

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6期(总第208期)(卷终) 2024年12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:国内公开发行业

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

非哺乳期乳腺炎大鼠模型的建立及评价

殷玉莲,马丽娜,屠思远,陈玲,叶媚娜,陈红凤..... 587

手术诱导大鼠中重度膝骨关节炎模型的建立与评价

孙效容,苏丹,贵文娟,陈玥..... 597

应用Triacsin C构建新型高血糖肥胖小鼠心功能减退模型

赵小娜,王鹏,叶茂青,曲新凯..... 605

基于Duchenne型肌营养不良症动物模型的核酸药物与基因治疗研究进展

刘思雨,赖跃昭,郭文婷,陈学进..... 613

大气细颗粒物PM_{2.5}暴露动物模型建立方法及在生殖毒性研究中的应用进展

田芳,潘滨,史佳怡,徐燕意,李卫华..... 626

脓毒症相关脏器损伤动物模型研究进展

杨家豪,丁纯蕾,钱风华,孙旗,姜旭升,陈雯,沈梦雯..... 636

各地实验动物科学发展

风雨五十载,奋斗半世纪——记苏州市实验动物产业发展五十年

赵丽娟,肖春兰,盛雅洁,鲁希,周正宇..... 645

实验动物质量控制

2017—2023年四川省实验动物寄生虫和微生物质量抽检报告分析

刘丽达,陈兵,谢娜,刘丽,庄思琪,邹奔星..... 654

猫冠状病毒基因特点分析及其研究进展

陶凌云..... 661

教学培训实践

实验猪在达芬奇手术机器人培训中的应用进展及挑战

刘意抒,蔡丽萍..... 667

动物实验技术与方法

6种复合固定液对金黄仓鼠视网膜组织固定效果的比较

吴海凤,周小江,李晨江,李怀银,高明..... 675

全过程动物实验伦理审查软件的设计与实现

徐骁,吴杰敏,梁翼,叶明霞,周顺长..... 682

病例报告

一例干扰素受体缺失小鼠自发未成熟型睾丸畸胎瘤诊断

赵赫, 张帆, 肖宇宙, 安学芳, 张涛, 李丽..... 691

一例新西兰白兔系统性淀粉样变性病理学诊断

林晴晴, 戴锦龙, 陈志森, 郭健敏, 杨威..... 695

科普讲坛

殊途同归的免疫缺陷小鼠培育史

孙强..... 700

读者-作者-编者

《实验动物与比较医学》第七届编辑委员会..... 前插8

本刊被数据库收录情况..... 英文目次第2页

《实验动物与比较医学》2025年征订启事..... 612

《实验动物与比较医学》有关实验动物福利伦理内容的说明..... 653

《实验动物与比较医学》出版伦理声明..... 660

《实验动物与比较医学》2024年审稿专家致谢名单..... 674

《实验动物与比较医学》2024年支持单位致谢名单..... 690

《实验动物与比较医学》2025年专题征稿启事..... 704

《实验动物与比较医学》2024年第44卷总目次..... 附1

《实验动物与比较医学》2024年刊务理事会名单..... 附2

《实验动物与比较医学》-中国科技核心期刊收录证书(2024年)..... 后插1

广告..... 封二, 前插1~7, 后插2~7, 封三, 封底

期刊基本参数: CN 31-1954/Q*1981*b* 大 16*118*zh*P*¥30.00*2000*15*2024-12

(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 应华忠

本期审稿专家 包晶晶 陈方明 杜小燕 付瑞 傅江南 富群华 高巍 官建中

郭连香 郭喻 韩新巍 何国栋 何远清 黄冰 季樱红 江振洲

李善刚 李顺 李垚 刘恩岐 施爱民 史晓光 宋国华 谭娟

谭毅 汤静 王朝霞 王春霞 王德军 王健 吴宝金 吴剑

徐平 许彤辉 薛整风 闫明霞 杨利峰 姚明 应华忠 于志锋

张董晓 张海丛 张周

本期责任编辑 张俊彦 丁宇菁

本期责任排版 王伟民

本期特邀编校 富群华 陶启辰 刘晓宇 吴凌波

本期实习编校 翟玉凤 干明红 洪怡 娄怡欣 吴昊晟 张萍 周晓铤 陆佳雯

李文杰

LABORATORY ANIMAL AND COMPARATIVE MEDICINE

Bimonthly

Established in September, 1981 Volume 44, Issue 6

December 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, YING Huazhong

CONTENTS IN BRIEF

Animal Models of Human Diseases

Establishment and Evaluation of a Rat Model for Non-Puerperal Mastitis
YIN Yulian, MA Lina, TU Siyuan, CHEN Ling, YE Meina, CHEN Hongfeng
..... 587

Establishment and Evaluation of a Moderate-to-Severe Knee Osteoarthritis
Model in Rats Induced by Surgery
SUN Xiaorong, SU Dan, GUI Wenjuan, CHEN Yue 597

Establishment of a New Hyperglycemic Obesity Cardiac Dysfunction
Mouse Model with Triacsin C
ZHAO Xiaona, WANG Peng, YE Maoqing, QU Xinkai 605

Advances in Nucleic Acid Drugs and Gene Therapies based on Animal
Models of Duchenne Muscular Dystrophy
LIU Siyu, LAI Yuezhaohao, GUO Wenting, CHEN Xuejin 613

Advances in Development of PM_{2.5}-Exposed Animal Models and Their
Application in Reproductive Toxicity Research
TIAN Fang, PAN Bin, SHI Jiayi, XU Yanyi, LI Weihua 626

Research Progress on Animal Models of Sepsis-Related Organ Injury
*YANG Jiahao, DING Chunlei, QIAN Fenghua, SUN Qi, JIANG Xusheng,
CHEN Wen, SHEN Mengwen* 636

Development of Laboratory Animal Science Across China

Challenges and Development in Suzhou Laboratory Animal Industry
Over the Past Five Decades
ZHAO Lijuan, XIAO Chunlan, SHENG Yajie, LU Xi, ZHOU Zhengyu
..... 645

Quality Control of Laboratory Animals

Survey Report Analysis on Parasitic and Microbial Quality of Laboratory
Animals in Sichuan Province, 2017-2023
LIU Lida, CHEN Bing, XIE Na, LIU Li, ZHUANG Siqi, ZOU Yixing ... 654

Genetic Characteristics and Research Progress of Feline Coronavirus
TAO Lingyun 661

Educational and Teaching Practice

Advances and Challenges of Using Experimental Pigs in Da Vinci Surgical
Robot Training
LIU Yishu, CAI Liping 667

Animal Experimental Techniques and Methods

Comparison of the Fixation Effects of Six Composite Fixatives on Retinal Tissue of Golden Hamsters <i>WU Haifeng, ZHOU Xiaojiang, LI Chenjiang, LI Huaiyin, GAO Ming</i>	675
Design and Implementation of a Software System for Full-Process Animal Experiment Ethical Review <i>XU Xiao, WU Jiemin, LIANG Yi, YE Mingxia, ZHOU Shunchang</i>	682

Case Reports

Preliminary Diagnosis and Characterization of a Spontaneous Immature Testicular Teratoma in an Interferon Receptor-Deficient Mouse <i>ZHAO He, ZHANG Fan, XIAO Yuzhou, AN Xuefang, ZHANG Tao, LI Li</i>	691
Pathological Diagnosis of Systemic Amyloidosis in a New Zealand White Rabbit <i>LIN Qingqing, DAI Jinlong, CHEN Zhisen, GUO Jianmin, YANG Wei</i>	695

本刊被数据库收录情况:

中国科技论文与引文数据库(CSTPCD,即中国科技核心期刊目录)

中国医药卫生“核心期刊”目录

中国核心期刊数据库

中国科技期刊数据库

中国生物医学文献数据库

中国期刊全文数据库

中国学术期刊综合评价数据库(CAJCED)统计源期刊

中国超星期刊域出版平台

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

美国《化学文摘》(Chemical Abstracts)

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

美国史蒂芬斯数据库(EBSCOhost)

国际农业与生物科学研究中心文摘(CAB Abstracts)

全球健康数据库(Global Health)

哥白尼期刊数据库(ICI World of Journals)

哥白尼精选期刊数据库(ICI Master List)

瑞典开放获取期刊目录(DOAJ)

WHO 西太平洋地区医学索引(WPRIM)



陈红凤, 主任医师, 二级教授, 医学博士, 博士生导师, 海派顾氏外科第五代传承人, 师从中医外科名家陆德铭教授。现为全国先进工作者、上海市名中医、第七批全国老中医药专家学术经验继承工作指导老师、全国优秀中医临床人才、国家中医药管理局重点学科中医乳腺病学学科带头人、上海中医药大学中医外科学学术带头人。主攻中医药防治非哺乳期乳腺炎、转移性乳腺癌、乳腺增生等病的临床和实验研究, 主持国家级和省部级科研项目20余项, 成果获教育部科技进步二等奖、中华中医药学会科学技术奖一等奖等。主编全国高等中医院校规划教材《中医外科学》《中医外科学临床研究》《实用中医乳房病学》等专著30余部。发表论文近百篇, 其中SCI收录20余篇。现任上海市中医药学会乳腺病分会主任委员、中华中医药学会乳腺病分会副主任委员、中国中医药研究促进会乳腺病专业委员会副主任委员、上海市中西医结合学会乳腺病专委会顾问等。



殷玉莲, 副主任医师, 医学博士, 硕士生导师, 海派顾氏外科第六代传承人, 师从上海市名中医陈红凤教授, 上海市卫生健康系统“陈红凤名中医劳模创新工作室”骨干成员。近5年发表论文33篇, 其中英文8篇; 授权国家发明专利1项、实用新型专利5项, 软件著作权2项; 先后入选上海市“医苑新星”青年医学人才培养计划、上海市科委“扬帆计划”, 主持并参与国家自然科学基金青年项目、上海卫健委临床专项、上海市中医药发展三年行动计划等多项课题。主要研究方向为中医药防治乳腺炎症性疾病、乳腺癌及其共病(心脏、骨、脑)的临床和基础研究。现担任上海市中医药学会中医乳腺病分会青年委员会副主任委员、中华中医药学会精准医学分会青年委员等。

非哺乳期乳腺炎大鼠模型的建立及评价

殷玉莲, 马丽娜, 屠思远, 陈玲, 叶媚娜, 陈红凤

(上海中医药大学附属龙华医院, 上海 200032)

【摘要】目的 通过模拟高催乳素血症及免疫炎症状态, 建立非哺乳期乳腺炎(non-puerperal mastitis, NPM)大鼠模型, 评价其乳腺局部炎症特征, 为乳腺疑难疾病的诊疗研究提供依据。**方法** 选用SPF级Wistar雌性大鼠12只, 均分为对照组和模型组。实验期间, 对照组未接受任何实验性操作和药物处理; 模型组连续7d每日皮下注射1次盐酸甲氧氯普胺注射液100 mg/kg, 在注射首日后第10、20、30天分别采用ELISA法检测血清催乳素水平。注射7d后, 将200 μ L哺乳期SD母鼠乳汁混合200 μ L完全弗氏佐剂制备为油包水乳剂, 多点皮下注射至模型组大鼠背部进行首次免疫。首次免疫7d后, 再将油包水乳剂经多点皮下注射至大鼠第3、4、5对乳房进行末次免疫。末次免疫后连续观察乳房外观28d, 计算乳腺结节大小; 并于第3、7、14、28天, 通过HE染色分析乳腺组织形态学, 免疫组织化学法检测CD138表达水平, ELISA法测定乳腺组织中白细胞介素(interleukin, IL)-6、IL-1 β 、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)- α 和诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)含量, 以综合评价造模情况。**结果** 模型组大鼠可见乳腺皮肤破溃, 并于破溃处闻及恶臭味, 触诊及超声下可见乳腺结节形成。HE染色显示, 末次免疫后第3天大鼠乳腺组织中正常导管及小叶结构消失, 并见大量浆细胞浸润; 第7天可见乳腺导管扩张, 导管上皮坏死脱落, 管周浆细胞、淋巴细胞(以T淋巴细胞为主)浸润明显; 第14天时可见大量纤维脂肪组织、小血管及肉芽组织增生, 间质内可见散在浆细胞; 第28天时炎症细胞浸润、纤维组织增生现象减轻, 肉芽肿形成。大鼠在造模成功后第10天、第20天催乳素水平逐渐升高($P < 0.05$, $P < 0.001$); 模型组大鼠在末次免疫后第3、7、14、28天时, 乳腺组织中IL-6和TNF- α 含量均较对照组升高($P < 0.05$); IL-1 β 含量在末次免疫后第3、7、14天时较对照组升高($P < 0.01$), 第28天时略低于对照组($P > 0.05$); iNOS在末次免疫后第7天显著高于对照组($P < 0.001$)。**结论** 成功构建大鼠NPM模型, 其乳房局部具有肿块、脓肿、溃疡等表现以及乳

【基金项目】 国家自然科学基金青年项目“从促进巨噬源性泡沫细胞胆固醇跨膜转运探讨九一丹祛腐生肌的作用机制研究”(82104854); 上海申康医院发展中心第二轮促进市级医院临床技能与临床创新三年行动计划(2020—2022年)重大临床研究项目“顾氏特色化腐清创法治疗难愈性非哺乳期乳腺炎的多中心临床研究”(SHDC2020CR2051B)

【第一作者】 殷玉莲(1990—), 女, 博士, 副主任医师, 研究方向: 乳腺良恶性疾病的临床及基础研究。E-mail: killua018yyl@163.com

【通信作者】 陈红凤(1964—), 女, 博士, 主任医师, 上海市名中医, 研究方向: 乳腺良恶性疾病的临床及实验研究。E-mail: chhfluk2068@163.com。ORCID: 0000-0001-6311-0651

腺导管扩张和浆细胞浸润的典型病理特征, 可为该临床疑难疾病的诊疗研究奠定基础。

[关键词] 非哺乳期乳腺炎; Wistar大鼠; 催乳素; 免疫炎症

[中图分类号] S857.26; Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2024)06-0587-10



Establishment and Evaluation of a Rat Model of Non-Puerperal Mastitis

YIN Yulian, MA Lina, TU Siyuan, CHEN Ling, YE Meina, CHEN Hongfeng

(Longhua Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China)

Correspondence to: CHEN Hongfeng (ORCID:0000-0001-6311-0651), E-mail: chhfluk2068@163.com

[ABSTRACT] **Objective** This study aims to establish a non-puerperal mastitis (NPM) rat model by simulating hyperprolactinemia and immune-inflammatory states, and to evaluate its local inflammatory characteristics in the mammary gland, thereby laying the foundation for research on the diagnosis and treatment of this clinically challenging disease. **Methods** Twelve SPF-grade Wistar female rats were evenly divided into a control group and a model group. During the experiment, the control group received no experimental treatment or medication. The model group received daily subcutaneous injections of 100 mg/kg metoclopramide hydrochloride for 7 consecutive days. Serum prolactin (PRL) levels were measured using ELISA on the 10th, 20th, and 30th days after the first injection. After 7 days of injections, 200 μ L of lactating SD rat milk was mixed with 200 μ L of complete Freund's adjuvant to prepare an oil-in-water emulsion, which was administered by multiple subcutaneous injections into the back of the Wistar rats for the initial immunization. Seven days after the initial immunization, the emulsion was injected subcutaneously into the third, fourth, and fifth mammary glands for the final immunization. After the final immunization, the rats were observed for 28 days for changes in mammary gland appearance, and the size of mammary nodules was calculated. On the 3rd, 7th, 14th, and 28th days, hematoxylin-eosin (HE) staining was used to analyze mammary tissue morphology. Immunohistochemistry was employed to detect CD138 expression levels. ELISA was used to measure the levels of interleukin (IL)-6, IL-1 β , tumor necrosis factor (TNF)- α , and inducible nitric oxide synthase (iNOS) in mammary tissue to comprehensively assess the model. **Results** Rats in the model group exhibited mammary skin ulceration and foul odor at the ulcer sites. Palpation and ultrasound revealed the formation of mammary nodules. HE staining showed that on the 3rd day after the final immunization, normal ductal and lobular structures in the mammary glands disappeared, with significant infiltration of plasma cells. On the 7th day, ductal dilation, epithelial necrosis and detachment, and pronounced periductal plasma cell and lymphocyte (predominantly T-lymphocytes) infiltration were observed. On the 14th day, there was a proliferation of fibrofatty tissue, small blood vessels, and granulation tissue, with scattered plasma cells in the interstitium. By the 28th day, inflammatory cell infiltration and fibrous tissue proliferation were reduced, with granuloma formation. Serum PRL levels in the model group were significantly increased on the 10th day ($P < 0.05$) and the 20th day ($P < 0.001$). IL-6 and TNF- α levels in mammary tissue were higher in the model group compared to the control group on the 3rd, 7th, 14th, and 28th days ($P < 0.05$). IL-1 β levels were higher on the 3rd, 7th, and 14th days compared with the control group ($P < 0.01$) but lower than the control group on the 28th day ($P > 0.05$). iNOS levels were significantly higher on the 7th day after the final immunization ($P < 0.001$). **Conclusion** A successful NPM model was established in rats, which exhibited typical pathological features such as local mammary masses, abscesses, ulcers, ductal dilation and plasma cell infiltration. This model can serve as a foundation for further research into the diagnosis and treatment of this clinically challenging disease.

[Key words] Non-puerperal mastitis; Wistar rats; Prolactin; Immune inflammation

非哺乳期乳腺炎 (non-puerperal mastitis, NPM) 是一种发生在非哺乳期/非妊娠期的乳房炎症, 其病理类型主要包括乳腺导管扩张症/导管周围乳腺炎、肉芽

肿性小叶乳腺炎等^[1]。近年来, NPM的发病率逐渐上升, 且发病年龄段有扩大化趋势, 使NPM成为外科临床中的疑难疾病之一^[2]。目前, NPM的研究主要集中在

在临床观察,发现导管内脂质样物分泌淤积可能是导致炎症的重要原因之一^[3]。而催乳素(prolactin)升高亦受到高度关注,有研究认为其可能导致了乳腺导管内分泌物增加,是一种伴随病变的信号^[4]。尽管如此,NPM的具体病理过程和发病机制仍不明确,目前多数学者认为NPM并非感染性疾病,而是属于免疫炎症范畴^[5]。

现有的NPM动物模型仅能模拟人类疾病的部分临床表现和病理特征,未能较好地展现NPM的全部情况,同时也存在代谢差异、物种间变异等局限性,这些问题影响了模型的稳定性和可靠性。本研究采用高催乳素状态下乳汁混合弗氏佐剂局部注射诱导免疫炎症的方法,构建了一种新的NPM动物模型;并且将乳腺局部表现、病理特征及催乳素等变化纳入模型评估,同时考虑白细胞介素(interleukin, IL)-6、IL-1 β 、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)- α 、诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)等生物标志物在炎症反应和免疫调节中的关键作用^[6],以此优化现有的NPM动物模型,提高其对人类疾病的模拟性和可靠性。

1 材料与方法

1.1 实验动物

用于模型构建的12只SPF级Wistar大鼠[均雌性,8周龄左右,体重为(200 \pm 20)g]以及用于乳汁抗原提取的6只SPF级SD大鼠(2雄4雌,8周龄左右,雄性体重为280和310g,雌性体重为200~250g)均购自斯贝福(北京)生物技术有限公司[SCXK(京)2019-0010]。由于目前NPM发病机制尚不明确,不排除现有监测手段无法检出的特殊病原菌感染,因此,本研究所用动物均采取独立通气笼盒系统进行饲养。饲养环境为屏障系统,相对湿度为40%~70%,室温保持在23~26 $^{\circ}$ C,实验动物均可自由饮水和进食。本研究中实验动物的饲养、操作、观察均于江西中洪博元生物技术有限公司[SYXK(赣)2020-0001]的实验平台进行,实验方案由江西中洪博元生物技术有限公司实验动物伦理委员会批准(LL-202304140005),依照实验动物之3R原则进行,并在动物饲养与实验过程中予以人道关怀。实验时间为2023年4月30日至2023年9月26日。

1.2 主要试剂与仪器

缩宫素注射液购自宁波第二激素厂;盐酸甲氧氯

普胺注射液购自上海麦克林生化科技股份有限公司;弗氏完全佐剂和弗氏不完全佐剂均购自美国Sigma公司;二甲苯、无水乙醇和95%乙醇购自西陇科学股份有限公司;苏木精染色液和山羊抗兔IgG购自北京中杉金桥生物技术有限公司;伊红染色液购自北京索莱宝科技有限公司;苏木精返蓝液购自武汉赛维尔生物科技有限公司;柠檬酸缓冲液购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司;质量分数为5%的胎牛血清BSA购自上海源叶生物技术有限公司;CD138抗体购自英国Abcam公司;DAB显色剂购自江苏康为世纪生物科技股份有限公司;超净高级封片胶购自珠海贝索生物技术有限公司;大鼠催乳素检测用ELISA试剂盒购自深圳子科生物技术有限公司;大鼠IL-6、IL-1 β 、TNF- α 、iNOS检测用ELISA试剂盒均购自江苏酶免实业有限公司。

组织脱水机(型号KD-TS3S1)购自浙江省金华市科迪仪器设备有限公司;石蜡包埋机(型号HistoCore Arcadia)、切片机(型号HistoCore BIOCUT)和摊片机(型号Leica HI1210)购自德国Leica公司;电热恒温鼓风干燥箱(型号HGZF-101-1)购自上海跃进医疗器械有限公司;显微镜(型号BX43)购自日本Olympus公司;全自动酶标仪(型号WD-2012B)购自北京六一生物科技有限公司;小动物超声成像系统(型号VINNO6 LAB)购自飞依诺科技股份有限公司;全自动五分类血液分析仪(型号KT-6610 VET)购自深圳市锦瑞生物科技股份有限公司。

1.3 乳汁抗原提取

将SD大鼠按照2:1雌雄比例合笼(共2笼,每笼2雌1雄),次日清晨通过阴道涂片法进行妊娠判断,确认雌鼠妊娠后及时将雄性大鼠分笼。挑选哺乳期SD母鼠,收集乳汁当天先将母鼠与子代隔离2h左右,保证乳腺腺泡内积攒足够量的乳汁。使用戊巴比妥钠溶液(配制质量浓度为3mg/mL,按10mL/kg的剂量腹腔注射)麻醉母鼠后,腹腔注射4U缩宫素注射液/只,等待2min。选取大鼠第2、3、4对乳头开始收集乳汁。先在乳头周围轻轻按摩并挤压,乳头处即可见乳汁溢出,使用无菌吸头吸取分泌的乳汁转移至无菌冻存管中。取出的乳汁经过紫外线照射(UV-B 0.03 μ W/cm², UB-A 0.026 μ W/cm², 5min)后放-80 $^{\circ}$ C冰箱冻存备用。

1.4 实验分组及建模步骤

12只Wistar雌性大鼠在实验前均经过健康检查并进行编号,通过随机数字表法随机分为空白对照组和模型组,每组6只。模型组大鼠皮下注射盐酸甲氧氯

普胺 (100 mg/kg), 连续 7 d, 每天 1 次, 营造高催乳素血症状态。皮下注射 1 周后进行第一次免疫, 首次免疫后 7 d 进行末次免疫。首次免疫: 采用 200 μ L SD 大鼠乳汁, 混合 200 μ L 完全弗氏佐剂制备为油包水乳剂, 多点皮下注射至模型组大鼠背部。末次免疫: 采用 200 μ L 乳汁, 混合 200 μ L 不完全弗氏佐剂制备为油包水乳剂, 多点皮下注射至模型组大鼠的第 3、4、5 对乳房。对照组大鼠在整个实验期间不接受任何实验性操作和药物处理。

1.5 乳腺结节连续观察及测量

在末次免疫次日开始连续 28 d 观察 2 组 Wistar 大鼠的第 3、4、5 对乳房状态。对照组未观察到结节情况。模型组大鼠每天通过无菌透明敷料盖贴乳房局部, 利用标记笔勾画乳腺结节范围, 然后计算平均结节数量, 并用游标卡尺测量结节长短径。

1.6 乳房超声检查

在末次免疫后第 3、7、14、28 天进行超声检测, 观察各组大鼠的乳房情况。超声参数设置为: 深度 1.5, 动态范围 46%, 频率 23 MHz, 帧率 90.9 Hz, 多普勒 82 dB, M 模式 (DG 46%, DR 108 dB)。超声检查前对大鼠采用异氟烷气体麻醉 (诱导浓度为 2%, 维持浓度为 1.0%) 后固定, 并准备加热垫 (如果触诊发现动物体温太低, 则开启加热垫维持体温), 确保在扫描过程中动物舒适和相对静止。超声扫描时获取实时的超声图像, 并记录或保存关键的图像和视频片段。

1.7 HE 染色和免疫组织化学法检测乳腺组织病理变化

在末次免疫后第 3、7、14 天, 所有 Wistar 大鼠均按照第 3、4、5 对 (左) 顺序各取 1 个乳腺 (不处死动物); 第 28 天取大鼠整个左侧乳腺剩余病变组织, 通过石蜡包埋切片进行 HE 染色观察乳腺病理改变, 并采用免疫组织化学法检测乳腺组织中浆细胞标志 CD138 的表达情况。

HE 染色具体步骤: 使用 4% 多聚甲醛溶液将取材的 Wistar 大鼠乳腺组织进行固定, 常规石蜡包埋, 石蜡切片放入二甲苯 I、II 中各 10 min, 再依次放入梯度乙醇溶液中各 3 min, 纯水冲洗 2 min, 用苏木精染液染色 3 min。流水冲洗后, 用体积分数为 1% 的盐酸乙醇溶液分化, 返蓝液返蓝, 伊红染色 3 min, 切片脱水, 封固, 在显微镜下观察。

免疫组织化学法检测具体步骤: 将取材的 Wistar 大鼠乳腺组织固定后, 进行切片, 烤片、脱蜡、水化,

用柠檬酸缓冲液进行抗原修复。经 5% BSA 抗原封闭后, 分别使用 CD138 抗体 (工作液稀释比例为 1:200) 进行一抗孵育。4 $^{\circ}$ C 过夜后, 加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗 (工作液稀释比例为 1:100) 孵育, 经 DAB 显色, 苏木精对比染色细胞核返蓝, 脱水透明后, 封固, 在显微镜下进行观察。CD138 阳性表达显示为棕黄色, 细胞核染为蓝色; 由病理科医师根据染色强度评估其表达强度: 强阳性表达为 (+++), 阳性表达 (++) , 弱阳性表达 (+)。

1.8 ELISA 检测催乳素及免疫指标

催乳素含量检测: 每组随机抽取 4 只 Wistar 大鼠, 于注射盐酸甲氧氯普胺后第 10、20、30 天通过尾静脉采血至少 1 mL。将收集于血清分离管的全血标本在室温放置 2 h, 然后以 1 000 \times g 离心 20 min, 取上清液用 ELISA 试剂盒检测血清催乳素含量。

免疫指标检测: 在末次免疫后第 3、7、14 天, 所有 Wistar 大鼠均按照第 3、4、5 对顺序各取右侧 1 个乳腺 (不处死动物), 第 28 天取大鼠整个右侧乳腺剩余病变组织, 制成匀浆后使用 ELISA 测定试剂盒检测 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 和 iNOS 含量。具体实验步骤均参照各试剂盒说明书进行, 最后测定 450 nm 波长处各孔的吸光度 ($A_{450\text{nm}}$) 值, 通过绘制标准曲线, 计算出样品的浓度。

1.9 统计学分析

所有实验测得数据均采用 SPSS 21.0 软件进行处理分析, 并用 GraphPad Prism 软件作图。实验结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 两组之间定量数值比较采用独立样本 t 检验和多重 t 检验, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 造模后大鼠状态

本实验全程顺利, 在操作过程中未出现实验动物死亡的情况。实验期间, 2 组大鼠进食、饮水和排泄正常, 均未观察到明显的体重下降或增长、异常粪便和尿液变化。模型组大鼠毛发较凌乱, 部分个体出现弓背表现。

2.2 造模效果

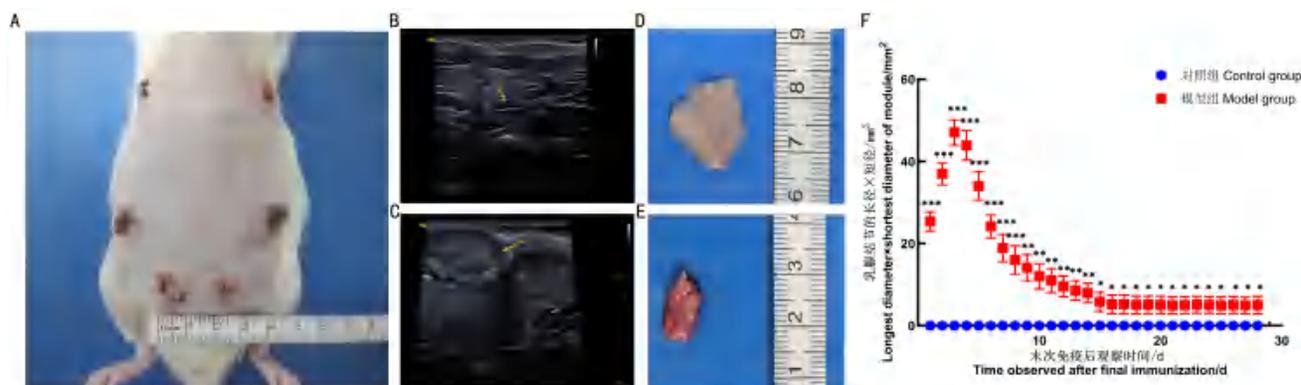
2.2.1 乳腺局部表现

模型组自末次免疫后第 3 天乳腺局部皮肤开始出现破溃 (图 1A), 并可闻及恶臭味; 触诊可及大鼠乳房部数枚结节, 质地中等, 部分边界清晰。末次免疫后第 3 天时, 超声下可见乳腺组织中有多个低回声结节 (图 1B~C), 并取下 2 组大鼠第 3 对 (左侧) 乳腺

组织进行肉眼比较观察, 见图1D~E。

在末次免疫后连续观察28 d, 每天测量记录实验大鼠的乳腺结节长径、短径变化趋势; 结果发现从第1

天至第28天, 2组间比较差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$)。其中模型组的乳腺结节大小(以长径 \times 短径/ mm^2 表示)在第3天达到峰值(图1F)。



注: A为模型组大鼠造模成功后乳腺外观表现, 可观察到多枚结节, 局部红肿, 部分破溃有脓性分泌物附着。B和C为模型组乳腺超声结果, 其中B显示多处扩张的乳腺导管(箭头所示); C显示乳腺组织内炎症性结节(箭头所示)。D为对照组的正常乳腺组织表现。E为模型组病理性乳腺结节表现。F为对照组($n=6$)和模型组($n=6$)在末次免疫后连续观察28 d的乳腺结节大小变化趋势; 与对照组比较, d1~d8, $***P < 0.001$; d9~d14, $**P < 0.01$; d15~d28, $*P < 0.05$ 。

Note: A represents the appearance of the mammary gland in the model group after successful modeling, where multiple nodules are observed, with local redness and swelling, and some ulcerations with purulent discharge. B and C represent the ultrasonography results of the mammary gland in the model group, where B shows multiple dilated mammary ducts (indicated by arrows), and C displays inflammatory nodules within the mammary tissue (indicated by arrows). D represents the normal mammary tissue appearance in the control group. E represents the pathological mammary nodule manifestation in the model group. F represents the trend of changes in the size of mammary nodules over 28 days of observation after the final immunization for both the control group ($n=6$) and model group ($n=6$). Compared with the control group, d1-d8, $***P < 0.001$; d9-d14, $**P < 0.01$; d15-d28, $*P < 0.05$.

图1 对照组和模型组大鼠乳腺局部表现和结节大小变化

Figure 1 Comparison of local mammary changes and nodule size in control and model groups of rats

2.2.2 催乳素水平变化

采用ELISA法检测大鼠血清催乳素含量, 结果发现模型组大鼠注射盐酸甲氧氯普胺后第10、20和30天的催乳素水平均高于对照组, 其中第10天、第20天的两组差异有统计学意义 [(52.42 \pm 3.36) ng/mL vs (47.86 \pm 4.65) ng/mL, $P < 0.05$; (50.87 \pm 1.85) ng/mL vs (45.88 \pm 1.81) ng/mL, $P < 0.001$]; 第30天时两组间差异无统计学意义 [(49.13 \pm 1.84) ng/mL vs (47.84 \pm 1.11) ng/mL, $P=0.079$], 见图2。

2.2.3 免疫学指标变化

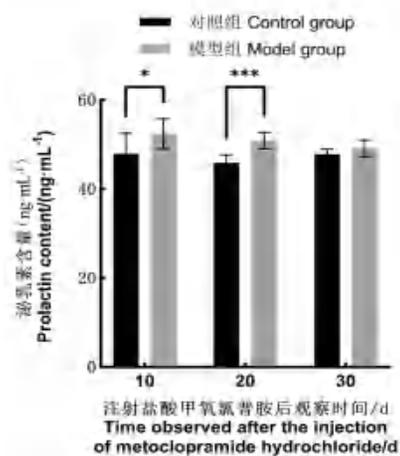
免疫组织化学法检测结果显示, 末次免疫后第3、7、14、28天, 模型组大鼠的乳腺组织中IL-6和TNF- α 水平均显著高于对照组 ($P < 0.05$); 第3、7、14天时, 模型组大鼠的乳腺组织中IL-1 β 水平显著高于对照组 ($P < 0.05$), 至第28天时2组间IL-1 β 水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 模型组在各时间点的iNOS指标虽然均略高于对照组, 但仅在第7天时明显高于对

照组 ($P < 0.001$), 见表1。

2.2.4 乳腺组织病理变化

末次免疫后第3、7、14、28天组织HE染色和浆细胞标志物CD138检测结果如图3所示。在光学显微镜下观察, 模型组末次免疫后第3天乳腺组织正常导管及小叶结构消失, 被大量炎性细胞(以浆细胞为主)取代, 病变周围可见个别小血管; 第7天可见少量萎缩的乳腺终末导管小叶结构, 乳腺间质纤维组织增生, 伴有浆细胞浸润, 局部可见淋巴细胞(以T淋巴细胞为主)聚集; 第14天大量纤维脂肪组织及小血管增生, 并伴有肉芽组织形成, 间质内可见少量浆细胞; 第28天炎性细胞浸润、纤维组织增生现象减轻, 并见上皮样组织细胞聚集, 形成肉芽肿样结构。而在相同时间节点时, 光学显微镜下对照组大鼠的脂肪、血管和乳腺终末导管小叶结构等均正常。

浆细胞CD138的免疫组织化学染色结果显示, 模型组大鼠在末次免疫后第3天时乳腺纤维脂肪组织内



注: ELISA法检测模型组 ($n=4$) 大鼠在注射盐酸甲氧氯普胺后第10天、第20天、第30天的血清催乳素水平。与对照组 ($n=4$) 比较, $^*P < 0.05$, $^{***}P < 0.001$ 。

Note: The prolactin levels were detected by ELISA method on the 10th, 20th, and 30th days after metoclopramide hydrochloride injection in the control group ($n=4$). Compared with the control group ($n=4$), $^*P < 0.05$, $^{***}P < 0.001$.

图2 对照组与模型组大鼠的催乳素含量比较

Figure 2 Comparison of prolactin levels in the two groups measured by ELISA

弥漫浆细胞, CD138强阳性表达 (+++); 第7天时乳腺脂肪组织及终末导管小叶结构见部分浆细胞,

CD138中强阳性表达 (++~+++); 第14天时见乳腺脂肪组织及少量乳腺导管, 个别小导管扩张, 见散在浆细胞, CD138阳性表达 (++); 第28天时乳腺纤维脂肪及血管组织间散在浆细胞, CD138弱阳性表达 (+)。而对照组在光学显微镜下显示个别乳腺腺上皮细胞CD138表达呈弱阳性 (+), 2组间存在显著差异。此外, 模型组大鼠自末次免疫后第14天开始浆细胞标志物表达减少, 与HE染色结果趋势一致。

3 讨论

NPM被认为是一种非感染性的乳房炎症性疾病, 发病后经久难愈, 严重时可使乳房变形, 治疗十分棘手。现阶段NPM的治疗主要以手术和激素为主, 但术后容易复发。部分患者经历了不止1次手术, 甚至有患者因此而全乳切除^[5,7]。激素治疗虽可减轻NPM的临床症状, 但仅短期有效, 长期应用可能引发不良反应, 停药后病情还可能反复。针对NPM的中医药治疗在临床疗效性观察上已取得了一定成果, 但在基础研究上尚有空白亟需填补。因此, 制备合理、稳定的NPM动物模型对深入研究其分子机制、评估治疗手段具有重要意义^[8]。既往其他学者已开展了部分研究, 例如左禧萌等^[9]将人肉芽肿小叶性乳腺炎标本匀浆和

表1 对照组与模型组大鼠在末次免疫后4个观察节点的IL-6、IL-1 β 、TNF- α 和iNOS水平比较

Table 1 Comparison of IL-6, IL-1 β , TNF- α , and iNOS levels between the control group and the model group at four observation time points after the final immunization

时间节点 Time point	组别 Group	IL-6 ρ /(pg·mL ⁻¹)	IL-1 β ρ /(pg·mL ⁻¹)	TNF- α ρ /(pg·mL ⁻¹)	iNOS c /(μ mol·L ⁻¹)
第3天 Day 3	对照组 Control group	65.10 \pm 15.51	34.41 \pm 1.97	235.39 \pm 23.00	8.74 \pm 0.87
	模型组 Model group	91.42 \pm 5.64***	71.45 \pm 25.20**	332.05 \pm 16.48***	9.04 \pm 0.85
第7天 Day 7	对照组 Control group	43.18 \pm 16.58	34.56 \pm 2.18	324.54 \pm 7.83	9.53 \pm 1.87
	模型组 Model group	68.92 \pm 17.70**	52.44 \pm 1.85***	364.07 \pm 27.15**	13.95 \pm 0.92***
第14天 Day 14	对照组 Control group	59.00 \pm 6.71	23.56 \pm 4.10	258.08 \pm 34.30	9.13 \pm 1.67
	模型组 Model group	71.14 \pm 4.95***	43.71 \pm 10.05**	348.70 \pm 36.87**	11.13 \pm 1.63
第28天 Day 28	对照组 Control group	51.15 \pm 7.70	44.66 \pm 2.64	256.21 \pm 39.02	11.33 \pm 0.84
	模型组 Model group	84.76 \pm 18.18***	40.92 \pm 3.41	303.89 \pm 33.40*	12.20 \pm 0.55

注: 与对照组比较, $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$ 。

Note: Compared with the control group, $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$.

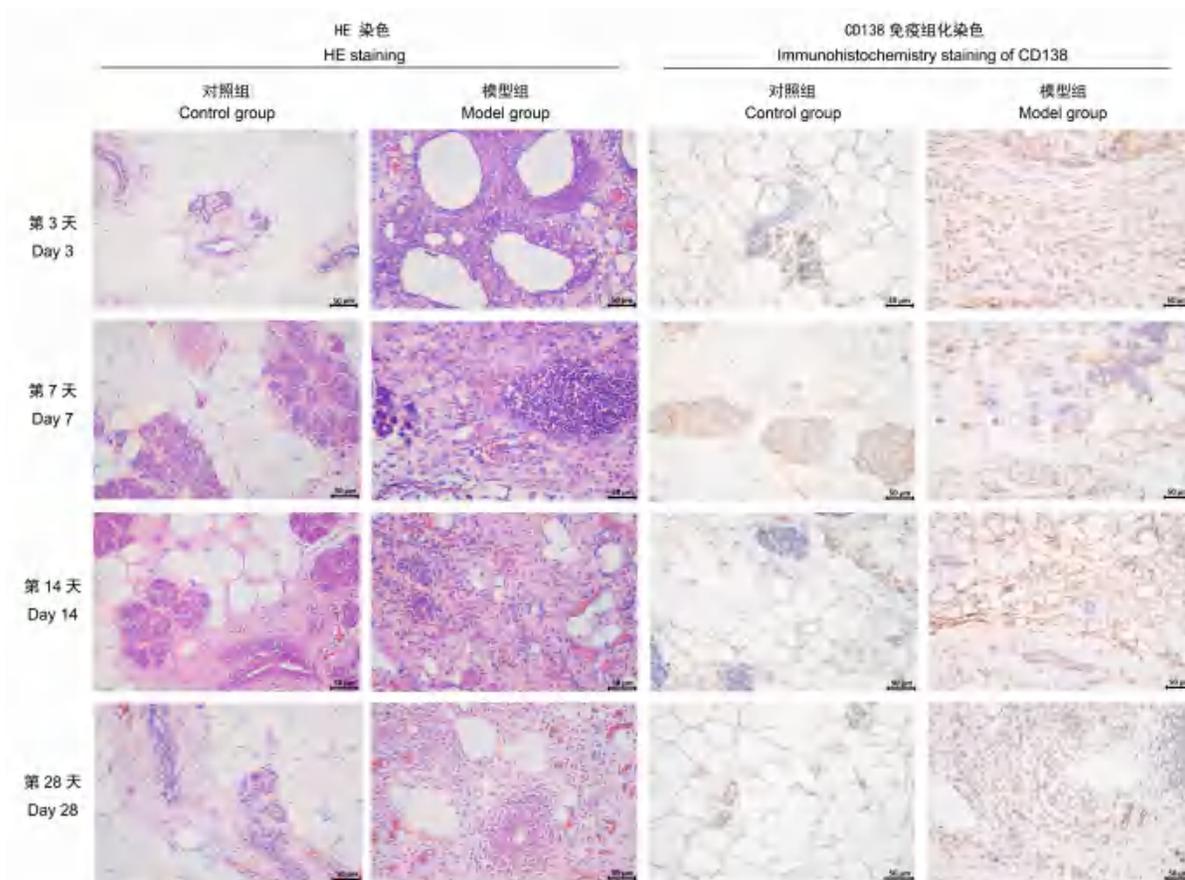


图3 末次免疫不同时间节点的对照组与模型组大鼠乳腺组织 HE 染色及 CD138 免疫组织化学染色结果 ($\times 400$)

Figure 3 HE and CD138 staining results of mammary tissue in the control group and the model group at different time points after the final immunization ($\times 400$)

完全弗氏佐剂的混悬液接种于具有孕产史的SD大鼠，建立了肉芽肿小叶性乳腺炎大鼠模型。崔振等^[10]采用浆细胞性乳腺炎手术切除病变组织制作匀浆，然后接种BALB/c小鼠乳腺，诱导建立浆细胞性乳腺炎小鼠模型，但发现异种组织匀浆可能会在小鼠体内引起免疫排斥反应。另外，由于个体差异，使用人病变组织匀浆接种的小鼠可能无法每次都复制出相同程度或类型的疾病表现；且人类和小鼠在生理和免疫应答上存在差异，导致人病变组织在小鼠体内可能无法完全模拟人类疾病的真实病理过程等^[11]。这些均对模型的稳定性和可靠性造成了一定影响。因此，为基础和临床研究提供更加符合实际的实验动物模型支持具有实际意义。

有研究显示，NPM患者中催乳素异常升高的比例较高，这可能是NPM发生、发展的相关因素之一^[12-14]。催乳素作为一类蛋白质激素，在非哺乳期妇女或男性患者中分泌过高提示病理性损伤的可能，通

常与周围神经损伤、垂体功能障碍等有关^[14]。催乳素水平异常被认为是导致乳腺导管中脂质样分泌物聚集的因素之一。导管内分泌物的堆积进一步引起导管周围的化学性刺激和免疫性反应，导致大量浆细胞浸润，继而引起炎症的发生与发展。本研究利用盐酸甲氧氯普胺注射液模拟了临床高风险患者的机体状态，且在不同造模阶段对血清催乳素进行了测定，发现注射模型组大鼠的高催乳素状态可持续至接近30 d。另外，通过注射制备的油包水乳剂（母鼠乳汁先后混合完全或不完全弗氏佐剂）诱导慢性炎症，构建大鼠NPM模型。弗氏佐剂与抗原结合可有效刺激其传递至免疫系统，诱发炎症反应，激发免疫细胞增殖^[15]。通过本方法造模可避免异体组织匀浆引起免疫反应所带来的缺陷。

本研究在乳腺局部评价中，模型组可观察到大鼠乳腺结节、脓肿、溃疡等多个病损表现，较好地模拟出NPM患者在实际临床中呈现的肿块期、脓肿期、破

溃期等多种变化,甚至可表现出多期共存的复杂情况(与文献[16]类似),提示本模型后续可用于不同临床分期包括疑难重症NPM的研究。另外,郑丽等^[8]指出CD138是浆细胞的特异性指标,定位于浆细胞胞膜及部分细胞质,其阳性表达为黄色至棕黄色。本研究继续沿用CD138标志浆细胞,镜检结果发现模型组大鼠在不同观察节点均与对照组呈现明显差异,尤其在末次免疫后第3、7、14天时乳腺组织中CD138阳性表达增加,对照组仅个别乳腺腺上皮细胞CD138阳性。HE染色结果显示,模型组大鼠呈现出乳腺导管扩张,导管上皮坏死脱落,导管周围浆细胞和淋巴细胞等炎症细胞浸润的典型病理表现。这些数据证实,本模型能够复现人类NPM的关键病理过程。此外,组织HE染色结果显示,模型组在4周(末次免疫后28d)内可维持较为典型的表现,说明本模型具有较好的稳定性和可重复性。

目前,NPM被认为属于免疫相关性疾病^[17-19]。从微观层面而言,NPM的反复发作、延期痊愈是炎症细胞、修复细胞以及多种细胞趋化因子等多因素共同参与、调控所引起的。其中IL-6、IL-1 β 、iNOS和TNF- α 等均是免疫炎症反应中的重要标志物,本研究对这些关键的细胞因子亦进行了检测。IL-6主要由单核巨噬细胞、B细胞、T细胞等活化分泌生成,其能够参与全身炎症反应及免疫反应^[20]。而IL-1 β 作为一种关键的促炎细胞因子,参与多种自身免疫性炎症反应和多种细胞活动,并且是一种典型的多功能细胞因子,几乎影响所有类型的细胞。例如,IL-1 β 参与了IL-6和TNF- α 的调节^[21],在组织细胞防御和组织修复过程中至关重要,可对疼痛、炎症和自身免疫产生作用^[22-23]。TNF- α 参与全身炎症,同时也是刺激急性期反应的细胞因子之一。更多的研究认为,TNF- α 是炎症级联反应启动阶段的主要表达因子,可引发许多病理并发症^[24-25]。iNOS作为一种重要的信号分子,在多种生物学过程(尤其是在免疫反应)中发挥作用。在特定的刺激如炎症、感染或免疫反应时,iNOS将被诱导产生^[26]。已有研究数据显示,以上这些细胞因子在临床NPM患者中存在表达上调的情况^[27-28]。因此,它们可作为评价NPM模型效果的分子标志物。本研究中,通过在不同时间节点对这些免疫指标进行检测,发现模型组大鼠的乳腺组织内IL-6、IL-1 β 、TNF- α 和iNOS水平均较对照组明显升高,尤其是在末次免疫后的第7天,各指标均显著高于对照组,这与临床患

者的表达趋势较为一致。

本研究结果还显示,模型稳定期为末次免疫后的14~28d。NPM系一类乳房慢性炎性疾病,多项临床研究结果统计了其治疗的时间。例如,尹琳琳等^[29]以临床观察1个月为时间节点比较了治疗组和对照组的总有效率;董兰蔚等^[30]观察了经切开扩创引流后难愈性病例的平均愈合时间为57.72d;赵赞等^[18]则是探讨了激素联合手术的平均疗程为20d。考虑大鼠自愈力较强,其溃疡模型的观察周期多为7~14d,并以21d或28d为观察终点。因此,本研究中建立的NPM大鼠模型的稳定时间更长,这更有利于疾病机制探索和药效研究等实验方案设计。

综上,本研究建立了一种更稳定且符合实际的NPM大鼠模型构建方法,成功复现了人类NPM发病时的多种临床表现,如肿块、脓肿、破溃等,与人体临床实际情况高度吻合,提示该模型可用于NPM不同分期阶段和疑难复杂病例的研究。本研究提高了NPM动物模型的稳定性和合理性,为深入探究NPM的病理机制和筛选有效治疗药物奠定了基础。本研究亦发现参与免疫细胞功能和免疫应答的重要分子(如IL-6、IL-1 β 、TNF- α 和iNOS)与NPM患者疾病转归的相应趋势变化,并结合病理表现推荐末次免疫后28d内为模型稳定时间,这可为后续研究提供参考。

[医学伦理声明 Medical Ethics Statement]

本研究涉及的所有动物实验已通过江西中洪博元生物技术有限公司实验动物伦理委员会批准(批号:LL-202304140005)。所有实验过程均遵照中国实验动物相关法律法规条例进行。All animal experiments involved in this study have been approved by the Experimental Animal Ethics Committee of Jiangxi Zhonghong Boyuan Biotechnology Co., Ltd. (Approval No. LL-202304140005). All experimental operations have been carried out in accordance with the requirements of the relevant laws and regulations on experimental animals in China.

[作者贡献 Author Contribution]

殷玉莲负责实验方案设计,参与实验操作、数据分析、初稿写作及获取基金资助;
马丽娜和屠思远参与实验方法设计、提供资源,负责实验操作和有效性验证;
陈玲负责病理数据可视化制作和写作指导;
叶媚娜参与论文修订;
陈红风负责提供基金资助和论文核修。

[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] 中华预防医学会妇女保健分会乳腺保健与乳腺疾病防治学组. 非哺乳期乳腺炎诊治专家共识[J]. 中国实用外科杂志, 2016, 36(7):755-758. DOI: 10.7504/CJPS.ISSN1005-2208.2016.07.12. Chinese Preventive Medicine Association Women's Health Branch Breast Care and Disease Prevention and Treatment Group. Expert consensus on diagnosis and treatment of non-lactation mastitis[J]. Chin J Pract Surg, 2016, 36(7):755-758. DOI: 10.7504/CJPS.ISSN1005-2208.2016.07.12.
- [2] 韦丽光, 韩猛. 非哺乳期乳腺炎的诊疗进展[J]. 实用医学杂志, 2022, 38(9): 1161-1165. DOI: 10.3969/j. issn. 1006-5725.2022.09.022. WEI L G, HAN M. Diagnosis and treatment of non-puerperal mastitis: a systematic literature review[J]. J Pract Med, 2022, 38(9):1161-1165. DOI: 10.3969/j.issn.1006-5725.2022.09.022.
- [3] 代秋颖, 周悦, 程一凡, 等. 基于高通量测序技术研究非哺乳期乳腺炎患者肠道菌群结构特征[J]. 复旦学报(医学版), 2023, 50(3): 379-389. DOI: 10.3969/j.issn.1672-8467.2023.03.009. DAI Q Y, ZHOU Y, CHENG Y F, et al. The structural characteristics of gut microbiota in patients with non-puerperal mastitis via high-throughput sequencing technology[J]. Fudan Univ J Med Sci, 2023, 50(3): 379-389. DOI: 10.3969/j.issn.1672-8467.2023.03.009.
- [4] VIZOSO F, DÍEZ-ITZA I, SÁNCHEZ L M, et al. Relationship between serum prolactin levels and protein composition of breast secretions in nonlactating women[J]. J Clin Endocrinol Metab, 1994, 79(2):525-529. DOI: 10.1210/jcem.79.2.8045972.
- [5] FREEMAN C M, XIA B T, WILSON G C, et al. Idiopathic granulomatous mastitis: a diagnostic and therapeutic challenge[J]. Am J Surg, 2017, 214(4): 701-706. DOI: 10.1016/j.amjsurg.2017.07.002.
- [6] 刘晓菲, 宿琦琦, 李静蔚, 等. 特发性肉芽肿性乳腺炎大鼠模型建立及 IL-6、IL-10 免疫失衡探讨[J]. 医学动物防制, 2022, 38(9): 825-829, 920. LIU X F, SU Q Q, LI J W, et al. Establishment of idiopathic granulomatous mastitis rat model and discussion on IL-6, IL-10 immune imbalance [J]. J Med Pest Control, 2022, 38(9):825-829, 920.
- [7] 关青青, 刘守尧, 韩静, 等. 祛腐生肌法治疗非哺乳期乳腺炎溃后期临床研究[J]. 世界中医药, 2018, 13(6):1388-1391. DOI: 10.3969/j.issn.1673-7202.2018.06.019. GUAN Q Q, LIU S Y, HAN J, et al. Clinical study on removing the necrotic tissue and promoting granulation method in the treatment of non-puerperal mastitis in the late stage of ulceration[J]. World Chin Med, 2018, 13(6):1388-1391. DOI: 10.3969/j.issn.1673-7202.2018.06.019.
- [8] 郑丽, 杨斌, 张晓军, 等. 消痈散结汤对浆细胞性乳腺炎模型大鼠 Th1/Th2 细胞因子平衡及上皮连接蛋白表达的影响[J]. 世界中西医结合杂志, 2023, 18(2):277-281, 288. DOI: 10.13935/j.cnki.sjzx.230211. ZHENG L, YANG B, ZHANG X J, et al. Effect of Xiaoyong Sanjie Decoction on Th1/Th2 cytokine balance and epithelial connexin expression in rats with plasma cell mastitis[J]. World J Integr Tradit West Med, 2023, 18(2):277-281, 288. DOI: 10.13935/j.cnki.sjzx.230211.
- [9] 左禧萌, 史晓光, 刘洁丽, 等. 肉芽肿小叶性乳腺炎大鼠模型建立初探[J]. 实验动物与比较医学, 2021, 41(4): 299-304. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2020.149. ZUO X M, SHI X G, LIU J L, et al. Establishment of a rat model of granulomatous lobular mastitis[J]. Lab Anim Comp Med, 2021, 41(4): 299-304. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2020.149.
- [10] 崔振, 余建军, 张大庆, 等. 浆细胞性乳腺炎小鼠模型的建立[J]. 中华全科医学, 2013, 11(12):1831-1832, 封3. DOI: CNKI: SUN: SYQY.0.2013-12-003. CUI Z, YU J J, ZHANG D Q, et al. Establishment of plasma cell mastitis model in mice[J]. Chin J Gen Pract, 2013, 11(12):1831-1832, Page 3 after the cover. DOI: CNKI: SUN: SYQY.0.2013-12-003.
- [11] 王军大, 王亚东, 王立娟, 等. 浆细胞性乳腺炎动物模型制备及模型效果评价的研究进展[J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(1):116-121. DOI: 10.3969/j.issn.1005-4847.2021.01.017. WANG J D, WANG Y D, WANG L J, et al. Research progress of animal model preparation and effect evaluation of plasma cell mastitis[J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2021, 29(1):116-121. DOI: 10.3969/j.issn.1005-4847.2021.01.017.
- [12] 吴晶晶, 程亦勤, 陈红凤, 等. 270例粉刺性乳痈发病的可能相关因素调查与分析[J]. 云南中医学院学报, 2019, 42(4):52-56. DOI: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2019.04.009. WU J J, CHENG Y Q, CHEN H F, et al. Investigation and analysis of the possible related factors in 270 cases of acne mastitis[J]. J Yunnan Univ Tradit Chin Med, 2019, 42(4):52-56. DOI: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2019.04.009.
- [13] 夏骏, 李玲玉, 高文静, 等. 浆细胞性乳腺炎的发病危险因素及列线图预测模型构建[J]. 中国现代普通外科进展, 2023, 26(7):543-547. DOI: 10.3969/j.issn.1009-9905.2023.07.009. XIA J, LI L Y, GAO W J, et al. Risk factors of plasma cell mastitis and construction of nomogram prediction model[J]. Chin J Curr Adv Gen Surg, 2023, 26(7):543-547. DOI: 10.3969/j.issn.1009-9905.2023.07.009.
- [14] 朱强, 王丕琳. 浆细胞性乳腺炎患者超声弹性应变率值与血清 E₂、PRL、Ki-67 指标表达相关性及其在预后评估的应用价值[J]. 生物医学工程与临床, 2020, 24(3): 272-277. DOI:10.13339/j.cnki.sglc.20200414.001. ZHU Q, WANG P L. Correlation between value of ultrasound elastic strain rate and serum level of E₂, PRL and Ki-67 in patients with plasma cell mastitis and its application value in prognosis evaluation[J]. Biomedical Engineering and Clinical Medicine, 2020, 24(3): 272-277. DOI: 10.13339/j. cnki. sglc. 20200414.001.
- [15] BILLIAU A, MATTHYS P. Modes of action of Freund's adjuvants in experimental models of autoimmune diseases [J]. J Leukoc Biol, 2001, 70(6): 849-860. DOI: 10.1189/jlb. 70. 6.849.
- [16] XING M Y, ZHANG S C, ZHA X M, et al. Current understanding and management of plasma cell mastitis: can we benefit from what we know? [J]. Breast Care, 2022, 17(3): 321-329. DOI: 10.1159/000517572.
- [17] 裴佳颖, 刘剑刚, 张晓军. 炎症因子和免疫相关蛋白通路在浆细

- 胞性乳腺炎病因学中的机制[J]. 中国现代普通外科进展, 2021, 24(11):888-892. DOI: 10.3969/j.issn.1009-9905.2021.11.011.
- QIU J Y, LIU J G, ZHANG X J. Mechanism of inflammatory factors and immune-related protein pathways in the etiology of plasma cell mastitis[J]. Chin J Curr Adv Gen Surg, 2021, 24(11):888-892. DOI: 10.3969/j.issn.1009-9905.2021.11.011.
- [18] 赵赞, 武海明, 谷志海, 等. 温阳活血法治疗早期浆细胞性乳腺炎疗效及对免疫功能的影响[J]. 中国中西医结合外科杂志, 2023, 29(6):777-782. DOI: 10.3969/j.issn.1007-6948.2023.06.010.
- ZHAO Y, WU H M, GU Z H, et al. Effect of warming Yang and activating blood circulation on early plasma cell mastitis and its influence on immune function[J]. Chin J Surg Integr Tradit West Med, 2023, 29(6):777-782. DOI: 10.3969/j.issn.1007-6948.2023.06.010.
- [19] LIU Y, SUN Y S, ZHOU Y H, et al. Sinomenine hydrochloride inhibits the progression of plasma cell mastitis by regulating IL-6/JAK2/STAT3 pathway[J]. Int Immunopharmacol, 2020, 81: 106025. DOI: 10.1016/j.intimp.2019.106025.
- [20] KANG S J, NARAZAKI M, METWALLY H, et al. Historical overview of the interleukin-6 family cytokine[J]. J Exp Med, 2020, 217(5): e20190347. DOI: 10.1084/jem.20190347.
- [21] LOPEZ-CASTEJON G, BROUGH D. Understanding the mechanism of IL-1 β secretion[J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2011, 22(4):189-195. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2011.10.001.
- [22] WANG G F, SWEREN E, LIU H Y, et al. Bacteria induce skin regeneration via IL-1 β signaling[J]. Cell Host Microbe, 2021, 29(5):777-791.e6. DOI: 10.1016/j.chom.2021.03.003.
- [23] XIANG H C, LIN L X, HU X F, et al. AMPK activation attenuates inflammatory pain through inhibiting NF- κ B activation and IL-1 β expression[J]. J Neuroinflammation, 2019, 16(1):34. DOI: 10.1186/s12974-019-1411-x.
- [24] YUK J M, KIM J K, KIM I S, et al. TNF in human tuberculosis: a double-edged sword[J]. Immune Netw, 2024, 24(1): e4. DOI: 10.4110/in.2024.24.e4.
- [25] FANG C Y, WANG L X, QIAO J T, et al. Differential regulation of lipopolysaccharide-induced IL-1 β and TNF- α production in macrophages by palmitate via modulating TLR4 downstream signaling[J]. Int Immunopharmacol, 2022, 103: 108456. DOI: 10.1016/j.intimp.2021.108456.
- [26] SUN L J, KEES T, ALMEIDA A S, et al. Activating a collaborative innate-adaptive immune response to control metastasis[J]. Cancer Cell, 2021, 39(10): 1361-1374. e9. DOI: 10.1016/j.ccell.2021.08.005.
- [27] 丁嫦英, 冯辉珍, 余秋燕. 疏肝清热化痰方联合地塞米松对浆细胞性乳腺炎患者炎症细胞因子和乳房疼痛的影响[J]. 中国妇幼保健, 2024, 39(5):781-785. DOI: 10.19829/j.zgfybj.issn.1001-4411.2024.05.002.
- DING C Y, FENG H Z, YU Q Y. Effect of Shugan Qingre Huayu recipe combined with dexamethasone on inflammatory cytokines and breast pain in patients with plasma cell mastitis[J]. Matern Child Health Care China, 2024, 39(5):781-785. DOI: 10.19829/j.zgfybj.issn.1001-4411.2024.05.002.
- [28] 武海明, 谷志海, 闫露露, 等. 温阳活血法对浆细胞性乳腺炎疼痛介质、泌乳素及血清炎症因子的影响[J]. 中医学报, 2023, 38(6): 1329-1334. DOI: 10.16368/j.issn.1674-8999.2023.06.220.
- WU H M, GU Z H, YAN L L, et al. Effects of warming Yang and activating blood circulation method on pain mediators, prolactin and serum inflammatory factors in plasma cell mastitis[J]. Acta Chin Med, 2023, 38(6): 1329-1334. DOI: 10.16368/j.issn.1674-8999.2023.06.220.
- [29] 尹琳琳, 郝俊兰, 赵静, 等. 西黄丸联合地塞米松治疗浆细胞性乳腺炎的临床研究[J]. 现代药物与临床, 2024, 39(6):1544-1548. DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2024.06.028.
- YIN L L, HAO J L, ZHAO J, et al. Clinical study of Xihuang pill combined with dexamethasone in treating plasma cell mastitis[J]. Drugs Clin, 2024, 39(6): 1544-1548. DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2024.06.028.
- [30] 董兰蔚, 叶媚娜, 殷玉莲, 等. 中医药内外合治对肉芽肿性乳腺炎的影响及作用机制研究[J]. 山东中医杂志, 2021, 40(12):1326-1331, 1336. DOI: 10.16295/j.cnki.0257-358x.2021.12.007.
- DONG L W, YE M N, YIN Y L, et al. Effect and mechanism of internal and external treatment by traditional Chinese medicine on granulomatous mastitis[J]. Shandong J Tradit Chin Med, 2021, 40(12): 1326-1331, 1336. DOI: 10.16295/j.cnki.0257-358x.2021.12.007.

(收稿日期: 2024-05-08 修回日期: 2024-11-13)

(本文编辑: 张俊彦, 富群华, 丁宇菁, 吴昊晟)

[引用本文]

- 殷玉莲, 马丽娜, 屠思远, 等. 非哺乳期乳腺炎大鼠模型的建立及评价[J]. 实验动物与比较医学, 2024, 44(6): 587-596. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.065.
- YIN Y L, MA L N, TU S Y, et al. Establishment and evaluation of a rat model for non-puerperal mastitis[J]. Lab Anim Comp Med, 2024, 44(6): 587-596. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.065.

