调查结果如下。

3.1 实验室管理体系建立和整体运行情况

调查结果显示,40家实验动物机构的日常工作总体较为规范,绝大多数机构(39家,97.5%)制定了实验动物管理相关文件和标准操作规程(standard operating procedure, SOP),运行情况总体良好。具体见表1。

3.2 突发事件应急管理情况

湖南省40家实验动物机构中,大多数单位虽然制定了本单位的实验动物突发事件应急预案(37家,92.5%),但有25家单位(62.5%)未定期开展实验动物生物安全应急演练或记录不完善,而在21家生物医

药公司中仅7家(33.3%)每年开展应急演练。一部分单位没有实验动物生物安全风险评估报告(14家,35.0%),8家医院/疾控中心中仅3家(37.5%)开展了风险评估,8家生产单位中仅3家(37.5%)开展了风险评估。这些结果提示,湖南省内实验动物突发事件应急管理方面尚待完善。

3.3 动物来源及医疗废弃物处置情况

湖南省40家实验动物机构的实验动物来源均符合相关文件的规定(40家,100.0%),绝大部分单位(39家,97.5%)建立了实验动物尸体管理制度及实验动物废弃物无害化处置制度。在医疗废弃物处置方面,高校/科研机构稍有欠缺,11家高校/科研机构中有1家(9.1%)未建立医疗废弃物相关管理制度;而生物医药公司、医院/疾控中心的此项指标完善率均为100%。

3.4 从业人员培训、体检及健康档案管理情况

湖南省40家实验动物机构中,绝大多数对从业人员进行每年体检并建立健康档案(39家,97.5%),有人员培训记录(37家,92.5%)。从业人员管理问题主要集中在生物医药公司,21家生物医药公司中有3家(14.2%)不能提供人员培训记录,有1家(4.8%)未建立从业人员健康档案;而高校/科研机构、医院/疾控中心的这两项指标完善率均为100%。

3.5 环境设施消毒及高压灭菌设备的使用、维护情况

湖南省40家实验动物机构均建立了环境设施消毒制度(40家,100.0%),且均有高压灭菌设备使用记录(40家,100.0%)。在高压灭菌设备的使用、维护方面,问题主要集中在生物医药公司。21家生物医药公司中,1家(4.8%)不能提供高压灭菌设备维护计划和记录,1家(4.8%)无高压灭菌器校准合格证或已过期,2家(9.5%)不能提供高压灭菌器灭菌效果监测记录;而高校/科研机构、医院/疾控中心的这3项指标完善率均为100%。

3.6 实验动物运输管理情况

湖南省8家实验动物生产单位的运输管理调查结果显示,尚未制定实验动物运输管理方案的有3家(37.5%),尚未制定实验动物运输途中应急预案的有4家(50.0%),未使用专用车辆运输的有1家(12.5%),没有在每次运输前后均消毒处理的有2家(25.0%)。

3.7 实验动物饲养或实验操作人员的生物安全意识情况

本次研究对50名实验动物饲养或实验操作人员进

表1 实验动物机构生物安全管理现状调查结果

Table 1 Survey results of biosafety management in laboratory animal institutions

调查内容 Survey contents	[n(%)]						合计 Total (n=40)
	按单位性质分 Classified by types of institutions			按许可类型分 Classified by types of licenses			
	生物医药 公司 (n=21)	高校/科 研机构 (n=11)	医院/疾 控中心 (n=8)	仅使用的 单位 (n=32)	仅生产的 单位 (n=5)	既生产又 使用的单 位(n=3)	
制定相关管理文件和标准操作规程(SOP) Establish management documents and standard operating procedures (SOP)	20 (95.2)	11 (100.0)	8 (100.0)	32 (100.0)	4 (80.0)	3 (100.0)	39 (97.5)
建立本实验室(单位)实验动物突发事件应急预案 Establish emergency response plans with laboratory animals	18 (85.7)	11 (100.0)	8 (100.0)	30 (93.8)	4 (80.0)	3 (100.0)	37 (92.5)
有实验动物生物安全应急演练记录 Laboratory animal biosafety emergency drill records	7 (33.3)	5 (45.5)	3 (37.5)	12 (37.5)	1 (20.0)	2 (66.7)	15 (37.5)
有实验室生物安全检查记录 Records of laboratory biosafety inspections	12 (57.1)	8 (72.7)	8 (100.0)	21 (65.6)	4 (80.0)	3 (100.0)	28 (70.0)
有实验室生物安全风险评估报告 Laboratory biosafety risk assessment reports	15 (71.4)	8 (72.7)	3 (37.5)	23 (71.9)	3 (60.0)	0 (0.0)	26 (65.0)
动物来源正规 Laboratory animals with legitimate sources	21 (100.0)	11 (100.0)	8 (100.0)	32 (100.0)	5 (100.0)	3 (100.0)	40 (100.0)
建立实验动物尸体及实验动物废弃物管理处置制度 Establish management and disposal systems for laboratory animal carcasses and wastes	21 (100.0)	10 (90.9)	8 (100.0)	31 (96.9)	5 (100.0)	3 (100.0)	39 (97.5)
建立实验动物从业人员的体检健康档案 Establish medical examination and health records for laboratory animal practitioners	20 (95.2)	11 (100.0)	8 (100.0)	32 (100.0)	4 (80.0)	3 (100.0)	39 (97.5)
人员定期培训并记录 Personnel training records	18 (85.7)	11 (100.0)	8 (100.0)	30 (93.8)	4 (80.0)	3 (100.0)	37 (92.5)
建立环境设施消毒制度 Establish environmental facilities disinfection system	21 (100.0)	11 (100.0)	8 (100.0)	32 (100.0)	5 (100.0)	3 (100.0)	40 (100.0)
高压灭菌设备维护计划和记录 Maintenance plan and records for high-pressure sterilization equipment	20 (95.2)	11 (100.0)	8 (100.0)	31 (96.9)	5 (100.0)	3 (100.0)	39 (97.5)
高压灭菌器使用记录 High-pressure sterilization equipment usage records	21 (100.0)	11 (100.0)	8 (100.0)	32 (100.0)	5 (100.0)	3 (100.0)	40 (100.0)
有高压灭菌器校准合格且在有效期内 High-pressure sterilization equipment calibration certificate and within the validity period	20 (95.2)	11 (100.0)	8 (100.0)	32 (100.0)	4 (80.0)	3 (100.0)	39 (97.5)
有高压灭菌器灭菌效果监测记录 Sterilization efficiency monitoring records for high-pressure sterilization equipment	19 (90.4)	11 (100.0)	8 (100.0)	32 (100.0)	3 (60.0)	3 (100.0)	38 (95.0)

行调查, 结果显示: 不了解国家或湖南省实验动物相关法律法规及行业标准的有2人(4.0%); 不了解实验动物常见人兽共患病和气溶胶危害的分别为2人(4.0%)和6人(12.0%); 不了解本单位实验动物应急预案或处置程序的为2人(4.0%); 不了解实验动物抓

伤或咬伤如何处理的有1人(2.0%); 不了解医疗废弃物意外流失/泄漏/扩散处理方式的有8人(16.0%); 不了解如何防控病媒生物进入实验动物设施的有5人(10.0%); 不了解实验动物逃逸处理方式的有5人(10.0%); 不了解实验动物未知原因大量死亡处理方式

的有5人(10.0%)。具体见表2。

50名实验动物饲养或实验操作人员均接受过培训并取得湖南省实验动物从业人员上岗证书,均每年参加单位组织的体检。但有19人(38.0%)未能每年参加生物安全应急演练;14人(28.0%)未能每年参加实验动物生物安全培训;6人(12.0%)未能做到进行实验动物操作均穿戴个人防护装备;有被实验动物咬伤或抓伤经历的有38人(76.0%),其中造成出血性创伤的有28人(56.0%),非出血性创伤的有10人(20.0%);有27人(54.0%)未接种过流行性出血热疫苗。

4 讨论

动物实验的生物安全问题主要涉及动物性气溶胶管理、人兽共患病防控、实验动物运输管理、突发事件处置、废弃物处理等方面,其可能产生的潜在风险或现实危害包括引种、繁育、运输,以及动物抓取、麻醉、灌胃、采血等过程^[1-2]。实验动物相关的生物安全突发事件是指实验动物生产、使用过程中发生的人兽共患病原感染人,造成一定数量动物死亡的烈性

传染病,以及由于其他突发事件造成的实验动物逃逸事件^[3]。2011年黑龙江省某高校的28名师生因使用未经检疫的羊进行实验而感染布鲁氏菌病^[4]。2021年北京某机构的一名兽医因解剖两只死亡实验猴时感染猴B病毒而死亡^[5]。不断发生的动物实验感染事件再次敲响了警钟,实验动物生物安全管理必须引起足够的重视。

近年来,湖南省实验动物设施及产品规模持续扩大。截至2023年7月,全省发放实验动物许可证58份,较2020年增加了15.7%;实验动物设施总面积约53 000 m²,较2020年增长了65.6%;实验动物包括大鼠、小鼠、豚鼠、兔和小型猪等6种14个品种品系,实验动物年产量170余万只,在全国排名第六^[6]。在此背景下,对全省40家实验动物机构和50名饲养/实验人员开展了此次调查。调查结果表明,湖南省实验动物相关单位的整体运行情况良好,日常管理较为规范,管理制度基本健全,各项资质基本完善,各单位均能按照《实验动物管理条例》和《湖南省实施〈实验动物管理条例〉办法》建立实验动物管理体系,也成立了实验动物生物安全管理委员会/小组,制定了相

表2 实验动物从业人员生物安全意识调查

Table 2 Survey results on biosafety awareness among laboratory animal practitioners

调查内容 Survey contents	[N=50, n(%)]		
	非常了解 Know very well	一般了解 Know well	完全不了解 Do not know
是否知晓国家/湖南省实验动物相关法律法规及行业标准? Are you familiar with national/Hunan laws and regulations on laboratory animals and industry standards?	15 (30.0)	33 (66.0)	2 (4.0)
是否了解实验动物常见的人兽共患病? Are you familiar with common zoonoses in laboratory animals?	17 (34.0)	31 (62.0)	2 (4.0)
是否了解实验动物气溶胶的产生及危害? Are you familiar with the production of aerosols and their hazards in laboratory animals?	18 (36.0)	26 (52.0)	6 (12.0)
是否了解本单位实验动物应急预案或处置程序? Are you familiar with the emergency plan or procedures for handling laboratory animals in your institution?	27 (54.0)	21 (42.0)	2 (4.0)
如被实验动物抓伤或咬伤,是否知晓如何处理? Do you know what to do if you are scratched or bitten by a laboratory animal?	39 (78.0)	10 (20.0)	1 (2.0)
如发生医疗废弃物意外流失/泄露/扩散,是否知晓如何处理? Do you know how to deal with the accidental spill/leakage/diffusion of medical waste?	25 (50.0)	17 (34.0)	8 (16.0)
是否知晓防控病媒生物进入实验动物设施的处理方式? Are you familiar with the management of vector control in laboratory animal facilities?	28 (56.0)	17 (34.0)	5 (10.0)
如发生实验动物逃逸,是否知晓如何处理? Do you know what to do if animals escape from the laboratory?	25 (50.0)	20 (40.0)	5 (10.0)
如发生实验动物未知原因大量死亡,是否知晓如何处理? Do you know what to do if a large number of laboratory animals die from unknown causes?	25 (50.0)	20 (40.0)	5 (10.0)

关 SOP, 其动物来源正规, 均建立了环境设施消毒制度, 但也存在几个问题需要引起重视。

4.1 强化实验动物突发事件应急管理

本次调查发现, 在从事实验动物饲养或实验操作的人员中有过被实验动物咬伤或抓伤经历的占 76.0%, 其中造成出血性创伤的占 56.0%。多数单位在生物安全突发事件应急管理方面不够完善, 虽然大部分单位针对实验动物的管理制定了应急预案, 但对于常见的实验动物生物安全突发事件, 如实验动物逃逸、抓伤咬伤、实验动物未知原因大量死亡等, 部分从业人员不了解如何进行紧急处理和相关的上报流程。多数单位未开展过实验动物生物安全突发事件应急演练, 尤其是实验动物生产单位开展风险评估和应急演练的比例与使用单位相比较低, 这表明对于突发事件的应急处置能力有待进一步加强。

为加强生物安全应急管理, 多个省份已制定和出台了区域性的实验动物突发事件应急预案^[3,7-8]。相对而言, 湖南省在制订应急预案和开展应急演练方面还相对薄弱。为加强湖南省实验动物生物安全管理, 提升实验动物生物安全突发事件预防与应急处置能力, 深化实验动物领域“放管服”改革, 健全依法行政工作机制, 2023 年湖南省科学技术厅、省教育厅、省生态环境厅等 8 个部门联合制定出台了《湖南省实验动物生物安全监管实施方案》(湘科发〔2023〕87 号) 和《湖南省实验动物生物安全突发事件应急预案》(湘科发〔2023〕88 号) 2 个规范性文件。实验动物生物安全监管管理部门应依照上述文件的要求, 加大对实验动物生产、使用单位的实验动物生物安全监管力度, 强化实验动物生物安全的日常监管, 定期进行监督检查, 发现问题及时通报并督促整改, 建立和完善问责、追责机制, 组织开展全省范围内 II 级或 III 级实验动物生物安全突发事件应急演练。

各实验动物机构应高度重视实验动物生物安全管理, 一方面要加强本单位工作人员的生物安全意识, 在相关操作前做好防护措施, 正确固定、抓取实验动物, 加强应对实验动物抓伤、咬伤、逃逸等常见突发状况的培训, 并提高相关疫苗的接种率; 另一方面要严格按照相关文件的要求, 建立并完善本单位生物安全管理体系, 及时评估生物安全风险, 制定适应的应急处置预案, 熟悉应急处置流程, 定期开展生物安全应急演练。生物医药公司要重点加强从业人员管理, 定期开展体检, 提高相关疫苗接种率, 建立人员健康

档案等, 同时加强高压灭菌设备管理, 定期校准和维护, 做好灭菌效果监测。高校/科研机构应重点加强对实验动物尸体及医疗废弃物的管理。

4.2 强化实验动物运输管理

本次调查显示, 湖南省实验动物运输管理方面仍存在欠缺, 分别有 37.5% 和 50.0% 的实验动物生产单位未制定实验动物运输管理方案和应急预案。此外, 仍有生产单位未使用专用车辆运输 (1 家, 12.5%), 运输前后消毒处理不完善 (2 家, 25.0%)。截至 2023 年 7 月, 湖南省在有效期内的实验动物生产许可证共 15 份, 涉及 8 家单位, 实验设施面积从 200 m² ~ 3 000 m² 不等, 生产管理参差不齐, 可能存在运输车辆货厢内环境指标不达标或记录不完整、笼具不符合要求、不同种类实验动物违规混装、动物运输车辆灭菌消毒不及时、运输和接收环节存在污染控制不到位等情况。

国家认证认可监督管理委员会在 2021 年发布了行业标准《实验动物运输管理规范》(RB/T 062—2021), 从供应方、承运方、接收方在运输条件、运输要求和运输控制等多方面进行规定^[9]。2023 年北京市科学技术委员会联合多部门共同发布了《北京市实验动物运输管理办法》(京科发〔2023〕3 号), 以规范实验动物运输管理。因此, 建议湖南省相关部门结合实际情况, 制定区域性的实验动物运输管理办法, 明确相关监管责任, 明确实验动物运输需要取得的许可和资质, 规定被许可人的管理主体责任与具体要求, 规定实验动物专用运输车辆及其配置要求, 加强实验动物运输的监督管理工作, 对实验动物运输情况开展日常监督检查与抽查, 提升本省实验动物安全监管水平。湖南省实验动物生产单位、实验动物承运单位应按照《实验动物运输管理规范》和相关规定, 保证运输过程中实验动物质量, 维护动物福利, 同时充分考虑运输过程的安全, 做好风险控制及应急预案, 确保实验动物免受感染或污染, 避免对人员及环境安全产生不良影响, 保障生物安全。

4.3 强化从业人员培训

从事一线实验动物饲养工作的人员学历普遍不高, 人员流动性较大, 很多从业人员对实验动物法律法规和相关知识不熟悉, 生物安全意识普遍不高。个人防护设备是对实验和饲养人员的重要保护屏障, 进入实验动物设施前应正确穿戴个人防护装备。本次调查显示, 湖南省实验动物机构中只有 88.0% 的从业人员在进入设施进行各项操作前穿戴了个人防护装备, 部分

从业人员的个人防护意识不强。实验动物生物安全监管部门和实验动物机构应不断完善考核制度、人员监督制度,加强对实验动物从业人员的培训。可以结合现代网络化技术,通过线上线下在职教育培训、组织知识竞赛、科普宣传活动等形式,加强实验动物相关法律法规的宣贯,确保从业人员掌握生物安全相关知识,增强其生物安全防护意识和个人防护意识,从而规范实际操作。

做好实验动物生物安全工作至关重要,通常需要多部门通力合作。相关监管部门在完善各项法律法规、标准的同时,要加强实验动物生物安全的监督管理。各实验动物机构既要建立有效的生物安全管理体系,落实管理责任,及时评估生物安全风险,也要不断强化生物安全知识的培训,预防生物安全突发事件,并做好应急演练,共同维护公共卫生安全,切实筑牢湖南省实验动物生物安全屏障。

[作者贡献 Author Contribution]

刘美佟负责检索文献,撰写论文;
陈长、张兆强、范荻、胡旃负责整理数据、统计分析和文章修改;
马海玲负责文章指导与审核。

[利益声明 Declaration of Interest]

本文所有作者均声明本文不存在利益冲突。

[参考文献 References]

- [1] 胡小林. 实验动物生物安全风险及管理对策[J]. 畜牧兽医学报(电子版), 2019(6): 26-27. DOI: 10.3969/j.issn.2096-3637.2019.06.015.
HU X L. Biosafety risks and management countermeasures of experimental animals[J]. *Graziery Vet Sci Electron Version*, 2019(6):26-27. DOI:10.3969/j.issn.2096-3637.2019.06.015.
- [2] 马春峰, 郭振东, 汤文庭. 动物生物安全实验室常见生物危害及控制措施[J]. 畜牧与兽医, 2019,51(9):119-124.
MA C F, GUO Z D, TANG W T. Biohazards in and control measures for the animal biosafety laboratory[J]. *Anim Husbandry Vet Med*, 2019,51(9):119-124.
- [3] 汪文琦, 刘兰, 樊世勇, 等. 甘肃省实验动物生物安全应急管理探索与实践[J]. 特种经济动植物, 2023, 26(1):166-169. DOI: 10.3969/j.issn.1001-4713.2023.01.054.
WANG W Q, LIU L, FAN S Y, et al. Exploration and practice of emergency management of laboratory animal biosafety in Gansu Province[J]. *Spec Econ Anim Plants*, 2023, 26(1):166-169. DOI: 10.3969/j.issn.1001-4713.2023.01.054.

- [4] 王帝, 翟璐. 东北农业大学28名师生因动物实验感染严重传染病[EB/OL]. (2011-09-03)[2023-09-10]. http://zqb.cyoil.com/html/2011-09/03/nw.D110000zgqnb_20110903_3-03.htm.
WANG D, ZHAI L. Twenty-eight teachers and students in Northeast Agricultural University were infected with severe infectious diseases due to animal experiments [EB/OL]. (2011-09-03) [2023-09-10]. http://zqb.cyoil.com/html/2011-09/03/nw.D110000zgqnb_20110903_3-03.htm.
- [5] WANG W L, QI W J, LIU J Y, et al. First human infection case of monkey B virus identified in China, 2021[J]. *China CDC Wkly*, 2021, 3(29):632-633. DOI: 10.46234/ccdcw2021.154.
- [6] 黄丽, 曾颖, 常伟. 湖南省实验动物资源支撑生物医药科技创新与产业发展调研报告(2022年)[J]. *中南药学*, 2022, 20(8):1743-1746. DOI: 10.7539/j.issn.1672-2981.2022.08.005.
HUANG L, ZENG Y, CHANG W. Investigation report on biomedical science and technology innovation and industrial development supported by laboratory animal resources in Hunan Province (2022) [J]. *Cent South Pharm*, 2022, 20(8):1743-1746. DOI: 10.7539/j.issn.1672-2981.2022.08.005.
- [7] 巩薇, 贺争鸣, 李根平. 北京市实验动物突发重大事件应急预案的制定[J]. *实验动物科学*, 2008, 25(1):29-33. DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2008.01.009.
GONG W, HE Z M, LI G P. Formulation of emergency plan for laboratory animals in Beijing[J]. *Lab Anim Sci*, 2008, 25(1):29-33. DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2008.01.009.
- [8] 陆建玲, 单斌, 孙兴莲, 等. 江苏省突发实验动物生物安全事件应急预案的编制[J]. *实验动物与比较医学*, 2015, 35(6):510-514. DOI: 10.3969/j.issn.1674-5817.2015.06.016.
LU J L, SHAN B, SUN X L, et al. Compilation of emergency plan for sudden laboratory animal biosafety events in Jiangsu Province[J]. *Lab Anim Comp Med*, 2015, 35(6):510-514. DOI: 10.3969/j.issn.1674-5817.2015.06.016.
- [9] 国家认证认可监督管理委员会. 实验动物运输管理规范: RB/T 062—2021[S]. 北京: 中国标准出版社, 2022.
National Certification and Accreditation Administration Regulatory Commission. Code for management of transportation of laboratory animals: RB/T 062-2021[S]. Beijing: Standards Press of China, 2022.