手术诱导大鼠中重度膝骨关节炎模型的建立与评价

孙效容^{1,2}, 苏丹¹, 贵文娟³, 陈玥^{1,2}

(1. 成都合拓创展生物科技有限公司, 成都 610041; 2. 四川大学生物治疗全国重点实验室, 成都 610041; 3. 宁夏医科大学总医院, 银川 750004)

[摘要] **目的** 建立大鼠中重度膝骨关节炎模型, 为中重度膝关节炎发病机制及其防治方法研究奠定基础。**方法** 选用30只雄性SD大鼠, 随机分为3组: 假手术组、模型8周组、模型20周组, 每组各10只。模型8周组和模型20周组大鼠通过手术切断右膝关节前后交叉韧带和内侧副韧带, 去除内外侧半月板, 术后大鼠可自由活动。假手术组大鼠仅切开皮肤, 暴露关节, 不进行手术处理。分别于术后8周和20周进行Micro-CT观察, 分析大鼠股骨骨质疏松情况; 大鼠安乐死后, 对膝关节面进行大体观察, 并采用Pelletier评分表对关节面软骨进行评分。膝关节取材, 进行HE染色和番红O-固绿染色, 观察软骨形态变化, 并使用改良Mankin's评分法对关节面组织病理情况进行评分。通过免疫组织化学染色法检测II型胶原和基质金属蛋白酶13 (matrix metalloproteinase 13, MMP13) 表达情况, 以此反映膝关节软骨的合成分解代谢情况。**结果** 模型8周组和模型20周组大鼠膝关节的关节面软骨破坏严重, Pelletier评分及改良Mankin's评分均明显高于假手术组 (均 $P < 0.01$)。模型20周组大鼠的Pelletier评分及改良Mankin's评分均明显高于模型8周组 ($P < 0.01$)。模型8周组和模型20周组大鼠经Micro-CT观察可见膝关节面不平整, 骨赘形成, 出现骨质疏松的表现; 且模型20周组大鼠的膝关节周围有较多游离体形成。免疫组织化学染色提示模型组大鼠的膝关节组织中MMP13表达量增多, II型胶原表达量减少, 提示关节软骨合成分解代谢平衡被破坏。**结论** 通过手术切断大鼠膝关节前后交叉韧带和内侧副韧带并去除内外侧半月板的方法可成功构建中重度膝关节炎大鼠模型, 影像学检查发现膝关节骨赘、骨质疏松及游离体, 病理学观察发现关节软骨减少甚至消失, 而且软骨合成分解代谢平衡破坏。

[关键词] 动物模型; 膝骨关节炎; Micro-CT; 组织病理学; 大鼠

[中图分类号] R684.3; Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2024)06-0597-08



Establishment and Evaluation of a Moderate-to-Severe Knee Osteoarthritis Model in Rats Induced by Surgery

SUN Xiaorong^{1,2}, SU Dan¹, GUI Wenjuan³, CHEN Yue^{1,2}

(1. Chengdu Bio-HT Co., Ltd., Chengdu 610041, China; 2. State Key Laboratory of Biotherapy, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 3. General Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China)

Correspondence to: CHEN Yue (ORCID: 0000-0002-7051-2365), E-mail: yue.chen@bio-ht.cn

[ABSTRACT] **Objective** To establish a rat model of moderate-to-severe knee osteoarthritis, laying the foundation for studying the pathogenesis of moderate-to-severe knee osteoarthritis and its prevention and treatment methods. **Methods** Thirty male SD rats were randomly divided into three groups: a sham surgery group, an 8-week model group, and a 20-week model group, with 10 rats in each group. Rats in the 8-week and 20-week model groups underwent surgery to cut the anterior and posterior cruciate ligaments and medial collateral ligament of the right knee joint, and remove the medial and lateral menisci. After surgery, the rats were allowed to move freely. The rats in the sham surgery group had only skin incisions to expose the joint without any surgical treatment. At 8 and 20 weeks post-surgery, Micro-CT scans were performed to analyze the femoral osteoporosis in the rats. After euthanizing the rats, gross observations of

[基金项目] 四川省科技计划项目“科技型企业高级管理人才”(2021JDRC0061)

[第一作者] 孙效容(1986—), 女, 博士研究生在读, 副研究员, 研究方向: 药物及医疗器械临床前有效性评价。E-mail: xiaorong.sun@bio-ht.cn. ORCID: 0000-0002-1470-854X

[通信作者] 陈玥(1984—), 女, 博士研究生在读, 高级工程师, 研究方向: 药物及医疗器械临床前有效性评价。E-mail: yue.chen@bio-ht.cn. ORCID: 0000-0002-7051-2365

the knee joints were made, and the cartilage of the joint surface was scored using the Pelletier scoring system. The knee joints were collected for hematoxylin and eosin (HE) staining and safranin O-fast green staining to observe changes in cartilage morphology. The modified Mankin's scoring system was used to assess the tissue pathology of the joint surface. Immunohistochemical staining was used to detect the expression of type II collagen and matrix metalloproteinase 13 (MMP13), reflecting the anabolic and catabolic metabolism of the knee joint cartilage. **Results** The knee joint cartilage in the 8-week and 20-week model groups was severely damaged, with Pelletier and modified Mankin's scores significantly higher than those in the sham surgery group (both $P < 0.01$). The Pelletier and modified Mankin's scores in the 20-week model group were significantly higher than those in the 8-week model group ($P < 0.01$). Micro-CT observations revealed irregular joint surfaces, osteophyte formation, and signs of osteoporosis in both the 8-week and 20-week model groups, with the 20-week model group showing more loose bodies around the knee joints. Immunohistochemical staining showed increased expression of MMP13 and decreased expression of type II collagen in the knee joint tissues of the model groups, indicating that the balance of anabolic and catabolic metabolism in the joint cartilage was disrupted. MMP13 increased while type II collagen decreased. **Conclusion** The surgical method of cutting the anterior and posterior cruciate ligaments and medial collateral ligament and removing the medial and lateral menisci successfully creates a moderate-to-severe knee osteoarthritis model in rats. Imaging examinations reveal osteophytes, osteoporosis, and loose bodies in the knee joints, while pathological observations show a reduction or even disappearance of joint cartilage, with a disruption in the balance of cartilage anabolic and catabolic metabolism.

[Key words] Animal model; Knee osteoarthritis; Micro-CT; Histopathology; Rat

骨关节炎是临床常见的关节退行性疾病^[1],好发于膝、髌等负重关节,表现为关节疼痛、僵硬、活动度受限等^[2],常导致患者生活自理能力和生活质量下降,并造成社会及家庭负担加重^[3]。膝骨关节炎是最常见的一种骨关节炎^[4],多发于50岁以上人群,随着社会人口老龄化加剧和肥胖人群增加,其发病率和患病率均进一步上升^[5]。目前,临床上治疗早期骨关节炎^[6],可通过物理治疗等方式减轻疼痛,维持或增加关节活动度,或选用非甾体抗炎药等药物进行镇痛或抗炎^[7]。对于中重度骨关节炎、关节畸形、药物治疗效果不佳且关节症状严重影响生活质量的患者,符合手术指征的情况下可采取手术方式治疗^[8]。

目前,国内外建立膝骨关节炎动物模型的方法主要分为3种^[9]:外科手术或创伤、关节腔内注射药物、转基因动物自发形成。其中,手术诱导的膝骨关节炎模型病程发展快,关节软骨结构改变明显,常采用Hulth法^[10]、改良Hulth法^[11]、切断前交叉韧带法、半月板切除法等改变膝关节应力,构建膝骨关节炎模型。使用这些方法制作的动物模型可观察到软骨退化、骨减少,严重者可观察到骨赘形成^[12],但罕见文献报道动物模型形成关节游离体、异位骨化等晚期严重骨关节炎表现。

本研究采用切断前后交叉韧带和内侧副韧带、去

除内外侧半月板的方法,建立大鼠膝骨关节炎模型,通过Micro-CT影像学观察大鼠膝关节骨赘、关节游离体等进展,并通过对膝关节大体观察及组织病理学评估软骨磨损破坏情况,以期构建与人类中重度膝骨关节炎在影像学和组织病理学上相似的动物模型,为中重度膝骨关节炎发病机制、药物治疗、手术治疗方式等研究提供新思路。

1 材料与方法

1.1 实验动物

30只SPF级雄性SD大鼠,6~8周龄,体重180~200g,购自斯贝福(北京)生物技术有限公司[SCXK(京)2019-0010]。大鼠饲养于成都合拓创展生物科技有限公司[SYXK(川)2021-0242],饲养环境为12h/12h明暗交替,相对湿度40%~60%,室温20~25℃。本实验方案经成都合拓创展生物科技有限公司伦理委员会批准(审批号2023HHT08R08),所有操作均符合实验动物福利伦理要求。

1.2 主要试剂与仪器

异氟烷(批号20221201)购自深圳市瑞沃德生命科技股份有限公司;EDTA脱钙液(慢脱)、多聚甲醛溶液、环保型脱蜡液、HE染色试剂盒、番红O-固绿(骨组织)染液套装、MMP13抗体、牛血清白蛋白、

苏木精染液、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔二抗、II型胶原抗体和DAB显色剂均购自武汉赛维尔生物科技有限公司；无水乙醇、二甲苯和中性树胶均购自国药集团化学试剂有限公司；注射用青霉素钠（批号43230105）购自山东鲁抗医药股份有限公司；痛立定注射液（Tolfedine 4%，批号9H32860）购自法国Vetoquinol公司。

Quantum GX小动物活体Micro-CT影像系统为美国PerkinElmer公司产品；ABS型呼吸麻醉机购自上海玉研科学仪器有限公司；RM2016病理切片机购自上海徕卡仪器有限公司；PH100生物显微镜购自凤凰光学股份有限公司。

1.3 动物分组及模型制备

30只大鼠适应性饲养1周，随机分为3组：假手术组、模型8周组（造模后饲养8周安乐死）、模型20周组（造模后饲养20周安乐死），每组各10只。大鼠使用2%~4%异氟烷持续吸入麻醉，于右侧后肢膝关节周围进行备皮。对模型8周组和模型20周组大鼠进行韧带及半月板损伤造模操作：大鼠仰卧位置于动物手术台上，常规消毒铺巾，沿膝关节内侧纵向切开约3 cm长的1个切口，切断内侧副韧带；屈曲后肢，外翻髌骨，暴露并切断前后交叉韧带，切除内外侧半月板，通过抽屉试验验证韧带离断情况，然后逐层缝合。术后允许大鼠自由饮水、摄食、活动，不进行患肢固定或运动负荷等操作。假手术组大鼠仅切开皮肤，暴露关节，不损伤韧带及半月板。术前2 h及术后3 d，每只大鼠每天以0.1 mL/kg的剂量肌内注射托芬那酸以镇痛。术后3 d，每天肌内注射20万单位青霉素以预防感染。

1.4 Micro-CT检测膝关节

造模后第8周，对假手术组和模型8周组大鼠进行Micro-CT检测；造模后第20周，对假手术组和模型20周组大鼠进行Micro-CT检测。将各组每只大鼠仰卧位放置于Micro-CT检测舱，整个检测过程中持续使用1%~3%异氟烷吸入麻醉以维持大鼠安静状态。Micro-CT参数设置：扫描电流100 μ A，扫描电压80 kV。Micro-CT断层扫描后进行三维图像重建，图像后处理阶段选择X-ray获取膝关节透射影像，通过膝关节CT扫描断层图像、X线透射影像、3D图像来观察膝关节损伤及股骨骨质疏松情况。扫描完成后，使用Calipers软件分析与股骨骨质疏松相关的形态学数据，选取股骨髌上端骺线以上区域100层为感兴趣区域。主要检

测参数包括股骨骨密度（bone mineral density, BMD）、骨体积分数（bone volume fraction, BV/TV）、骨小梁厚度（trabecular thickness, Tb.Th）、骨小梁数目（trabecular number, Tb.N）、骨小梁间隙（trabecular separation, Tb.Sp）。

1.5 解剖大体观察膝关节软骨变化

模型8周组大鼠在术后8周经异氟烷麻醉后安乐死；假手术组和模型20周组大鼠在术后20周经异氟烷麻醉后安乐死。大鼠安乐死后，切开右侧膝关节囊，肉眼大体观察膝关节面变化情况，并采用Pelletier评分法^[13]对膝关节软骨损伤情况进行评价：正常，0分；关节面粗糙，有小的裂隙，1分；关节面糜烂，2分；关节面溃疡形成，软骨缺损达到深层，3分；软骨剥脱，软骨下骨质暴露，4分。

1.6 组织病理学观察

对安乐死大鼠的膝关节进行大体观察后，取股骨髌进行固定，慢速脱钙，常规石蜡包埋，制备4 μ m厚度切片，然后分别进行HE染色以观察膝关节病变情况和组织结构细节，番红O-固绿染色观察膝关节软骨和软骨下的骨组织结构，并对膝关节组织中的II型胶原和基质金属蛋白酶13（matrix metalloproteinase 13, MMP13）进行免疫组织化学染色。具体实验步骤均按照各试剂说明书进行；其中，免疫组化染色阳性细胞显示为棕黄色。使用光学显微镜对膝关节病变情况、膝关节软骨合成分解代谢情况进行观察和图像采集，根据HE染色和番红O-固绿染色结果，采用改良Mankin's评分法^[14]对膝关节软骨结构、软骨细胞、基质染色、潮线完整性进行组织病理学评分。

1.7 统计学分析

运用SPSS 26软件进行实验结果的统计学分析。各实验结果数据用平均值 \pm 标准差表示。正态和方差齐的多组间数据比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用LSD-*t*检验。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

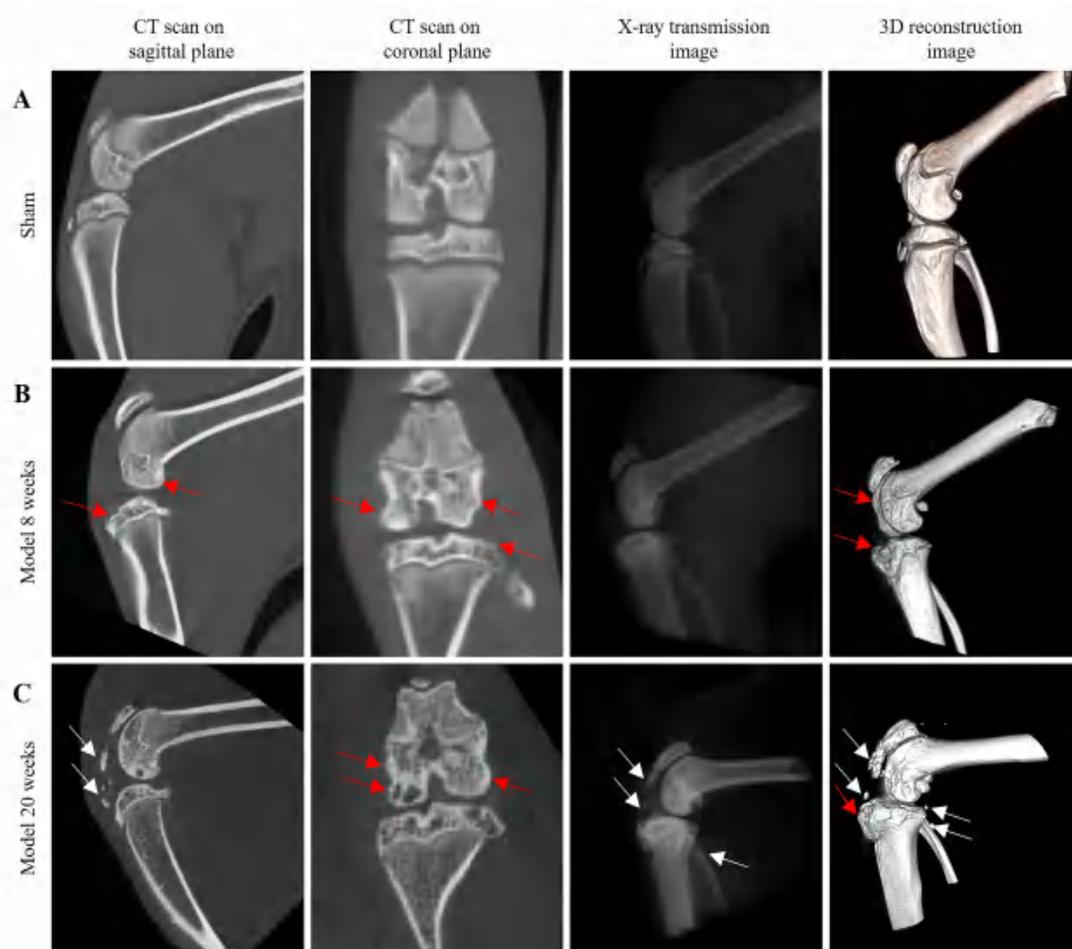
2 结果

2.1 造模术后大鼠出现中重度骨关节炎

各组大鼠膝关节的Micro-CT图像见图1。假手术组大鼠的Micro-CT图像显示膝关节关节面平整，未见骨赘或骨刺等（图1A）；模型8周组大鼠的Micro-CT图像显示膝关节关节面不平整，软骨下骨硬化，多处骨赘形成，并可见骨质疏松情况，表现为骨小梁间隙

变大(图1B);模型20周组的Micro-CT图像与模型8周组相似,显示大鼠膝关节关节面不平整,软骨下骨

硬化,关节间隙变窄,多处骨赘形成,且多角度均可见膝关节多处游离体生成(图1C)。



注: A, 假手术组膝关节 Micro-CT; B, 模型8周组膝关节 Micro-CT; C, 模型20周组膝关节 Micro-CT。每一组图像按照从左到右的顺序依次为矢状面CT扫描、冠状面CT扫描、X线透射影像、三维重建图像。红色箭头指示骨赘;白色箭头指示关节游离体。

Note: A, Micro-CT of knee joint in sham surgery group; B, Micro-CT of knee joint in 8-week model group; C, Micro-CT of knee joint in 20-week model group. The sequence of images in each group, from left to right, is as follows: CT scan on sagittal plane, CT scan on coronal plane, X-ray transmission image, and 3D reconstruction image. Red arrows show the osteophytes; White arrows show the joint loose bodies.

图1 各组大鼠膝关节的Micro-CT图像

Figure 1 Micro-CT images of knee joint in different groups of rats

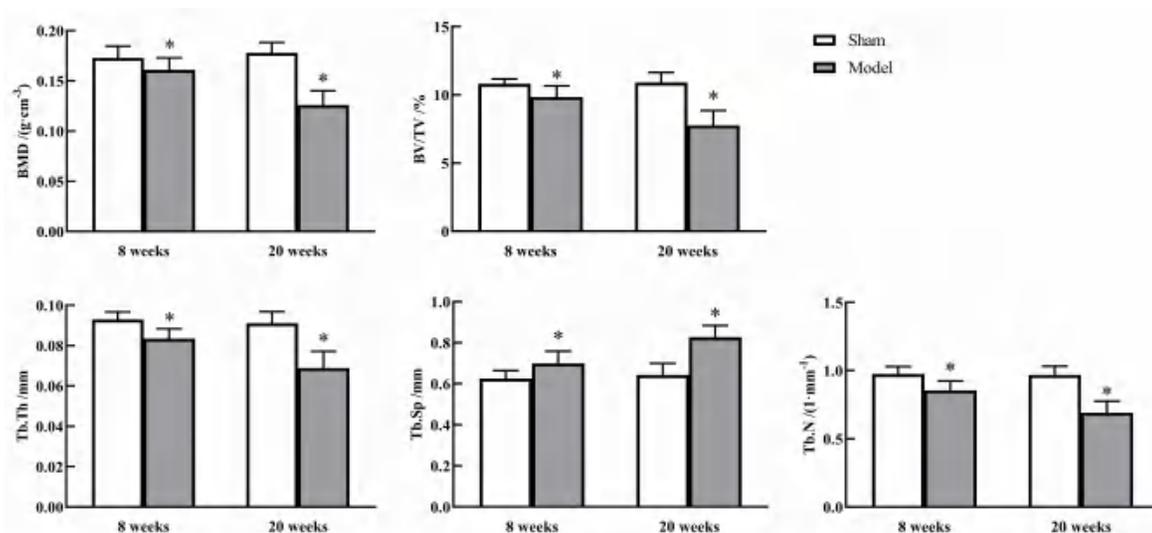
进一步的股骨形态学数据显示:模型8周组大鼠已有明显骨质疏松;模型20周组大鼠的骨质疏松进一步加重(图2)。综合Micro-CT结果可知,模型8周组和20周组大鼠的膝关节均出现了骨重建、骨赘形成和骨质疏松,模型20周组大鼠多处关节还发现游离体形成,这些都是中重度骨关节炎的表现。

2.2 造模术后大鼠膝关节软骨损伤随时间延长逐渐严重

大鼠的膝关节大体观察显示,假手术组大鼠膝关节活动度好,取材后软骨表面光滑无磨损;模型8周

组大鼠膝关节活动度良好;模型20周组大鼠膝关节活动度差,关节僵硬,无法维持正常屈伸活动度,多为屈曲畸形。模型组膝关节取材时,大鼠肌腱缝合处瘢痕愈合,膝关节股骨内外髌关节面均异常粗糙,关节软骨磨损严重,有骨赘形成。尤其是模型20周组的大鼠,还可触摸到膝关节处骨化硬物。

Pelletier评分见图3:与假手术组相比,模型8周组和模型20周组的Pelletier评分均显著升高($P < 0.01$);与模型8周组相比,模型20周组的软骨磨损更加严重,两组间Pelletier评分差异有统计学意义($P < 0.01$)。

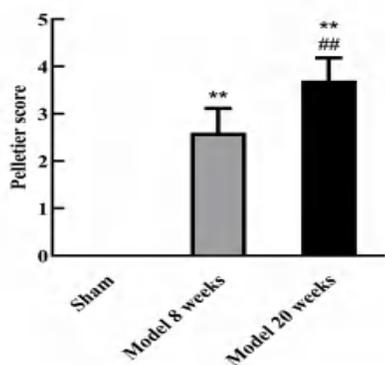


注: BMD, 股骨骨密度; BV/TV, 骨体积分数; Tb.Th, 骨小梁厚度; Tb.Sp, 骨小梁间隙; Tb.N, 骨小梁数目。每组10只大鼠; 与假手术组比较, * $P < 0.05$ 。

Note: BMD, Bone mineral density; BV/TV, Bone volume fraction; Tb.Th, Trabecular thickness; Tb.Sp, Trabecular separation; Tb.N, Trabecular number. Compared with sham surgery group, * $P < 0.05$; $n = 10$.

图2 各组大鼠股骨Micro-CT骨形态学分析

Figure 2 Micro-CT femur morphological analysis in different groups of rats



注: 每组10只大鼠; 与假手术组比较, ** $P < 0.01$; 与模型8周组比较, ** $P < 0.01$ 。

Note: Compared with sham surgery group, ** $P < 0.01$; Compared with 8-week model group, ** $P < 0.01$; $n = 10$.

图3 各组大鼠的膝关节Pelletier评分

Figure 3 Pelletier score of the knee joint in different groups of rats

2.3 造模术后大鼠膝关节组织病理学变化加剧

各组大鼠膝关节的HE染色结果见图4A。假手术组大鼠膝关节面光滑平整, 软骨各层结构排列规则, 染色均匀, 可见明显软骨细胞, 潮线完整, 无血管侵入; 模型8周组大鼠的膝关节面及软骨层出现破坏, 软骨各层结构紊乱, 软骨细胞数量减少, 基质染色减弱, 软骨下血管入侵潮线, 骨质骨小梁间隙增加; 模型20周组大鼠的膝关节进一步破坏, 关节面磨损严重, 软骨细胞进一步减少甚至消失, 软骨正常结构

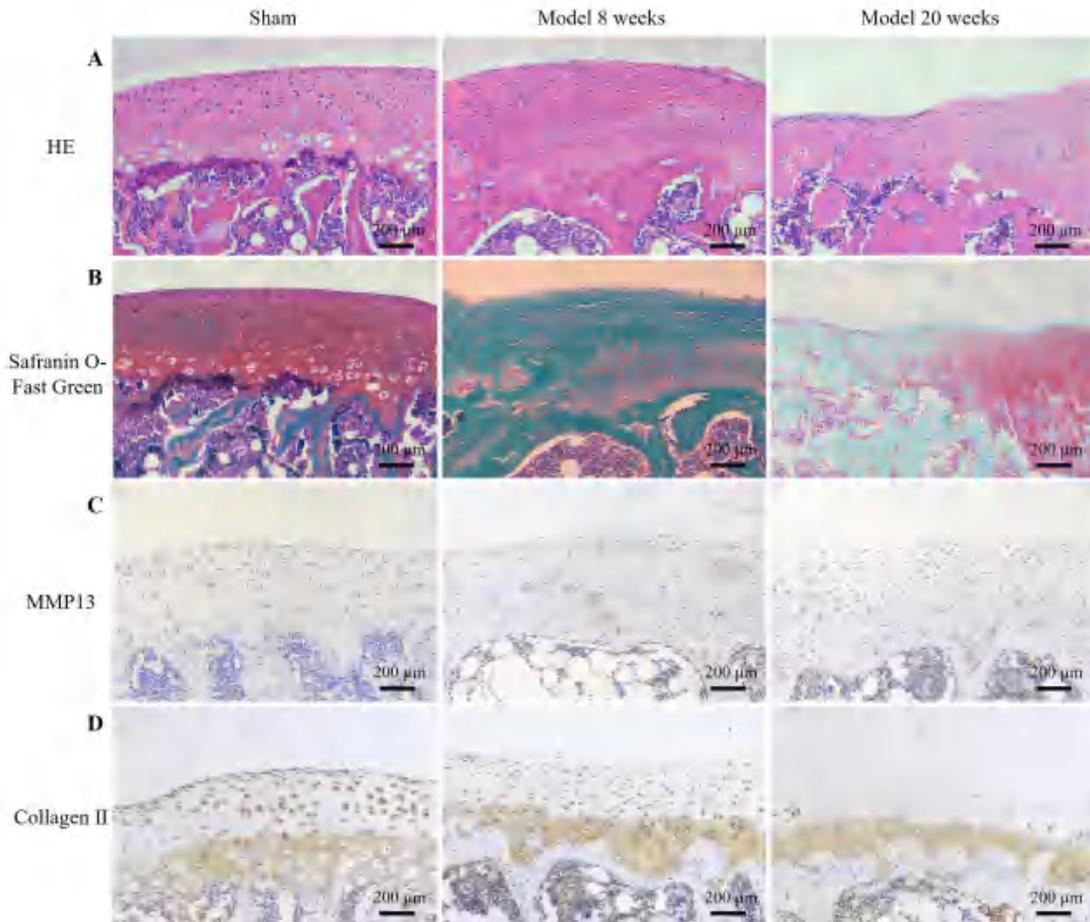
消失。

各组大鼠膝关节的番红O-固绿染色结果见图4B, 与HE染色结果基本一致。假手术组大鼠软骨基质呈红色, 胶原纤维呈绿色, 潮线清晰规律, 各层结构清晰且染色对比明显; 模型8周组大鼠的番红O染色减弱, 固绿染色明显且面积增加; 模型20周组大鼠的番红O和固绿染色均减弱, 软骨细胞进一步减少甚至消失, 各层正常结构消失或严重破坏。

2.4 造模术后大鼠膝关节软骨合成分解代谢失衡

各组大鼠膝关节的免疫组织化学染色结果见图4C和图4D。假手术组大鼠膝关节软骨及软骨下骨中MMP13表达水平较低, 偶见细胞表达MMP13且染色较浅; 模型8周组MMP13阳性细胞明显增多, 关节软骨及软骨下骨均可见阳性细胞聚集, 且着色较为明显; 模型20周组MMP13阳性细胞较多, 着色较重。这提示正常大鼠膝关节中MMP13表达水平较低, 制作膝关节炎模型后, 大鼠膝关节软骨及软骨下骨MMP13表达水平升高。

假手术组大鼠膝关节中II型胶原阳性细胞较多, 着色深, 且在关节软骨和软骨下骨中均大量表达; 模型8周组II型胶原阳性细胞数量减少, 主要分布于软骨下骨, 关节软骨层可见少量细胞呈阳性且着色浅; 模型20周组II型胶原表达进一步下降, 阳性细胞主要分布于软骨下骨, 关节软骨层偶见阳性细胞。



注: A, HE 染色 ($\times 100$); B, 番红O-固绿染色 ($\times 100$); C~D, 免疫组织化学染色 ($\times 100$)。MMP13, 基质金属蛋白酶13; Collagen II, II型胶原。

Note: A, HE staining ($\times 100$); B, Safranin O-Fast Green staining ($\times 100$); C-D, Immunohistochemical staining ($\times 100$). MMP13, matrix metalloproteinase 13; Collagen II, type II collagen.

图4 各组大鼠膝关节组织病理学变化

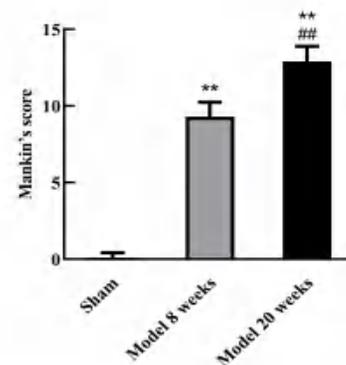
Figure 4 Histopathological changes of the knee joint in different groups of rats

2.5 造模术后大鼠的膝关节病理分期评分

各组大鼠膝关节的改良 Mankin's 评分见图5。假手术组大鼠膝关节 Mankin's 评分较低, 表明关节组织结构保持完整。与假手术组相比, 模型8周组和模型20周组大鼠的 Mankin's 评分均明显升高 ($P < 0.01$); 模型20周组与模型8周组相比, Mankin's 评分进一步升高 ($P < 0.01$), 提示大鼠膝关节病变更为严重。综上, 根据骨关节炎分期标准^[15], 模型8周组大鼠为中重度骨关节炎表现, 模型20周组大鼠为重度骨关节炎表现。

3 讨论

膝关节是人体重要的承重关节, 在行走、跑步、弹跳、负重等活动中, 膝关节承载的负荷均较大^[16]。临床上, 膝关节韧带或半月板损伤的患者, 发生膝关



注: 每组10只大鼠; 与假手术组比较, ** $P < 0.01$; 与模型8周组比较, ## $P < 0.01$ 。

Note: Compared with sham surgery group, ** $P < 0.01$; Compared with 8-week model group, ## $P < 0.01$; $n = 10$.

图5 各组大鼠膝关节 Mankin's 评分

Figure 5 Mankin's score of the knee joint in different groups of rats

关节炎的概率明显增加^[17]。半月板损伤时,股骨髁与胫骨平台直接接触,在行走或运动过程中磨损严重,使生物应力急剧增加^[18]。在膝骨关节炎动物模型研究中,常用Hulth法和改良Hulth法联合卵巢切除、强迫运动或使用老年动物等进行模型制作,以模拟不同状态下膝关节炎的情况。传统Hulth法是通过手术方法完全切断膝关节的前交叉韧带、后交叉韧带及内侧副韧带,并完整切除内侧半月板;改良Hulth法是在传统Hulth法的基础上保留后交叉韧带或内侧副韧带及后交叉韧带,这种方法适于中早期骨关节炎研究。本实验是在传统Hulth法基础上,额外切除内外侧半月板,即手术切断大鼠右膝关节前后交叉韧带和内侧副韧带,并且去除内外侧半月板。术后大鼠自由活动,即通过手术改变膝关节生物应力,破坏关节稳态,从而诱发膝关节退行性变。用这种方法构建的大鼠中重度膝关节炎模型,可以重点关注膝关节中重度损伤情况。

模型8周组大鼠的Micro-CT检测可见关节面不平整,骨赘形成,大体观察关节面粗糙,软骨破坏;组织病理学观察证实软骨破坏明显。模型20周组大鼠的Micro-CT检测除可见骨赘形成、关节间隙变窄、软骨下骨硬化,还观察到大量游离体形成;大体观察其膝关节较模型8周组大鼠的关节面进一步破坏,且可触摸到膝关节内硬化骨物;组织病理学观察可见部分关节面软骨消失。本研究通过手术方法在大鼠中成功建立中重度膝骨关节炎模型,影像学可见骨赘形成及游离体形成, Pelletier评分及改良Mankin's评分均可见严重软骨破坏,且膝骨关节炎的严重程度随时间推移进一步加重。

MMP13是MMP家族的重要一员,参与成骨细胞/骨细胞分化、骨形成、骨吸收期间类骨的溶解、破骨细胞的募集和迁移等过程,在生理条件下是骨重塑的耦合因子^[19]。相反,一些导致骨溶解-骨形成不平衡的骨重塑相关的病理改变,主要是由MMP过度表达和细胞外基质异常引起的^[20]。MMP13是一种胶原酶,该家族蛋白参与胚胎发育、组织重塑等正常生理过程,还参与疾病过程中的细胞外基质分解^[21]。MMP13的主要功能除了降解骨关节中的II型胶原外,还可以降解软骨中其他类型的胶原如IV型、IX型和软骨基质成分蛋白多糖等^[22]。MMP13及其抑制剂(matrix metalloproteinase inhibitors, MMPIS)的失衡是导致II型胶原减少的起始因素^[23-24]。本实验中免疫组织化学染色结果显示,假手术组大鼠膝关节的MMP13表达较少,模型组大鼠的MMP13阳性细胞明显增多;假手术

组大鼠的II型胶原阳性细胞较多且着色深,而模型组大鼠的II型胶原阳性细胞减少。这提示膝骨关节炎造模后,软骨的合成分解代谢平衡被打破。

本实验通过手术损伤韧带及半月板后,除观察到关节活动度减少,骨赘形成、骨质疏松及软骨破坏等膝关节炎表现外,还观察到大鼠膝关节中游离体形成。这与临床膝关节炎患者除影像学改变外,常伴有活动受限的情况一致。后续实验将对动物疼痛程度进行量化测试,使用游泳行为学、转棒行为学等方法测试动物运动能力;同时,进一步检测与疾病发生、发展相关的各类通路或因子,如转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)、核因子 κ B(nuclear factor kappa-B, NF- κ B)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、C-X-C型趋化因子受体(C-X-C chemokine receptor, CXCR)等表达情况。后续研究中,还将对该疾病模型进行非甾体抗炎药治疗或物理治疗,以观察现有治疗手段对膝关节炎的作用。

综上所述,本实验通过手术切断前后交叉韧带和内侧副韧带并去除内外侧半月板的方法,成功建立了大鼠中重度膝骨关节炎模型,且发现随时间推移,动物模型的膝骨关节炎症状明显加重,出现关节游离体等,提示该模型可为中重度膝骨关节炎机制、药物治疗、手术治疗等研究提供一种新的模型思路。

[医学伦理声明 Medical Ethics Statement]

本研究涉及的动物实验均已通过成都拓创展生物科技有限公司动物福利伦理委员会(IACUC)审查批准[审批号:2023IINH08R08]。所有实验过程遵照中国实验动物相关法律条例要求进行,包括《实验动物管理条例》(2017年3月1日)、《实验动物福利伦理审查指南》(GB/T 35892—2018)等。All experimental animal protocols in this study were reviewed and approved by Experimental Animal Ethics Committee of Chengdu Co., Ltd. (Approval Letter No. 2023IINH08R08). All experimental procedures were performed in accordance with the requirements of laws and regulations in China related to experimental animals, including *Animal Management Regulations* (01/03/2017), *Laboratory Animal-Guideline for Ethical Review of Animal Welfare* (GB/T 35892-2018), and so on.

[作者贡献 Author Contribution]

孙效容负责实验方案设计、组织实施、软件处理、论文撰写及修改;

苏丹负责提供资源、实验方案设计、动物实验;

贵文娟负责论文图片整理和制作;

陈玥提供研究经费,负责项目管理、计划审核,以及论文修改。

[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] BRUYÈRE O, HONVO G, VERONESE N, et al. An updated algorithm recommendation for the management of knee osteoarthritis from the European Society for Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis, Osteoarthritis and Musculoskeletal Diseases (ESCEO) [J]. *Semin Arthritis Rheum*, 2019, 49(3): 337-350. DOI: 10.1016/j.semarthrit.2019.04.008.
- [2] HUNTER D J, BIERMA-ZEINSTRAS S. Osteoarthritis[J]. *Lancet*, 2019, 393(10182): 1745-1759. DOI: 10.1016/S0140-6736(19)30417-9.
- [3] DAINESE P, WYNGAERT K V, DE MITS S, et al. Association between knee inflammation and knee pain in patients with knee osteoarthritis: a systematic review[J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2022, 30(4):516-534. DOI: 10.1016/j.joca.2021.12.003.
- [4] WOOLF A D, PFLEGER B. Burden of major musculoskeletal conditions[J]. *Bull World Health Organ*, 2003, 81(9): 646-656. DOI: 10.1590/S0042-96862003000900007.
- [5] SHARMA L. Osteoarthritis of the knee[J]. *N Engl J Med*, 2021, 384(1): 51-59. DOI: 10.1056/NEJMc1903768.
- [6] NÜESCH E, DIEPPE P, REICHENBACH S, et al. All cause and disease specific mortality in patients with knee or hip osteoarthritis: population based cohort study[J]. *BMJ*, 2011, 342: d1165. DOI: 10.1136/bmj.d1165.
- [7] MINTARJO J A, POERWANTO E, TEDYANTO E H. Current non-surgical management of knee osteoarthritis[J]. *Cureus*, 2023, 15(6): e40966. DOI: 10.7759/cureus.40966.
- [8] TSOKANOS A, LIVIERATOU E, BILLIS E, et al. The efficacy of manual therapy in patients with knee osteoarthritis: a systematic review[J]. *Medicina (Kaunas)*, 2021, 57(7):696. DOI: 10.3390/medicina57070696.
- [9] KATZ J N, ARANT K R, LOESER R F. Diagnosis and treatment of hip and knee osteoarthritis: a review[J]. *JAMA*, 2021, 325(6): 568-578. DOI: 10.1001/jama.2020.22171.
- [10] SELLAM J, COURTIES A, EYMARD F, et al. Recommendations of the French Society of Rheumatology on pharmacological treatment of knee osteoarthritis[J]. *Joint Bone Spine*, 2020, 87(6):548-555. DOI: 10.1016/j.jbspin.2020.09.004.
- [11] ATIK O Ş, HANGODY L R, TURAN S. Total versus unicompartmental knee arthroplasty[J]. *Jt Dis Relat Surg*, 2023, 34(2):235-236. DOI: 10.52312/jdrs.2023.57913.
- [12] DOSSETT H G, ARTHUR J R, MAKOVICKA J L, et al. A randomized controlled trial of kinematically and mechanically aligned total knee arthroplasties: long-term follow-up[J]. *J Arthroplasty*, 2023, 38(6S): S209-S214. DOI: 10.1016/j.arth.2023.03.065.
- [13] DREVET S, FAVIER B, BRUN E, et al. Mouse models of osteoarthritis: a summary of models and outcomes assessment[J]. *Comp Med*, 2022, 72(1): 3-13. DOI: 10.30802/AALAS-CM-21-000043.
- [14] ALVES-SIMÕES M. Rodent models of knee osteoarthritis for pain research[J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2022, 30(6):802-814. DOI: 10.1016/j.joca.2022.01.010.
- [15] HULTH A. Does osteoarthrosis depend on growth of the mineralized layer of cartilage? [J]. *Clin Orthop Relat Res*, 1993(287):19-24. DOI: 10.1097/00003086-199302000-00004.
- [16] ZEIGHAMI A, DUMAS R, AISSAOUI R. Knee loading in OA subjects is correlated to flexion and adduction moments and to contact point locations[J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1):8594. DOI: 10.1038/s41598-021-87978-2.
- [17] VAN TUNEN J A, DELL'ISOLA A, JUHL C, et al. Biomechanical factors associated with the development of tibiofemoral knee osteoarthritis: protocol for a systematic review and meta-analysis[J]. *BMJ Open*, 2016, 6(6): e011066. DOI: 10.1136/bmjopen-2016-011066.
- [18] ZHANG K J, LI L, YANG L F, et al. Effect of degenerative and radial tears of the *Meniscus* and resultant meniscectomy on the knee joint: a finite element analysis[J]. *J Orthop Translat*, 2019, 18:20-31. DOI: 10.1016/j.jot.2018.12.004.
- [19] LEEMAN M F, CURRAN S, MURRAY G I. The structure, regulation, and function of human matrix metalloproteinase-13[J]. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2002, 37(3): 149-166. DOI: 10.1080/10409230290771483.
- [20] FAN A Y, WU G B, WANG J F, et al. Inhibition of fibroblast activation protein ameliorates cartilage matrix degradation and osteoarthritis progression[J]. *Bone Res*, 2023, 11(1):3. DOI: 10.1038/s41413-022-00243-8.
- [21] CHELLINI F, TANI A, PARIGI M, et al. HIF-1 α /MMP-9 axis is required in the early phases of skeletal myoblast differentiation under normoxia condition *in vitro* [J]. *Cells*, 2023, 12(24):2851. DOI: 10.3390/cells12242851.
- [22] GROEN S S, SINKEVICIUTE D, BAY-JENSEN A C, et al. A serological type II collagen neopeptide biomarker reflects cartilage breakdown in patients with osteoarthritis[J]. *Osteoarthr Cartil Open*, 2021, 3(4): 100207. DOI: 10.1016/j.oarto.2021.100207.
- [23] HU Q C, ECKER M. Overview of MMP-13 as a promising target for the treatment of osteoarthritis[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(4): 1742. DOI: 10.3390/ijms22041742.
- [24] YAO X D, SUN K, YU S N, et al. Chondrocyte ferroptosis contribute to the progression of osteoarthritis[J]. *J Orthop Translat*, 2021, 27:33-43. DOI: 10.1016/j.jot.2020.09.006.

(收稿日期: 2024-05-09 修回日期: 2024-10-10)

(本文编辑: 张俊彦, 丁宇菁, 富群华, 周晓铤)

[引用本文]

孙效容, 苏丹, 贵文娟, 等. 手术诱导大鼠中重度膝关节关节炎模型的建立与评价[J]. *实验动物与比较医学*, 2024, 44(6): 597-604. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.066.

SUN X R, SU D, GUI W J, et al. Establishment and evaluation of a moderate-to-severe knee osteoarthritis model in rats induced by surgery[J]. *Lab Anim Comp Med*, 2024, 44(6): 597-604. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.066.

应用 Triacsin C 构建新型高血糖肥胖小鼠心功能减退模型

赵小娜¹, 王鹏², 叶茂青³, 曲新凯¹

(1. 复旦大学附属华东医院心血管内科, 上海 200040; 2. 复旦大学附属中山医院心血管内科, 上海 200032; 3. 上海市老年医学临床重点实验室, 上海 200040)

[摘要] **目的** 应用长链酰基辅酶A合成酶1 (acyl-CoA synthetase long-chain family member 1, ACSL1) 抑制剂 Triacsin C 联合高脂饮食建立新的高血糖肥胖小鼠心功能减退模型, 以模拟肥胖相关2型糖尿病患者脂肪组织和心功能的变化。**方法** 将20只SPF级雄性C57BL/6J小鼠随机分为2组: Con组(对照组, 腹腔注射柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液)和TC组(实验组, 腹腔注射 Triacsin C)。连续注射4周后, 2组小鼠均给予高脂饲料喂养, 自实验开始每8周监测小鼠体重及糖耐量。以空腹血糖>8 mmol/L 或餐后2 h血糖>15 mmol/L 视为造模成功。观测2组小鼠左心室舒张末期内径 (left ventricular end-diastolic diameter, LVEDD)、左心室收缩末期内径 (left ventricular end-systolic diameter, LVESD)、舒张末期室间隔厚度 (end-diastolic interventricular septal thickness, EDIVS)、左心室射血分数 (left ventricular ejection fraction, LVEF) 和左心室短轴缩短分数 (left ventricular short-axis fractional shortening, FS) 等心功能指标的变化。HE染色后观测小鼠附睾白色脂肪组织 (white adipose tissue, WAT) 及背部棕色脂肪组织 (brown adipose tissue, BAT) 形态和面积的变化; 采用免疫荧光法分析棕色脂肪组织血管内皮标志蛋白CD31和棕色脂肪组织标志蛋白UCP1的变化; 采用蛋白质印迹法检测小鼠心肌组织中ACSL1表达的变化。**结果** Con组和TC组小鼠空腹血糖分别为 (8.14±1.43) mmol/L 和 (8.18±0.85) mmol/L ($P>0.05$), 餐后2 h血糖浓度分别为 (19.8±4.01) mmol/L 和 (22.60±3.97) mmol/L ($P<0.05$), 表明本研究中两组糖尿病小鼠模型均造模成功。与Con组相比, TC组小鼠葡萄糖耐量较差, LVEDD、LVEF和FS下降明显 ($P<0.05$), WAT及BAT面积明显增大 ($P<0.05$), CD31、UCP1的表达量明显减少 ($P<0.05$), 心肌组织ACSL1表达明显减少 ($P<0.05$)。**结论** Triacsin C联合高脂饮食制备新型高血糖肥胖小鼠心功能减退模型是可行的, 较单纯高脂饮食诱导2型糖尿病模型出现明显的棕色脂肪组织白色化、胰岛素抵抗及心功能减退现象。

[关键词] 动物模型; 长链脂酰辅酶A合成酶1; 棕色脂肪组织; 心功能减退; 小鼠

[中图分类号] R-332; Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2024)06-0605-08



Establishment of a New Hyperglycemic Obesity Cardiac Dysfunction Mouse Model with Triacsin C

ZHAO Xiaona¹, WANG Peng², YE Maoqing³, QU Xinkai¹

(1. Department of Cardiology, Huadong Hospital, Fudan University, Shanghai 200040, China; 2. Department of Cardiology, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China; 3. Shanghai Key Laboratory of Clinical Geriatric Medicine, Shanghai 200040, China)

Correspondence to: QU Xinkai (ORCID: 0000-0002-5000-6721), E-mail: qxkchest@126.com

[ABSTRACT] **Objective** This study aims to establish a novel hyperglycemic obesity mouse model by utilizing Triacsin C, an inhibitor of acyl-CoA synthetase long-chain family member 1 (ACSL1), combined with a high-fat diet, to simulate the changes in adipose tissue and cardiac function observed in patients with obesity-related type 2 diabetes. **Methods** Twenty adult SPF-grade male C57BL/6J mice were randomly

[基金项目] 复旦大学附属华东医院院级课题“SCFA通过抑制IL-1 β -NLRP3炎症小体产生减轻动脉粥样硬化”(H1297); 华东医院重点学科建设计划“临床医学研究中心-心血管内科”(LCZX2205)

[第一作者] 赵小娜(1989—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 老年冠心病的诊疗。E-mail: zxncardiac1224@163.com

[通信作者] 曲新凯(1972—), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 主任医师, 研究方向: 老年冠心病的诊疗。E-mail: qxkchest@126.com. ORCID: 0000-0002-5000-6721

divided into two groups: the Control group (injected intraperitoneally with citric acid-sodium citrate buffer, Con group) and the TC group (injected intraperitoneally with Triacsin C, TC group). After four consecutive weeks of intraperitoneal injections, both groups were fed high-fat diets. Body weight and glucose tolerance of the mice were assessed every eight weeks. The models were considered successful if fasting blood glucose exceeded 8 mmol/L or blood glucose was above 15 mmol/L two hours after glucose injection. Cardiac function, including ventricular end-diastolic diameter (LVEDD), left ventricular end systolic diameter (LVESD), end-diastolic interventricular septal thickness (EDIVS), left ventricular ejection fraction (LVEF), and left ventricular short-axis fractional shortening (FS), was measured by echocardiography. HE staining was used to detect the changes in epididymal white adipose tissue (WAT) and brown adipose tissue (BAT). Immunofluorescence technology was used to analyze changes in CD31 and UCP1 in BAT. ACSL1 expression in myocardial tissue was tested by Western blotting. **Results** The fasting blood glucose levels were (8.14±1.43) mmol/L in the Con group and (8.18±0.85) mmol/L in the TC group ($P>0.05$), and the 2-hour postprandial blood glucose levels were (19.8±4.01) mmol/L in the Con group and (22.60±3.97) mmol/L in the TC group ($P<0.05$). This indicated that both groups of diabetic mouse models were successfully established. Compared to the Con group, the TC group showed poor glucose tolerance; significant decreases in LVEDD, LVEF and FS ($P<0.05$); significant increases in WAT and BAT areas ($P<0.05$); significant decreases in CD31 and UCP1 expression ($P<0.05$); and a significant decrease in the expression of ACSL1 in myocardial tissues ($P<0.05$). **Conclusion** Compared with the high-fat diet-induced type 2 diabetes model, the new hyperglycemic obesity and cardiac dysfunction mouse model, created by the combination of Triacsin C and a high-fat diet, is feasible and allows for easier observation of brown adipose tissue whitening, insulin resistance and cardiac dysfunction.

[Key words] Animal model; Acyl-CoA synthetase long-chain family member 1; Brown adipose tissue; Cardiac dysfunction; Mice

糖尿病是一种以持续性高血糖及长期代谢紊乱为主要特征的疾病，其发病机制与遗传、代谢以及环境等多重因素有关^[1]。越来越多的研究表明，糖尿病是导致心脑血管死亡的高危因素，且对全球卫生系统经济产生了重大影响，糖尿病医疗支出约占世界卫生总支出的11.5%^[2-3]。因此，糖尿病在世界范围内引起高度重视。然而，糖尿病的发生、发展机制复杂，为了提高糖尿病的临床治愈率、减少心血管疾病相关并发症的发生，研究者不断研究该疾病的发生、发展机制，以探索新的治疗方法。因此，基于庞大而持续的科研需求，糖尿病动物模型的建立至关重要。

常见的糖尿病模型包括：胰岛素抵抗的啮齿类动物模型、胰岛细胞及功能破坏的啮齿类动物模型、胰岛素抵抗的非啮齿类动物模型、胰岛细胞或功能破坏的非啮齿类动物模型。胰岛素抵抗的啮齿类动物模型有基因突变的Zucker大鼠、ob/ob小鼠、db/db小鼠和我国自主研发的长爪沙鼠等模型。这类动物模型具有基因突变背景，在模拟大多数糖尿病患者群体的病理特征方面存在一定局限性^[4-6]；胰岛细胞及功能破坏的啮齿类动物模型有链脲霉素(streptozotocin, STZ)注射制备胰岛细胞破坏的1型糖尿病小鼠模型，这类

模型缺乏胰岛素抵抗^[7]；具有胰岛素抵抗的非啮齿类动物模型有与人类代谢表型极其相近的灵长类动物模型，然而，此类动物对福利伦理要求高，且具有饲养场地及费用的限制^[8]；胰岛细胞及功能破坏的1型糖尿病非啮齿类动物模型有胰腺切除的猪糖尿病模型，但这类动物模型常发生酮症酸中毒和感染等现象，从而导致实验动物的死亡^[9]。

长链酰基辅酶A合成酶1(acyl-CoA synthetase long-chain family member 1, ACSL1)是线粒体和内质网上的蛋白，其参与长链脂肪酸的转运代谢，促进长链脂肪酸进入细胞内，从而参与线粒体三羧酸循环。ACSL1通过氧化分解脂肪酸，最终产生二氧化碳、水和ATP，为心脏、脑组织等高能代谢器官提供能量代谢底物^[10]。Triacsin C (TC)是从金黄色链霉菌中分离出来的天然产物，它能抑制ACSL1的表达并干扰长链酰基辅酶A的转运，是常用的ACSL1抑制剂^[11]。既往研究表明，用反式脂肪酸干扰STZ诱导糖尿病小鼠脂肪酸代谢后，心肌ACSL1的表达代偿性增加，这提示ACSL1在糖尿病心肌能量代谢中起重要的调节作用^[12]。然而，ACSL1在饮食诱导的肥胖患者中，对代谢及心脏的影响如何，目前并无明确的研究报告。上

述模型不能准确模拟 ACSL1 功能减退的肥胖相关糖尿病患者的真实表现, 因此本研究利用 Triacsin C 联合高脂饮食来建立一个新的高血糖肥胖小鼠模型, 通过观察脂肪组织和心功能的变化, 探讨 ACSL1 对代谢及心功能的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠 20 只, 6 周龄, 平均体重为 (22.09 ± 1.42) g, 购自上海斯莱克实验动物有限公司 [SCXK (沪) 2017-005], 质量合格证编号为 20170005005249。小鼠于复旦大学附属中山医院 [SYXK (沪) 2016-0006] 的 SPF 级屏障设施内饲养并进行实验, 每笼 5 只, 行 12 h 明暗交替以模拟日夜转换。所有实验操作均经复旦大学附属中山医院实验动物管理委员会审核通过 (审批号 2019-030)。

1.1.2 主要试剂和仪器

Triacsin C (T4540-1MG) 购自美国 Sigma-Aldrich 公司; 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液 (XY51467-100 mL) 购自上海信裕生物科技有限公司; 异氟烷 (100 mL/瓶) 购自深圳市瑞沃德生命科技有限公司; 小动物超声仪器 (Visual_Sonics Vevo[®]770[™]) 购自加拿大 Visual_Sonics 公司; 血糖测试仪器 (HEA-232) 购自日本欧姆龙公司; 高脂饲料 (脂肪提供 60% 热量) 购自美国 Research Diet 公司; 葡萄糖粉剂 (SYPTT-25kg) 购自上海晶矿生物科技有限公司。10 g 葡萄糖溶于 50 mL 去离子水, 配成 20% 葡萄糖溶液。抗 ACSL1 一抗抗体 (9189S; Rabbit/IgG; Polyclonal) 购自美国 Cell Signaling Technology 公司; 抗 GAPDH 一抗抗体 (abs124037; Rabbit/IgG; Polyclonal) 购自上海爱必信生物科技有限公司; 山羊抗兔 IgG (LF102) 二抗抗体自购自上海雅酶生物医药科技有限公司; 山羊抗鼠 CD31 一抗抗体 (AF3628) 购自美国 R&D Systems 公司, 兔抗鼠解偶联蛋白 1 (uncoupling protein 1, UCP1) 一抗抗体 (ab23841) 购自美国 Abcam 公司。荧光标记抗鼠 IgG 二抗抗体 (Anti-Mouse CD45 eFluor[®]450, 48-0451-82) 购自美国 Invitrogen 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 动物分组

实验前, 20 只雄性 C57BL/6J 小鼠在设施内适应性饲养 2 周, 后续随机将其分为 2 组, 每组 10 只。Con 组即对照组, 腹腔注射柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液; TC 组

即实验组, 将 5 mg Triacsin C 溶于 100 mL 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液中, 以 5 mg/kg 体重腹腔注射 Triacsin C。连续注射 4 周后, 两组小鼠均给予高脂饲料喂养。研究人员自实验开始每 8 周测一次小鼠体重及鼠尾血糖, 若小鼠空腹血糖 > 8 mmol/L 或餐后 2 h 血糖值 > 15 mmol/L, 视为造模成功。

1.2.2 分组后小动物体重及糖耐量实验

所有 C57BL/6J 小鼠在进行称重及血糖测试前, 禁食 12 h, 之后用电子秤称量小鼠体重。根据小鼠体重腹腔注射 20% 葡萄糖水 (葡萄糖剂量为 2 g/kg 体重)。分别于葡萄糖注射后 0 min、30 min、60 min、90 min 和 120 min 使用血糖仪采集鼠尾部血并测量葡萄糖含量。

1.2.3 小动物心脏超声测试

分组后喂养 16 周, 对小鼠实施异氟烷吸入麻醉, 随后使用小动物超声系统 30-MHz 高频扫描探头采集实时心血管超声图像。二维超声指导下的胸骨旁左心室短轴 M 型超声心动图按标准测量: 左心室舒张末期内径 (left ventricular end-diastolic diameter, LVEDD), 左心室收缩末期内径 (left ventricular end-systolic diameter, LVESD), 舒张末期室间隔厚度 (end-diastolic inter ventricular septal thickness, EDIVS), 左心室射血分数 (left ventricular ejection fraction, LVEF), 左心室短轴缩短分数 (left ventricular short-axis fractional shortening, FS)。用标准心尖四腔观双平面 Simpson's 法获得左心室容量, 利用多普勒技术获得二尖瓣血流频谱, 测量左心室舒张早期峰值速度 (E 峰) 和左心房收缩期峰值速度 (A 峰), 据此计算 E 峰与 A 峰的比值。连续测量 5 个心动周期, 取平均值。以 LVEDD、LVESD、EDIVS、LVEF、FS 来评价心脏的收缩功能, 以 E/A 比值评价心脏的舒张功能。

1.2.4 脂肪组织切片及 HE 染色、免疫荧光染色

各组小鼠经过异氟烷吸入麻醉后, 通过眼球取血处死, 分别采集附睾白色脂肪组织 (white adipose tissue, WAT) 及背部棕色脂肪组织 (brown adipose tissue, BAT)。组织样本用 4% 多聚甲醛溶液固定 30 h, 进行脱水、包埋后, 连续冷冻切片, 进行 HE 染色和免疫荧光染色。用 Image J 软件进行图像分析, HE 染色后测量脂肪组织面积; 免疫荧光染色分析棕色脂肪组织血管内皮标志蛋白 CD31 和棕色脂肪组织标志蛋白 UCP1 的表达。

1.2.5 蛋白质印迹法检测

造模成功后, 各组分别取小鼠的心肌组织 0.05 g,

匀浆裂解后提取总蛋白,用BCA法测蛋白浓度,然后进行凝胶电泳,电泳时间为115 min,电泳结束后以350 mA恒流电进行转膜(120 min),再用5%牛血清白蛋白室温封闭30 min,加入抗ACSL1一抗(1:1 000稀释)于4℃孵育过夜。细胞总蛋白以GAPDH为内参,于室温孵育抗兔二抗(1:5 000稀释)2 h,缓冲液洗涤后用增强化学发光试剂曝光使胶片显影。

1.2.6 统计学方法

采用Graph Pad Prism 8.0软件进行统计分析。数据用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,两组间差异比较采用 t 检验。 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Triacsin C联合高脂饮食可成功获得高血糖肥胖小鼠模型

小鼠经腹腔注射Triacsin C后,分别给予高脂饮食喂养,在0周、8周、16周时,测量小鼠体重及葡萄糖耐量。结果如图1所示:高脂喂养8周、16周的TC组小鼠体重明显低于对照组($P<0.05$);高脂喂养8周时,

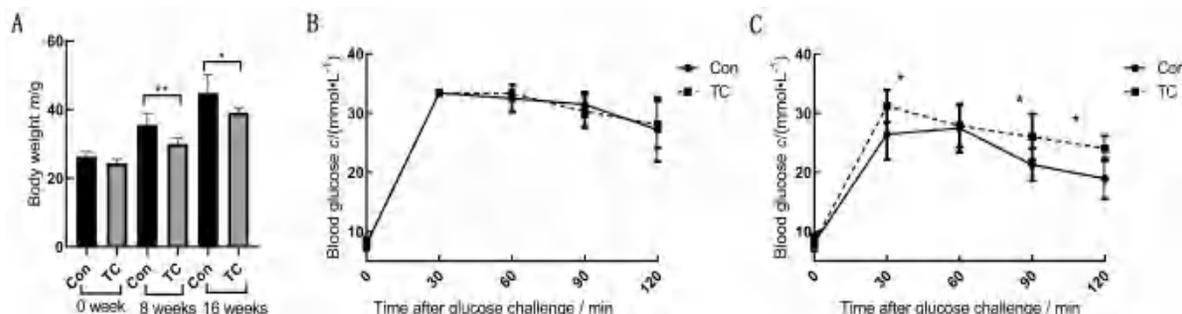
2组小鼠糖代谢无差异;高脂喂养16周时,2组小鼠的空腹血糖浓度差异不明显[分别为(8.14±1.43) mmol/L和(8.18±0.85) mmol/L, $P>0.05$],而TC组小鼠的餐后2 h血糖浓度明显高于对照组[分别为(22.60±3.97) mmol/L和(19.8±4.01) mmol/L, $P<0.05$]。

另外,2组小鼠比作者既往研究中常规饮食8周后小鼠体重[既往实验正常饮食,脂肪提供25%热量,小鼠体重为(28.34±2.27) g;而本研究中Con组小鼠体重为(45.82±6.01) g,TC组小鼠体重为(39.60±2.56) g]增加均超过20% ($P<0.05$),符合肥胖小鼠判断标准。

以上结果提示,本研究中2组糖尿病小鼠模型均造模成功,且TC组糖代谢紊乱更严重。

2.2 高血糖肥胖小鼠心肌ACSL1表达水平降低

小鼠经腹腔注射Triacsin C并接受高脂饮食16周后检测小鼠心肌组织中ACSL1表达的变化。蛋白质印迹法检测结果显示,与Con组相比,TC组小鼠心肌组织中ACSL1蛋白表达水平明显减少($P<0.05$),如图2所示。



注: Con为对照组;TC为实验组即Triacsin C腹腔注射组。A, Con组和TC组在高脂饮食0、8、16周时的体重变化($n=6$); B-C,分别为高脂饮食8周(B)、16周(C)时Con组和TC组的葡萄糖耐量变化($n=6$)。与对照组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

Note: Con is the control group; TC is the experimental group, i.e., the Triacsin C intraperitoneal injection group. A, Changes in body weight of the Con and TC groups at 0, 8, and 16 weeks of high-fat diet ($n=6$); B-C, Changes in the glucose tolerance of the Con and TC groups at 8 weeks (B) and 16 weeks (C) of high-fat diet, respectively ($n=6$). Compared to the control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

图1 高脂饮食喂养下小鼠体重及葡萄糖耐量变化

Figure 1 Changes in mouse weight and glucose tolerance after high-fat diet

2.3 高血糖肥胖小鼠模型的心功能减退

当高脂饮食16周后,实时心血管超声结果显示,TC组小鼠左心室舒张末期径(LVEDD)、左心室射血分数(LVEF)以及左心室短轴收缩率(FS)均较Con组明显下降($P<0.05$),如表1所示。

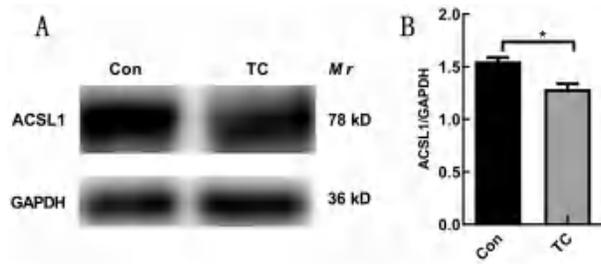
2.4 高血糖肥胖小鼠心功能减退模型中脂肪组织变化

在高脂饮食喂养16周后,HE染色结果显示,TC组附睾WAT及背部BAT面积变大($P<0.05$),如图3所

示。提示ACSL1抑制可以促进白色脂肪蓄积,棕色脂肪白色化,从而加剧葡萄糖代谢紊乱。

2.5 高血糖肥胖小鼠心功能减退模型中CD31及UCP1表达水平降低

将HE染色显示面积变化的2组小鼠背部BAT进行免疫荧光染色分析,结果发现,应用Triacsin C构建的高血糖肥胖小鼠心功能减退模型中,棕色脂肪组织血管内皮标志蛋白CD31和棕色脂肪组织标志蛋白UCP1表达量均较对照组显著减少($P<0.05$,图4)。



注：Con为对照组；TC为实验组即Triacsin C腹腔注射组。A，心肌组织ACSL1蛋白质印迹图像；B，心肌组织ACSL1蛋白质印迹定量分析 ($n=6$)。与对照组相比， $^*P<0.05$ 。

Note: Con is the control group; TC is the experimental group, i.e. the Triacsin C intraperitoneal injection group. A, Western blotting image of ACSL1 in cardiac tissue; B, Quantitative analysis of ACSL1 in cardiac tissue ($n=6$). Compared to the control group, $^*P<0.05$.

图2 不同组小鼠心肌组织中ACSL1表达的变化
Figure 2 Changes in ACSL1 expression in cardiac tissues of the different group of mice

3 讨论

本研究利用Triacsin C联合高脂饮食建立高血糖肥胖小鼠心功能减退模型，与传统STZ腹腔注射制造胰

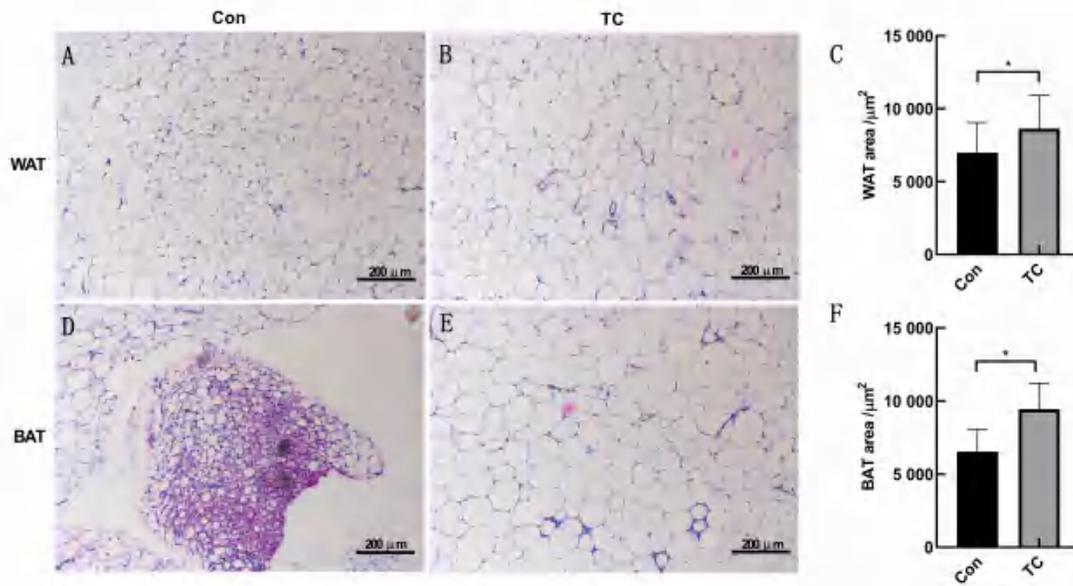
表1 各组小鼠心超检测结果

Table 1 Indexes of cardiac function in each group of mice measured by echocardiography

参数	对照组	实验组
Parameters	Con group	TC group
LVEDD/mm	3.59±0.12	3.06±0.36*
LVESD/mm	2.25±0.26	2.47±0.71
EDIVS/mm	0.93±0.15	1.02±0.14
LVEF/%	70.87±8.71	54.79±10.27*
FS/%	42.71±2.89	34.26±5.96*
E/A	1.32±0.20	1.62±0.36

注：LVEDD为左室舒张末期内径，LVESD为左室收缩末期内径，EDIVS为舒张末期室间隔厚度，LVEF为左室射血分数，FS为左室短轴缩短分数，E/A为左室舒张早期峰值速度E与左心房收缩期峰值速度A的比值。与Con组相比， $^*P<0.05$ 。

Note: LVEDD, left ventricular end-diastolic diameter; LVESD, left ventricular end-systolic diameter; EDIVS, end-diastolic interventricular septal thickness; LVEF, left ventricular ejection fraction; FS, left ventricular short-axis fractional shortening; E/A, ratio of left ventricular early diastolic peak velocity E to left atrial peak systolic velocity A. Compared with the control group, $^*P<0.05$.

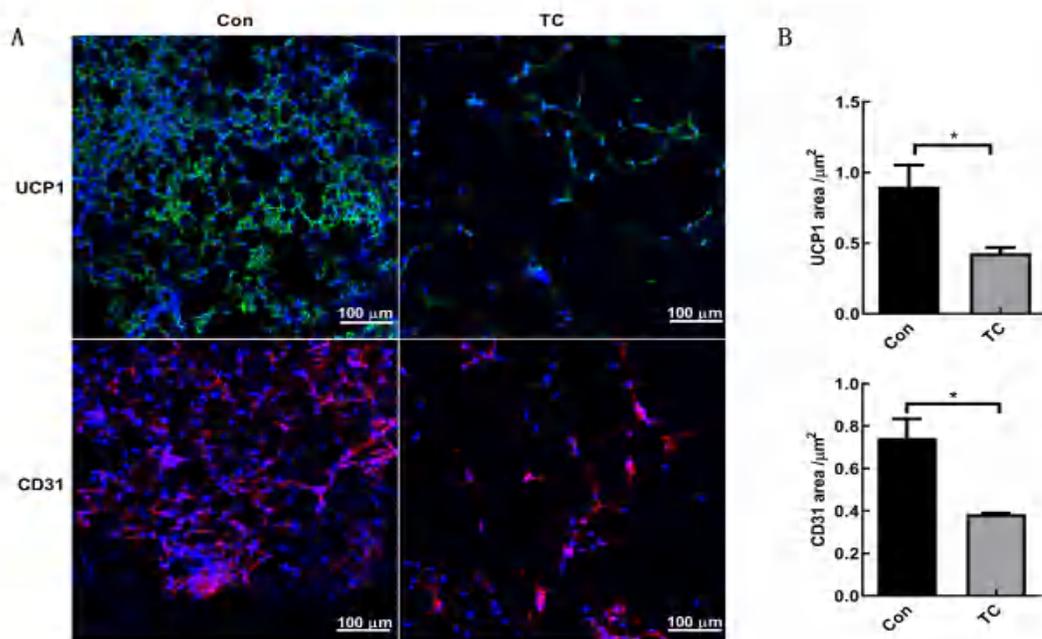


注：Con为对照组；TC为实验组即Triacsin C腹腔注射组。A~B，高脂饮食16周后，小鼠附睾白色脂肪组织（WAT）HE染色 ($n=6$, $\times 100$)；C，高脂饮食16周后，小鼠生殖腺周围白色脂肪组织（WAT）面积；D~E，小鼠背部棕色脂肪组织（BAT）HE染色 ($n=6$, $\times 100$)；F，高脂饮食16周后，小鼠背部棕色脂肪组织（BAT）面积。比例尺为200 μm 。与Con组相比， $^*P<0.05$ 。

Note: Con is the control group; TC is the experimental group, i.e. the Triacsin C intraperitoneal injection group. A-B, HE staining of epididymal white adipose tissue (WAT) after 16 weeks of high-fat diet ($n=6$, $\times 100$); C, Area of epididymal WAT of mice after 16 weeks of high-fat diet; D-E, HE staining of BAT after 16 weeks of high-fat diet ($n=6$, $\times 100$); F, Area of BAT after 16 weeks of high-fat diet. Scale bar is 200 μm . Compared to the control group, $^*P<0.05$.

图3 高脂饮食16周后各组小鼠脂肪组织病理变化

Figure 3 Pathological changes in adipose tissues in each group of mice after 16 weeks of high-fat diet



注: Con 为对照组; TC 为实验组即 Triacsin C 腹腔注射组。A, 棕色脂肪组织标志蛋白 UCP1 (绿色, $n=6$, $\times 200$), 血管内皮细胞标志蛋白 CD31 (红色, $n=6$, $\times 200$), 细胞核为蓝色, 比例尺为 100 μm ; B, CD31 和 UCP1 区域面积比较分析。与 Con 组相比, $^*P<0.05$ 。

Note: Con is the control group; TC is the experimental group, i.e., the Triacsin C intraperitoneal injection group. A, Staining of brown adipose tissue marker UCP1 (green, $n=6$, $\times 200$), and vascular endothelial cell marker CD31 (red, $n=6$, $\times 200$), with the cell nucleus stained blue (Scale bar is 100 μm); B, Analysis of CD31 and UCP1 marked area. Compared with the control group, $^*P<0.05$.

图4 各组小鼠棕色脂肪组织中CD31、UCP1的表达

Figure 4 Expression of CD31 and UCP1 in brown adipose tissues of different groups of mice

岛细胞破坏的1型糖尿病小鼠模型相比, 该模型可以较好地模拟临床代谢相关2型糖尿病心功能减退患者情况, 探究小鼠模型中脂肪组织的变化, 以期代谢性相关心血管疾病的机制研究提供新方向。

ACSL1是调节脂肪代谢的重要分子, 在肥胖相关糖尿病小鼠(如ob/ob小鼠)机体中, 其表达量增加以调节脂肪酸代谢及脂肪分布^[13]。Wang等^[14]研究提示, ACSL1被敲除后, 线粒体 β 氧化受到抑制, 使机体能量代谢底物供应减少。本研究中, TC组开始给药后, 与对照组相比, 小鼠体重增加无统计学意义, 提示Triacsin C的注射对体重无明显影响; 开始高脂喂养后, TC组小鼠的体重低于对照组, 这提示Triacsin C可抑制高脂饮食的氧化供能。由于心肌是高能代谢组织, ACSL1表达减少后, 心肌能量代谢底物的供应也减少, 结合心超和蛋白质印记结果, 本研究通过Triacsin C联合高脂饮食来建立新型心功能减退小鼠模型是切实可行的, 并且TC组小鼠心功能减退可能和Triacsin C抑制ACSL1的表达有关。

脂肪组织是机体重要的能量贮存组织之一, 脂质的过量摄入, 常通过WAT, 如皮下脂肪组织、附睾脂

肪组织的白色脂肪细胞进行脂质蓄积。当脂肪异常蓄积时, 可加剧胰岛素抵抗, 从而促进脂肪酸代谢紊乱及糖尿病的发生^[15]。与WAT不同, BAT主要分布于小鼠肩胛间区, 是一种含有大量血红蛋白和血红素卟啉且细胞呈棕色的一种脂肪组织。这种脂肪组织含有丰富的线粒体和血管, 线粒体膜上的UCP1能够促进经脂肪酸氧化产生的能量得到充分的利用, 故BAT可以促进产热供能, 减轻体重, 改善胰岛素敏感性。除此之外, BAT可通过内分泌或旁分泌作用, 释放一些蛋白和因子如外泌体生物活性酶iNOS、沉默复合体蛋白AGO1等, 调节心脏的收缩和舒张功能^[16-18]。既往有研究提示, 在糖脂代谢失调的人群中, 脂肪组织重构如BAT白色化, 可能是由于血管新生变少, BAT微循环障碍, 进而影响BAT的能量代谢及氧化应激, 从而加剧胰岛素抵抗造成的^[19-22]。CD31是常见的血管内皮细胞标记蛋白, UCP1是BAT标记蛋白^[23-24]。肥胖可导致BAT减少及功能异常, 可表现为UCP1表达的下调、脂滴聚集及线粒体的功能障碍, 即BAT白色化^[25]。本研究通过HE染色和定量分析发现, TC组小鼠在高脂饮食16周后, 其生殖腺周围WAT的面积较

Con 组明显增大,提示 TC 组脂肪蓄积加重。免疫荧光染色定性分析发现,TC 组 BAT 中 CD31 和 UCPI 的表达较 Con 组明显减少,提示 TC 组 BAT 发生白色化改变。因此, Triacsin C 联合高脂饮食建立的高血糖肥胖小鼠模型糖代谢紊乱加重,可能与背部 BAT 血管减少有关,从而导致 BAT 白色化,这进一步提示 ACSL1 对糖代谢有重要的调节作用。

综上所述, Triacsin C 联合高脂饮食建立一种新型高血糖肥胖小鼠心功能减退模型是切实可行的。本研究探究了该新型模型脂肪组织和心功能变化,这些变化可能和 Triacsin C 抑制心肌 ACSL1 表达以及棕色脂肪组织血管减少产生的白色化有关。本实验为代谢性心血管疾病机制的研究提供新的造模思路及研究方向。需要说明的是,本研究仅设立 Triacsin C 的单剂量实验组,缺少未饲喂高脂饮食的正常饮食小鼠空白对照组的各组数据,在后续的研究中将增加 Triacsin C 的不同剂量组及细胞实验,以进一步探究 Triacsin C 协同高脂饮食促进 BAT 白色化的分子机制。

[医学伦理声明 Medical Ethics Statement]

本研究涉及的所有动物实验均已通过复旦大学附属中山医院实验动物伦理委员会审批(审批号:2019-030)。所有实验过程均遵照中国实验动物相关法律法规条例要求进行。

All animal experiments involved in this study were reviewed and approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of Zhongshan Hospital Affiliated to Fudan University (Approval Number: 2019-030), and all experimental procedures were conducted in accordance with the relevant laws and regulations concerning experimental animals in China.

[作者贡献 Author Contribution]

赵小娜负责实验设计、实验实施、数据整理和分析、文章撰写;王鹏负责技术支持、数据分析;叶茂青负责实验指导、文章修改;曲新凯负责实验指导、经费获取。

[利益说明 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] TOMKINS M, LAWLESS S, MARTIN-GRACE J, et al. Diagnosis and management of central diabetes insipidus in adults[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2022, 107(10):2701-2715. DOI: 10.1210/clinem/dgac381.
- [2] ATILA C, LOUGHREY P B, GARRAHY A, et al. Central diabetes insipidus from a patient's perspective: management, psychological co-morbidities, and renaming of the condition: results from an international web-based survey[J]. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2022, 10(10):700-709. DOI: 10.1016/S2213-8587(22)00219-4.
- [3] REUREAN-PINTILEI D, POTCOVARU C G, SALMEN T, et al. Assessment of cardiovascular risk categories and achievement of therapeutic targets in European patients with type 2 diabetes[J]. *J Clin Med*, 2024, 13(8):2196. DOI: 10.3390/jcm13082196.
- [4] AL-AWAR A, KUPAI K, VESZELKA M, et al. Experimental diabetes mellitus in different animal models[J]. *J Diabetes Res*, 2016, 2016:9051426. DOI: 10.1155/2016/9051426.
- [5] 杜小燕, 李长龙, 王冬平, 等. 长爪沙鼠自发性糖尿病模型近交系培育及其生物学特性的研究进展[J]. *中国实验动物学报*, 2018, 26(4):507-511. DOI: 10.3969/j.issn.1005-4847.2018.04.016.
- [6] DU X Y, LI C L, WANG D P, et al. Research progress in the establishment of a spontaneous diabetic inbred gerbil and its biological characteristics[J]. *Acta Lab Animalis Sci Sin*, 2018, 26(4):507-511. DOI: 10.3969/j.issn.1005-4847.2018.04.016.
- [7] 唐艺丹, 王鲜忠, 张姣姣. II 型糖尿病动物模型构建的研究进展[J]. *中国实验动物学报*, 2020, 28(6):870-876. DOI: 10.3969/j.issn.1005-4847.2020.06.020.
- [8] TANG Y D, WANG X Z, ZHANG J J. Research progress in the construction of type II diabetes animal models[J]. *Acta Lab Animalis Sci Sin*, 2020, 28(6):870-876. DOI: 10.3969/j.issn.1005-4847.2020.06.020.
- [9] 崔淼, 朱春江, 刘向荣. 糖尿病动物模型构建的研究进展[J]. *中国实验诊断学*, 2023, 27(2):227-230. DOI: 10.3969/j.issn.1007-4287.2023.02.026.
- [10] CUI M, ZHU C J, LIU X R. Research progress on the construction of animal model of diabetes mellitus[J]. *Chin J Lab Diagn*, 2023, 27(2):227-230. DOI: 10.3969/j.issn.1007-4287.2023.02.026.
- [11] LUTZ T A. Mammalian models of diabetes mellitus, with a focus on type 2 diabetes mellitus[J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2023, 19(6):350-360. DOI: 10.1038/s41574-023-00818-3.
- [12] MARTÍN-CARRO B, DONATE-CORREA J, FERNÁNDEZ-VILLABRILLE S, et al. Experimental models to study diabetes mellitus and its complications: limitations and new opportunities[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(12):10309. DOI: 10.3390/ijms241210309.
- [13] REN G, BHATNAGAR S, HAHN D J, et al. Long-chain acyl-CoA synthetase-1 mediates the palmitic acid-induced inflammatory response in human aortic endothelial cells[J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2020, 319(5):E893-E903. DOI: 10.1152/ajpendo.00117.2020.
- [14] PRIOR A M, ZHANG M, BLAKEMAN N, et al. Inhibition of long chain fatty acyl-CoA synthetase (ACSL) and ischemia reperfusion injury[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2014, 24(4):1057-1061. DOI: 10.1016/j.bmcl.2014.01.016.
- [15] 赵小娜, 王聪, 申程, 等. 反式脂肪酸摄加重糖尿病小鼠脂代谢异常及初步机制研究[J]. *中国分子心脏病学杂志*, 2016, 16(2):1659-1663. DOI: 10.16563/j.cnki.1671-6272.2016.10.026.
- [16] ZHAO X N, WANG C, SHEN C, et al. Trans fatty acids aggravate lipid metabolism dysfunction in STZ-induced diabetic mice and its possible mechanism[J]. *Mol Cardiol China*, 2016, 16(2):1659-1663. DOI: 10.16563/j.cnki.1671-6272.2016.10.026.
- [17] MA Y J, ZHA J Y, YANG X K, et al. Long-chain fatty acyl-CoA synthetase 1 promotes prostate cancer progression by

- elevation of lipogenesis and fatty acid beta-oxidation[J]. *Oncogene*, 2021, 40(10): 1806-1820. DOI: 10.1038/s41388-021-01667-y.
- [14] WANG C H, SURBHI, GORAYA S, et al. Fatty acids and inflammatory stimuli induce expression of long-chain acyl-CoA synthetase 1 to promote lipid remodeling in diabetic kidney disease[J]. *J Biol Chem*, 2024, 300(1): 105502. DOI: 10.1016/j.jbc.2023.105502.
- [15] SANTORO A, KAHN B B. Adipocyte regulation of insulin sensitivity and the risk of type 2 diabetes[J]. *N Engl J Med*, 2023, 388(22):2071-2085. DOI: 10.1056/NEJMra2216691.
- [16] KOTZBECK P, GIORDANO A, MONDINI E, et al. Brown adipose tissue whitening leads to brown adipocyte death and adipose tissue inflammation[J]. *J Lipid Res*, 2018, 59(5): 784-794. DOI: 10.1194/jlr.M079665.
- [17] LIN J R, DING L L, XU L, et al. Brown adipocyte ADRB3 mediates cardioprotection via suppressing exosomal iNOS [J]. *Circ Res*, 2022, 131(2):133-147. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.121.320470.
- [18] TANG X F, MIAO Y F, LUO Y J, et al. Suppression of endothelial AGO1 promotes adipose tissue browning and improves metabolic dysfunction[J]. *Circulation*, 2020, 142(4): 365-379. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.119.041231.
- [19] WANG H D, SHEN L, SUN X T, et al. Adipose group 1 innate lymphoid cells promote adipose tissue fibrosis and diabetes in obesity[J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 3254. DOI: 10.1038/s41467-019-11270-1.
- [20] ADACHI Y, UEDA K, NOMURA S, et al. Beiging of perivascular adipose tissue regulates its inflammation and vascular remodeling[J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 5117. DOI: 10.1038/s41467-022-32658-6.
- [21] YIN T T, CHEN S, ZENG G H, et al. Angiogenesis-browning interplay mediated by asprosin-knockout contributes to weight loss in mice with obesity[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(24): 16166. DOI: 10.3390/ijms232416166.
- [22] CHOUCANI E T, KAZAK L, JEDRYCHOWSKI M P, et al. Mitochondrial ROS regulate thermogenic energy expenditure and sulfenylation of UCP1[J]. *Nature*, 2016, 532(7597):112-116. DOI: 10.1038/nature17399.
- [23] YANG Y, BEIGNEUX A P, SONG W X, et al. Hypertriglyceridemia in ApoA5-/- mice results from reduced amounts of lipoprotein lipase in the capillary lumen[J]. *J Clin Invest*, 2023, 133(23): e172600. DOI: 10.1172/JCI172600.
- [24] CHENG L, ZHANG S F, SHANG F, et al. Emodin improves glucose and lipid metabolism disorders in obese mice via activating brown adipose tissue and inducing browning of white adipose tissue[J]. *Front Endocrinol*, 2021, 12: 618037. DOI: 10.3389/fendo.2021.618037.
- [25] TANAKA Y, NAGOSHI T, TAKAHASHI H, et al. URAT1-selective inhibition ameliorates insulin resistance by attenuating diet-induced hepatic steatosis and brown adipose tissue whitening in mice[J]. *Mol Metab*, 2022, 55: 101411. DOI: 10.1016/j.molmet.2021.101411.

(收稿日期:2024-05-31 修回日期:2024-10-21)

(本文编辑:翟玉凤,富群华,张萍,丁宇菁)

[引用本文]

赵小娜,王鹏,叶茂青,等.应用Triacsin C构建新型高血糖肥胖小鼠心功能减退模型[J]. *实验动物与比较医学*, 2024, 44(6): 605-612. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.078.

ZHAO X N, WANG P, YE M Q, et al. Establishment of a new hyperglycemic obesity cardiac dysfunction mouse model with triacsin C[J]. *Lab Anim Comp Med*, 2024, 44(6): 605-612. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.078.

《实验动物与比较医学》2025年征订启事

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

本刊兼顾理论与实践、普及与提高,刊登实验动物科学和比较医学领域的研究及应用新成果、新进展、新信息。期刊内容主要涉及人类疾病动物模型、实验动物资源开发与利用、实验动物管理、实验动物福利与伦理、动物实验技术与方法、实验动物医学、比较医学方法研究,以及以实验动物为基础的生物医药各领域基础与应用研究。设置栏目或文章类型包括专家论坛、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

基于Duchenne型肌营养不良症动物模型的核酸药物与基因治疗研究进展

刘思雨¹, 赖跃昭¹, 郭文婷¹, 陈学进²

[1. 昆明理工大学灵长类转化医学研究院, 省部共建非人灵长类生物医学国家重点实验室, 昆明 650500; 2. 香港中文大学(深圳)医学院, 深圳 518172]

[摘要] Duchenne型肌营养不良症(Duchenne muscular dystrophy, DMD)是一种严重的X连锁隐性遗传疾病,由DMD基因突变引起,是最常见的遗传性肌营养不良类型之一。DMD基因是已知的人类基因组中最大的基因之一,编码抗肌萎缩蛋白(dystrophin)。目前已知的DMD基因突变类型复杂多样,包括外显子的缺失、重复、点突变,以及小片段插入或缺失等,为DMD的治疗带来了巨大挑战。目前尚无根治DMD的方法,其主要治疗手段以症状管理为主,且无法逆转或阻止疾病的进展。近年来,随着生物技术的进步,核酸药物和基因治疗成为DMD治疗研究的前沿领域。此类治疗方法旨在通过修复或替代突变的基因来恢复抗肌萎缩蛋白的表达,从而改善肌肉功能或延缓肌肉退化。在临床前动物模型研究和前期临床试验中,这些治疗方法已显现出一定的疗效,为DMD患者带来了新的希望。本文在简述DMD病理机制及遗传特征的基础上,详细介绍了DMD治疗领域的最新研究进展,特别聚焦于DMD核酸药物(包括基于外显子跳跃疗法的反义寡核苷酸药物和核糖体跳跃促进剂)以及基因治疗方法(包括基因替代疗法和基因编辑疗法)。这些治疗方法的开发和应用不仅为DMD患者提供了新的治疗选择,也为其他遗传性疾病的治疗积累了宝贵经验。然而,DMD治疗的临床转化也面临诸多挑战,未来研究需要进一步优化现有的治疗方法,提高治疗的有效性和适用性,同时探索新的治疗策略,以期DMD患者带来更有效且可持续的治疗方案。

[关键词] Duchenne型肌营养不良症; 抗肌萎缩蛋白; 核酸药物; 反义寡核苷酸; 基因治疗; 外显子跳跃

[中图分类号] R-332; R966 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2024)06-0613-13



Advances in Nucleic Acid Drugs and Gene Therapies based on Animal Models of Duchenne Muscular Dystrophy

LIU Siyu¹, LAI Yuezhao¹, GUO Wenting¹, CHEN Xuejin²

(1. State Key Laboratory of Primate Biomedical Research, Institute of Primate Translational Medicine, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, China; 2. School of Medicine, The Chinese University of Hong Kong, Shenzhen 518172, China)

Correspondence to: GUO Wenting (ORCID: 0000-0002-1370-7764), E-mail: guowt@lpbr.cn;

CHEN Xuejin (ORCID: 0009-0001-1500-8721), E-mail: chenxuejin@cuhk.edu.cn

[ABSTRACT] Duchenne muscular dystrophy (DMD) is a severe X-linked recessive genetic disorder caused by mutations in the *DMD* gene, making it one of the most common forms of hereditary muscular dystrophy. The *DMD* gene, which encodes dystrophin, is the largest known gene in the human genome. Mutations in the *DMD* gene are highly diverse, including exon deletions, duplications, point mutations, and small insertions or deletions, posing significant challenges for treatment. Currently, there is no cure for

[基金项目] 2024年度云南省高校服务重点产业科技项目“利用猴模型评价Utrophin基因激活疗法的有效性和安全性研究”(FWCY-ZD2024006)

[第一作者] 刘思雨(2001—),女,硕士研究生在读,研究方向:Duchenne型肌营养不良疾病机制。E-mail: abc2597456565@163.com;

赖跃昭(1999—),男,硕士,研究方向:遗传疾病机制。E-mail: laiyuezhao@163.com

[通信作者] 郭文婷(1987—),女,博士,助理研究员,研究方向:遗传疾病机制及治疗。E-mail: guowt@lpbr.cn。ORCID: 0000-0002-1370-7764;

陈学进(1960—),男,博士,教授,研究方向:实验动物学。E-mail: chenxuejin@cuhk.edu.cn。ORCID: 0009-0001-1500-8721

DMD, and existing treatment strategies focus primarily on symptom management, which cannot reverse or halt disease progression. Advances in biotechnology position nucleic acid drugs and gene therapies at the forefront of DMD treatment research. These treatments aim to restore dystrophin expression by repairing or replacing mutated genes, thereby improving muscle function or slowing muscle degeneration. Preclinical studies in animal models and early-phase clinical trials demonstrate promising efficacy and offer new hope for DMD patients. This review briefly outlines the pathological mechanisms and genetic characteristics of DMD before delving into recent progress in therapeutic strategies, with a particular focus on nucleic acid drugs (including antisense oligonucleotides for exon skipping therapy and translation readthrough inducers) and gene therapy approaches (including gene replacement therapy and gene editing). The development and application of these therapies not only provide new treatment options for DMD patients, but also offer valuable insights for addressing other genetic disorders. However, numerous challenges impede the clinical translation of DMD treatments. Future studies must optimize existing therapeutic strategies, improve their efficacy and applicability, and explore innovative approaches to deliver more effective and sustainable treatments for DMD patients.

[Key words] Duchenne muscular dystrophy; Dystrophin; Nucleic acid drugs; Antisense oligonucleotides; Gene therapy; Exon skipping

Duchenne 型肌营养不良症 (Duchenne muscular dystrophy, DMD) 是一种 X 染色体连锁的神经肌肉疾病^[1], 主要罹患群体为男性, 以严重的肌肉萎缩、心肌病和肌酸激酶水平升高为特征。DMD 是最常见的儿童肌营养不良症之一, 在中国男婴中的发病率约为 1/3 853, 以此估算全国约有 70 000 名 DMD 男性患者^[2]。DMD 作为一种遗传性肌肉疾病, 患者常伴有学习和社交障碍及身体残疾, 生活质量降低, 且易出现心理问题。该病的医疗费用高昂, 持续治疗、康复服务和近期新开发但昂贵的基因疗法, 都会给患者家庭造成巨大的经济负担。此外, 药物不良反应和长期护理需求会进一步增加医疗成本和社会压力。DMD 临床表现通常在儿童早期出现, 包括运动发育迟滞、进行性肌无力和运动功能障碍等症状; 患者青春期后逐渐丧失行走能力, 约在 20~30 岁因心肺衰竭而死亡^[3]。

目前 DMD 患者的标准治疗方法包括皮质类固醇治疗、物理治疗和心肌病治疗等。其中, 皮质类固醇治疗主要通过抗炎、调节免疫等起效, 可一定程度上延缓病情, 但存在骨密度下降、代谢异常、肾上腺功能受损、血压升高、体重增加、发育不良等显著不良反应, 且无法从根本上治疗疾病^[4]。同时, 用药患者会产生明显的药物依赖性, 一旦停药, 病情可能会加速恶化。因此, 患者往往需要长期服药, 而这又增加了药物累积性不良反应发生的风险。物理治疗仅能改善患者的运动功能, 减缓肌肉萎缩或挛缩的进程, 但无法修复受损的基因或恢复抗肌萎缩蛋白 (dystrophin)

的功能, 无法影响疾病的病理根源。晚期 DMD 患者肌肉萎缩严重、功能受限, 物理治疗的效果大幅下降。而且物理治疗的效果多为短期, 需长期坚持才能延续疗效, 这容易给患者和家庭造成较大负担, 患者的依从性也会显著影响治疗效果。因此, DMD 治疗亟需开发更先进的治疗方法。

近年来, 核酸药物和基因治疗凭借其精准性和靶向性, 展现出治疗 DMD 的巨大潜力, 成为 DMD 治疗研究的前沿方向。本文旨在总结核酸药物和基因治疗的研究进展, 阐明其治疗 DMD 的机制和临床转化价值, 并探讨其面临的挑战和未来的发展方向。

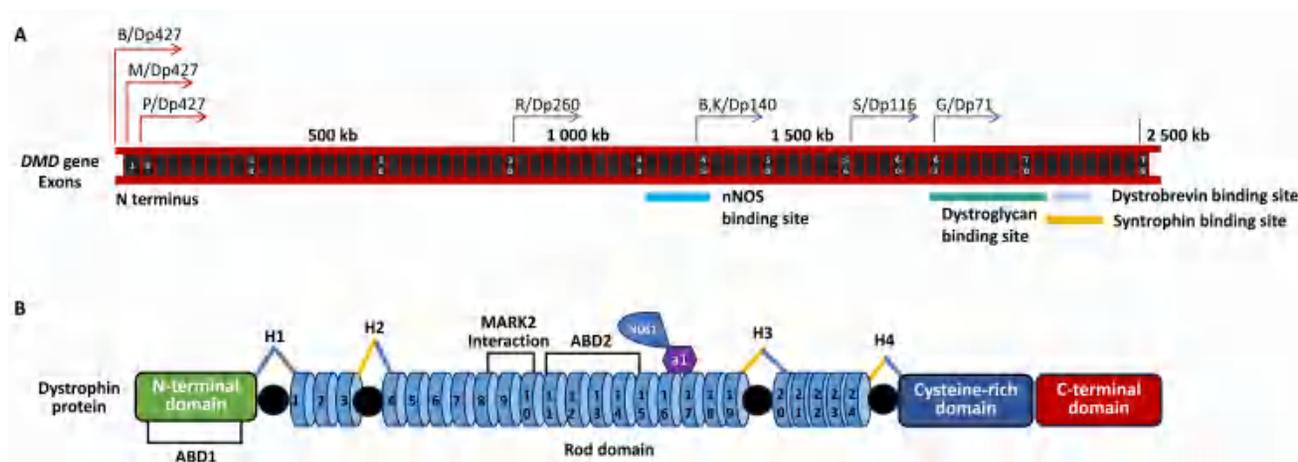
1 DMD 病理机制及遗传特征

基于动物模型的研究表明, 抗肌萎缩蛋白是肌细胞中肌动蛋白细胞骨架和细胞外基质的重要组成部分, 其缺失会导致肌纤维受损和丢失。而且作为抗肌萎缩糖蛋白复合体 (dystrophin-glycoprotein complex, DGC) 的一部分, 抗肌萎缩蛋白缺乏会破坏肌细胞膜的稳定性, 进而导致肌肉退化^[5]。编码抗肌萎缩蛋白的基因为 *DMD* 基因, 包含 79 个外显子。目前已知的 *DMD* 基因突变多达上千种。约 70% 的 DMD 患者的 *DMD* 基因突变类型为大片段缺失, 另外 30% 为片段重复、点突变、小片段插入或缺失等类型^[6]。大多数外显子缺失或重复突变聚集在外显子 6 和 7 以及外显子 43 和 53 之间的两个热点区域, 而其他突变则在 *DMD* 基因上随机发生。这些突变通常会导致开放阅读框 (open reading

frame) 的移位, 进而形成终止密码子, 使得肽链合成提前终止并产生截短的、无功能的抗肌萎缩蛋白^[7]。

抗肌萎缩蛋白的相对分子质量为 4.27×10^5 , 包含3 685个氨基酸, 由4个不同的功能域组成: N端结构域(N-terminal domain, NTD)、中央杆状结构域(rod domain, RD)、富含半胱氨酸结构域(cysteine-rich domain, CRD)以及C端结构域(C-terminal domain, CTD)(图1)。NTD与肌动蛋白结合, 连接肌细胞骨架, 提供机械支撑^[8]。中央的杆状结构域存在许多重复和冗余的序列。研究表明, 删除部分中央结构域的抗肌萎缩蛋白仍能正常发挥功能^[9]。在贝克尔肌营养不良症(Becker muscular dystrophy, BMD)患者体内, 拥有部分中央结构域的抗肌萎缩蛋白仍能在一定程度上维持肌肉功能, 这为外显子跳跃和基因编辑治疗策

略提供了有力支持^[10]。正常肌肉组织中, 完整的糖蛋白复合物(dystrophin-associated glycoprotein complex, DAGC)通过连接细胞骨架、肌膜和细胞外基质, 维持肌膜的完整性。然而在DMD患者的肌肉组织中, 由于缺乏功能性抗肌萎缩蛋白, DAGC无法与肌动蛋白(Actin)和细胞外基质相互作用, 导致DAGC失去支撑功能。这会导致细胞膜稳定性降低, 钙离子内流增加, 以及氧化应激发生^[11], 进而诱导促炎性细胞因子的释放, 引发肌纤维出现炎症、变性坏死和纤维化, 损害肌肉细胞的再生能力, 形成恶性循环。此外, 受损的肌肉组织会被脂肪组织和纤维结缔组织取代, 导致肌肉功能丧失, 并伴随线粒体功能紊乱和血管缺血, 从而加剧代谢损伤, 最终加速疾病发展^[12]。



注: 本图根据文献^[13]内容绘制。

Note: This figure was adapted from reference^[13].

图1 *DMD*基因及其编码蛋白结构示意图

Figure 1 Schematic diagram of *DMD* gene and its encoded protein structure

2 DMD核酸药物研究进展

核酸药物是指低分子量、化学修饰的核酸分子, 可用于调控基因表达或修复遗传缺陷。由于结合了核酸药物的特异性和小分子药物的稳定性这两方面优势, 核酸药物在治疗遗传病、癌症和病毒感染中具有重要的应用价值。目前, 应用在DMD治疗上的核酸药物包括反义寡核苷酸(antisense oligonucleotides, ASOs)和核糖体跳跃促进剂(translation readthrough inducers)等。

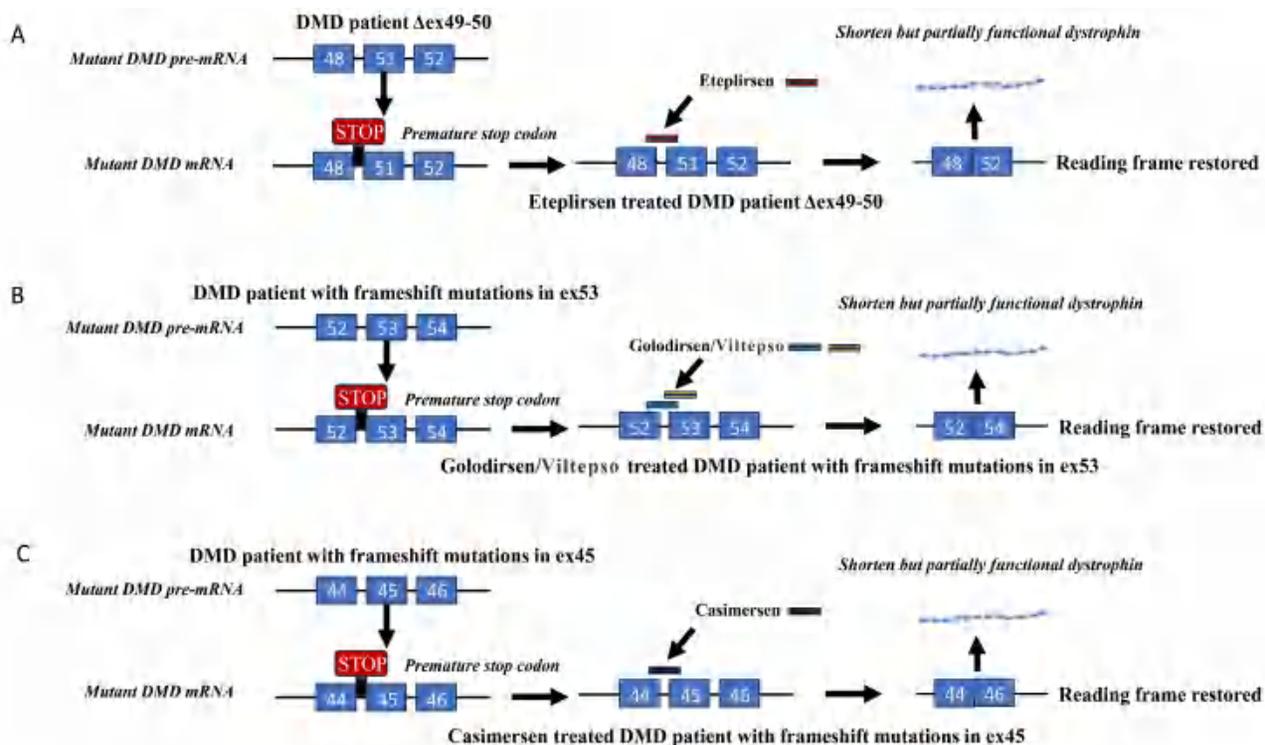
2.1 反义寡核苷酸类药物

DMD患者的基因突变通常包括*DMD*基因的外显子

缺失、重复或突变, 这些突变导致开放阅读框移位, 并提前形成终止密码子, 从而产生截短且功能丧失的抗肌萎缩蛋白^[14]。反义寡核苷酸药物主要通过外显子跳跃(exon skipping)技术来恢复*DMD*基因的阅读框, 从而表达功能性抗肌萎缩蛋白。虽然跳跃后的抗肌萎缩蛋白比正常的抗肌萎缩蛋白较短, 但其仍能维持肌肉细胞膜的稳定性, 改善肌肉功能, 并减缓肌肉退化的进程^[15]。外显子跳跃疗法是目前最有前途的治疗途径之一, 可用于治疗约60%~80%的DMD患者。目前, 几种反义寡核苷酸药物已获得美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)的批准: (1) Eteplirsen (Exondys 51) 诱导外显子51跳

跃, 治疗188周后肌肉组织中抗肌萎缩蛋白的表达水平低于正常水平约1%^[15]; (2) Golodirsen (Vyondys 53) 诱导外显子53跳跃, 治疗48周后抗肌萎缩蛋白的表达水平低于正常水平约1%^[16]; (3) Casimersen (Amondys 45) 诱导外显子45跳跃, 治疗48周后抗肌

萎缩蛋白的表达水平达到正常水平的1.7%^[17-18]; (4) Viltepso 诱导外显子53跳跃, 治疗25周后抗肌萎缩蛋白的表达水平低于正常水平约5.9% (该研究使用的抗肌萎缩蛋白表达水平检测方法与上述研究不同)^[22]。



注: A, Eteplirsen, 用于治疗缺失外显子49和50的DMD患者; B, Viltolarsen/Golodirsen, 用于治疗53号外显子发生移码突变的DMD患者; C, Casimersen, 用于治疗45号外显子中发生移码突变的DMD患者。本图根据文献[7]内容绘制。

Note: A, Eteplirsen, for DMD patients with deletion of exons 49 and 50; B, Viltolarsen/Golodirsen, for DMD patients with frameshift mutations affecting exon 53; C, Casimersen, for DMD patients with frameshift mutations affecting exon 45. This figure was adapted from reference [7].

图2 针对Duchenne型肌营养不良症DMD基因外显子跳跃疗法的作用机制

Figure 2 Mechanism of exon skipping therapy for DMD gene in Duchenne muscular dystrophy

2.1.1 Eteplirsen

Eteplirsen (商品名 Exondys 51) 由美国 Sarepta Therapeutics 公司开发, 是首个获得FDA批准用于治疗DMD的反义寡核苷酸药物。其通过磷酸二胺吗啡寡核苷酸 (phosphorodiamidate morpholino oligomer, PMO) 技术实现对51号外显子的跳跃, 从而恢复mRNA阅读框, 产生截短的抗肌萎缩蛋白^[19]。该药物已在食蟹猴和mdx小鼠上进行了临床前研究。其中一项食蟹猴研究显示, 最大剂量(320 mg/kg, 相当于人类100 mg/kg)的Eteplirsen经皮下或静脉注射具有良好耐受性, 未观察到显著的心血管、呼吸、神经或肾脏毒性; 随着剂量的增加, 肾脏细胞中嗜碱性颗粒/肾小

管和肾小管空泡化现象增多, 但这些变化会在恢复期自发逆转, 且未影响血清生化参数或肾功能^[20]。除此之外, 小鼠骨髓细胞微核试验结果显示, 与对照组相比, 注射剂量分别为5 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 或2 000 mg/kg的Eteplirsen药物没有毒性作用^[21]。以上动物模型研究中的安全性结果为Eteplirsen的I/II期临床试验的启动铺平了道路。

初步的临床试验结果表明, Eteplirsen可有效促进功能性抗肌萎缩蛋白的产生, 并增加6 min步行测试的距离^[22]。随后的随机、双盲、安慰剂对照试验进一步验证了Eteplirsen诱导产生的功能性抗肌萎缩蛋白的作用与能力^[23]。一项关于Eteplirsen长期治疗DMD的研

究显示,随着治疗时间的延长,抗肌萎缩蛋白阳性纤维的比例逐渐增加,从初期正常值的23%增加至更高水平;在第48周时,30 mg/kg剂量组的抗肌萎缩蛋白表达水平达到正常值的52%,而50 mg/kg剂量组达到正常值的43%^[24]。在接受Eteplirsen治疗的患者中,即使部分患者已经失去了行走能力,Eteplirsen治疗仍能维持他们的心脏和上肢功能,其他的疾病进展指标保持在相对稳定的状态^[25]。鉴于在接受Eteplirsen治疗的部分患者中观察到骨骼肌中抗肌萎缩蛋白表达量增加的积极成果,2016年9月19日,FDA批准了Eteplirsen用于DMD患者的治疗^[26]。Eteplirsen获批开创了多项“第一”,包括:第一个在美国获得批准用于治疗DMD的药物、第一个被批准用于调节剪接的寡核苷酸、第一个被批准的PMO^[27]。

Eteplirsen的成功不仅在于创新的治疗机制,还在于其通过严格的动物模型测试和临床试验验证了其安全性和有效性。这种从动物模型到人类患者的转化医学研究,体现了比较医学在药物开发和疾病治疗中的关键作用,为未来更多基于基因疗法的药物研发提供了宝贵的经验和启示。

然而,Eteplirsen的批准也伴随着争议。尽管Eteplirsen治疗在临床试验中显示出良好的恢复抗肌萎缩蛋白表达水平的能力,为DMD患者提供了一种新颖的、更有效的治疗选择^[28],但该批准主要是基于一项样本量相对较小且数据质量和数量均有限的临床研究,并且以抗肌萎缩蛋白表达水平的变化作为替代指标,而非直接验证药物的长期临床获益。这一批准引发了公众对FDA加速审批程序的担忧,特别是这种审批模式可能导致药物长期疗效和安全性评价不充分。此外,Eteplirsen的潜在不良反应(包括肾毒性和免疫反应的可能性)尚未在大规模研究中充分验证,其长期安全性和耐受性仍需进一步观察。尽管如此,Eteplirsen的获批仍然被视为DMD治疗领域中的一个重要里程碑,为未来开发更多的PMO治疗方法提供了宝贵的经验和数据。2023年一项最新的研究结果显示,通过精密化学修饰以识别更强的靶向结合位点的新一代反义寡核苷酸可以显著提高外显子51跳跃反义寡核苷酸的效率,在肌肉细胞培养和动物模型实验中显示出比早期药物更高的外显子跳跃水平和抗肌萎缩蛋白恢复水平。该研究证实,外显子跳跃治疗成功的关键因素是选择正确的反义寡核苷酸序列。该研究构建了一种系统性反义寡核苷酸筛选模型,该模型对潜在的外显子跳跃

效率和被挽救的抗肌萎缩蛋白水平进行定量分析,可以筛选出将在临床试验中测试的最佳反义寡核苷酸序列^[29]。

2.1.2 Golodirsen

Golodirsen(商品名Vyondys 53)也是一种基于PMO技术的核酸药物,同样由美国Sarepta Therapeutics公司开发。它能靶向诱导53号外显子发生跳跃,恢复DMD基因主要转录本的阅读框,产生截短但仍具部分功能的抗肌萎缩蛋白,从而减缓疾病发展^[30]。在比较医学研究中,Golodirsen的表现尤为引人注目。动物模型研究表明,与健康对照组相比,DMD患者的肌源性细胞以及mdx小鼠的肌纤维中,细胞核与细胞质之间的mRNA运输可能存在障碍,导致转录失衡,而Golodirsen治疗可以调节mRNA的转录失衡现象。在对来自25名参与者的成纤维细胞所展开的体外实验中,利用MyoD慢病毒进行诱导后,研究同样发现,Golodirsen能够显著恢复DMD发病过程中出现的mRNA转录不平衡^[31]。这些初步的体外和动物模型研究结果为Golodirsen的临床试验奠定了基础,提供了理论依据和初步的疗效证据。另一项研究结果表明,Golodirsen长期治疗对DMD患者表现出了一定的有效性和安全性。该研究包含I/II期临床试验,第一部分是为期12周的随机、双盲、安慰剂对照试验,随后又进行了9周的安全性审查;第二部分是对30 mg/kg的Golodirsen进行为期168周的安全性评估。结果显示,Golodirsen显著增加了抗肌萎缩蛋白的表达量,同时产生的不良反应通常很轻微且大多与药物无直接关系,未见患者因安全问题而中断治疗或死亡^[32]。

为期3年的随访研究发现,接受Golodirsen治疗的患者在6 min步行测试中基线距离减少了99.0 m,相比之下,对照组则减少了181.4 m($P=0.067$),并且在接受Golodirsen治疗后,依旧丧失行走能力的患者仅为9%^[32]。这表明Golodirsen具有很强的生物活性和长期安全性。另外需要说明,尽管FDA在2019年加速批准了Golodirsen用于DMD治疗,但其批准过程也很曲折,主要是由于存在治疗相关的感染风险以及在动物模型实验中发现的肾毒性^[33]。综上所述,尽管存在一些争议和挑战,但更多的研究数据显示Golodirsen可以为DMD患者提供一种潜在的治疗选择。

从比较医学的角度来看,Golodirsen的研究和开发过程凸显了动物模型在预测药物疗效和安全性方面的价值。动物模型研究中的积极结果不仅为Golodirsen的

临床应用提供了有力支持,而且临床试验的成功反过来证实了动物模型研究的预测价值。这种从实验室到临床的转化过程,不仅验证了Golodirsen的治疗潜力,也为DMD患者带来了新的治疗希望,并展示了比较医学在推动精准医疗和个性化治疗方面的重要作用。

2.1.3 Casimersen

Casimersen (商品名Amondys 45)同样由美国Sarepta Therapeutics公司开发,适用于DMD基因的第45号外显子跳跃,可以治疗大约8%的DMD患者。在临床前动物实验中,研究者通过每周静脉注射1次不同剂量(0、100、300、900 mg/kg)的Casimersen给幼年大鼠,持续10周,以评估其安全性。结果显示,在最高剂量下可观察到大鼠肾小管退化,但未观察到对生殖系统、发育系统和免疫功能的影响^[34]。这一发现提示在临床应用中,需要对Casimersen的剂量和潜在的肾脏毒性进行密切监控。2020年开展了一项针对所有接受Casimersen治疗的DMD患者长达144周的随访研究。该研究提供了关于Casimersen在长期治疗中安全性和有效性相关的宝贵信息,对于评估其是否能作为DMD治疗的有效策略起到了至关重要的作用^[35]。该研究结果显示,Casimersen在促进抗肌萎缩蛋白表达和延缓疾病发展方面具有一定的疗效。2021年2月,FDA批准Casimersen用于DMD治疗^[18],标志着Casimersen在临床应用中迈出了重要一步。然而,其长期治疗的有效性和广泛的适用性仍需通过进一步的研究和临床试验来确定,目前正在进行的Ⅲ期临床试验预计于2026年结束。

从比较医学的角度来看,Casimersen的研究和开发过程体现了动物模型在药物开发中的关键作用。动物模型不仅帮助研究者评估了药物的安全性,而且在预测药物对人类的潜在疗效方面发挥了重要作用。这种跨物种的比较研究,不仅可以为从实验室到临床的转化提供科学依据,同时也能够指出药物开发和临床试验中需要注意的关键问题,如剂量选择和不良反应监测。目前正在进行的Ⅲ期临床试验预计在2026年结束,将进一步验证Casimersen在人类患者中的安全性和有效性,并为其在临床治疗中的应用提供更坚实的证据。

2.1.4 Viltepsso

Viltepsso (商品名Viltolarsen)也是一种PMO药物,由美国Sarepta Therapeutics公司开发,通过跳过DMD基因中的第53号外显子,促进功能性抗肌萎缩蛋白的表达。2020年8月12日,美国FDA通过加速审批程序

批准了Viltepsso用于治疗携带53号外显子DMD基因突变的DMD患者^[22],使其成为继Golodirsen之后第2个获得FDA批准的针对DMD的反义寡核苷酸疗法用药。在比较医学的视角下,Viltepsso的临床试验和动物模型研究提供了药物疗效和安全性的重要对比数据。在DMD临床试验方面,Viltepsso显示出了一定的疗效。2018年10月,在世界肌肉病学大会上公布的Ⅱ期临床试验结果显示,接受Viltepsso静脉注射治疗的DMD患儿在多个运动功能评估指标上取得了显著改善,包括10 m行走速度、6 min行走距离、从坐姿至起立的时间等,如从仰卧位到站立位的时间和跑步/步行10 m所需时间明显减少,表明Viltepsso注射液能够提高DMD患儿的体内抗肌萎缩蛋白水平,并增强肌肉力量^[22]。虽然临床试验过程中患者没有出现因剂量增加而发生的不良反应,但是在临床前动物模型研究中,通过对出生后第7天至第70天的幼年雄性小鼠每周静脉注射Viltolarsen(0、15、60、240 mg/kg或1 200 mg/kg),发现进行最高剂量注射后的雄性小鼠最终死于肾毒性;在240、1 200 mg/kg剂量组的存活动物中,肾小管效应(包括变性)的发生率和严重程度均呈剂量依赖性增加;而且在测试的最高剂量下观察到小鼠体重减少和性成熟延迟的现象^[36]。这些动物模型研究的结果提示,尽管Viltepsso在临床试验中未观察到肾毒性,但该药物可能具有潜在的肾毒性风险,尤其是在高剂量使用时。因此,在使用Viltepsso时需要密切监测患者的肾功能,并且需要进一步的临床研究来评估该药物的安全性。而且通过这种跨物种的比较医学研究,科学家和医生们可以更好地理解药物的作用机制,并为DMD患者提供更安全有效的治疗方案。

2019年6月29日,在美国奥兰多举行的DMD患者家长组织(Parent Project Muscular Dystrophy, PPMD)的年会上,日本新药研发部主管表示,Viltepsso静脉滴注液将进入Ⅲ期临床试验研究。2019年9月,日本新药株式会社正式提交了Viltepsso静脉滴注液新药上市的申请,并于2020年3月25日获得加速批准上市。总之,Viltepsso作为一种基于外显子跳跃治疗原理的药物,在DMD治疗领域展现出了积极的前景,其在临床试验中的良好疗效和安全性证明了其作为DMD治疗手段的潜力。需要说明,FDA批准Viltepsso用于特定基因突变的DMD患者时,要求进行额外的研究以确认其临床益处,并监测肾功能,提示该药物存在潜在的不良反应(如肾毒性风险)仍然不可忽视。针对不同基因突变类

型的DMD患者，可能需要设计更细致的治疗方案以实现最佳的治疗效果。未来的研究将进一步探索 Viltrepso 及其他类似药物在DMD治疗中的应用潜力和长期疗效。

综上，使用反义寡核苷酸进行外显子跳跃治疗是一种很有前景的DMD治疗策略。虽然反义寡核苷酸疗法的有效性已得到证实，但要将这种疗法更全面地应用于DMD患者，仍面临一些挑战，包括反义寡核苷酸因核酸酶抗性低而不稳定，以及组织吸收能力差等。最近有研究采用了一种新的治疗策略，即将反义寡核苷酸药物与反义寡核苷酸载体结合形成水凝胶微球，并通过肌肉内和动脉内注射的方式递送至经典的DMD动物模型mdx小鼠体内。该方法可恢复mdx小鼠体内抗肌萎缩蛋白的表达，并且与传统的直接注射法相比，使用水凝胶微球作为载体的方法显示出更高的治疗效率和更广泛的肌肉覆盖范围，还能够实现治疗效果的持续性，即使在停止治疗后抗肌萎缩蛋白表达和肌肉功能仍能得到维持^[37]。使用水凝胶微球作为载体的反义寡核苷酸药物结合的治疗策略在动物模型中显示出了良好的治疗效果和临床转化的潜力，其高效率、广泛的肌肉覆盖范围、持续的治疗效果以及良好的生物相容性都为其在DMD治疗中的临床应用提供了有力支持。随着进一步的研究和开发，这一策略有望为DMD患者提供一种新的、有效的治疗选择。

2.2 核糖体跳跃促进剂类药物

核糖体跳跃促进剂，如 Ataluren (Translarna™, 旧称 PTC124)，是一类重要的药物，它们能够通过促进核糖体跳过无义突变来延续蛋白质的合成。这些药物通过改变核糖体对终止密码子的识别，使得核糖体能够“跳跃”过错误的终止密码子，从而部分恢复抗肌萎缩蛋白的功能。Ataluren 是一种由美国 PTC Therapeutics 公司开发的口服小分子药物，通过阻断核糖体翻译过程中过早终止密码子 (premature termination codons, PTC) 的识别 (通读方法)，部分恢复功能性抗肌萎缩蛋白的表达，适用于约 10%~15% 的 DMD 患者^[38]。在比较医学的框架下，mdx 小鼠作为 DMD 研究的标准动物模型，为评估 Ataluren 的疗效提供了重要依据。在 mdx 小鼠的肌细胞体外实验中，Ataluren 能够显著提高抗肌萎缩蛋白的表达水平，达到正常对照的 35%；经过 2~8 周的 Ataluren 药物治疗后，mdx 小鼠的肌肉切片病理显示抗肌萎缩蛋白表达水平约为野生型小鼠的 20%~25%，已基本达到公认的恢复肌肉功能所需的表达水平^[39]，并在 I 期临床试验中

显示出良好的安全性。然而，在一项 48 周的 II b 期临床研究中，Ataluren 未能显示出显著疗效。在试验中，患者被随机分配接受口服 Ataluren (每天分 3 次服用) 或对照药剂。口服 Ataluren 的患者分为低剂量组和高剂量组，低剂量组 3 次给药剂量分别为 4、4、8 mg/kg，高剂量组 3 次给药剂量分别为 20、20、40 mg/kg。低剂量组患者在某些指标上显示出较慢的疾病进展，例如 6 min 步行测试中低剂量组的 DMD 患者步行距离增加了 29 m；但高剂量组的表现与对照组相似，甚至在某些情况下劣于对照组。因此，可以得出初步结论：Ataluren 在低剂量下可能对某些患者有一定的积极影响，但在高剂量下其疗效并不显著。这些研究结果提示 Ataluren 在临床试验中具有复杂表现，其疗效可能受多种因素影响，包括剂量、患者群体的选择等，从而导致 Ataluren 疗效仍存在争议^[40]。最近的一项 meta 分析表明，在卧床过渡阶段 (300 m≤6 min 步行距离<400 m) 的患者中，Ataluren 治疗组与对照组之间 6 min 步行距离从基线到第 48 周的变化具有显著的统计学差异^[41]。这一实验结果虽然展现出该药有效性的积极一面，但并未完全消除有关药物疗效的争议。基于上述争议，FDA 拒绝了 Ataluren 用于 DMD 治疗的申请。不过，该药已获得欧洲药品管理局 (European Medicines Agency, EMA) 批准用于 DMD 患者，并将其作为一种新的 DMD 治疗方法。比较医学研究强调了在药物开发过程中，动物模型和临床试验之间的差异和一致性。虽然动物模型为药物筛选和机制研究提供了重要信息，但它们不能完全预测药物在人类中的疗效和安全性。因此，临床试验仍然是评估药物有效性和安全性的金标准，而比较医学则为我们理解药物作用机制和跨物种差异提供了宝贵视角。

目前，一个名为 STRIDE (Strategic Targeting of Registries and International Database of Excellence) 的多中心药物注册项目正在对接受 Ataluren 治疗的非传统型 DMD 患者进行进一步评估。该项目旨在探讨 Ataluren 与标准治疗 (standard of care, SoC) 联合使用时的疗效，现有结果已经提示这种联合治疗确实能够延缓 DMD 患者的疾病发展^[42-43]。尽管 Ataluren 作为治疗 DMD 的一种潜在药物已获得部分批准，但要将其广泛应用于临床治疗，仍需通过更大规模的研究来评估其长期疗效和安全性。

上述 5 种代表性核酸药物的优缺点及特点总结见表 1，它们的研发历程见图 3。

表1 用于Duchenne型肌营养不良症治疗的代表性核酸药物总结

Table 1 Summary of representative nucleic acid drugs for treatment of Duchenne muscular dystrophy

药物名称 Drug name	适用DMD基因突变类型 Targeted DMD gene mutation type	优点 Advantage	缺点 Drawback
Eteplirsen	51号外显子缺失	首款获批的DMD治疗用反义寡核苷酸药物,安全性良好,肌肉功能改善具有长期稳定性	仅适用于51号外显子缺失突变,疗效提升有限 ^[44]
Golodirsen	53号外显子缺失	有效提高抗肌萎缩蛋白水平,每周静脉注射1次,给药方式方便且易于管理 ^[45]	适用范围有限,仅适用于53号外显子缺失突变,缺乏功能性结果报告 ^[7]
Viltolarsen	53号外显子缺失	与Golodirsen相比可更高效地提高抗肌萎缩蛋白水平,作用迅速;全球认可度高,获日本和美国批准	治疗周期长,与Golodirsen治疗范围重叠,患者覆盖面未扩大 ^[46]
Casimersen	45号外显子缺失	有效延缓疾病进展,安全性较高,风险低,可为患者提供新选择	尚无长期有效的数据,仅适用于45号外显子缺失突变 ^[47]



图3 针对Duchenne型肌营养不良症的核酸药物发展历史线

Figure 3 Development timeline of nucleic acid drugs for Duchenne muscular dystrophy

2.3 传统小分子药物和核酸药物的优点和局限性

小分子药物在治疗DMD疾病中展现出了广泛的应用潜力。其相对分子量通常低于900 Da,具有良好的细胞膜通透性,可与细胞内多种靶点(如酶、受体和核酸)相互作用,且靶点选择灵活,可作用于细胞内外多种通路。此外,小分子药物通常通过化学合成制备,生产和储存过程简单,稳定性较高,研发成本和周期相对较低,周期较短。与大分子药物相比,其给药途径具有非侵入性,可口服或注射,递送方便。然而,小分子药物的局限性也较为明显,其疗效往往局限于缓解病理症状,无法从根本上修复遗传缺陷。此外,长期用药可能引发不良反应,如骨密度下降、代谢异常等,还可能产生耐药性。

核酸药物能够精准地靶向DMD的分子病因,特别

是基因突变。这使得核酸药物具有高度的特异性,能够选择性地修复特定的外显子跳跃或无义突变,恢复功能性抗肌萎缩蛋白的表达,从而减缓或延缓疾病发展。相较于传统药物,核酸药物能够更直接地针对基因缺陷进行治疗,降低不可控的全身性不良反应的发生风险。尽管核酸药物在治疗DMD等遗传性疾病中展现出潜力,但也面临一系列挑战。首先,核酸药物的稳定性较差,易受核酸酶降解,导致药效减弱;此外,药物的组织渗透能力低,特别是在肌肉等目标组织中的传递效率有限,需要借助载体系统来提高传递效率;核酸药物的给药方式通常需要频繁注射,这可能影响患者的依从性,并且治疗过程中可能出现局部不良反应,如注射部位的疼痛或炎症。药物的高成本和复杂的生产工艺也是实际应用中的障碍。此外,虽然某些

药物能够部分恢复抗肌萎缩蛋白的表达,但效果往往有限,特别是在疾病晚期,难以完全逆转已发生的肌肉损伤,且长期疗效和安全性尚不完全明确。免疫反应和个体差异性也可能导致部分患者的治疗效果不尽如人意。因此,虽然核酸药物在DMD治疗中具有巨大前景,但其全面应用仍需解决以上技术和临床问题。

3 DMD基因治疗研究进展

基因治疗的目标是从根本上修复或替代缺陷的DMD基因,恢复抗肌萎缩蛋白的表达,理论上能够长期甚至永久改善病情。目前,基因治疗在基因替代和基因编辑领域取得了重要进展,并且各有侧重。基于微型基因递送和双载体系统的基因替代疗法适用性更广;基于成簇规律间隔短回文重复序列(clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR)及其相关蛋白9(CRISPR-associated protein 9, Cas9)的基因编辑法则具有更高的精准性,适用于小范围内的DMD基因外显子跳跃或修复。

3.1 基因替代疗法

基因替代疗法是DMD治疗中的重要策略,其核心功能是递送功能性DMD基因来弥补患者体内的基因缺陷。腺相关病毒(adeno-associated virus, AAV)因高感染效率、低免疫原性和多组织靶向性成为递送基因的首选载体。目前,AAV载体已被广泛用于递送人工设计的基因片段,尤其是在针对骨骼肌、膈肌和心肌等靶组织的基因替代治疗中显示出巨大的发展潜力。然而,由于DMD基因过大(超过11 kb),远超AAV载体的封装容量限制(约5 kb),因此用AAV载体直接递送完整的DMD基因面临技术限制。为克服这一问题,研究人员提出了两种主要策略:微型基因递送和双载体系统。

3.1.1 微型DMD基因递送

微型DMD(mini-/micro-dystrophin)基因通过保留抗肌萎缩蛋白的关键功能结构域,将基因片段缩小至AAV载体容量范围内,从而实现递送。该策略在动物模型中已展现出良好的疗效。例如,2023年的一项研究利用AAV9载体递送微型DMD基因,在金毛犬肌营养不良(golden retriever muscular dystrophy, GRMD)模型中开展了临床前试验。结果显示, μ Dys5蛋白在骨骼肌和心脏中成功表达,显著改善了犬的肢体运动和呼吸功能,同时减少了组织病理损伤。尽管该治疗未能完全恢复金毛犬的正常表型,但实验组表现出良

好的药物耐受性,无显著不良反应。为降低免疫反应,该研究还优化了基因启动子的设计,使用肌肉特异性启动子代替了常用的人巨细胞病毒(cytomegalovirus, CMV)启动子,使微型DMD基因仅在肌肉组织中表达^[48]。这一改进不仅减少了非靶器官的免疫反应,还确保了在无免疫抑制剂干预的情况下,能够实现患者体内稳定的基因表达。这些成果表明,微型DMD基因递送是一种安全且有效的策略,为DMD患者带来了显著的治疗效果。然而,由于微型DMD基因不具备完整功能,在患者的肌肉功能恢复和病理改善方面疗效仍较为有限。这一发现提示我们,在将动物模型的研究成果转化为人类临床应用时,需要考虑基因治疗的局限性,并对治疗方案进行相应的调整和优化。比较医学研究强调了跨物种治疗策略的有效性和局限性,同时也指出了在动物模型中观察到的疗效可能不会完全适用于人类。因此,这些研究成果虽然为DMD患者带来了新的治疗希望,但在进入临床试验和最终应用于临床治疗之前,仍需进行深入的研究和评估。

3.1.2 双AAV载体递送方法

为克服微型DMD基因功能的局限性,另一种策略是采用双AAV载体系统,即用两个AAV载体分别携带DMD基因的不同片段,在体内通过同源重组实现完整或接近完整的抗肌萎缩蛋白表达。这一策略在早期研究中曾面临诸多技术挑战,如转基因重组效率低、启动子表达不均等问题,但2023年的一项最新研究在这些问题上取得了突破性进展。研究人员开发了一种改进的双AAV载体系统,不仅实现了高效的抗肌萎缩蛋白表达,还通过微滴式数字PCR(Droplet digital PCR, ddPCR)技术精确评估了体内转基因重组效率。结果表明,在mdx小鼠中全身递送双AAV载体后,显著恢复了肌肉中的抗肌萎缩蛋白表达,并极大改善了肌肉组织的病理特征^[49]。与单AAV载体方法相比,双AAV载体递送方法在重组效率和治疗效果上展现出显著优势,为DMD患者的基因替代治疗提供了新的可能性。

3.2 基因编辑疗法

3.2.1 CRISPR/Cas9技术在DMD小动物模型中的应用

CRISPR/Cas9基因编辑技术作为一种新型的基因组编辑工具,近年来在基因治疗和疾病修复领域获得了广泛关注。尤其是在DMD等遗传性疾病中,应用CRISPR/Cas9基因编辑技术可为修复DMD基因缺陷提

供有潜力的治疗方法。研究表明, CRISPR/Cas9 在多种 DMD 动物模型中已显示出积极的治疗效果。Long 等^[50] 通过 CRISPR/Cas9 技术对出生后的 DMD 小鼠进行基因修复, 部分恢复了抗肌萎缩蛋白的表达, 尽管该研究未能完全恢复抗肌萎缩蛋白表达至正常水平, 但所展现出的肌肉病理改善和功能恢复效果仍表明 CRISPR/Cas9 技术在 DMD 治疗方面具有较大的应用价值。该研究为临床上实施基因编辑治疗进行了有效的初步尝试, 尤其体现在出生后的基因治疗应用方面。Tabebordbar 等^[51] 则在 DMD 小鼠肌肉组织和肌肉干细胞中应用 CRISPR/Cas9 技术, 成功恢复了抗肌萎缩蛋白的表达。这一研究表明, CRISPR/Cas9 不仅能够直接编辑体内肌肉细胞中的 *DMD* 基因, 还能够通过修复肌肉干细胞来实现长效治疗, 并展现了恢复肌肉功能和改善组织病理的潜力。Nelson 等^[52] 应用 CRISPR/Cas9 技术修复 DMD 小鼠中的 *DMD* 基因突变, 有效提高了抗肌萎缩蛋白的表达水平, 并显著改善肌肉功能, 特别是在疾病早期阶段。最近的一项研究采用静脉注射法递送 CRISPR/Cas9 基因编辑载体至新生 mdx 小鼠, 针对 55 号外显子采用了 3 种不同的基因编辑策略: 单个单向导 RNA (single guide RNA, sgRNA)、单个 sgRNA 和高剂量 sgRNA; 结果表明, 优化后的高剂量 sgRNA 策略能够有效恢复 mdx 小鼠体内抗肌萎缩蛋白的表达, 并且显著预防了早发性心脏衰竭^[53]。