(收稿日期: 2023-09-25 修回日期: 2024-02-02)

(本文编辑: 张俊彦, 富群华, 丁宇菁, 李燕真)

[引用本文]

- 刘美佟, 陈长, 张兆强, 等. 湖南省实验动物机构生物安全管理现状调查[J]. *实验动物与比较医学*, 2024, 44(2): 202-208. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2023.129.
LIU M T, CHEN Z, ZHANG Z Q, et al. Investigation on current biosafety management status in laboratory animal institutions in Hunan Province[J]. *Lab Anim Comp Med*, 2024, 44(2): 202-208. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2023.129.

四川省实验动物管理政策分析

陈兵^{1,2}, 邹弈星^{1,2}, 姚凌云^{1,2}, 王敬东^{1,2}

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

[摘要] 完善实验动物管理制度是促进实验动物管理法制化和规范化的有效方式之一。本文系统梳理了自2019年以来国家制定颁布的法律法规、规范性文件及标准, 以及规定中关于实验动物管理的相关内容 with 最新要求, 然后分析了近年来四川省在实验动物行政管理、质量保障、生物安全、地方标准等四个方面的管理制度现状, 并对存在的问题进行归纳总结, 且针对性地提出相应政策建议, 以期四川省实验动物管理政策制定提供参考。

[关键词] 实验动物; 管理制度; 政策建议; 四川省

[中图分类号] Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2024)02-0209-05



Research on Management Policies of Laboratory Animals in Sichuan Province

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

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

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

[ABSTRACT] Improving laboratory animal management system is one of the effective ways to promote the legalization and standardization of laboratory animal management. This article systematically reviews the relevant content and requirements of the latest laws, regulations, normative documents, and standards formulated and promulgated by the state since 2019 regarding the management of experimental animals. It also analyzes the current institutional framework in managing experimental animals in Sichuan Province from four aspects: administrative management, quality assurance, biosafety, and local standards. Furthermore, this article summarizes the existing problems and proposes corresponding policy recommendations in a targeted manner, aiming to provide a reference for the formulation of robust experimental animal management policies in Sichuan Province.

[Key words] Laboratory animals; Management policies; Policy recommendations; Sichuan Province

实验动物是生命科学研究不可或缺的活的“精密仪器”, 广泛应用于生命科学^[1]、食品药品^[2]、仪器设备^[3]、环境保护^[4]、航空航天^[5]等多个研究领域, 是科技进步与创新的重要支撑条件。四川省是实验动物生产和使用大省, 其实验动物许可证数量位居全国第七、西部第一^[6], 实验动物生产使用总量已超300万只。2019年以来, 一系列国家和行业法律法规、规范性文件、标准相继颁布实施, 在实验动物行政许可、实验动物质量控制、实验动物生物安全防范、实验动物

福利伦理等方面提出了一些新的规范要求。在新形势下, 开展四川省实验动物管理制度现状研究, 能够发现现行制度体系中存在的不足, 进一步完善四川省实验动物管理政策, 对支持实验动物产业发展、科技创新、优化营商环境具有重要意义。

1 国家实验动物管理政策发展趋势

1.1 实验动物相关法律法规逐步增多

2019年以来, 国家先后新增或者修订了多部法律

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

[第一作者] 陈兵(1990—), 男, 硕士, 助理研究员, 研究方向: 实验动物管理。E-mail: nczxcb2018@126.com

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

法规, 其中有7部法律法规的部分章节条款都涉及实验动物相关内容, 包括2019年11月1日开始实施的《中华人民共和国行政许可法》、2021年3月1日开始实施的《中华人民共和国刑法修正案(十一)》、2021年4月15日开始实施的《中华人民共和国生物安全法》、2021年5月1日开始实施的《中华人民共和国动物防疫法》、2021年9月1日开始实施的《中华人民共和国安全生产法》、2022年1月1日开始实施的《中华人民共和国科学技术进步法》和2022年3月20日开始实施的《关于加强科技伦理治理的意见》。

1.2 法律法规更加关注实验动物的生物安全和福利伦理

2021年4月15日起施行的《中华人民共和国生物安全法》第四十七条、第七十七条共计提及实验动物6次, 涉及实验动物管理、无害化处理、禁止将使用后的实验动物流入市场及相关违法行为处理等内容。2021年国家新修订了《中华人民共和国动物防疫法》, 新增了第一百一十二条“实验动物防疫有特殊要求的, 按照实验动物管理的有关规定执行”。2022年3月, 国务院办公厅印发了《关于加强科技伦理治理的意见》, 第二章第二条说明“使用实验动物应符合‘减少、替代、优化’等要求”, 第五章第一条说明“涉及人、实验动物的科技活动, 应当按规定由本单位科技伦理(审查)委员会审查批准”。

1.3 实验动物标准紧跟国际要求

2019年4月, 全国实验动物标准化技术委员会启动了现行国家标准《实验动物 环境及设施》(GB 14925—2010)的修订工作: 新增了对实验动物饲料、垫料仓库环境指标的要求, 在“设施”章节新增了空调净化、自动控制、消防要求等内容, 在“运输”章节新增加了运输环境要求, 修正了实验动物设施和环

境技术指标要求, 细化了常用实验动物所需居所的最小空间要求, 使工艺布局、设施、废弃物处理、运输、检测、运行维护等更具可操作性, 更加符合国际上对实验动物福利的要求。2023年11月, 国家市场监督管理总局批准了《实验动物 环境及设施》(GB 14925—2023), 正式替代2010年版本, 并于2024年6月1日正式实施。2022年12月, 新修订的《实验动物 微生物、寄生虫学等级及监测》(GB 14922—2022)国家标准发布, 该标准取代原有的《实验动物 寄生虫学等级及监测》(GB 14922.1—2001)和《实验动物 微生物学等级及监测》(GB 14922.2—2011)两个标准, 取消了清洁

级实验动物分类, 实验动物等级划分标准与国际标准一致。

2 四川省实验动物行业发展现状

2.1 行业规模持续扩大

2023年, 四川省实验动物持证单位116家, 较2022年增长18家; 实验动物设施总面积为29.67万平方米, 较2022年增长6.38%; 实验动物生产和使用总量分别为344.35万只和122.84万只, 较2022年分别增长29.99%和8.5%; 实验动物从业人员3472人, 较2022年增长6.5%; 实验动物产业直接经济效益11.24亿元人民币, 较2022年增长25.4%。

2.2 行业影响日益突出

2019年以来, 维通利华、药明康德、集萃药康、玛斯生物等国内外知名实验动物相关企业相继落户四川省。目前, 全省共有实验动物许可证153个, 其中生产许可证31个, 使用许可证122个, 许可证总量居全国第七、西部第一。

2.3 行业创新步伐加快

2020年以来, 四川省内新搭建了实验动物相关的科技资源共享与服务平台3个、院士专家工作站1个、省重点实验室1个; 研发了免疫缺陷小鼠新品系12个、大鼠新品系5个; 构建了眼病、银屑病、口腔疾病、高血压等人类疾病相关的实验动物模型, 部分实验动物疾病模型获得国家发明专利授权; “基于创新疾病动物模型的规模化 and 规范化临床前药效评价平台”成果获四川省科技进步三等奖。

3 四川省实验动物管理政策分析

2018年以来, 四川省实验动物管理制度体系逐渐完善, 先后印发了一系列的实验动物相关管理规范性文件, 包含行政管理、质量保障、生物安全、地方标准等, 为加强实验动物管理、规范行业发展提供了制度保障。

3.1 实验动物行政管理方面

四川省科学技术厅对2013年制订的《四川省实验动物管理暂行办法》进行了修订, 新的《四川省实验动物管理办法》于2019年11月1日起开始实施。该管理办法主要从6个方面对实验动物工作进行了规范: 一是成立管理机构。四川省科学技术厅联合相关部门成立省实验动物管理委员会, 负责全省实验动物工作的宏观管理与组织协调。二是鼓励科技创新。推进实

验动物标准化工作, 加强对实验动物科学研究和人才队伍培养的支持。三是改革行政审批。取消了“实验动物出口审批”“实验动物工作单位从国外进口实验动物原种登记单位指定”“从事实验动物工作人员资格认可”行政审批事项。四是落实安全生产。四川省科学技术厅根据规定对实验动物设施进行安全评价, 要求实验动物单位切实履行安全生产职责, 特种作业人员需培训考核后持证上岗。五是强调生物安全。对实验动物尸体及废弃物的处理机构、处理规范等作了明确规定。六是改善动物福利。细化了对实验动物保护的规定, 增加了“3R”原则的要求。

3.2 实验动物质量保障方面

2018年, 四川省科学技术厅印发了《关于进一步做好实验动物质量管理工作的通知》, 对全省实验动物质量管理工作提出了明确要求: 要提高认识、落实责任, 做好实验动物设施的运行维护, 提高饲养管理水平和动物实验质量。2019年以来, 四川省科学技术厅每年定期对全省实验动物相关单位开展“重点监管”, 按照“各实验动物生产单位、各单位实验动物品种、各实验动物品种关键指标”3个全覆盖原则, 委托第三方检测单位对全省实验动物生产单位中全部实验动物品种品系进行抽检, 对部分实验动物使用单位进行环境设施抽检, 有效提升了全省实验动物质量和动物实验质量。

3.3 实验动物生物安全方面

2018年, 四川省科学技术厅印发了《四川省科学技术厅关于进一步加强全省实验动物尸体及废弃物管理工作的通知》, 强化了全省实验动物生产、使用监管责任; 要求对实验动物尸体及废弃物分级分类集中处理, 防止实验动物尸体及废弃物引发疾病流行和造成环境污染, 确保实验动物生物安全; 要求各实验动物单位根据需要必须在有《动物防疫条件合格证》或者《危险废物经营许可证》资质且核准经营危险危废类别相符的单位进行无害化处理。此后, 四川省科学技术厅在每年的年检工作中, 都把实验动物尸体及废弃物处理作为重点内容进行年度检查。2021年, 四川省科学技术厅印发了《关于加强实验动物安全生产管理工作的通知》, 要求各单位切实增强实验动物安全生产防范意识, 制定和完善实验动物应急预案, 及时排除实验动物安全生产管理工作安全隐患。

3.4 实验动物地方标准建设方面

2018年以来, 四川省科学技术厅结合工作实际和

形势发展, 启动了实验动物地方标准的制定工作。2021年和2022年, 四川省市场监督管理局共批准发布了10项四川省实验动物地方标准, 包括《实验用猪 环境及设施》(DB51/T 2756—2021)、《实验用猪 微生物学和寄生虫学等级及监测》(DB51/T 2757—2021)和《实验用小型猪 遗传质量控制》(DB51/T 2758—2021)、《普通级实验用猫 环境及设施》(DB51/T 2851—2021)、《普通级实验用猫 微生物学监测》(DB51/T 2852—2021)、《普通级实验用猫 寄生虫学监测》(DB51/T 2853—2021)、《普通级实验用羊 环境及设施》(DB51/T 2854—2021)、《普通级实验用羊 微生物学监测》(DB51/T 2855—2021)、《普通级实验用羊 寄生虫学监测》(DB51/T 2856—2021)和《实验用猪 营养需要》(DB51/T 2857—2021), 对实验用猪、猫、羊等的行政许可与监督管理提供了重要依据, 使四川省实验动物监管体系更加健全。

4 现阶段四川省实验动物管理政策存在的主要问题

4.1 实验动物法律地位亟待提升

目前, 四川省实验动物管理主要依据《四川省实验动物管理办法》, 但该办法是规范性文件, 效力层级不高。国内北京、吉林、云南、广东、黑龙江、湖北等6省市先后通过地方人大制定了《实验动物管理条例》^[7]。比如, 在2021年, 北京市发布了新修订后的《北京市实验动物管理条例》, 弥补了原有法律制度对北京市实验动物和动物实验的监管盲区, 保障了实验动物和动物实验的质量, 强化了实验动物安全监管, 解决了执法中的难点。相对而言, 四川省尚未明确实验动物的法律地位, 实验动物监管还存在薄弱环节。

4.2 实验动物生物安全管理有待加强

近年来, 国家先后出台了《中华人民共和国生物安全法》《中华人民共和国安全生产法》等法律法规, 对应急预案、病原微生物实验室、实验动物无害化处理等方面提出了要求。江苏、北京、江西都出台了《突发实验动物生物安全事件应急预案》^[8-10]。北京市通过协调农业农村局、生态环境局等单位, 对实验动物尸体处理给出了指导意见, 发布了《北京市实验动物尸体处理管理规定》。四川省现有的实验动物生物安全管理制度缺乏系统性, 亟须建立统一的突发实验动物生物安全事件应急预案。

4.3 支持科技创新力度不够

目前,在四川省科技计划中,还没有设立实验动物科技创新专项计划,每年支持力度有限。而上海市科学技术委员会从1998年起开始实施“科技创新行动计划”,设立实验动物研究领域专项,累计支持项目超过550项,资助总经费超过2亿元。陕西省在科技计划中也设立了实验动物专项,支持实验动物创新及服务能力建设。浙江省设立基础公益研究计划项目实验动物专项后效果显著,加快了浙江省生命科学研究、生物医药开发进程。因此,四川省有必要在省科技计划中设立支持实验动物科技创新发展的专项,以引导科技创新支持实验动物行业发展。

4.4 人才队伍建设指导不足

2016年,国家取消“从事实验动物工作人员资格认可”后,四川省要求各单位对实验动物工作人员自行培训,但普遍存在培训内容不规范、培训形式单一、针对性不强等问题。此外,尽管各单位都按《实验动物管理条例》规定组织员工进行健康体检,但是并未根据从业人员的健康状况进行岗位分类管理。

5 完善四川省实验动物管理政策的建议

实验动物相关法律法规在不断完善,实验动物有关管理制度也在不断优化。面对新的形势和发展阶段,结合2023年6月四川省委在《关于深入推进新型工业化加快建设现代化产业体系的决定》中提出的“构建世界一流的生物医药创新服务体系,强化实验动物等重要资源支撑,做大做强生物医药产业”战略计划,笔者提出推动四川省实验动物高质量发展的管理政策建议如下:

5.1 加快制定《四川省实验动物管理条例》

以国家《实验动物管理条例》为根本遵循,支撑四川省科技创新和经济社会发展为根本,尽快制定《四川省实验动物管理条例》,提升四川省实验动物管理制度的法律地位。建议《四川省实验动物管理条例》分别从生产管理、使用管理、安全管理、福利伦理管理、单位与从业人员管理、监督检查、法律责任等方面制定^[11]。

5.2 针对生物安全薄弱环节形成配套政策

结合省外经验做法和省内实际需求,一是制定《突发实验动物生物安全事件应急预案》(拟),明确生物安全事件的级别以及处理方式,明确管理责任主体^[8-10];二是制定《四川省实验动物废弃物无害化处理管理办法》(拟),与卫健、环保等部门建立实验动

物尸体和废弃物处理协调联络机制,明确在生产和使用过程中易产生生物安全隐患的薄弱环节^[12],界定废弃物种类,按照实验动物生产和使用单位性质分类处理实验动物废弃物,提出各类废弃物交由不同处置单位进行处理的^[13]具体要求。

5.3 出台支持实验动物科技创新的资助计划

建议借鉴上海市(科技创新行动计划-实验动物领域专项)、浙江省(基础公益研究计划-实验动物专项)、陕西省^[14](实验动物专项)的先进做法,设立四川省科技创新资助计划-实验动物专项,支持实验动物标准种质资源开发、实验动物全过程可追溯、实验动物福利与伦理、人类疾病动物模型、实验动物及环境设施的质量控制与监测,以及实验动物机构安全运行等领域的新方法与新技术研究。

5.4 加强实验动物从业人员队伍建设和保障

一是建立《实验动物从业人员培训规范》(拟),明确实验动物不同种类从业人员培训要求、培训形式和需要掌握的基础知识^[15-16],指导各单位建立符合本单位实际情况的从业人员培训体系;二是建立《实验动物从业人员体检指导目录》(拟)^[17],根据所使用的实验动物种类和需要检测的项目情况,制定人员体检指导目录。

[作者贡献 Author Contribution]

陈兵负责数据统计分析、文章撰写及修改;
邹弈星参与数据统计分析和文章撰写;
姚凌云参与数据支持;
王敬东进行文章写作指导。

[利益声明 Declaration of Interest]

所有作者均声明本文不存在利益冲突。

[参考文献 References]

- [1] 秦川,孔琪,钱军,等.实验动物科学技术是生命科学和健康中国建设的基础支撑条件[J].科技导报,2017,35(11):10-14. DOI: 10.3981/j.issn.1000-7857.2017.11.001.
QIN C, KONG Q, QIAN J, et al. Laboratory animal science and technology is strategically important to life science and health China Construction[J]. Sci Technol Rev, 2017, 35(11):10-14. DOI: 10.3981/j.issn.1000-7857.2017.11.001.
- [2] 徐容,曹入双,杨茂,等.低碳水化合物饮食对小鼠肾脏和肝脏的影响[J].食品安全导刊,2021(27):91-94. DOI: 10.16043/j.cnki.cfs.2021.27.053.
XU R, CAO R S, YANG M, et al. Effects of low carbohydrate diet on kidney and liver in mice[J]. China Food Saf Mag, 2021(27):91-94. DOI: 10.16043/j.cnki.cfs.2021.27.053.
- [3] 韦晓娟,杨阳,刘静.可植入式温差发电技术的动物实验研究[J].北京生物医学工程,2008,27(3):276-280. DOI: 10.3969/j.issn.1002-3208.2008.03.014.

- WEI X J, YANG Y, LIU J. Animal experiments on implanted thermal electricity generator[J]. Beijing Biomed Eng, 2008, 27(3): 276-280. DOI: 10.3969/j.issn.1002-3208.2008.03.014.
- [4] 苏瑞军, 晋小婷, 安全, 等. 太原市冬季大气PM2.5暴露对小鼠脏器及炎症因子的影响研究[J]. 环境与健康杂志, 2015, 32(8):677-679. DOI: 10.16241/j.cnki.1001-5914.2015.08.005.
- SU R J, JIN X T, AN Q, et al. Effects of PM2.5 collected in winter of Taiyuan on organs weights and inflammatory cytokines expressions in mice[J]. J Environ Health, 2015, 32(8): 677-679. DOI: 10.16241/j.cnki.1001-5914.2015.08.005.
- [5] 董李晋川, 黄红, 刘斌, 等. 苏俄太空动物实验研究发展历程[J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(4):557-567. DOI: 10.3969/j.issn.1005-4847.2022.04.015.
- DONG L J C, HUANG H, LIU B, et al. A review of space animal experiments conducted by the former Soviet Union and Russia[J]. Acta Lab Anim Sci Sinica, 2022, 30(4):557-567. DOI: 10.3969/j.issn.1005-4847.2022.04.015.
- [6] 李会萍, 梁楚军, 赵维波. 广东省实验动物许可证管理现状[J]. 实验动物与比较医学, 2022, 42(6): 577-582. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2022.107.
- LI H P, LIANG C J, ZHAO W B. The Current status of laboratory animal license administration in Guangdong Province[J]. Lab Anim Comp Med, 2022, 42(6): 577-582. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2022.107.
- [7] 贺争鸣, 李根平, 徐平, 等. 写在《实验动物管理条例》发布实施三十周年[J]. 实验动物科学, 2018, 35(4): 1-13. DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2018.04.001.
- HE Z M, LI G P, XU P, et al. Written on the 30th anniversary of the promulgation and implementation of the regulations for the administration of laboratory animals[J]. Lab Anim Sci, 2018, 35(4): 1-13. DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2018.04.001.
- [8] 陆建玲, 单斌, 孙兴莲, 等. 江苏省突发实验动物生物安全事件应急预案的编制[J]. 实验动物与比较医学, 2015, 35(6): 510-514. DOI: 10.3969/j.issn.1674-5817.2015.06.016.
- LU J L, SHAN B, SUN X L, et al. Compilation of emergency plan for sudden laboratory animal biosafety events in Jiangsu Province[J]. Lab Anim Comp Med, 2015, 35(6): 510-514. DOI: 10.3969/j.issn.1674-5817.2015.06.016.
- [9] 巩薇, 贺争鸣, 李根平. 北京市实验动物突发重大事件应急预案的制定[J]. 实验动物科学, 2008, 25(1): 29-33. DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2008.01.009.
- GONG W, HE Z M, LI G P. Formulation of emergency plan for laboratory animals in Beijing[J]. Lab Anim Sci, 2008, 25(1): 29-33. DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2008.01.009.
- [10] 褚芳, 黄雪梅, 徐丽英, 等. 江西省实验动物突发重大疫情应急预案的制定[J]. 实验动物科学, 2011, 28(3): 55-59. DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2011.03.014.
- CHU F, HUANG X M, XU L Y, et al. Formulation of emergency plan for sudden major epidemic situation of experimental animals in Jiangxi Province[J]. Lab Anim Sci, 2011, 28(3): 55-59. DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2011.03.014.
- [11] 刘玉琴. 解读《北京市实验动物管理条例》[J]. 中华病理学杂志, 2005, 34(4): 255-256. DOI: 10.3760/j.issn.0529-5807.2005.04.024.
- LIU Y Q. Interpretation of the regulations of Beijing municipality on the administration of laboratory animals[J]. Chin J Pathol, 2005, 34(4): 255-256. DOI: 10.3760/j.issn.0529-5807.2005.04.024.
- [12] 李宝龙, 王玉娥, 司昌德, 等. 黑龙江省实验动物管理现状与发展对策[J]. 实验动物与比较医学, 2021, 41(3): 181-189. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2021.043.
- LI B L, WANG Y, SI C D, et al. Current situation and development countermeasures of laboratory animal management in Heilongjiang Province[J]. Lab Anim Comp Med, 2021, 41(3): 181-189. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2021.043.
- [13] 张阔, 田枫, 康爱君, 等. 2016年北京地区实验动物废弃物处理方法的调查与分析[J]. 中国比较医学杂志, 2017, 27(11): 60-63. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7856.2017.11.012.
- ZHANG K, TIAN F, KANG A J, et al. Investigation and analysis of laboratory animal waste disposal in Beijing area in 2016[J]. Chin J Comp Med, 2017, 27(11): 60-63. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7856.2017.11.012.
- [14] 师长宏, 刘恩岐, 张海. 陕西省实验动物工作近10年发展历程[J]. 实验动物与比较医学, 2021, 41(1): 14-16. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2021.011.
- SHI C H, LIU E Q, ZHANG H. Development of Shaanxi laboratory animal science in past 10 years[J]. Lab Anim Comp Med, 2021, 41(1): 14-16. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2021.011.
- [15] 邸冉, 刘佩琳, 杨海龙, 等. 实验动物从业人员培养体系调查分析[J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(4): 116-119. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.04.016.
- DI R, LIU P L, YANG H L, et al. Investigation and analysis on the training system of laboratory animal employees[J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(4): 116-119. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.04.016.
- [16] 褚芳, 罗小泉, 许宝华, 等. 江西省实验动物科技发展回顾与思考[J]. 实验动物与比较医学, 2022, 42(1): 11-17. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2021.189.
- CHU F, LUO X Q, XU B H, et al. Development of laboratory animal science and technology in Jiangxi Province: review and reflection[J]. Lab Anim Comp Med, 2022, 42(1): 11-17. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2021.189.
- [17] 马小琴, 徐莹娴. 实验动物从业人员职业伤害和自我防护与其焦虑、抑郁水平的相关性[J]. 中国健康心理学杂志, 2015, 23(12): 1799-1802. DOI: 10.13342/j.cnki.cjhp.2015.12.012.
- MA X Q, XU J X. The relationship among laboratory animal workers' occupational injury, self-protection and anxiety, depression[J]. China J Health Psychol, 2015, 23(12): 1799-1802. DOI: 10.13342/j.cnki.cjhp.2015.12.012.