3.2.2 CRISPR/Cas9 技术在 DMD 大动物模型及患者中的应用

与小鼠模型相比, 人的体型要大得多, 这意味着 CRISPR 基因编辑载体的递送量需要增加几个数量级。此外, 人体复杂的生物环境也可能导致脱靶效应增加、编辑效率降低以及免疫排斥反应增强。因此, 在进行人体临床试验前, 使用大型动物模型进行研究显得尤为重要。在这方面, Amoasii 等^[54] 将 Cas9 与 sgRNA 结合, 并利用 AAV 递送系统, 将 CRISPR/Cas9 技术成功应用于实验犬的心肌中, 成功恢复了动物心肌中抗肌萎缩蛋白的表达, 其水平可达到正常水平的 90%。这一研究证明 CRISPR/Cas9 基因编辑疗法在大型动物模型中的有效性, 但其临床转化潜力仍需要进一步验证。然而, 该研究尚无法明确治疗的长期安全性, 需进行长期的跟踪观察和评估, 以进一步了解治疗效果的持续性与安全性。Moretti 等^[55] 采用 CRISPR/Cas9 介导的外显子剪切方法, 恢复了 DMD 猪模型中的阅读框, 成功表达了截短的功能性抗肌萎缩蛋白, 并改善了猪的

骨骼和心肌功能。这一研究结果进一步提示 CRISPR/Cas9 技术在大型动物模型中应用的巨大潜力, 尤其是在基因编辑修复突变并恢复蛋白表达方面, 为治疗 DMD 带来了新的希望。

同时, 多个研究团队和制药公司也在积极探索 CRISPR/Cas9 在 DMD 临床治疗中的应用^[22]。例如, 美国 Sarepta Therapeutics 公司正在开展“SRP-9001”临床试验, 结合 AAV 载体和 CRISPR/Cas9 技术, 向 DMD 患者体内递送微型 *DMD* 基因, 初步数据显示其具有良好的疗效和安全性; 2020 年, 该公司还启动了针对外显子 51 的基因编辑疗法的 I 期临床试验, 受试者为 4 岁以上的 DMD 患者, 旨在评估该疗法的安全性、耐受性及其初步的疗效。预计在接下来的数年内, 将会有更多的临床试验验证其长期效果。此外, 美国 Editas Medicine 公司与 Allergan 公司也在开展针对 DMD 的基因编辑疗法项目, 名为“EDIT-101”, 旨在通过 CRISPR/Cas9 技术修复 *DMD* 基因中的外显子缺失, 初步结果已表明 CRISPR/Cas9 能有效恢复抗肌萎缩蛋白的表达; 2021 年, 美国 Editas Medicine 公司宣布将在美国和欧洲启动 EDIT-101 的 I 期临床试验, 评估其对 DMD 患者的安全性及初步疗效。预计该疗法将在 2024 年开始招募患者, 并持续监测。此外, 瑞士 CRISPR Therapeutics 公司与美国 Vertex Pharmaceuticals 公司的合作项目则聚焦于通过 CRISPR/Cas9 修复 *DMD* 基因中的外显子缺失, 以改善肌肉功能; 2023 年, 该项目已在其临床前动物模型中展示了基因编辑的治疗潜力, 并计划在未来几年启动临床试验。

通过观察不同动物模型对 CRISPR/Cas9 治疗的反应, 能够发现可能存在的物种特有差异, 这对于完善治疗方案和评估人类治疗的安全性极为关键。此外, 这些研究还能够使人们深入了解基因编辑技术在不同器官中的分布、持久性以及可能产生的不良反应, 为临床上的精确治疗提供了宝贵的数据。综上所述, 比较医学的研究不仅可以推动 CRISPR/Cas9 技术从实验室研究向临床应用的转化, 而且为 DMD 患者带来了更加精确和个性化的治疗新希望。

3.3 基因治疗的优势与局限性

基因治疗的最大优势在于能够从根本上修复或替代缺陷 *DMD* 基因, 从而恢复抗肌萎缩蛋白的功能, 具有潜在的长期或永久疗效。因此, 基因治疗在 DMD 治疗中展现出了显著优势。通过外显子跳跃疗法、基因替代和基因编辑等技术, 基因治疗可针对患者特定的

突变类型实现个性化治疗。然而，基因治疗也面临诸多挑战，其中递送效率是关键瓶颈，目前AAV载体的肌肉组织靶向能力有待进一步提高。基因治疗的长期疗效与安全性同样需要关注。在人体中，基因治疗的可持续性及其潜在不良反应尚未得到充分验证。此外，脱靶效应、载体免疫原性以及治疗费用高昂等问题也限制了其应用范围。尽管如此，基因治疗为DMD提供了革命性的希望，后续若能在递送效率、安全性和成本控制等方面取得突破，将会实现更广泛的临床转化。

4 展望

虽然DMD核酸药物与基因治疗在临床转化和未来发展展现出巨大的潜力，但同时也面临诸多的挑战。特别是在临床试验中，个体死亡等重大事件的发生不容忽视。截至目前，一共报道过2例DMD患者死亡病例，且都与基因治疗相关。其中一例是通过medRxiv预出版平台报告的：2021年12月，辉瑞公司在其1b期临床试验中发现，一名16岁的DMD患者在接受高剂量基因疗法-PF-06939926治疗后，因心源性休克死亡^[56]。这一事件引发了人们对基因治疗安全性的关注，尤其是在高剂量给药时潜在的免疫反应方面尚有潜在风险。因此，对基因治疗的风险与收益进行综合评估显得尤为重要。

联合疗法是DMD治疗的一个重要方向。联合使用核酸药物和小分子药物可以通过不同机制进行双重干预。例如，核酸药物可以修复突变引起的翻译缺陷，而小分子药物则可以提升蛋白的稳定性或促进功能性的抗肌萎缩蛋白的合成，从而在多方面改善患者的肌肉功能，延缓病程。核酸药物通常有较强的靶向性，而小分子药物则可以降低免疫反应的风险，帮助减少基因治疗可能带来的免疫排斥反应。此外，小分子药物可通过减轻炎症和抑制纤维化，改善肌肉微环境，为基因治疗提供更佳的递送环境和肌肉功能恢复条件。基因编辑与抗炎药物联合在动物实验中已显示出协同效果。然而，联合治疗仍需优化药物剂量、递送时间窗及联合模式，同时也需要充分关注临床试验中联合用药的安全性和药物相互作用。DMD的临床转化还面临着个体化治疗的需求。突变类型多样性要求开发针对性治疗策略，而高昂的治疗费用及审批监管标准也限制了其广泛应用。

在未来，技术的发展将为DMD治疗带来更多希望，例如低免疫反应的非病毒载体、更高效的基因编辑工具的开发与应用，以及人工智能在加速药物设计

和基因疗法开发中的作用。而动物模型在从基础研究到临床应用的协同推进过程中同样具有重要的支撑作用，尤其是非人灵长类DMD模型在验证治疗效果方面具有不可或缺的作用。非人灵长类动物在DMD基因序列和表达调控上与人类高度相似。本课题组以往的研究结果表明，非人灵长类DMD模型在肌肉病理、纤维化、炎症反应和运动功能等方面表现出与人类DMD患者类似的病理特征，因此是评估上述DMD治疗方法有效性和安全性的最佳模型^[57]。同时还应加强基础与临床研究团队间的合作，共同推动研究成果的快速转化，最终制定更安全、高效和经济可行的治疗方案。

【作者贡献 Author Contribution】

刘思雨负责初稿写作并进行图表绘制；
赖跃昭负责初稿写作；
郭文婷、陈学进对文章内容进行指导与修改。

【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] BOCCANEGR A B, CAPPELLARI O, MANTUANO P, et al. Growth hormone secretagogues modulate inflammation and fibrosis in *mdx* mouse model of Duchenne muscular dystrophy[J]. *Front Immunol*, 2023, 14:1119888. DOI: 10.3389/fimmu.2023.1119888.
- [2] JAXYBAYEVA A, CHUNKAYEVA D, MYRZALIYEVA B, et al. Duchenne muscular dystrophy in Kazakhstan: a journey from diagnosis to the treatment, the biases and achievements[J]. *J Neuromuscul Dis*, 2023, 10(2): 263-269. DOI: 10.3233/JND-221559.
- [3] RICCI G, BELLO L, TORRI F, et al. Therapeutic opportunities and clinical outcome measures in Duchenne muscular dystrophy[J]. *Neurol Sci*, 2022, 43(Suppl 2): 625-633. DOI: 10.1007/s10072-022-06085-w.
- [4] FISCHER R, PORTER K, DONOVAN J M, et al. A mixed-method study exploring patient-experienced and caregiver-reported benefits and side effects of corticosteroid use in Duchenne muscular dystrophy[J]. *J Neuromuscul Dis*, 2023, 10(4):593-613. DOI: 10.3233/JND-221617.
- [5] DEN HARTOG L, ASAKURA A. Implications of Notch signaling in Duchenne muscular dystrophy[J]. *Front Physiol*, 2022, 13:984373. DOI: 10.3389/fphys.2022.984373.
- [6] KODIPPILI K, RUDNICKI M A. Satellite cell contribution to disease pathology in Duchenne muscular dystrophy[J]. *Front Physiol*, 2023, 14:1180980. DOI: 10.3389/fphys.2023.1180980.
- [7] SAIYULLAH, MOTOHASHI N, TSUKAHARA T, et al. Development of therapeutic RNA manipulation for muscular dystrophy[J]. *Front Genome Ed*, 2022, 4:863651. DOI: 10.3389/fgeed.2022.863651.
- [8] MIN Y L, BASSEL-DUBY R, OLSON E N. CRISPR correction of Duchenne muscular dystrophy[J]. *Annu Rev Med*, 2019, 70:

- 239-255. DOI: 10.1146/annurev-med-081117-010451.
- [9] OLSON E N. Toward the correction of muscular dystrophy by gene editing[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2021, 118(22): e2004840117. DOI: 10.1073/pnas.2004840117.
- [10] AARTSMA-RUS A, DE WAELE L, HOUWEN-OPSTAL S, et al. The dilemma of choice for Duchenne patients eligible for exon 51 skipping the European experience[J]. *J Neuromuscul Dis*, 2023, 10(3):315-325. DOI: 10.3233/JND-221648.
- [11] MAMSA H, STARK R L, SHIN K M, et al. Sarcospan increases laminin-binding capacity of α -dystroglycan to ameliorate DMD independent of Galgt2[J]. *Hum Mol Genet*, 2022, 31(5): 718-732. DOI: 10.1093/hmg/ddab276.
- [12] REID A L, ALEXANDER M S. The interplay of mitophagy and inflammation in Duchenne muscular dystrophy[J]. *Life (Basel)*, 2021, 11(7):648. DOI: 10.3390/life11070648.
- [13] KAMDAR F, GARRY D J. Dystrophin-deficient cardiomyopathy [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2016, 67(21): 2533-2546. DOI: 10.1016/j.jacc.2016.02.081.
- [14] MANINI A, ABATI E, NUREDINI A, et al. Adeno-associated virus (AAV)-mediated gene therapy for Duchenne muscular dystrophy: the issue of transgene persistence[J]. *Front Neurol*, 2021, 12:814174. DOI: 10.3389/fneur.2021.814174.
- [15] NOVAK J S, SPATHIS R, DANG U J, et al. Interrogation of dystrophin and dystroglycan complex protein turnover after exon skipping therapy[J]. *J Neuromuscul Dis*, 2021, 8(s2): S383-S402. DOI: 10.3233/JND-210696.
- [16] FRANK D E, SCHNELL F J, AKANA C, et al. Increased dystrophin production with golodirsén in patients with Duchenne muscular dystrophy[J]. *Neurology*, 2020, 94(21): e2270-e2282. DOI: 10.1212/WNL.00000000000009233.
- [17] SHIRLEY M. Casimersen: first approval[J]. *Drugs*, 2021, 81(7): 875-879. DOI: 10.1007/s40265-021-01512-2.
- [18] WILTON-CLARK H, YOKOTA T. Casimersen for Duchenne muscular dystrophy[J]. *Drugs Today*, 2021, 57(12):707-717. DOI: 10.1358/dot.2021.57.12.3352740.
- [19] HU G, CHEN C. Promising treatments for Duchenne muscular dystrophy: restoring dystrophin protein expression using nucleic acid therapeutics[J]. *Int J Drug Discov Pharmacol*, 2023: n.pag. DOI: 10.53941/ijddp.0201002.
- [20] SAZANI P, WELLER D L, SHREWSBURY S B. Safety pharmacology and genotoxicity evaluation of AVI-4658[J]. *Int J Toxicol*, 2010, 29(2):143-156. DOI: 10.1177/1091581809359206.
- [21] SAZANI P, NESS K P, WELLER D L, et al. Chemical and mechanistic toxicology evaluation of exon skipping phosphorodiamidate morpholino oligomers in mdx mice[J]. *Int J Toxicol*, 2011, 30(3): 322-333. DOI: 10.1177/1091581811403504.
- [22] HAPPI M, BAKAM C, LAMOTHE G, TREMBLAY J P. Therapeutic strategies for dystrophin replacement in Duchenne muscular dystrophy[J]. *Front Med*, 2022, 9:859930. DOI: 10.3389/fmed.2022.859930.
- [23] STIMPSON G, RAQUQ S, CHESSHIRE M, et al. Growth pattern trajectories in boys with Duchenne muscular dystrophy[J]. *Orphanet J Rare Dis*, 2022, 17(1):20. DOI: 10.1186/s13023-021-02158-9.
- [24] MENDELL J R, RODINO-KLAPAC L R, SAHENK Z, et al. Eteplirsén for the treatment of Duchenne muscular dystrophy[J]. *Ann Neurol*, 2013, 74(5): 637-647. DOI: 10.1002/ana.23982.
- [25] ALFANO L N, CHARLESTON J S, CONNOLLY A M, et al. Long-term treatment with eteplirsén in nonambulatory patients with Duchenne muscular dystrophy[J]. *Medicine*, 2019, 98(26): e15858. DOI: 10.1097/MD.00000000000015858.
- [26] TRAYNOR K. Eteplirsén approved for Duchenne muscular dystrophy[J]. *Am J Health Syst Pharm*, 2016, 73(21):1719. DOI: 10.2146/news160063.
- [27] AARTSMA-RUS A, KRIEG A M. FDA approves eteplirsén for Duchenne muscular dystrophy: the next chapter in the eteplirsén Saga[J]. *Nucleic Acid Ther*, 2017, 27(1): 1-3. DOI: 10.1089/nat.2016.0657.
- [28] MCDONALD C M, SHIEH P B, ABDEL-HAMID H Z, et al. Open-label evaluation of eteplirsén in patients with Duchenne muscular dystrophy amenable to exon 51 skipping: PROMOV trial[J]. *J Neuromuscul Dis*, 2021, 8(6):989-1001. DOI: 10.3233/JND-210643.
- [29] ECHIGOYA Y, LIM K R Q, TRIEU N, et al. Quantitative antisense screening and optimization for exon 51 skipping in Duchenne muscular dystrophy[J]. *Mol Ther*, 2017, 25(11):2561-2572. DOI: 10.1016/j.jymthe.2017.07.014.
- [30] ANWAR S, YOKOTA T. Golodirsén for Duchenne muscular dystrophy[J]. *Drugs Today*, 2020, 56(8):491-504. DOI: 10.1358/dot.2020.56.8.3159186.
- [31] Anon. Abstracts of the 12th UK neuromuscular translational research conference, 4th and 5th April 2019[J]. *J Neuromuscul Dis*, 2019, 6(s1): S1-S109. DOI: 10.3233/JND-190000.
- [32] SERVAIS L, MERCURI E, STRAUB V, et al. Long-term safety and efficacy data of golodirsén in ambulatory patients with Duchenne muscular dystrophy amenable to exon 53 skipping: a first-in-human, multicenter, two-part, open-label, phase 1/2 trial[J]. *Nucleic Acid Ther*, 2022, 32(1): 29-39. DOI: 10.1089/nat.2021.0043.
- [33] AARTSMA-RUS A, COREY D R. The 10th oligonucleotide therapy approved: golodirsén for Duchenne muscular dystrophy[J]. *Nucleic Acid Ther*, 2020, 30(2): 67-70. DOI: 10.1089/nat.2020.0845.
- [34] ASSEFA M, GEPFERT A, ZAHEER M, et al. Casimersen (AMONDYS 45™): an antisense oligonucleotide for Duchenne muscular dystrophy[J]. *Biomedicines*, 2024, 12(4): 912. DOI: 10.3390/biomedicines12040912.
- [35] VASTERLING M E, MAITSKI R J, DAVIS B A, et al. AMONDYS 45 (casimersen), a novel antisense phosphorodiamidate morpholino oligomer: clinical considerations for treatment in Duchenne muscular dystrophy[J]. *Cureus*, 2023, 15(12): e51237. DOI: 10.7759/cureus.51237.
- [36] CLEMENS P R, RAO V K, CONNOLLY A M, et al. Long-term functional efficacy and safety of viltolarsén in patients with Duchenne muscular dystrophy[J]. *J Neuromuscul Dis*, 2022, 9

- (4):493-501. DOI: 10.3233/JND-220811.
- [37] COHEN S A, BAR-AM O, FUOCO C, et al. *In vivo* restoration of dystrophin expression in mdx mice using intra-muscular and intra-arterial injections of hydrogel microsphere carriers of exon skipping antisense oligonucleotides[J]. *Cell Death Dis*, 2022, 13(9):779. DOI: 10.1038/s41419-022-05166-0.
- [38] POLITANO L. Read-through approach for stop mutations in Duchenne muscular dystrophy. An update[J]. *Acta Myol*, 2021, 40(1):43-50. DOI: 10.36185/2532-1900-041.
- [39] 刘延波, 徐乃军, 贾飞勇. Duchenne肌营养不良(DMD)发病机制及治疗研究进展[J]. *生命科学*, 2012, 24(4):354-361.
LIU Y B, XU N J, JIA F Y. The research progresses of Duchenne muscular dystrophy (DMD) in it's pathogenesis and therapy[J]. *Chin Bull Life Sci*, 2012, 24(4):354-361.
- [40] MICHOROWSKA S. Ataluren-promising therapeutic premature termination *Codon* readthrough frontrunner[J]. *Pharmaceuticals*, 2021, 14(8):785. DOI: 10.3390/ph14080785.
- [41] CAMPBELL C, BAROHN R J, BERTINI E, et al. Meta-analyses of ataluren randomized controlled trials in nonsense mutation Duchenne muscular dystrophy[J]. *J Comp Eff Res*, 2020, 9(14):973-984. DOI: 10.2217/cer-2020-0095.
- [42] MUNTONI F, DESGUERRE I, GUGLIERI M, et al. Ataluren use in patients with nonsense mutation Duchenne muscular dystrophy: patient demographics and characteristics from the STRIDE registry[J]. *J Comp Eff Res*, 2019, 8(14):1187-1200. DOI: 10.2217/cer-2019-0086.
- [43] MERCURI E, MUNTONI F, OSORIO A N, et al. Safety and effectiveness of ataluren: comparison of results from the STRIDE registry and CINRG DMD natural history study[J]. *J Comp Eff Res*, 2020, 9(5):341-360. DOI: 10.2217/cer-2019-0171.
- [44] FONTELONGA T M, JORDAN B, NUNES A M, et al. Sunitinib promotes myogenic regeneration and mitigates disease progression in the mdx mouse model of Duchenne muscular dystrophy[J]. *Hum Mol Genet*, 2019, 28(13): 2120-2132. DOI: 10.1093/hmg/ddz044.
- [45] SIRBU C A, IVAN R, AUTHIER F J, et al. Orphan drugs in neurology-a narrative review[J]. *J Pers Med*, 2023, 13(3):420. DOI: 10.3390/jpm13030420.
- [46] SHEIKH O, YOKOTA T. Advances in genetic characterization and genotype-phenotype correlation of Duchenne and Becker muscular dystrophy in the personalized medicine era [J]. *J Pers Med*, 2020, 10(3):111. DOI: 10.3390/jpm10030111.
- [47] COLLOTTA D, BERTOCCHI I, CHIAPPELLO E, et al. Antisense oligonucleotides: a novel Frontier in pharmacological strategy[J]. *Front Pharmacol*, 2023, 14:1304342. DOI: 10.3389/fphar.2023.1304342.
- [48] BIRCH S M, LAWLOR M W, CONLON T J, et al. Assessment of systemic AAV-microdystrophin gene therapy in the GRMD model of Duchenne muscular dystrophy[J]. *Sci Transl Med*, 2023, 15(677): eabo1815. DOI: 10.1126/scitranslmed.abo1815.
- [49] ALBINI S, PALMIERI L, DUBOIS A, et al. Assessment of therapeutic potential of a dual AAV approach for Duchenne muscular dystrophy[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(14):11421. DOI: 10.3390/ijms241411421.
- [50] LONG C Z, AMOASII L, MIREAULT A A, et al. Postnatal genome editing partially restores dystrophin expression in a mouse model of muscular dystrophy[J]. *Science*, 2016, 351(6271):400-403. DOI: 10.1126/science.aad5725.
- [51] TABEBORDBAR M, ZHU K X, CHENG J K W, et al. *In vivo* gene editing in dystrophic mouse muscle and muscle stem cells[J]. *Science*, 2016, 351(6271): 407-411. DOI: 10.1126/science.aad5177.
- [52] NELSON C E, HAKIM C H, OUSTEROUT D G, et al. *In vivo* genome editing improves muscle function in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy[J]. *Science*, 2016, 351(6271): 403-407. DOI: 10.1126/science.aad5143.
- [53] KUPATT C, WINDISCH A, MORETTI A, et al. Genome editing for Duchenne muscular dystrophy: a glimpse of the future? [J]. *Gene Ther*, 2021, 28(9): 542-548. DOI: 10.1038/s41434-021-00222-4.
- [54] AMOASII L, HILDYARD JCW, LI H, et al. Gene editing restores dystrophin expression in a canine model of Duchenne muscular dystrophy[J]. *Science*, 2018, 362(6410): 86-91. DOI: 10.1126/science.aau1549.
- [55] MORETTI A, FONTEYNE L, GIESERT F, et al. Somatic gene editing ameliorates skeletal and cardiac muscle failure in pig and human models of Duchenne muscular dystrophy[J]. *Nat Med*, 2020,26(2): 207-214. DOI: 10.1038/s41591-019-0738-2.
- [56] LEK A, WONG B, KEELER A, et al. Unexpected death of a Duchenne muscular dystrophy patient in an N-of-1 trial of rAAV9-delivered CRISPR-transactivator[*R/OL*]. medRxiv (Preprint), 2023. (2023-05-30) [2024-12-01]. <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2023.05.16.23289881v2>. DOI: 10.1101/2023.05.16.23289881.
- [57] REN S W, FU X, GUO W T, et al. Profound cellular defects attribute to muscular pathogenesis in the *Rhesus* monkey model of Duchenne muscular dystrophy[J]. *Cell*, 2024, 187(23): 6669-6686.e16. DOI: 10.1016/j.cell.2024.08.041.

(收稿日期:2024-11-13 修回日期:2024-12-04)

(本文编辑:张俊彦,富群华,丁宇菁,李文杰)

[引用本文]

- 刘思雨, 赖跃昭, 郭文婷, 等. 基于 Duchenne 型肌营养不良症动物模型的核酸药物与基因治疗研究进展[J]. *实验动物与比较医学*, 2024, 44(6): 613-625. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.168.
- LIU S Y, LAI Y H, GUO W T, et al. Advances in nucleic acid drugs and gene therapies based on animal models of Duchenne muscular dystrophy[J]. *Lab Anim Comp Med*, 2024, 44(6): 613-625. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.168.

大气细颗粒物 PM_{2.5} 暴露动物模型建立方法及在生殖毒性研究中的应用进展

田芳^{1,2}, 潘滨^{1,2}, 史佳怡¹, 徐燕意², 李卫华¹

(1. 上海市生物医药技术研究院, 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 200237; 2. 复旦大学公共卫生学院, 上海 200032)

[摘要] 大气细颗粒物 (particulate matter 2.5, PM_{2.5}) 是雾霾的主要成分, 对人类生殖健康的潜在影响已成为公共卫生领域的关注焦点。建立合适的动物模型对于深入开展 PM_{2.5} 暴露所引起的生殖毒性及其机制研究尤为关键。本综述基于近年来发表的相关文献, 总结了当前 PM_{2.5} 生殖毒性研究的动物模型建立方法和应用评价指标。PM_{2.5} 暴露的建模方法主要有全身吸入暴露和气管内滴注暴露。其中, 全身吸入暴露虽然能较好地模拟人体实际吸入环境, 但对实验设备要求高; 而气管内滴注方法虽然成本较低、操作简单, 却难以精确模拟 PM_{2.5} 在自然吸入过程中的分布和沉积。因此, 研究者在选择暴露方式时需综合权衡, 以提高造模的严谨性并尽可能真实地模拟人类暴露条件。本综述进一步总结 PM_{2.5} 暴露生殖毒性的应用评价指标, 发现雄性生殖毒性的评价指标主要有精子质量降低、睾丸组织结构损伤和激素水平失衡; 雌性生殖毒性的评价指标主要有卵巢储备功能降低、内分泌功能失衡、子宫内膜受损和围产期不良反应等。此外, 本综述提出: 需要关注 PM_{2.5} 的化合物成分分析, 探索含有不同化学成分如重金属和多环芳烃等颗粒物对生殖系统的作用靶点及机制; 还需要开展长期研究, 评估 PM_{2.5} 暴露对动物及其后代生殖健康的影响, 以预测人类可能面临的长期风险; 另外还应进行跨学科合作, 鼓励环境科学、毒理学、生殖医学等多学科间协作, 以综合评估 PM_{2.5} 的环境健康风险并为制定综合性的防治策略提供科学依据。本综述通过总结 PM_{2.5} 导致生殖功能异常的动物建模方法及其应用评价, 可为 PM_{2.5} 的生殖毒性研究提供方法学参考。

[关键词] 大气细颗粒物; PM_{2.5}; 生殖毒性; 动物模型

[中图分类号] R994.6; Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2024)06-0626-10



Advances in Development of PM_{2.5}-Exposed Animal Models and Their Application in Reproductive Toxicity Research

TIAN Fang^{1,2}, PAN Bin^{1,2}, SHI Jiayi¹, XU Yanyi², LI Weihua¹

(1. National Health Commission Key Lab of Reproduction Regulation, Shanghai Engineering Research Center of Reproductive Health Drug and Devices, Shanghai Institute for Biomedical and Pharmaceutical Technologies, Shanghai 200237, China; 2. School of Public Health, Fudan University, Shanghai 200032, China)

Correspondence to: LI Weihua (ORCID: 0000-0003-4596-9088), E-mail: iamliwehua@foxmail.com;

XU Yanyi (ORCID: 0000-0003-0270-2017), E-mail: yanyi_xu@fudan.edu.cn

[ABSTRACT] Atmospheric fine particulate matter (particulate matter 2.5, PM_{2.5}) is a major component of haze, and its potential hazards to human reproductive health have garnered widespread attention. Establishing appropriate animal models is crucial for in-depth research into the reproductive toxicity of PM_{2.5} exposure and its underlying mechanisms. This paper, based on recent literature, summarizes current

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目“线粒体蛋白疏基化修饰对精子运动的调控机制”(32270910); 上海市科技计划项目“乙酸避孕凝胶的 I 期临床研究”(22S11904900)

[第一作者] 田芳 (1985—), 女, 高级实验师, 博士研究生在读, 研究方向: 化学物的生殖发育毒性研究及新型生育调节药物的研发。E-mail: 376616808@qq.com;

潘滨 (1992—), 男, 博士研究生在读, 研究方向: 生殖相关药物的临床前药理与毒理学研究。E-mail: 18211020079@fudan.edu.cn

[通信作者] 李卫华 (1973—), 女, 博士, 研究员, 博士生导师, 研究方向: 化学物的生殖发育毒性研究和新型生育调节药物的研发。E-mail: iamliwehua@foxmail.com。ORCID: 0000-0003-4596-9088;

徐燕意 (1988—), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 大气污染物的毒性机制及跨代效应。E-mail: yanyi_xu@fudan.edu.cn。ORCID: 0000-0003-0270-2017

methods for establishing PM_{2.5}-exposed animal models and the evaluation criteria for reproductive toxicity research. The primary modeling methods for PM_{2.5} exposure include whole-body inhalation exposure and intratracheal instillation exposure. While whole-body inhalation exposure effectively simulates real-life human inhalation environments, it requires sophisticated experimental equipment. Conversely, intratracheal instillation exposure is more cost-effective and easier to operate but faces challenges in accurately mimicking the distribution and deposition of PM_{2.5} during natural inhalation. Therefore, researchers must carefully weigh these exposure methods to enhance model rigor and achieve the most realistic simulation of human exposure conditions. When summarizing the application evaluation indicators of PM_{2.5}-induced reproductive toxicity, this review finds that the main indicators of male reproductive toxicity include reduced sperm quality, testicular tissue damage, and hormonal imbalances. For female reproductive toxicity, the primary indicators are reduced ovarian reserve, endocrine dysfunction, endometrial damage, and adverse perinatal reactions. Additionally, this review highlights the need for detailed chemical composition analysis of PM_{2.5}, exploring the reproductive toxic targets and mechanisms of particles containing different chemical components, such as heavy metals and polycyclic aromatic hydrocarbons. Long-term studies are also necessary to assess the effects of PM_{2.5} exposure on reproductive health and transgenerational effects, to predict potential long-term risks for humans. Additionally, interdisciplinary collaboration should be encouraged, involving cooperation between environmental science, toxicology, reproductive medicine, and other disciplines, to comprehensively assess the environmental health risks of PM_{2.5} and provide scientific support for the development of integrated prevention and control strategies. This review summarizes animal modeling methods, evaluation criteria, and their applications, providing valuable methodological references for future reproductive toxicity research on PM_{2.5}.

[Key words] Atmospheric fine particulate matter; PM_{2.5}; Reproductive toxicity; Animal model

大气细颗粒物 (particulate matter 2.5, PM_{2.5}), 是指空气动力学直径 $\leq 2.5 \mu\text{m}$ 的颗粒物, 它能够深入人体肺部并进入血液循环, 对多个器官产生影响, 从而导致全身健康问题。PM_{2.5}被认为是全球范围内致死和致残疾病负担的主要风险因素之一。据世界卫生组织 (World Health Organization, WHO) 报告, 全球有超过 90% 的人口 (约 73 亿人) 生活在 PM_{2.5} 浓度超过 WHO 规定可长期安全暴露水平的环境中^[1]。大量的流行病学数据和动物实验结果显示, 长期暴露于 PM_{2.5} 会导致呼吸系统、心血管系统、神经系统和生殖系统等相关疾病^[2-3]。PM_{2.5} 暴露导致的生殖毒性包括精子质量下降、卵巢功能受损以及围产期不良反应等^[4]。此外, PM_{2.5} 暴露还可以通过损伤精子或卵细胞对子代产生有害影响。因此, 近年来越来越多的研究聚焦于 PM_{2.5} 对生殖系统产生的毒性作用及其机制。

构建适宜的动物模型对研究 PM_{2.5} 引起的生殖毒性至关重要。目前, 研究 PM_{2.5} 生殖毒性的动物模型有小鼠、大鼠、斑马鱼和秀丽隐杆线虫等。暴露方式主要是采用 PM_{2.5} 全身暴露和气管内滴注。全身暴露是模拟人体吸入方式, 而气管内滴注是将 PM_{2.5} 悬液注入气管

后吸入肺内, 这两种暴露方式均是通过呼吸系统使 PM_{2.5} 进入体内。研究人员可根据实验目的和设备条件, 选择不同的暴露方式和合适的动物模型。本文以“细颗粒物”或“PM_{2.5}”和“生殖”或“睾丸”或“精子”或“卵巢”或“子宫”及相应英文为检索词, 在 PubMed、Web of Knowledge、CNKI 数据库中进行检索, 主要对近 10 年发表的 PM_{2.5} 生殖毒性文献中的暴露方式和评价终点指标进行了归纳总结, 以期为今后 PM_{2.5} 生殖毒性研究的方案设计提供参考。

1 PM_{2.5} 暴露动物模型的建立方法

在动物实验中, 研究 PM_{2.5} 对呼吸系统、心血管系统、神经系统和生殖系统的影响时, 需要选择合适的暴露方式, 最常见的暴露模式为全身吸入暴露和气管滴注暴露。吸入暴露浓度单位为 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, 滴注暴露浓度单位通常为毫克每千克体重 (mg/kg) 或微克每千克体重 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)。每只小鼠的肺泡通气量约为 24 mL/min, 并且吸入的颗粒物大约 70% 会沉积在气管和肺泡^[5], 据此可以对 PM_{2.5} 暴露吸入浓度和滴注浓度进行适当换算。小鼠肺泡中 24 h PM_{2.5} 沉积量的计算公式是: $N =$

24 mL/min \times A $\mu\text{g}/\text{m}^3\times 60 \text{ min}\times 24 \text{ h}\times 70\%$ (式中, N 为 24 h $\text{PM}_{2.5}$ 的沉积量, A 为 $\text{PM}_{2.5}$ 吸入暴露的浓度)。

1.1 吸入暴露模型

吸入暴露模拟人体呼吸道吸入的暴露方式, 可以保持 $\text{PM}_{2.5}$ 的原始理化特性和复合成分, 进而评估 $\text{PM}_{2.5}$ 中不同成分之间的协同毒性。因此, 吸入暴露方式被认为是评估 $\text{PM}_{2.5}$ 急性和慢性暴露的最佳选择。吸入暴露通常分为全身吸入暴露和口鼻吸入暴露。这两种吸入方式所使用的 $\text{PM}_{2.5}$ 均来源于环境空气, 采用空气浓缩系统对空气中颗粒物进行不同倍数的浓缩, 并进行实时浓度监测。该暴露方式有助于提高研究结果的准确性和可靠性。然而, 这两种暴露方式都需要通过特殊的实验室设备来实现。

1.1.1 全身吸入模型

全身吸入暴露被认为是实验室条件下模拟人群接触 $\text{PM}_{2.5}$ 的最佳方式, 能够较好地模拟人群的真实暴露环境。目前, $\text{PM}_{2.5}$ 生殖毒性的动物实验多采用多功能气溶胶浓缩系统 (versatile aerosol concentration enrichment system, VACES) 进行全身吸入暴露, 尤其是针对长期暴露研究^[6-11]。全身吸入暴露系统通常分为清洁仓和浓缩仓, 可以对环境中的 $\text{PM}_{2.5}$ 进行高效的过滤和浓缩。清洁仓是在动物饲养笼的进气阀上安装高效空气过滤器 (high efficiency particulate air filter, HEPA), 可以有效地过滤掉空气中的颗粒物; 浓缩仓可以将空气中的 $\text{PM}_{2.5}$ 浓缩 1~10 倍, 以此来模拟高浓度的 $\text{PM}_{2.5}$ 环境。动物在暴露仓内可以自然吸入颗粒物, 同时可以自由活动和进食。该系统最多可支持 64 只小鼠同时进行吸入暴露^[12], 且配备相应的在线计算机控制系统, 可以实时监测暴露仓内空气的温度、湿度、流速、稳定性和可重复性, 以及颗粒物的浓度、粒径。研究者可根据研究目标选择合适的暴露时间和浓度。

1.1.2 口鼻吸入模型

口鼻吸入暴露是将含有 $\text{PM}_{2.5}$ 的空气送入实验动物的口鼻, 模拟人类的鼻或口腔吸入过程。实验动物通常被固定在一个特制的暴露系统中, 该系统能够控制和调节进入动物呼吸道的 $\text{PM}_{2.5}$ 浓度、粒径分布和流速, 从而精确地模拟 $\text{PM}_{2.5}$ 在呼吸道中的沉积和吸收。在 $\text{PM}_{2.5}$ 毒性研究中, 口鼻吸入暴露也是一种较为常用的染毒方法^[13-14]。与全身吸入暴露相比, 口鼻吸入暴露可以避免或限制皮肤和其他非呼吸暴露途径产生的影响, 对动物的暴露剂量实现精确控制。经多种物质暴露测试发现, 口鼻吸入暴露方式的效果优于全身吸

入暴露方式^[15]。但是口鼻吸入暴露装置引起的动物行动受限是否会干扰研究结果, 尚存在很大的争议。有研究显示, 使用相同材料染毒, 在暴露浓度和时间相同的条件下, 口鼻吸入暴露和全身吸入暴露引起颗粒物在肺部的颗粒沉积和组织病理学表现没有差异^[16]。但也有研究认为, 口鼻暴露会引起较严重的呼吸系统病变和全身应激反应, 如体重减轻、血液中淋巴细胞减少等表现^[17]。目前, 在 $\text{PM}_{2.5}$ 的生殖毒性研究中, 口鼻吸入暴露方式的应用较少。

表 1 列出了用于生殖毒性研究的 $\text{PM}_{2.5}$ 吸入暴露动物模型的造模方法和相关表型研究情况^[18-22]。

1.2 滴注暴露模型

滴注暴露也是一种常见的研究 $\text{PM}_{2.5}$ 毒性效应的建模方法。该方法将 $\text{PM}_{2.5}$ 与生理盐水或磷酸盐缓冲液混合制成混悬液, 并通过鼻腔或气管滴注的方式使其吸入肺部。滴注暴露主要分为气管滴注和鼻内滴注两种方式。滴注的 $\text{PM}_{2.5}$ 来源主要有两种: 第一种是使用滤膜收集环境中 $\text{PM}_{2.5}$, 然后从滤膜上回收颗粒物用于实验^[23]; 第二种是使用标准参考材料 (standard reference material, SRM) 进行实验, 这些材料具有已知的化学和物理特性, 可用于不同研究之间的比较^[24]。

1.2.1 气管滴注模型

受试动物在麻醉状态下, 通过给药装置 (如导管、移液器枪头或无针头注射器等) 插入气管, 并将测试物质注入气管进行实验。与吸入暴露相比, 气管滴注不需要专用的实验设备或设施, 并且所需测试物质质量较少^[25-26]。根据给药过程是否插管, 气管滴注可以分为吸入式气管滴注和插管式气管滴注。

吸入式气管滴注又称为口咽吸入滴注, 该方法广泛应用于 $\text{PM}_{2.5}$ 的生殖毒性研究中, 特别是在大鼠和小鼠模型中^[27-30]。改良版的吸入式气管滴注通常是用镊子将麻醉的小鼠或大鼠的舌头拉出, 捏住鼻腔, 将一定体积的 $\text{PM}_{2.5}$ 混悬液滴入其咽部, 从而迫使鼠用嘴呼吸, 使 $\text{PM}_{2.5}$ 混悬液进入气道, 在至少完成两次呼吸后, 将其松开。小鼠的滴注体积通常是 50 μL , 而大鼠的滴注体积一般为 200 μL 。吸入式气管滴注的操作时间较短, 对动物的侵入性伤害较小, 可以使药物在肺部分布更为均匀, 更接近自然吸入的情况; 但需要操作者具备一定的技术和经验, 以确保滴注的准确性和一致性。

$\text{PM}_{2.5}$ 生殖毒性实验中采用的插管式气管滴注均为无创性气管滴注^[5,31-34]。该方法是将特制的导管插入

表1 用于生殖毒性研究的PM_{2.5}吸入暴露模型的造模方法和相关表型Table 1 Modeling methods and associated phenotypes of PM_{2.5} inhalation exposure models for reproductive toxicity studies

动物 Animal	PM _{2.5} 暴露浓度 Exposure concentration of PM _{2.5}	PM _{2.5} 暴露时间 Exposure duration of PM _{2.5}	生殖毒性相关表型 Associated phenotypes of reproductive toxicity
C57BL/6 小鼠, 雄性, 8周龄 C57BL/6 mouse, male, 8 weeks old	FA: 60 μg/m ³ ; CAP: 488 μg/m ³	6 h/d, 共8周	精母细胞存在明显的病理损伤 ^[18]
C57BL/6 小鼠, 雄性, 6~8周龄 C57BL/6 mouse, male, 6-8 weeks old	FA: 0.39 μg/m ³ ; UA: 59.75 μg/m ³ ; CAP: 483.61 μg/m ³	6 h/d, 5 d/周, 共5周	精子活力降低 ^[19]
C57BL/6 小鼠, 雄性, 6周龄 C57BL/6 mouse, male, 6 weeks old	UA: 94.84 μg/m ³ ; CAP: 900.21 μg/m ³	6 h/d, 分别暴露8周和16周	精子数量减少, 活力降低, 睾丸支持细胞空泡化, 生精细胞变性 ^[6]
C57BL/6 小鼠, 雄性, 8周龄 C57BL/6 mouse, male, 8 weeks old	FA: 0 μg/m ³ ; CAP: 75.78 μg/m ³	60 d	子代出生数量减少, 睾丸重量减轻, 精子数量减少, 睾酮水平下降 ^[7]
C57BL/6 小鼠, 雄性, 8周龄 C57BL/6 mouse, male, 8 weeks old	FA: 4.5 μg/m ³ ; CAP: 72.26 μg/m ³	8 h/d, 5 d/周, 连续暴露16周	精子数量减少, 精子活力下降, 睾酮水平下降 ^[20]
SD 大鼠, 雄性, 6周龄 SD rat, male, 6 weeks old	FA: 0.70 μg/m ³ ; CAP: 16.7 μg/m ³	暴露8个月	睾丸内脂质紊乱 ^[10]
Wistar 大鼠, 雄性, 6周龄 Wistar rat, male, 6 weeks old	对照组: 0.02 ~ 0.18 mg/m ³ ; 4倍浓缩组: 0.06 ~ 0.81 mg/m ³ ; 8倍浓缩组: 0.11 ~ 1.60 mg/m ³	8 h/d, 连续3个月	间质水肿, 生精管细胞层次减少, 各级生精细胞排列紊乱甚至缺失 ^[11]
C57BL/6 小鼠, 雌性, 8周龄 C57BL/6 mouse, female, 8 weeks old	FA: 2.4 μg/m ³ ; CAP: 49.4 μg/m ³	孕前每天暴露12 h, 7 d/周, 暴露4周, 孕期继续暴露直到子代出生	母代卵巢储备降低, 子代小鼠在出生后第3天和出生后第7天的原始卵泡和总卵泡数量均减少 ^[21]
C57BL/6 小鼠, 雌性, 4月龄 C57BL/6 mouse, female, 4 months old	FA: < 5 μg/m ³ ; CAP: 110 ~ 130 μg/m ³	5 h/d, 4 h/周, 持续12周	生长卵泡凋亡, 卵巢储备降低 ^[9]
C57BL/6 小鼠, 雌性, 4周龄 C57BL/6 mouse, female, 4 weeks old	FA: 3.93 μg/m ³ ; CAP: 128.1 μg/m ³	8 h/d, 5 d/周, 共9周	卵巢闭锁 ^[22]

注: PM_{2.5}, 空气动力学直径≤2.5 μm的细颗粒物; FA, 过滤空气; UA, 未过滤空气; CAP, 浓缩环境。

Note: PM_{2.5}, fine particulate matter with an aerodynamic diameter≤2.5 μm; FA, filtered air; UA, unfiltered air; CAP, concentrated atmosphere.

动物的气管内, 然后通过导管将一定浓度的PM_{2.5}混悬液直接输送到肺部。插管式气管滴注可以实现对剂量的精确控制, 小鼠滴注体积一般为30 μL, 而大鼠滴注体积多为300~500 μL。相较于开放性气管滴注, 插管式气管滴注无需手术切口暴露气管, 在一定程度上减少了对动物呼吸道的损伤^[35], 在特殊的辅助设备配合下, 可以更好地简化操作流程。插管式气管滴注造模方式需要较高的技术水平和经验, 以确保插管的准确性, 同时要避免对动物造成不必要的伤害。尽管该方法减少了手术切口, 但插管操作本身可能会给动物带来不适, 而且可能需要特殊设备, 如光纤、喉镜等。

1.2.2 鼻内滴注模型

受试动物在局部麻醉或非麻醉状态下, 操作者将动物头部进行固定, 鼻尖朝上, 将一定体积的溶液或悬浮液滴入鼻腔, 等待动物自动抽吸, 给药后立即监测动物的恢复情况。鼻内滴注的操作简便、对设备要

求低, 适用于多种实验环境; 但是PM_{2.5}容易沉积在上呼吸道, 若需要观察下呼吸道或者全身效应, 应加大暴露剂量。此外, 给药的混悬液容易从鼻腔流失, 这会导致作用剂量不精确。

1.3 其他暴露方法

在PM_{2.5}的生殖毒性研究中, 除了上述常见的全身吸入暴露和滴注两种造模方式外, 还有采用雾化吸入的方式进行建模。在密闭容器中, 将一定剂量的PM_{2.5}混悬液加入自动雾化器中, 小鼠通过雾化吸入PM_{2.5}进行染毒, 以此来研究PM_{2.5}的生殖毒性^[8]。此外, 在采用斑马鱼和秀丽隐杆线虫作为研究对象进行生殖毒性研究时^[36-38], 研究者将PM_{2.5}溶解在水和培养基中, 让斑马鱼在含有PM_{2.5}的水体中饲养, 而秀丽线虫则在含有PM_{2.5}的培养基中生长和繁殖。

表2列出了用于生殖毒性研究的PM_{2.5}滴注暴露动物模型的造模方法和相关表型研究情况^[39-51]。

表2 用于生殖毒性研究的PM_{2.5}滴注暴露模型的造模方法和相关表型Table 2 Modeling methods and associated phenotypes of PM_{2.5} instillation exposure models for reproductive toxicity studies

动物模型 Animal model	PM _{2.5} 暴露浓度 Exposure concentration of PM _{2.5}	PM _{2.5} 暴露时间 Exposure duration of PM _{2.5}	生殖毒性相关表型 Associated phenotypes of reproductive toxicity
C57BL/6 小鼠, 雌性, 8周龄 C57BL/6 mouse, female, 8 weeks old	低剂量组: 4.8 mg/kg; 高剂量组: 43.2 mg/kg	孕期每3 d 1次, 共滴注6次	F1代精子数量和活力下降, 畸形率增加; 支持细胞形态异常, 精子发生异常 ^[39]
C57BL/6 小鼠, 雄性, 5周龄 C57BL/6 mouse, male, 5 weeks old	1.0 mg/kg	每周一、三、五暴露, 共29周	生育能力下降, 精子数量和活力明显降低 ^[40]
SD大鼠, 雄性, 8周龄 SD rat, male, 8 weeks old	低剂量组: 4.3 mg/kg; 高剂量组: 12.9 mg/kg	每2 d 1次, 共滴注4周	睾丸重量及睾丸系数减低, 曲细精管管壁变薄, 各级生精细胞排列松散紊乱, 管腔中成熟精子数量减少, 睾酮水平下降 ^[31]
SD大鼠, 雄性, 4周龄 SD rat, male, 4 weeks old	1.5 mg/kg	每周5 d, 共4周	精子质量和血清睾酮水平显著降低。生精细胞结构松散, 生精细胞和成熟精子的数量减少 ^[41]
SD大鼠, 雄性, 6周龄 SD rat, male, 6 weeks old	低剂量组: 10 mg/kg; 高剂量组: 20 mg/kg	每天1次, 共4周	精子质量降低, 睾丸血睾屏障损伤, 生育力降低 ^[42-43]
SD大鼠, 雄性, 8周龄 SD rat, male, 8 weeks old	25 mg/kg	每周1次, 连续3个月	睾丸代谢组紊乱 ^[44]
SD大鼠, 雄性, 6~8周龄 SD rat, male, 6-8 weeks old	低剂量组: 1.8 mg/kg; 中剂量组: 5.4 mg/kg; 高剂量组: 16.2 mg/kg	每3 d 1次, 共30 d	精子存活率和密度显著降低, 畸形率显著增加, 睾酮和促黄体生成素水平下降, 血睾屏障的超微结构发生改变 ^[45-46]
SD大鼠, 雄性, 6周龄 SD rat, male, 6 weeks old	低剂量组: 9 mg/kg; 高剂量组: 24 mg/kg	每天1次, 共7周	大鼠生育力明显降低, 精子数量显著减少, 精子畸形率增加, 睾丸组织形态损伤, 生精细胞减少并脱落, 生精小管直径减少 ^[47]
SD大鼠, 雄性, 180~220 g SD rat, male, 180-220 g	夏季: 0.2、0.6、1.5 mg/kg; 冬季: 0.3、1.5、2.7 mg/kg	每3 d 1次, 共2个月	睾丸组织损伤, 睾丸生殖细胞凋亡 ^[32]
SD大鼠, 雄性, 4周龄 SD rat, male, 4 weeks old	低剂量组: 20 μg/kg; 高剂量组: 160 μg/kg	每天1次, 连续60 d	精子数量和质量明显下降, 生精小管结构紊乱, 管腔精子数减少 ^[48]
昆明小鼠, 雌性, 6~7周龄 Kunming mouse, female, 6 to 7 weeks old	低剂量组: 0.259 2 μg/μL; 中剂量组: 1.566 95 μg/μL; 高剂量组: 3.456 μg/μL	妊娠第1天开始 每3 d 1次, 孕期暴露7次	孕鼠体重增长缓慢, 妊娠天数减少 ^[34]
昆明小鼠, 雌性, 4周龄 Kunming mouse, female, 4 weeks old	低剂量组: 0.36 μg/μL; 中剂量组: 1.2 μg/μL; 高剂量组: 2.4 μg/μL	每3 d 1次, 共4周	窝仔数减少, 颗粒细胞核膜、染色体和线粒体超微结构改变, 囊胚形成率低 ^[5]
SD大鼠, 雌性, 成年 SD rat, female, adult	低剂量组: 0.5 mg/kg; 中剂量组: 2 mg/kg; 高剂量组: 8 mg/kg	孕前滴注15 d, 孕期6 d, 每天1次	雌鼠的交配指数及GD6.5受孕指数下降, 胚胎个数减少, 子宫连胚质量下降 ^[49]
SD大鼠, 雌性, 8周龄 SD rat, female, 8 weeks old	低剂量组: 1.5 mg/kg; 高剂量组: 6 mg/kg	每天1次, 连续30 d	子宫脏器系数、内膜上皮细胞厚度和腺上皮高度增加 ^[29]
C57BL/6, 雌性 C57BL/6, female	3 mg/kg	孕期每隔1 d 滴注1次	胎盘细胞增殖受到抑制, 胎盘营养物质的运输能力受损 ^[27]
ICR小鼠, 雌性, 成年 ICR mouse, female, adult	对照组: 1 mL/kg; PM _{2.5} 组: 15 mg/kg	妊娠期第3、6、9、12、15天及哺乳期第5、10、15天滴注	F1代小鼠体重下降或体重增长缓慢, 且具有跨代遗传效应, 并可能通过F2代生殖系统传递给F3代小鼠 ^[50]
ICR小鼠, 雌性, 4周龄 ICR mouse, female, 4 weeks old	10 mg/kg	鼻内滴注, 每2 d最多滴注11次, 连续3周	卵巢组织出血和血管出血, 卵泡细胞凋亡增加 ^[51]

2 PM_{2.5} 导致生殖功能异常的动物模型应用评价

2.1 雄性生殖毒性的应用评价

空气污染被认为是导致男性生殖损害的重要原因之一。用于评价PM_{2.5}暴露的雄性生殖毒性指标包括：精子质量降低、睾丸组织损伤以及雄激素水平改变等。这些影响可能与PM_{2.5}引发的氧化应激反应、炎症反应以及细胞凋亡等生物过程有关。

2.1.1 精子质量下降

精子有较高的表面积与体积比，需要维持更大面积的细胞膜。当精子受到损伤时，修复能力比较有限。因此，精子比体细胞更容易受到外源性化学物、氧化剂等应激因素的损伤。

有研究表明，雄性C57BL/6J小鼠在PM_{2.5} (94 μg/m³) 中连续吸入暴露8周，会导致精子数量减少，活力降低，并且畸形率增加^[6]。另外，有学者通过气管滴注方式，对雄性SD大鼠进行连续4周的PM_{2.5} (1.5 mg/kg) 暴露，以及对雄性C57BL/6小鼠进行为期29周的PM_{2.5} (1.0 mg/kg) 暴露，结果发现附睾内的精子数量和活力均有明显降低^[40-41, 52]。此外，母体PM_{2.5}暴露也会引起子代雄性小鼠的精子数量和活力下降^[39]。

2.1.2 睾丸生殖细胞毒性

睾丸内生殖细胞从精原细胞增殖分化为精母细胞，经过减数分裂形成精细胞，这一过程受到多种因素调控。多项研究结果显示，生殖细胞是PM_{2.5}导致睾丸毒性的主要靶细胞。在全身吸入暴露模式中，有学者对雄性C57BL/6小鼠分别进行连续8周 (488 μg/m³) 和16周 (71.6 μg/m³) 的PM_{2.5}暴露实验，结果显示PM_{2.5}暴露会导致精母细胞变性和数量减少^[7, 18]；也有学者发现，PM_{2.5}慢性暴露会引起雄性Wistar大鼠生精小管内细胞层减少，生精细胞排列紊乱甚至缺失^[11]。在气管滴注暴露模式下，有学者对雄性SD大鼠进行4~8周 (1.5~24 mg/kg) 的PM_{2.5}滴注实验，发现此方法能引起睾丸生精细胞排列紊乱、脱落以及数量减少^[31-32, 41, 43, 47, 52]；对雄性C57BL/6小鼠进行连续29周 (1.0 mg/kg) 的PM_{2.5}滴注，发现会影响精母细胞的减数分裂^[40]。此外，研究还揭示，生精细胞数量减少可能和PM_{2.5}诱发的氧化损伤、炎症和自噬相关^[8, 11, 31, 41]；而生精细胞的变性、脱落可能是由于血睾屏障的连接蛋白表达异常所致^[47-48]。

2.1.3 血睾屏障损伤

血睾屏障由紧密连接 (tight junctions, TJs)、外质

特化 (ectoplasmic specialization, ES)、桥粒样连接和缝隙连接共同组成，其功能是将生殖细胞和免疫系统隔离，可以阻止外源性有害物质进入生精小管，为精子发生提供免疫豁免的微环境，其完整性对精子发生和生育力至关重要^[53]。血睾屏障受损会影响生殖细胞的正常增殖和分化，导致精子异常和精子质量下降，从而降低男性生育能力。

有研究显示，通过气管滴注方式对雄性SD大鼠进行PM_{2.5}暴露，会导致大鼠睾丸的血睾屏障超微结构发生改变，以及紧密连接和基底膜外质特化结构受损，并在支持细胞的细胞质内形成大量自噬小体^[43, 46]。此外，还有大量动物实验发现，PM_{2.5}暴露会引起连接蛋白 (ZO-1, occludin, connexin 43) 表达水平下降，从而损伤血睾屏障^[43, 47-48]。

2.1.4 雄激素水平失衡

雄激素在维持正常精子生成的过程中起着至关重要的作用。PM_{2.5}暴露可能会通过干扰体内雄激素正常水平，从而影响精子发生。有学者发现，在对C57BL/6小鼠进行PM_{2.5}全身吸入暴露后，会引起小鼠睾酮水平下降^[6, 20]。当通过气管滴注方式进行PM_{2.5}染毒时，同样也会导致SD大鼠睾酮水平降低^[31, 46]。

2.2 雌性生殖毒性的应用评价

多项研究显示，PM_{2.5}中的多环芳烃和重金属成分会通过干扰雌激素合成、氧化应激、炎症反应和表观修饰改变等产生明显的雌性生殖毒性^[54]，主要表现为卵巢储备功能降低、内分泌功能受到干扰、子宫内膜受损和围产期不良反应的发生。PM_{2.5}的雌性生殖毒性研究多采用滴注暴露模式。吸入暴露和滴注暴露均导致雌性生殖毒性的指标包括卵巢储备功能降低和激素水平改变，而滴注暴露还引起子宫内膜改变和卵巢出血。

2.2.1 卵巢储备功能下降

卵巢储备是指卵巢可产卵子数量和质量的潜能，可用于评价女性的生殖能力。流行病学研究发现，窦状卵泡的数量下降与PM_{2.5}暴露密切相关^[55]。当卵巢中剩余卵泡的数量和质量降低时，女性的生殖健康就会受到影响。

多项动物实验研究表明，PM_{2.5}暴露会降低卵巢储备功能。C57BL/6雌性小鼠全身吸入暴露PM_{2.5}会导致其生长卵泡凋亡、原始卵泡减少和闭锁卵泡增加，从而降低卵巢储备^[9, 22]。有研究发现，通过气管滴注方式对小鼠进行PM_{2.5}暴露后，其卵巢颗粒细胞和卵母细

胞凋亡, 并影响生育力和胚胎发育^[5]。此外, 研究者对 C57BL/6 小鼠进行孕前 PM_{2.5} 暴露 4 周 (49 μg/m³), 交配后雌鼠在孕期继续进行 PM_{2.5} 暴露, 结果发现雌性子代小鼠在 3 日龄和 7 日龄的原始卵泡和总卵泡数量均减少^[21]。这些研究表明, PM_{2.5} 暴露不仅会对亲代的卵巢储备功能造成影响, 同时也会影响子代的卵泡数量。

2.2.2 生殖激素水平失衡

PM_{2.5} 中的重金属成分 (如铅、镉) 和多环芳烃等, 可能会通过干扰雌激素的产生, 引起内分泌失调, 进一步对雌性生殖系统造成负面影响。有研究发现, 将雌性 C57BL/6 小鼠进行全身吸入暴露 PM_{2.5} (128 μg/m³) 后, 会引起血清中抗苗勒氏管激素 (anti-Mullerian hormone, AMH) 和卵泡雌激素 (follicle stimulating hormone, FSH) 水平降低, 雌二醇 (estradiol, E₂) 和孕酮 (progesterone, P4) 水平升高^[22]。此外, 有学者通过鼻腔滴注的方式对雌性小鼠进行 PM_{2.5} 染毒, 发现小鼠血清中 AMH 水平降低^[51]。

2.2.3 子宫内膜异常

子宫内膜异常可能会使受精卵难以着床, 从而增加早期流产的风险。PM_{2.5} 暴露可能会导致子宫内膜异常生长, 影响子宫环境。研究发现, 通过气管滴注的方式对雄性 SD 大鼠进行 PM_{2.5} 暴露后, 大鼠的子宫脏器系数、内膜上皮厚度和腺上皮高度受到影响, 并可能与核因子-红血细胞 2 相关因子 2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf-2) 信号通路和含 pyrin 结构域 NOD 样受体家族 3 (NOD-like receptors family pyrin domain containing 3, NLRP3) /半胱天冬氨酸特异性蛋白酶-1 (Caspase-1) 信号通路激活, 以及子宫炎症反应有关^[29-30]。

2.2.4 围产期不良反应

PM_{2.5} 对妊娠的影响包括流产、早产、低出生体重、胎膜早破和出生缺陷等^[56]。研究发现, 孕期 PM_{2.5} 暴露会导致孕鼠体重增长速度缓慢, 妊娠天数缩短, 并引起胎仔数量减少, 胎儿体重降低^[34]。有学者对 SD 大鼠进行孕前 15 d 和孕期 6.5 d 的 PM_{2.5} 暴露, 结果显示, PM_{2.5} 暴露组大鼠的交配指数和受孕指数均下降, 并导致胚胎数量减少和子宫连胚重量降低^[49]。也有研究发现, PM_{2.5} 暴露除了会导致胎鼠的活胎率降低外, 还会引起孕鼠 E₂、P4、绒毛膜促性腺激素 (chorionic gonadotropin, CG) 和黄体生成素 (luteinizing hormone, LH) 水平降低^[28]。此外, 孕期

PM_{2.5} 暴露还会导致胎盘细胞增殖被抑制, 胎盘营养物质转运能力受损^[57], 这可能与母体 PM_{2.5} 暴露所引起的子代低体重和活胎率降低有关。

3 小结与展望

为了研究 PM_{2.5} 的生殖毒性及其作用机制, 选择合适的动物模型是至关重要的。本综述总结了近年来关于 PM_{2.5} 暴露导致生殖毒性的动物造模方法, 并对这些模型的应用进行了评价, 旨在为未来 PM_{2.5} 生殖毒性研究提供方法学参考。目前, 最常见的 PM_{2.5} 生殖毒性动物建模方法包括全身吸入暴露和吸入式气管滴注两种。每种方法都有其优点和局限性, 研究者应根据实验室条件和研究需求进行选择。

全身吸入暴露能够较好地模拟人体在真实环境中的暴露状态, 可以研究 PM_{2.5} 在呼吸道中的沉积和分布以及对其他系统的影响, 为研究 PM_{2.5} 的毒理学效应及其机制提供了重要的实验手段。但是全身吸入暴露对实验室的设备条件要求较高, 需要较多的材料来搭建暴露平台。吸入式气管滴注是一种成本较低且高效的造模方法, 比较容易控制暴露剂量, 操作相对简便快速, 对动物损伤较小, 而且更接近自然吸入的状态, 但这种方法无法完全模拟自然吸入过程中颗粒物在呼吸道中的分布和沉积。

未来的 PM_{2.5} 生殖毒性研究建议重点关注以下几个方面: 第一, 需要进一步优化动物模型, 提高其准确性和可靠性, 包括改进 PM_{2.5} 的暴露方法并严格控制实验条件, 使其更真实地模拟实际人群的暴露情况; 第二, 由于 PM_{2.5} 的化学成分和生物活性复杂多样, 不同地区和季节的成分及含量也有所不同, 因此需要深入研究其化学成分 (如重金属、多环芳烃等) 对生殖系统的作用机制和靶点; 第三, 尽管已有研究发现 PM_{2.5} 暴露可影响子代的精子活力和雄性激素水平^[7], 但大多数研究集中于其对动物个体的直接影响, 而对其跨代影响的研究较少, 这是一个有待深入探索的新领域; 第四, 尽管当前的毒理学研究提供了一些关于 PM_{2.5} 对生殖健康影响的证据, 但动物模型的评价标准并不统一, 因此需要建立统一的 PM_{2.5} 生殖毒性动物模型评价标准和方法; 第五, 跨学科的合作尤为重要, 鼓励环境科学、毒理学、生殖医学等多学科间的合作, 以全面评估 PM_{2.5} 的环境健康风险, 并为制定综合性的预防和治理策略提供科学依据。

[作者贡献 Author Contribution]

田芳负责文献检索、文献数据提取和撰写论文；
潘滨负责文献检索、文献数据提取和论文修改；
史佳怡协助文献检索；
徐燕意和李卫华负责提出研究思路、修订稿件和基金支持。

[利益声明 Declaration of Interest]

所有作者均声明本文不存在利益冲突。

[参考文献 References]