(收稿日期: 2023-08-04 修回日期: 2023-10-08)

(本文编辑: 张俊彦, 富群华, 丁宇菁, 周晓铤)

[引用本文]

陈兵, 邹弈星, 姚凌云, 等. 四川省实验动物管理政策分析[J]. 实验动物与比较医学, 2024, 44(2): 209-213. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2023.110.

CHEN B, ZOU Y X, YAO L Y, et al. Research on management policies of laboratory animals in Sichuan Province[J]. Lab Anim Comp Med, 2024, 44(2): 209-213. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2023.110.

完善实验动物废物处置质量管理体系的思考:以中国食品药品检定研究院为例

马丽颖, 赵明海, 梁春南, 岳秉飞, 王 洪

(中国食品药品检定研究院, 北京 102629)

[摘要] 科技发展是推动人类社会前进的巨大动力, 而实验动物资源是生命科学、医药等领域科技发展的条件保障。但在开展医药研发、检验检测等实验过程中, 使用实验动物产生的废物也为城市管理带来了新的考验。废物的分类、回收、有效利用和生物安全危害等问题接踵而至, 对法规、标准、规范等的制定提出了与时俱进的要求。质量管理体系建设是检验检测机构管理的地基和框架, 具备较强的操作性和检查性, 可以不断提升管理水平, 加强基础管理的稳定性。随着各层级新的管理办法出台, 很多单位现行的质量管理体系内关于实验动物废物管理的相关内容欠妥, 存在未明确非医疗机构实验动物废物处置流程、实验动物废物分类不准确、不同分类的废物未能按照不同方式处置等问题。本文针对目前存在的问题, 梳理了中国食品药品检定研究院质量管理体系需要增加或者删改的流程, 并制订了现行有效的标准作业流程, 在如何加强监督管理方面提出了切实可行的措施, 并开创性地把6S管理内容纳入质量管理体系中。因此, 针对实验动物废物的管理应从完善质量管理体系的角度出发, 从源头做好废物分类和管理, 有效控制生物危害, 最大限度地减少环境污染, 为可持续发展创造条件。

[关键词] 废物; 质量管理; 实验动物; 检验检测机构

[中图分类号] Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2024)02-0214-06



Reflection on Improving the Quality Management System for Experimental Animal Waste Disposal: National Institutes for Food and Drug Control as an Example

MA Liying, ZHAO Minghai, LIANG Chunnan, YUE Bingfei, WANG Hong

(National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 102629, China)

Correspondence to: WANG Hong (ORCID: 0009-0004-1402-6735), E-mail: wanghong@nifdc.org.cn

[ABSTRACT] Science and technological advancements drive human progress, with laboratory animals serving as essential resources for developments in life sciences and medicine. However, the waste generated by these animals presents new challenges for urban management. Issues such as classification, recycling, effective utilization, and biohazard elimination must be addressed, necessitating the development of regulations, standards, and norms to keep pace with advancements. The construction of quality management system is the foundation and framework for the management of inspection and testing organizations. It should have strong operability and inspectability, enabling continuous improvement of the management level and enhancing the stability of basic management. However, current quality management systems often lack clarity in managing laboratory animal waste, including undefined disposal processes for non-medical institutions, inaccurate waste classification, and inadequate disposal methods for different waste categories. This paper addresses these challenges by identifying necessary processes to be added or removed in the quality management system of National Institutes for Food and Drug Control, developing effective SOPs, proposing practical measures to strengthen supervision and management, and integrating 6S management principles into our quality management system. In conclusion, effective management of laboratory animal waste should be centered on improving the quality management system, emphasizing waste classification and management at the source, controlling

[第一作者] 马丽颖(1972—),女,硕士,主任技师,研究方向:医学免疫学,质量管理。E-mail: maliyinglw@sina.com

[通信作者] 王 洪(1977—),女,硕士,研究员,研究方向:分子遗传学。E-mail: wanghong@nifdc.org.cn。ORCID: 0009-0004-1402-6735

biological hazards, minimizing environmental pollution and promoting conditions for sustainable development.

[Key words] Waste; Quality management; Laboratory animal; Inspection and testing organizations

实验动物资源作为科技创新和社会发展的战略性资源,对破解生命科学基础研究和大健康事业发展领域的重大科学问题,起着重要的支撑作用^[1]。在人类历史上数次重大疫情发生时,实验动物在疫苗研制、药物开发等预防和治疗领域发挥了重大作用。同时,不可忽视的是,在实验动物生产和科研中也相应产生了大量废物。目前,固体废物管理与大气、水、土壤污染防治密切相关,是整体推进生态环境保护工作中不可或缺的重要一环。随着我国生态环境保护意识的提高,各种环境保护举措也发生了历史性的变化。从国家到城市,从各类机构到每个人,参与程度逐渐增强。本文从国内文献调研分析以及作者所在的中国食品药品检定研究院使用实验动物产生的废物管理角度出发,探讨完善实验动物质量管理体系对促进国家固体废物管理的积极作用,为创建“无废城市”提供管理思路,并为建设人与自然和谐共生的现代化凝聚共识、汇聚力量。

1 实验动物废物分类依据

实验动物废物是一类固体废物,其中用于药品、生物制品检验检测的部分实验动物废物更是属于危险废物。

自2020年9月1日起施行的国家法律《中华人民共和国固体废物污染环境防治法》和国家标准《固体废物鉴别标准 通则》(GB 34330—2017)^[2]都对固体废物有明确的定义。固体废物是指在生产、生活和其他活动中产生的丧失原有利用价值,或者虽未丧失利用价值但被抛弃或放弃的固态、半固态和置于容器中呈气态的物品、物质,以及法律、行政法规规定纳入固体废物管理的物品、物质。《固体废物鉴别标准 通则》中第4条款“依据产生来源的固体废物鉴别”明确指出,教学、科研、生产、医疗等实验过程中,产生的动物尸体等实验废弃物质为固体废物。

另外,根据国家标准《危险废物鉴别标准 通则》(GB 5085.7—2019代替GB 5085.7—2007)^[3]定义,危险废物是指列入国家危险废物名录,或者根据国家规定的危险废物鉴别标准和鉴别方法,认定的具有危险性的固体废物。根据我国生态环境部等5部门联合发

布的《国家危险废物名录》(2021年版)第二条,具有毒性、腐蚀性、易燃性、反应性或者感染性一种或者几种危险特性的,或者不排除具有危险特性,可能对生态环境或者人体健康造成有害影响,需要按照危险废物进行管理的固体废物(包括液态废物),列入国家危险废物名录。国家卫生健康委员会和生态环境部进一步发布的《医疗废物分类目录(2021年版)》规定:卫生行业来源的废物类别为医疗废物,分为感染性、损伤性、病理性、化学性、药物性5类;废弃的医学实验动物组织或尸体应列入病理性废物中,主要是指在“诊疗过程中产生的人体废物和医学实验动物尸体等”。而且国家行政法规《医疗废物管理条例》(2011年修订)要求:各级人民政府卫生行政主管部门应对医疗废物收集、运送、贮存、处置活动中的疾病防治工作实施统一监督管理;环境保护行政主管部门应对医疗废物收集、运送、贮存、处置活动中的环境污染防治工作实施统一监督管理。然而,目前对于检验检测机构在实验过程中产生的实验动物尸体及相关废物还没有国家标准进行统一规定,用于检测的实验动物目前都参照医疗机构医学实验的要求,按照医疗废物进行分类统一管理。

2 国内实验动物废物管理现状

一份针对北京市2016年164家实验动物生产及使用单位的调研结果^[4]显示,90.4%的机构将实验过程中产生的实验动物尸体按照医疗废物进行处理,48%的机构将垫料、饲料等废物(不涉及感染性、放射性等)按照医疗废物进行管理。2019年对上海市共165家实验动物许可证持有机构(有效期内)的调查结果^[5]显示,上海市动物无害化处理中心及上海市固体废物处置中心有能力对实验动物尸体处理做到全覆盖,但在垫料等其他废物处理上存在困难。2021年10月—2022年1月一项对山东省40多家实验动物使用单位的调研结果^[6]显示,只有36%的单位对实验动物废物进行有效分类,且只有28%的单位建立了分类管控的废物仓库。

而另一项针对我国一些欠发达地区的医疗机构开展的2020年度调研结果^[7]显示,欠发达地区的整体

环境管理力度不足,专业管理人员不足,管理制度与发达地区相比有一定的差距。

根据以上调研结果可以看到,不同经济发展程度的城市对实验动物废物的管理能力和处置能力参差不齐;各地区对于国家法规制度和国家标准落实不完全到位。动物实验过程中产生的废物,如动物尸体、动物废弃垫料、动物排泄物、实验过程中产生的一次性手套、衣服、鞋套、棉球以及注射器等大都按照医疗废物进行管理,并未进行更细致的分类。这一方面造成了资源浪费,另一方面也给生态环境治理带来难度。

3 中国食品药品检定研究院实验动物废物管理体系完善情况

国家部署固然重要,但贯彻落实更为关键。虽然不同城市 and 不同地区有条件差异,但应形成高层坚定推行、中层达成共识、基层积极贯彻执行绿色通道。国家层面有法律法规和国家标准,地方政府有管理办法和地方政策,各机构应根据法律法规、标准、政策等制定切实可行的质量管理体系。

由北京市科学技术委员会、中关村科技园区管理委员会等五部门共同制定,2022年9月颁布实施的《北京市实验动物废物无害化处理管理办法》对实验动物废物进行了分类管理,明确了危险废物和其他废物不同的处置方式。其中第3条明确规定“开展动物实验产生的废弃垫料和其他废物,属于危险废物的,纳入危险废物进行无害化处理;不属于危险废物的,纳入生活垃圾分类中的其他垃圾进行焚烧处理”。

笔者所在的中国食品药品检定研究院(以下简称“本单位”)隶属北京地区,因此根据北京市最新的管理办法,在2023年8月修订了本单位的“实验动物设施医疗废弃物处理标准操作规程”,并于2023年10月在本单位内的质量管理体系中正式发布实施。具体修订内容介绍如下。

3.1 根据机构资质修订废物管理类别

中国食品药品检定研究院主要承担食品、药品、医疗器械、化妆品及有关药用辅料、包装材料与容器的检验检测工作,无医疗机构资质。在2022年9月颁布实施《北京市实验动物废物无害化处理管理办法》之前,本单位质量管理体系文件关于实验动物废物处置流程一律参照医疗机构相关管理办法制订并实施。本次修订主要明确了非医疗机构对生产及使用实验动物过程中产生的动物废物如何进行分类管理的相关内

容。本单位同时拥有实验动物生产许可证和使用许可证,修订中将生产设施和使用设施中产生的实验动物废物按《北京市实验动物废物无害化处理管理办法》要求分别进行分类处理。

3.2 修订质量管理体系文件中的“实验动物废物”定义和分类

本单位修订前的质量管理体系文件中未对动物实验过程中的废物进行明确定义,也未对废物进行详细分类。《北京市实验动物废物无害化处理管理办法》明确指出,实验动物废物包括实验动物尸体、组织、废弃垫料(刨花、玉米芯、木屑、纸屑等材质的动物铺垫物)及其他废物(一次性隔离服、口罩、手套、注射器、玻璃器皿、废过滤器芯材等)。本次修订即在质量管理体系文件中补充了实验动物废物的定义,并将实验动物废物分为动物废物和其他废物两大类,同时,也规定了动物实验过程中产生的动物废物和其他废物需分类处理。

3.3 修订废物分类处理内容

本单位修订前的质量管理体系文件是依据《医疗废物分类目录(2021年版)》,对动物实验过程中产生的所有废物均按照医疗废物统一管理,大大增加了垃圾处理的成本。根据《北京市实验动物废物无害化处理管理办法》,不具备医疗机构资质的实验动物使用许可单位产生的实验动物尸体和组织应当纳入危险废物进行无害化处理;产生的废弃垫料和其他废物,属于危险废物的,纳入危险废物进行无害化处理;不属于危险废物的,纳入生活垃圾分类中的其他垃圾进行焚烧处理。因此,本次修订时补充:依据本单位福利伦理审查委员会审核通过的福利伦理审查报告,由动物实验管理人员判别该项动物实验过程中产生的废物是否为危险废物;不属于危险废物的,放入黑色垃圾袋中,纳入生活垃圾处理;属于危险废物的,放入黄色垃圾袋中,按照危险废物进行无害化处理。

3.4 修订不同分类废物依据不同的管理办法进行处理

在本单位修订的质量管理体系文件中,增加不属于危险废物的处理标准作业程序(standard operating procedure, SOP)。处理不属于危险废物的废弃垫料和其他废物时,按照《北京市生活垃圾管理条例》相关要求执行,并确保以上废物最终进入生活垃圾焚烧设施处理。同时,完善已有的危险废物处理SOP。实验动物尸体和组织以及属于危险废物的废弃垫料,交由

有危险废物处置资质的单位处理并保存好处理凭证,以保障生物安全,防止环境污染。

3.5 修订监督管理内容

本次修订补充内容还包括:指定专人负责质量管理监督程序,质量监督人员须确保相关实验动物废物符合收运和处理单位的相关要求,及时查新法律法规、政策、标准,以保证各项管理制度和质量管理体系持续符合相关管理规定;同时需要检查实验动物废物处理、交接凭证的完整性,档案管理符合规定,确保实验动物废物无害化处理工作可追溯、可考核。

3.6 增加6S管理内容

在本单位修订后的质量管理体系中,增加了“6S”管理的内容,包括整理(Seiri)、整顿(Seiton)、清扫(Seiso)、清洁(Seiketsu)、素养(Shitsuke)和安全(Security)六大要素^[8-9],这是以现场管理为出发点的一套行之有效的工具,应用在本单位动物实验现场,可以高效完成实验废物处理。动物实验管理人员根据在本单位动物实验系统平台上提交的动物实验计划,提前整理出需要分类管理的动物实验;现场实验流程和操作由兽医指导并配合实验人员完成整顿;不同项目的实验产生的废物由实验人员负责清扫;进入动物实验设施的人员都需要对实验全程包括实验动物废物的安全负责;清洁过程持续优化,包括对人员、设备、原材料、方法、环境5个要素的持续有效管理,动物实验管理团队通过周例会,研究和讨论营造干净、整洁、舒适、安全的动物实验场所和空间环境的有效措施;通过培训、宣传,引领从事动物实验的科研和检测人员形成随时整理、整顿、清扫、清洁的良好习惯和素养,并能够持续保持。

4 思考与展望

4.1 急需制定针对检验检测机构的实验动物废物管理标准

从地方标准信息服务平台(<https://dbba.sacinfo.org.cn/>)上可以查询到我国各省市、自治区都有关于危险废物、医疗废物的管理技术规范或者规程,专门针对检验检测机构的规范是陕西省于2021年发布的地方标准《检验检测机构危险废物处置管理规范》^[10],其中把实验动物尸体等废物纳入固体废物进行管理。2021年5月6日,国家市场监督管理总局就强化检验检测机构监管有关情况举行专题新闻发布会,会上指出:截至2020年底,全国共有检验检测机构近4.9万家^[11],从业人员141万人,市场规模约占全球市场

额的20%。这些检验检测机构产生的废物也相当可观,相对应的管理难度势必增加。因此,针对检验检测机构的固体废物分类管理技术规范等标准的制定显得尤为重要,急需出台国家层面的标准或管理办法,以规范全国检验检测机构或者无医疗资质的机构开展实验动物废物相关管理工作。北京地区于2022年发布实施的《北京市实验动物废物无害化处理管理办法》为其他地区的检验检测机构制定相应标准提供了参考。

4.2 继续建立实验动物废物信息化管理体系

据前瞻产业研究院报告预测,2023年的医疗废物处理市场规模可能达到107.37亿元,同时医疗废物产量可能达到249.56万吨^[12]。随着固体废物量的增长,其处置难度也随之增加,固体废物的分类管理迫在眉睫。

各类实验动物尸体及相关废物无害化处置的监管流程包含回收管理、运输过程监管、入库监管、出库监管、处置过程监管、尾气排放监测、废水监测、残留物监测等^[13]。据报道,华中科技大学基础医学国家级实验教学示范中心已经对教学实验动物尸体实行二维码网络信息管理^[14]。2023年6月7日,中华人民共和国生态环境部的官方网站上发布了《关于进一步加强危险废物规范化环境管理有关工作的通知(征求意见稿)》,其中提出:运用信息化手段提升危险废物规范化环境管理水平;加快提高危险废物环境管理信息化水平和能力,实现危险废物全过程监控和信息化追溯;推行电子标签、电子联单、电子证照等集成智能监控手段,地方系统与国家系统衔接,构建全国“一张网”,实现统筹监管,确保数据的实时性、准确性、完整性。笔者推测,随着数字化技术的不断发展和进步,我国的实验动物废物信息化管理指日可待,监管将逐步实现全过程数字化。

从“十四五”规划来看,未来我国生物医药产业以“健康中国”为战略发展目标,大力鼓励以医药服务业为主的细分行业发展。而医药行业的重大科技支撑之一实验动物必不可少。目前,我国实验动物模型及其医药研究仍处于发展阶段,相关产品及服务市场需求高速增长,针对实验动物行业的综合管理也是保障科研工作安全平稳发展的必要任务。实验动物废物从产生到处置的全过程管理亟待各环节的技术规范和指导标准落地,产生实验动物废物的机构尤其是检验检测机构的实验动物废物分类管理和回收管理信息化水平急需提高,相应的质量管理体系也需要持续

完善。随着信息化管理系统的不断完善,实验动物废物处置管理也会逐步形成高效的运行体系,从而助力人与自然和谐共生的美丽中国建设。

[作者贡献 Author Contribution]

马丽颖提出观点,查阅参考文献,进行数据采集、处理和分析,撰写论文初稿并组织讨论和修订。

赵明海参与研究,协助提供数据档案等。

梁春南参与研究,提供论文写作相关的国家标准和指导文件。

岳秉飞参与研究设计,提供数据分析方法,参与论文修订。

王洪负责整个研究的设计和实施,监督和协调整体研究,修订论文。

[利益声明 Declaration of Interest]

所有作者均声明本文不存在利益冲突。

[参考文献 References]

- [1] 国家科技基础条件平台中心. 中国实验动物资源发展研究报告 2022[M]. 北京: 科学出版社, 2023.
National Science and Technology Infrastructure Platform Center. Report on the research of Chinese laboratory animal resources 2022[M]. Beijing: Science and Technology Press, 2023.
- [2] 中华人民共和国环境保护部. 固体废物鉴别标准 通则: GB 34330—2017[S]. 北京: 中国环境科学出版社, 2017.
Ministry of Environmental Protection of the People's Republic of China. Identification standards for solid wastes-General rules: GB 34330-2017[S]. Beijing: China Environmental Science Press, 2017.
- [3] 国家环境保护总局. 危险废物鉴别标准 通则: GB 5085.7—2007 [S]. 北京: 中国环境科学出版社, 2007.
China National Environmental Protection Administration. Identification standards for hazardous waste-General rules: GB 5085.7-2007[S]. Beijing: China Environmental Science Press, 2007.
- [4] 张阔, 田枫, 康爱君, 等. 2016年北京地区实验动物废弃物处理方法的调查与分析[J]. 中国比较医学杂志, 2017, 27(11):60-63. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7856.2017.11.012.
ZHANG K, TIAN F, KANG A J, et al. Investigation and analysis of laboratory animal waste disposal in Beijing area in 2016[J]. Chin J Comp Med, 2017, 27(11):60-63. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7856.2017.11.012.
- [5] 盛文伟, 朱广蕊, 苏杰, 等. 上海地区实验动物废弃物无害化处理现状调查与分析[J]. 上海畜牧兽医通讯, 2020(6):34-36. DOI: 10.14170/j.cnki.cn31-1278/s.2020.06.012.
SHENG W W, ZHU G R, SU J, et al. Investigation and analysis on the present situation of harmless treatment of experimental animal wastes in Shanghai[J]. Shanghai J Anim Husb Vet Med, 2020(6):34-36. DOI: 10.14170/j.cnki.cn31-1278/s.2020.06.012.
- [6] 孙晓红, 刘厚茹, 朱梦依, 等. 实验动物废弃物无害化处理的现状和对策研究[J]. 现代畜牧科技, 2023(4):86-88. DOI: 10.19369/j.cnki.2095-9737.2023.04.024.
- [7] 李创, 彭启丽. 关于欠发达地区医疗废物规范化管理的思考[J]. 资源节约与环保, 2022(8):137-140. DOI: 10.16317/j.cnki.12-1377/x.2022.08.037.
LI C, PENG Q L. Thoughts on standardized management of medical waste in underdeveloped areas[J]. Resour Econ Environ Prot, 2022(8): 137-140. DOI: 10.16317/j.cnki.12-1377/x.2022.08.037.
- [8] 张淑正, 金林, 任雪芳, 等. 6S管理在大规模核酸检测标本整理室的应用实践[J]. 医学理论与实践, 2023, 36(8):1432-1434. DOI: 10.19381/j.issn.1001-7585.2023.08.066.
ZHANG S Z, JIN L, REN X F, et al. Application of 6S management in large-scale nucleic acid detection sample sorting room[J]. J Med Theory Pract, 2023, 36(8): 1432-1434. DOI: 10.19381/j.issn.1001-7585.2023.08.066.
- [9] 叶文娟. 6S管理在基层医院医疗废物管理中的应用价值分析[J]. 当代医药论丛, 2022, 20(23):178-180.
YE W J. Analysis of the Application Value of 6S Management in Medical Waste Management in Grassroots Hospitals [J]. Contemp Med Symp, 2022, 20(23):178-180.
- [10] 陕西省市场监督管理局. 检验检测机构危险废弃物处置管理规范: DB 61/T 1466—2021[S/OL]. (2021-07-10)[2023-07-30]. <https://std.samr.gov.cn/db/search/stdDBDetailed?id=D7B6451FCF4E919DE05397BE0A0A6273>.
Shaanxi Administration for Market Regulation. Management specification for hazardous waste disposal in inspection body and laboratory: DB 61/T 1466-2021[S/OL]. (2021-07-10) [2023-07-30]. <https://std.samr.gov.cn/db/search/stdDBDetailed?id=D7B6451FCF4E919DE05397BE0A0A6273>.
- [11] 雷震, 张耀武, 刘欣, 等. 检验检测机构危险废弃物标准化管理的研究[J]. 中国标准化, 2021(19): 210-213. DOI: 10.3969/j.issn.1002-5944.2021.19.031.
LEI Z, ZHANG Y W, LIU X, et al. Research on the standardized management of hazardous waste in inspection and testing bodies[J]. China Stand, 2021(19): 210-213. DOI: 10.3969/j.issn.1002-5944.2021.19.031.
- [12] 龚甜, 陈玮, 陈育庆. 人工智能在医疗废物监管中的应用探索[J]. 中国卫生监督杂志, 2022, 29(3):212-216. DOI: 10.3969/j.issn.1007-6131.2022.03.003.
GONG T, CHEN W, CHEN Y Q. Exploration and application of artificial intelligence in medical waste supervision[J]. Chin J Health Insp, 2022, 29(3):212-216. DOI: 10.3969/j.issn.1007-6131.2022.03.003.
- [13] 李勇, 周亮, 何勇, 等. 实验动物尸体及相关废弃物无害化处置信息化监管系统初探[J]. 实验动物与比较医学, 2022, 42(2):122-126. DOI:10.12300/j.issn.1674-5817.2021.075.126.
LI Y, ZHOU L, HE Y, et al. Preliminary exploration of information supervision system for harmless disposal of laboratory animal carcasses and related wastes[J]. Lab Anim Comp Med, 2022, 42(2):122-126. DOI:10.12300/j.issn.1674-5817.2021.075.

[14] 金悠, 王晨晨, 余上斌, 等. 医学实验教学动物尸体二维码信息管理系统建立的理想[J]. 实验动物与比较医学, 2021, 41(5):455-458. DOI:10.12300/j.issn.1674-5817.2020.211.

JIN Y, WANG C C, YU S B, et al. Design of two-dimensional code information management system for animal corpses in medical experimental teaching[J]. Lab Anim Comp Med, 2021, 41(5):455-458. DOI:10.12300/j.issn.1674-5817.2020.211.

(收稿日期:2023-08-15 修回日期:2023-10-17)

(本文编辑:张俊彦, 富群华, 丁宇菁, 陆佳雯)

[引用本文]

马丽颖, 赵明海, 梁春南, 等. 完善实验动物废物处置质量管理体系的思考:以中国食品药品检定研究院为例[J]. 实验动物与比较医学, 2024, 44(2): 214-219. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2023.116.

MA L Y, ZHAO M H, LIANG C N, et al. Reflection on improving the quality management system for experimental animal waste disposal: National Institutes for Food and Drug Control as an example[J]. Lab Anim Comp Med, 2024, 44(2): 214-219. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2023.116

《实验动物与比较医学》常用英文缩略词表

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

《实验动物与比较医学》编辑部

实验动物设施智能控制系统建设与运行经验探讨： 以深圳市药品检验研究院为例

曾 龙, 李俊鹏, 王晓炜, 陈 宁, 王 平, 秦美蓉

(深圳市药品检验研究院, 国家药品监督管理局化妆品监测评价重点实验室, 深圳 518057)

[摘要] 智能控制系统能够有力地辅助实验动物设施建设和管理, 提高设施运行效率, 保证动物实验结果的可靠性, 并大幅节省人力资源。深圳市药品检验研究院实验动物设施智能控制系统于2021年4月建成, 智能控制系统主要包括动物实验室智能化管理平台和动物实验室信息管理系统; 其中, 动物实验室智能化管理平台通过建筑设备管理系统对文丘里阀、电动风阀、电动水阀、蒸汽加湿阀等进行控制, 以调节房间环境温度、湿度、压力等参数, 同时通过环境监测系统对各环境参数进行在线监控; 另外, 自动照明控制系统、全高清视频监控系统、自动门禁和自动门系统、独立通气饲养系统、自动清洗系统、废气自动处理系统、集中供气系统、仪器参数实时监测系统提升了实验室智能化水平; 而动物实验信息管理系统将检验、仪器设备、人员、文件、标准物质、试剂、检验标准、图书、记录、科研管理、相关申请、质量管理、查询统计等信息高度集成; 在实验动物工作方面, 还开发了动物管理模块, 实现了实验动物管理的全面信息化, 同时还通过动物实验电子实验记录实现了天平校验、样品质量、动物体重等数据的实时采集和记录。总之, 深圳市药品检验研究院动物实验室综合运用各类智能化系统, 实现了实时在线控制和监测, 提高了工作效率, 保障了设施高效高质量运行, 各项参数均符合标准规定, 各项检验和科研工作均顺利开展, 运行3年以来取得了很好的效果。本文以深圳市药品检验研究院实验动物设施建设和管理运行情况为例, 从设施规模、功能、智能化管理系统、信息化管理系统等方面进行介绍, 为国内同类型实验动物设施实现智能化控制提供参考。

[关键词] 实验动物设施; 智能控制; 信息化; 建设及运行

[中图分类号] Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2024)02-0220-07



Discussion on the Construction and Operational Experience of Intelligent Control Systems for Laboratory Animal Facilities: Shenzhen Institute for Drug Control as an Example

ZENG Long, LI Junpeng, WANG Xiaowei, CHEN Ning, WANG Ping, QIN Meirong

(Shenzhen Institute for Drug Control, Key Laboratory for Monitoring and Evaluation of Cosmetics, State Administration for Market Regulation, Shenzhen 518057, China)

Correspondence to: WANG Ping (ORCID: 0009-0009-5252-4635), E-mail: wangping662@sina.com

QIN Meirong (ORCID: 0009-0006-4077-5689), E-mail: szqinmeirong@sina.com

[ABSTRACT] Intelligent control systems can effectively assist in the construction and management of laboratory animal facilities, improving operational efficiency, ensuring the reliability of animal experimental results, and significantly saving human resources. The intelligent control system for laboratory animal facilities at Shenzhen Institute for Drug Control was completed in April 2021. It includes an intelligent management platform and an information management system for animal laboratories. The intelligent

[第一作者] 曾 龙(1988—),男,学士,助理兽医师,主要从事实验动物饲养管理。E-mail: 461800653@qq.com。

[通信作者] 王 平(1972—),女,博士,主任药师,主要从事药品、化妆品的作用机制、安全性评价及新方法研究。E-mail: wangping662@sina.com。ORCID: 0009-0009-5252-4635;

秦美蓉(1980—),女,硕士,主任药师,主要从事药品、化妆品安全性评价及新方法研究。E-mail: szqinmeirong@sina.com。ORCID: 0009-0006-4077-5689

management platform regulates room environment parameters such as temperature, humidity, and pressure through building equipment management system, controlling devices such as the Venturi valve, electric air valve, electric water valve, and steam humidification valve. At the same time, various environmental parameters are monitored online through the environmental monitoring system. The laboratory's intelligence is further enhanced by systems such as automatic lighting control, full HD video monitoring, automatic access control and door system, independent ventilation and feeding, automatic cleaning, automatic exhaust gas treatment, centralized gas supply, and real-time instrument parameter monitoring. The information management system for animal laboratories integrates inspection, instrument and equipment, personnel, documents, standard substances, reagents, inspection standards, books, records, scientific research management, relevant applications, quality management, and query statistics. For animal experimentation, a management module has been developed to achieve a comprehensive digitization of animal management. Furthermore, real-time collection and recording of data such as balance calibration, sample quality, and animal weight are facilitated through electronic experimental recording. In summary, the Animal Laboratory of Shenzhen Institute for Drug Control has extensively utilized intelligent systems to achieve real-time online control and monitoring, improve efficiency, ensure high-quality facility operation, and meet standard requirements. Smooth execution of all inspection and research activities has been achieved over the past three years. This paper provides insights into the construction, management, and operation of laboratory animal facilities at Shenzhen Institute for Drug Control, offering guidance for the implementation of intelligent control in similar facilities across China.

[Key words] Laboratory animal facilities; Intelligent control; Informatization

随着生命科学研究的快速发展, 实验动物在多学科多领域有着广泛的应用, 对实验动物设施的要求也不断提高^[1]。近年来, 实验动物设施向规模大、功能多、平台化的方向发展, 其建设和运行管理日益复杂, 特别是在人流密集区的高层实验动物设施的设计、施工和运行要求更高, 急需通过智能化控制系统来提高建设和运行管理效率^[2]。实验动物设施智能控制系统可有力地辅助设施建设和管理, 能够提高设施运行效率, 保证动物实验结果的可靠性, 并大幅节省人力资源^[3]。

深圳市药品检验研究院(以下简称深圳药检院)实验大楼位于深圳市南山区科技园, 于2021年4月建成。该楼高98 m, 包括地下3层和地上19层, 总面积达48 000 m²。其中, 第12~19层为动物实验室, 包括7层饲养区和1层集中清洗区, 每层面积约2 000 m²。动物实验室楼板间层高5.1 m, 屏障室内净高2.5 m, 大动物实验室内净高2.6 m, 饲养小鼠、大鼠、豚鼠、仓鼠等小型实验动物和犬、猴、猪等大型实验动物。深圳药检院于2021年取得广东省《实验动物使用许可证》, 通过了中国合格评定国家认可委员会(China National Accreditation Service for Conformity Assessment, CNAS)认可、国家检验检测机构资质认定(China

Inspection Body and Laboratory Mandatory Approval, CMA)、广东省二级病原微生物备案等实验室资质评审, 2022年11月通过国际实验动物评估和认可委员会(Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care, AAALAC)认可, 2023年3月通过国家药品监督管理局药物非临床研究质量管理规范(good laboratory practice, GLP)认证评审。自2021年起, 深圳药检院对标国际先进的动物实验室建设经验, 通过智能控制系统对实验室的环境设施和实验流程进行实时在线监控^[4]。智能控制系统主要包括动物实验室智能化管理平台和动物实验室信息管理系统两大部分。至今该系统已运行3年, 取得了良好的使用效果, 现将其建设及运行情况汇报如下, 以供国内同行借鉴与参考。

1 动物实验室智能化管理平台

1.1 建筑信息模型技术的建筑设计平台

在建筑设计和施工过程中, 深圳药检院的动物实验室要满足普通环境、屏障环境、生物安全二级实验室、理化实验室等不同的功能需求, 并且楼层高, 实验室数量多, 空调通风系统设备、管道和阀门多, 给排水、供电管线密集复杂, 施工难度大。建筑设计时

通过建筑信息模型技术,将暖通机组、排风除臭、供配电、弱电、设施自控、给排水、污水处理、工艺气体等诸多系统的监控整合在一个直观、统一的平台上,在三维场景中可以实时显示实验大楼的整体结构与布局情况,方便用户通过模型了解设备安装位置、管线走向,利于设施的建设和后期设备维护及相关问题排查^[5]。

1.2 建筑设备管理系统

1.2.1 暖通控制系统

通过建筑设备管理系统对文丘里阀、电动风阀、电动水阀、蒸汽加湿阀等进行控制,调节房间温度、湿度、压力等参数。系统接收送排风压力传感器采集的信息后,通过变频器控制硬件设施的运行,在满足参数要求的前提下实现节能。通过动物实验室门口的显示屏可实时查看实验室内的环境参数、系统状态、门禁开关状态等信息。运行3年来,该系统可靠、准确、运行平稳^[6]。

1.2.2 暖通硬件设施

全楼采用集中供热水、冷水和蒸汽的方式调控温湿度。动物实验室配备全新风系统,核心区安装组合式专业洁净空调机组,房间使用文丘里阀气流控制系统。在动物实验室内通过建筑设备管理系统设置变风量节能控制系统,调节室内送、排风量及风机变频。

1.2.3 智能化系统采集传感器

动物实验室采用室内环境监控系统(可调控可监测),房间内安装排风管路探头(即传感器安装在每个实验室的排风总管处)、新风机组送风探头、室外新风探头,检测温湿度、可吸入颗粒物、挥发性有机化合物、氨、一氧化碳、二氧化碳等指标。同时传感器实时采集信息后传输至建筑设备管理系统,供系统显示、报警和参与控制。

1.2.4 节能和消毒模式

动物实验室有正常和值班两种工作模式。对于空置的实验室可采用值班模式减少能耗,同时保持房间的洁净度。实验室内设消毒模式,需要熏蒸消毒时可以关闭通风口。

1.3 环境监测系统

环境监测系统的传感器完全独立于建筑设备管理系统,只可检测,不能调控。传感器安装在每个实验室的排风总管处,通过环境监测系统(只监不控)可以实现对温度、湿度、压差的实时监控,自动记录,自动保存,双备份,检测数据不可修改。登录环境监

测系统可查询历史数据及运行参数曲线等,参数异常时可自动发送报警短信。环境监测系统正常运行状态下,可不再采用人工登记环境参数,可靠性、连续性、可追溯性大大提高。

1.4 自动照明控制系统

动物实验室通过自动照明控制系统,可实现对不同楼层、区域的照明精准控制。可以根据不同的场景,设置各自的照明自动开关时间。如设置为早8点自动开,晚8点自动关。

1.5 全高清视频监控系统

每个实验室及走廊均对角安装2个全高清摄像头,构建了全高清的视频监控系统(图1A)。在监控室和办公室旁的监控屏幕上可实时查看各实验室的布局、动物饲养、人员活动、设施卫生等情况,方便对内监督和对外介绍设施运行情况。

1.6 自动门禁和自动门系统

动物实验室的入口门禁系统采用人脸识别,使用



图1 全高清监控视频图像(A,走廊;B,笼具清洗区)

Figure 1 Full high-definition surveillance video images (A, corridor; B, cage cleaning area)

者在电脑屏幕上选择工作名称(如:实验、动物饲养、清洁消毒、安全巡查等)或直接填写实验信息后,系统会自动记录人员的进出情况,未授权人员无法进入实验室,从而减少了手动登记的繁琐,并防止未授权人员进入受控区域。在主要的通道上设置了自动门,通过红外感应自动开关^[7]。

1.7 独立通气饲养系统和家兔自动清污饲养系统

动物实验室采用数十套独立通气饲养系统即独立通气笼盒(individual ventilated cages, IVC)饲养小鼠、大鼠、豚鼠和仓鼠,改善了实验室饲养环境^[8]。家兔饲养采用家兔自动清污饲养系统,每天可以定时自动清洁动物排泄物3次。

1.8 自动清洗系统

动物实验室配备垫料倾倒地(带真空负压管道,直通地面1楼)、隧道式洗笼机、立式洗笼机、自动垫料填充机、自动洗瓶机、自动灌装机、家兔自动清污饲养系统、工业洗衣机、烘干机等设备,建成了智能化的集中清洗系统(图1B),节省了大量人工。

1.9 给排水系统

全楼超纯水和软水集中制备,统一供应。大动物饮水采用大动物自动饮水系统,对饮水进行消毒处理后,通过自动水器直接供给动物饮用。小动物饮水采用反渗透无菌过滤水系统,通过管道连接进屏障内灌装机供水。废水按照理化实验废水、动物实验室废水、生活废水分类收集处理,处理过程包括沉淀(二级)、过滤、酸碱中和等,达标后排放^[9]。废水管道均为不锈钢材质。

1.10 废气自动处理系统

废气按动物实验、理化实验(防酸碱腐蚀)和普通区域废气分别收集处理。大楼配备一体扰流喷淋除臭设备,该设备功能段由进风段、纳米半导体光催化段、扰流段、喷淋段、除雾段和出风段组成,可有效地对恶臭气体、挥发性有机化合物、酸碱气体、颗粒物、病原微生物等多种空气污染物进行处理。该系统具有高效、方便、无耗材、智能控制、无需专人值守等优势,使用中取得了良好效果。

1.11 集中供气系统

在中间楼层集中设置气瓶间,气瓶间设防爆泄压墙,设置气体泄漏报警系统,监控室可第一时间接收报警信息。通过气体输送管道向各楼层实验室提供氧气、二氧化碳、氮气、氦气、氩气等实验气体,保障了实验室气体使用的便利性和安全性。

1.12 仪器参数实时监测系统

实验室采用环境参数实时监测系统,采集记录冰箱、液氮罐、培养箱、冷库和烤箱等设施设备的温度和二氧化碳浓度,实现在线监控管理。实验室管理人员可以在任意电脑上登录查看实时数据,所记录的数据可长期保存且不可修改,系统还可自动生成数据报告。当设施设备参数异常时,系统自动报警,并以短信方式发送到管理员手机,便于及时处理。

1.13 报警系统

深圳药检院动物实验室配置了智能消防报警系统和保险柜非法开启报警系统,提升了实验室安全管理水平。

2 动物实验室信息管理系统

深圳药检院已使用实验室信息管理系统十余年,是国内实验室信息管理系统的第一批用户。该系统将检验、仪器设备、人员、文件、标准物质、试剂、检验标准、图书、记录、科研管理、相关申请、质量管理、查询统计等信息高度集成。在实验动物工作方面,开发了该系统下的动物管理模块和动物实验电子实验记录模块,实现了实验动物管理的全面信息化(图2A)。

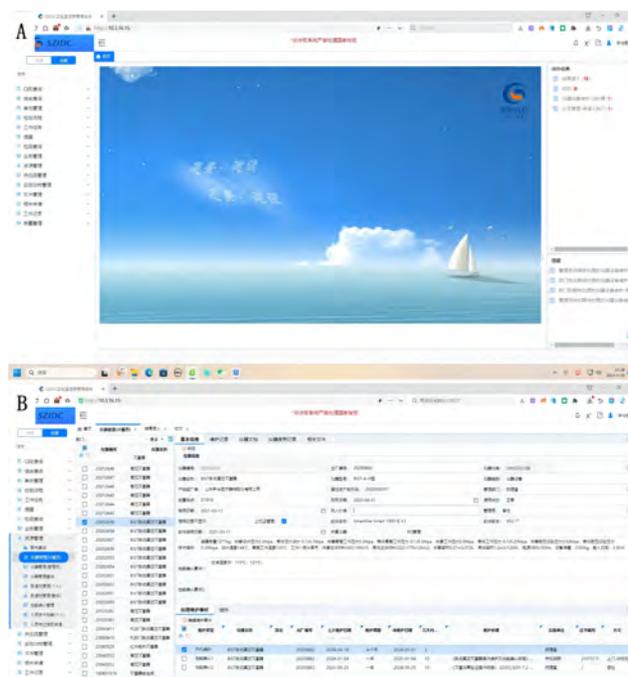


图2 实验室信息管理系统(A,主界面;B,仪器维护界面)