- [1] GBD RISK FACTORS COLLABORATORS. Global burden and strength of evidence for 88 risk factors in 204 countries and 811 subnational locations, 1990-2021: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2021[J]. *Lancet*, 2024, 403(10440):2162-2203. DOI: 10.1016/S0140-6736(24)00933-4.
- [2] THANGAVEL P, PARK D, LEE Y C. Recent insights into particulate matter (PM_{2.5})-mediated toxicity in humans: an overview[J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2022, 19(12):7511. DOI: 10.3390/ijerph19127511.
- [3] ZHENG S K, ZHAO N N, LIN X J, et al. Impacts and potential mechanisms of fine particulate matter (PM_{2.5}) on male testosterone biosynthesis disruption[J/OL]. *Rev Environ Health*, 2023, Sep 1. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37651650/>. DOI: 10.1515/reveh-2023-0064.
- [4] WANG L J, LUO D, LIU X L, et al. Effects of PM2.5 exposure on reproductive system and its mechanisms[J]. *Chemosphere*, 2021, 264(Pt 1): 128436. DOI: 10.1016/j.chemosphere. 2020. 128436.
- [5] LIAO B Q, LIU C B, XIE S J, et al. Effects of fine particulate matter (PM_{2.5}) on ovarian function and embryo quality in mice [J]. *Environ Int*, 2020, 135: 105338. DOI: 10.1016/j.envint.2019.105338.
- [6] ZHOU L X, SU X, LI B H, et al. PM2.5 exposure impairs sperm quality through testicular damage dependent on NALP3 inflammasome and miR-183/96/182 cluster targeting FOXO1 in mouse[J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2019, 169: 551-563. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2018.10.108.
- [7] WEI X Y, ZHANG Z H, GU Y Y, et al. Inter- and trans-generational impacts of real-world PM2.5 exposure on male-specific primary hypogonadism[J]. *Cell Discov*, 2024, 10(1):44. DOI: 10.1038/s41421-024-00657-0.
- [8] 周逢海, 周川, 吕海迪, 等. 细颗粒物对雄性小鼠生殖功能的影响 [J]. *海南医学*, 2019, 30(5):545-548. DOI: 10.3969/j.issn.1003-6350.2019.05.001.
ZHOU F H, ZHOU C, LV H D, et al. Effect of fine particles on reproductive function of male mice[J]. *J Hainan Med Univ*, 2019, 30(5):545-548. DOI: 10.3969/j.issn.1003-6350.2019.05.001.
- [9] LUDERER U, LIM J, ORTIZ L, et al. Exposure to environmentally relevant concentrations of ambient fine particulate matter (PM_{2.5}) depletes the ovarian follicle reserve and causes sex-dependent cardiovascular changes in apolipoprotein E null mice[J]. *Part Fibre Toxicol*, 2022, 19(1): 5. DOI: 10.1186/s12989-021-00445-8.
- [10] LIN C Y, CHEN W L, CHEN T Z, et al. Lipid changes in extrapulmonary organs and serum of rats after chronic exposure to ambient fine particulate matter[J]. *Sci Total Environ*, 2021, 784:147018. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2021.147018.
- [11] 丁素素, 刘焕亮, 林本成, 等. PM2.5长期动态低浓度恒定及高浓度间隔吸入暴露对雄性大鼠睾丸的损伤效应[J]. *环境与健康杂志*, 2020, 37(1):11-15, 封 2. DOI: 10.16241/j.cnki.1001-5914.2020. 01.003.
DING S S, LIU H L, LIN B C, et al. Effects of long-term dynamic inhalation of PM2.5 with constant low concentration and interval high concentration on testis damage in male rats[J]. *J Environ Health*, 2020, 37(1): 11-15, second cover page. DOI: 10.16241/j.cnki.1001-5914.2020.01.003.
- [12] CHEN L C, LIPPMANN M. Inhalation toxicology methods: the generation and characterization of exposure atmospheres and inhalational exposures[J]. *Curr Protoc Toxicol*, 2015, 63: 24.4.1-24.424.4.23. DOI: 10.1002/0471140856.tx2404s63.
- [13] CAO X W, WANG M, LI J W, et al. Fine particulate matter increases airway hyperresponsiveness through kallikrein-bradykinin pathway[J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2020, 195: 110491. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2020.110491.
- [14] FENG S, DUAN E H, SHI X J, et al. Hydrogen ameliorates lung injury in a rat model of subacute exposure to concentrated ambient PM2.5 via Aryl hydrocarbon receptor[J]. *Int Immunopharmacol*, 2019, 77: 105939. DOI: 10.1016/j.intimp.2019.105939.
- [15] PAULUHN J. Overview of testing methods used in inhalation toxicity: from facts to artifacts[J]. *Toxicol Lett*, 2003, 140-141: 183-193. DOI: 10.1016/s0378-4274(02)00509-x.
- [16] OYABU T, MORIMOTO Y, IZUMI H, et al. Comparison between whole-body inhalation and nose-only inhalation on the deposition and health effects of nanoparticles[J]. *Environ Health Prev Med*, 2016, 21(1):42-48. DOI: 10.1007/s12199-015-0493-z.
- [17] KOGEL U, WONG E T, SZOSTAK J, et al. Impact of whole-body versus nose-only inhalation exposure systems on systemic, respiratory, and cardiovascular endpoints in a 2-month cigarette smoke exposure study in the ApoE^{-/-} mouse model [J]. *J Appl Toxicol*, 2021, 41(10):1598-1619. DOI: 10.1002/jat.4149.
- [18] WANG J K, ZHANG Z H, SHI F Q, et al. PM2.5 caused ferroptosis in spermatocyte via overloading iron and disrupting redox homeostasis[J]. *Sci Total Environ*, 2023, 872: 162089. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2023.162089.
- [19] SHI F Q, ZHANG Z H, WANG J K, et al. Analysis by metabolomics and transcriptomics for the energy metabolism disorder and the aryl hydrocarbon receptor activation in male reproduction of mice and GC-2spd cells exposed to PM_{2.5}[J]. *Front Endocrinol*, 2021, 12: 807374. DOI: 10.3389/fendo.2021.807374.
- [20] ZHENG S K, JIANG J C, SHU Z H, et al. Fine particulate matter (PM_{2.5}) induces testosterone disruption by triggering ferroptosis through SIRT1/HIF-1 α signaling pathway in male mice[J]. *Free Radic Biol Med*, 2024, 221:40-51. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2024.05.026.
- [21] CHEN Y Y, XI Y Y, LI M L, et al. Maternal exposure to PM2.5

- decreases ovarian reserve in neonatal offspring mice through activating PI3K/AKT/FoxO3a pathway and ROS-dependent NF- κ B pathway[J]. *Toxicology*, 2022, 481: 153352. DOI: 10.1016/j.tox.2022.153352.
- [22] YANG M J, TIAN F, TAO S M, et al. Concentrated ambient fine particles exposure affects ovarian follicle development in mice[J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2022, 231:113178. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2022.113178.
- [23] WANG H Y, WANG T H, RUI W, et al. Extracellular vesicles enclosed-miR-421 suppresses air pollution (PM_{2.5})-induced cardiac dysfunction via ACE2 signalling[J]. *J Extracell Vesicles*, 2022, 11(5): e12222. DOI: 10.1002/jev2.12222.
- [24] SMYTH T, VEAZEY J, ELISEEVA S, et al. Diesel exhaust particle exposure reduces expression of the epithelial tight junction protein Tricellulin[J]. *Part Fibre Toxicol*, 2020, 17(1): 52. DOI: 10.1186/s12989-020-00383-x.
- [25] MORIMOTO Y, IZUMI H, YOSHIURA Y, et al. Usefulness of intratracheal instillation studies for estimating nanoparticle-induced pulmonary toxicity[J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(2): 165. DOI: 10.3390/ijms17020165.
- [26] MORIMOTO Y, IZUMI H, YOSHIURA Y, et al. Significance of intratracheal instillation tests for the screening of pulmonary toxicity of nanomaterials[J]. *J UOEH*, 2017, 39(2):123-132. DOI: 10.7888/juoeh.39.123.
- [27] ZHU N, JI X T, GENG X L, et al. Maternal PM_{2.5} exposure and abnormal placental nutrient transport[J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2021, 207:111281. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2020.111281.
- [28] 张丰泉,董恩恒,王茂,等. PM_{2.5}对雌鼠生殖内分泌水平和妊娠结局的影响[J]. *中国实验动物学报*, 2017, 25(4):455-460. DOI: 10.3969/j.issn.1005-4847.2017.04.019.
- ZHANG F Q, DONG E H, WANG M, et al. Effects of PM_{2.5} on reproductive hormone levels and pregnancy outcome in female rats[J]. *Acta Lab Animalis Sci Sin*, 2017, 25(4):455-460. DOI: 10.3969/j.issn.1005-4847.2017.04.019.
- [29] 张丰泉,赵杉,董恩恒. PM_{2.5}通过激活NLRP3/Caspase-1通路诱导大鼠子宫炎症反应[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2022, 38(9):1234-1241. DOI: 10.13865/j.cnki.cjbmb.2022.07.1064.
- ZHANG F Q, ZHAO S, DONG E H. PM_{2.5} induces uterine inflammation via activating of NLRP3/caspase-1 pathway[J]. *Chin J Biochem Mol Biol*, 2022, 38(9):1234-1241. DOI: 10.13865/j.cnki.cjbmb.2022.07.1064.
- [30] 张丰泉,赵杉,董恩恒,等. 核转录因子NF-E2相关因子2信号通路在PM_{2.5}致雌性大鼠生殖损伤中的作用[J]. *中国实验动物学报*, 2018, 26(5): 639-643. DOI: 10.3969/j.issn.1005-4847.2018.05.016.
- ZHANG F Q, ZHAO S, DONG E H, et al. Effect of NF-E2 related factor 2 pathway activation on PM_{2.5} induced reproductive injury in female rats[J]. *Acta Lab Animalis Sci Sin*, 2018, 26(5): 639-643. DOI: 10.3969/j.issn.1005-4847.2018.05.016.
- [31] 邱娴娴,安妮妮,江克华,等. PM_{2.5}暴露通过NF- κ B信号通路致雄性大鼠生殖功能障碍[J]. *实用医学杂志*, 2022, 38(7):836-840, 847. DOI: 10.3969/j.issn.1006-5725.2022.07.011.
- QIU X X, AN N N, JIANG K H, et al. Reproductive dysfunction induced by PM_{2.5} exposure through NF- κ B signaling pathway in male rats[J]. *J Pract Med*, 2022, 38(7):836-840, 847. DOI: 10.3969/j.issn.1006-5725.2022.07.011.
- [32] LIU X N, JIN X T, SU R J, et al. The reproductive toxicology of male SD rats after PM_{2.5} exposure mediated by the stimulation of endoplasmic reticulum stress[J]. *Chemosphere*, 2017, 189: 547-555. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2017.09.082.
- [33] 王婷婷,郑昕蕊,李文燕,等. 母源性PM_{2.5}暴露致子代鼠大脑皮层神经炎症与星形胶质细胞和小胶质细胞激活[J]. *中国组织化学与细胞化学杂志*, 2018, 27(4):313-320. DOI: 10.16705/j.cnki.1004-1850.2018.04.002.
- WANG T T, ZHENG X R, LI W Y, et al. Maternal PM_{2.5} exposure induces the activation of astrocytes and microglia and subsequent neuroinflammation in the cerebral cortex in mouse offspring[J]. *Chin J Histochem Cytochem*, 2018, 27(4): 313-320. DOI: 10.16705/j.cnki.1004-1850.2018.04.002.
- [34] 赵会,谭金峰,刘德文,等. 妊娠期大气细颗粒物暴露损伤孕鼠多种器官并抑制妊娠及胎儿发育[J]. *中国组织化学与细胞化学杂志*, 2016, 25(1): 42-48. DOI: 10.16705/j.cnki.1004-1850.2016.01.008.
- ZHAO H, TAN J F, LIU D W, et al. Exposure to Atmospheric fine particulate matter damages multiple organs of pregnant mice and inhibits pregnancy and fetal development during pregnancy[J]. *Chin J Histochem Cytochem*, 2016, 25(1):42-48. DOI: 10.16705/j.cnki.1004-1850.2016.01.008.
- [35] 余伊翔,曹珊珊,冯怡,等. 大鼠气管滴注方法的改良及效果评价[J]. *实验动物与比较医学*, 2021, 41(6): 543-546. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2021.031.
- YU Y X, CAO S S, FENG Y, et al. Improvement and effect evaluation on method of tracheal instillation in rats[J]. *Lab Anim Comp Med*, 2021, 41(6): 543-546. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2021.031.
- [36] LIU X M, GE P X, LU Z Y, et al. Reproductive toxicity and underlying mechanisms of fine particulate matter (PM_{2.5}) on *Caenorhabditis elegans* in different seasons[J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2022, 248: 114281. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2022.114281.
- [37] YANG R Y, GE P X, LIU X M, et al. Chemical composition and transgenerational effects on *Caenorhabditis elegans* of seasonal fine particulate matter[J]. *Toxics*, 2023, 11(2): 116. DOI: 10.3390/toxics11020116.
- [38] RHEE J, HAN E, NAM K J, et al. Assessment of hair cell damage and developmental toxicity after fine particulate matter 2.5 μ m (PM_{2.5}) exposure using zebrafish (*Danio rerio*) models[J]. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*, 2019, 126: 109611. DOI: 10.1016/j.ijporl.2019.109611.
- [39] HUANG J, LU H, DU J W, et al. Effects of exposure to PM_{2.5} during pregnancy on the multigenerational reproductive outcomes of male mouse offspring and the role of Sertoli cells[J]. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2023, 30(47):103823-103835. DOI: 10.1007/s11356-023-29751-8.
- [40] YANG W, XU Y Y, PAN H J, et al. Chronic exposure to diesel exhaust particulate matter impairs meiotic progression during spermatogenesis in a mouse model[J]. *Ecotoxicol*

- Environ Saf, 2020, 202: 110881. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2020.110881.
- [41] YANG Y, FENG Y J, HUANG H, et al. PM_{2.5} exposure induces reproductive injury through IRE1/JNK/autophagy signaling in male rats[J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2021, 211: 111924. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2021.111924.
- [42] LIU B, WU S D, SHEN L J, et al. Spermatogenesis dysfunction induced by PM_{2.5} from automobile exhaust via the ROS-mediated MAPK signaling pathway[J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2019, 167:161-168. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2018.09.118.
- [43] CAO X N, SHEN L J, WU S D, et al. Urban fine particulate matter exposure causes male reproductive injury through destroying blood-testis barrier (BTB) integrity[J]. *Toxicol Lett*, 2017, 266:1-12. DOI: 10.1016/j.toxlet.2016.12.004.
- [44] 王晓飞, 蒋守芳, 张维冰, 等. 利用代谢组学研究大气细颗粒物的生殖毒性效应[J]. *分析化学*, 2017, 45(5):633-640. DOI: 10.11895/j.issn.0253-3820.170020.
- WANG X F, JIANG S F, ZHANG W B, et al. Study on reproductive toxicity of fine particulate matter by metabolomics[J]. *Chin J Anal Chem*, 2017, 45(5):633-640. DOI: 10.11895/j.issn.0253-3820.170020.
- [45] ZHANG J, LIU J H, REN L H, et al. PM_{2.5} induces male reproductive toxicity via mitochondrial dysfunction, DNA damage and RIPK1 mediated apoptotic signaling pathway[J]. *Sci Total Environ*, 2018, 634: 1435-1444. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2018.03.383.
- [46] LIU J H, REN L H, WEI J L, et al. Fine particle matter disrupts the blood-testis barrier by activating TGF- β 3/p38 MAPK pathway and decreasing testosterone secretion in rat[J]. *Environ Toxicol*, 2018, 33(7):711-719. DOI: 10.1002/tox.22556.
- [47] WEI Y, CAO X N, TANG X L, et al. Urban fine particulate matter (PM_{2.5}) exposure destroys blood-testis barrier (BTB) integrity through excessive ROS-mediated autophagy[J]. *Toxicol Mech Methods*, 2018, 28(4): 302-319. DOI: 10.1080/15376516.2017.1410743.
- [48] 严超, 曹希宁, 沈炼桔, 等. 汽车尾气来源PM_{2.5}颗粒物长期暴露导致SD雄鼠生殖功能损害[J]. *中华男科学杂志*, 2016, 22(2):104-109. DOI: 10.13263/j.cnki.nja.2016.02.002.
- YAN C, CAO X N, SHEN L J, et al. Long-term exposure to PM_{2.5} from automobile exhaust results in reproductive dysfunction in male rats[J]. *Natl J Androl*, 2016, 22(2):104-109. DOI: 10.13263/j.cnki.nja.2016.02.002.
- [49] 吴思雨, 侯海燕, 张利文, 等. 大气细颗粒物PM_{2.5}对雌性大鼠生育力损伤作用的研究[J]. *国际妇产科学杂志*, 2016, 43(3): 258-262.
- WU S Y, HOU H Y, ZHANG L W, et al. Impairment of airborne fine particulate matters PM_{2.5} to the fertility of female rats [J]. *J Int Obstet Gynecol*, 2016, 43(3):258-262.
- [50] 周雅琳, 张敏佳, 刘伟, 等. 孕期及哺乳期PM_{2.5}暴露致子代小鼠低体重的跨代遗传效应[J]. *环境与健康杂志*, 2019, 36(2):111-115. DOI: 10.16241/j.cnki.1001-5914.2019.02.005.
- ZHOU Y L, ZHANG M J, LIU W, et al. Transgenerational effects of offspring low body weight induced by maternal exposure to PM_{2.5} during pregnancy and lactation[J]. *J Environ Health*, 2019, 36(2):111-115. DOI: 10.16241/j.cnki.1001-5914.2019.02.005.
- [51] GAI H F, AN J X, QIAN X Y, et al. Ovarian damages produced by aerosolized fine particulate matter (PM_{2.5}) pollution in mice: possible protective medications and mechanisms[J]. *Chin Med J*, 2017, 130(12): 1400-1410. DOI: 10.4103/0366-6999.207472.
- [52] 杨阳, 刘福荣, 崔留欣, 等. PM_{2.5}暴露对雄性大鼠生殖功能及IRE1-JNK通路相关蛋白表达的影响[J]. *郑州大学学报(医学版)*, 2021, 56(3):309-313. DOI: 10.13705/j.issn.1671-6825.2020.04.024.
- YANG Y, LIU F R, CUI L X, et al. Effects of PM_{2.5} exposure on reproductive function and expressions of IRE1-JNK pathway related proteins in male rats[J]. *J Zhengzhou Univ Med Sci*, 2021, 56(3):309-313. DOI: 10.13705/j.issn.1671-6825.2020.04.024.
- [53] CHENG C Y, WONG E W, LIE P P, et al. Regulation of blood-testis barrier dynamics by desmosome, gap junction, hemidesmosome and polarity proteins: an unexpected turn of events[J]. *Spermatogenesis*, 2011, 1(2):105-115. DOI: 10.4161/spmg.1.2.15745.
- [54] MESQUITA S R, VAN DROOGE B L, OLIVEIRA E, et al. Differential embryotoxicity of the organic pollutants in rural and urban air particles[J]. *Environ Pollut*, 2015, 206:535-542. DOI: 10.1016/j.envpol.2015.08.008.
- [55] GASKINS A J, MÍNGUEZ-ALARCÓN L, FONG K C, et al. Exposure to fine particulate matter and ovarian reserve among women from a fertility clinic[J]. *Epidemiology*, 2019, 30(4):486-491. DOI: 10.1097/EDE.0000000000001029.
- [56] YUAN L, ZHANG Y, WANG W D, et al. Critical windows for maternal fine particulate matter exposure and adverse birth outcomes: the Shanghai birth cohort study[J]. *Chemosphere*, 2020, 240:124904. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2019.124904.
- [57] 巩艳, 李文燕, 郑昕蕊, 等. 妊娠期大气细颗粒物暴露对新生小鼠肝脏发育的影响[J]. *中国组织化学与细胞化学杂志*, 2016, 25(5): 406-410. DOI: 10.16705/j.cnki.1004-1850.2016.05.005.
- GONG Y, LI W Y, ZHENG X R, et al. Effects of gestational exposure to atmospheric fine particulate matter on liver development of newborn mice[J]. *Chin J Histochem Cytochem*, 2016, 25(5):406-410. DOI: 10.16705/j.cnki.1004-1850.2016.05.005.

(收稿日期:2024-05-11 修回日期:2024-08-01)

(本文编辑:张俊彦,富群华,丁宇菁,吴昊晟)

[引用本文]

田芳, 潘滨, 史佳怡, 等. 大气细颗粒物PM_{2.5}暴露动物模型建立方法及在生殖毒性研究中的应用进展[J]. *实验动物与比较医学*, 2024, 44(6): 626-635. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.068.

TIAN F, PAN B, SHI J Y, et al. Advances in development of PM_{2.5}-exposed animal models and their application in reproductive toxicity research[J]. *Lab Anim Comp Med*, 2024, 44(6): 626-635. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.068.

脓毒症相关脏器损伤动物模型研究进展

杨家豪¹, 丁纯蕾¹, 钱风华², 孙旗¹, 姜旭升², 陈雯², 沈梦雯¹

(1. 上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院急诊医学科, 上海 200437; 2. 上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院老年医学科, 上海 200437)

[摘要] 脓毒症是机体因感染和免疫失调引起的多脏器功能衰竭综合征, 影响心脏、肺脏、肾脏、肝脏、大脑等多个重要器官, 致死率极高。建立各器官功能衰竭综合征相应的动物模型是明确其发病机制、研究潜在有效药物及评估治疗方案有效性与安全性不可或缺的一环。本文首先对脓毒症相关脏器损伤的经典造模方式进行总结, 指出脓毒症的经典造模方式包括破坏肠道屏障组织完整性和植入病原体或毒性药物。前者主要包括盲肠结扎穿刺法、升结肠植入支架法和盲肠结扎切口法, 后者根据模拟临床感染途径的不同分为腹腔注射、静脉注射和气道内给药, 其中以盲肠结扎穿刺法和脂多糖腹腔注射最为常见。其次, 本文归纳总结了脓毒症致心肌损伤、急性肺损伤、急性肾损伤、急性肝损伤、脓毒症相关脑病的动物模型常见的造模方法和模型评估方法, 指出几乎所有器官损伤都用到了经典造模方式, 对不同器官损伤模型根据发病机制的不同进行了相应的补充。比如, 除经典造模方式外, 气管内滴注脂多糖进行脓毒症致急性肺损伤的造模方式更能模拟肺屏障功能损伤; 盲肠结扎穿刺法后气管内给予假单胞菌进行二次打击的脓毒症致急性肾损伤造模方式能表现出更严重的急性肾损伤; 半乳糖胺腹腔注射是较为成熟的脓毒症致急性肝损伤的造模方式; 颅内注射脂多糖是脓毒症致脑功能障碍可行的造模方式。另外, 除造模方式不同外, 根据实验目的的不同, 给药时间、给药剂量和实验时间节点也均存在差异。本综述通过对脓毒症致心肌病、急性肺损伤、急性肾损伤、急性肝损伤、脑功能障碍的动物模型研究进展进行介绍, 以期对动物模型的选择和实验设计的优化提供一定参考。

[关键词] 脓毒症; 动物模型; 多器官功能损伤; 研究进展

[中图分类号] R-332; Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2024)06-0636-09



Research Progress on Animal Models of Sepsis-Related Organ Injury

YANG Jiahao¹, DING Chunlei¹, QIAN Fenghua², SUN Qi¹, JIANG Xusheng², CHEN Wen², SHEN Mengwen¹

(1. Department of Emergency Medicine, Yueyang Integrated Traditional Chinese and Western Medicine Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200437, China; 2. Department of Geriatrics Medicine, Yueyang Integrated Traditional Chinese and Western Medicine Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200437, China)

Correspondence to: SHEN Mengwen (ORCID: 0000-0002-1186-5654), E-mail: hupo_58@163.com

[ABSTRACT] Sepsis is a multi-organ dysfunction syndrome caused by infection and immune dysfunction, with a high mortality rate. It affects multiple important organs such as the heart, lungs, kidneys, liver, and brain. Establishing corresponding animal models of organ dysfunction syndrome is an essential step in clarifying its pathogenesis, researching potential effective drugs, and evaluating the effectiveness and safety of treatment plans. This article first summarizes classic modeling methods for sepsis related organ injury, including the destruction of intestinal barrier tissue integrity and the implantation of pathogens or toxic drugs. The former mainly includes cecal ligation and puncture, ascending colon stent implantation,

[基金项目] 国家自然科学基金“基于机械敏感离子通道蛋白 PIEZO1 的四逆升降散调控细胞紧密连接改善脓毒症急性肺损伤的机制研究”(82304933); 上海市卫生健康委员会卫生行业临床研究专项“四逆升降散改善脓毒症急性呼吸窘迫综合征患者预后的临床观察研究”(202140202); 上海中医药大学预算内科研项目“加味四逆升降散调控 Ang-Tie 轴改善脓毒症急性肺损伤毛细血管渗漏的研究”(2021LK096)

[第一作者] 杨家豪(1999—), 男, 硕士研究生在读, 研究方向: 中西医结合急危重症诊疗。E-mail: 864102934@qq.com

[通信作者] 沈梦雯(1986—), 女, 博士, 副主任医师, 研究方向: 中西医结合急危重症诊疗。E-mail: hupo_58@163.com。ORCID: 0000-0002-1186-5654

and cecal ligation incision. The latter is divided into intraperitoneal injection, intravenous injection, and intratracheal administration based on the clinical infection route being simulated. Cecal ligation and puncture and lipopolysaccharide intraperitoneal injection are the most commonly used methods. Secondly, this article summarizes the common modeling methods and evaluation methods for animal models of sepsis-induced cardiomyopathy, acute lung injury, acute kidney injury, acute liver injury, and brain dysfunction. It points out that almost all organ injuries use classic modeling methods, and different organ injury models have additional modifications according to their different pathogenesis. For example, in addition to the classic modeling methods, lipopolysaccharide instillation in the trachea is more effective in modeling acute lung injury as it better simulates lung barrier dysfunction. Cecal ligation and puncture followed by *Pseudomonas* instillation in the trachea in a secondary challenge model better represents sepsis-induced acute kidney injury. Intraperitoneal injection of galactosamine is a mature modeling method of sepsis-induced acute liver injury. Intracerebral injection of lipopolysaccharide is a feasible model of sepsis-associated encephalopathy. In addition to the different modeling methods, there are differences in the administration time, dosage and experimental time points according to the different experimental purposes. This article reviews the research progress of animal experimental models for sepsis-induced cardiomyopathy, acute lung injury, acute kidney injury, acute liver injury, and brain dysfunction, aiming to provide a reference for the selection of animal experimental models and optimization of experimental design.

[Key words] Sepsis; Animal models; Multiple organ dysfunction; Research progress

脓毒症 (sepsis) 是重症监护病房 (intensive care unit, ICU) 常见的危重症之一。2016年, 脓毒症3.0被定义为机体对感染反应失调引起的多器官功能障碍综合征^[1-3], 相较于1991年的脓毒症1.0与2001年的脓毒症2.0定义, 新定义更加关注感染序贯的脏器功能损害。截至2017年, 全球有4 890万例脓毒症病例, 其中死亡病例约占全球死亡总数的19.7%^[4]。一项统计调查表明, 在中国的ICU中, 脓毒症患者约占20%, 其90 d死亡率高达35.5%^[5]。随着医疗技术的发展, 脓毒症的死亡率有较大降低, 但该疾病对患者心脏、肺脏、肾脏、肝脏、大脑等多个器官功能仍会造成极大损伤, 如何改善脓毒症患者的预后依然是全球面临的重要医学难题^[6]。为了解决这一难题, 建立稳定、可重复的动物模型是推动脓毒症相关脏器损伤研究的关键之一。

1 经典造模方式

1.1 破坏肠道屏障组织完整性

细菌性腹膜炎模型是临床上用于模拟脓毒症的常用模型, 该模型通过破坏肠道完整性, 以使微生物群成分进入腹腔, 来实现模拟脓毒症的过程^[7]。目前破坏组织完整性的造模方式可分为盲肠结扎与穿刺 (cecal ligation and puncture, CLP) 型、升结肠支架腹膜炎脓毒症 (colon ascendens stent peritonitis, CASP) 型、

盲肠结扎与切口 (cecal ligation and incision, CLI) 型^[8-9]。

1.2 植入病原体/毒性药物

植入病原体即向动物给予临床常见致病菌如大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、肺炎克雷伯菌、鲍曼不动杆菌、铜绿假单胞菌和链球菌等^[10-11], 从而模拟临床屏障组织感染诱发的脓毒症。根据不同的研究目的, 可采用不同的给药途径, 如腹腔注射、静脉注射与气管内给药 (表1)。这种方法无需手术, 具有可重复性和低侵入性的特点, 适合触发特定病原体免疫反应的研究^[12]。

植入毒性药物诱导脓毒症通常需要使用病原体相关分子模式 (pathogen-associated molecular patterns), 其中以脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 最为常见, 其他还有酵母聚糖、肽聚糖等^[13-14]。此类造模方式可以快速且有效地诱导脓毒症, 常用于研究免疫应答及炎症反应。但由于毒性药物的单一性, 此类方法难以模拟临床上多菌性脓毒症的病理生理情况。

除此之外, 向腹腔注射粪便溶液或盲肠匀浆可以诱导一种侵入性低且易于获得的多微生物脓毒症模型, 然而肠道内容物大量给药的造模方式会引起强烈的免疫反应, 需要进行模型鉴定和筛选。这个过程中实验动物可能在造模早期死亡, 也可能会完全康复, 这就对取得预期实验效果造成了阻碍^[15]。

腹腔内植入载有病原体的纤维蛋白凝块是一种新

型诱导脓毒症的方式。该方法首先将一定剂量的细菌封闭在纤维蛋白凝块中, 然后通过中线剖腹手术将纤维蛋白凝块植入腹腔。纤维蛋白会延迟机体对被封闭细菌的吸收速度, 并促进脓肿的形成和发展, 进而使脓肿演变成局部的脓毒症病灶, 引起腹膜炎, 最终导

致血流感染。与传统造模方式相比, 这种造模方式的优势在于病原体在体内缓慢持续释放, 可以更好地模拟病原体从感染到扩散的过程, 造成更为持久的感染模型^[8]。

经典造模方式的优缺点具体见表2。

表1 常见造模药物给药途径及优缺点

Table 1 Common routes of drug administration for modeling and their advantages and limitations

给药途径 Routes of administration	优点 Advantages	局限 Limitations
腹腔注射 Intraperitoneal injection	操作简便, 适用于快速诱导脓毒症模型	可引起腹膜炎等多种并发症, 无法造成目标脏器损伤; 无法完全模拟临床脓毒症多菌性感染
静脉注射 Intravenous injection	接近临床细菌及毒素入血情况, 适用于研究循环中的炎症反应	易损伤血管; 对药物剂量及浓度要求高
气管内给药 Intratracheal administration	可模拟肺部感染引起的脓毒症, 适合建立急性肺损伤模型	操作复杂、易对气管造成损伤; 对药物剂量及浓度要求高

表2 建立脓毒症动物模型的常见方法及其优缺点

Table 2 Common methods for establishing animal models of sepsis and their advantages and limitations

方法 Methods	具体技术 Specific techniques	优点 Advantages	局限 Limitations
破坏肠道屏障组织完整性 Disrupting the integrity of intestinal barrier tissue	CLP ^[7]	脓毒症造模“金标准”最接近人类脓毒症发病过程; 可重复性高; 可模拟多菌性感染	手术难度大、死亡率及疾病严重程度难以控制
	CASP ^[8]	接近人类脓毒症发病过程; 可重复性高; 可控制脓毒症严重程度	手术难度大、操作复杂
	CLI ^[9]	与CLP模式相同, 可持续释放病原体, 模拟临床腹腔感染致脓毒症	代谢组学、血流动力学以及免疫反应的研究尚未成熟
植入病原体/毒性药物 Introducing pathogens/toxic drugs	脂多糖、酵母聚糖、肽聚糖 ^[13-14]	易操作、低侵入性; 可激活宿主免疫系统用于研究脓毒症相关免疫反应	无法模拟脓毒症的多菌性感染
	大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、肺炎克雷伯菌 ^[10-11]	易操作、低侵入性; 适用研究宿主对特定病原体的反应机制	无法模拟脓毒症的多菌性感染, 有细菌使用的实验室等级要求
	载有病原体的纤维蛋白凝块 ^[8]	可重复性高; 使病原体缓慢释放, 造成持久感染而不影响最终死亡率	纤维蛋白凝块制作难度大
	粪便溶液、盲肠匀浆 ^[15]	易操作、低侵入性; 可模拟多菌性感染	免疫反应过于强烈, 易导致早期死亡或早期完全康复, 浓度难以控制

2 脓毒症致不同脏器损伤相关动物造模

在脓毒症造模动物的选择上, 鼠类 (murine), 如大鼠、小鼠、豚鼠等, 由于其易于基因改造、繁殖能力强、世代更新快且容易饲养的特性, 是研究各类脓毒症相关脏器损伤最常选用的实验对象。

2.1 脓毒症致心肌病

脓毒症心肌损伤 (sepsis-induced myocardial injury, SIMI) 是脓症患者最严重且最常见的并发症之一, 表现为心室射血分数降低和心室扩张, 对患者

的预后构成极大的威胁^[16]。

2.1.1 腹腔注射LPS法与CLP法

胡立亚等^[17] 在一项比较腹腔注射10、12、15 mg/kg等不同剂量LPS后对C57BL/6小鼠 (8~12周龄、雄性) 模型进行脓毒症心肌损伤的研究中发现, 7 d死亡率分别为33.3%、53.3%、86.7%。LPS各剂量组小鼠均出现心肌组织损伤, 且LPS的剂量越大损伤越严重。在达格列净与冷诱导RNA结合蛋白通过减轻心脏炎症、细胞凋亡和氧化应激改善SIMI的两项不同的研究中, 均采用LPS腹腔注射法进行造模。前者LPS以

5 mg/kg的剂量腹腔注射入SD大鼠(8周龄、雄性),所有大鼠在LPS注射后均予2 mL/kg生理盐水进行液体复苏,药物干预时间为造模前7 d,样本采集时间为造模后24 h^[18];后者实验对象为C57BL/6J小鼠(10周龄、雄性),LPS剂量为10 mg/kg,药物干预时间为造模前7 d,样本采集时间为造模后12 h^[19]。两项实验均发现达格列净能够减轻脓毒症致SIMI。在芦竹碱改善SIMI的研究中,于造模前7 d每日使用芦竹碱干预,向C57BL/6小鼠(8~12周龄、雄性)腹腔内按20 mg/kg注射LPS造模后,每隔12 h记录小鼠存活情况。结果显示,实验组24 h及72 h存活率均优于对照组,说明芦竹碱具有减轻脓毒症致SIMI的作用^[20]。

另外两项通过抑制铁死亡来改善SIMI的研究均采用CLP法对SD大鼠(6~8周龄、雄性)进行造模。术后立即予40 mL/kg乳酸钠林格氏液进行液体复苏,其给药时间为CLP前30 min。之后按照每12 h一次的间隔给予药物干预,采集时间为造模后24 h。结果发现白藜芦醇可通过激活Sirt1/Nrf2通路减轻铁死亡,而益气复脉合剂可通过激活xCT/GPX4通路减轻铁死亡,从而减轻大鼠的SIMI严重程度^[21-22]。

2.1.2 SIMI模型的评估

造模之后,通过超声心动图评估心功能;血样本的生化检测评估炎症因子;酶联免疫吸附试验检测心肌损伤标志物水平;病理组织切片观察心肌结构形态等相关实验方式进行SIMI模型评估^[23]。

2.2 脓毒症致急性肺损伤

急性肺损伤(acute lung injury, ALI)是脓毒症中最为常见且最早发生的并发症,该病进展迅速且有极高的死亡率^[24]。免疫反应失调及内皮功能障碍是脓毒症ALI的标志^[25]。CLP与LPS注射仍然是脓毒症急性肺损伤(sepsis-induced acute lung injury, SALI)动物模型的主要建立方式^[26]。

2.2.1 经典造模方式均能造成SALI免疫反应失调

Zhou等^[27]在近期一项实验比较了单次盲肠结扎穿刺法、两次重复穿刺法、LPS(10 mg/kg或20 mg/kg)尾静脉注射法、LPS(10 mg/kg或20 mg/kg)气管内滴注法诱发的SALI动物模型情况。分别在SD大鼠(体重180~220 g、雄性)造模后4、24、48 h这三个时间点进行比较。结果发现,就死亡率而言,除10 mg/kg LPS气管内滴注法外,其余造模方式的大鼠在7 d内的死亡率均超过50%;就炎症因子释放而言,各模型组在造模后24 h和48 h时,大鼠血清白细胞介素-6和C

反应蛋白水平均明显升高。

Ji等^[28]在另一项研究血清淀粉样蛋白A与脓毒症小鼠(4月龄、雄性、C57BL/6型)死亡率和肺损伤的研究中分别使用了LPS(7.5 mg/kg)腹腔内注射、CLP、盲肠匀浆注射三种造模方式,使用这三种方法造模的小鼠在7 d内的死亡率分别为10%、45%、29%。此外,Sorgun等^[29]在研究中探讨了利用甜菜碱的抗炎和抗氧化特性对SALI的保护作用,给Wistar大鼠(体重200~250 g、雄性)按1 g/kg的剂量腹腔注射75 mg/mL浓度的大鼠(不包括在本研究中)粪便溶液,造模后24 h取样,发现与对照组相比,实验组白细胞介素-6和C反应蛋白水平均降低。并且经甜菜碱治疗后,实验组肺CT实质密度以及肺组织病理评分均较对照组有所改善。

2.2.2 气道内给药可以更好地模拟肺屏障功能损伤

在前述的六种SALI动物模型比较实验中,气管内滴注LPS的大鼠肺组织病理学上有明显改变且伴有炎性渗出。在第4个小时,大鼠肺泡灌洗液中的白细胞介素-6、C反应蛋白、总蛋白浓度出现了明显升高,但CLP与LPS尾静脉注射组均未见肺损伤表现,肺泡灌洗液结果均无明显变化^[27]。

Guo等^[30]在另一项关于药物调节表面活性蛋白表达与分泌以减轻SALI的研究中,以向FVB/NJ小鼠(8~12周龄、不区分性别)气管内注射荧光标记铜绿假单胞菌溶液(5×10^4 CFU/只)的方式进行造模。在造模后的0、12、24、36、48 h分别采用荧光信号检测活体成像系统检测小鼠体内的细菌负荷。结果显示,在24 h时出现细菌负荷高峰。其药物干预时间为造模后30 min,实验时间为造模后24 h,此造模方式的48 h死亡率为60%。

2.2.3 SALI模型的评估

造模后通过测定肺组织中过氧化酶活性来评估炎性细胞在肺组织的浸润程度;肺湿重与干重比来评估组织水肿程度^[15];支气管肺泡灌洗液中蛋白水平与伊文思蓝外渗试验来检测血管通透性^[26];酶联免疫吸附试验来检测血清和支气管肺泡灌洗液中白细胞介素-6,肿瘤坏死因子- α 等因子的浓度;原位末端标记法来评估内皮细胞凋亡程度等相关试验进行SALI模型评估^[31]。

2.3 脓毒症致急性肾损伤

脓毒症致急性肾损伤(sepsis-associated acute

kidney injury, SA-AKI) 是常见的器官功能障碍之一。约 60% 的脓毒症患者会并发急性肾损伤 (acute kidney injury, AKI), 而 AKI 的发展会显著增加患者死亡风险^[32]。

2.3.1 最常见的 SA-AKI 造模方式

Lv 等^[33] 在一项探究 SA-AKI 潜在诊断生物标志物的研究中, 研究人员将 LPS 以 10 mg/kg 注射于 Wistar 大鼠 (8~9 周龄、体重 180~220 g、雄性) 腹膜内, 并设 LPS 注射后 8、12、24、48、72 h 为观察时间点。结果发现, LPS 注射 8 h 后血清肌酐与尿素氮开始明显升高且于 12 h 到达高峰后开始下降。Kim 等^[34] 在一项探讨 β -羟基丁酸是否通过减少肾小管细胞凋亡和炎症反应来改善 SA-AKI 的研究中, 将 LPS 以 15 mg/kg 的剂量, 腹腔注射于 C57BL/6 小鼠 (8 周龄、雄性) 体内进行造模, 药物干预时间为造模前 24 h, 而样本采集时间为造模后 24 h。实验结果表明, β -羟基丁酸能够减轻 SA-AKI 的严重程度。

CLP 造模方式与前文类似, 例如, Luo 等^[35] 在通过调控乳腺癌易感蛋白 1 的稳定性使核因子 κ B (nuclear factor κ B, NF- κ B) 信号通路失活进而减轻 SA-AKI 的研究中, 给药时间为 C57BL/6J 小鼠 (8 周龄、雄性) CLP 前 1 d, 术后立即予 50 mL/kg 生理盐水液体复苏, 样本采集观察时间为术后 12、24、48 h。

2.3.2 降低早期死亡率的改良造模方式

尽管早期可以看到血清肌酐和尿素氮的升高, 但是病理学观察显示肾实质不一定有损伤, 小鼠可能痊愈或未进展至肾损伤却已死于其他脏器功能衰竭。因此, 为了降低早期死亡率, 提升肾损伤的发生率, 有研究人员进行了一定的探索, 并改良了造模方式。

Munley 等^[36] 在近期的一项关于脓毒症造模方法的研究中发现, 在 SD 大鼠 (9~11 周龄、不区分性别) CLP 术后第一天通过气管内给予假单胞菌进行二次打击的造模方式比单独 CLP 表现出更严重的 AKI 和更高的血肌酐水平。在研究水通道蛋白等多种蛋白是否能作为 SA-AKI 的潜在指标中, 通过向 Wistar 大鼠 (8~9 周龄、雄性) 腹腔内注射盲肠匀浆的方式进行造模。但与传统盲肠匀浆造模方式不同, 该实验在造模后 12 h 每天 2 次, 连续 5 d 给予抗感染处理 (亚胺培南 1.5 mg/只), 并于造模后 24 h 开始液体复苏, 以此延长大鼠存活时间^[33]。

2.3.3 SA-AKI 模型的评估

造模后, 经尾静脉收集血样本或代谢笼采集尿液

标本, 以测定肌酐与尿素氮水平来评估肾功能; 同时, 收集肾脏样本进行病理染色, 以评估肾组织的损伤程度 (肾小管坏死、上皮细胞脱落、管型沉积、血管充血等)。以上相关实验用于评估 SA-AKI 模型^[37-38]。

2.4 脓毒症致急性肝损伤

肝脏作为防御感染的前线脏器, 在脓毒症的发展过程中发挥着重要作用; 同时, 肝脏也是脓毒症相关脏器损伤的主要目标之一。大约 50% 的脓毒症患者会出现急性肝损伤 (sepsis-induced acute liver injury, SI-ALI)^[39]。

2.4.1 CLP 与 LPS/半乳糖胺腹腔注射是较为成熟的 SI-ALI 造模方式

Wan 等^[40] 在研究 T 细胞产生的白细胞介素-17a 在 SI-ALI 中的保护作用时, 虽采用 CLP 造模, 但与传统 CLP 造模方式不同的是, 此实验中运用 18 号针头穿刺 5 次以达到造模目的, 给药时间为手术前 3 d, 其 7 d 内死亡率为 70%。

Zhang 等^[41] 在莲心碱通过核因子 κ B 和丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 通路减轻 SI-ALI 的研究中则采用 LPS (10 mg/kg) 向 C57BL/6 小鼠 (7~8 周龄、雄性) 腹膜内注射的方式造模, 其药物干预时间为 LPS 注射前 5 d 每日给药, 样本采集时间为 LPS 注射后 6 h。此外, Arunachalam 等^[42] 基于肝脏代谢药物的特殊功能, 半乳糖胺被特异性地用于急性肝损伤的造模中。例如, 在 P2Y2 嘌呤核苷酸受体基因缺失可保护小鼠免受细菌内毒素和脓毒症相关肝损伤的研究中, 采用 LPS (100 μ g/kg) 联合半乳糖胺 (700 mg/kg) 向 C57BL/6J 小鼠 (10~12 周龄、雄性) 腹腔内注射的造模方式, 分别于造模后 1 h 和 5 h 后进行样本采集。

2.4.2 SI-ALI 模型的评估

造模后, 收集血样本以测定血清丙氨酸转氨酶 (alanine transaminase, ALT)、天冬氨酸转氨酶 (aspartate transaminase, AST) 以评估肝功能, 通过酶联免疫吸附试验来检测肝脏匀浆中白细胞介素-1 β 、肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素-6 的表达来评估肝脏中的细胞因子水平, 以肝脏病理组织切片等实验进行 SI-ALI 的评估^[43]。

2.5 脓毒症相关脑病

脓毒症相关脑病 (sepsis-associated encephalopathy, SAE) 主要由脓毒症进展过程中释放的各类因子所致, 其发病率高且发病时间早。急性期

表现为谵妄、脑缺血或脑出血等，远期表现为认知障碍^[44]。

2.5.1 建立脓毒症相关脑病动物模型首要选择

Giridharan等^[45]在一项关于脓毒症致认知功能下降及其与肠道和大脑之间相互作用的研究中，采用CLP对Wistar大鼠（50日龄、雄性）进行造模，大鼠在术后12 h给予液体复苏以及抗感染治疗。在术后24 h或10 d进行后续实验，发现神经胶质细胞和肠道微生态可能为治疗脓毒症幸存者认知功能障碍提供新靶点。Kala等^[46]在一项关于脓毒症引起大鼠海马体振荡状态的研究中，使用LPS（10 mg/kg）向Long-Evans大鼠（体重400~500 g、雄性）腹腔内注射进行造模，其观测时间为LPS注射后3 h，实验结果描述了脓毒症患者和SAE动物模型中的严重睡眠碎片化的机制。

2.5.2 LPS直接损伤模型的探索

Lee等^[47]在一项探究抗炎与LPS致大鼠学习与记忆障碍作用之间关系的研究中，将50 μg LPS溶于10 μL的脑脊液中，再向SD大鼠（6周龄、雄性）双侧颅内进行注射。此法可引起慢性炎症并导致脑功能障碍，给药时间为LPS注射后24 h。该实验发现人参

皂苷Rg3可能通过其在大脑中具有的抗炎活性改善认知和记忆功能，从而有效预防或减缓阿尔茨海默病等神经系统疾病的发展。

2.5.3 SAE模型的评估

造模后，通过伊文思蓝染色评估血-脑屏障通透性；通过水迷宫试验来评估动物学习及记忆能力；采用酶联免疫吸附法测定脑组织样本中细胞因子水平等方法来评估SAE^[48-49]。

3 总结与展望

综上所述，LPS注射与CLP法仍是脓毒症脏器损伤最常用的造模方式。LPS注射法更容易操作、侵入性低、诱导脓毒症速度更快，适用于研究早期的炎症及免疫反应对脏器损伤的影响；而CLP法能更好地模拟多菌性脓毒症，但其操作复杂，且均一性较难把握。各类造模的优缺点比较，具体见表3。为了更好地模拟不同脏器在脓毒症发展过程中的损伤机制，规避经典造模方式的缺点，我们根据研究目标的不同，得出一些新的探索和初步结论，大致可以归纳为：针对脏器的直接给药，例如气道内、颅脑内直

表3 脓毒症致不同脏器损伤相关动物造模及其优缺点

Table 3 Experimental animal modeling of sepsis-induced organ injury and the advantages and limitations of these methods

脏器损伤 Organ damage	方式 Method	时间 Time	优势 Advantages	局限 Limitations	检测指标 Testing indexes
脓毒症致心肌病 Sepsis-induced myocardial injury, SIMI	LPS腹腔注射 ^[18-19,21-22] 器官损伤情况观察剂量： 5~10 mg/kg 生存情况观察剂量：20 mg/kg	造模后 12、24 h	易操作、低侵入性、可快速 诱导脓毒症；可通过调 节剂量控制疾病严重程 度	不能完全模拟脓毒症致 心肌病的临床情况	超声心动图、心肌损 伤标志物、心脏病理 切片 ^[20]
	CLP ^[20]	造模后 12、24 h	更接近临床脓毒症致心肌 病的病理变化	操作复杂、创伤大、无法 同时间点里在保证相 对均一性的情况下大 量造模	
脓毒症致急性肺 损伤 Sepsis-induced acute lung injury, SALI	LPS腹腔注射：5~10 mg/kg ^[27]	造模后 4、	易操作、侵入性低、可快速 诱导脓毒症；可通过调 节剂量及注射方式控制 疾病严重程度	难以模拟多菌性脓毒症 致急性肺损伤	过氧化酶活性、肺干 湿重比、BALF液 及血清中炎症因 子及蛋白水平 ^[15,26,31]
	LPS静脉注射：10~20 mg/kg ^[27]	12、24 h			
	LPS气管内滴注：10~20 mg/kg ^[27]				
	气管内注射生物发光铜绿假单胞 菌溶液(5×10 ⁴ CFU/只) ^[30]	造模后 24 h	可直观检测感染部位、感 染严重程度	操作复杂、生物安全等 级高、仪器要求高	
	粪便溶液腹腔注射：浓度75 mg/ mL；剂量1 g/kg ^[29]	造模后 24 h	易操作，更接近临床多菌性 脓毒症致急性肺损伤的 病理变化	粪便溶液的制备难度 高、均一性差	
	CLP ^[27-28]	造模后 12、24 h	更接近临床脓毒症致急性 肺损伤的病理变化；模 型使用成熟，易于参考	操作复杂、创伤大、无法 同时间点里在保证相 对均一性的情况下大 量造模	

(续表)

脓毒症致急性肾损伤	LPS腹腔注射:10~15 mg/kg ^[33-34]	造模后 12 h	易操作、侵入性低、易重复、可快速诱导脓毒症,利于肾损伤的观察	无法模拟多菌性或特定菌种脓毒症急性肾损伤的病理情况	血尿酸酐、尿素氮、肾脏病理切片 ^[39]
Sepsis-induced acute kidney injury, SA-AKI	盲肠匀浆腹腔注射+亚胺培南(1.5 mg/只, bid)抗感染 ^[33]	造模后 24 h	接近临床脓毒症致急性肾损伤的病理情况、延长了实验动物的存活时间	盲肠匀浆制备难度高、均一性差	
	CLP+气管内滴注假单胞菌的二次打击(10 ⁷ /只) ^[36]	造模后 24 h	可快速诱导更为严重的脓毒症致急性肾损伤、相关肾损伤指标水平更高	操作复杂、死亡率高	
脓毒症致急性肝损伤	LPS腹腔注射:10 mg/kg ^[41]	造模后 6 h	易操作、侵入性低	难以模拟临床上多菌性脓毒症致急性肝损伤的病理情况	血清 ALT、AST、肝脏匀浆中细胞因子水平、肝组织病理切片 ^[43]
Sepsis-induced acute liver injury, SI-ALI	LPS(100 μg/kg)+半乳糖胺(700 mg/kg)腹腔注射 ^[42]	造模后 1.6 h	LPS联合半乳糖胺可较好的模拟临床脓毒症致急性肝损伤、减少LPS的用量	对药物浓度、剂量准确度要求较高	
	CLP ^[40]	造模后 24 h	更接近临床脓毒症致急性肝损伤的病理变化	操作复杂、创伤大、无法同时间点里在保证相对均一性的情况下大量造模	
脓毒症相关脑病	LPS腹腔注射:5~10 mg/kg ^[46]	造模后 3 h	可快速诱导脓毒症相关脑病、对全身炎症反应以及免疫应答进行研究	难以模拟临床上多菌性脓毒症致脑病的病理情况	伊文思蓝染色评估血-脑脊液屏障通透性、水迷宫试验评估动物学习及记忆能力、测定脑组织样本中细胞因子水平、脑组织病理切片 ^[48-49]
Sepsis-associated encephalopathy, SAE	LPS双侧颅内注射:50 μg溶于10 μL脑脊液 ^[47]	造模后 24 h	可引起慢性炎症并导致脑功能障碍	操作复杂、使用少难以参考	
	CLP ^[45]	造模后 24 h	更接近临床脓毒症相关脑病的病理变化	操作复杂、创伤大、无法同时间点里在保证相对均一性的情况下大量造模	

接给予LPS或者细菌造成损伤;采用荧光标记的细菌给药,观察感染部位及感染高峰期;通过小剂量LPS两次或多次打击,或LPS注射联合CLP的复合造模方式来降低造模失败率;感染后联合抗生素疗法,降低造模早期死亡,但因为抗生素使用造成的免疫干扰,仅适用于特定的研究内容。总之,为了更精准地满足脓毒症脏器损伤的研究需求,仍需不断探索、反复评价,以期脓毒症研究和临床诊疗提供更精准的基础依据。

[作者贡献 Author Contribution]

杨家豪负责文章构思设计与撰写;
丁纯蕾参与论文框架构思;
钱风华和陈雯参与文稿修改;
孙旗和姜旭升负责文献收集及整理;
沈梦雯指导论文写作及核定,并获得基金资助。

[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]

- DE BACKER D, DEUTSCHMAN C S, HELLMAN J, et al. Surviving sepsis campaign research priorities 2023[J]. Crit Care Med, 2024, 52(2): 268-296. DOI: 10.1097/CCM.0000000000006135.
- SEYMOUR C W, LIU V X, IWASHYNA T J, et al. Assessment of clinical criteria for sepsis: for the third international consensus definitions for sepsis and septic shock (sepsis-3) [J]. JAMA, 2016, 315(8):762-774. DOI: 10.1001/jama.2016.0288.
- MARGALIN B, ARFIJANTO M V, HADI U. Effector function and neutrophil cell death in the severity of sepsis with diabetes mellitus[J]. Narra J, 2024, 4(1): e532. DOI: 10.52225/narra.v4i1.532.
- RUDD K E, JOHNSON S C, AGESA K M, et al. Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990-2017: analysis for the global burden of disease study[J]. Lancet, 2020, 395(10219):200-211. DOI: 10.1016/S0140-6736(19)32989-7.
- XIE J F, WANG H L, KANG Y, et al. The epidemiology of sepsis in Chinese ICUs: a national cross-sectional survey[J]. Crit Care Med, 2020, 48(3): e209-e218. DOI: 10.1097/CCM.0000000000004155.
- CARABALLO C, JAIME F. Organ dysfunction in sepsis: an

- ominous trajectory from infection to death[J]. *Yale J Biol Med*, 2019, 92(4):629-640.
- [7] WANG J B, LIAO L M, CHEN Y, et al. A modified surgical sepsis model satisfying sepsis-3 and having high consistency of mortality[J]. *Shock*, 2023, 59(4): 673-683. DOI: 10.1097/SHK.0000000000002096.
- [8] DRECHSLER S, OSUCHOWSKI M. Cecal ligation and puncture [M]//Walker J M. *Methods Mol Biol. New York: Humana*, 2021: 1-8. DOI: 10.1007/978-1-0716-1488-4_1.
- [9] UTIGER J M, GLAS M, LEVIS A, et al. Description of a rat model of polymicrobial abdominal sepsis mimicking human colon perforation[J]. *BMC Res Notes*, 2021, 14(1): 14. DOI: 10.1186/s13104-020-05438-y.
- [10] SHARMA A, KONTODIMAS K, BOSMANN M. The MAVS immune recognition pathway in viral infection and sepsis[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2021, 35(16): 1376-1392. DOI: 10.1089/ars.2021.0167.
- [11] CHEUNG G Y C, BAE J S, OTTO M. Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*[J]. *Virulence*, 2021, 12(1): 547-569. DOI: 10.1080/21505594.2021.1878688.
- [12] DICKSON K, LEHMANN C. Inflammatory response to different toxins in experimental sepsis models[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(18):4341. DOI: 10.3390/ijms20184341.
- [13] LIN H, JI F, LIN K Q, et al. LPS-aggravated Ferroptosis via Disrupting Circadian Rhythm by Bmal1/AKT/p53 in Sepsis-Induced Myocardial Injury[J]. *Inflammation*, 2023, 46(4): 1133-1143. DOI: 10.1007/s10753-023-01804-7.
- [14] JAKOBSSON G, PAPAREDDY P, ANDERSSON H, et al. Therapeutic S100A8/A9 blockade inhibits myocardial and systemic inflammation and mitigates sepsis-induced myocardial dysfunction[J]. *Crit Care*, 2023, 27(1): 374. DOI: 10.1186/s13054-023-04652-x.
- [15] BAER B, PUTZ N D, RIEDMANN K, et al. Liraglutide pretreatment attenuates sepsis-induced acute lung injury[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2023, 325(3): L368-L384. DOI: 10.1152/ajplung.00041.2023.
- [16] LIU Y F, HU N D, AI B, et al. MiR-31-5p alleviates septic cardiomyopathy by targeting BAP1 to inhibit SLC7A11 deubiquitination and ferroptosis[J]. *BMC Cardiovasc Disord*, 2024, 24(1):286. DOI: 10.1186/s12872-024-03954-4.
- [17] 胡立亚, 李培军, 常超, 等. 脓毒症心肌损伤小鼠模型的建立和评价[J]. *中华危重病急救医学*, 201830(4): 342-345. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2018.04.011.
HU L Y, LI P J, CHANG C, et al. Establishment and evaluation of mouse models of septic myocardial injury[J]. *Chin Crit Care Med*, 2018, 30(4):342-345. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2018.04.011.
- [18] HAN X Y, LIU X, ZHAO X, et al. Dapagliflozin ameliorates sepsis-induced heart injury by inhibiting cardiomyocyte apoptosis and electrical remodeling through the PI3K/Akt pathway[J]. *Eur J Pharmacol*, 2023, 955:175930. DOI: 10.1016/j.ejphar.2023.175930.
- [19] LIU A J, ZHANG Y L, XUN S C, et al. Targeting of cold-inducible RNA-binding protein alleviates sepsis via alleviating inflammation, apoptosis and oxidative stress in heart[J]. *Int Immunopharmacol*, 2023, 122: 110499. DOI: 10.1016/j.intimp.2023.110499.
- [20] DAO L, LIU H D, XIU R Z, et al. Gramine improves sepsis-induced myocardial dysfunction by binding to NF- κ B p105 and inhibiting its ubiquitination[J]. *Phytomedicine*, 2024, 125: 155325. DOI: 10.1016/j.phymed.2023.155325.
- [21] ZENG Y C, CAO G D, LIN L, et al. Resveratrol attenuates sepsis-induced cardiomyopathy in rats through anti-ferroptosis via the Sirt1/Nrf2 pathway[J]. *J Invest Surg*, 2023, 36(1):2157521. DOI: 10.1080/08941939.2022.2157521.
- [22] GUO L Y, LI P, WANG Y M, et al. Yiqifumai injection ameliorated sepsis-induced cardiomyopathy by inhibition of ferroptosis via xct/gpx4 axis[J]. *Shock*, 2024, 61(4): 638-645. DOI: 10.1097/SHK.0000000000002257.
- [23] WAN T T, LI Y, LI J X, et al. ACE2 activation alleviates sepsis-induced cardiomyopathy by promoting MasR-Sirt1-mediated mitochondrial biogenesis[J]. *Arch Biochem Biophys*, 2024, 752:109855. DOI: 10.1016/j.abb.2023.109855.
- [24] LEE W J, CHEN Y L, CHU Y W, et al. Comparison of glutathione peroxidase-3 protein expression and enzyme bioactivity in normal subjects and patients with sepsis[J]. *Clin Chim Acta*, 2019, 489: 177-182. DOI: 10.1016/j.cca. 2017. 10.031.
- [25] ZHANG H, LIU J L, ZHOU Y L, et al. Neutrophil extracellular traps mediate m6A modification and regulates sepsis-associated acute lung injury by activating ferroptosis in alveolar epithelial cells[J]. *Int J Biol Sci*, 2022, 18(8):3337-3357. DOI: 10.7150/ijbs.69141.
- [26] JIANG T, LIU E R, LI Z Y, et al. SIRT1-Rab7 axis attenuates NLRP3 and STING activation through late endosomal-dependent mitophagy during sepsis-induced acute lung injury[J]. *Int J Surg*, 2024, 110(5): 2649-2668. DOI: 10.1097/JS9.0000000000001215.
- [27] ZHOU G, XIE D, FAN R, et al. Comparison of pulmonary and extrapulmonary models of sepsis-associated acute lung injury[J]. *Physiol Res*, 2023, 72(6): 741-752. DOI: 10.33549/physiolres.935123.
- [28] JI A L, TRUMBAUER A C, NOFFSINGER V P, et al. Deficiency of acute-phase serum amyloid A exacerbates sepsis-induced mortality and lung injury in mice[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(24): 17501. DOI: 10.3390/ijms242417501.
- [29] SORGUN O, ÇAKIR A, BORA E S, et al. Anti-inflammatory and antioxidant properties of betaine protect against sepsis-induced acute lung injury: CT and histological evidence[J]. *Braz J Med Biol Res*, 2023, 56: e12906. DOI: 10.1590/1414-431X2023e12906.
- [30] GUO J P, CHEN X H, WANG C, et al. Liraglutide alleviates acute lung injury and mortality in pneumonia-induced sepsis through regulating surfactant protein expression and secretion[J]. *Shock*, 2024, 61(4): 601-610. DOI: 10.1097/SHK.0000000000002285.
- [31] YU Y J, LI Z X, LIU C, et al. Danlou tablet alleviates sepsis-induced acute lung and kidney injury by inhibiting the PARP1/

- HMGB1 pathway[J]. *Heliyon*, 2024, 10(9): e30172. DOI: 10.1016/j.heliyon.2024.e30172.
- [32] ZARBOCK A, KOYNER J L, GOMEZ H, et al. Sepsis-associated acute kidney injury-treatment standard[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2023, 39(1):26-35. DOI: 10.1093/ndt/gfad142.
- [33] LV W Y, XUE L G, LIANG L, et al. Endotoxin induced acute kidney injury modulates expression of AQP1, P53 and P21 in rat kidney, heart, lung and small intestine[J]. *PLoS One*, 2023, 18(7): e0288507. DOI: 10.1371/journal.pone.0288507.
- [34] KIM M J, KIM Y S, KIM S R, et al. β -hydroxybutyrate ameliorates sepsis-induced acute kidney injury[J]. *Mol Biol Rep*, 2023, 50(11):8915-8923. DOI: 10.1007/s11033-023-08713-w.
- [35] LUO S, GONG J Z, ZHAO S Q, et al. Deubiquitinase BAP1 regulates stability of BRCA1 protein and inactivates the NF- κ B signaling to protect mice from sepsis-induced acute kidney injury[J]. *Chem Biol Interact*, 2023, 382: 110621. DOI: 10.1016/j.cbi.2023.110621.
- [36] MUNLEY J A, KELLY L S, GILLIES G S, et al. Narrowing the gap: preclinical trauma with postinjury sepsis model with increased clinical relevance[J]. *Shock*, 2023, 60(2): 272-279. DOI: 10.1097/SHK.0000000000002161.
- [37] FU Y, XIANG Y, WEI Q Q, et al. Rodent models of AKI and AKI-CKD transition: an update in 2024[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2024, 326(4): F563-F583. DOI: 10.1152/ajprenal.00402.2023.
- [38] LUO C J, LUO F, CHE L, et al. Mesenchymal stem cells protect against sepsis-associated acute kidney injury by inducing Gal-9/Tim-3 to remodel immune homeostasis[J]. *Ren Fail*, 2023, 45(1):2187229. DOI: 10.1080/0886022X.2023.2187229.
- [39] CAI J Z, TANG D, HAO X, et al. Mesenchymal stem cell-derived exosome alleviates sepsis-associated acute liver injury by suppressing MALAT1 through microRNA-26a-5p: an innovative immunopharmacological intervention and therapeutic approach for sepsis[J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1157793. DOI: 10.3389/fimmu.2023.1157793.
- [40] WAN J, ZHANG Q, HAO Y L, et al. Infiltrated IL-17A-producing gamma delta T cells play a protective role in sepsis-induced liver injury and are regulated by CCR6 and gut commensal microbes[J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2023, 13: 1149506. DOI: 10.3389/fcimb.2023.1149506.
- [41] ZHANG X, YUAN S L, FAN H, et al. Liensinine alleviates sepsis-induced acute liver injury by inhibiting the NF- κ B and MAPK pathways in an Nrf2-dependent manner[J]. *Chem Biol Interact*, 2024, 396:111030. DOI: 10.1016/j.cbi.2024.111030.
- [42] ARUNACHALAM A R, SAMUEL S S, MANI A, et al. P2Y2 purinergic receptor gene deletion protects mice from bacterial endotoxin and sepsis-associated liver injury and mortality[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2023, 325(5): G471-G491. DOI: 10.1152/ajpgi.00090.2023.
- [43] FU J N, LIU S C, CHEN Y, et al. Forsythiaside A alleviates lipopolysaccharide-induced acute liver injury through inhibiting endoplasmic reticulum stress and NLRP3 inflammasome activation[J]. *Biol Pharm Bull*, 2023, 46(7):979-986. DOI: 10.1248/bpb.b23-00137.
- [44] PAN S W, LV Z, WANG R, et al. Sepsis-induced brain dysfunction: pathogenesis, diagnosis, and treatment[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2022, 2022: 1328729. DOI: 10.1155/2022/1328729.
- [45] GIRIDHARAN V V, GENEROSO J S, LENCE L, et al. A crosstalk between gut and brain in sepsis-induced cognitive decline[J]. *J Neuroinflammation*, 2022, 19(1):114. DOI: 10.1186/s12974-022-02472-4.
- [46] KALA, LEEMBURG S, JEZEK K. Sepsis-induced changes in spectral segregation and kinetics of hippocampal oscillatory states in rats[J]. *eNeuro*, 2023, 10(6): ENEURO.0002-23.2023. DOI: 10.1523/ENEURO.0002-23.2023.
- [47] LEE B, SUR B, PARK J, et al. Ginsenoside Rg3 alleviates lipopolysaccharide-induced learning and memory impairments by anti-inflammatory activity in rats[J]. *Biomol Ther*, 2013, 21(5):381-390. DOI: 10.4062/biomolther.2013.053.
- [48] QIU F, LIU Y M, LIU Y, et al. CD137L inhibition ameliorates hippocampal neuroinflammation and behavioral deficits in a mouse model of sepsis-associated encephalopathy[J]. *Neuromolecular Med*, 2023, 25(4): 616-631. DOI: 10.1007/s12017-023-08764-z.
- [49] QIN M B, GAO Y X, GUO S G, et al. Establishment and evaluation of animal models of sepsis-associated encephalopathy[J]. *World J Emerg Med*, 2023, 14(5): 349-353. DOI: 10.5847/wjem.j.1920-8642.2023.088.
- (收稿日期:2024-06-21 修回日期:2024-10-09)
(本文编辑:翟玉凤,富群华,丁宇菁,张萍)

[引用本文]

杨家豪, 丁纯蕾, 钱风华, 等. 脓毒症相关脏器损伤动物模型研究进展[J]. *实验动物与比较医学*, 2024, 44(6): 636-644. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.087.