Figure 2 Laboratory information management system (A, main interface; B, instrument maintenance interface)

2.1 实验动物管理

实验动物管理模块包括实验动物、饲料和垫料管理。实验动物全程采用信息化系统管理,包括动物的基本信息录入(购入日期、品种品系、数量、性别、供应商、质量合格证等)、接收检疫记录、使用记录、处理记录等,并可通过统计功能统计实验动物的使用情况。通过信息化系统实现了实验动物的智能高效管理,让动物实验室相关的管理工作更加智能化、实时化和人性化,大幅提升了实验动物饲养管理工作效率。

2.2 动物实验电子记录

将电子实验记录本整合到实验室信息管理系统中,实现天平校验、样品质量、动物体重等实验数据实时采集记录。根据动物实验项目的需要,建立异常毒性检查、细菌内毒素等实验记录模板,实验人员实时将数据和信息录入到电子实验记录中,动物体重等检测数据可以自动采集到电子实验记录中,实现动物实验记录全程信息化。

2.3 检验流程、人员档案、文件及设备资产管理

业务部门收到样品后,录入实验室信息管理系统并分发给检验部门,检验员通过系统查看任务,编写报告,完成检验后通过系统提交报告,经校核,签发完成报告,这样基本实现了检验全流程无纸化。系统集成个人档案、培训带教、科研成果、仪器设备管理等信息,可编制仪器设备维护计划,生成性能确认目录,发出维护提醒等(图2B)。

2.4 查询统计、提醒和其他功能

实验室信息管理系统可查询检品情况、仪器设备信息、人员档案、法律法规、质量技术标准、行政管理制度、标准操作规程及相关表格附件等信息。同时有完善的提醒功能,包括仪器维护提醒、校验提醒、检验员超期检品等。此外,还有论文管理、滴定液管理、试液管理、图书管理、色谱柱管理、试剂试药管理、相关申请、工作记录和质量管理等功能,能够对检验工作进行全因素管理。

3 动物实验室运行效果

深圳药检院动物实验室综合运用各类智能化系统,实现了设施在线控制和监测,提高了工作效率,保障了动物设施的高效、高质量运行。其中,环境监测系统24 h实时不间断记录环境参数,准确、可靠、方便查询;温度、相对湿度和压差等参数均完成准确性验证,参数超标时有短信报警;通过数据采集,避免了

人为干扰,保障了实验数据的可靠性。实验室信息管理系统具有提醒功能,各项工作流程一目了然,既保证了工作规范、有序,也有效避免了疏漏和差错发生。

深圳药检院动物实验室设施全面运行3年以来,严格按照国家标准控制温湿度、压差、氨浓度、换气次数等各项参数。其中,屏障内环境温度一年四季基本稳定在22~23℃,日温差一般不超过1℃(图3A),相对湿度基本稳定在40%~60%(图3B),屏障内相邻区域压差>10 Pa,鼠类和兔饲养室内氨浓度通常为0 mg/m³,换气次数、悬浮粒子、照度和噪声等均符合相关标准规定。即便在极端的湿热和寒冷天气下,系统参数均能保持稳定。为了防止普通级动物实验室气味外溢,饲养区域采用微负压设计(-10~-5 Pa),外围走廊无异味。

本设施由专业维保公司负责维护,24 h值班,每年更换空气高效过滤器1次,全部环境参数每年检测2次。启用3年以来,系统出现过3次较大考验:第1次为蒸汽管道自动阀门故障,导致湿度偏高,维保公司将自动模式切换为手动,加装疏水阀后解决了问题;第2次为变电站供电线路故障导致停电,维保公司及及时更换了供电线路;第3次为一个变电箱故障导致系统停机,维保公司紧急启用备用设备,并及时维修故障。3次故障都及时得到处理,没有对实验产生影响。

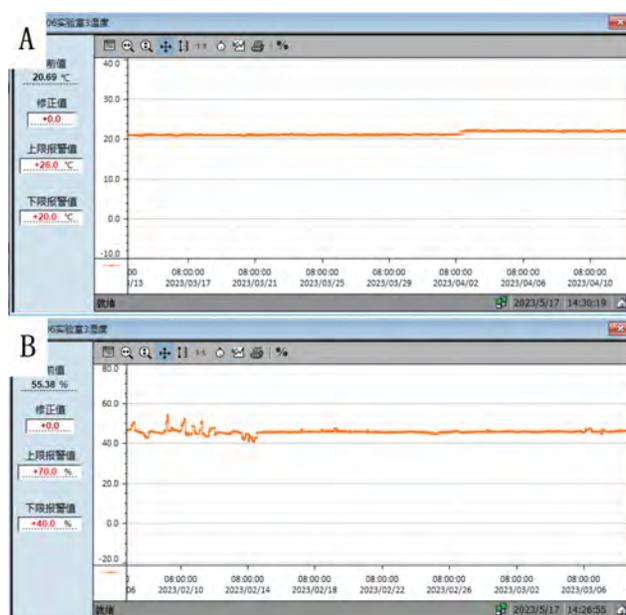


图3 环境监测系统的环境参数(A,温度曲线;B,湿度曲线)
Figure 3 Environmental parameters of environmental monitoring system (A, temperature curve; B, humidity curve)

设施运行3年以来,为检验、科研工作提供了坚实的保障,深圳药检院得以高质量地完成各类药品、化妆品和医疗器械产品的质量检验和安全性评价。同时,我们还承担了国家、省、市各级科研课题20余项,并在国内外核心期刊发表论文30余篇。此外,还建立了对外开放共享的实验动物公共服务平台,与生物医药企业、医院、高校、研究机构等30余家外部单位开展合作,累计开展药理药效、药代动力学与毒代动力学、质量标准等相关研究项目超过300项,为深圳市生物医药产业发展提供了有力支撑。

4 经验、不足和展望

4.1 经验

4.1.1 建设前认真调研,使用部门深度参与设计和建设

项目建设管理单位前后组织人员多次赴大型医院、安评机构、药品研发生产企业、实验动物生产企业等不同类型的单位参观调研,考察重点实验室设计、仪器、建筑材料(包括墙面材料、门、窗、水池等)、设施(水、电、通风空调、喷淋、传递窗等)、实验室家具、精装修、弱电等,吸收各个单位的先进经验为本项目所用,同时聘请业内专家为项目把关。项目使用方与建设管理单位、设计单位、施工单位、装饰单位、监理单位、设备供应商等积极沟通,并安排有动物实验室建设经验的专人全方位参与其中,通过反复研讨,不断优化、完善设计方案。

4.1.2 设计参数指标需要留有备用量,普通级动物实验室饲养区域采用微负压设计

主要设备功率参数按标准的130%设计,预留了一定的功率余量,使设施能经受住极端天气的考验。普通级动物实验室饲养区域采用微负压的设计(-10~-5 Pa)值得推荐,实际效果非常好,即便在猪、犬、猴等大动物的实验室外走廊,也无异味。

4.1.3 仪器设备提前做好安装规划,安装过程做好确认工作

高压灭菌器和全自动洗笼机等大型仪器提前做好地面降板安装设计,留足电、水、空间及更换吊装口,降板安装后消毒车可以平稳推入灭菌器或清洗室内,避免了斜坡。负压解剖台无独立排气系统,靠房间排风系统造成负压,因此提前规划好安装,留足排气管道空间,确保有害气体有效排出。

4.2 不足

运行初期,部分蒸汽阀门性能不稳定,通过加装

部分疏水阀得以解决。兔自动除粪系统运行初期不够流畅,经过改造喷水清洁系统、新增固定滑轮等改进措施,性能得以提高。高压锅蒸汽镀锌管道出现过泄漏,建议用不锈钢或其他高品质的蒸汽管道。污水处理系统设计处理量偏小,污水泵容易堵塞,建议增加过滤设施。

4.3 展望

深圳药检院实验动物设施智能控制系统集成度高、创新性强,为科学高效地开展动物实验提供了坚实保障。随着科技的进一步发展,新的需求不断涌现,伦理评审^[10]和数据统计分析等方面的功能还有待进一步开发,智能控制系统还需要持续优化升级。

【作者贡献 Author Contribution】

曾龙负责撰写初稿;
李俊鹏负责收集资料,修改核对;
王晓伟负责监督指导;
陈宁负责提出建议;
王平负责监督指导及论文审核;
秦美蓉负责文章构思和论文审核。

【利益声明 Declaration of Interest】

所有作者均声明本文不存在利益冲突。

【参考文献 References】

- [1] 严瑞,庄志洪.基于智慧实验室的高校实验室信息化建设与探究[J].科学与信息化,2022(14):56-58.
YAN R, ZHUANG Z H. Construction and exploration of university laboratory informationization based on intelligent laboratory[J]. Technology and Information, 2022(14):56-58.
- [2] 李巍,陈晓娟,柯贤福,等.高等院校实验动物的信息化管理体系建设及初步运行[J].实验动物与比较医学,2020,40(2):154-158. DOI: 10.3969/j.issn.1674-5817.2020.02.012.
LI W, CHEN X J, KE X F, et al. Summary of the information management system of laboratory animal in colleges and universities[J]. Lab Anim Comp Med, 2020, 40(2):154-158. DOI: 10.3969/j.issn.1674-5817.2020.02.012.
- [3] 朱玉,秦嫫,辛丹,等.高等院校实验动物的信息化管理体系建设探讨[J].畜牧兽医科技信息,2022(6):19-21. DOI: 10.3969/J.ISSN.1671-6027.2022.06.007.
ZHU Y, QIN L, XIN D, et al. Discussion on the construction of information management system of experimental animals in colleges and universities[J]. Chin J Anim Husb Vet Med, 2022 (6):19-21. DOI: 10.3969/J.ISSN.1671-6027.2022.06.007.
- [4] 吴琪.基于信息化的实验动物中心管理新模式实践[J].畜牧业环境,2022(17):53-54.
WU Q. Practice of a New Management Model for Animal Centers Based on Informatization [J]. Anim Ind Environ, 2022 (17):53-54.
- [5] 王鑫,王维东,蒋晋生.基于BIM的智慧化实验动物中心管理平台的构建[J].中国医院建筑与装备,2021,22(3):86-88. DOI: 10.

- 3969/j.issn.1671-9174.2021.03.019.
WANG X, WANG W D, JIANG J S. Construction of intelligent animal laboratory center management platform based on BIM[J]. Chin Hosp Archit Equip, 2021, 22(3): 86-88. DOI: 10.3969/j.issn.1671-9174.2021.03.019.
- [6] 张泽全, 常晟, 金树兴, 等. SPF级实验动物设施环境参数的自动化控制[J]. 中国实验动物学杂志, 2002, 12(2): 120-124.
ZHANG Z Q, CHANG C, JIN S X, et al. The automation control of the environmental parameters in SPF laboratory animal installation[J]. Chin J Lab Anim Sci, 2002, 12(2): 120-124.
- [7] 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.
- [8] 李俊鹏, 秦美蓉, 冼静雯, 等. 独立通气动物笼和开放笼饲养大鼠比较观察[J]. 实验动物与比较医学, 2018, 38(5):399-402. DOI: 10.3969/j.issn.1674-5817.2018.05.014.
LI J P, QIN M R, XIAN J W, et al. Comparative observation on feeding rats in independent ventilated animal cages and open cages[J]. Lab Anim Comp Med, 2018, 38(5):399-402. DOI: 10.3969/j.issn.1674-5817.2018.05.014.
- [9] 中华人民共和国住房和城乡建设部. 实验动物设施建筑技术规范: GB 50447—2008[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.
Ministry of Housing and Urban-Rural Development of the People's Republic of China. Architectural and technical code for laboratory animal facility: GB 50447-2008[S]. Beijing: Standards Press of China, 2008.
- [10] 金鑫, 崔起超, 金哲勇, 等. 大数据背景下高校实验动物中心智慧化管理与实践[J]. 现代农业研究, 2022, 28(12):40-42. DOI: 10.19704/j.cnki.xdnyyj.2022.12.036.
JIN X, CUI Q C, JIN Z Y, et al. Intelligent management and practice exploration of university laboratory animal center under the background of big data[J]. Mod Agric Res, 2022, 28(12):40-42. DOI: 10.19704/j.cnki.xdnyyj.2022.12.036.

(收稿日期: 2023-11-20 修回日期: 2024-02-21)

(本文编辑: 张俊彦, 富群华, 丁宇菁, 姜怡欣)

[引用本文]

- 曾龙, 李俊鹏, 王晓炜, 等. 实验动物设施智能控制系统建设与运行经验探讨: 以深圳市药品检验研究院为例[J]. 实验动物与比较医学, 2024, 44(2): 220-226. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2023.162.
ZENG L, LI J P, WANG X W, et al. Discussion on the construction and operational experience of intelligent control systems for laboratory animal facilities: Shenzhen Institute for Drug Control as an example[J]. Lab Anim Comp Med, 2024, 44(2): 220-226. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2023.162.

《实验动物与比较医学》有关实验动物福利伦理内容的说明

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

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

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

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

4. 涉及肿瘤动物模型的研究, 本刊参考国内及国际通用准则, 建议单个肿瘤体直径不超过20 mm(小鼠)或40 mm(大鼠)且不出出现明显的肿瘤溃疡。如投稿文章中有超出上述标准的研究内容, 需提交作者单位相关肿瘤动物模型研究的指导原则文件, 以及从科学角度判断肿瘤体积合理性的依据性材料。

《实验动物与比较医学》编辑部

上海交通大学实验动物中心公共细胞培养平台管理经验探讨

彭丽娜, 张曼, 艾敏, 徐汪节

(上海交通大学实验动物中心, 上海 200240)

[摘要] 公共细胞培养平台作为实验动物设施中一个重要的配套设施, 是实验动物肿瘤疾病模型以及转基因动物制备等科学研究的重要支撑。实验动物中心搭建公共细胞培养实验平台, 能充分整合实验动物和细胞培养资源, 更为高效、合理地配置相关科研资源, 便于科研人员更好地开展研究。实验动物中心公共细胞培养平台内培养的细胞大部分用于动物实验, 细胞如果存在污染或者质量问题, 不但影响实验结果, 还会影响实验动物健康, 造成实验动物的微生物感染, 严重者甚至会扩散污染整个动物饲养设施。因此实验动物中心的公共细胞培养实验室在细胞质量把控上相比常规的细胞培养室更为严格。本文以上海交通大学实验动物中心公共细胞培养平台为例, 从设施维护与管理、人员管理、细胞生物风险质控管理等三个主要控制点对公共细胞培养室的管理经验进行了探讨, 以期为国内其他实验动物机构的公共细胞培养实验室管理提供有益借鉴。

[关键词] 细胞培养室; 设施维护与管理; 人员管理; 细胞生物风险质控管理

[中图分类号] Q95-33; R-332 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2024)02-0227-07



Discussion on Management Experience of Public Cell Culture Platform in Laboratory Animal Center of Shanghai Jiao Tong University

PENG Lina, ZHANG Man, AI Min, XU Wangjie

(Laboratory Animal Center, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

Correspondence to: XU Wangjie (0009-0007-2049-5169), E-mail: hover_xwj@sjtu.edu.cn

[ABSTRACT] Public cell culture platform is an important facility in laboratory animal facilities, providing essential support for scientific research such as the development of animal tumor disease models and transgenic animals. By establishing a public cell culture experimental platform, laboratory animal centers can effectively integrate experimental animals and cell culture resources, optimizing the allocation of scientific research resources to facilitate better research outcomes. The majority of cells cultured in these platforms are used for animal experiments. Contamination or quality issues in these cells not only affect experimental results but also jeopardize the health of experimental animals, potentially leading to microbial infections and contamination of entire animal facilities. Therefore, public cell culture laboratories within experimental animal facilities impose stricter quality control measures than conventional cell culture rooms. This study takes the public cell culture platform at the Laboratory Animal Center of Shanghai Jiao Tong University as a case study to discuss management experiences, focusing on facility maintenance and management, personnel management and quality control of cell biological risk. The aim is to provide useful reference for the management of public cell culture laboratories in experimental animal facilities and other institutions.

[基金项目] 中国高等教育学会 2022 年度高等教育科学研究规划课题“探究高校实验动物管理‘集成信息化’建设的必要性及对策思考” (22SY0222)

[第一作者] 彭丽娜 (1983—), 女, 硕士, 实验师, 研究方向: 实验动物环境与微生物质量控制。E-mail: linapeng@sjtu.edu.cn。ORCID: 0009-0001-1985-4271

[通信作者] 徐汪节 (1977—), 男, 博士, 副研究员, 硕士生导师, 研究方向: 环境因素与生殖发育, 实验动物模型研究。E-mail: hover_xwj@sjtu.edu.cn。ORCID: 0009-0007-2049-5169

[Key words] Cell culture laboratory; Facility maintenance and management; Personnel management; Cell biological risk quality control management

细胞培养技术是生命科学研究各领域中一种最基本、最重要、应用最广泛的技术之一^[1]。细胞培养是指在体外环境中,人为地建立细胞生长的培养和支撑体系。细胞培养室简化了复杂的生命体,避免了直接生命研究的伦理局限,也使研究的干扰因素和经济耗费减少^[2]。随着生命科学研究的不断深入,细胞培养技术结合显微操作技术以及实验动物,构建基因编辑模型小鼠以研究某特定基因功能,或通过建立肿瘤疾病动物模型,进行人类疾病的发生、发展机制以及预防和治疗等方面的研究,是实现精准医疗的重要工具,也是基础科学研究、转化医学研究的必要手段,在人类疾病研究和新型药物研制和开发等生命科学领域都有着重要的意义。因此,实验动物中心的公共细胞培养平台除了保障和提高实验动物质量外,还需要通过加强细胞培养过程中的设施管理、人员管理和质控管理,建设与之相匹配的细胞培养实验室,从而保障以实验动物和细胞为材料的生命科学研究结果的科学性、可靠性及可重复性^[3-5]。

上海交通大学实验动物中心(闵行校区)是校级实验动物科研平台,一直致力于优质服务平台的建设。为提升本校在生命科学研究领域的重大前沿基础研究水平,本中心除建设了实验动物基础饲养设施外,还搭建了公共细胞培养平台等多种专业技术服务平台,配备先进的仪器设备和专业的技术及管理人员。公共细胞培养平台除了支撑本校的生命科学、农学、医学、药学、材料科学等学科发展外,也为校外科研用户提供便利条件。本文以上海交通大学实验动物中心公共细胞培养平台为例,从设施管理、人员管理以及质控管理3个方面进行介绍,以期对其他高校和机构的公共细胞培养实验室的污染防控管理提供有益借鉴。

1 设施维护与管理

公共细胞培养平台属于实验动物中心主体即动物饲养屏障的配套设施,建于实验动物饲养屏障外,便于各平台间单独维护和管理,避免和动物饲养屏障交叉污染。公共细胞培养平台的使用对象包括本中心技术人员,以及校外服务用户。校外服务用户通过自主操作或者委托中心技术人员操作的方式来开展细胞相关的各项实验。

1.1 设施运行管理方式

公共细胞培养平台主要分为两个功能模块:一个用于肿瘤动物模型制备的体外细胞培养,另一个用于基因编辑动物模型平台相关技术的体外细胞实验。因此,针对这两种不同类型的实验需求,将细胞培养平台分成两个单独的功能性细胞培养室,每个细胞室承担一个功能模块。从管理方式上实行集中统一管理,即两个培养室采用相同的管理规定和规章制度;同时针对不同的实验类型,在空间上实行分类管理,即两个培养室除更衣室共用外,人员通道、物品传递和传出、培养室内的仪器设备使用以及细胞培养操作、设施消毒等均完全分开。如果一个培养室出现污染,需要灭菌后重启,不会影响另一间培养室的使用。这种管理方式,既能从管理上做到统一标准和要求,又能有效避免操作过程中的相互影响及交叉污染。

1.2 设施维护与消毒

公共细胞培养室按照屏障设施要求建造,有独立的送排风,采用全新风系统,配有高、中、低效过滤器,空气洁净度达到7级。根据本实验动物中心制定的《初、中、高效过滤器的使用和更换操作规程》,定期维护和更换初、中、高效过滤器是保障细胞室屏障环境质量安全的第一道防线。细胞室内定期开启和更换各种紫外灯以及进行环境落下菌和尘埃粒子数的检测,从而有效保障细胞培养室内的空气洁净度。如果环境落下菌和尘埃粒子数检测不合格,就需要更换过滤器并加强室内消毒。具体做法如表1。

公共细胞实验平台由于实验人员来源复杂、人员流动性大、仪器设备使用频率高、仪器操作时间不固定、实验物品种类繁多等因素,设施内部环境微生物污染的概率大大增加,因此消毒工作应更加严格。通过比对测试多种消毒剂不同使用浓度的消毒效果、消毒作用时间及其稳定性、腐蚀性、安全性能,并充分考虑细胞室内各种仪器设备的性质和特点以及人员防护安全等因素,选用杀孢子剂和75%乙醇溶液两种消毒剂对设施环境、实验物品、仪器设备以及人员防护用品等实施消毒。根据不同区域对微生物的控制要求以及人员操作频率,按照次、天、周、月的消毒频率,采用高压灭菌、化学和物理等多种消毒和灭菌方式相结合,从而保障细胞培养室内环境质量安全。具体做法如表2~3。

表1 上海交通大学实验动物中心细胞培养实验室的硬件设施维护频率

Table 1 Maintenance frequency of hardware facilities in cell culture laboratories of Laboratory Animal Center of Shanghai Jiao Tong University

设备维护项目 Maintenance projects	每次 Each time	每天 Daily	每月 Monthly	每季度 Per quarter	每半年 Semiannually	每年 Per annum
初效过滤器 Primary efficiency filter			②	③		
中效过滤器 Medium efficiency filter					③	
高效过滤器 High efficiency filter						③
传递窗中紫外灯 Ultraviolet lamp in delivery window	①			③		
生物安全柜中紫外灯 Ultraviolet lamp in biosafety cabinet	①			③*		
细胞培养室中紫外灯 Ultraviolet lamp in cell culture room		①			③	
落下菌检测 Airborne bacteria detection			④			
尘埃粒子检测 Dust particle detection				④		

注：①开启；②擦拭消毒；③更换，*或根据安全柜显示提醒；④检测。

Note: ①On; ②Wipe disinfection; ③Switch, *or according to the reminders displayed on the safety cabinet; ④Detection.

表2 上海交通大学实验动物中心细胞培养实验室内的清洁及消毒频率

Table 2 Frequency of cleaning and disinfection in cell culture laboratories of Laboratory Animal Center of Shanghai Jiao Tong University

消毒物品或位置 Sterilized items or locations	每次 Each time	每天 Daily	每周 Weekly	每月 Monthly
实验室台面 Laboratory countertop	②③	①④		
生物安全柜台面 Biosecurity countertop	①②③			
仪器操作台面 Instrument operating table	②	①④		
细胞培养室 Cell culture room		①④		
传递窗 Delivery window	①③	②		
进出口缓冲间 Inlet and outlet buffer		①③④		
冰箱 Icebox			②	
二氧化碳培养箱内部及水盘 Carbon dioxide incubator inside and water tray			②	
置物架 Storage shelf		①④	②	
储物柜 Locker		①④	②	
门 Door		①④	②	
墙壁 Wall		①④	②	
天花板 Ceiling		①④		②

注：①紫外线消毒；②擦拭消毒；③喷雾消毒；④臭氧消毒。

Note: ①UV disinfection; ②Wipe disinfection; ③Spray disinfection; ④Ozone disinfection.

1.3 设施规章制度

健全的规章制度是细胞培养实验室安全、高效运行的有力保障。没有规矩不成方圆，完善的规章制度是实验室标准化管理的前提，只有当实验室的各项工有章可循，并从根本上杜绝各类潜在隐患发生，才能可持续地加强实验室的建设与发展^[6]。针对细胞培养室的硬件和软件设施，从人员、物品、仪器设备、消毒及实验技术等各个方面分别制定行之有效的管理规定和操作规程，如《细胞培养室使用管理规定》《实验室及仪器设备使用管理制度》《物品进出细胞培养室管理规定》《细胞培养室清洁消毒操作规程》《仪器使用操作规程》等，使其在运行时做到有章可循，规范

执行。

1.4 设施安全管理

实验室的安全管理关系到实验质量、设施安全、实验人员健康、环境保护等重要问题，在很多国家及行业标准中占有重要位置，因此应引起重视^[7]。实验室安全是保障实验室正常运行的重中之重，除了严格遵守学校规定的《实验室安全守则》外，实验动物中心还制定了本部门的《实验室安全管理办法》和《突发事件应急管理制度》。通过实验室负责人每日安全检查、安全员每周定期巡查以及直属单位每月巡检和学校不定期抽检等多种方式，多方位、全方面保障细胞培养室的安全运行。(1) 设施安全：每天检查设施运

表3 各种实验用物品进入上海交通大学实验动物中心细胞培养实验室的消毒方式

Table 3 Various methods of disinfection of laboratory items entering cell culture laboratories of Laboratory Animal Center of Shanghai Jiao Tong University

实验物品 Experimental item	高压灭菌 Autoclave	化学消毒 Chemical disinfection		物理消毒 Physical disinfection
		杀孢子剂 Sporicide	75%乙醇溶液 75% alcohol	紫外线+臭氧 UV+Ozone
防护用品 Protective equipment				
防护服 Protective suits	√			
拖鞋 Slippers		√		√
口罩 Face masks*		√		√
帽子 Hats*		√		√
手套 Gloves*		√		√
实验用品 Laboratory supplies				
超纯水 Ultrapure water	√			
擦拭纸 Wiping paper	√			
离心管 Centrifuge tubes	√			
细胞 Cell*			√	
细胞计数板 Cell counting plates*		√		√
细胞培养耗材 Cell culture consumables*		√		√
细胞培养试剂* Cell culture reagents*		√		√
仪器设备 Instruments and equipment				
移液器 Pipettors			√	√
精密小型仪器 Precision small instruments			√	√
小型仪器 Small instruments		√		√
大型仪器 Large instruments		√		√

注：*外包装。

Note: *Outer packing.

行状态，包括送排风、空调、压差等是否正常；每日下班前，确认水、电、门、空调为正常状态。(2) 仪器安全：每日检查二氧化碳钢瓶、培养箱等仪器的安全状态，如钢瓶的固定是否安全、钢瓶内气体量是否充足，培养箱的温度、气体控制等是否正常。(3) 人员安全防护：进入细胞培养室前，需严格做好个人防护措施，按照防护鞋—手套—帽子—口罩—防护服的顺序穿戴整齐，双手经75%乙醇溶液喷雾消毒后方可进入细胞培养室。(4) 生物安全：所有细胞培养及实验操作均应在生物安全柜内进行，并严格实行废弃物分类处理；细胞培养物及相关试剂废液放入专门的废液收集桶，细胞培养相关废弃耗材放入黄色生物垃圾桶；所有生物污染废弃物最终经集中灭菌后无害化处理。

2 人员管理

相比于其他科研机构，高校实验室有一个显著特点是人员管理的复杂性，由于科研人员流动性大和实验时间上不固定，所以在管理上存在难点^[8]。特别是

一些非生物专业背景的学生普遍缺乏细胞培养方面的相关知识，对细胞培养操作没有相关经验，如果管理上稍有疏忽，就有可能使细胞培养室从屏障设施降为普通实验场所。因此，在细胞培养室管理制度中，应增加系统的规章制度培训和细胞培养技术操作培训的频次，并且加强现场巡查指导和纠错机制^[9]。

2.1 培训管理

实验人员的培训主要包括：细胞培养室的规章制度和管理规定；细胞培养室内常规仪器使用操作规程；细胞培养相关试剂（完全培养基、细胞冻存液等）配制方法；传代细胞培养、原代细胞分离、体外细胞转染、细胞毒性实验等各类细胞操作技术；细胞冻存及复苏等实验原理及注意事项；细胞染色、细胞计数等基本实验方法。所有实验人员必须通过线上理论学习和线下实操培训，通过考核后，方可独立开展细胞培养实验操作。

2.2 预约管理

所有实验人员需提前24 h在线预约细胞培养室的操作时间。在同一时间段，每间细胞室的每台生物安

全柜内只允许开展一项细胞实验。预约使用细胞室能有效避免实验时间冲突和交叉污染,使得细胞培养室公共资源利用最大化。

2.3 监督管理

细胞培养实验室的环境维护、细胞实验的质量和安​​全都离不开对人员的监督管理。实验动物中心可通过设置各区域的门禁系统、监控系统,并展开不定期巡检等途径,对操作人员进行全方位实时监督,及时制止和纠正违规操作。

3 细胞生物风险质控管理

3.1 细胞生物安全风险评估

随着人/动物细胞培养内容的不断增加,细胞培养技术的生物安全问题即与人类健康和环境因素相关的风险愈加受到关注。最大限度地减少这些风险需要通过生物安全风险评估来确定,并要考虑细胞培养操作的类型和细胞培养潜在的生物危害。人/动物细胞培养风险评估与细胞特点、遗传修饰和致病因子感染获得的特征以及实验操作类型都有密切关系。实验动物相关的细胞实验,如肿瘤细胞的传代培养、原代细胞分离等操作涉及的生物危害风险,主要包括细胞来源、细胞或者组织类型、外来感染因子以及培养类型等因素。动物细胞和非人灵长类动物细胞的风险指数低于人类细胞;上皮和纤维原细胞、肠黏膜和内皮细胞风险指数低于神经组织和造血细胞;细菌、真菌、寄生虫以及支原体的风险指数低于病毒和朊病毒;状态良好的持续细胞系风险指数低于原代细胞系^[10]。

安全、可靠的细胞来源是把控细胞质量的关键所在,同时也是保护人类、动物健康和环境安全的必要条件。首先,推荐实验人员优先从本平台的细胞资源库里选用细胞株,本平台所有冻存细胞均购自优质的细胞供应商,且经过支原体阴性验证。其次,推荐实验人员从质量稳定的优质供应商处购买细胞株,并且每批次进行支原体复检验证。这样能保障细胞的质量、遗传特性以及无交叉污染,从而最大限度地降低细胞的生物污染风险。优质的细胞供应商一般会满足以下几个条件:(1)细胞运输装置防震且包裹较严实,细胞瓶外包装完好;(2)贴壁细胞贴壁较紧实、无飘落,细胞形态符合其特征;(3)提供详细的说明书,包含细胞来源、特征、培养及冻存条件等;(4)提供细胞短串联重复序列(short tandem repeats, STR)鉴定结果;(5)提供支原体检测报告。细胞来源的最大污染

风险是细胞株来自某些细胞培养操作不严谨的课题组、研究机构或者医院的实验室,一般不推荐使用。特殊情况需要使用时,需由供方提供一周之内的支原体检测阴性结果,并且在细胞到达后,先培养在隔离培养箱内,再次验证支原体为阴性时方可转到常规培养箱内继续培养。

3.2 细胞培养操作要求

除了细胞生物安全风险把控外,细胞培养操作也至关重要。离体细胞对病原微生物及病毒无抵抗力,无菌操作是整个细胞体外培养成败的关键。细胞一旦感染,将因被夺营养物质而生长缓慢或停滞,甚至死亡。因此,从接触细胞培养实验开始,实验人员就要形成严格的无菌观念^[11]。细胞培养操作对实验人员的理论知识,以及物品使用、操作方法、实验结束后处理等方面技能都有严格要求。所有进出生物安全柜内的物品均需用75%乙醇溶液喷雾消毒后才可使用。使用的培养耗材和试剂,应严格按照最小包装或者分装的最小剂量使用。非公共试剂和耗材需要做好明确的标识,写明实验人、日期、浓度、有效期等信息。操作人员需严格按照无菌操作要求进行操作,出现任何可疑的污染动作应立刻停止,消毒双手并更换试剂或者耗材。操作结束后,所有操作台面和物品应及时整理、消毒,所有废弃物按照要求分类存放并最终进行无害化处理。

3.3 细胞运输、传递及保存

细胞培养至合适的状态和数量后,收集并进行细胞计数,稀释至实验所需的浓度,将其运输和传递至饲养屏障内使用。此过程的污染风险把控也十分重要,细胞在运输和传递过程中一旦污染,不仅影响实验进度,也会给动物饲养屏障带来外来因子的感染风险。

3.3.1 细胞收集和运输

细胞收集后分装于1.5 mL或2.0 mL无菌离心管中,用封口膜封好,通过冰盒(已消毒,4℃冰箱预冷)将细胞通过传递窗传出细胞培养室。如果实验所需细胞数量比较多,建议少量多次收集,最大程度保证细胞活力。

3.3.2 细胞传递

将细胞离心管以及冰盒分别进行表面消毒,然后将冰盒放入动物屏障专用物品传递窗内,并盖上已消毒的不透明卡片(遮盖细胞离心管,防止细胞被紫外照射损伤),再次喷雾消毒冰盒,并经15 min紫外线照射后传递进屏障内。

3.3.3 细胞保存

线下保存：收集细胞（支原体检测阴性），加入冻存液，分装于细胞冻存管中，标记好细胞名称、细胞代数、冻存时间、操作人等信息后，将其放在 -80°C 冰箱暂存，并最终放入液氮罐中长期保存。线上保存：将冻存细胞的信息及时登记到细胞库中，要求标记细胞名称、细胞来源、细胞代数、培养条件、冻存位置、操作人员、支原体检测结果等信息，便于后续查询和复苏使用。细胞库需要相关负责人定期维护，包括将冻存的细胞定期进行复苏以验证其活力，对传代次数比较多或者状态不好的细胞进行及时淘汰和补充。

3.4 细胞污染应急处置

细胞污染是细胞培养室面临的巨大威胁。细胞污染一旦蔓延，势必造成更大的不可挽回的损失，并需要投入更多的时间、人力和物力进行治理。因此，预防和避免细胞污染成为本平台细胞培养室管理的第一要务^[11]。常见的细胞污染包括细菌、真菌（霉菌）、支原体以及黑胶虫等。如果培养过程中发现细胞污染，实验人应立即上报管理员。首先需找出污染的原因，根据原因把控污染扩散或者传播的风险。同时，应及时将污染的细胞及相关试剂和耗材进行灭菌处理，并对涉及污染的细胞培养区域及其内部仪器和物品严格消毒后再使用。发生严重污染时，需要对整个细胞培养平台进行彻底消毒，并经过过氧化氢灭菌后方可重新启用。

4 结语

实验动物中心搭建公共细胞培养或实验平台，能充分整合实验动物和细胞培养资源，更为高效、合理地配置相关科研资源，便于科研人员更好地开展研究。由于细胞培养要求无菌操作，相比其他实验室，细胞培养平台对实验人员的实验技术及操作规范有更高的要求。只有建立健全的规章制度，明确使用权限，完善管理体系，才能保证科研实验顺利进行，从而使平台运行更高效、完善和科学化^[12]。

近年来，国内外实验动物机构开始探索和实践实验动物安全管理模式，逐步重视实验动物生物安全问题。由于动物实验所用的实验材料都将与实验动物直接接触，实验材料携带微生物污染必将影响实验动物的健康，进而影响动物实验数据的可靠性，还可能造成动物发病并在屏障设施内传播，所以对实验动物材料进行检控就显得十分必要和重要^[13]。各种来源的生

物材料，包括细胞、组织、生物制剂等，在进入实验动物屏障设施并进行动物实验前，都需要做安全性检测，以防止存在人源或动物源传染病原的生物材料在实验动物上使用^[14]。细胞在培养过程中会受到细菌、真菌、支原体、病毒、寄生虫等外来生物污染因子的影响，在这些影响因素中，支原体污染的危害相对严重，无论是影响范围、检测难度还是防治等方面都存在比较难以处理的情况^[15]。除本平台外，走访调研发现国内清华大学、复旦大学、中国科学院分子细胞科学卓越创新中心等多家高校及研究所的实验动物机构针对各种来源的可传代的肿瘤细胞，均要求提供细胞质量合格检测证明，一般包括支原体检测结果和细胞中STR鉴定报告。

实验动物中心公共细胞培养平台内培养的大部分细胞用于接种实验动物，如果存在污染或者质量问题，不但影响实验结果，还会影响实验动物健康，严重者甚至会扩散污染整个动物饲养设施。因此，实验动物中心的细胞培养平台在细胞质量把控上要比常规的细胞培养室更为严格。通过十多年的管理经验累积，本平台目前累计冻存70余种细胞系，服务校内外60多个课题组或用户，支撑各类细胞实验项目完成近百项，细胞污染控制率达到95%以上。上海交通大学实验动物公共细胞培养平台已经形成了一套完整的管理和质控体系，能够有效地降低细胞污染概率，为生、农、医、药等科研领域产出高质量研究成果做好服务和支撑。

[作者贡献 Author Contribution]

彭丽娜负责撰写方案策划，初稿写作及修改；
张曼负责调查研究，参与文章撰写思路探讨；
艾敏负责查阅及引用文献；
徐汪节负责撰写方案审定及写作审修。

[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] 徐加英, 秦立强, 曹建平, 等. 细胞培养室管理的研究与探索[J]. 中国实用医药, 2008, 3(36):249-250. DOI: 10.3969/j.issn.1673-7555.2008.36.205.
XU J Y, QIN L Q, CAO J P, et al. Research and exploration on the management of cell culture room[J]. China Pract Med, 2008, 3(36): 249-250. DOI: 10.3969/j. issn. 1673-7555.2008. 36.205.
- [2] 陈功星, 王世贵, 俞诚, 等. 普通细胞培养室的建设与管理[J]. 实验室研究与探索, 2011, 30(11): 151-154. DOI: 10.3969/j.issn.1006-7167.2011.11.042.

- CHEN G X, WANG S G, YU C, et al. Construction and management of ordinary cell culture laboratory[J]. Res Explor Lab, 2011, 30(11): 151-154. DOI: 10.3969/j.issn.1006-7167.2011.11.042.
- [3] 李晶晶, 刘磊, 潘艳, 等. 细胞室的布局、管理与日常维护探析[J]. 绿色科技, 2017(10):232-233. DOI: 10.16663/j.cnki.lskj.2017.10.087.
- LI J J, LIU L, PAN Y, et al. Analysis on establishment, management and maintenance of cells laboratory[J]. J Green Sci Technol, 2017(10): 232-233. DOI: 10.16663/j.cnki.lskj.2017.10.087.
- [4] 刘丽月, 彭宗林. 分权限开放 提高透射电镜的使用率[J]. 实验室研究与探索, 2016, 35(6): 280-283.
- LIU L Y, PENG Z L. Opening with different permissions and improving use efficacy of TEM[J]. Res Explor Lab, 2016, 35(6): 280-283.
- [5] 王筱冰, 王海萍, 张坤, 等. 研究生"细胞培养"课程教学实践及思考[J]. 实验室科学, 2018, 21(4):120-122, 126. DOI: 10.3969/j.issn.1672-4305.2018.04.032.
- WANG X B, WANG H P, ZHANG K, et al. Teaching practice and thinking of graduate cell culture course[J]. Lab Sci, 2018, 21(4):120-122, 126. DOI: 10.3969/j.issn.1672-4305.2018.04.032.
- [6] 张亚楠, 陈炜, 龚淼, 等. 医学院校实验室规范化管理的探索与实践[J]. 河北医科大学学报, 2019, 40(7):866-868. DOI: 10.3969/j.issn.1007-3205.2019.07.029.
- ZHANG Y N, CHEN W, GONG M, et al. Exploration and practice of standardized laboratory management in medical colleges and universities[J]. J Hebei Med Univ, 2019, 40(7): 866-868. DOI: 10.3969/j.issn.1007-3205.2019.07.029.
- [7] 崔冬生, 李增宁, 顾平, 等. 细胞培养室管理规则[J]. 华北煤炭医学院学报, 2004, 6(3):395-396. DOI: 10.19539/j.cnki.2095-2694.2004.03.125.
- CUI D S, LI Z N, GU P, et al. Management rules of cell culture room[J]. J N China Coal Med Coll, 2004, 6(3):395-396. DOI: 10.19539/j.cnki.2095-2694.2004.03.125.
- [8] 王志昇, 陈健茂, 李红兵, 等. 我校屏障环境动物实验室管理初探[J]. 实验动物与比较医学, 2014, 34(2): 156-158. DOI: 10.3969/j.issn.1674-5817.2014.02.016.
- WANG Z S, CHEN J M, LI H B, et al. Preliminary study on the management of barrier environment animal laboratory in our school[J]. Lab Anim Comp Med, 2014, 34(2): 156-158. DOI: 10.3969/j.issn.1674-5817.2014.02.016.
- [9] 严冬琳, 江宏兵, 潘永初, 等. 医学实验室液氮操作的风险分析、控制和应急处置[J]. 科教导刊, 2021(31): 147-149. DOI: 10.16400/j.cnki.kjdk.2021.31.049.
- YAN D L, JIANG H B, PAN Y C, et al. Risk analysis, control and emergency operations in medical laboratory when using liquid nitrogen[J]. Guide Sci Educ, 2021(31): 147-149. DOI: 10.16400/j.cnki.kjdk.2021.31.049.
- [10] 徐莉, 刘敏, 徐吉, 等. 动物细胞培养中的生物安全问题与风险评估研究[J]. 中国自然医学杂志, 2008, 10(1):68-71.
- XU L, LIU M, XU J, et al. Biosafety issues and risk assessment in animal cell culture[J]. Chin J Nat Med, 2008, 10(1):68-71.
- [11] 杨迷芳, 江宏兵, 王林, 等. 公共实验平台细胞培养室污染风险分析和管理措施[J]. 教学管理, 2022, 36(12):50-53.
- YANG M F, JIANG H B, WANG L, et al. Risk analysis and management measures of pollution in cell culture room of public experimental platform[J]. J Teach Manag, 2022, 36 (12): 50-53.
- [12] 左琴华, 薛巍. 细胞培养实验平台的管理经验探索[J]. 实验技术与管理, 2020, 37(2):233-236, 263. DOI: 10.16791/j.cnki.sjg.2020.02.056.
- ZUO Q H, XUE W. Exploration on management experience of experimental platform for cell culture[J]. Exp Technol Manag, 2020, 37(2):233-236, 263. DOI: 10.16791/j.cnki.sjg.2020.02.056.
- [13] 陈国元, 康康, 李晓娴, 等. 实验材料检测在 SPF 级实验小鼠质量控制中的应用[J]. 实验动物与比较医学, 2021, 41(1): 61-65. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2020.092.
- CHEN G Y, KANG K, LI X X, et al. Application of experimental material inspection in quality control of SPF mice[J]. Lab Anim Comp Med, 2021, 41(1): 61-65. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2020.092.
- [14] 谢忠忱, 江轶, 黄开胜, 等. 高校实验动物生物安全管理模式研究[J]. 实验技术与管理, 2020, 37(2): 1-5. DOI: 10.16791/j.cnki.sjg.2020.02.001.
- XIE Z C, JIANG Y, HUANG K S, et al. Research on laboratory animal biosafety management model in colleges and universities[J]. Exp Technol Manag, 2020, 37(2): 1-5. DOI: 10.16791/j.cnki.sjg.2020.02.001.
- [15] 胡燕玲, 高习文. 细胞培养时存在的生物安全问题简析[J]. 现代畜牧科技, 2018(7): 18. DOI: 10.19369/j.cnki.2095-9737.2018.07.010.
- HU Y L, GAO X W. Brief analysis of biosafety problems in cell culture[J]. Mod Anim Husb Sci Technol, 2018(7):18. DOI: 10.19369/j.cnki.2095-9737.2018.07.010.
- (收稿日期: 2023-07-12 修回日期: 2023-10-18)
(本文编辑: 张俊彦, 富群华, 丁宇菁, 王艳)
- [引用本文]**
彭丽娜, 张曼, 艾敏, 等. 上海交通大学实验动物中心公共细胞培养平台管理经验探讨[J]. 实验动物与比较医学, 2024, 44(2): 227-233. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2023.101.
PENG L N, ZHANG M, AI M, et al. Discussion on management experience of public cell culture platform in Laboratory Animal Center of Shanghai Jiao Tong University[J]. Lab Anim Comp Med, 2024, 44(2): 227-233. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2023.101.