YANG J H, DING C L, QIAN F H, et al. Research progress on animal models of sepsis-related organ injury[J]. *Lab Anim Comp Med*, 2024, 44(6): 636-644. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.087.



周正宇, 博士研究生, 教授, 博士生导师。从事维生素D与糖尿病、动物模型与比较医学研究, 担任苏州大学苏州医学院实验动物中心主任。兼任苏州市实验动物协会理事长, 中国实验动物学会实验动物机构认证工作委员会委员、实验动物标准化专业委员会委员、实验动物饲料与营养专业委员会委员, 江苏省动管办专家组成员、专业标准化技术委员会委员, 江苏省动物学会理事, 江苏省实验动物协会副理事长,《中国比较医学杂志》和《实验动物与比较医学》编委。同时承担苏州医学院研究生专业基础课程《实验动物学》教学工作。曾获得首届中国实验动物学会、中国药理学会、中国毒理学会优秀论文奖, 江苏省实验动物管理先进个人, 苏州市科技进步二等奖、三等奖, 苏州市自然科学优秀论文二等奖。

风雨五十载, 奋斗半世纪——记苏州市实验动物产业发展五十年

赵丽娟, 肖春兰, 盛雅洁, 鲁希, 周正宇

(苏州大学苏州医学院实验动物中心, 苏州 215123)

[摘要] 从20世纪70年代开始, 苏州市实验动物产业经历了起步、兴起、壮大、转型、规模化五个阶段。始于实验动物的笼器具, 从最初的引进模仿到自主创新, 规模从零星工厂走向集聚化、集团化的企业, 产业逐渐兴起壮大, 并打开了我国笼器具出口的大门。21世纪产业升级转型, 净化工程和配套产品开始发展, 行业组织诞生。随着我国现代化水平的提升, 自动化、智能化生产的潮流带来了企业的科技创新和实验动物行业各项外包服务的涌现, 产业链的发展走向规模化。经过了近半个世纪的成长, 苏州市实验动物产业已形成了包括实验动物、笼器具、饲料垫料生产, 实验动物设施设计与施工, 实验动物与环境质量检测, 动物实验等服务在内的完整产业链。实验动物饲养设备作为苏州市实验动物产业核心已达到发达国家水平, 产业规模和影响力在国内同类行业中独树一帜。与此同时, 21世纪以来, 生物医药成为苏州大力发展的“一号产业”。在政府的支持、地方经济的引领、高校和科研院所的助力下, 动物实验服务外包行业开始集聚苏州, CRO机构的不断涌入促使大规模实验动物设施纷纷新建, 重点研发项目先后立项、研发能力大幅提升。苏州市实验动物产业与“一号产业”同频共振快速扩张, 走出了一条实验动物的“苏州之路”。在将近五十载的岁月中, 苏州市实验动物产业支撑着苏州乃至我国生物医药产业的快速发展。

[关键词] 苏州; 实验动物; 笼器具; 独立通风笼盒

[中图分类号] Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2024)06-0645-09



Challenges and Development in Suzhou Laboratory Animal Industry Over the Past Five Decades

ZHAO Lijuan, XIAO Chunlan, SHENG Yajie, LU Xi, ZHOU Zhengyu

(Laboratory Animal Center of Suzhou Medical College, Soochow University, Suzhou 215123, China)

Correspondence to: ZHOU Zhengyu (ORCID: 0000-0001-5712-9495), E-mail: zacharyzhou@suda.edu.cn

[ABSTRACT] Since the 1970s, the laboratory animal industry in Suzhou has gone through five stages: its inception, emergence, growth, transformation, and scaling up. It began with the manufacturing of caging equipment for laboratory animals, initially by imitation and later through independent innovation. The industry evolved from sporadic factories to clustered enterprises, gradually growing and opening up the export market for caging equipment. In the 21st century, with industrial upgrading and transformation, purification systems and related products began to develop, and industry organizations emerged. As China

[第一作者] 赵丽娟(1988—),女,硕士研究生,助理实验师。研究方向:实验动物学。E-mail: ljzhao@suda.edu.cn

[通信作者] 周正宇(1973—),男,博士,教授,研究方向:动物模型和比较医学。E-mail: zacharyzhou@suda.edu.cn。ORCID: 0000-0001-5712-9495

has modernized, the rise of automation and intelligent production has led to technological innovation in enterprises and the emergence of various outsourcing services in the laboratory animal industry, driving the large-scale development of the industrial chain. After nearly half a century of growth, the laboratory animal industry in Suzhou has formed a complete industrial chain, including the production of laboratory animals, caging equipment, feed and bedding materials, design and construction of laboratory animal facilities, quality testing of laboratory animals and environments, and animal experimentation services. Laboratory animal breeding equipment, the core of the industry, has reached the level of developed countries, and the industry's scale and influence are unmatched in China. Since the 21st century, biopharmaceuticals have become the "No.1 industry" in the development of Suzhou. With government support, the guidance of the local economy, and the assistance from universities and research institutes, the animal experiment outsourcing industry has begun to cluster in Suzhou. The continuous influx of CROs has driven the construction of large-scale laboratory animal facilities, and key research projects have been initiated, significantly enhancing the industry's R&D capabilities. The Suzhou laboratory animal industry has quickly expanded alongside the "No. 1 industry," creating a unique "Suzhou Path" for laboratory animals. Over nearly fifty years, the laboratory animal industry in Suzhou has been essential to the rapid development of the biopharmaceutical industry in Suzhou and China.

[Key words] Suzhou; Laboratory animal; Caging equipment; Individually ventilated cages

20世纪70年代,是我国改革开放的前夕,也是实验动物产业在苏州萌发的重要时刻。从实验动物笼器具的引进和一步步升级,到净化工程以及配套产品的研发,再到实验动物行业各项外包服务的应运而生,苏州市实验动物产业已经形成了完整产业链。在苏州市政府的引导和行业标准化建设下,苏州市实验动物产业与苏州“一号产业”——生物医药同频共振、协同发展,走出了一条独具特色的“苏州之路”。

1 苏州市实验动物产业发展的历程

苏州市实验动物产业紧跟我国改革开放的步伐,与苏州地方经济和产业同步发展,具有鲜明的时代特征和阶段性特点。从早期的引进、模仿,到后来的创新、研发,苏州市实验动物产业在地方政府的引导和支持下,逐步走出了一条创新、协同发展之路。

1.1 起步——20世纪70年代

饲养设备是实验动物产业的核心和起点。在20世纪60~70年代,由陶土烧制而成的陶瓷瓦罐是我国实验大鼠、小鼠饲养的主要笼器具^[1],此时也正是苏州市实验动物产业的起步阶段。1976年,苏州市吴县文教医用塑料厂成立,时为苏州市吴县文教局校办厂,主要生产输液针,同时也生产和销售大鼠、小鼠饲养用陶瓷瓦罐[图1(上图)],适用于大鼠、小鼠近交系的保种和繁育。陶瓷瓦罐虽价格低廉但沉重易损,使用起来有诸多不便。到了20世纪70年代中后期,一些海外学者从国外带回来了塑料大鼠、小鼠笼盒。此

种无毒塑料制成的笼盒轻便耐用、易于清洁,一下子引起了广泛关注,以至国内部分厂家纷纷开始模仿。1978年,苏州市吴县文教医用塑料厂开发出国内第一套实验小鼠塑料笼盒模具(M1型),并用PC塑料生产出国内第一批塑料笼盒;后经改造、调整生产的M2型大鼠、小鼠塑料笼盒成为了当时的主流产品^[2]。但由于缺少专业性的模具和塑料原材料,这样的生产很难在其他工厂大规模推广。

实验动物产业的起步阶段正是我国改革开放的前期。由于物资材料短缺,此时的实验动物笼架、笼箱多以铁质材料为主,加以喷漆达到美观、防锈的目的。喷漆铁架是当时主要的笼架原型[图1(下图)]。

1.2 兴起——20世纪80年代

1980年代,随着改革开放的全面展开,中国各行各业积极变革。全国实验动物工作会议的召开吹响了我国实验动物科学与产业发展的号角,实验动物产业因此迎来了发展的第一次飞跃。

1982年,由科技部(原国家科委)、卫健委(原卫生部)、农业农村部(原农牧渔业部)、国家医药管理局等多个国家部委组织的全国第一次实验动物工作会议在西双版纳召开^[3]。会上,各地专家提出了关于我国实验动物工作发展的建议和意见。1983年,原国家科委从日本引进了4套实验动物塑料笼盒模具(CP-1~4,包括大鼠、小鼠塑料笼盒)及部分TPX塑料粒子,无偿赠送给苏州塑料一厂。之后,苏州塑料一厂作为国家科委定点生产单位,成功试制出SS、CP



图1 20世纪70年代的啮齿类动物饲养笼器具陶瓷瓦罐(上图)和喷塑铁架(下图)

Figure 1 Ceramic jar for rodent cages (above) and spray-coated iron frame (below) in the 1970s

系列实验动物笼器具，很快投入批量生产。这些成果被当时国内唯一的实验动物学术期刊《上海实验动物科学》(现更名为《实验动物与比较医学》)所报道^[4]。

塑料模具的引进掀起了实验动物笼器具生产的浪潮，苏州市实验动物笼具厂如雨后春笋般建立。1985年，苏州市东渚实验动物笼具厂成立。1987年，吴县实验动物设施设备厂落成，并于1992年更名为苏州市冯氏实验动物设备有限公司，目前已成为国内实验动物笼器具的龙头企业。1987年，原苏州辐射制品厂也开始生产实验动物笼器具；1990—1992年，该厂的技术骨干相继成立苏州枫桥实验动物笼具厂、苏州枫桥净化设备厂和苏州新区教育实验动物笼具厂。

1980年代初，裸小鼠在国外已被广泛用于科学研究，而此时由于国内生产设备缺乏，裸小鼠的繁育一直处于困难境地。后来一些留学归国人员带回了国外先进的实验动物生产设备和技術，他们和笼器具厂家一起，对饲养裸小鼠的隔离器进行研发并实行小批量生产。1989年，由于原上海生物制品研究所下属玻璃加工厂(当时国内塑料隔离器的主要生产厂家)转型，苏州市吴县实验动物器材厂在相关专家的指导下开始研发和生产隔离器。同期，国产超净生物层流架通过技术鉴定^[5]。苏州市吴县实验动物器材厂的系列洁净层流柜也研制成功。超净生物层流架的出现填补了国内科研产品的一项空白(图2)。另外，苏州医学院脑

神经研究室从日本引进了NC系裸小鼠，采用苏州净化设备厂(现江苏苏净集团有限公司)生产的系列产品CLJD装配式1000级生物洁净室进行饲养；每年可繁育近500只，为实验室建立的裸小鼠人脑胶质瘤模型提供了充足的实验材料^[6]。随着各个笼器具厂的兴起，苏州成为了全国著名的“笼具之乡”。



图2 20世纪80年代苏州市实验动物器材企业生产的第一代隔离器(上图)和国产超净生物层流架(下图)

Figure 2 First generation isolator (above) and China-made ultra-clean biological laminar flow rack (below) produced by Suzhou laboratory animal equipment enterprises in the 1980s

1.3 壮大——20世纪90年代

20世纪90年代，我国钢产能迅速发展。不锈钢因牢固耐用和美观卫生的特点，开始被大范围应用于实验动物设备中。原先的实验动物笼架、笼箱的材料逐步被不锈钢材料所取代，尤其是实验兔、犬、猴和猪的饲养、实验及运输用笼器具。自此，不锈钢成为笼架、笼箱等产品的主流材料并沿用至今。与此同时，随着国家实验动物资源种子中心的建设以及相关国家标准的颁布，实验动物规范化生产成为主流，以不锈钢为主体的隔离器成为了实验动物保种的主要笼器具。

1995年,江苏省质量技术监督局、扬州大学、江苏省原子医学研究所等单位的专家联合起草了江苏省第一部实验动物笼器具地方标准,并对该标准的水平及可行性进行了评估^[7]。该标准也是国内第一部实验动物笼器具标准。其借鉴了第一部实验动物环境与设施国家标准(GB/T 14925—1994),充分结合了当时的国情状况。

经过20年的发展,我国实验动物产业在笼器具方面有了长足进步,苏州的实验动物笼器具行业也具备了一定规模,形成了以冯氏、苏杭、苏州艾可林净化设备有限公司、枫桥净化、新区教育、枫桥等厂家为代表的实验动物笼器具产业集群。据不完全统计,当时全国实验动物笼器具中,80%以上的笼器具均来自苏州。同时,苏州的笼器具产品开始出口日本、新西兰等国,并从此打开了我国笼器具出口的大门。此后,在国际市场上的影响力也逐渐提高。

在此基础上,苏州的实验动物配套产业也开始发展壮大。以苏净、金燕净化、安达、艾尔泰克为代表的一大批实验动物行业净化企业成为国内首批专业从事实验动物设施规划建设的机构,参与建设了国内第一批实验动物亚屏障/屏障设施。1994年,苏州市第一家专业化实验动物养殖企业——苏州镇湖实验动物厂(现苏州高新区镇湖实验动物科技有限公司)成立;1997年,国内第一家专业化实验动物饲料生产企业——苏州双狮实验动物饲料科技服务有限公司成立;1999年,苏州市第一家合资开办的专业化实验猴生产单位——苏州西山中科实验动物有限公司挂牌。苏州市实验动物产业链开始逐步延伸和壮大。

1.4 转型——21世纪初10年

20世纪90年代,意大利泰尼百斯(Tecniplast)公司率先研制出独立通气笼盒(individually ventilated cages, IVC)系统,标志着实验动物饲养在笼器具方面从传统的开放式逐步向净化式发展;该系统逐步在世界发达国家得到研究和应用^[8],并于20世纪末被引进至国内^[9]。它的出现给苏州市实验动物产业带来了第二次飞跃性发展。

2000年,国内首台IVC在上海诞生。紧随其后的是,苏州的苏杭、冯氏、艾可林等笼器具企业也纷纷在短期内研发出具有自主知识产权的IVC产品并推向市场。以IVC、EVC(exhaust ventilated closed-system cage)为代表的大鼠、小鼠净化笼器具产品逐步成为市场的主流,兔、豚鼠饲养IVC也相继投入市场。同年,国内第一家专业从事实验动物笼器具与设施规划

建设的研发机构——苏州市博采实验动物笼器具技术研发中心在苏州成立,这弥补了当时我国实验动物笼器具产业研发力量的不足。

2006年,江苏省质量技术监督局组织全省专家对原先的实验动物笼器具地方标准进行了重新修订,出台了《江苏省实验动物笼器具地方系列标准》。该标准分为塑料笼箱、金属笼箱、笼架、水瓶、层流架等5个系列^[10],并在之后通过了省质量技术监督局的审查,获得国家标准化委员会备案后正式实施并沿用至今。同年,江苏省还发布了IVC系统的地方标准(DB32/T 972—2006)。

从实验动物及相关产品到动物实验服务,苏州市实验动物产业实现了新的转型,产业链向行业纵深延伸,并日臻完善。实验动物上下游企业的快速发展,催生了实验动物行业组织的诞生。2003年,国内第一个地方性实验动物行业组织——苏州市实验动物协会诞生。在协会的组织与推动下,苏州市实验动物产业研发创新能力进一步快速发展。

1.5 规模化发展——21世纪10年代至今

随着我国现代化水平的提升和劳动力成本的增加,自动化、智能化产品需求逐步增多。21世纪10年代以来,苏州市实验动物产业链也向着自动化、智能化方向逐渐完善和扩大。在这个过程中,企业的科技创新是产业可持续发展的支撑。自动清洁、自动饮水、生物安全以及在线监测与报警等功能相继推出,并衍生出一系列专利产品。伴随生物安全实验室建设的需要,适用于大动物(猴、犬、猪等)的生物安全笼器具相继研发成功,并通过农业农村部专家的验收。冯氏公司的专利产品小鼠投放驿站可以解决实验鼠独立存放和错序的问题;组合式生物安全型IVC实验猴隔离系统可以通过多重手段监控猴在隔离器集成柜内部的饲养情况,保证饲养质量。苏杭公司的集中通风式实验猴生物安全饲养系统相比独立通风,具有较低的通风噪声,对动物应激干扰小,配合独立设置的主机箱,可大大减少后续检查维护的工作量。苏州猴皇动物实验设备科技有限公司的实用新型换笼工作台能够提供所需洁净度的换笼环境和平台,保证实验的质量和稳定。

与此同时,实验动物设施及配套产品也得到进一步发展,净化工程、笼器具生产、福利产品、检测试剂、劳保用品等都衍生出新的专业生产服务机构。表1列出了目前苏州市实验动物产业的部分代表性企业及其业务范围等信息。

表1 目前苏州市实验动物产业代表性企业信息

Table 1 Information on current representative enterprises in Suzhou laboratory animal industry

企业名称 Enterprise name	成立时间 Year of establishment	业务范围 Business scope	产业领域 Industry sector
苏州市冯氏实验动物设备有限公司 Suzhou Fengshi Laboratory Animal Equipment Co., Ltd.	1987	实验动物 IVC、EVC 笼器具、层流架、隔离器、不锈钢笼器具	实验动物饲养设备
苏州市苏杭科技器材有限公司 Suzhou Suhang Technology Equipment Co., Ltd.	1993	实验动物 IVC 笼器具、隔离器	实验动物饲养设备
江苏苏净集团有限公司 Jiangsu Sujing Group Co., Ltd.	1994	空气洁净设备及系统、生物安全设备及系统	净化工程
苏州艾可林净化设备有限公司 Suzhou Airclean Equipment Co., Ltd.	2001	实验动物饲养设备、生物安全净化工程设备	实验动物饲养设备、净化工程
苏州猴皇动物实验设备科技有限公司 Suzhou Houhuang Animal Experimental Equipment Technology Co., Ltd.	2007	实验动物笼器具、净化笼器具、不锈钢实验设备	实验动物饲养设备
苏州双狮实验动物饲料科技有限公司 Suzhou Shuangshi Experimental Animal Stall Food Technology Co., Ltd.	1998	实验动物各类配合饲料和垫料	实验动物饲料垫料
苏州西山中科实验动物有限公司 Suzhou Xishan Zhongke Laboratory Animal Co., Ltd.	1999	犬和非人灵长类实验动物的繁育供应和研究	实验动物生产
卡文斯百格(苏州)模式动物研究有限公司 Cavens Biogle (Suzhou) Model Animal Research Co., Ltd.	2016	SPF 级实验小鼠的生产销售及定制化繁育保种服务	实验动物生产

1.6 协同并进——CRO 机构的涌入

21 世纪以来,受国内外形势影响,专业从事新药研发临床前动物实验外包服务的机构[即合同研究机构(contract research organization, CRO)]开始建设规模化、高标准的实验动物设施。苏州市政府高度重视生物医药产业,大力吸引专业化的 CRO 机构进入苏州。2006—2011 年,苏州药明康德新药开发有限公司、昭衍苏州新药研究中心有限公司、中美冠科生物技术(太仓)有限公司、西山中科药物研究有限公司、圣苏新药开发有限公司、华测生物技术有限公司先后落户苏州,并建设了高标准的实验动物设施。

生物医药产业日渐受到国内外的高度重视,苏州市政府更是把生物医药作为“一号产业”加以重点发展。为此,一大批为生物医药、医疗器械研发提供外包服务的 CRO 机构涌入苏州。2014 年以来,安领、国辰、敬咨达、方达、熠品、中检华通威、科标、熙华、华联美德、蛇牌学院、凯斯艾等 CRO 机构先后落户苏州,形成了以医药(药明康德、昭衍、华测、西山中科、方达、安领、中美冠科、国辰、圣苏、拓维、熙华、莱奥、凯斯艾、泰普迈)、农药(敬咨达、西山中科)、医疗器械(苏大检测、熠品、中检华通威、科标、振湖、博赛孚、蛇牌学院、华联美德、金翼)三

大领域为特色的临床前评价服务产业集群。集聚效应和规模效应日渐突出,有力地支撑着生物医药产业的高速发展。

同时,生物医药产业的高速发展反过来也引领了苏州市实验动物产业的快速扩张。多个大规模实验动物设施纷纷新建,以配合扩大的产能需求(如药明康德、昭衍、华测等)。尤其是,大分子药物、生物制品等研发热潮形成的驱动力吸引了多家从事实验动物生产、模型开发和动物实验服务一体化的机构来苏州发展或扩张(维通利华、斯贝福、赛业等),配合拥有检验检测机构资质认定(China Inspection Body and Laboratory Mandatory Approval, CMA)和中国合格评定国家认可委员会(China National Accreditation Service for Conformity Assessment, CNAS)等多项资质的专业实验动物质量检测机构。至此,苏州市实验动物行业产业链已极为完整(表2)。

据统计,2021 年,苏州市实验动物许可证数量占全省数量的 26.9%,苏州市实验动物许可证单位数量首次超过南京市^[11]。至 2023 年底,苏州市实验动物产业现有许可证 97 份,其中包括生产许可证 14 份(涉及 11 家单位)和使用许可证 83 份(涉及 43 家机构),整体呈增长趋势(图3)。年使用实验动物超 140 万只,

表2 目前苏州市实验动物相关的部分CRO企业信息

Table 2 Information on current CRO companies related to laboratory animal industry in Suzhou

企业名称 Company name	成立时间 Year of establishment	涉及业务范围 Business scope involved
苏州药明康德新药开发有限公司 WuXi AppTec (Suzhou) Co., Ltd.	2006	药物研发、医疗器械检测服务
苏州西山中科药物研究开发有限公司 Suzhou Xishan Zhongke Pharmaceutical R&D Co., Ltd.	2008	药物、农药安全性评价检测服务
中美冠科生物技术(太仓)有限公司 Crown Bioscience (Taicang) Co., Ltd.	2008	药物研发
昭衍(苏州)新药研究中心有限公司 JOINN Laboratories (Suzhou) Co., Ltd.	2008	药物、农药安全评价、医疗器械检测服务
苏州华测生物技术有限公司 Centre Testing International Group Co., Ltd.	2011	医药、医疗器械、环境检测服务
苏州熠品质量技术服务有限公司 Suzhou Yipin Quality Technical Service Co., Ltd.	2015	医疗器械检测服务
苏州国辰生物科技股份有限公司 Suzhou Guochen Biotechnology Co., Ltd.	2016	药物试验、日化品检测服务
安领生物医药(苏州)有限公司 Anling Biopharmaceutical (Suzhou) Co., Ltd.	2017	药物试验服务
中检华通威国际检验(苏州)有限公司 CCIC Huatongwei International Inspection(Suzhou) Co., Ltd.	2017	医疗器械检测服务
苏州科卓医疗科技有限公司 Suzhou Kezhuo Medical Technology Co., Ltd.	2020	医疗器械检测服务
苏州苏大卫生与环境技术研究所有限公司 Suzhou Suda Health and Environmental Technology Research Institute Co., Ltd.	1984	实验动物质量检测、设施环境质量和医疗器械检测服务
苏州西山生物技术有限公司 Suzhou Xishan Biotechnology Co., Ltd.	2005	实验动物质量检测和感染性疾病诊断试剂的开发和推广服务

设施面积超22万m²。

2 实验动物产业发展的“苏州之路”

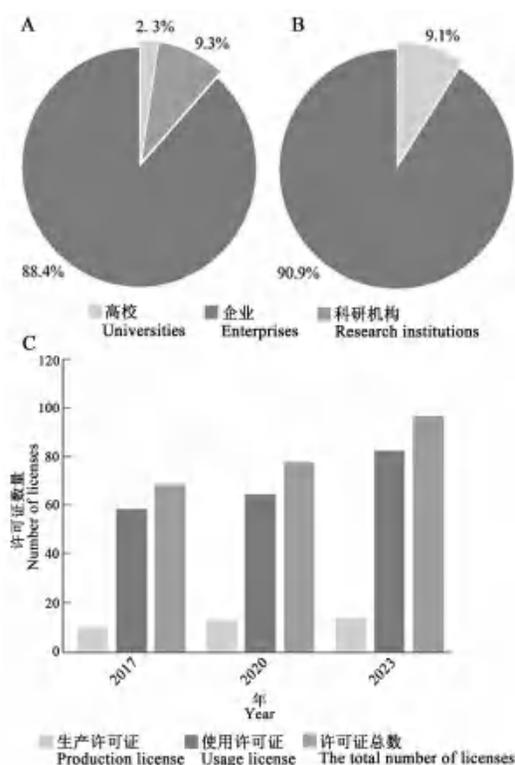
苏州市实验动物产业能有如今的规模和影响力，得益于政府的支持、地方经济的引领、高校和科研院所的助力，以及民营经济活跃的氛围等诸多因素的共同作用，走出了一条特色化的“苏州之路”。

2.1 政府支持与引导

从最初的萌发到如今的规模化，苏州市实验动物产业的蓬勃发展离不开政府的决策和政策的引领。早在1983年，原国家科委在苏州试点，将从日本引进的实验动物笼盒模具及部分TPX塑料粒子无偿赠送给苏州塑料一厂，试制实验动物塑料笼器具。自1990年代起，科技部、江苏省科技厅、苏州市科技局高度重视实验动物配套条件的支持工作，先后立项重点研发计划、江苏省科技基础设施平台、江苏省社会发展、苏州市重点实验室、苏州市科技服务平台、苏州市社会

发展等各类项目10多个，累计投入研发经费近亿元，用于支持模式动物开发、实验动物饲料、垫料、笼器具、动物实验服务等各类产品的研发以及服务平台的建设，极大提升了苏州市实验动物产业的研发能力和科研水平。

除此之外，在地方标准研制立项方面，2006年重新修订出台的《江苏省实验动物笼器具地方系列标准》的制定获得中国实验动物学会科学技术奖二等奖^[12]，并一直沿用至今。随后陆续开展了实验动物垫料、实验猪、雪貂等产品的地方标准研制，大大推动了相关产业的健康发展。2008年，《江苏省实验动物管理办法》颁布，将实验动物行业的法制化管理落到实处。2012年，江苏省发布了实验动物垫料的地方标准(DB32/T 2129—2012)。2013年，颁布了《江苏省突发实验动物生物安全事件应急预案(试行)》。2019年，中国(江苏)自贸试验区苏州片区的正式成立为苏州市实验动物行业带来了新前景。同年起，苏州市下发



注：A~B，2023年苏州市实验动物使用许可证（左）和生产许可证（右）分布情况；C，2017—2023年的苏州市实验动物生产和使用许可证数量变化趋势。

Note: A-B, Distribution of Suzhou laboratory animal use licenses (left) and production licenses (right) in 2023; C, The trend of changes in the number of laboratory animal production and use licenses in Suzhou from 2017 to 2023.

图3 苏州市实验动物许可证分布情况及数量变化趋势
Figure 3 Distribution and quantity trends of Suzhou laboratory animal licenses

了《关于开展苏州市实验动物行政许可事中事后监管工作的通知》，且每年执行，为行业的健康发展保驾护航。

2.2 高校与科研院所助力

苏州市实验动物产业在萌发之际就得到了众多高校和科研院所的大力支持。20世纪80年代，上海、北京等地一些学成回国的学者从国外带回了先进的塑料笼盒以及隔离器等产品的信息和技术，他们将这些材料无偿地交由苏州笼器具企业进行模仿和开发，进而才有了国内实验动物笼器具的第一批产品和相关产业的兴起。在参考了日本、英国等国家的实验动物饲养定标设备后，从我国国情和技术基础出发，结合现有设备的优缺点^[13]，苏州的笼器具企业一步步设计出小鼠塑料饲养盒、自动洗涤式笼架、洁净层流柜等产

品^[14]。其后，科学家们继续无私地分享他们在动物实验过程中的想法，促进了我国笼器具产品的不断创新。苏州吴县实验动物器材厂曾在上海市畜牧兽医学学会实验动物科学学科组专家的技术支持下，开发生产了当时畅销全国的笼器具产品。苏州塑料一厂在当时国家科委、中国实验动物科学技术开发中心和国内实验动物科学界多名专家、学者的共同支持下，曾与日本三井物产株式会社进行技术交流，开发生产的实验动物笼器具已在苏州医学院附属第一医院投入使用，建立了人脑胶质细胞瘤的动物模型，从而促进了肿瘤医治的研究工作^[4]。

自1999年起，苏州大学实验动物中心联合苏州双狮实验动物饲料科技有限公司、苏州市苏杭科技器材有限公司、苏州市冯氏实验动物设备有限公司等企业，共同研发实验动物饲料、辐照饲料、垫料、IVC、IVC管道清洗消毒机、小鼠驿站等系列产品。这大大激活了企业的研发动力，多数产品引领市场，成为行业明星并沿用至今。2016年，苏杭公司与复旦大学联合承担了国家重点研发计划——生物安全初级屏障关键装备的研发项目，重点研究高等级动物病原微生物ABSL-3实验室生物安全防护技术与产品，为我国生物安全实验室建设提供了强有力支撑。

通过高校（科研院所）、企业、市场形成的产学研联合体，大幅提升了实验动物产业的研发能力，提高了产品质量和性能，促进了实验动物产业的健康发展，有力支撑着我国医学、生命科学、药学等学科的高质量发展。

2.3 地方经济引领

苏州市一直是我国改革开放的前沿。早在改革开放之初的1983年春，邓小平同志就来到苏州调研，为改革开放政策的制定提供了第一手资料，描绘了苏州经济发展的蓝图。这对于苏州、江苏乃至全国的发展，都有着普遍的指导意义^[15]。

正是苏州乡镇经济发展才引来了国家科委的试点，将引进的第一套笼器具模具放在苏州。其后的若干年，是我国改革开放的春天，也是实验动物产业的春天。苏州民营经济的沃土促进了实验动物笼器具、净化工程行业的快速发展。到了21世纪，服务经济和产业经济兴起，作为支撑着苏州未来发展的“一号产业”——生物医药产业蓬勃发展^[16]。

2007年开园的苏州生物医药产业园（BioBAY）是苏州工业园区为发展生物医药产业而建立的专业科技

创新载体。2018年以来,国家关于生物医药行业利好政策的不断推出,促进了该行业的快速发展。科技部中国生物技术发展中心发布的中国生物医药产业园区竞争力评价及分析报告显示,在最新的中国生物医药产业园区综合竞争力50强中,苏州工业园区多年来在全国生物医药产业园中稳居第一方阵,已经连续4年排名前三,在产业竞争力、技术竞争力和人才竞争力3个方面均名列前茅。

据BioBAY统计,目前苏州市生物医药产业园已汇聚各类生物医药创新企业620余家,形成了创新药物、高端医疗器械与体外诊断、生物技术三大重点产业集群。以政策奠定发展基石,以改革释放创新活力,以集群布局为战略支撑,以全产业链塑造核心竞争力^[17],产业生态圈的发展促使动物实验服务外包行业集聚苏州,进一步推动了苏州市实验动物产业的繁荣。未来,配合具有国际竞争力的世界级产业地标“中国药谷”的打造,苏州市实验动物行业的整体实力还将进一步增强。

3 总结

经过半个世纪的发展,苏州市实验动物产业经历了数次更新和飞跃。以年代为轴,历经20世纪70年代的起步、80年代的兴起、90年代的壮大,迎来了21世纪的转型,再到近10年的规模化、国际化发展。通过引进、模仿和创新以及智能化、数字化升级,笼器具产品从最初的瓦罐到如今的洁净、安全、自动化、数字化的笼盒,该产业焕发出新的活力。从传统的笼器具到如今的动物实验外包,从产品到服务,苏州市实验动物产业在各级政府引导和支持、众多专家助力、地方经济引领下,形成了产业链完整、规模化集聚、协同发展的新局面。苏州市实验动物产业在产品、工艺、标准、研发、规模等方面已经处于国内第一方阵,有力地支撑着苏州乃至全国医学、生命科学的发展,未来将携手苏州生物医药产业共同进步,大力发展产业创新,推动关键核心技术突破,走向世界,致力于成为高质量发展的典范。

[作者贡献 Author Contribution]

赵丽娟负责相关资料调查、数据整理、文章初稿撰写;
肖春兰参与相关资料的调查研究以及写作策划;
盛雅洁参与资料的整合以及文章修改;
鲁希负责资料的整合及核对;
周正宇负责文章的框架策划、数据把关及审定。

[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] 尹松林,袁春萍,严国锋,等.独立通气笼具的技术分析与发展前景[J].实验动物与比较医学,2005,25(3):186-189.
YIN S L, YUAN C P, YAN G F, et al. Technical analysis and development prospects of independent ventilation cage[J]. Lab Anim Comp Med, 2005, 25(3):186-189.
- [2] 薛逸祯,邱志方.M-1型小鼠塑料饲育盒的繁殖效果观察[J].上海畜牧兽医通讯,1982,2(1):12-14.
XUE Y Z, QIU Z F. Observation on reproductive effect of M-1 plastic feeding box for mice[J]. Lab Anim Comp Med, 1982, 2(1):12-14.
- [3] 唐利军.西双版纳会议与湖北省实验动物科技发展40年历程[J].实验动物与比较医学,2021,41(1):9-13. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2020.159.
TANG L J. History of Xishuangbanna conference and development of Hubei laboratory animal science and technology in past 40 years[J]. Lab Anim Comp Med, 2021, 41(1):9-13. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2020.159.
- [4] 管基.国家科委定点生产单位苏州塑料一厂试制成功SS、CP系列实验动物笼器具[J].上海实验动物科学,1984,4(4):236.
GUAN J. Suzhou No. 1 Plastic Factory, the designated production unit of the State Science and Technology Commission, successfully trial-produced SS and CP series experimental animal cage appliances[J]. Shanghai Lab Anim Sci, 1984, 4(4):236.
- [5] 尚东言.国产超净生物层流架通过技术鉴定:填补了国内一项空白[J].上海实验动物科学,1987,7(1):68.
SHANG D Y. Domestic ultra-clean biological laminar flow frame passed the technical appraisal-filling a gap in China[J]. Shanghai Lab Anim Sci, 1987, 7(1):68.
- [6] 黄强,徐康达,马文雄,等.NC系裸小鼠的饲养与应用[J].上海实验动物科学,1987,7(3):153-155.
HUANG Q, XU G D, MA W X, et al. Reproduction of NC nude mice and relevant experimental application in the study of human brain tumor[J]. Shanghai Lab Anim Sci, 1987, 7(3): 153-155.
- [7] 穆正明,李厚达,单平.«江苏省实验动物笼器具地方标准»编制说明[J].上海实验动物科学,1996,16(S1):241. DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2007.03.010.
MU Z M, LI H D, SHAN P. Introduction to local standards of laboratory animal cage in Jiangsu province[J]. Lab Anim Comp Med, 1996, 16(S1): 241. DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2007.03.010.
- [8] CLOUGH G, WALLACE J, GAMBLE M R, et al. A positive, individually ventilated caging system: a local barrier system to protect both animals and personnel[J]. Lab Anim, 1995, 29(2):139-151. DOI: 10.1258/002367795780740221.
- [9] 齐海涛,王有为,卢笑丛.独立换气净化笼具(IVC)国内外研究进展[J].中国比较医学杂志,2006,16(2):122-125. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7856.2006.02.016.
QI H T, WANG Y W, LU X C. Review of IVC system[J]. Chin J

- Comp Med, 2006, 16(2):122-125. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7856.2006.02.016.
- [10] 刘年双, 张玫, 孟群, 等. 江苏省实验动物笼器具隔离器地方标准编制说明[J]. 实验动物科学, 2009, 26(2):36-37. DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2009.02.009.
- LIU N S, ZHANG M, MENG Q, et al. Introduction to local standards of laboratory animal cage isolator in Jiangsu province[J]. Lab Anim Sci, 2009, 26(2): 36-37. DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2009.02.009.
- [11] 漆重阳, 陈林, 艾曼, 等. 基于江苏省实验动物行政许可现状的安全管理对策[J]. 实验动物与比较医学, 2023, 43(1):79-85. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2022.083.
- QI C Y, CHEN L, AI M, et al. Safety management countermeasures based on the status of laboratory animal administrative licensing in Jiangsu Province[J]. Lab Anim Comp Med, 2023, 43(1): 79-85. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2022.083.
- [12] 刘年双, 宗卫峰. 实验动物建筑设施相关产品研发-笼器具标准编制引发的思考[J]. 中国比较医学杂志, 2011, 21(10):69-71. DOI: 10.3969/j.issn.1671.7856.2011.10.11.016.
- LIU N S, ZONG W F. The research of laboratory animal building facilities related product the thinking initiated by the standards of laboratory animal cage[J]. Chin J Comp Med, 2011, 21(10):69-71. DOI: 10.3969/j.issn.1671.7856.2011.10.11.016.
- [13] 曹征操, 余贵生. 实验动物的饲养设备[J]. 上海畜牧兽医通讯, 1982, 2(1):23-25.
- CAO Z C, SHE G S. Feeding equipment for experimental animals[J]. Lab Anim Comp Med, 1982, 2(1):23-25.
- [14] 王建军, 李丽清. 浅谈在我国尽快实现实验动物饲养器材现代化[J]. 动物学杂志, 1987, 22(1):53-54. DOI: 10.13859/j. cjz. 1987. 01.016.
- WANG J J, LI L Q. Talking about the modernization of laboratory animal feeding equipment as soon as possible in China[J]. Chin J Zool, 1987, 22(1):53-54. DOI: 10.13859/j. cjz. 1987. 01.016.
- [15] 张原诚. 1983年邓小平在苏州调研[J]. 江南论坛, 2014(9):15-16. DOI: 10.3969/j.issn.1006-0057.2014.09.007.
- ZHANG Y C. In 1983, Deng Xiaoping made an investigation in Suzhou[J]. Jiangnan Forum, 2014(9):15-16. DOI: 10.3969/j.issn.1006-0057.2014.09.007.
- [16] 蓝绍敏. "开放再出发"的苏州实践[J]. 中国领导科学, 2020(4):18-21.
- LAN S M. Suzhou's new method and practice of the "opening up" policy[J]. China Leadersh Sci, 2020(4):18-21.
- [17] 苏功新. 全力打造生物医药产业创新集群[J]. 群众, 2022(18):49-50.
- SU G X. Make every effort to build an innovative cluster of biomedical industry[J]. QUNZHONG, 2022(18):49-50.
- (收稿日期: 2024-08-02 修回日期: 2024-10-12)
(本文编辑: 翟玉凤, 张俊彦, 富群华, 姜怡欣)

[引用本文]

- 赵丽娟, 肖春兰, 盛雅洁, 等. 风雨五十载, 奋斗半世纪——记苏州市实验动物产业发展五十年[J]. 实验动物与比较医学, 2024, 44(6): 645-653. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.113.
- ZHAO L J, XIAO C L, SHENG Y J, et al. Challenges and development in Suzhou laboratory animal industry over the past five decades[J]. Lab Anim Comp Med, 2024, 44(6): 645-653. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.113.

《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)的相关性状的实验动物的影响, 从而不能保障实验动物福利及研究结果的可靠性, 而且目前已有更优的市售麻醉剂可供选择, 因此本刊不建议使用上述试剂。如确需使用, 请提供充足理由说明及相应的批准文件。

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

《实验动物与比较医学》编辑部

2017—2023年四川省实验动物寄生虫和微生物质量抽检报告分析

刘丽达¹, 陈兵², 谢娜¹, 刘丽¹, 庄思琪¹, 邹弈星²

(1. 四川省疾病预防控制中心, 成都 610041; 2. 四川省农村科技发展中心, 成都 610041)

[摘要] **目的** 通过回顾分析2017—2023年四川省实验动物寄生虫、微生物质量抽检结果, 为进一步加强四川省实验动物管理提供参考。**方法** 四川省共有实验动物生产单位31家, 实验动物主要有小鼠、大鼠、豚鼠、兔、犬、猴、猪7种。按照现行国家和地方的实验动物等级相关标准, 对四川省具有实验动物生产资质的单位进行抽样检测并出具检测报告, 分析2017—2023年四川省内各种实验动物的质量检测结果。**结果** 2017—2023年, 除2018年外, 每年进行一次实验动物质量抽检。小鼠: 2017年检出蠕虫、鞭毛虫、沙门菌、小鼠肝炎病毒抗体和小鼠肺炎病毒抗体阳性, 合格率仅为42.9%; 2019年检出金黄色葡萄球菌和肺炎克雷白杆菌阳性, 合格率为86.7%; 2021年检出仙台病毒抗体阳性, 合格率为85.7%; 2020年、2022年和2023年合格率为100%。大鼠: 2017年检出蠕虫、支原体抗体、金黄色葡萄球菌、仙台病毒抗体、小鼠肺炎病毒抗体、大鼠细小病毒RV株抗体、大鼠细小病毒H-1株抗体和大鼠冠状病毒抗体阳性, 合格率为40.0%; 2019年检出支原体抗体、金黄色葡萄球菌和肺炎克雷白杆菌阳性, 合格率为35.0%; 2020年未检出阳性指标; 2021年检出仙台病毒抗体、大鼠细小病毒RV株抗体阳性, 合格率为50.0%; 2022年检出大鼠细小病毒RV株抗体阳性, 合格率为87.5%; 2023年检出嗜肺巴斯德杆菌和肺炎克雷白杆菌阳性, 合格率为85.7%。犬: 2017年、2019年检出狂犬病病毒抗体和犬瘟热病毒抗体效价未达标, 合格率分别为33.3%和20.0%; 2020年和2022年合格率均为100%。普通级豚鼠: 2019年检出弓形虫抗体阳性, 合格率为80.0%; 其余各抽检年份的合格率均为100%。猴: 2019年检出弓形虫抗体、猕猴疱疹病毒I型(B病毒)抗体阳性, 合格率为87.5%; 2020年、2022年均检出猕猴疱疹病毒I型抗体阳性, 合格率分别为93.3%和97.5%; 2021年和2023年合格率均为100%。清洁级豚鼠、兔和猪: 各年抽检合格率均为100%。**结论** 四川省实验动物寄生虫和微生物质量尚存在问题。监督抽检能帮助及时发现这些问题, 是确保实验动物质量的重要手段。抽检结果可为促进四川省实验动物产业健康发展提供数据支持。

[关键词] 四川省; 实验动物; 质量抽检; 寄生虫; 微生物

[中图分类号] S853.32; Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2024)06-0654-07



Survey Report Analysis on Parasitic and Microbial Quality of Laboratory Animals in Sichuan Province, 2017-2023

LIU Lida¹, CHEN Bing², XIE Na¹, LIU Li¹, ZHUANG Siqi¹, ZOU Yixing²

(1. Sichuan Center for Disease Control and Prevention, Chengdu 610041, China; 2. Sichuan Rural Science and Technology Development Center, Chengdu 610041, China)

Correspondence to: ZOU Yixing (ORCID: 0000-0002-3122-6120), E-mail: nczzyx@126.com

[ABSTRACT] **Objective** To provide reference for further strengthening the management of laboratory animals in Sichuan Province by reviewing and analyzing the results of parasitic and microbial quality inspections of laboratory animals from 2017 to 2023. **Methods** Sichuan Province has 31 licensed laboratory animal production units, with the main species including mice, rats, guinea pigs, rabbits, dogs, monkeys, and pigs. Sampling inspections and reports were conducted for units with laboratory animal production qualifications in accordance with current national and local standards for laboratory animal classification. The quality inspection results for various laboratory animals in Sichuan Province from 2017 to 2023 were

[第一作者] 刘丽达(1985—), 女, 硕士, 副研究员, 研究方向为卫生毒理及实验动物科学。E-mail: 31928803@qq.com

[通信作者] 邹弈星(1982—), 女, 硕士, 副研究员, 研究方向为实验动物管理。E-mail: nczzyx@126.com。ORCID: 0000-0002-3122-6120

analyzed. **Results** With the exception of 2018, annual quality inspections of laboratory animals were conducted every year between 2017 and 2023. Mice: In 2017, positive results for helminths, flagellates, *Salmonella*, murine hepatitis virus antibodies, and murine pneumonia virus antibodies were detected, with a pass rate of only 42.9%. In 2019, *Staphylococcus aureus* and *Klebsiella pneumoniae* were detected, with a pass rate of 86.7%. In 2021, Sendai virus antibodies were detected, yielding a pass rate of 85.7%. The pass rate in 2020, 2022, and 2023 was 100%. Rats: In 2017, positive results were found for helminths, mycoplasma antibodies, *Staphylococcus aureus*, Sendai virus antibodies, murine pneumonia virus antibodies, rat parvovirus RV strain antibodies, rat parvovirus (H-1) strain antibodies, and rat coronavirus antibodies, with a pass rate of 40.0%. In 2019, mycoplasma antibodies, *Staphylococcus aureus* and *Klebsiella pneumoniae* were detected, with a pass rate of 35.0%. No positive indicators were detected in 2020. In 2021, Sendai virus antibodies and rat parvovirus RV strain antibodies were detected, with a pass rate of 50.0%. In 2022, positive results for rat parvovirus RV strain antibodies were found, yielding a pass rate of 87.5%. In 2023, *Pasteurella pneumotropica* and *Klebsiella pneumoniae* were detected, with a pass rate of 85.7%. Dogs: In 2017 and 2019, the antibody titers for rabies virus and canine distemper virus were below the required standard, with pass rates of 33.3% and 20.0%, respectively. In 2020 and 2022, the pass rate was 100%. Guinea pigs (general grade): In 2019, positive results for *Toxoplasma* antibodies were detected, with a pass rate of 80.0%. In all other years, the pass rate was 100%. Monkeys: In 2019, positive results for *Toxoplasma gondii* and rhesus herpesvirus type I antibodies were found, with a pass rate of 87.5%. In 2020 and 2022, rhesus herpesvirus type I antibodies were positively detected, yielding pass rates of 93.3% and 97.5%, respectively. The pass rates in 2021 and 2023 were 100%. Clean guinea pigs, rabbits and pigs all passed the inspection each year. **Conclusion** Issues related to the parasitic and microbial quality of laboratory animals persist in Sichuan Province. Supervision and sampling inspections have proven to be effective in identifying these issues promptly, serving as a critical measure to ensure the quality of laboratory animals. The results of these inspections offer valuable data to support the healthy development of the laboratory animal industry in Sichuan Province.

[Key words] Sichuan Province; Laboratory animals; Quality inspection; Parasites; Microorganisms

实验动物是指经人工饲养，对携带的病原体进行控制，遗传背景明确或来源清楚，用于生命科学和生物技术研究、食品和药品等质量检验和安全性评价的动物。它们既是生命科学研究的重要支撑条件，更是医药行业快速发展的保障。随着生命科学的不断发展，实验动物的研究占比逐渐加大，使用量亦呈现逐年上升的趋势^[1]。其中，动物质量是整个实验的关键，可直接影响实验结果的准确性和可重复性。实验动物质量检测是一项依照有关标准和法律法规，由具有相关资质的检测机构开展的质量检验与评估活动，是判断实验动物质量的主要手段，也是行政主管部门依法管理实验动物工作的技术支撑和有力保障^[2]。

为进一步加强实验动物管理，维护公共卫生安全，有效防范实验动物生物安全风险，四川省每年都会对实验动物生产机构进行抽检，以便及时掌握动物的质量情况，从而有力保障全省实验动物的质量安全。本文对2017—2023年四川省实验动物寄生虫和微生物质量抽检结果进行分析，以了解省内实验动物质量的发

展变化，为本省以及其他兄弟省市的实验动物生产和监管提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

目前，四川省共有实验动物生产单位31家，这些单位生产的实验动物主要有小鼠、大鼠、豚鼠、兔、犬、猴和实验用猪7种。其中，小鼠产量占全部实验动物生产总量的81.52%，大鼠产量占全部实验动物生产总量的8.66%。每年抽检的动物样本均来自四川省具有实验动物生产许可证的生产单位。各年度抽检单位数量、动物种类、动物等级和动物数量见表1。

1.2 主要仪器设备及试剂

BX51生物显微镜购自日本Olympus公司；VITEK 2 COMPACT全自动病原微生物鉴定及药敏分析系统购自生物梅里埃中国有限公司；MB-530型酶标仪购自深圳汇松科技发展有限公司；ELISA试剂盒由苏州西山生物技术有限公司提供；平皿和培养基由北京陆桥技

表1 2017—2023年四川省实验动物质量抽检数目

Table 1 Number of laboratory animals sampled for quality inspection in Sichuan from 2017 to 2023

(n)

年份 Year	抽检单 位/家 Number of units	抽检动物数量/只 [#] Number of laboratory animals [#]								总数 Total
		小鼠 ^a Mouse ^a	大鼠 ^a Rat ^a	豚鼠 ^b Guinea pig ^b	豚鼠 ^c Guinea pig ^c	兔 ^b Rabbit ^b	犬 ^b Dog ^b	猴 ^b Monkey ^b	小型猪 ^b Miniature pig ^b	
2017	8	35 (7)	25 (5)	NA	10 (2)	NA	15 (3)	NA	NA	85
2019	13	30 (6)	20 (4)	10 (2)	10 (2)	10 (2)	10 (2)	40 (4)	NA	130
2020	9	25 (5)	25 (5)	NA	NA	NA	15 (3)	45 (3)	NA	110
2021	14	35 (7)	20 (4)	10 (2)	10 (2)	NA	NA	40 (4)	20 (4)	135
2022	17	50 (10)	40 (8)	NA	NA	NA	10 (2)	40 (4)	20 (4)	160
2023	14	50 (10)	35 (7)	10 (2)	10 (2)	5 (1)	NA	50 (4)	NA	160
Total	75	225	165	30	40	15	50	215	40	780

注：^a指无特定病原体级；^b指普通级；^c指清洁级。[#]括号中数字为生产该种类动物的单位数量，NA指未抽检，2023年1家猴生产单位有2个许可证，分别进行抽检；2018年未进行实验动物抽检。

Note: ^a means specific pathogen-free (SPF) animals; ^b means conventional grade animals; ^c means clean grade animals. [#]Figures in parentheses indicate the number of units produced for the species, NA means no sampling. In 2023, a monkey production unit had two licenses and conducted separate inspections for each. No laboratory animal sampling was conducted in 2018.

术股份有限公司、青岛海博生物技术有限公司等公司提供。

1.3 抽样与检测

四川省科学技术厅委托四川省农村科技发展中心负责组织实施对全省有实验动物生产许可证的单位进行动物质量抽样，每年集中抽检一次。抽检涉及的实验动物种类及数量根据四川省科技厅的相关文件决定。抽样人员到现场指定抽样房间进行随机抽样，主要从生产扩大群中抽取。大鼠、小鼠、豚鼠、兔、犬、猪从每家单位各抽取5只，猴从每家单位抽取10只。采回的样本由具备实验动物质量检测资质的检测机构——四川省疾病预防控制中心，依据国家及地方标准进行检测^[3-6]：寄生虫镜检；细菌按要求分离培养鉴定；病毒采用ELISA法测定抗体，如抗体出现阳性则重复一次实验，仍有疑问的样品将送至第三方检测机构进行复核。

1.4 结果判定

按照国家及地方相应标准对检测结果进行综合判定。根据这几年的检验报告对不同种类，不同等级的动物感染情况进行计算及分析。

1.5 结果计算方法

使用Excel软件进行计算分析，数据由阳性率、合格率表示。不同种类动物的检出阳性率由出现阳性指标的动物数除以动物总数得到，合格率为合格动物总数除以抽检动物总数所得。

2 结果

2.1 小鼠

从表2可知：2017年，有2家单位的SPF级小鼠感染蠕虫，1家单位感染鞭毛虫，1家单位感染沙门菌，4家单位的小鼠肝炎病毒抗体阳性，2家单位的小鼠肺炎病毒抗体阳性；其中，有1家单位的抽检小鼠中蠕虫、鞭毛虫、小鼠肝炎病毒抗体、小鼠肺炎病毒抗体均为阳性。2019年，2家单位的SPF级小鼠感染金黄色葡萄球菌，另有1家单位感染肺炎克雷白杆菌。2021年，1家单位的抽检小鼠中出现仙台病毒抗体阳性。2020年、2022年和2023年的SPF小鼠均未检出阳性指标。

2.2 大鼠

根据表2可见，SPF级大鼠在2017年检测出多项指标阳性，包括3家单位的蠕虫、1家单位的支原体抗体、2家单位的金黄色葡萄球菌、1家单位的仙台病毒抗体和小鼠肺炎病毒抗体、3家单位的大鼠细小病毒RV株抗体和大鼠细小病毒H-1株抗体、1家单位的大鼠冠状病毒抗体均阳性。其中，有1家单位同时检出了蠕虫、支原体抗体、仙台病毒抗体、小鼠肺炎病毒抗体、大鼠细小病毒RV株、大鼠细小病毒H-1株和大鼠冠状病毒抗体阳性。2019年，1家单位检出支原体抗体阳性，2家单位检出金黄色葡萄球菌阳性，1家单位检出肺炎克雷白杆菌阳性。2020年，所有被检单位

表2 2017—2023年实验动物病原体检出阳性率

Table 2 Positive detection rates of pathogens in laboratory animals from 2017 to 2023

动物 Animal	检出病原体 Pathogens		不同年份的检出阳性率/% Positive rate in different years/%					
	类别 Category	名称 Name	2017	2019	2020	2021	2022	2023
SPF级小鼠 SPF mouse	寄生虫	蠕虫	17.1 (4a、2f)	0	0	0	0	0
		鞭毛虫	8.6 (3a)	0	NA	NA	0	0
	病原菌	沙门菌	5.7 (2d)	0	0	0	0	0
		金黄色葡萄球菌	0	10.0 (1b、2c)	0	NA	NA	NA
	病毒	肺炎克雷白杆菌	0	3.3 (1a)	0	0	NA	0
		小鼠肝炎病毒抗体	57.1 (5a、5c、5d、5f)	0	0	0	NA	0
		小鼠肺炎病毒抗体	20.0 (2a、5f)	0	0	0	0	0
		仙台病毒抗体	0	0	0	14.3 (5h)	0	0
SPF级大鼠 SPF rat	寄生虫	蠕虫	24.0 (1a、2c、3f)	0	0	0	0	0
	病原菌	支原体抗体	20.0 (5a)	25.0 (5h)	0	0	0	0
		金黄色葡萄球菌	16.0 (2b、2f)	35.0 (2b、5c)	0	NA	NA	NA
	病毒	嗜肺巴斯德杆菌	0	0	0	NA	NA	11.4 (4a)
		肺炎克雷白杆菌	0	5.0 (1a)	0	0	NA	2.9 (1l)
		仙台病毒抗体	4.0 (1a)	0	0	25.0 (5h)	0	0
		小鼠肺炎病毒抗体	20.0 (5a)	0	0	NA	0	NA
		大鼠细小病毒RV株抗体	48.0 (5a、5c、2f)	0	0	25.0 (5a)	13 (5a)	0
		大鼠细小病毒H-1株抗体	32.0 (4a、1c、3f)	0	0	NA	0	0
		大鼠冠状病毒抗体	20.0 (5a)	0	NA	0	NA	NA
普通级兔 Rabbit	寄生虫	弓形虫抗体	NA	0	NA	NA	NA	0
普通级犬 Dog	病毒	狂犬病毒抗体	40.0 (3c、3e、0g)	20.0 (1e、1g)	100	NA	100	NA
		犬瘟热病毒抗体	73.3 (2c、5e、4g)	70 (3e、4g)	100	NA	100	NA
普通级豚鼠 Guinea pig	寄生虫	弓形虫抗体	NA	20.0 (2j)	NA	0	NA	0
普通级猴 Monkey	寄生虫	弓形虫抗体	NA	5.0 (1e、1i)	0	0	0	0
	病毒	猕猴疱疹病毒I型(B病毒) 抗体	NA	12.5 (3e、2i)	6.7 (3e)	0	2.5 (1e)	0

注：2018年未抽检。括号内数字代表病原体检出阳性动物的数量，字母代表抽检实验动物生产单位的编号，NA指未抽检。犬要求免疫，抗体为阳性。

Note: No laboratory animal sampling was conducted in 2018. The numbers in brackets represent the number of animals testing positive for pathogens, and the letters represent the identification codes of laboratory animal production units. NA means no sampling. Dogs are required to be immunized, and antibodies are expected to test positive.

均未检出阳性指标。2021年，1家单位检出仙台病毒抗体，1家单位检出大鼠细小病毒RV株抗体阳性。2022年，1家单位检出大鼠细小病毒RV株抗体阳性，系与2021年为同一家单位。2023年，分别有1家单位检出嗜肺巴斯德杆菌和肺炎克雷白杆菌阳性。

2.3 普通级、清洁级动物

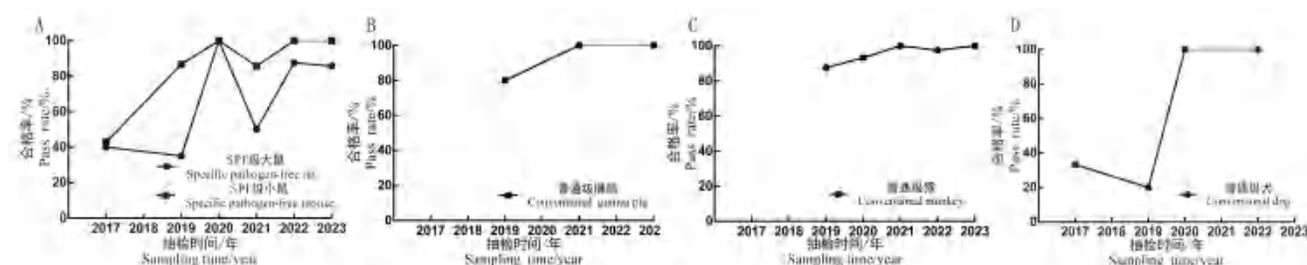
表2列出了普通级实验动物的抽检结果（因清洁级豚鼠和普通级小型猪的抽检中未检出阳性病原体，故未列入表格）。在2019年与2023年抽检中，兔的检测结果均合格。犬要求免疫，抗体应为阳性。2017年，

3家单位的狂犬病毒抗体、2家单位的犬瘟热病毒抗体效价未达标；2019年，有2家单位的狂犬病毒抗体、2家单位的犬瘟热病毒抗体效价未达标；2020年、2022年，抽检的犬生产单位检测结果均合格。2019年，2家单位的普通级豚鼠检出弓形虫抗体阳性；2021年、2023年，普通级豚鼠的检测结果均合格；2017年、2019年、2021年、2023年，清洁级豚鼠的抽检结果均合格。2019年，1家单位的猴检出弓形虫抗体阳性；2019年、2020年、2022年，均有猕猴疱疹病毒I型(B病毒)抗体检出阳性，其中1家单位在这3年中均

有检出；2021年、2023年猴的检测结果均合格；2017年未抽检。此外，2021年、2022年，根据四川省地方标准对4家实验用猪生产单位进行抽检，抽检指标均合格。

由图1可以看出，2017—2023年（2018年未抽检）抽检动物合格率整体都呈上升趋势。SPF级大鼠的抽检合格率在2017年、2019年较低，最低仅有35.0%；2020年合格率提高，2021年出现回落，2022年后平稳在80%以上。SPF级小鼠的抽检合格

率在2017年最低，仅42.9%；2019年后合格率提升；2022年、2023年均为100%。普通级豚鼠在2019年合格率为80.0%，其余抽检年份的合格率都为100%。普通级犬的抽检合格率为在2017年、2019年较低，仅为33.0%和20.0%；2020年、2022年达100%。普通级猴的抽检合格率一直在较高水平，2019年最低为87.5%，以后每年都在90%以上。此外，清洁级豚鼠、普通级兔、普通级小型猪的抽检合格率均为100%。



注：2018年未抽检SPF级大鼠、SPF级小鼠和普通级猴，2018、2021和2023年未抽检普通级犬，2017、2018、2020和2022年未抽检普通级豚鼠。
Note: Rats, mice and monkeys were not sampled in 2018; Dogs were not sampled in 2018, 2021, and 2023; Guinea pigs were not sampled in 2017, 2018, 2020, and 2022.

图1 2017—2023年四川省实验动物抽检合格率趋势图

Figure 1 Trend of qualified rates for laboratory animal sampling in Sichuan Province from 2017 to 2023

3 讨论

四川省的生物产业虽然起步较晚，但发展快速。“十三五”期间，四川省生物经济平均每年增长4.7%^[7]，生物产业的经济发展基础不断增强。实验动物作为生物产业的基础支撑，一直在稳定发展。2017年，四川省实验动物生产总量为128万只，使用总量为96万只。到2023年，实验动物生产总量达344万只，使用总量为122万只，实现了超11.24亿元的直接经济效益^[8]，这些数据从侧面反映了全省生物产业的壮大。近几年，大量包括实验动物生产企业在内的生物企业落户四川省，如2023年新增四川友士达生物科技有限公司、四川美春生物科技有限公司等实验动物生产许可单位5家，为省内提供了更充足的实验动物资源。

回顾分析2017—2023年的四川省实验动物质量抽检结果，发现共检出了3种寄生虫和12种微生物或血清抗体阳性；其中，大鼠和小鼠的感染情况在2017年最为严重，与2015年的小鼠有1种寄生虫阳性、大鼠有3种微生物或抗体阳性相比^[9]，2017年的阳性指标种类明显增加，且大多集中在同一家单位，可能由于

其生产种群的生产时间较长，管理上不完善导致。到了2019年，小鼠的阳性指标种类明显减少，合格率由42.9%上升到87.5%，此后几年的抽检质量相对稳定。然而，2019年大鼠阳性指标种类虽然减少，但出现了不同单位感染不同微生物的情况，且有单位在2019年未生产实验动物，在抽检总数减少的情况下合格率反而下降。以后的年份里，大鼠质量总体有所改善，但仍存在问题。据文献报告^[10]和北京市科学技术委员会、上海市科学技术委员会、广东省科学技术厅发布的实验动物质量监督抽查结果显示，大鼠和小鼠质量问题主要集中在嗜肺巴斯德杆菌、肺炎克雷伯菌、绿脓杆菌和仙台病毒抗体阳性。四川省实验动物也有嗜肺巴斯德杆菌、肺炎克雷伯菌和仙台病毒检出，但相比这些发达地区，本省的阳性指标种类更多，检出频率更高，说明和发达地区相比，四川省在实验动物生产和质量管理上还存在着一定差距，需要进一步完善。

值得注意的是，有1家单位除2020年未检出阳性指标外，每年都会有同一种或不同种微生物感染出现。据悉，该单位在每次抽检发现问题后都及时更换了生产种群，因此推测反复感染可能是由于生产设施已启用20多年，环境指标维持困难，以及在运行中容易出

现压差梯度不达标等因素导致；另外，在更换种群前终末消毒不彻底，生产饲养人员的操作存在不规范情况，也可能是实验动物质量不达标的原因。该单位已在2023年抽样后将生产设施做了全面改造，并在新设施检验合格后再进行后续生产，具体成效有待后续抽检结果。此外，有的单位同时持有使用许可证和生产许可证，这些单位的实验动物在使用环境中参与试验数量多，实验人员流动性大，使用环境中动物质量控制难度增加。因此，也不排除由于生产环境与使用环境工作人员的接触，将感染风险带入生产环境的可能性。这就需要这些单位制定更为合理的操作规范，更加严格地按照操作规范进行实验动物的使用与生产。

四川省豚鼠总体质量稳定，只在2019年检出弓形虫，积极整改后未再出现相同问题。犬在2017年和2019年都出现了狂犬病毒、犬瘟热病毒抗体水平未达标的情况，生产单位通过抽检发现问题后加强了对犬的疫苗接种管理，严格按照接种计划时间进行接种，并将首次接种时间由48 d推迟为60 d，以避免母源抗体的干扰，同时将所用联合疫苗换成单一疫苗，并在接种时增加了一剂加强针的免疫程序，以保持机体对病毒的免疫力。各生产单位严格按照规章制度执行，增加自检频率，每3~6个月自检1次，并及时进行补充接种，因此在随后2年的抽检过程中抗体水平都达到了国家标准的要求。

四川省是猴的天然聚居地，有着丰富的资源。依托着自然优势，四川省也成为实验用猴的生产大省，但在实验猴的质量检测过程中也发现了一些问题。2019年，有2家单位出现弓形虫和B病毒阳性，2020年、2022年有1家单位检出B病毒阳性。猕猴为B病毒的自然宿主，感染B病毒后可能没有明显症状。但B病毒是人兽共患病，有着严重的生物安全隐患。有文献报告，某实验动物研究所在135份送检猴血清中发现，B病毒感染率为32.6%~37.8%^[11]；安徽省实验猕猴中心的400只猕猴中，B病毒血清阳性率为36.50%^[12]，抗体阳性率都处于较高水平。这说明加强实验猴的微生物质量管理是必要的，一旦发现阳性个体要及时隔离，以减少B病毒传播的风险。

综上，实验动物作为生物医药的支持产业，越来越受到各省市主管部门的重视。在2020—2021年，四川省通过了实验用猪、实验用羊和实验用猫的相关地方标准，为新品种实验动物的生产提供了标准指导^[13]。作为正在发展的产业，实验动物行业在管理监督方面依然存在着一些不足。由于资金不足等多方面

原因，四川省的实验动物病原体检测样本量和抽检批次与北京等^[10]发达地区相比存在较大差距，遗传质量评价体系也有待完善。目前遗传检测仅由个别实验室进行自检，抽检中却没有涉及遗传质量评价，这也需要相关部门的重视与支持，从而促进四川省实验动物行业的健康发展。

[作者贡献 Author Contribution]

刘丽达负责调查研究、数据统计分析、文章撰写；陈兵负责方案策划、提供资源、监督调查、文章修订；谢娜、刘丽和庄思琪负责调查研究；邹弈星负责获取资助、项目管理及文章指导。

[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] 赵心刚, 卢凡, 程莘, 等. 我国实验动物资源建设的问题与展望[J]. 中国科学院院刊, 2019, 34(12):1371-1378. DOI: 10.16418/j.issn.1000-3045.2019.12.006.
ZHAO X G, LU F, CHENG P, et al. Problems and prospects of laboratory animal resources in China[J]. Bull Chin Acad Sci, 2019, 34(12): 1371-1378. DOI: 10.16418/j. issn. 1000-3045.2019. 12.006.
- [2] 陈梅丽, 刘万策. 实验动物质量检测信息资源的建设与共享[J]. 实验动物科学, 2016, 33(1):33-37. DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2016.01.008.
CHEN M L, LIU W C. Development and sharing of information resources for the quality inspection of laboratory animal[J]. Lab Anim Sci, 2016, 33(1):33-37. DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2016.01.008.
- [3] 国家标准化管理委员会. 实验动物寄生虫学等级及监测: GB 14922.1—2001[S]. 北京: 中国标准出版社, 2001.
Standardization Administration of the People's Republic of China. Laboratory animal-Standards and monitoring for parasitology: GB 14922.1-2001[S]. Beijing: China Standards Press, 2001.
- [4] 国家标准化管理委员会. 实验动物微生物学等级及监测: GB 14922.2—2011[S]. 北京: 中国标准出版社, 2011.
Standardization Administration of the People's Republic of China. Laboratory animal-Microbiological and parasitological standards and monitoring: GB 14922.2-2011[S]. Beijing: China Standards Press, 2001.
- [5] 科学技术部. 实验动物微生物、寄生虫学等级及监测: GB 14922—2022[S]. 北京: 中国标准出版社, 2022.
Ministry of Science and Technology of the People's Republic of China. Laboratory animal-Microbiological and parasitological standards and monitoring: GB 14922-2022[S]. Beijing: China Standards Press, 2022.
- [6] 四川省科学技术厅. 实验用猪 微生物学和寄生虫学等级及监测: DB51/T 2757—2021[S/OL]. [2024-04-10]. <https://dbba.sacinfo.org.cn/stdDetail/0646d899abc0e8232b57ebf3313f61884692e30fc4e333b4c770e8c8d2a9b559>.