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。

如果动物实验不严谨

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)02-0234-04



本栏目的第一篇文章中, 通过几个较早的动物实验案例, 以“为什么要开展动物实验”为题, 向读者朋友们介绍了动物实验对人类和动物健康的贡献^[1]。如今, 虽然通过使用动物开展实验来评价候选药物的疗效、代谢及潜在毒性是新药研发不可或缺的环节, 但科学界也会有不同的声音出现。尤其是基于动物实验结果的候选药物临床转化率仅有11%时^[2], 有一些人认为动物实验完全没有必要。事实果真如此吗? 如果药物进入临床前没有通过动物实验对候选药物进行安全性评价, 不知将会有多少患者受到伤害。在新药研发过程中, 不仅要开展动物实验, 而且要进行科学严谨的动物实验。如果动物实验设计和实施过程不严谨, 同样会出问题。例如因出现严重不良反应而被召回的“新药”反应停和万络, 之所以在上市前没有发现其毒性和不良反应, 不严谨的动物实验结果难辞其咎。下面就以几个经典案例来介绍不严谨的动物实验所带来的危害。

1 反应停事件

约60年前, 一款缓解孕妇晨吐的镇静药沙利度胺(Thalidomide, 商品名为反应停)在上市5年后, 因被发现可导致婴儿海豹胎(四肢短得就像海豹的鳍足)和其他畸形而被叫停使用。反应停是20世纪50年代由联邦德国格兰泰公司投入开发的一种镇静类药物, 其声称该药能够显著抑制孕妇晨吐等妊娠反应。1957年10月, 反应停正式投放欧洲市场, 不久后进入日本市场, 并在此后不到一年的时间内风靡欧洲、日本、非洲、澳大利亚和拉丁美洲。但在美国申请上市许可时, 遇到了美国食品药品监督管理局(Food and Drug

Administration, FDA)仔细且繁琐的市场准入调查, 最终没能得到进入美国市场的许可, 并促成“美国国会于1962年通过法案, 加强对药物的管理, 授予FDA更多的权力, 要求新药在获准上市前必须经过严格的试验, 并提供药物不良反应和中长期毒性的数据, 必须对至少两种妊娠动物进行致畸性试验”^[3]。

到1961年, 澳大利亚产科医生威廉·麦克布里德(William McBride)向英国《柳叶刀》(*The Lancet*)杂志投稿, 以“Letter to Editor”的形式报道了反应停能导致婴儿畸形的现象^[4]。在麦克布里德接生的产妇中, 许多人产下的婴儿患有罕见的海豹胎畸形症状, 而这些产妇都曾经服用过反应停。随后, 格兰泰公司撤回联邦德国市场上所有反应停, 不久其他国家也相继停售, 但此时已经有万余名因服用反应停而导致畸形的胎儿出生。由于这一事件, 格兰泰公司支付了1.1亿西德马克的赔偿, 并破产倒闭。

回顾发现, 在反应停上市前, 格兰泰公司使用大鼠开展了动物实验研究, 但并没有发现畸形大鼠出生。后续调查证明, 他们的动物实验设计非常不严谨。首先, 沙利度胺在大鼠体内的半衰期约为0.5 h, 而在人体内的半衰期则有7.3 h之久。因此, 沙利度胺在大鼠体内会很快被代谢掉。其次, 抗氧化剂如谷胱甘肽可以抑制沙利度胺引起的细胞凋亡, 而大鼠比人类具有更多的抗氧化剂, 这些抗氧化剂可保护它们的胚胎免受沙利度胺引起的破坏^[5]。因此, 可以说大鼠并不是一种可以充分评估沙利度胺毒性的实验动物, 相较而言, 使用非人灵长类动物则很容易观察到沙利度胺对胚胎发育的影响。

另外一个容易被忽略的因素是, 大鼠为多胎生产

实验动物，其分娩又多发生在夜间，且母鼠有吃掉发育畸形仔鼠的习惯。因此，当实验人员白天检查大鼠生产情况时往往只能观察到健康的出生个体。虽然窝平均产仔数可能有少许减少，但通常也不会引起注意。后续通过剖宫产和夜间观察大鼠产仔，确实发现在妊娠特定阶段给予沙利度胺，大鼠也可以产下畸形的胎儿。也就是说，如果当时格兰泰公司在开展动物实验时能够考虑到这个细节，改为剖宫产或想办法直接观察大鼠产仔时的情况，或许就可以观察到反应停的不良后果，从而避免悲剧的发生。而且格兰泰公司于1956年发表的沙利度胺动物实验相关文章中显示其动物实验既没有设置安慰剂组，也没有交代给药持续时间，更没有进行双盲对照实验设计^[6]。如此不严谨的实验设计，其团队注意不到动物实验的细节问题也就一点都不意外了。综上，正是由于沙利度胺在上市前的动物安全性评价实验存在严重缺陷，人们没能及时发现其不良反应，最终导致了反应停悲剧的发生。

2 万络事件

如果说反应停事件还只是新药研发和审批不健全时代的产物，那么万络的匆忙上市和退市则是在利益驱动下，当代药物研发中由于动物实验不严谨而造成严重后果的经典案例。

身体在经历发烧、疼痛或炎症反应时，往往会通过抑制或阻断身体内不同部位的前列腺素分泌来缓解症状。例如，退烧药布洛芬和对乙酰氨基酚就是通过抑制下丘脑前列腺素合成来调控体温调节中枢内的体温调定点，促使其恢复正常而实现退烧的；阿司匹林则通过抑制外周前列腺素合成来实现其镇痛、退热和抗炎的功效。上述这些具有抑制或阻断身体不同部位前列腺素分泌或功能的药物隶属于非选择性环氧合酶（cyclooxygenase, COX）（又称前列腺素内氧化酶还原酶）抑制剂。它们都是通过非特异性地抑制或阻断COX活性，实现其抑制前列腺素合成的功能，进而发挥药效。

COX是催化花生四烯酸转化为前列腺素的关键酶，有两种同工酶：COX-1和COX-2。COX-1除了下丘脑外，还在血管、胃、肾等多种组织中表达，参与血管舒缩、血小板聚集、胃黏膜血流、胃黏液分泌及肾功能等的调节，具有保护胃肠黏膜、调节血小板聚集、调节外周血管阻力和调节肾血流量分布的功能。因此，这些非选择性COX抑制剂类药物在发挥其药效的同时，也会抑制广泛表达在身体其他部位的COX-1，从

而产生不良反应。最典型的不良反应就是引起胃部不适，甚至出现胃溃疡和胃出血等。COX-2则是诱导表达型，只有在身体经历了诸如化学和机械损伤或微生物感染后才会激活。因此，如果能开发出一种药物可以选择性地阻断COX-2的功能，就有望避开上述非选择性COX抑制剂类药物的不良反应。

20世纪90年代，制药界的巨头之一德国默克公司启动了寻找COX-2特异性抑制剂的研究。他们很快推出了一款新药罗非昔布，商品名为万络。并通过8000多名患者的临床试验证明，与当时广泛使用的同类药物萘普生相比，该药在治疗类风湿性关节炎时具有更少的胃肠道不良反应，差不多将胃肠道事件的风险降低了一半。但由于过于关注胃肠道不良反应，默克公司在研发万络的过程中，有意或无意地忽略了该药对心血管系统的严重不良反应，且在不断出现心血管不良反应报告的情况下仍没有重视。直到默克公司继续研究万络在预防腺瘤性息肉等方面的其他适应证时，证实其存在引发心血管的风险，该药才从市场上撤回。但此时仅美国就约有400万人服用了万络。美国FDA的一名调查员估计，万络可能导致约14万人罹患心脏病，其中6万人或将因此死亡^[7]。

排除其他各种涉及公司经济利益等原因外，不严谨的动物实验结果也是万络能够最终通过审查上市的原因之一。早在万络上市之前，宾夕法尼亚大学医学博士加勒特·菲茨杰拉德（Garret FitzGerald）领导的研究小组就观察到万络抑制了前列环素生成。鉴于前列环素对心脏具有潜在的保护作用，加勒特推测该药可能有导致心脏病和中风的风险。但这并没有引起默克公司的足够重视，他们也没有就此开展更为严谨的动物实验来分析万络在心血管方面的风险。而在该药退市后，更进一步的研究结果显示，选择性地敲除血管内皮细胞中的COX-2会使小鼠出现血栓和高血压，这些小鼠就像服用万络的人类一样，前列环素也出现了下降^[8]。想象一下，如果默克公司在万络上市前就能够使用COX-2敲除小鼠开展一个并不需要花费太长时间和精力的研究，或许就可以挽救成千上万人的生命。

3 渐冻人症药物研发

因中枢神经系统内控制骨骼肌运动的神经元退化导致的肌萎缩性脊髓侧索硬化症（amyotrophic lateral sclerosis, ALS，也称渐冻人症）是一种渐进且致命的神经退行性疾病。由于运动神经元退化和死亡，肌肉逐渐萎缩致大脑完全丧失控制随意运动的能力，最终

会造成发音、吞咽、呼吸和运动障碍。著名物理学家斯蒂芬·霍金 (Stephen Hawking) 就是一名 ALS 患者。目前还没有真正可有效治疗 ALS 的药物和方法。

绝大多数 (90%~95%) 的 ALS 发病原因不明,但也有约 5%~10% 的 ALS 患者表现出了家族遗传性。其中,超氧化物歧化酶 1 (superoxide dismutase 1, SOD1) 基因突变约占这些遗传性 ALS 病例的 10%。SOD1 也是第一个被鉴定出来的 ALS 风险基因^[9]。因此很快就有科学家构建了一种含有第 93 位甘氨酸突变为丙氨酸 (G93A) 的人 SOD1 基因的转基因小鼠模型,全名为 B6SJL-Tg (SOD1*G93A) 1Gur/J 转基因小鼠^[10]。该转基因小鼠的基因组中被转入了 23 个拷贝的人源 SOD1*G93A 突变基因,接下来我们将其简称为 SOD1*G93A 转基因小鼠。

自 1996 年 SOD1*G93A 转基因小鼠问世以来,其就被广泛应用于 ALS 药物研发的临床前动物实验中。到 2004 年,短短 8 年时间内,已至少有 50 篇文章描述了从小分子到病毒载体的各类 ALS 治疗方案可延长 SOD1*G93A 转基因小鼠的寿命,其中最多可以延长 100 d (约占原寿命的 78%)。因此,这些药物很快进入临床试验。然而,迄今为止,除了利鲁唑最多可延长 ALS 患者两个月寿命之外,没有任何一种药物显示出对人类 ALS 疾病的进程有显著影响^[11]。这给医药公司带来了巨大损失。例如,2008 年在《美国国家科学院院刊》(PNAS) 上发表的一篇文章显示,锂可以将 SOD1*G93A 转基因小鼠的存活时间延长 30 d^[12];由于锂早已经被用于治疗精神分裂症,许多 ALS 患者开始超说明书服用该药物,希望减缓 ALS 的疾病进程;然而,招募了数百名患者,花费了远超 1 亿美元的 3 个同时启动的独立 III 期临床试验结果却显示,锂对 ALS 无任何治疗效果。

其实不仅仅是 ALS 的药物研发,在整个医药研发领域,动物实验结果的临床转化率也是非常低的,平均在 11% 左右^[11,13]。那么到底是什么原因导致了如此多的动物实验结果无法实现在人类的临床转化呢?

1999 年,美国麻省理工学院的机械工程师詹姆斯·海伍德 (James Heywood) 在得知他的兄弟斯蒂芬·海伍德 (Stephen Heywood) 被确诊患有 ALS,并无任何有效治疗方法后,与家人一起创立了一家非营利性生物技术公司,即 ALS 治疗开发研究所 (ALS-TDI)。ALS-TDI 成立后,开展了一项旨在寻找 SOD1*G93A 转基因小鼠实验结果临床转化失败原因的项目,即使用 SOD1*G93A 转基因小鼠重复已发表科研

论文中的动物实验,以找出其临床转化失败的原因。

在 ALS-TDI 开展的重复性实验中,他们不仅严格执行盲法对照,而且对给药组和对照组的动物进行了更为精细地分配和动物筛查以排除系统误差。他们的分组及实验要求包括:(1) 年龄匹配;(2) 性别匹配;(3) 同窝匹配,即使用同一天出生的同一非转基因母亲和转基因父亲的后代进行分组,具体来说,治疗组中的每个雄性(和雌性)动物在对照组中都有一个同窝兄弟(和姐妹);(4) 样本量设定,每组使用动物数量为 24 只(12 雌,12 雄);(5) 死因筛查,检查记录每一只动物的死亡原因,排除非 ALS 致死个体;(6) 转基因拷贝数监控,有研究证明 SOD1*G93A 转基因小鼠在传代过程中会出现转基因拷贝数丢失的现象,且低拷贝的转基因小鼠的平均寿命会延长。

在这一严格的实验分组和动物筛查条件下,ALS-TDI 的科研人员总共使用了 5 429 只 SOD1*G93A 转基因小鼠测试了包括利鲁唑在内的 100 多种候选化合物(大部分已有论文发表并证明可延长 SOD1*G93A 转基因小鼠寿命),结果却发现没有一种化合物能表现出可延长 SOD1*G93A 转基因小鼠寿命的效果^[11]。

为了找出那些已经发表的实验结果无法被复现的原因,研究人员以在 ALS-TDI 开展实验中所使用的 2 000 多只对照小鼠作为研究对象,进行了计算机分组模拟实验。由于这些小鼠从出生到死亡的信息以及死亡原因在 ALS-TDI 都有详细的记录,因此他们能够以所有对照小鼠为数据库,分析前述重复实验中设定的不同分组和动物筛查条件对实验结果的影响。即通过计算机对这些没有经过任何药物处理的小鼠根据前述重复实验中设定的不同分组和动物筛查条件进行随机分组,将一组设为假定的实验组,而另一组设为假定的对照组,然后依据已有的小鼠死亡时间记录,统计两组小鼠之间死亡时间是否存在显著差异。经过多次重复,计算出现 5% 以上显著差异(统计学上通常设置的显著置信区间,即 $P < 0.05$) 的百分比。由于这些小鼠没有接受过任何化合物处理,因此如果假定的实验组和对照组小鼠死亡时间出现了显著性差异,那么其原因应该是分组时的系统误差。

结果显示,在样本量大小为 4 的计算机分组模拟对比实验中,随机分组和不进行死因筛查(排除和不排除低转基因拷贝数个体)条件下,两组间出现显著差异的可能性超过了 50%。而在随机分组的同时进行死因筛查并排除低转基因拷贝数个体和进行性别同窝匹配的条件下,样本量为 4 的模拟分组实验中也有

30%的可能出现两组死亡时间有显著差异的情况。随着样本量的增加,出现显著性差异的可能性逐渐减少,但要实现低于5% (即 $P > 0.05$)的非显著性差异,样本量要达到每组24只动物。如果不做分组条件控制,即使样本量达到50只也难以排除系统误差^[11]。

4 启示

反应停事件和万络事件告诉我们:药物研发期间的动物实验不仅不可或缺,而且还需要选择最合适的实验动物(如反应停应使用非人灵长类动物,万络应补充使用基因敲除小鼠);同时应对任何潜在的风险因素都给予重视,并通过严谨和充分的动物实验加以检测和验证。

如果说这两个案例主要反映了制药公司在药物研发过程中,临床前动物实验不严谨会给患者带来严重危害,那么渐冻人症药物研发案例则提示科学研究中动物实验不严谨所带来的更多危害。

ALS-TDI的计算机模拟实验结果说明,前述那些已经发表的基于SOD1*G93A转基因小鼠的实验结果无法实现临床转化的真正原因极大可能是源于其实验设计的不合理,即这些实验因为没有排除分组时的系统误差而导致了假阳性结果。这个研究也暴露了当下使用实验动物开展研究的诸多问题,诸如:盲目地追求减少使用动物的数量;对所用动物的遗传、微生物和繁殖等特性不了解;实验过程中对动物关注不够,不清楚动物发病或死亡的真正原因等。这些问题不仅需要引起实验动物从业人员的注意,而且需要科研人员同样给予关注。因为实验设计不严谨导致的假阳性结果不仅是人力、物力和财力的巨大浪费,也严重有违动物实验伦理福利原则,这样的实验不会带来科学进步,反而浪费了大量实验动物的生命。比如在ALS-TDI开展的重复性实验中,那些无法重复出阳性结果但已经发表的研究工作累计使用小鼠的数量已超过了18 000只。

此外,在动物实验伦理申请时常用替代、减少和优化原则(俗称3R原则)来指导伦理审查工作,有时为了满足3R原则中的“减少”原则,加上开展实验的成本考虑,往往选择使用最少的动物数量(比如多为每组6只)。但从ALS-TDI的计算机分组模拟对比研究看,样本量过小会导致系统误差加大,因此极可能出现假阳性结果。这个时候大家或许忘了3R原则使用的大前提是要能够实现拟开展实验的科学目标,如果单纯为了“减少”而使用更少的实验动物导致科学目标

无法实现,那就不是真正的减少,而是对动物生命的漠视(实际的浪费)。

综上,3个案例告诉我们,无论是科学研究,还是候选药物临床前的安全性评价,都需要开展严谨的动物实验,否则不仅会令所得科研成果无效而浪费动物的生命,也会造成巨大的经济损失,并给患者带来严重的健康风险。

(2024年3月4日星期一,于强业路500号)

【参考文献 References】

- [1] 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.
- [2] HAY M, THOMAS D W, CRAIGHEAD J L, et al. Clinical development success rates for investigational drugs[J]. Nat Biotechnol, 2014, 32(1):40-51. DOI: 10.1038/nbt.2786.
- [3] 方舟子. "反应停"悲喜剧[EB/OL]. (2005-04-06)[2024-03-03]. http://zqb.cyol.com/content/2005-04/06/content_1063523.htm.
- [4] YANG T J, YANG T S, LIANG H M. Thalidomide and congenital abnormalities[J]. Lancet, 1963, 1(7280):552-553. DOI: 10.1016/s0140-6736(63)91347-3.
- [5] VARGESSON N. Thalidomide-induced teratogenesis: history and mechanisms[J]. Birth Defects Res C Embryo Today, 2015, 105(2):140-156. DOI: 10.1002/bdrc.21096.
- [6] BOTTING JH. Animals and medicine: The contribution of animal experiments to the control of disease[EB/OL]. [2024-03-03]. <https://books.openbookpublishers.com/10.11647/obp.0055.pdf>.
- [7] KRUMHOLZ H M, ROSS J S, PRESLER A H, et al. What have we learnt from Vioxx? [J]. BMJ, 2007, 334(7585):120-123. DOI: 10.1136/bmj.39024.487720.68.
- [8] YU Z, CRICHTON I, TANG S Y, et al. Disruption of the 5-lipoxygenase pathway attenuates atherogenesis consequent to COX-2 deletion in mice[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012, 109(17):6727-6732. DOI: 10.1073/pnas.1115313109.
- [9] ROSEN D. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis[J]. Nature, 1993, 364(6435):362. DOI: 10.1038/362059a0.
- [10] TU P H, RAJU P, ROBINSON K A, et al. Transgenic mice carrying a human mutant superoxide dismutase transgene develop neuronal cytoskeletal pathology resembling human amyotrophic lateral sclerosis lesions[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996, 93(7):3155-3160. DOI: 10.1073/pnas.93.7.3155.
- [11] SCOTT S, KRANZ J E, COLE J, et al. Design, power, and interpretation of studies in the standard murine model of ALS [J]. Amyotroph Lateral Scler, 2008, 9(1): 4-15. DOI: 10.1080/17482960701856300.
- [12] FORNAI F, LONGONE P, CAFARO L, et al. Lithium delays progression of amyotrophic lateral sclerosis[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, 105(6):2052-2057. DOI: 10.1073/pnas.0708022105.
- [13] KOLA I, LANDIS J. Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates? [J]. Nat Rev Drug Discov, 2004, 3(8): 711-715. DOI: 10.1038/nrd1470.

(收稿日期:2024-03-07 修回日期:2024-03-24)

(本文编辑:张俊彦,富群华)

【引用本文】

孙强. 如果动物实验不严谨[J]. 实验动物与比较医学, 2024, 44(2): 234-237. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.039.

清华大学实验动物中心

清华大学实验动物中心（简称“中心”）坐落在北京海淀区美丽的清华园中，位于校园西北角，毗邻生命科学学院、医学院和药学院。中心始建于2008年，于2009年9月正式投入运行，是清华大学“十一五”期间重点建设的校级科研条件支撑平台之一，同时也是清华大学-北京大学生命科学联合中心和国家蛋白质科学研究（北京）设施（清华基地）的重要科研条件支撑平台之一。



中心在学校实验室管理处的领导下，依托生命科学学院进行建设和运行。经过十几年的建设发展，目前中心设施总建筑面积约7 800 m²，包括一期和二期两个综合性实验动物研究设施。一期设施位于学校西北门内西侧，由教学楼改建而成，建筑面积约2 900 m²，于2009年9月启用，并于2021年6月重新改造后再次投入运行。二期设施位于生物医学馆地下二层U4区，于2019年12月正式投入启用，建筑面积约4 900 m²。

中心采用“独立运行、统一管理、资源共享、有偿服务”的运行模式，致力于为校内外用户提供7 d×24 h全方位、高质量的开放服务，为助力科研和教学，支撑创新发展提供重要保障。中心连续多年获得北京实验动物行业协会先进集体称号，并立足北京，辐射全国，为国内众多相关单位提供人员培训、参观调研和技术咨询等服务。

1 设施硬件条件

中心一期动物设施配置约8 262个小鼠独立通风笼具（individual ventilated cages, IVC）笼位、576个大鼠IVC笼位、1 620个动物生物安全二级（animal biosafety level-2, ABSL-2）小鼠IVC笼位，以及150个普通级兔和雪貂笼位。



中心二期动物设施包括南北两个屏障环境设施和一个中央洗消区，采用集中送排风系统，配置41 200个小鼠IVC笼位，并全部配置了进口自动饮水设备。

洗消区装备有2套进口隧道式笼盒自动清洗、脏垫料收集和新垫料填充系统，1台步入式自动清洗机，6台3 m³高温高压灭菌柜，2台大型过氧化氢蒸汽灭菌传递舱，以及工业洗衣机和烘干机等先进设备。

中心拥有983台/套先进专业仪器设备，包括徕卡全套病理组织制片及图像采集系统、显微注射系统、X-线辐射仪、Micro-CT/Spectrum 3D影像系统、TSE小动物能量代谢测试分析系统、EchoMRI小动物活体脂成分分析仪等，资产总值约1.5亿元。同时拥有小动物感知觉、运动功能、情绪、社交、节律、学习认知功能等20多种行为学表型测试设备和多种模式分析软件，为免疫学、发育生物学、肿瘤生物学、能量代谢、神经科学等生物医药学科及相关领域的科研提供重要支撑。

2 质量控制体系

中心于2014年和2017年连续两次通过了国际实验动物评估和认可委员会（Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care, AAALAC）认证，2022年通过了中国合格评定国家认可委员会（China

National Accreditation Service for Conformity Assessment, CNAS) 实验动物机构认可, 在实验动物质量控制、福利伦理管理和生物安全体系建设方面得到了快速提升。

中心成立伊始即建立了实验动物使用与管理委员会, 负责审核实验动物从业人员的资格, 审批实验动物使用申请, 审查实验动物福利伦理, 以确保其符合国家法律法规和标准的要求, 同时也符合国际惯例。

中心建立并逐步完善实验动物质量控制体系, 涵盖动物防疫检疫、健康状况监测、动物健康护理、污染动物隔离净化、屏障环境监测、饲料垫料卫生检测、动物遗传质量检测等方面, 全力保障实验动物和动物实验的质量及生物安全。此外, 中心还重视对动物及物料供应商产品的质量评估, 定期对实验动物、饲料、垫料、个人防护用品及消毒产品等供应商的产品质量进行全面考察评估, 并不定期进行产品质量第三方抽检。同时, 通过全面了解、评估供应商的产品质量控制体系、售后服务保障条款以及用户体验反馈等各个方面, 确保实验动物的质量和福利得到充分保障。

3 服务保障与技术支撑

中心下设实验动物饲养、设施运行与维护、生物净化与转基因、小鼠代管和表型分析, 以及实验动物福利与质量保障共5个平台, 提供实验动物饲养、兽医护理、动物质量控制、生物净化、基因工程小鼠制作、辅助生殖、冷冻保种、小鼠代管繁育、表型分析、模型制作、技术培训等实验动物全生命周期/体系的一系列服务保障和技术支撑。

中心免费提供实验动物精子和胚胎液氮贮存服务, 现存放2394个品种品系的小鼠冻存精子, 299个品种品系的小鼠胚胎, 已逐步发展成一个小型的、条件共享的基因工程小鼠资源库, 更方便地满足科研需求。

利用自主研发的“MyMice”小鼠管理软件, 中心代管技术员可实现与用户远程交互, 为基因工程小鼠提供包括配置繁殖笼、剪尾、编号、基因型鉴定、分笼、安乐死、采血等技术服务, 这极大地提高了小鼠实验管理效率, 并进一步实现了动物质量的有效控制。



4 人员配置与管理

中心现有工作人员89名, 其中具有大专及以上学历者49名, 占比44%; 拥有硕士、博士学位的核心技术人员19名, 占比21%。另外, 动物设施日常运行维护委托专业公司管理, 驻场人员配置14名。

中心对技术人员进行平台主管、组长、组员的分级管理, 定期考核评聘, 在技术职务评审与内部职级评定、薪酬和休假等方面, 打破了唯学历和职称的用人理念, 构建了全面公正、公开、透明的用人机制, 率先实现事业编制与非事业编制人员趋同管理。通过加强继续教育与培训, 使技术人员及时学习新知识、掌握新技能, 不断提高设备利用效率, 实现个人职业发展与平台技术服务能力同步提升。

经过十几年的发展, 中心已经在设施规模、管理模式、技术服务体系等多个方面处于行业领先水平, 为支撑高质量科研创新以及建设世界一流大学提供助力。

清华大学实验动物中心网址: <http://www.larc.tsinghua.edu.cn>。



图文: 刘苗苗、谢忠忱、唐倩倩、李志萍、张静
审核: 常在

华南农业大学实验动物中心/实验动物研究团队

1 中心介绍

华南农业大学实验动物中心于2013年10月由华南农业大学（是国家“双一流”建设高校）批准成立。本中心拥有建设面积逾6 000 m²的实验动物大楼，目前是华南地区农业院校中规模最大的实验动物公共服务平台，功能涵盖了动物饲养、实验、模型建立（包括感染模型）和药物研究等方面，同时也是承担国家重大项目和国际合作项目的重要服务支撑体系和教学科研基地。本中心不仅能为华南农业大学的兽医学院、食品学院、动物科学学院、生命科学学院、资源环境学院等提供公共实验技术服务，还可提供国内外实验动物检测和动物实验委托等服务。



实验动物中心设置有屏障环境动物室、普通环境动物室、无菌动物平台、二级负压实验室、实验动物检测实验室、实验动物学教研室、综合办公室等部门。本中心工作人员共有11名，其中：高级职称3人，中级职称2人；博士研究生学历3人，硕士研究生学历5人。此外，本中心主持并承担省部级以上项目10余项，获广东省科技进步一等奖（排前三）1项，发表论文100余篇。随着中心的发展，未来人员队伍还将不断壮大。

2 主要研究方向及团队介绍

华南农业大学实验动物研究团队的主要研究方向包括：（1）实验动物疾病模型研制；（2）基因突变灵长类动物研究与应用；（3）实验动物传染病研究；（4）实验动物重金属代谢及中毒机制研究等。研究团队成员由20余人组成（含本中心以外人员），其中：高级职称5人，中级职称2人；博士研究生学历5人，硕士研究生学历6人。团队承担国家自然科学基金面上项目、国家重点研发计划项目子课题、广东省自然科学基金等省部级以上项目20余项；获广东省科技进步一等奖3项，广东省科技进步二等奖1项，全国农牧渔业丰收奖一等奖1项，大北农科技奖一等奖1项，广东省农业技术推广奖一等奖2项，教育部科技进步二等奖1项；出版专著10余部，发表论文150余篇，获授权发明专利7项。

实验动物疾病模型研究团队负责人为刘忠华教授，硕士生导师，从事实验动物专业工作近30年，兼任广东省实验动物学会副理事长、广东省动物学会理事、中国合格评定国家认可委员会（China National Accreditation Service for Conformity Assessment, CNAS）动植物检疫专业委员会委员、CNAS主任评审员，长期从事正压屏障动物实验设施和负压生物安全设施的运行管理工作，并长期开展实验动物质量检测和研究工作，带领团队成功建立了小鼠冠状病毒感染模型、兔出血症病毒模型、禽流感病毒的哺乳动物疾病模型，同时还研制出大鼠出血热病毒单克隆抗体免疫和PCR检测试剂盒、小鼠肝炎病毒PCR检测试剂盒、猴B病毒和犬细小病毒PCR检测试剂盒。2011年“禽流感动物模型、免疫机理及疫苗研制与推广应用”成果获广东省科技进步一等奖（评分均前三）；2000年“实验动物的监测系统建设和质量检验”获广东省科技进步二等奖，“海上油田开采排放物的生物毒性评价和标准制定”获广东省科技进步二等奖。参与出版《实验动物学》《实验动物从业人员培训教程》等著作4部，发表论文60余篇。

基因突变灵长类动物研究与应用团队负责人为杨世华教授，博士生导师，是广东省本土创新创业团队负责人，入选国家高层次特殊支持计划创新领军人才、国家百千万人才工程暨授予“有突出贡献中青年专家”、国务院特殊津贴专家、教育部新世纪优秀人才及广东省省级千百十人才培养对象等，2007年报道中国首例试管猕猴，培育出5种基因突变食蟹猴（*SHANK3*、*HBB*、*MCPH1*、*p53*基因敲除及*FAH*点突变）并建立了相关疾病模型，完成微小RNA治疗老年猕猴骨量丢失实验，相关成果发表在*Nature*、*Cell Research*、*Nature Communications*、*PNAS*等SCI期刊，并获授权中国发明专利7项。目前主要研制和研究单基因突变糖尿病、珠蛋白基因突变地中海贫血、单基因突视觉网膜疾病及基因突变引起免疫相关疾病的食蟹猴疾病模型。

实验动物传染病方向负责人为贾伟新教授，博士生导师，担任广东省人兽共患病防控制剂国家与地方联合工程实验室主任、华南农业大学动物生物安全三级实验室副主任，兼任全国重大动物疫病分区防控指导组专家、全国动物病原微生物（毒）种保藏管理专家委员会委员、农业农村部动物病原微生物实验室生物安全评审专家委员会委员、CNAS技术评审员、广东省实验动物学会理事、《养禽与禽病防治》杂志编委，主要从事“禽病学”“兽医传染病学”“兽医流行病学”等课程教学，以及禽流感等畜禽重大疫病的流行病学和防控技术研究工作。

3 设施设备及资质

华南农业大学实验动物中心在学校领导的支持及全体教职员工的努力下，于2014年3月首次通过广东省科技厅组织的实验动物许可证现场评审（屏障环境和普通环境），获得实验动物使用许可证 [SYXK（粤）2014-0136]；2019年3月通过换证评审；2022年1月通过现场评审，获得实验动物使用许可证 [SYXK（粤）2022-0136] 和实验动物生产许可证 [SCXK（粤）2022-0048]；2024年3月通过现场



评审，获得实验动物使用许可证[SYXK(粤)2024-0136]和实验动物生产许可证[SCXK(粤)2024-0048]。同时，中心通过了广州市动物生物安全二级实验室（animal biosafety level-2 laboratory, ABSL-2）实验室备案，实验动物质量和环境检测项目通过了国家CNAS实验室认可。



屏障环境实验设施能同时容纳2万余只大鼠、小鼠、SPF鸡进行实验，配备30余套独立通风笼具（IVC）系统、10余台高压灭菌器和隔离器等设备；普通环境实验设施能同时开展犬、小型猪、猴、兔、豚鼠、番鸭、猫等动物实验；无菌动物平台可以开展无菌小鼠实验。华南农业大学实验动物中心是承担国家重大项目和国际合作项目的重要服务支撑体系和教学科研基地，每年支撑校内外100多个项目的立项和动物实验的开展工作。华南农业大学动物疾病检测诊断中心具有完整的CNAS管理体系，也配备了荧光定量PCR仪、酶标仪、核酸提取仪、生物安全柜等仪器设备80余台/套，能接受校内外实验动物质量和环境项目的委托检测，是保障本校实验动物质量的重要平台。

图文：余文兰
审核：刘忠华

《实验动物与比较医学》创刊于1981年，是我国实验动物科学领域内第一本专业性学术刊物，主要报道实验动物与比较医学方面的最新研究成果、实验方法和技术。为加强产学研合作，以期刊为媒介凝聚行业力量，促进国内实验动物和比较医学领域有关科研单位及技术企业的横向交流和科技创新，自2006年起成立《实验动物与比较医学》刊务理事会。

2024年《实验动物与比较医学》刊务理事会理事长由《实验动物与比较医学》编辑部法人代表担任，秘书长由《实验动物与比较医学》编辑部负责人担任。秘书长在理事会领导下负责日常工作。秘书处设在《实验动物与比较医学》编辑部。本会以自愿参加为原则，随时接纳新的申请单位，欢迎全国各地企事业单位加盟，共谋实验动物与比较医学行业大发展。

《实验动物与比较医学》2024年刊务理事会名单

理 事 长

范 春 主任 上海实验动物研究中心

副理事长

赵 勇 副部长 上海实验动物研究中心科研管理部
周正宇 主任 苏州大学苏州医学院实验动物中心
夏长友 主任 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所
王靖宇 主任 大连医科大学实验动物中心
袁 进 副主任 南方医科大学实验动物管理中心
丁玉强 主任 复旦大学实验动物科学部
倪黎明 董事长 鑫博海生物医疗科技有限公司

理 事

李 焱 主任 上海交通大学医学院实验动物科学部
王德军 主任 浙江中医药大学动物实验研究中心
王 刚 主任 广东省医学实验动物中心
李 娜 高级工程师 中国科学院上海药物研究所实验动物室
刘恩岐 主任 西安交通大学实验动物中心
刘忠华 主任 华南农业大学实验动物中心
应华忠 主任 浙江省实验动物中心
顾美儿 主任 杭州师范大学实验动物中心
张 泉 主任 扬州大学比较医学中心
王可洲 常务副主任 山东省实验动物中心
施 恩 总经理 上海斯莱克实验动物有限责任公司
汪亚兵 总经理 上海开纯洁净室技术工程有限公司
吴 强 总经理 江苏苏净集团苏州苏净节能科技有限公司
吴征宏 总经理 安维迪生命科学(浙江)有限公司
卢晨焱 副总经理 泰尼百斯实验室设备贸易(上海)有限公司
崔锦鹏 总经理 上海元上生物医学科技有限公司
刘建中 总经理 上海业腾洁净技术有限公司
张亚兵 总经理 上海韵嘉赛生物科技有限公司
潘 慧 华东销售经理 厦门抱壹智能科技有限公司

秘 书 长

张俊彦 副编审 《实验动物与比较医学》编辑部

《实验动物与比较医学》第4届(2021—2023年)优秀论文获奖名单

<p>病原微生物防控在实验动物设施管理与生物安全控制中的作用探讨 罗银珠, 闵凡贵, 王静, 何丽芳, 潘金春 (广东省实验动物监测所, 广东省实验动物重点实验室)</p>	2021(5)	
<p>基于互联网交互平台三明治教学法在医学实验动物学教学中的应用 魏盛, 耿希文, 徐凯勇, 胡明会, 周苗苗, 李自发 (山东中医药大学实验中心)</p>	2021(3)	
<p>竹节香附素 A 对肝缺血再灌注大鼠的保护作用机制 李洪波, 黄锐, 代将, 钟振东 (四川省广汉市人民医院外二科; 四川省医学科学院·四川省人民医院肝胆外科; 四川省医学科学院·四川省人民医院急救中心; 四川省医学科学院·四川省人民医院动物研究中心)</p>	2021(1)	
<p>多囊卵巢综合征-胰岛抵抗大鼠子宫组织中PPARs 异常表达与胰岛素抵抗的关系 魏巍, 陈艺华, 张秀智, 冷义福, 李纯, 尹天晓 (大连大学附属中山医院生殖医学中心; 大连大学)</p>	2021(5)	
<p>可视化核酸检测技术 RPA-LFD 的研究和应用进展 于灵芝, 陶凌云, 魏晓锋 (上海实验动物研究中心)</p>	2021(6)	
<p>缺血性脑卒中动物模型的研究进展 董波, 刘嘉欣, 熊伟, 唐宋琪, 黄巍 (成都中医药大学基础医学院; 成都岐黄博恩生物科技有限公司)</p>	2022(1)	
<p>脓毒症动物模型的制备方法及其影响因素 李潇, 颜海鹏, 肖政辉 (南华大学儿科学院, 湖南省儿童医院重症医学科)</p>	2022(3)	
<p>利格列汀对 2 型糖尿病大鼠肾组织纤维化过程中骨膜蛋白及转化生长因子-β1 的影响 弓慧杰, 张光明 (四川省成都市新都区人民医院内分泌肾病血液内科; 西南医科大学病理生理研究室)</p>	2022(2)	
<p>阿尔茨海默病动物模型的研究进展 盛哲津, 李利妹 (同济大学生命科学与技术学院; 同济大学附属东方医院医学转化平台)</p>	2022(4)	
<p>环境丰富对英国短毛猫应激相关指标的改善作用 陈鸿婷, 杨斐, 胡樱 (复旦大学实验动物科学部; 复旦大学基础医学院)</p>	2022(4)	
<p>高脂血症动物模型肾功能损伤机制及干预研究进展 周晓丽, 张倩, 钱智勇 (天津市疾病预防控制中心毒理科)</p>	2022(3)	
<p>光化学法与线栓法制作局灶性脑梗死大鼠模型比较研究 姜惠娟, 张红石, 王宇峰, 贾萌, 丛德毓 (长春中医药大学针灸推拿学院; 长春中医药大学护理学院; 长春中医药大学附属医院推拿科; 长春新兴产业光电技术有限公司)</p>	2022(1)	
<p>利用 CRISPR/Cas9 技术构建脂多糖结合蛋白基因敲除小鼠 李思迪, 付彬, 郭中坤, 林颖杰, 张振宇, 米传靓, 王可洲 (山东第一医科大学(山东省医学科学院)实验动物学院(省实验动物中心); 山东第一医科大学附属皮肤病医院(山东省皮肤病医院), 山东省皮肤病性病防治研究所)</p>	2022(4)	
<p>SPF 级雄性 SD 大鼠回肠与结肠菌群结构比较分析 许琴, 倪艳, 是文辉, 李建瑛, 刘江伟, 赵红琼, 徐新明 (新疆军区总医院, 新疆特殊环境医学重点实验室; 新疆农业大学动物医学学院; 新疆畜牧科学院生物技术研究所)</p>	2023(1)	
<p>SHJH^{hr} 小鼠部分生物学特性及衰老表型的测定与分析 唐慧青, 常书福, 于志锋, 张雷, 谈小倩, 瞿伟, 李亮, 钱珍, 顾坚忠, 徐平 (上海吉辉实验动物饲养有限公司; 复旦大学附属中山医院; 上海市骨科内植物重点实验室, 上海交通大学医学院附属第九人民医院)</p>	2023(1)	
<p>基于江苏省实验动物行政许可现状的安全管理对策 漆重阳, 陈林, 艾曼, 徐航, 张厚森 (江苏省生产力促进中心)</p>	2023(1)	
<p>动物衰老模型的研究进展 尹丹阳, 胡怡, 史仍飞 (上海体育学院运动健康学院)</p>	2023(2)	
<p>精神分裂症动物模型的研究概述 胡玲, 胡志斌, 胡筠卿, 丁玉强 (复旦大学实验动物科学部; 复旦大学脑科学研究院)</p>	2023(2)	
<p>一种显著提高实验用斑马鱼繁殖效率和使用寿命的优化养殖方案 金仕容, 华叶, 訾化星, 杜旭飞, 卜纪雯 [中国科学院脑科学与智能技术卓越创新中心(原中国科学院上海生命科学院神经科学研究所), 全脑介观神经联接图谱研究平台(斑马鱼); 中国科学院脑科学与智能技术卓越创新中心(原中国科学院上海生命科学院神经科学研究所), 感觉整合与行为研究组]</p>	2023(3)	
<p>猪血型 PCR 鉴定方法的建立 王娇祥, 王艳, 胡珂, 徐凯祥, 魏太云, 角德灵, 赵恒, 赵红业, 魏红江 (云南省小型猪基因编辑与异种器官移植重点实验室; 云南省异种器官移植工程研究中心; 云南农业大学动物科学技术学院; 云南农业大学动物医学院)</p>	2023(6)	