- Sichuan Provincial Department of Science and Technology. Experimental pig Standards and monitoring for microbiology and parasitology: DB51/T 2757-2021[S/OL]. [2024-04-10]. <https://dbba.sacinfo.org.cn/stdDetail/0646d899abc0e8232b57ebf3313f61884692e30fc4e333b4c770e8c8d2a9b559>.
- [7] 李欣忆. 我省出台"十四五"生物经济发展规划生物经济规模到2025年超1.5万亿元[EB/OL]. (2021-10-07)[2024-04-02]. <https://www.sc.gov.cn/10462/10464/10797/2021/10/7/f259500c38cb4a5896e8be7d8385196f.shtml>.
- LI X Y. Our province issued the "14th Five-Year Plan" bioeconomy development plan, the scale of bioeconomy will exceed 1.5 trillion yuan by 2025[EB/OL]. (2021-10-07)[2024-04-02]. <https://www.sc.gov.cn/10462/10464/10797/2021/10/7/f259500c38cb4a5896e8be7d8385196f.shtml>.
- [8] 陈兵, 邹弈星, 王敬东. 基于行政许可的四川省实验动物管理现状与对策分析[J]. 实验动物与比较医学, 2024, 44(5):560-566. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.055.
- CHEN B, ZOU Y X, W J D. Analysis on current status and countermeasures for laboratory animal management in Sichuan Province based on administrative licensing[J]. Lab Anim Comp Med, 2024, 44(5): 560-566. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.055.
- [9] 刘丽达, 刘科亮, 何其励, 等. 2011—2015年四川省实验动物质量抽检结果分析[J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(2):102-105, 134. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7856.2019.02.017.
- LIU L D, LIU K L, HE Q L, et al. Results and analysis of sampling inspection for laboratory animal quality in Sichuan Province from 2011 to 2015[J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(2): 102-105, 134. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7856.2019.02.017.
- [10] 魏杰, 黄健, 刘文菊, 等. 2017—2019年北京地区实验动物质量抽检结果分析[J]. 实验动物科学, 2021, 38(5):19-27, 58. DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2021.05.005.
- WEI J, HUANG J, LIU W J, et al. Analysis of random testing results of laboratory animals in Beijing Area from 2017 to 2019[J]. Lab Anim Sci, 2021, 38(5): 19-27, 58. DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2021.05.005.
- [11] 李晋文, 佟巍, 蔡鹏, 等. 猴B病毒抗体不同检测方法的比对[J]. 中国比较医学杂志, 2017, 27(7):29-33. DOI: 10.3969.j.issn.1671-7856.2017.07.006.
- LI J W, TONG W, CAI J, et al. Comparison of different detection methods of monkey B virus antibody[J]. Chin J Comp Med, 2017, 27(7): 29-33. DOI: 10.3969.j.issn.1671-7856.2017.07.006.
- [12] 蔡标, 戴陈伟, 李舜, 等. 实验猕猴B病毒抗体检测结果分析[J]. 安徽医学, 2018, 39(3): 261-263. DOI: 10.3969/j.issn.1000-0399.2018.03.003.
- CAI B, DAI C W, LI S, et al. Analysis on antibody testing of B virus(corcopithecine herpesvirus 1)[J]. Anhui Med J, 2018, 39(3):261-263. DOI: 10.3969/j.issn.1000-0399.2018.03.003.
- [13] 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.
- (收稿日期:2024-04-17 修回日期:2024-05-30)
(本文编辑:张俊彦,翟玉凤,丁宇菁,陆佳雯)

[引用本文]

- 刘丽达, 陈兵, 谢娜, 等. 2017—2023年四川省实验动物寄生虫和微生物质量抽检报告分析[J]. 实验动物与比较医学, 2024, 44(6): 654-660. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.057.
- LIU L D, CHEN B, XIE N, et al. Survey report analysis on parasitic and microbial quality of laboratory animals in Sichuan Province, 2017-2023[J]. Lab Anim Comp Med, 2024, 44(6): 654-660. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.057.

猫冠状病毒基因特点分析及其研究进展

陶凌云

(上海实验动物研究中心, 上海 201203)

[摘要] 猫冠状病毒 (feline coronavirus, FCoV) 的生物型分为猫传染性腹膜炎病毒 (feline infectious peritonitis virus, FIPV)、猫肠道冠状病毒 (feline enteric coronavirus, FECV) 两种。FIPV 和 FECV 可能通过基因重组、突变等方式进行进化和变异, 产生新的亚型和变种。本文着重阐述猫冠状病毒的基因组结构和生物分型, FIPV 和 FECV 的感染特征以及 FECV 向 FIPV 转变的机制, 提示它们的基因组构造基本类似, 但存在高效感染单核细胞/巨噬细胞能力的差异, 这些差异可能与它们的病原性和传播特征有关, 并可能导致 FIPV 具有更强的致病性。另外, 从 FIPV 的开放阅读框 (open reading frame, ORF) 3/7 以及 N/S 的序列关系分析发现, FIPV 的非结构蛋白可能与其对宿主免疫系统的调控有关, 使得 FIPV 感染后能够逃避宿主的免疫应答, 从而导致更严重的疾病。这种基因组的变异性是研究 FIPV 和 FECV 病原性和流行病学特征的重要基础, 也为病毒检测及药物研发提供了参考。

[关键词] 猫冠状病毒; 猫传染性腹膜炎病毒; 猫肠道冠状病毒; 猫传染性腹膜炎; 基因组

[中图分类号] Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2024)06-0661-06



Genetic Characteristics and Research Progress of Feline Coronavirus

TAO Lingyun

(Shanghai Laboratory Animal Research Center, Shanghai 201203, China)

Correspondence to: TAO Lingyun (ORCID:0009-0007-7324-7417), E-mail: taolingyun@slarc.org.cn

[ABSTRACT] Feline coronavirus (FCoV) is classified into two biotypes: feline infectious peritonitis virus (FIPV) and feline enteric coronavirus (FECV). FIPV and FECV might evolve and mutate via genetic recombination and mutation, leading to novel subtypes and variants. This study examined the genomic structure and biological subtyping of FCoV, analyzed the infection characteristics of FIPV and FECV, and investigated the mechanisms of FECV transforming into FIPV. The findings revealed that while their genome structures were fundamentally similar, differences in their ability to efficiently infect monocytes/macrophages significantly influenced their pathogenicity and transmission characteristics, with FIPV exhibiting higher virulence. Moreover, the analysis of the open reading frames (ORF)3/7 as well as the N/S sequences of FIPV indicated that its non-structural proteins were associated with modulation of the host immune system. These proteins enabled immune evasion, leading to more severe disease. The genomic variability of FCoV constitutes an important foundation for studying the pathogenicity and epidemiology of FIPV and FECV, and offers references for virus detection and drug development.

[Key words] Feline coronavirus; Feline infectious peritonitis virus; Feline enteric coronavirus; Feline infectious peritonitis; Genome

猫冠状病毒 (feline coronavirus, FCoV) 是一种 RNA 病毒, 普遍存在于世界各地的许多猫科动物中^[1]。FCoV 主要是一种肠道病毒, 尽管存在高病毒载量, 但大多数的 FCoV 突变株感染后通常不会导致临床症状, 只有少部分的突变株有致病性, 会引起轻微的

肠道症状或体重无法正常增加^[2-6]。目前, 国内关于 FCoV 流行情况及遗传进化等的报道甚少。而猫作为一种重要的实验用动物和人类最主要的伴侣动物, 与人有着最密切的接触, 因此对 FCoV 研究更有非同寻常的公共卫生意义。本综述就 FCoV 及其两种生物型即猫传

[基金项目] 上海市科技计划项目“猫冠状病毒核酸检测方法的建立、流行病学调查及基因遗传进化分析”(20140900500)

[作者简介] 陶凌云 (1981—), 女, 硕士, 副研究员, 主要从事实验动物质量控制及实验动物资源标准化研究。E-mail: taolingyun@slarc.org.cn。ORCID: 0009-0007-7324-7417

染性腹膜炎病毒 (feline infectious peritonitis viruses, FIPV) 和猫肠道冠状病毒 (feline enteric coronavirus, FECV) 的基因组构造和研究进展进行阐述, 以期为建设快速检测该病毒的体外或体内方法提供参考。

1 猫冠状病毒概况

根据体外中和试验, FCoV 细分为两种血清型: 猫在自然界中容易感染的 FCoV 1 型, 以及由 FCoV 1 型和犬冠状病毒 (canine coronavirus, CCoV) 重组产生的 FCoV 2 型^[7]。FCoV 2 型通常应用于实验室模型, 因为它易于在 Crandell-Rees 猫肾细胞 (CRFK) 或猫巨噬细胞 Fcwf-4 等细胞系中复制。流行病学调查表明, 开发针对 FCoV 的检测和治疗方法具有重要意义^[8]。

1.1 基因组结构

FCoV 是单股正链 RNA 病毒, 其基因组长度约 $(2.7 \sim 3.2) \times 10^4$ bp, 与 CCoV、猪传染性肠胃炎病毒均有较近的亲缘关系, 可普遍在猫中传播或携带, 其基因组含有 3 万个左右的核苷酸^[8]。

冠状病毒基因组通常包括若干个开放阅读框 (open reading frame, ORF), 每个 ORF 编码不同的蛋白质, 分为编码结构蛋白 (如核蛋白和刺突糖蛋白) 的 ORF 和编码非结构蛋白的 ORF^[9]。FCoV 由 11 个 ORF 组成, 根据编码序列不同, 包括两大类^[10]: (1) 编码结构蛋白的 ORF2 和 ORF9~11, 编码核衣壳蛋白 N、包膜蛋白 E、膜蛋白 M、刺突糖蛋白 S; (2) 编码非结构蛋白的 ORF1 和 ORF3~8, ORF1a 和 ORF1b 还可以编码复制酶, 如 RNA 复制酶。这些蛋白质在病毒的生命周期中扮演着不同的角色, 包括病毒入侵、复制、装配和释放等。

1.2 生物分型

根据其病理学表现, FCoV 分为两种生物型: FIPV 和 FECV。弱毒株通常会引发轻微或亚临床消化道症状, 被称为 FECV。FECV 在猫中流行, 血清阳性率为 20%~60%; 在有多个猫的家庭中, 血清阳性率可高达 90%^[7]。强毒株导致猫传染性腹膜炎 (feline infectious peritonitis, FIP), 因此被称为 FIPV。FIPV 是 FECV 自发突变的结果, 它修饰了刺突糖蛋白, 以及 ORF 3c 和 ORF 7b 编码的非结构蛋白^[11-12]。

2 两种生物型猫冠状病毒的特点分析

2.1 感染特征比较

高效感染单核细胞/巨噬细胞的能力是低毒力 FECV 和高致病性 FIPV 之间最重要的区别^[13]。体外接

种 12 h 后, FECV 在外周血单核细胞中复制能力下降, 而在 45% 猫的单核细胞中, FIPV 可维持其复制能力。FECV 多感染于抵抗力较差或离乳的低日龄幼猫, 感染主要局限于肠道, 可在猫的肠道内复制和存活^[14]。FECV 通过粪-口途径传播, 多数感染猫无症状或表现为轻微的胃肠道症状, 如轻微的腹泻。被感染的猫通常会自行康复, 只有少数猫可能发展成 FIP。

FIPV 主要感染 0.5~5 岁的猫, 但在特定年龄段如 1 岁以下、11 岁以上的猫显示出更高的易感性, 这种年龄分布特征增加了病毒在猫群中的传播风险。FIPV 能够感染单核细胞和巨噬细胞^[8], 直到建立全身感染。FIP 的两种临床形式是以充满液体的空腔为特征的渗出型, 和在多个器官中具有多个脓性肉芽肿病变的干燥型, 表现为腹膜炎、胸腔积液、眼部病变等病理症状^[15]。

FIP 的诊断比较困难, 通常需要结合临床症状、实验室检查、组织活检等多种方法来进行。总的来说, FECV 感染通常是相对温和的, 大多数感染猫能够自愈; 而 FIPV 感染则是一种严重的疾病, 预后较差, 治疗也比较困难^[16]。

2.2 转变机制

冠状病毒的复制很容易出错, 其平均突变率约为每年 1×10^4 个核苷酸替换/位点^[17]。Jin 等^[18]提出, ORF 3c 和 7b 基因突变可能与 FECV 向 FIPV 转变有关。由于 FCoV 刺突糖蛋白在受体结合和融合中发挥关键作用, 特别是血清型 FCoV-II 获得巨噬细胞趋向性被证明是由刺突糖蛋白基因引起^[19], 进一步表明刺突糖蛋白的关键突变可能对 FCoV 的生物型转换很重要。

还有假说认为, FECV 突变为 FIPV 是由宿主免疫系统的选择压力引起的。当猫感染 FECV 时, 免疫系统可能会产生一些抗体, 但由于 FECV 的复制能力较强, 这些抗体可能并不完全有效^[20]。因此, FECV 可能在宿主体内长期存在, 而免疫系统不断试图应对这种感染。在这种持续的免疫挑战下, FECV 可能会发生突变以逃避免疫系统的清除, 从而产生 FIPV^[21]。这种突变可能包括改变病毒的抗原性、增强病毒的侵袭性或改变病毒与宿主细胞之间的相互作用。

除了病毒本身的特性外, 宿主因素也可能对 FECV 转变为 FIPV 起作用^[22]。例如, 宿主的遗传易感性、免疫状态和环境因素等可能影响 FECV 感染后疾病的发展和严重程度。病毒在猫体内发生变异, 从 FECV 突变为 FIPV 型, 使猫更容易发展成 FIP。

综上所述, FECV 向 FIPV 转变是一个复杂的过程, 涉

及病毒遗传变异、免疫选择压力以及宿主因素等的相互作用。随着对这一过程的深入研究,我们可以更好地理解FIP的发病机制,并为预防和治疗提供更有效的策略。

3 FIPV的ORF序列特点

研究发现,FCoV的非结构蛋白对毒力维持发挥着重要作用,FIPV的非结构蛋白缺失与减毒病毒有关^[23]。FIPV的非结构蛋白是维持病毒在单核细胞中持续复制的重要蛋白。研究显示,ORF7ab和ORF3abc缺失而无法编码非结构蛋白的FIPV会失去维持复制的能力,这与野生型FIPV存在显著差异^[24]。而仅ORF3abc缺失而无法编码非结构蛋白的FIPV仍能维持其复制能力,但受感染的单核细胞所占百分率显著低于野生型FIPV。以上提示ORF7对单核细胞/巨噬细胞中FIPV复制至关重要,可以解释其在体内和FIP发展中的作用;而ORF3缺失的影响并不明显,表明ORF3编码蛋白仅在FIPV感染体内靶细胞期间发挥支持作用。

3.1 ORF3序列分析

FIPV中ORF3序列的分析可以提供有关病毒变种之间的差异和相似性信息^[25]。对FIPV的ORF3序列进行研究发现,FIPV在这个区域可能存在一些特定的变异,这些变异可能与其致病性和临床表现相关^[26]。通过分析ORF3序列,还可以为诊断FIP提供一定的帮助。

ORF3编码蛋白对于单核细胞中FIPV的复制不太重要,因为ORF3缺失而无法编码非结构蛋白的FIPV仍具有毒性感染力^[27]。如果缺失ORF3的FIPV滴度和复制能力提高,至少存在1种编码完整非结构蛋白的ORF,即ORF3a、ORF3b或ORF3c。缺失ORF3a和ORF3b的野生型FIPV79-1146,其ORF3c基因编码是截短3c蛋白,在60%~71.4%的体内FIPV毒株表达这种截短3c蛋白^[28]。在单核细胞/巨噬细胞中有效复制FIPV,需要截短3c蛋白。表达截短3c蛋白的野生型FIPV79-1146确实在单核细胞/巨噬细胞中有效复制,但联合至少一种ORF3a或ORF3b编码蛋白质,可以支持FIPV在单核细胞中完整复制^[29]。

综上,FIPV与ORF3序列的分析可以提供关于病毒变种之间的差异信息,有助于更好地理解FIP的发病机制、传播途径,以及改进诊断方法。

3.2 ORF7序列分析

ORF7缺失的FIPV无法进入新的单核细胞,或者体外培养单核细胞在感染环境中发现病毒蛋白合成受

到抑制^[30]。当细胞被病毒感染时,它们可以通过释放干扰素来预防邻近细胞感染病毒。这会诱导细胞产生多抗病毒蛋白,这些蛋白具有对抗病毒或阻断蛋白质合成以应对新病毒感染的作用^[31]。由于ORF7位于病毒基因组的3'远端,即转录开始的地方,ORF7a和ORF7b的mRNA在病毒复制一开始就产生,表明ORF7a和ORF7b早期翻译蛋白质,这些蛋白质很可能会发挥快速干扰感染细胞释放干扰素等多种作用,从而抑制抗病毒反应^[32]。因此,ORF7缺失的FIPV无法消除干扰素诱导的抗病毒反应,并且病毒复制可能被阻止。体外研究观察发现,单核细胞中ORF7是FIPV维持复制的关键基因,体内ORF7缺失的FIPV也是减毒表型^[30,32]。

3.3 N/S序列分析

对FIP猫血液样本中分离出的FIPV流行毒株HRB-17进行测序和分析显示,N基因和S基因与NCBI数据库中现有参考毒株的序列同源性分别为91.2%~98.87%和89.38%~96.70%^[33]。此外,FIPV HRB-17毒株与1971年在德国分离的CCoV171、1979年在英国分离的FCoV79-1146之间存在密切的进化关系,因此FIPV HRB-17流行毒株可能是CCoV进行基因分选后产生的FCoV突变体^[33]。N/S基因编码的核衣壳蛋白也是诊断FIP的潜在标志物之一,这个蛋白在病毒的复制和装配过程中起着重要作用。核衣壳蛋白是FIPV中含量和保守性最高的蛋白,是病毒粒子的核心成分。N蛋白不仅能识别病毒RNA并将其包装成核糖核蛋白复合体,还能通过与病毒或宿主蛋白结合,参与病毒转录、复制、免疫调节等多个进程^[34]。

核衣壳蛋白能在病毒感染后期促进宿主的炎症反应,这可能与FIPV引起的细胞因子风暴相关。核衣壳蛋白能招募核转录因子 κ B(nuclear transcription factor- κ B, NF- κ B)通路中的关键激酶即转化生长因子 β 激活激酶1(transforming growth factor- β activated kinase 1, TAK1)及抑制剂 κ B激酶 β (inhibitory kappa B kinase β , IKK β),促进TAK1与IKK β 的相互作用,并激活IKK β 磷酸化^[35]。通过促进TAK1与IKK β 相互结合,核衣壳蛋白可以促进宿主NF- κ B通路的激活,并诱导细胞分泌大量促炎性细胞因子,包括白细胞介素(interleukin, IL)-6、IL-1 β 、IL-8和TNF α 等^[2,36-37]。此外,使用1,6-己二醇抑制核衣壳蛋白的相分离形成,不仅可以减弱病毒感染过程中TAK1与IKK β 的相互作用,而且能抑制FIPV感染引起的炎症反应及炎症因子释放^[36]。

4 结论

冠状病毒是RNA病毒，其基因组具有高度变异性。FIPV和FECV可能通过基因重组、突变等方式进行进化和变异，产生新的亚型和变种。Jin等^[18]认为ORF中部分基因突变可能与FECV向FIPV转变有关。Gao等^[20]认为FECV转变为FIPV是由宿主免疫系统的选择压力引起的；当猫感染FECV时，如果其免疫系统无法完全有效清除该病毒，就可能发生突变，从而产生FIPV。吴春霞等^[24]研究发现FIPV的非结构蛋白基因ORF3、7b以及S基因七肽重复区1序列呈遗传多样性，序列存在很大的个体间差异，其中ORF3c基因的截短和/或某些氨基酸的替换共同作用与病毒的致病性有关。

FIPV和FECV均属于冠状病毒科，它们的基因组构造基本类似，但有一些关键的差异，这些差异可能与它们的致病性和传播特征有关。此外，这些差异可能导致FIPV具有更强的致病性。FIPV的刺突糖蛋白可能与其致病性有关，因为刺突糖蛋白是冠状病毒进入宿主细胞的关键蛋白，刺突糖蛋白变异可能影响病毒对宿主细胞的感染能力和免疫逃逸能力。另外，FIPV的非结构蛋白可能与其对宿主免疫系统的调控有关，使FIPV感染后能够逃避宿主的免疫应答，从而导致更严重的疾病。这种基因组的变异性是研究FIPV和FECV病原性和流行病学特征的重要基础，也为病毒检测方法的研究提供了参考。

虽然《中华人民共和国药典》明确将猫列为实验动物，但我国到目前为止还没有实验用猫的国家标准。现行有效的地方标准分别由河北、黑龙江、四川及山西等省份相继制定并发布，它们都将FIPV列入无特定病原体（specific pathogen free, SPF）级猫病原微生物必检项，或作为普通级实验用猫设施申请生产许可证、引进实验用猫或怀疑本病流行等必要时的检测项目^[38-40]。综上所述，FIPV和FECV的基因组结构相似，但在特定基因区域的差异可能导致它们的致病性和传播特征有所不同。对这些差异的深入研究有助于更好地理解 and 防治FCoV感染相关的疾病，有利于促进实验用猫标准的制定。

[利益声明 Declaration of Interest]

作者声明本文不存在利益冲突。

[参考文献 References]

[1] TASKER S, ADDIE D D, EGBERINK H, et al. Feline infectious

peritonitis: European advisory board on cat diseases guidelines[J]. *Viruses*, 2023, 15(9): 1847. DOI: 10.3390/v15091847.

- [2] THAYER V, GOGOLSKI S, FELTEN S, et al. 2022 AAFP/EveryCat feline infectious peritonitis diagnosis guidelines[J]. *J Feline Med Surg*, 2022, 24(9): 905-933. DOI: 10.1177/1098612X221118761.
- [3] DELAPLACE M, HUET H, GAMBINO A, et al. Feline coronavirus antivirals: a review[J]. *Pathogens*, 2021, 10(9):1150. DOI: 10.3390/pathogens10091150.
- [4] LUTZ H, LEHMANN R, WINKLER G, et al. Feline immunodeficiency virus in Switzerland: clinical aspects and epidemiology in comparison with feline leukemia virus and coronaviruses[J]. *Schweiz Arch Tierheilkd*, 1990, 132(5): 217-225.
- [5] MELI M, KIPAR A, MÜLLER C, et al. High viral loads despite absence of clinical and pathological findings in cats experimentally infected with feline coronavirus (FCoV) type I and in naturally FCoV-infected cats[J]. *J Feline Med Surg*, 2004, 6(2):69-81. DOI: 10.1016/j.jfms.2003.08.007.
- [6] VENNEMA H, POLAND A, FOLEY J, et al. Feline infectious peritonitis viruses arise by mutation from endemic feline enteric coronaviruses[J]. *Virology*, 1998, 243(1): 150-157. DOI: 10.1006/viro.1998.9045.
- [7] ZEHR J D, KOSAKOVSKY POND S L, MILLET J K, et al. Natural selection differences detected in key protein domains between non-pathogenic and pathogenic feline coronavirus phenotypes[J]. *Virus Evol*, 2023, 9(1): vead019. DOI: 10.1093/ve/vead019.
- [8] YAN Y Y, LI J, JIAO Z, et al. Better therapeutic effect of oral administration of GS441524 compared with GC376[J]. *Vet Microbiol*, 2023, 283:109781. DOI: 10.1016/j.vetmic.2023.109781.
- [9] LUTZ M, STEINER A R, CATTORI V, et al. FCoV viral sequences of systemically infected healthy cats lack gene mutations previously linked to the development of FIP[J]. *Pathogens*, 2020, 9(8):603. DOI: 10.3390/pathogens9080603.
- [10] WU S S, HE X, ZHANG B C, et al. Molecular epidemiology and genetic diversity of canine coronavirus from domestic dogs in Chengdu, China from 2020 to 2021 using a multiplex RT-PCR[J]. *Infect Genet Evol*, 2023, 112: 105463. DOI: 10.1016/j.meegid.2023.105463.
- [11] 刘一楠, 陈奕熹, 汪刚, 等. 猫传染性腹膜炎诊断研究进展[J]. *中国动物传染病学报*, 2022, 30(2):208-215. DOI: 10.19958/j.cnki.cn31-2031/s.2022.02.016.
- LIU Y N, CHEN Y X, WANG G, et al. Updates for diagnosis of feline infectious peritonitis I[J]. *Chin J Anim Infect Dis*, 2022, 30(2):208-215. DOI: 10.19958/j.cnki.cn31-2031/s.2022.02.016.
- [12] FELTEN S, HARTMANN K. Diagnosis of feline infectious peritonitis: a review of the current literature[J]. *Viruses*, 2019, 11(11):1068. DOI: 10.3390/v11111068.
- [13] CAPOZZA P, PRATELLI A, CAMERO M, et al. Feline coronavirus and alpha-herpesvirus infections: innate immune response and immune escape mechanisms[J]. *Animals*, 2021, 11(12):3548. DOI: 10.3390/ani11123548.
- [14] 张森, 吕炫, 毕庄莉, 等. 猫冠状病毒的全基因组测序与遗传进化分析[J]. *中国动物传染病学报*, 2023, 31(6):108-115. DOI:10.19958/j.cnki.cn31-2031/s.20211118.001.
- ZHANG M, LV X, BI Z L, et al. The whole genomic sequencing

- and genetic evolution analysis of a feline coronavirus strain [J]. *Chin J Anim Infect Dis*, 2023, 31(6):108-115. DOI:10.19958/j.cnki.cn31-2031/s.20211118.001.
- [15] 张永富, 张恒, 高爱芸, 等. 冠状病毒引发猫感染猫传染性腹膜炎的诊断与治疗[J]. *当代畜禽养殖业*, 2023, 43(1):59-62. DOI: 10.3969/j.issn.1005-5959.2023.01.020.
ZHANG Y F, ZHANG H, GAO A Y, et al. Diagnosis and treatment of infectious peritonitis caused by coronavirus in Maine cats[J]. *Mod Anim Husb*, 2023, 43(1): 59-62. DOI: 10.3969/j.issn.1005-5959.2023.01.020.
- [16] 俞向前, 马世伟, 文德亮, 等. 猫细小病毒、猫疱疹病毒和猫冠状病毒多重 PCR 检测方法建立及病原学分析[J]. *今日畜牧兽医*, 2023, 39(5):13-16.
YU X Q, MA S W, WEN D L, et al. Establishment of multiplex PCR method for detection of feline parvovirus, feline herpesvirus and feline coronavirus and pathogenic analysis [J]. *Today Anim Husb Vet Med*, 2023,39(5):13-16.
- [17] JIAO Z, YAN Y Y, CHEN Y X, et al. Adaptive mutation in the main protease cleavage site of feline coronavirus renders the virus more resistant to main protease inhibitors[J]. *J Virol*, 2022, 96(17): e0090722. DOI: 10.1128/jvi.00907-22.
- [18] JIN Z M, DU X Y, XU Y C, et al. Structure of M^{pro} from SARS-CoV-2 and discovery of its inhibitors[J]. *Nature*, 2020, 582(7811):289-293. DOI: 10.1038/s41586-020-2223-y.
- [19] TORTORICI M A, WALLS A C, JOSHI A, et al. Structure, receptor recognition, and antigenicity of the human coronavirus CCoV-HuPn-2018 spike glycoprotein[J]. *Cell*, 2022, 185(13):2279-2291.e17. DOI: 10.1016/j.cell.2022.05.019.
- [20] GAO Y Y, WANG Q, LIANG X Y, et al. An updated review of feline coronavirus: mind the two biotypes[J]. *Virus Res*, 2023, 326:199059. DOI: 10.1016/j.virusres.2023.199059.
- [21] BANK-WOLF B R, STALLKAMP I, WIESE S, et al. Mutations of 3c and spike protein genes correlate with the occurrence of feline infectious peritonitis[J]. *Vet Microbiol*, 2014, 173(3-4): 177-188. DOI: 10.1016/j.vetmic.2014.07.020.
- [22] LICITRA B N, MILLET J K, REGAN A D, et al. Mutation in spike protein cleavage site and pathogenesis of feline coronavirus [J]. *Emerg Infect Dis*, 2013, 19(7): 1066-1073. DOI: 10.3201/eid1907.121094.
- [23] 杨德全, 鞠厚斌, 管跻一, 等. 上海地区 3 株猫冠状病毒 ORF3、ORF7 和 S2 基因的序列测定及进化分析[J]. *微生物与感染*, 2020, 15(6):370-376. DOI: 10.3969/j.issn.1673-6184.2020.06.005.
YANG D Q, JU H B, GUAN J Y, et al. Sequencing and phylogenetic analysis of ORF3, ORF7 and S2 gene of three feline coronavirus in Shanghai[J]. *J Microbes Infect*, 2020, 15(6):370-376. DOI: 10.3969/j.issn.1673-6184.2020.06.005.
- [24] 吴春霞, 卢建远, 金素钰, 等. 成都地区猫传染性腹膜炎病毒 ORF3、7b 以及 S 基因七肽重复区 1 序列的分析[J]. *中国预防兽医学报*, 2019, 41(2):200-203. DOI: 10.3969/j.issn.1008-0589.201806034.
WU C X, LU J Y, JIN S Y, et al. Sequence analysis of ORF3, 7b and HR1 of S gene of feline infectious peritonitis virus in Chengdu[J]. *Chin J Prev Vet Med*, 2019, 41(2):200-203. DOI: 10.3969/j.issn.1008-0589.201806034.
- [25] 高雅, 黄金田, 冯心如, 等. 猫传染性腹膜炎病毒的检测及 ORF 7ab、N 和 S 基因遗传进化分析[J]. *动物医学进展*, 2023, 44(12): 60-65. DOI: 10.3969/j.issn.1007-5038.2023.12.011.
GAO Y, HUANG J T, FENG X R, et al. Detection and analysis of the genetic evolution of the ORF 7ab, N and S genes of feline infectious peritonitis virus[J]. *Prog Vet Med*, 2023, 44(12):60-65. DOI: 10.3969/j.issn.1007-5038.2023.12.011.
- [26] EMMER L, FELTEN S, MATIASSEK K, et al. Feline coronavirus with and without spike gene mutations detected by real-time RT-PCRs in cats with feline infectious peritonitis[J]. *J Feline Med Surg*, 2020, 22(8):791-799. DOI: 10.1177/1098612X19886671.
- [27] BÁLINT Á, FARSANG A, ZÁDORI Z, et al. Molecular characterization of feline infectious peritonitis virus strain DF-2 and studies of the role of ORF3abc in viral cell tropism [J]. *J Virol*, 2012, 86(11):6258-6267. DOI: 10.1128/JVI.00189-12.
- [28] MELI M L, SPIRI A M, ZWICKLBAUER K, et al. Fecal feline coronavirus RNA shedding and spike gene mutations in cats with feline infectious peritonitis treated with GS-441524[J]. *Viruses*, 2022, 14(5):1069. DOI: 10.3390/v14051069.
- [29] DEDEURWAERDER A, OLYSLAEGERS D A J, DESMARETS L M B, et al. ORF7-encoded accessory protein 7a of feline infectious peritonitis virus as a counteragent against IFN- α -induced antiviral response[J]. *J Gen Virol*, 2014, 95(Pt 2):393-402. DOI: 10.1099/vir.0.058743-0.
- [30] CAPASSO C, NOCENTINI A, SUPURAN C T. Protease inhibitors targeting the main protease and papain-like protease of coronaviruses[J]. *Expert Opin Ther Pat*, 2021, 31(4): 309-324. DOI: 10.1080/13543776.2021.1857726.
- [31] KRISTEN-BURMANN C, ROGGER P, VEIGA I B, et al. Reverse genetic assessment of the roles played by the spike protein and ORF3 in porcine epidemic diarrhea virus pathogenicity [J]. *J Virol*, 2023, 97(7): e0196422. DOI: 10.1128/jvi.01964-22.
- [32] DECARO N, MARI V, LANAVE G, et al. Mutation analysis of the spike protein in Italian feline infectious peritonitis virus and feline enteric coronavirus sequences[J]. *Res Vet Sci*, 2021, 135:15-19. DOI: 10.1016/j.rvsc.2020.12.023.
- [33] GUAN X T, LI H, HAN M J, et al. Epidemiological investigation of feline infectious peritonitis in cats living in Harbin, Northeast China from 2017 to 2019 using a combination of an EvaGreen-based real-time RT-PCR and serum chemistry assays[J]. *Mol Cell Probes*, 2020, 49: 101495. DOI: 10.1016/j.mcp.2019.101495.
- [34] 熊炜, 林颖峥, 王艳, 等. 猫传染性腹膜炎病毒核衣壳蛋白的表达及间接 ELISA 法的建立[J]. *中国动物检疫*, 2014, 31(2):67-70. DOI:10.3969/j.issn.1005-944X.2014.02.021.
XIONG W, LIN Y Z, WANG Y, et al. Cloning and expression of nucleocapsid protein of feline infectious peritonitis virus and establishment of an indirect ELISA for EIPV[J]. *China Anim Health Insp*, 2014, 31(2): 67-70. DOI: 10.3969/j.issn.1005-944X.2014.02.021.
- [35] 赵艳姣, 卓娅·买买提乌斯满, 刘金玲, 等. 肿瘤坏死因子样细胞凋亡诱导物/成纤维细胞生长因子诱导早期反应蛋白 14 轴及下游核因子 K β 通路的关键因子 Mrna 及蛋白表达差异与老年肥胖的相关性[J]. *中华老年多器官疾病杂志*, 2024, 23(2):81-86. DOI: 10.11915/j.issn.1671-5403.2024.02.016.
ZHAO Y J, Zhuoya Maimaitiwsiman, LIU J L, et al. Correlation between obesity and difference of mRNA and protein expression of key factors of tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis/fibroblast growth factor-induced early reactive protein 14 and downstream nuclear factor-kappa B pathway in the elderly[J]. *Chin J Mult Organ Dis Elder*, 2024, 23(2):81-86. DOI: 10.11915/j.issn.1671-5403.2024.02.016.

- [36] 高传龙, 袁静, 李琴, 等. 特异性抑制转化生长因子 β 激活激酶1活性对妊娠期糖尿病孕妇外周血单核细胞炎症通路的影响[J]. 中国现代医学杂志, 2016, 26(7):9-14. DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2016.07.003.
GAO C L, YUAN J, LI Q, et al. Influence of specific inhibition of TAK1 activity in inflammatory pathway of mononuclear cells in peripheral blood of pregnant women with gestational diabetes mellitus[J]. China Ind Econ, 2016, 26(7):9-14. DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2016.07.003.
- [37] OLARTE-CASTILLO X A, LICITRA B N, ANDRÉ N M, et al. Intra-host variation in the spike S1/S2 region of a feline coronavirus type-1 in a cat with persistent infection[J]. bioRxiv (Preprint), 2023: 2023.07.31.551356. DOI: 10.1101/2023.07.31.551356.
- [38] 山西省科学技术厅. 实验动物猫微生物等级与监测: DB14/T 2290—2021[S/OL]. [2024-05-10]. <https://dbba.sacinfo.org.cn/stdDetail/2baddccc12c8e866b53247922bdbbeb831bf9584582c7f64302875bda6cafd0ed>.
Department of Science and Technology of Shanxi Province. Laboratory animals—Microbiological standards and monitoring of cats: DB 14/T 2290-2021[S/OL]. [2004-05-10]. <https://dbba.sacinfo.org.cn/stdDetail/2baddccc12c8e866b53247922bdbbeb831bf9584582c7f64302875bda6cafd0ed>.
- [39] 黑龙江省质量技术监督局. 实验动物猫微生物等级及监测: DB23/T 2057.2—2017[S/OL]. [2004-05-10]. <http://heblac.hebmu.edu.cn/ydksys/file/2022-07-08/16572474361262c9e813f81adc3376630181dba50d5e44d4.pdf>.
Heilongjiang Provincial Bureau of Quality and Technical Supervision. Laboratory animals—Microbiological standards and monitoring of cats: DB23/T 2057.2-2017[S/OL]. [2004-05-10]. <http://heblac.hebmu.edu.cn/ydksys/file/2022-07-08/16572474361262c9e813f81adc3376630181dba50d5e44d4.pdf>.
- [40] 四川省科学技术厅. 普通级实验用猫微生物学监测: DB51/T 2852—2021[S/OL]. [2004-05-10]. <https://dbba.sacinfo.org.cn/stdDetail/11c2796a027d3bc72e31dad74a39d50dc7c623d7f33e99a61ea33f0ee8bd8b90>.
Conventional experimental cat—Pathogenic surveillance: DB51/T 2852-2021[S/OL]. [2004-05-10]. <https://dbba.sacinfo.org.cn/stdDetail/11c2796a027d3bc72e31dad74a39d50dc7c623d7f33e99a61ea33f0ee8bd8b90>.

(收稿日期: 2024-05-13 修回日期: 2024-07-29)

(本文编辑: 张俊彦, 富群华, 丁宇菁, 姜怡欣)

[引用本文]

- 陶凌云. 猫冠状病毒基因特点分析及其研究进展[J]. 实验动物与比较医学, 2024, 44(6): 661-666. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.069.
TAO L Y. Genetic characteristics and research progress of feline coronavirus[J]. Lab Anim Comp Med, 2024, 44(6): 661-666. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.069.

《实验动物与比较医学》出版伦理声明

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

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

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

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

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

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

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

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

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

9. 所有来稿若涉及学术不端行为, 均须由作者本人负责。本刊对已发现的学术不端作者, 保留通报其所在单位及同领域期刊社的权利。

《实验动物与比较医学》编辑部



刘意抒, 医学硕士, 副主任护师, 海军军医大学第三附属医院内科学与野战内科学教研室教学秘书。现任上海市医学伦理学会叙事医学分会委员、上海市实验动物学会教育培训与科普专委会委员。长期从事医学教育及教学管理工作, 主持教育部、上海市及院校各类课题6项, 入选医院优青托举、教菁人才项目2项。以第一作者/通信作者发表SCI论文1篇, 核心期刊论文15篇; 副主编专著2部, 参编2部; 申请授权国家发明专利6项, 实用新型专利20项, 软件著作权4项。个人先后取得全国、上海市及各类国际医学模拟师资认证13项, 获上海市医学会教育技术优秀成果评选一等奖1项、三等奖3项, 并先后获得国家、上海市各类教育及科学论坛征文比赛荣誉。同时致力于提高公众健康素养, 积极投身科普工作, 先后在“科普中国”、《医师报》等国家和省部级媒体发表多篇科普文章。



蔡丽萍, 主管技师, 动物学硕士, 海军军医大学第一附属医院手术机器人培训中心核心导师, 国内首位达芬奇手术机器人培训课程专职兽医, 国家执业兽医师。主要从事实验动物在手术机器人、腹腔镜、导管介入等微创外科手术医学模拟课程的应用研究。现任上海市实验动物学会教育培训与科普专委会委员、实验动物设施与资源专委会委员, 中国实验动物学会实验动物技术专家(高级)。现主持教育部产学研合作协同育人项目1项, 参与上海市高等教育学会等各类模拟医学教学课题6项。副主编专著1部, 参编教材2部; 以第一作者/通信作者发表SCI论文1篇, 核心期刊论著9篇; 于“新华网”“科普中国”等国家、省部级媒体和期刊发表科普作品6项, 科普视频1部; 授权国家发明专利8项, 实用新型专利18项, 软件著作权4项。

实验猪在达芬奇手术机器人培训中的应用进展及挑战

刘意抒¹, 蔡丽萍²

(1. 海军军医大学第三附属医院内科学与野战内科学教研室, 上海 200438; 2. 海军军医大学第一附属医院临床教育中心, 上海 200433)

[摘要] 实验猪在生命科学研究中占据重要地位, 同时在促进临床新技术与新方法的实际应用过程中也发挥着不可或缺的关键性作用。达芬奇手术机器人系统由美国 Intuitive Surgical 公司开发, 自2000年获美国FDA批准以来, 已广泛应用于多个外科领域, 因其高精度和准确性而备受推崇。随着手术机器人技术的不断进步, 对专业医疗人员的技能要求也日益提高。因此, 手术技能培训成为确保手术安全和有效的关键环节。本文对国内外达芬奇手术机器人的培训现状进行了简要概述, 并重点探讨了实验猪在国内达芬奇手术机器人培训中的实际应用情况, 指出其不仅能够有效模拟人体手术环境, 使受训者在安全可控的条件下进行实践操作, 还能加快受训者对手术机器人的熟悉和掌握, 显著缩短学习曲线, 提高手术操作精准度和稳定性, 降低手术风险。然而, 实验动物在手术机器人培训中的应用也面临着挑战, 包括实验动物与人体差异导致的局限性、潜在的伦理风险及舆论压力等。为此, 本文提出了促使伦理法规完善和执行、推动虚拟现实和增强现实技术研发等建议, 以期减少手术培训对实验动物的依赖, 并提升培训效果, 对推动达芬奇手术机器人培训模式的创新与发展提供更多参考。

[关键词] 实验猪; 手术模拟; 达芬奇手术机器人; 实验动物伦理; 虚拟现实

[中图分类号] R-332; Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2024)06-0667-08



Advances and Challenges of Using Experimental Pigs in Da Vinci Surgical Robot Training

[基金项目] 海军军医大学第三附属医院人才培养“腾飞工程”-优青托举项目“内科与野战内科学教研室主管护师刘意抒”(TF2024TJYQ07)

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

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

LIU Yishu¹, CAI Liping²

(1. Department of Internal Medicine and Field Internal Medicine, The Third Affiliated Hospital of Naval Medical University, Shanghai 200438, China; 2. Clinical Education Center, The First Affiliated Hospital of Naval Medical University, Shanghai 200433, China)

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

[ABSTRACT] Experimental pigs occupy a crucial position in life sciences research and have been indispensable in advancing the practical application of new clinical technologies and methods. The Da Vinci Surgical Robot System, developed by Intuitive Surgical in the United States, has been widely used across various surgical fields since its approval by the U.S. Food and Drug Administration (FDA) in 2000, and is highly esteemed for its precision and accuracy. With the continuous advancement of surgical robot technology, the skill requirements for medical professionals have also increased. Consequently, surgical skills training has become an essential component of ensuring both surgical safety and effectiveness. This article briefly reviews the current status of Da Vinci surgical robot training, both domestically and internationally, with a focus on the practical application of experimental pigs in domestic Da Vinci surgical robot training. It emphasizes that experimental pigs not only effectively simulate the human surgical environment, enabling trainees to practice in a safe and controlled setting, but also help accelerate the trainees' familiarity with and mastery of the surgical robot. This, in turn, significantly shortens the learning curve, enhances the precision and stability of surgical procedures, and reduces surgical risks. However, the use of experimental animals in surgical robot training also encounters challenges, including limitations caused by the differences between experimental animals and humans, potential ethical concerns, and public opinion pressures. In response to these challenges, the paper proposes suggestions such as improving and enforcing ethical regulations, as well as advancing the development of virtual reality (VR) and augmented reality (AR) technologies. These efforts aim to reduce reliance on experimental animals in surgical training while enhancing training effectiveness, thereby contributing to the innovation and development of Da Vinci surgical robot training models.

[Key words] Experimental pigs; Surgical simulation; Da Vinci surgical robot; Ethics for laboratory animals; Virtual reality

达芬奇手术机器人又称“内窥镜手术器械控制系统”，该系统由美国 Intuitive Surgical 公司开发，于 2000 年获得美国食品药品监督管理局（Food and Drug Administration, FDA）的批准^[1]。达芬奇手术机器人实现了医学科学、机器人技术和工程学的交叉融合^[2]，可提供高清晰度的三维视觉系统和高灵活度的机械臂，使外科医师能够以更高的精确度和准确性进行复杂的手术，从而减少术后并发症的发生，因此被广泛应用于泌尿外科、妇科、普通外科和心胸外科等多个领域。

随着手术机器人技术的迭代和手术适应症范围的不断扩大，对专业医疗人员的技能要求也随之提高。为了更精确地掌握手术机器人系统的操控技巧，操作技能培训成为确保手术有效进行和安全的关键环节。近年来，模拟手术在外科教学中变得越来越重要，法国国家卫生管理局（Haute Autorité de Santé, HAS）发

表了“永远不要第一次在患者身上操作”的声明，突出强调了目标和道德优先原则^[3]。Fisher 等^[4]则认为培训课程是全球标准化培训和认证外科医师进行机器人手术程序的关键步骤。因此，建立系统、全面的达芬奇手术机器人培训项目，利用模拟手术降低术者的试错风险成本，对于提高手术成功率、保障患者安全以及推动外科技术的发展具有不可估量的价值^[5]。

实验动物在医学研究和培训中的应用历史悠久，尤其在医疗器械开发、手术技能培训中具有重要意义，发挥着不可替代的作用^[6]。大量研究表明，利用活体猪进行模拟训练是提高机器人手术技能的有效手段^[7]。因此，实验猪成为支持达芬奇手术机器人培训项目顺利进行的重要环节。2017 年 2 月，海军军医大学第一附属医院（上海长海医院）正式启用了达芬奇手术机器人国际培训中心，成为国内继香港之后第二家获得 Intuitive Surgical 公司官方授权的培训基地。该

中心的成立标志着长海医院在机器人手术领域中迈出了新的一步,成为在全国范围内该行业培训的规范和标杆、标准制定者和方向引领者,具有里程碑式的战略意义。本文基于笔者所在机构的培训实践经验,系统性地综述了当前国内外达芬奇手术机器人培训的现状,并着重分析了实验猪在此类培训中的应用情况。内容涵盖选择实验猪作为培训用动物的原因及标准、培训的基本流程和关键操作技巧等方面,深入探讨了实验猪在达芬奇手术机器人培训中所面临的局限性和困境,并剖析这些挑战产生的根本原因,继而探索可能的解决方案。同时,本文也对实验猪在未来手术机器人培训中的应用前景进行了展望,期望通过科学研究、技术创新以及伦理标准的提升,进一步优化实验猪在培训中的角色,力求在保障培训质量的同时,尽可能减少对实验动物的依赖。

1 达芬奇手术机器人培训现状

1.1 国外培训中心

自2000年欧洲首次引入达芬奇手术机器人以来,其应用范围已从最初的泌尿外科扩展至消化外科、胸腔外科、妇科等多个专业领域。根据Intuitive Surgical公司发布的财务报告,截至2023年12月,达芬奇手术系统的装机量增长到8 914台,2023年完成了约2 286 000例手术,且该数字仍在持续快速增长^[8]。有鉴于此,全球范围内外科住院医师以及有意向开展或参与机器人手术项目的资深外科医师申请进行专业培训的需求量呈现激增态势。

国际上,达芬奇手术机器人培训中心作为专业技能提升的重要基地,致力于提供高标准的机器人辅助手术培训。培训中心通常配备先进的达芬奇手术机器人模拟系统,以及专为模拟实际手术情景而设计的实验室,以确保受训者在安全的情况下,练习并掌握基本操作技能,提升应对复杂手术情况的决策能力。培训涵盖多学科成员,强调手术团队的协作训练。同时,培训中心会提供持续教育课程,以确保医疗专业人员掌握最新的手术技术和临床应用。

达芬奇手术机器人培训体系的构建严格遵循经过科学验证的教育框架,不仅强调扎实的理论知识,还深度融合了提升技能的多维度实践环节。因其独特的技术特性和环境要求,达芬奇手术机器人手术在操作方式上与传统腹腔镜手术存在显著差异。然而,两者在多个方面仍具备共通性。外科医师需适应通过机器

界面进行手术的新方式,并重新审视手术流程中的某些步骤,以确保整个机器人手术过程在绝对安全的环境中进行。术者需要习得的关键技能包括:机器人专用穿刺钳的正确定位、仪器推车臂的准确对接、结合多种功能的多个脚踏板的使用、与体内仪器多维关节操作相关的新特定手势,同时也要持续关注技术创新及其更新进展^[9]。总之,国外培训中心多是基于验证课程的培训体系,注重持续教育与最新技术跟踪。

1.2 国内培训中心

我国机器人外科领域的发展起步较晚,然而,随着达芬奇手术机器人在中国的引进与广泛应用,相关领域对于专业培训的需求日益迫切。初期,国内仅有香港地区建立了符合国际标准且具备官方授权的培训基地,这导致大量有潜力的外科手术人才不得不远赴香港或海外接受相关培训。因此,培训条件的限制使得国内达芬奇手术专业人才的培养遇到瓶颈。直到2017年,海军军医大学第一附属医院(上海长海医院)机器人手术培训中心落成启用,这对加快我国手术机器人医师人才的培养建设提供了有力保障^[10],也为国内医疗行业的可持续发展提供了人才支撑。

近年来,随着技术的进一步推广和培训的逐步规范化,国内其他地区也相继建立起具备资质的培训中心。中国人民解放军总医院、四川大学华西医院、南京鼓楼医院等医疗机构也相继通过资质审核和认证,成功建立起一批达芬奇手术机器人培训中心,为推动国内机器人手术技术的发展和普及提供了进一步的有力支持,同时促进了国际交流与合作,推动了我国医疗技术走向世界舞台。各中心在沿用国际先进技术和培训理念的基础上,结合中国医疗实践的特点,开发了符合国情的培训课程和教学方法。例如,通过与国内顶尖医院的合作,引入具有中国特色的手术案例,成立专科高级临床培训中心,使培训更加贴近国内医师的实际工作。此外,一些培训中心还开展了远程教学和数字化教学资源建设,以提高培训的效率和可及性。总之,国内培训中心已经从单纯引进到培训模式本土化,并不断强调创新与特色。

2 达芬奇手术机器人培训中的实验动物应用现状

2.1 实验动物的选择原因与标准

实验动物是探索疾病治疗及预防策略的关键工具,不仅在药物研发过程中发挥着不可替代的作用,还是

研究人类疾病与衰老机制的重要载体。在医疗新技术与新术式的研发及推广领域,实验动物模型的应用同样扮演着至关重要的角色。随着基因编辑技术的不断进步,其应用范围亦日益扩大,涵盖了异种移植、环境污染风险评评估以及药物发现等多个重要领域^[11]。值得一提的是,2024年9月23日,华中科技大学同济医学院陈忠华团队、澳门科技大学医学院张康团队、海南医科大学第二附属医院王毅团队和成都中科奥格生物科技有限公司潘登科团队联合成功实施了两例从转基因小型猪到脑死亡患者的单肾异种移植,将观察期延长至术后12 d,移植后患者的肾功能得以恢复^[12]。这不仅标志着异种移植技术迈出了重要一步,更彰显了实验猪在医学新技术研发中的核心价值。

大量研究表明,实验猪在机器人手术培训中起到不可替代的作用,Tiong等^[13]强调了活体动物模型在使用手术机器人模拟缝合环境中的核心地位,其可模拟出真实且复杂的生物组织触感,这一特性极大地增强了训练模型的有效性,其优势是计算机模拟、干模型训练及尸体模型所难以比拟的。日本学者的一项研究^[14]进一步证明实验动物在机器人手术技术验证中的价值,他们通过实验动物模型验证了机器人在执行肺切除与淋巴结清扫术时,能够达到与标准开胸手术相当的技术精度与效果,这标志着机器人手术技术在复杂手术领域的应用潜力。与此同时,Kasabwala等^[15]的研究聚焦于机器人辅助骶骨盆底固定术的学习曲线,揭示了构建高效手术培训模块对于掌握此类复杂手术技能的重要作用。针对手术培训过程中面临的高昂成本、潜在感染风险、组织适应性差异以及人类尸体资源稀缺等困境,该研究进一步强调了采用活体猪模型作为替代训练平台的现实意义、可行性与成本效益优势。活体猪模型不仅能够模拟人体解剖结构与生理反应,为学员提供接近真实的手术操作环境,还能有效缓解培训资源限制问题,为胸外科医师在机器人手术领域的技能精进开辟了新的途径。

选择实验动物必须遵循一套严格的标准体系,以确保所选动物在组织结构、生理功能及代谢机制等方面与人类保持高度的相似性。这一原则对于维护试验结果的准确性、可靠性以及可推广性至关重要。目前,国内手术机器人培训中心优选的实验动物为体重约30 kg的未成年雌性长白猪,其多项生理特性使其成为理想的培训模型。首先,长白猪的耳缘静脉显著,便于迅速建立静脉通道,可确保在长时间的培训过程中

实现即时给药,以维持动物生命体征的稳定。其次,相较于雄性猪,雌性猪的尿道结构更利于术中导尿管操作,可有效预防膀胱过度充盈对手术视野的干扰,提升培训效果。此外,雌性猪的子宫是电能量操作训练的理想靶器官,在模拟实训中能够充分锻炼术者在电能量辅助下的组织分离、血管处理等关键技术,对提升手术技能具有关键作用^[16]。从成本效益角度考量,相较于同体型的实验犬等动物,雌性长白猪在满足复杂手术操作需求的同时,还展现出更高的经济性。除此之外,科研人员还可依托这一模型,深入剖析手术机器人在复杂手术环境中的实际效能,精准捕捉技术瓶颈与改进空间,为该领域实现科技进步与临床应用的协同发展作出有力推动。

2.2 动物实训基本流程和操作技巧

达芬奇手术机器人培训通常以团队为单位,团队成员包括主刀医生、助手以及护理人员。培训体系严格遵循递进原则,主刀医生的培训主要为线上理论学习、SimNow电脑模拟训练器训练、Dry Lab腹部模型训练和Wet Lab动物模拟实训共4个模块(图1)。在培训开始前,受训者需完成手术机器人相关的线上理论学习,且考核合格。培训当日依次通过SimNow电脑模拟训练器和Dry Lab腹部模型训练后,方可进入Wet Lab动物模拟实训阶段(图2)。



图1 达芬奇手术机器人主刀医生培训项目时间轴
Figure 1 Timeline of Da Vinci surgical robot surgeon training program

培训中选取体重为(28±3) kg的雌性长白猪,术前禁食12 h,禁水4 h,肌注0.4 mg/kg舒泰镇定,行气管插管术连接动物麻醉机进行麻醉维持,异氟烷浓度调至2%~3%。经尿道放置导尿管,术中持续监测并记录动物的心率、无创平均血压、呼气末二氧化碳和血氧饱和度等生命体征数值^[17]。实验猪采取仰卧位固定,建立气腹后进行打孔。放置乔卡后安装对接机械



注：A，达芬奇手术机器人线上理论课程界面；B，SimNow电脑模拟训练器中连续缝合训练模块界面；C，利用Dry Lab腹部模型执行装机与器械安装训练；D，利用Dry Lab腹部模型执行缝合打结训练；E，镜下组织缝合打结界面；F，镜下电能量使用界面；G，镜下钝性分离界面；H，镜下血管分离界面。

Note: A, Interface of theoretical course for Da Vinci surgical robot; B, Interface of continuous suture training module in SimNow computer simulation trainer; C, Performing setup and instrument installation training with Dry Lab abdominal model; D, Performing suture and knotting training with Dry Lab abdominal model; E, Interface of suturing and knot tying under endoscope; F, Interface of electric energy use under endoscope; G, Interface of blunt dissection under endoscope; H, Interface of vascular separation under endoscope.

图2 运用实验猪进行达芬奇手术机器人的培训各阶段示例

Figure 2 Illustrative stages of using experimental pigs for Da Vinci surgical robot training

臂。受训者按照培训要求练习使用手术机器人完成组织缝合、电能量使用、钝性游离、血管游离等培训内容并进行手术技能操作练习。

3 实验动物在达芬奇手术机器人培训中面临的局限与困境

3.1 实验动物与人体差异导致的局限性

实验动物是支撑生命科学和生物医药等领域科技创新的重要基础科研条件之一^[18]。在达芬奇手术机器人的培训过程中，尽管实验动物模型为医师提供了大量宝贵的实践机会，但是动物模型与人体在解剖结构和生理机能上不可避免地存在若干差异，这些差异在一定程度上限制了培训效果的最大化。例如，实验动物的血管直径、组织弹性以及器官位置与人类存在显著差异，这可能会影响医师对手术器械操作的感知和技能的精准度。这些差异对实际手术中采取的操作方式和操作技巧有着直接影响。

与此同时，技能转移也是以实验动物为载体的培训人员需要面对的问题。医师在动物模型上获得的手术操作经验并不总能直接应用于人体手术。例如，机器人手术系统在人体手术中的操作可能受到患者体位、手术区域的可及性以及手术团队成员站位等因素的影响，这些因素在应用动物模型培训中难以得到完全模

拟。所以，受训者需要在实验动物实训的基础上，通过临床实践和进一步的专业培训，不断调整和完善手术技能，以适应真正临床手术的特殊要求。

3.2 潜在的伦理风险及舆论压力

达芬奇手术机器人培训内容涵盖面广且复杂，涉及长时间的麻醉与精细手术操作，每只实验动物在培训过程中均需经历超过8 h的麻醉与手术处理。这对培训过程中保障动物福利和遵守相关的法律法规提出了更为严格的要求。因此，培训机构在启动动物实验前，需将医学研究与动物福利的平衡作为首要考量，严格执行伦理审批流程，实验全程实施疼痛管理和福利保障措施，确保实验过程符合伦理标准，并最大限度地减少动物痛苦和不适，推动医学教育的健康发展。

此外，随着公众对动物权益保护意识的日益增强，医学培训中使用实验动物的行为正面临着来自社会各界的伦理审视和舆论压力。伦理法规的完善和执行不仅体现了对生命尊严和权利的尊重，也是提升医疗机构社会责任感和公众信任度的重要途径。因此，培训中心亟需加强与公众的有效沟通，以透明化实验动物使用情况，说明所采取的伦理措施和保障，并广泛普及实验动物在医学教育和研究中的不可或缺性。同时，培训机构应当积极致力于探索并推广替代动物模型的培训方法，如虚拟现实（virtual reality, VR）模拟技术

和计算机模拟手术等，以逐步减少对实验动物的依赖，实现医学教育与动物福利保护的双重目标。

4 实验动物在达芬奇手术机器人培训中的应用展望

4.1 促使伦理法规的完善和执行

伦理法规的严格执行是确保培训活动合规、合法及符合伦理标准的关键，也是维护动物福利、回应公众关切的重要途径。随着医疗技术的发展和人们对生命伦理的日益重视，使用实验动物需进行更为严格的审查和监督，建立更为健全的伦理法规体系，这些对于促进达芬奇手术机器人培训的健康可持续发展，为医疗行业培养出更多具备高技能和高伦理标准的外科医师具有重要意义。

4.2 推动虚拟/增强现实技术的研发

近年来，实验动物在医学研究和手术技能培训中应用的局限性以及伦理问题日益凸显，VR和增强现实(augmented reality, AR)技术作为替代方案，在手术机器人关键技能的培养中获得了蓬勃发展。二者可通过构建高度逼真的虚拟手术环境，为手术机器人的技能培训提供创新途径，为医学教育带来革命性变革。这些技术能够模拟各种复杂的手术场景，使受训者在安全的环境中反复练习，从而快速掌握关键技能。同时，VR和AR技术还具备可重复性和可定制性的优势，能够根据受训者的需求和水平调整训练难度，实现个性化的培训效果。

当前，外科培训领域广泛采纳了多种形式的VR技术，这些技术不仅获得了全面而高质量的验证支持，还显著推动了外科教育的发展。Raison等^[19]通过精心设计的随机对照试验，深入比较了程序性VR模拟训练与基础VR模拟训练在机器人手术技能培训中的效果。该研究纳入了26名无机器人手术经验的初学者，并随机分配他们为程序性VR培训组和基础VR培训组。程序性VR培训组的参与者主要接受结构化的程序性VR培训，使用RobotiX Mentor机器人辅助前列腺切除术(robot-assisted radical prostatectomy, RARP)模块，完成膀胱颈解剖(bladder neck dissection, BND)和尿道膀胱吻合(urethrovesical anastomosis, UVA)等具体的手术任务。这些参与者在5周内进行了1h的指导性BND和UVA任务训练，训练过程中得到了专家机器人外科医生的即时培训和指导。相比之下，基础VR培训组的参与者则接受的是更多地侧重于如手腕操作、抓取、三维视觉、灵巧度、组织处理、器械控制和摄像

头控制等基础手术技能的培训。培训结束后，所有参与者通过模拟器数据来分析学习曲线，并使用新鲜冷冻尸体进行技能转移评估。此外，还招募了9名未接受任何机器人技能培训的新手参与者作为对照组。研究结果显示，两种VR培训均有效地提升了技术技能，尤其是程序性VR培训组在全球吻合口破裂评估评分(global evaluation of anastomotic rupture score, GEARS)上表现更为出色，显著提高了评分，预示着其在高级外科技能培训中的巨大潜力。

此外，Fotouhi等^[20]创新性地提出了一种基于头戴显示器(head-mounted display, HMD)的AR系统，该系统聚焦于优化手术机器人臂的配置过程。通过HMD，外科医生能够实时将实际机器人机械臂与预设的虚拟模型进行精准对齐，利用反射式AR技术从多角度同步展示增强内容，创造出一种沉浸式的多视角AR体验，极大地促进了虚拟与实体之间的直观匹配。试验数据表明，相较于传统方法，该系统在机器人臂的虚拟与实体对齐方面实现了显著改进，对于提升手术操作的效率和精确度具有里程碑式的意义。

在国际外科教育的前沿，SimLife模拟模型^[21-24]的引入更是为复杂手术技能的培训开辟了新纪元。该模型通过先进的血液灌注与人工通气技术，成功模拟了人体的血液循环搏动与呼吸运动，为住院医师提供了一个高度仿真且贴近真实手术环境的训练平台。借助该平台，学员不仅能够有效提升外科手术技能，还能在模拟实战中逐步克服实际操作中可能遭遇的心理压力与焦虑情绪。此外，随着三维打印技术的飞速进步，合成器官模型在机器人手术训练领域的应用也迎来了突破性进展。特别是在泌尿外科的机器人手术培训中，一种经过严格验证且具备高度成本效益的高仿真程序模型应运而生。这类模型不仅精准复制了目标器官的结构与特性，还能够在多种手术场景中模拟复杂的操作环境，可为受训者提供前所未有的训练体验^[25]。这一创新不仅标志着机器人手术教育模式的重大转型，也预示着数字模型和合成器官模型将逐步成为未来培训的主流趋势。因此，我们有理由相信，这些技术的融合将为未来的培训模式带来革新，通过不断完善其独特优势，最终减少乃至完全取代动物模型的使用^[26]。

5 结语

可以预见，达芬奇手术机器人的培训模式将不断迈向高科技与人性化的新高度。鉴于VR、AR，以及

人工智能等尖端技术的快速发展,未来的培训将有望为医生提供更加逼真、个性化的操作体验,从而有效减少对实验动物的依赖。这种转变不仅体现了科技进步对医学教育的深刻影响,也符合现代医学教育对效率和伦理的双重追求。同时,远程培训和在线协作平台的建立,将进一步打破地域限制,促进全球范围内医学知识和技能的交流。此外,随着伦理法规的完善和社会公众对动物福利关注度的不断提高,我们有理由相信,在科技、法规和公众意识的共同推动下,未来的医学教育将迎来更加美好的明天。

[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海军军医大学第一附属医院(上海长海医院)伦理委员会审查批准[CHec(A.E)2023-012]。所有实验过程均遵照中国实验动物相关法律法规条例要求进行。

All animal experiments involved in this study have been reviewed and approved by the Ethics Committee of the First Affiliated Hospital of Naval Medical University (Changhai Hospital, Shanghai) [CHec(A.E)2023-012]. All experimental procedures were carried out in accordance with the relevant laws and regulations on experimental animals in China.

[作者贡献 Author Contribution]

刘意抒负责初稿写作,以及全文修改;
蔡丽萍负责写作指导和定稿。

[利益声明 Declaration of Interest]

所有作者均声明本文不存在利益冲突。

[参考文献 References]

- [1] BEN-OR S, NIFONG L W, JR CHITWOOD W R. Robotic surgical training[J]. *Cancer J*, 2013, 19(2):120-123. DOI: 10.1097/PPO.0b013e3182894887.
- [2] RIVERO-MORENO Y, ECHEVARRIA S, VIDAL-VALDERRAMA C, et al. Robotic surgery: a comprehensive review of the literature and current trends[J]. *Cureus*, 2023, 15(7): e42370. DOI: 10.7759/cureus.42370.
- [3] BRESLER L, PEREZ M, HUBERT J, et al. Residency training in robotic surgery: the role of simulation[J]. *J Visc Surg*, 2020, 157(3): S123-S129. DOI: 10.1016/j.jviscsurg.2020.03.006.
- [4] FISHER R A, DASGUPTA P, MOTTRIE A, et al. An over-view of robot assisted surgery curricula and the status of their validation[J]. *Int J Surg*, 2015, 13: 115-123. DOI: 10.1016/j.ijsu.2014.11.033.
- [5] BUFFI N, VAN DER POEL H, GUAZZONI G, et al. Methods and priorities of robotic surgery training program[J]. *Eur Urol*, 2014, 65(1):1-2. DOI: 10.1016/j.eururo.2013.07.020.
- [6] MUKHERJEE P, ROY S, GHOSH D, et al. Role of animal models in biomedical research: a review[J]. *Lab Anim Res*, 2022, 38(1):18. DOI: 10.1186/s42826-022-00128-1.
- [7] RAISON N, POULSEN J, ABE T, et al. An evaluation of live porcine simulation training for robotic surgery[J]. *J Robot Surg*, 2021, 15(3):429-434. DOI: 10.1007/s11701-020-01113-3.
- [8] Intuitive Surgical, Inc. Intuitive announces preliminary fourth quarter and full year 2023 results[EB/OL]. (2024-01-09)[2024-04-10]. <https://investor.intuitivesurgical.com/news-releases/news-release-details/intuitive-announces-preliminary-fourth-quarter-and-full-year-3>.
- [9] NASSER KOTBY M, WAHBA H A, KAMAL E, et al. Animal model for training and improvement of the surgical skills in endolaryngeal microsurgery[J]. *J Voice*, 2012, 26(3): 351-357. DOI: 10.1016/j.jvoice.2011.04.002.
- [10] 李建萍, 刘意抒, 蔡丽萍, 等. 达芬奇手术机器人国际培训中心建设[J]. *解放军医院管理杂志*, 2017, 24(12):1156-1158. DOI: 10.16770/J.cnki.1008-9985.2017.12.016.
- [10] LI J P, LIU Y S, CAI L P, et al. Construction of the da vinci surgical robot international training center[J]. *Hosp Adm J Chin People's Liberation Army*, 2017, 24(12):1156-1158. DOI: 10.16770/J.cnki.1008-9985.2017.12.016.
- [11] WALTERS E M, WELLS K D, BRYDA E C, et al. Swine models, genomic tools and services to enhance our understanding of human health and diseases[J]. *Lab Anim*, 2017, 46(4):167-172. DOI: 10.1038/labani.1215.
- [12] WANG Y, CHEN G, PAN D, et al. Pig-to-human kidney xenotransplants using genetically modified minipigs[J]. *Cell Rep Med*, 2024, 5(10): 101744. DOI: 10.1016/J.XCRM. 2024. 101744.
- [13] TIONG H Y, GOH B Y S, CHIONG E, et al. Robotic kidney autotransplantation in a porcine model: a procedure-specific training platform for the simulation of robotic intracorporeal vascular anastomosis[J]. *J Robot Surg*, 2018, 12(4): 693-698. DOI: 10.1007/s11701-018-0806-5.
- [14] KAJIWARA N, KAKIHANA M, USUDA J, et al. Training in robotic surgery using the da Vinci® surgical system for left pneumonectomy and lymph node dissection in an animal model[J]. *Ann Thorac Cardiovasc Surg*, 2011, 17(5): 446-453. DOI: 10.5761/atcs.oa.10.01613.
- [15] KASABWALA K, GOUELI R, CULLIGAN P J. A live porcine model for robotic sacrocolpopexy training[J]. *Int Urogynecol J*, 2019, 30(8):1371-1375. DOI: 10.1007/s00192-019-03936-7.
- [16] LI D W, LIU Z X, ZANG Y, et al. Video laryngoscope-guided urethral catheterization in female minipigs[J]. *Lab Anim*, 2022, 56(5):446-453. DOI: 10.1177/00236772221092933.
- [17] 刘意抒, 赵善民, 蔡丽萍. 不同麻醉通气方法在胸外科微创手术培训中的应用与比较[J]. *实验动物与比较医学*, 2024, 44(1):97-104. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2023.135.
- [17] LIU Y S, ZHAO S M, CAI L P. Application and comparison of different anesthetic ventilation methods in minimally invasive thoracic surgery training[J]. *Lab Anim Comp Med*, 2024, 44(1):97-104. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2023.135.
- [18] 贺争鸣, 陈洪岩, 陈振文, 等. 基于科研范式变革的实验动物资源创新发展[J]. *实验动物科学*, 2024, 41(1):84-88. DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2024.01.015.
- [18] HE Z M, CHEN H Y, CHEN Z W, et al. Reflection on the innovation and development of laboratory animal resources based on the transformation of scientific research paradigm [J]. *Lab Anim Sci*, 2024, 41(1):84-88. DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2024.01.015.
- [19] RAISON N, HARRISON P, ABE T, et al. Procedural virtual reality simulation training for robotic surgery: a randomised controlled trial[J]. *Surg Endosc*, 2021, 35(12): 6897-6902. DOI: 10.1007/s00464-020-08197-w.
- [20] FOTOUHI J, SONG T Y, MEHRFARD A, et al. Reflective-AR

display: an interaction methodology for virtual-to-real alignment in medical robotics[J]. IEEE Robot Autom Lett, 2020, 5(2):2722-2729. DOI: 10.1109/LRA.2020.2972831.

[21] CULLIGAN P, GURSHUMOV E, LEWIS C, et al. Predictive validity of a training protocol using a robotic surgery simulator[J]. Female Pelvic Med Reconstr Surg, 2014, 20(1):48-51. DOI: 10.1097/SPV.0000000000000045.

[22] DELPECH P O, DANION J, ORIOT D, et al. SimLife a new model of simulation using a pulsated revascularized and ventilated cadaver for surgical education[J]. J Visc Surg, 2017, 154(1):15-20. DOI: 10.1016/j.jviscsurg.2016.06.006.

[23] DANION J, BREQUE C, ORIOT D, et al. SimLife* technology in surgical training-a dynamic simulation model[J]. J Surg Surg, 2020, 157(3 Suppl 2): S117-S122. DOI: 10.1016/j.jviscsurg.2020.02.013.

[24] DANION J, DONATINI G, BREQUE C, et al. Bariatric surgical simulation: evaluation in a pilot study of SimLife, a new dynamic simulated body model[J]. Obes Surg, 2020, 30(11): 4352-4358. DOI: 10.1007/s11695-020-04829-1.

[25] COSTELLO D M, HUNTINGTON I, BURKE G, et al. A review of

simulation training and new 3D computer-generated synthetic organs for robotic surgery education[J]. J Robot Surg, 2022, 16(4):749-763. DOI: 10.1007/s11701-021-01302-8.

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

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

(收稿日期: 2024-05-29 修回日期: 2024-07-29)
(本文编辑: 张俊彦, 翟玉凤, 丁宇菁, 洪怡)

[引用本文]

刘意抒, 蔡丽萍. 实验猪在达芬奇手术机器人培训中的应用进展及挑战[J]. 实验动物与比较医学, 2024, 44(6): 667-674. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.075.

LIU Y S, CAI L P. Advances and challenges of using experimental pigs in Da Vinci surgical robot training[J]. Lab Anim Comp Med, 2024, 44(6): 667-674. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.075.

《实验动物与比较医学》2024年审稿专家致谢名单

- | | | | | | | |
|---------|---------|---------|----------|----------|----------|---------|
| 白玉(北京) | 白玉(河北) | 包晶晶(浙江) | 包义君(辽宁) | 卞勇(江苏) | 常亮堂(上海) | 常在(北京) |
| 陈傍柱(广东) | 陈方明(浙江) | 陈国元(上海) | 陈洪岩(黑龙江) | 陈鸿军(上海) | 陈民利(浙江) | 陈仁金(江苏) |
| 陈瑛(河北) | 陈真(上海) | 陈振文(北京) | 崔东红(上海) | 崔永春(北京) | 代解杰(云南) | 戴方伟(浙江) |
| 戴建军(上海) | 戴然然(上海) | 邸亚男(北京) | 丁玉强(上海) | 杜小燕(北京) | 杜旭光(北京) | 范薇(北京) |
| 冯洁(上海) | 付瑞(北京) | 傅江南(广东) | 富群华(上海) | 高彩霞(黑龙江) | 高静(上海) | 高苒(北京) |
| 高巍(吉林) | 葛良鹏(重庆) | 葛龙(甘肃) | 官建中(安徽) | 郭连香(江苏) | 郭喻(湖北) | 韩利文(山东) |
| 韩凌霞(上海) | 韩新巍(河南) | 郝智慧(北京) | 何国栋(上海) | 何远清(江苏) | 和占龙(云南) | 贺争鸣(北京) |
| 黄冰(广东) | 黄朝晖(江苏) | 黄镇(福建) | 季樱红(上海) | 贾六军(北京) | 江振洲(江苏) | 金帆(浙江) |
| 邝高艳(湖南) | 邝少松(广东) | 赖国旗(重庆) | 郎廷元(重庆) | 李洪涛(广东) | 李秦(北京) | 李善刚(云南) |
| 李顺(上海) | 李文德(广东) | 李新华(山东) | 李秀(江苏) | 李垚(上海) | 李自发(山东) | 林惠然(深圳) |
| 林金杏(上海) | 刘恩岐(陕西) | 刘吉宏(上海) | 刘晓宇(北京) | 刘燕萍(四川) | 刘永刚(黑龙江) | 刘月环(浙江) |
| 刘云波(北京) | 刘真(上海) | 刘忠华(广东) | 卢晓(上海) | 卢选成(北京) | 陆尔奕(上海) | 陆益红(江苏) |
| 罗小泉(江西) | 吕龙宝(云南) | 麻彬(上海) | 孟长虹(江苏) | 孟庆刚(上海) | 牛廷献(甘肃) | 潘登科(四川) |
| 潘学营(上海) | 庞万勇(北京) | 庞晓斌(河南) | 彭长庚(上海) | 蒲小平(北京) | 蒲小燕(青海) | 权福实(吉林) |
| 饶军华(广东) | 师长宏(陕西) | 施爱民(江苏) | 史晓光(北京) | 宋春红(山东) | 宋国华(山西) | 宋宁宁(上海) |
| 宋晓明(上海) | 孙德明(北京) | 孙丽光(吉林) | 谭娟(上海) | 谭毅(重庆) | 汤静(上海) | 唐炜(上海) |
| 唐元家(上海) | 陶雨风(北京) | 陶元清(青海) | 田嘉军(四川) | 屠伟峰(江苏) | 王春霞(上海) | 王德军(浙江) |
| 王刚(广东) | 王贵平(江苏) | 王含必(北京) | 王健(上海) | 王可洲(山东) | 王守立(江苏) | 王爽洁(上海) |
| 王萧(广东) | 王宇(上海) | 王玉娥(重庆) | 王朝霞(上海) | 魏强(北京) | 吴宝金(上海) | 吴德国(北京) |
| 吴剑(上海) | 吴强(江苏) | 相磊(北京) | 肖君华(上海) | 谢家骏(上海) | 谢建芸(上海) | 谢淑武(上海) |
| 熊炜(上海) | 徐彭(江西) | 徐平(上海) | 徐汪节(上海) | 徐永君(福建) | 许彤辉(上海) | 薛整风(江苏) |
| 闫明霞(上海) | 杨斐(上海) | 杨利峰(北京) | 杨伟敏(上海) | 杨文(上海) | 杨晓辉(上海) | 杨玉琴(上海) |
| 姚明(上海) | 叶茂青(上海) | 应华忠(浙江) | 于士颜(上海) | 于艳(北京) | 于志锋(上海) | 余梅(上海) |
| 袁韩涛(上海) | 袁进(广东) | 袁晓龙(广东) | 岳秉飞(北京) | 张超超(上海) | 张董晓(北京) | 张海丛(河北) |
| 张厚森(江苏) | 张评浒(江苏) | 张泉(江苏) | 张涛(北京) | 张笑人(广东) | 张璇(上海) | 张周(上海) |
| 赵静(江苏) | 赵彦光(上海) | 赵勇(上海) | 郑和平(福建) | 郑茂恩(山东) | 周聪颖(上海) | 周晓辉(上海) |
| 周正宇(江苏) | 朱德生(北京) | 朱佳蕾(上海) | 朱顺星(江苏) | 朱彦兵(北京) | 朱焰(上海) | 庄乐南(浙江) |
| 卓振建(广东) | 邹洪(上海) | | | | | |

(以拼音字母排序)

6种复合固定液对金黄仓鼠视网膜组织固定效果的比较

吴海凤, 周小江, 李晨江, 李怀银, 高明

(兰州生物制品研究所有限责任公司, 甘肃省疫苗工程技术研究中心, 兰州 730046)

[摘要] **目的** 比较6种复合固定液对金黄仓鼠视网膜组织石蜡切片的影响, 优化金黄仓鼠视网膜组织石蜡切片的固定方法。**方法** 取18只雄性SPF级金黄仓鼠, 随机分为6组, 每组3只。每只动物经腹腔注射戊巴比妥钠麻醉后, 分别使用4%多聚甲醛、Bouin's、Carnoy、Davidson's、Zenker和Helly固定液进行心脏灌注固定。将每只动物的眼球组织取出后制作眼杯, 并投入对应的复合固定液中固定, 48 h后取出进行石蜡包埋, 并将包埋块在切片机上切片, 然后进行苏木精-伊红 (hematoxylin and eosin, HE) 染色。在光学显微镜下观察视网膜组织细胞的形态学特征并进行双盲法评分, 统计分析各种复合固定液的固定效果和染色质量。**结果** Davidson's固定液固定后的切片中, 视网膜完整无断裂, 各层结构清晰, 细胞核形态良好, 视网膜与巩膜、葡萄膜连接紧密; 4%多聚甲醛、Bouin's和Carnoy固定液固定的切片中均有不同程度的视网膜断裂以及视网膜与巩膜脱离现象; Zenker和Helly固定液固定后的切片质量最差, 视网膜组织脱落明显, 裂隙大, 各层细胞不清晰, 染色淡。对视网膜细胞形态特征进行双盲法评分后, SPSS 27.0软件分析结果显示: 6种固定液的平均得分差异有统计学意义 ($P < 0.001$), 其中Davidson's固定液 > 4%多聚甲醛 > Bouin's固定液 > Carnoy固定液 > Helly固定液 > Zenker固定液; Zenker固定液和Helly固定液与其他4种试剂的平均得分相比均有显著差异 ($P < 0.001$), 其他试剂之间两两相比无明显差异 ($P > 0.05$)。**结论** Davidson's固定液染色效果最佳, 4%多聚甲醛和Bouin's固定液染色效果次之, Carnoy固定液染色效果较差, Zenker固定液和Helly固定液染色效果最差。据此提示, 金黄仓鼠视网膜组织的固定首选Davidson's固定液, 其次为4%多聚甲醛、Bouin's和Carnoy固定液。

[关键词] 固定液; 金黄仓鼠; 视网膜; 石蜡切片

[中图分类号] R774; Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2024)06-0675-07



Comparison of the Fixation Effects of Six Composite Fixatives on Retinal Tissue of Golden Hamsters

WU Haifeng, ZHOU Xiaojiang, LI Chenjiang, LI Huaiyin, GAO Ming

(Lanzhou Institute of Biological Products Co., Ltd., Gansu Vaccine Engineering Technology Research Center, Lanzhou 730046, China)

Correspondence to: GAO Ming (ORCID: 0009-0003-2618-6587), E-mail: gaominglss@163.com

[ABSTRACT] **Objective** To compare the effects of six composite fixatives on paraffin sections of golden hamster retinal tissue, and to optimize the fixation methods for retinal tissue paraffin sections of golden hamsters. **Methods** Eighteen male SPF grade golden hamsters were taken and randomly divided into six groups of three animals each. After each animal was anesthetized by intraperitoneal injection of sodium pentobarbital, cardiac perfusion was performed using 4% paraformaldehyde, Bouin's, Carnoy, Davidson's, Zenker, and Helly fixatives, respectively. The eye tissues of each animal were taken out to make eye cups and put into the corresponding compound fixative solution for fixation, and then taken out for paraffin embedding after 48 h. The embedded blocks were sliced using microtome, and then stained with hematoxylin and eosin (HE). The morphological characteristics of retinal tissue cells were observed under a light microscope and scored in a double-blind method to statistically analyze the fixation effect and staining quality of various composite fixative solutions. **Results** Retinal sections fixed with Davidson's fixative exhibited intact morphology without breaks, clear structural layers, well-morphosed nuclei, and

[第一作者] 吴海凤 (1977—), 女, 硕士, 医学生物工程师, 研究方向: 实验动物病理检测。E-mail: 1092999471@qq.com

[通信作者] 高明 (1992—), 男, 助理研究员, 研究方向: 实验动物学。E-mail: gaominglss@163.com。ORCID: 0009-0003-2618-6587

tight adhesion between the retina, sclera, and uvea. In contrast, sections fixed with 4% paraformaldehyde, Bouin's, and Carnoy fixatives showed varying degrees of retinal breaks and detachment from the sclera. Sections fixed with Zenker and Helly fixatives demonstrated the poorest quality, characterized by pronounced detachment, large fissures, unclear cell layers, and pale staining. Statistical analysis using SPSS 27.0 software revealed significant differences in mean scores among the six fixatives ($P < 0.001$). The fixation quality ranking was as follows: Davidson's fixative > 4% paraformaldehyde > Bouin's fixative > Carnoy fixative > Helly fixative > Zenker fixative. Zenker and Helly fixatives showed significantly lower scores than the other fixatives ($P < 0.001$), while no significant differences were observed among the remaining fixatives ($P > 0.05$). **Conclusion** Davidson's fixative provides the best fixation and staining results, followed by 4% paraformaldehyde and Bouin's fixative. Carnoy fixative exhibits suboptimal performance, while Zenker and Helly fixatives result in the poorest outcomes. Therefore, Davidson's fixative is recommended as the optimal fixative for golden hamster retinal tissue, with 4% paraformaldehyde, Bouin's and Carnoy fixatives as alternative options.

[Key words] Fixative solution; Golden hamster; Retinal; Paraffin section

实验动物视网膜组织被广泛用于眼科相关疾病的实验研究^[1-7]。眼球壁结构分为3层，外层为角膜和巩膜；中层为葡萄膜，包括虹膜、睫状体和脉络膜；内层为视网膜。由于眼球中空且构造复杂，各部分组织结构差异较大，各层间连接性差，容易发生视网膜脱离，导致病理切片的制作难度较高。近年来，研究人员对不同实验动物视网膜石蜡切片的制作技术进行了改良^[8-9]。而关于金黄仓鼠眼球视网膜石蜡切片的研究却鲜有报告。

固定液是制备病理切片的关键因素。在进行眼球固定和脱水的过程中，由于高度分化的视网膜层与外部的纤维血管膜对固定液的渗透程度不同，引起组织收缩的程度也不同，容易导致视网膜各层分离脱落，其中最易发生脱离的是视网膜神经上皮层和色素上皮层^[10-11]。另外由于眼球各结构的软硬度不同，在石蜡切片标本的制作过程中极易发生组织碎裂、细胞变形、组织皱缩、脱水不完全，甚至出现裂隙等现象，这些现象的出现导致眼球视网膜石蜡切片的质量下降，进而不利于后期的组织学研究。本研究通过苏木精-伊红(hematoxylin and eosin, HE)染色，比较6种不同固定液对金黄仓鼠视网膜组织形态结构的影响，以筛选适合金黄仓鼠视网膜组织的最佳固定液。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF级雄性金黄仓鼠18只，分为6组，每组3只，均为11周龄，由兰州生物制品研究所有限责任公司[SCXK(甘)2023-0001]提供，质量合格证号为0002809；动物在兰州生物制品研究所有限责任公司的屏障环境设施[SYXK(甘)2023-0001]中饲养，温

度为20~26℃，相对湿度为30%~70%，噪声≤60 dB(A)，其他条件均符合实验动物饲养环境的国家标准要求。本实验通过兰州生物制品研究所有限责任公司实验动物管理和使用委员会审查(批准文号：IACUC-LIBP-202402003)。

1.2 仪器与试剂

分体组织包埋机(型号AP250)和旋转式切片机(型号HM360)均购自美康仪器设备(北京)有限公司；生物显微镜(型号CX33)购自仪景通光学科技有限公司；高效切片石蜡(批号20230416)、二甲苯(批号20231116)均购自国药集团化学试剂有限公司；苏木精和伊红染色液试剂盒(批号20230304)购自南京森贝伽生物科技有限公司；无水乙醇(批号20231213)购自昆山金城试剂有限公司；质量分数为4%的多聚甲醛固定液(批号20230725)、Bouin's固定液(批号20240221)、Zenker固定液(批号20240205)、Helly固定液(批号20240225)、Carnoy固定液(批号20240129)和Davidson's固定液(批号20231206)均购自福州飞净生物科技有限公司；戊巴比妥钠(编号57-33-0)购自德国Merck公司。

1.3 取材固定

先用4%戊巴比妥钠溶液经腹腔注射麻醉金黄仓鼠，随后在其右心耳处剪一小切口，用生理盐水置换血液，接着向各组金黄仓鼠中分别推注4%多聚甲醛、Bouin's、Carnoy、Davidson's、Zenker和Helly固定液，若观察到金黄仓鼠下肢抽动及尾巴摆动，表明心脏灌注成功。待金黄仓鼠眼球变苍白、质地变硬后，将其眼球取下并置于相应的固定液中。30 min后，从固定液中取出眼球并剪去角膜组织、剥出晶状体、制作眼杯后，投入原固定液中固定48 h。

1.4 HE染色

取出固定好的眼球组织经乙醇溶液梯度脱水、HE染色、二甲苯透明、浸蜡包埋后切片。将切片用二甲苯（I、II、III）脱蜡、下行梯度乙醇溶液脱水后，分别经苏木精染色、流水冲洗，1%盐酸乙醇分色、流水冲洗，蓝化液蓝化、流水冲洗，然后经伊红染色和上行梯度乙醇溶液脱水，最后经二甲苯（I、II）透明处理，用中性树脂封固，并置于光学显微镜下观察。

1.5 结果观察

在光学显微镜下分别取4倍、10倍和40倍视野观察HE染色效果，并对切片染色结果进行双盲法评分。视网膜完整度及各层结构排列：无断裂、完整无脱落，排列整齐、紧密，记为5分；较少断裂、脱落松散、很多裂隙，结构较模糊、松散，根据程度不同可记为2~4分；破碎、脱片，结构模糊、消失，记为0分。视网膜结构清晰度及各层连接：清晰，连接紧密，记为5分；不同程度的不清晰及裂隙，记为2~4分；模糊，完全脱离，记为0分。视网膜各层染色及细胞质染色强度：鲜艳，清晰，记为5分；不同程度淡染，记为2~4分；模糊，记为0分。细胞核形态：良好，记为5分；较模糊，记为2~4分；固缩不清，记为0分。细胞间紧密程度：整齐无裂隙，记为5分；不同

程度松散，记为2~4分；裂隙较多，记为0分。单项满分为5分，最低为0分；5项检查合计满分为25分，若所有项都不合格则记为0分。

1.6 统计学方法

采用SPSS 27.0软件进行统计学处理，评分数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，多组间比较采用单因素方差分析，组内两两比较采用SNK-*q*检验法，以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 低倍镜下观察视网膜完整性

在4倍光学显微镜下观察使用不同固定液处理后的HE染色结果，如表1和图1所示：经4%多聚甲醛固定的切片中，视网膜完整无断裂，各层结构清晰平整（图1A）；经Bouin's固定液固定的切片中，视网膜发生断裂，各层细胞尚清晰（图1B）；经Carnoy固定液固定的切片中，视网膜无断裂，各层结构变薄，层次不分明（图1C）；经Davidson's固定液固定的切片中，视网膜结构完整清晰，各层排列整齐（图1D）；经Helly固定液固定的切片中，视网膜有断裂，各层细胞不清晰，染色淡（图1E）；经Zenker固定液固定的切片中，视网膜组织脱落明显，视网膜完整性消失（图1F）。

表1 低倍镜下观察使用6种固定液后金黄仓鼠视网膜组织的HE染色效果比较

Table 1 Comparison of HE staining effects on retinal tissue of golden hamsters fixed with six fixatives under low magnification

固定液种类 Types of fixative	视网膜完整度 Integrity of the retina	视网膜各层结构排列 Uniformity of each layer of the retina	视网膜结构清晰度 Retinal structural resolution	视网膜各层染色 Staining of each layer of the retina	视网膜各层连接 Connection of retinal layers
4%多聚甲醛 4% paraformaldehyde	完整无断裂	整齐	清晰	鲜艳	紧密
Bouin's固定液 Bouin's fixative	断裂较多	较整齐	清晰	鲜艳	紧密
Zenker固定液 Zenker fixative	破碎、脱片	各层结构消失	不清晰	淡染	完全脱离
Helly固定液 Helly fixative	较少断裂	结构模糊	模糊	模糊	完全脱离
Carnoy固定液 Carnoy fixative	完整无断裂	紧密，结构不清	不清晰	鲜艳	紧密
Davidson's固定液 Davidson's fixative	完整无断裂	结构整齐	清晰	鲜艳	较多裂隙

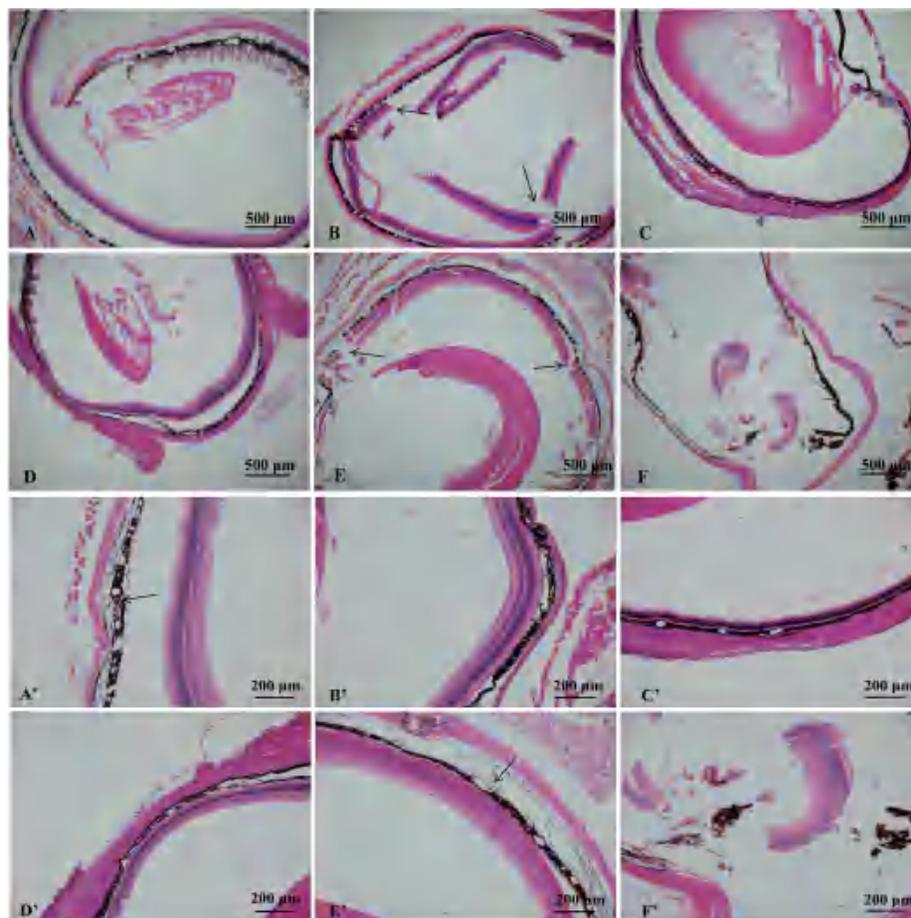
2.2 低倍镜下观察视网膜与巩膜、葡萄膜等各层组织的连接情况

在10倍光学显微镜下观察使用不同固定液的HE

染色结果，如图1所示：经4%多聚甲醛固定的切片中，视网膜与巩膜、葡萄膜裂隙较大，视网膜与巩膜脱离（图1A'）；经Bouin's固定液固定的切片中，视

网膜与巩膜、葡萄膜连接紧密(图1B');经Carnoy固定液固定的切片中,视网膜、巩膜、葡萄膜收缩变薄,紧贴在一起,层次不清(图1C');经Davidson's固定液固定的切片中,视网膜与巩膜、葡萄膜连接紧

密,无裂隙,层次清晰(图1D');经Helly固定液固定的切片中,巩膜与葡萄膜分离,裂隙较大(图1E');经Zenker固定液固定的切片中,各层组织脱离,呈碎片状(图1F')。



注: A和A', 使用4%多聚甲醛固定液(A'图中箭头所示为视网膜与巩膜、葡萄膜之间裂隙较大); B和B', 使用Bouin's固定液(B图中箭头所示为多处断裂); C和C', 使用Carnoy固定液; D和D', 使用Davidson's固定液; E和E', 使用Helly固定液(E图中箭头所示为断裂, E'图中箭头所示为巩膜与葡萄膜分离); F和F', 使用Zenker固定液。A~F图中比例尺为500 μm; A'~F'图中比例尺为200 μm。

Note: A and A', fixed with 4% paraformaldehyde (the arrow in fig A' shows a large fissure between the retina and the sclera and the uvea); B and B', fixed with Bouin's fixative (multiple breaks shown by arrows in fig B); C and C', fixed with Carnoy fixative; D and D', fixed with Davidson's fixative; E and E', fixed with Helly fixative (the arrow in fig E shows breaks, while the arrow in the fig E' shows the separation between the sclera and the uvea); F and F', fixed with Zenker fixative. The scale bar=500 μm(A-F) or 200 μm(A'-F').

图1 低倍镜下观察使用不同固定液后的金黄仓鼠视网膜切片HE染色结果

Figure 1 HE staining results of retinal sections of golden hamsters fixed with different fixatives under low magnification

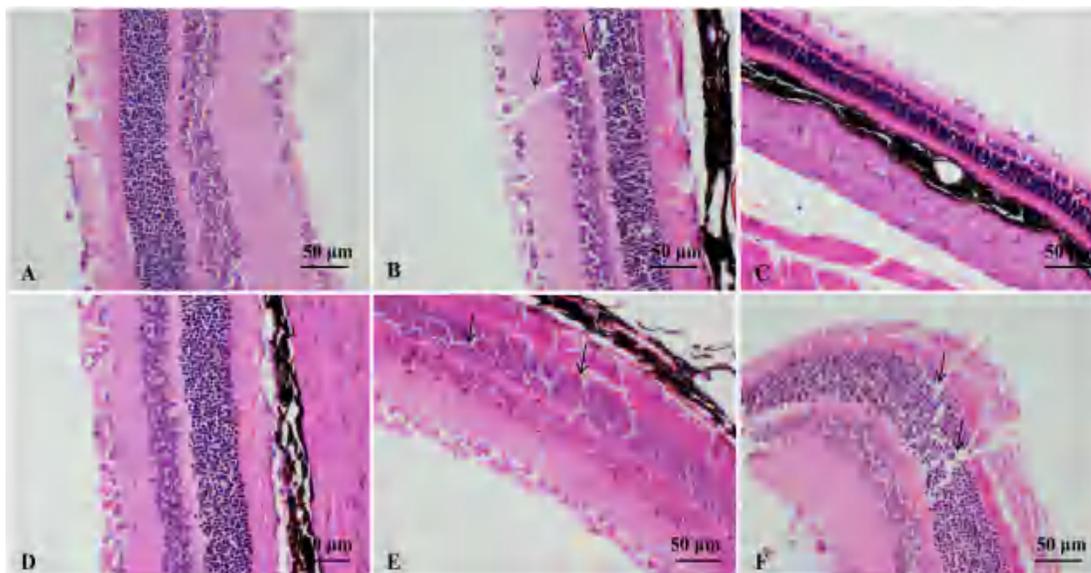
2.3 高倍镜下观察视网膜各层细胞结构

在40倍光学显微镜下观察使用不同固定液的HE染色结果,如图2和表2所示:经4%多聚甲醛固定的切片中,视网膜各层结构清晰,细胞排列整齐无裂隙,细胞核形态良好(图2A);经Bouin's固定液固定的切片中,视网膜各层结构清晰,视网膜内核层可见明显的空白裂隙,细胞核形态良好(图2B);经Carnoy固定液固定的切片中,视网膜各层收缩,视网膜内核层细胞核固缩,各层结构不清晰(图2C);经Davidson's

固定液固定的切片中,视网膜各层结构清晰,细胞排列整齐无裂隙,细胞核形态良好(图2D);经Zenker固定液固定的切片中,视网膜各层结构松散,裂隙较多,染色较淡(图2E);经Helly固定液固定的切片中,视网膜各层结构模糊,细胞核细胞质染色淡,裂隙较多(图2F)。

2.4 视网膜切片的染色结果评分

采用双盲法对不同固定液的HE染色结果评分,结果如表3所示。6种固定液处理的视网膜切片HE染色



注：A，使用4%多聚甲醛；B，使用Bouin's固定液；C，使用Carnoy固定液；D，使用Davidson's固定液；E，使用Helly固定液；F，使用Zenker固定液；箭头所示为裂隙。图中比例尺为50 μm 。

Note: fixed with 4% paraformaldehyde; B, fixed with Bouin's fixative; C, fixed with Carnoy fixative; D, fixed with Davidson's fixative; E, fixed with Helly fixative; F, fixed with Zenker fixative. The fissures are indicated by arrows. The scale bar=50 μm .

图2 高倍镜下观察使用不同固定液后的金黄仓鼠视网膜切片HE染色结果

Figure 2 HE staining results of retinal sections of golden hamsters fixed with different fixatives under high magnification

表2 高倍镜下观察使用6种固定液后金黄仓鼠视网膜组织HE染色效果的比较

Table 2 Comparison of HE staining effects on retinal tissue of golden hamsters fixed with six fixatives under high magnification

固定液种类 Types of fixative	视网膜完整度 Integrity of retina	视网膜各层结构排列 Uniformity of each layer of the retina	细胞核形态 Nuclear morphology	细胞间紧密程度 Degree of intercellular tightness	细胞质染色强度 Cytoplasmic staining intensity
4%多聚甲醛 4% paraformaldehyde	完整无脱落	松散	良好	整齐无裂隙	清晰
Bouin's固定液 Bouin's fixative	完整无脱落	紧密	较好	松散	清晰
Zenker固定液 Zenker fixative	脱落松散	松散	基本正常	裂隙较多	较淡
Helly固定液 Helly fixative	很多裂隙	消失	模糊	裂隙较多	模糊
Carnoy固定液 Carnoy fixative	较完整	消失	固缩,不清	松散	模糊
Davidson's固定液 Davidson's fixative	完整	紧密	良好	整齐无裂隙	清晰

平均得分差异均具有统计学意义 ($P < 0.001$), 评分由高到低依次为 Davidson's 固定液 (20.63 ± 3.18) > 4%多聚甲醛 (20.13 ± 1.19) > Bouin's 固定液 (19.62 ± 0.26) > Carnoy 固定液 (14.13 ± 2.25) > Helly 固定液 (6.63 ± 3.06) > Zenker 固定液 (5.38 ± 3.93)。SNK- q 检验法两两比较显示, Helly 组和 Zenker 组与其他 4 组的平均得分相比均有显著差异 ($P < 0.001$), 其他组两两

相比的差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

3 讨论

制作视网膜病理切片不但可以用于评估视网膜的结构功能, 而且对探究疾病机制具有重要意义。由于视网膜结构的特殊性, 制作石蜡切片时较难保持其完整的形态结构^[12]。笔者在以往的石蜡切片制作过程中

发现, 固定液选择不当容易造成视网膜各层组织收缩、组织层间脱离以及切片出现裂隙等问题。也有研究报告指出固定液是影响制片效果的重要因素之一^[13]。

4%多聚甲醛固定液主要由多聚甲醛和磷酸盐组成, 具有配制简单和操作方便的特点, 是实验室常用的固定液^[14]。4%多聚甲醛固定液同时具有渗透力强、固定均匀、收缩组织和损伤较少等优点, 能较好地保护组织和细胞的形态结构^[15]。因此, 4%多聚甲醛固定液适用于多种组织的固定, 包括脑组织、肝组织等大组织, 在眼科实验研究中也用于小鼠和大鼠眼球的固定^[16]。本研究发现, 经4%多聚甲醛固定液固定的视网膜各层组织清晰完整, 但是视网膜与巩膜、葡萄膜之间的裂隙较大, 且视网膜与巩膜脱离, 这和宋惠欣等^[17]的研究结果一致, 说明4%多聚甲醛固定液作为视网膜石蜡切片标本固定液的效果并不理想。

Bouin's 固定液是由甲醛、苦味酸和醋酸按一定比例混合而成。其中, 苦味酸对坚韧组织有软化作用^[18]。醋酸可抑制细菌和酶的活性, 防止自溶, 但其缺点是组织膨胀较明显, 对于胶原纤维与纤维蛋白尤其明显。苦味酸和醋酸配合使用能很好地保存组织结构, 其组织渗透性强且渗透速度快而均匀, 组织收缩幅度小, 不容易出现组织变脆现象^[19]。本研究结果显示, 使用 Bouin's 固定液固定的视网膜各层组织断裂明显, 视网膜各层结构清晰, 视网膜内核层有明显的空白裂隙, 细胞核形态良好。

相比于 Bouin's 固定液, Davidson's 固定液是一种快速固定液, 组织放入后会快速变白并呈不透明状。Davidson's 固定液是由4%甲醛溶液、冰醋酸、95%乙醇及蒸馏水按比例配制而成。其中, 冰醋酸可使组织膨胀, 抵偿因乙醇、甲醛等固定液引起的组织收缩和硬化, 能较好地保存组织原有形态, 从而显示出清晰的结构^[20]。本研究结果显示, Davidson's 固定液在金黄仓鼠眼球视网膜石蜡切片中的固定效果良好; 切片 HE 染色结果显示, 眼球视网膜完整无断裂, 视网膜与巩膜、葡萄膜连接紧密, 视网膜各层结构清晰、无裂隙, 且细胞核形态良好。

Carnoy 固定液是由无水乙醇、三氯甲烷和冰醋酸按比例配制而成, 其中无水乙醇可固定细胞质, 冰醋酸用来固定染色质, 常用于糖原、尼氏体和肌纤维等的染色。光学显微镜下观察发现, 经 Carnoy 固定液固定的切片中视网膜各层组织收缩, 视网膜内核层细胞核固缩, 结构不清晰。

Zenker 固定液也是组织切片中常用的固定液, 它

由氯化汞、重铬酸钾、硫酸钠、蒸馏水和冰醋酸按比例配制而成。氯化汞使组织快速硬化, 对细胞核和细胞质有良好的固定作用, 并促进染色; 重铬酸钾常用于混合固定液中, 有助于组织染色。把 Zenker 固定液中的乙酸用甲醛饱和水溶液替代则为 Helly 固定液, 故 Helly 液又常被称为 Zenker-formol 固定液。这两种固定液的配制较复杂, 且固定后需去除组织内的重铬酸钾和“汞色素”, 步骤较繁琐。本实验发现经 Zenker 固定液和 Helly 固定液处理后制作的视网膜组织石蜡切片 HE 染色均不太好, 视网膜组织结构不清晰, 出现了不同程度的淡染色、断裂、各层组织脱落等问题。

综上所述, Davidson's 固定液能够保留完整的视网膜组织和细胞形态结构, 相较其他 5 种固定液而言, 更适合金黄仓鼠视网膜组织的固定; 4%多聚甲醛固定液和 Bouin's 固定液有相近的固定效果, 但会出现视网膜和巩膜脱离、视网膜断裂现象, 不建议作为首选。Carnoy、Zenker 和 Helly 固定液的染色效果差, 不适宜作为金黄仓鼠视网膜组织石蜡切片的固定剂。

【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兰州生物制品研究所有限责任公司实验动物管理和使用委员会审查(批准文号 IACUC-LIBP-202402003)。所有实验过程均遵照中国实验动物相关法律法规条例要求进行。

All the animal experiments involved in this study have been reviewed by the Laboratory Animal Management and Use Committee of Lanzhou Institute of Biological Products Limited Liability Company (Approval No. IACUC-LIBP-202402003). All the experimental procedures were carried out in accordance with the requirements of the relevant laws and regulations on laboratory animals in China.

【作者贡献 Author Contribution】

吴海凤负责实施研究并起草文章;

周小江负责方法设计;

李晨江负责数据统计分析, 并提供行政、技术或材料支持;

李怀银参与动物实验以及文章修改工作;

高明负责研究的监督指导及文稿修订。

【利益声明 Declaration of Interest】

所有作者均声明本文不存在利益冲突。

【参考文献 References】

- [1] 李娟娟, 陈晨, 张利伟, 等. 缺血-再灌注损伤鼠模型中视网膜微循环的结构损伤[J]. 中华实验眼科杂志, 2019, 37(1):5-9. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2019.01.002.
LI J J, CHEN C, ZHANG L W, et al. Structural changes of retinal microcirculation in mouse model of ischemia-reperfusion injury[J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2019, 37(1):5-9. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2019.01.002.
- [2] SANO H, NAMEKATA K, KIMURA A, et al. Differential effects

- of N-acetylcysteine on retinal degeneration in two mouse models of normal tension glaucoma[J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(2):75. DOI: 10.1038/s41419-019-1365-z.
- [3] STORM T, BURGOYNE T, DUNAIEF J L, et al. Selective ablation of megalin in the retinal pigment epithelium results in megaophthalmos, macromelanosome formation and severe retina degeneration[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2019, 60(1):322-330. DOI: 10.1167/iovs.18-25667.
- [4] 陈肖君, 林鑫, 于瑶瑶, 等. HUC-MSCs对视网膜挫伤大鼠的治疗作用[J]. *潍坊医学院学报*, 2020, 42(5):356-359. DOI: 10.16846/j.issn.1004-3101.2020.05.011.
- CHEN X J, LIN X, YU Y Y, et al. Therapeutic effect of HUC-MSCs in rat retinal contusion[J]. *Acta Acad Med Weifang*, 2020, 42(5):356-359. DOI: 10.16846/j.issn.1004-3101.2020.05.011.
- [5] 袁晨, 张梅, 谢学军. 血-视网膜内屏障体外模型构建研究进展[J]. *国际眼科杂志*, 2021, 21(6):991-995. DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2021.6.10.
- YUAN C, ZHANG M, XIE X J. Progress in the construction of inner blood retinal barrier model *in vitro*[J]. *Int Eye Sci*, 2021, 21(6):991-995. DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2021.6.10.
- [6] 张懿, 孙兴怀, 王中峰. 生长抑素对视网膜的生理调控及神经保护作用[J]. *中华实验眼科杂志*, 2021, 39(10):915-918. DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20191112-00492.
- ZHANG Y, SUN X H, WANG Z F. Physiological role and neuroprotective effects of somatostatin in retina[J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2021, 39(10): 915-918. DOI: 10.3760/cma. j. cn115989-20191112-00492.
- [7] 赵福新, 汪琪, 王莉, 等. *Vipr2* 敲除对小鼠视网膜功能的影响[J]. *中华眼视光学与视觉科学杂志*, 2022, 24(7):485-493. DOI: 10.3760/cma.j.cn115909-20210826-00342.
- ZHAO F X, WANG Q, WANG L, et al. The effect of *Vipr2* knockout on retinal function in mice[J]. *Chin J Optom Ophthalmol Vis Sci*, 2022, 24(7): 485-493. DOI: 10.3760/cma. j. cn115909-20210826-00342.
- [8] 罗灿娇, 莫木琼, 聂钊铭, 等. 比较5种混合固定液对小鼠眼球标本制片质量和染色效果的影响[J]. *中国卫生检验杂志*, 2015, 25(13):2065-2067.
- LUO C Q, MO M Q, NIE Z M, et al. Effect of 5 mixed stationary liquids on the mouse eyeball specimen sectioning and the staining quality[J]. *Chin J Health Lab Technol*, 2015, 25(13): 2065-2067.
- [9] 张云龙. 无醛混合固定液与甲醛固定液对大鼠器官组织检材形态学保存效果的比较研究[J]. *基层医学论坛*, 2020, 24(16):2223-2225. DOI: 10.19435/j.1672-1721.2020.016.002.
- ZHANG Y L. A comparative study on the morphological preservation effect of formaldehyde-free fixative and formaldehyde on tissue samples of rat organs[J]. *Med Forum*, 2020, 24(16):2223-2225. DOI: 10.19435/j.1672-1721.2020.016.002.
- [10] 高延娥, 杜秀娟, 董卫红, 等. 心脏灌注固定在大鼠视网膜石蜡切片中的应用[J]. *中国实用眼科杂志*, 2016, 34(10):1109-1111. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1006-4443.2016.10.019.
- GAO Y E, DU X J, DONG W H, et al. Application of cardiac perfusion fixation in rat retinal paraffin section[J]. *Chin J Pract Ophthalmol*, 2016, 34(10): 1109-1111. DOI: 10.3760/cma. j. issn. 1006-4443.2016.10.019.
- [11] 高洪彬, 林英, 宋向荣, 等. 四种固定液对小鼠视网膜固定效果的比较[J]. *临床与实验病理学杂志*, 2016, 32(3):352-353. DOI: 10.13315/j.cnki.cjcep.2016.03.032.
- GAO H B, LIN Y, SONG X R, et al. Comparison of the effects of four fixatives on retinal fixation in mice[J]. *Chin J Clin Exp Pathol*, 2016, 32(3): 352-353. DOI: 10.13315/j. cnki. cjcep. 2016. 03.032.
- [12] STRADLEIGH T W, ISHIDA A T. Fixation strategies for retinal immunohistochemistry[J]. *Prog Retin Eye Res*, 2015, 48:181-202. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2015.04.001.
- [13] LIU Y, EDWARD D P. Assessment of PAXgene fixation on preservation of morphology and nucleic acids in microdissected retina tissue[J]. *Curr Eye Res*, 2017, 42(1):104-110. DOI: 10.3109/02713683.2016.1146777.
- [14] BACZEWSKA M, EDER K, KETELHUT S, et al. Refractive index changes of cells and cellular compartments upon paraformaldehyde fixation acquired by tomographic phase microscopy[J]. *Cytometry A*, 2021, 99(4):388-398. DOI: 10.1002/cyto.a.24229.
- [15] MIKI M, OHISHI N, NAKAMURA E, et al. Improved fixation of the whole bodies of fish by a double-fixation method with formalin solution and Bouin's fluid or Davidson's fluid[J]. *J Toxicol Pathol*, 2018, 31(3):201-206. DOI: 10.1293/tox.2018-0001.
- [16] 孙自强, 王军, 陈明亮, 等. 小鼠眼球标本石蜡切片制作方法的改进[J]. *河南大学学报(医学版)*, 2015, 34(1):36-39.
- SUN Z Q, WANG J, CHEN M L, et al. Improved method for paraffin sections of mouse eyeball[J]. *J Henan Univ Med Sci*, 2015, 34(1):36-39.
- [17] 宋惠欣, 蒋文君, 毕宏生. 三种不同固定液对豚鼠眼球的固定效果比较[J]. *国际眼科杂志*, 2018, 18(6):1010-1013. DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2018.6.07.
- SONG H X, JIANG W J, BI H S. A comparative study on the effect of fixation for guinea pigs eyeballs among three different fixation solution[J]. *Int Eye Sci*, 2018, 18(6):1010-1013. DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2018.6.07.
- [18] SOUSA S, ROCHA M J, ROCHA E. Characterization and spatial relationships of the hepatic vascular-biliary tracts, and their associated pancreocytes and macrophages, in the model fish guppy (*Poecilia reticulata*): a study of serial sections by light microscopy[J]. *Tissue Cell*, 2018, 50:104-113. DOI: 10.1016/j.tice.2017.12.009.
- [19] WANG H, YANG L L, JI Y L, et al. Different fixative methods influence histological morphology and TUNEL staining in mouse testes[J]. *Reprod Toxicol*, 2016, 60:53-61. DOI: 10.1016/j.reprotox.2016.01.006.
- [20] LATENDRESSE J R, WARBRITTON A R, JONASSEN H, et al. Fixation of testes and eyes using a modified Davidson's fluid: comparison with bouin's fluid and conventional Davidson's fluid[J]. *Toxicol Pathol*, 2002, 30(4): 524-533. DOI: 10.1080/01926230290105721.

(收稿日期: 2024-03-28 修回日期: 2024-07-03)

(本文编辑: 张俊彦, 翟玉凤, 丁宇菁, 吴昊晟)

【引用本文】

吴海凤, 周小江, 李晨江, 等. 6种复合固定液对金黄仓鼠视网膜组织固定效果的比较[J]. *实验动物与比较医学*, 2024, 44(6): 675-681. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.049.

WU H F, ZHOU X J, LI C J, et al. Comparison of the fixation effects of six composite fixatives on retinal tissue of golden hamsters[J]. *Lab Anim Comp Med*, 2024, 44(6): 675-681. DOI: 10.12300/j.issn. 1674-5817.2024.049.

全过程动物实验伦理审查软件的设计与实现

徐 骁¹, 吴杰敏¹, 梁 翼², 叶明霞¹, 周顺长¹

(1. 华中科技大学实验动物中心, 武汉 430030; 2. 厦门抱壹智能科技有限公司, 厦门 361000)

[摘要] 探讨并优化高等院校实验动物机构在承担动物实验项目数量多, 实验类型复杂的情况下, 如何通过信息化手段提高动物伦理审查效率并确保监督质量。基于华中科技大学实验动物中心伦理审查的工作现状, 本文设计并开发了一套全过程伦理审查软件系统, 结合信息化手段以改进高等院校动物福利伦理的审查与监督机制。该系统运用“事前审批、事中监管、事后回顾”的全过程监管理念, 聚焦强化实验动物研究及使用计划审核与批准后监督环节。事前审批阶段, 系统优化了实验动物研究及使用计划审核中的指定成员审核流程, 确保所有动物实验项目都符合伦理标准和法律法规要求; 事中监管阶段, 由执行兽医进行兽医验证和咨询, 采取“线下巡查、线上记录”的方式开展监督; 事后回顾阶段, 要求研究者提供回顾性资料, 对实验过程进行回顾性评估。本文详细描述了本系统设计时考虑的功能需求、非功能需求及安全需求, 以及软件整体架构、业务流程设计、业务细节设计, 并展示了本系统上线以来的运行成效。同时, 对该系统的适用性和实用性进行了讨论, 分析了存在的不足和面临的挑战, 如实验紧迫性与审查严谨性的难以平衡, 批准后监管存在的溯源盲区等。后续研究将结合新技术、新方法, 继续提升动物福利伦理审查与监督的准确性和力度。

[关键词] 动物伦理福利; 伦理审查; 信息化; 软件设计; 全过程监管

[中图分类号] TP311; R-052 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2024)06-0682-09



Design and Implementation of a Software System for Full-Process Animal Experiment Ethical Review

XU Xiao¹, WU Jiemin¹, LIANG Yi², YE Mingxia¹, ZHOU Shunchang¹

(1. Laboratory Animal Center, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China; 2. Xiamen Baoyi Intelligent Technology Co., Ltd., Xiamen 361000, China)

Correspondence to: ZHOU Shunchang (ORCID: 0009-0001-2647-8294), E-mail: 1989020590@hust.edu.cn

[ABSTRACT] Institutions of higher education undertake a significant number of animal experiment projects with diverse types. To standardize animal experiments and ensure animal welfare, ethical review has become a core task for the Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) in these higher education institutions. A key issue worth exploring is how to improve the efficiency of animal ethical reviews while maintaining systematic quality of supervision. Based on the current status of ethical reviews at the Laboratory Animal Center of Huazhong University of Science and Technology, this paper designs and implements a full-process ethical review software system. This system seeks to offer solutions for the ethical review and supervision of animal welfare in institutions of higher education through information technology. The system employs a full-process supervision philosophy of "pre-approval, in-process supervision, post-review," focusing on strengthening the review and approval of animal research protocols, as well as post-approval monitoring. At the pre-approval stage, the system optimizes the process for designated members involved in the project review, ensuring that all projects comply with ethical standards and legal regulations. At the in-process stage, veterinary verification and consultation are carried out by executive veterinarians, using a method of "offline inspections and online records" for supervision. At the post-review stage, researchers are required to provide retrospective data to evaluate the experimental process. Additionally, this paper provides an in-depth exploration of the software, detailing its functional and non-functional requirements, as well as its security considerations. It also delves into the

[第一作者] 徐 骁 (1990—), 男, 硕士, 工程师, 研究方向: 实验动物设施管理。E-mail: xuxiaolac@hust.edu.cn

[通信作者] 周顺长 (1968—), 男, 硕士, 高级工程师, 研究方向: 兽医学。E-mail: 1989020590@hust.edu.cn。ORCID: 0009-0001-2647-8294

comprehensive software architecture, process design, and operational details. Furthermore, it illustrates the system's operational efficacy and impact since its launch. This paper discusses the software's applicability and practicality, analyzing existing limitations and challenges, such as the difficulty of balancing experiment urgency with the stringent nature of review processes, and the traceability blind spots in post-approval supervision. Future research will continue to enhance the accuracy and strength of animal welfare ethical reviews and supervision through new technologies and methods.

[Key words] Animal ethics and welfare; Ethical review; Informatization; Software design; Full-process monitoring

在以实验动物为研究对象的科学研究中, 伦理审查与评估必不可少, 其关系到动物实验过程的科学性、规范性、高效性, 也关系到动物实验结果的真实性与可重复性。为确保程序的规范性, 实验动物福利伦理审查工作应建立实验动物使用与管理委员会 (Institutional Animal Care and Use Committee, IACUC) 备案制度、年度工作报告和检查制度, 使伦理审查工作成效成为实验动物管理中的硬指标^[1]。尤其是高等院校的实验动物机构, 由于其承担的动物实验项目数量多且实验类型复杂, 因此, 在实际工作中, 伦理审查实际上已成为高校实验动物伦理委员会的核心工作职责之一。伦理审查工作, 至少应包括审核实验动物研究及使用计划 (animal protocol, AP) 和开展批准后监管 (post approval monitoring, PAM) 两部分。因此, 如何提高动物实验伦理审查效率、完善监督质量的系统性是值得研究的问题, 也是保障 IACUC 实现高效机构管理、人员管理、职业健康管理、生物安全管理的关键所在。运用信息化手段进行伦理审查, 能够实现审查流程的标准化和自动化, 还能加强数据分析与监管评估, 提高审查工作的透明度。

本文结合华中科技大学实验动物中心在伦理审查工作中实际面临的问题, 设计并开发了一套“事前审批、事中监管、事后回顾”的全过程伦理审查软件, 以改进高等院校动物福利伦理的审查与监督机制。

1 研究背景

1.1 国内外动物福利伦理审查研究现状

西方发达国家对动物福利伦理审查方面已开展广泛而深入的研究。一方面集中在对动物福利的内涵、范畴及工作方法的讨论上。Dawkins^[2]认为, 动物福利审查不只是一项工作, 而是一门综合学科, 涉及生物学、兽医学、心理学、经济学和法学等多个方面。Olsson 等^[3]讨论了不同的文化、机构和地理背景下伦理审查结果的差异, 并建议在伦理审查工作中引入国

际视角, 以增强其透明度。Webb 等^[4]研究了动物行为科学和动物伦理学之间分歧的起源, 鼓励在伦理审查工作中, 开始关注动物的道德地位 (moral status of animals), 这将伦理审查的范畴拓展至了哲学领域。Kiani 等^[5]在“3R”原则 (reduction, 减少; replacement, 替代; refinement, 优化) 的基础上, 提出责任 (responsibility) 的概念, 形成了“4R”原则, 作为伦理审查工作的更高层次指导。

另一方面则关注于动物福利的量化评估。Rust 等^[6]讨论了动物福利不同影响因素如环境、食物等作为分析因子的可能性, 进而定量地评估动物福利伦理; Brønstad 等^[7]根据不同影响因素比较了几种损益分析法 (harm-benefit analysis, HBA) 的模型, 包括算法模型、图形模型 (正方形、立方体和决策树)、检查表和关键问题以及面向过程的模型等, 来帮助量化评估伦理审查过程; Keubler 等^[8]建立了考虑临床评分、体重、行为以及鬼脸量表等多个因素在内的实验室动物严重程度 (severity assessment in laboratory animals) 量化评估体系, 用于评价动物实验设计是否符合动物福利伦理的要求。

自 1988 年《实验动物管理条例》(国务院令第 676 号) 颁布起, 国内伦理审查研究已经历了三十余年的发展。刘丽艳等^[9]梳理了近三十年来中国实验动物福利伦理审查工作的发展历程, 总结中国实验动物福利发展相对滞后的原因, 提出了加强中国实验动物福利的工作对策; 鹿双双等^[10]详细总结了伦理委员会运行过程中普遍存在的问题, 结合国际实践经验, 提出了伦理审查工作的优化建议; 刘文华等^[11]和刘凤华等^[12]对中国生物医学期刊中存在的动物伦理审查现状及问题进行了分析研究, 发现国内外期刊对于动物伦理的认识程度差异较大, 中国伦理审查流程效率和伦理审查质量应继续提升; 杜盼盼等^[13]提出, 在科技伦理治理中, 应当建立基于“事前预防、事中控制和事后补救”的全过程伦理审查机制, 以期不断推动

科技进步。

1.2 国内外伦理审查软件研究和应用现状

国外大学伦理审查的信息化普及程度较高,如哈佛大学(Harvard University)的E-IACUC^[14],西北大学(Northwestern University)的eIACUC^[15],耶鲁大学(Yale University)的MAPS^[16]等。也有较多的商业应用软件,如PyRAT animal facility^[17]、Tick@lab^[18]、REDCap^[19]等。

国内方面,浙江中医药大学的徐孝平等^[20]、浙江大学的李巍等^[21]和首都医科大学的翟亚南等^[22]先后报告了他们在伦理审查软件上的研究及应用进展。这些研究表明,信息化手段的应用可以显著提升伦理审查的效率。总体而言,在实验动物信息化建设领域,国内高等院校和研究机构也开展了许多探索研究,并积累了较为丰富的经验。

2 伦理审查软件的需求分析

2.1 当前存在的问题

华中科技大学实验动物伦理委员会于2009年成立,委员会根据《实验动物管理条例》、《实验动物福利伦理审查指南》(GB/T 35892—2018)、《实验动物安乐死指南》(GB/T 39760—2021)、《湖北省实验动物管理条例》(2022修订)等法律法规制定章程并开展工作。经总结,在实际运行中面临以下问题:

审查形式单一:审查形式目前以E-mail和线下方式为主,未设立快速审核流程,导致部分新申请AP在审核时存在效率低和周期长的问题。

监管存在漏洞:周期较长的动物实验项目缺乏过程数据管理,项目结束时难以将实际动物实验方案与审批通过方案进行回顾性比对,无法有效地进行PAM。

审查范围受限:部分委员为兼职身份,对审核活动的参与度不高且缺乏动态沟通机制,导致伦理委员会在一定程度上未能严格按照章程运行,审核的全面性和合规性有待提升。

2.2 全过程伦理审查软件的整体需求

功能性需求方面,全过程伦理审查软件参考《实验动物福利伦理审查指南》(GB/T 35892—2018)和《美国公共卫生署人道管理和使用实验动物政策》(Public Health Service Policy on Humane Care and Use of Laboratory Animals, PHS)等规范性文件,整体设计原则确定为“事前审批、事中监管、事后回顾”。具体包括:(1)在线提交与审核。平台允许研究人员在线提交AP,包括实验信息、目的、方法等详细信息,并支

持将过程材料作为附件上传;伦理委员会委员可在线审核这些方案,并提供反馈;研究人员可在线获取具有与纸质文件同等效力的伦理审查报告。(2)回顾性方案比对。实验结束后,系统能够将实验方案与实际情况比对,以确保实验过程与审批方案的一致性,有效地进行PAM。(3)专家管理。系统支持专家信息的认证和管理,包括专家的专业领域、审查历史和可用性等信息,并结合专家过往审查响应的情况,动态调整审查任务的分配。(4)数据分析。提供数据报告功能,允许用户生成实验过程和结果的详细报告,并支持数据分析以供伦理委员会进行决策支持。

非功能性需求方面:(1)性能需求。结合历史审查的数据,系统应保证在高并发时的稳定性和响应速度,支持正常时间并发数为500人/连接、峰值为800人/连接、空闲时期为80人/连接。(2)可扩展性。核心技术采用前后端分离设计(Spring Framework+Vue框架),从而增强扩展灵活性,以满足未来的需求。(3)兼容性。软件需采用B/S架构,访问者通过校园网络路由器连接,通过校园统一身份认证授权后方可访问软件。(4)此外,软件还跨平台支持多种操作系统,如Windows、Linux、MacOS,以及主流浏览器,如IE、Chrome和Firefox等。

安全性需求方面:(1)数据保护。遵守“最小可用、不断更新”原则,以最小可用的权限运行各种应用程序和数据库,禁止不必要的额外权限获取,从而防止数据泄露。(2)安全防护。严格按照《信息安全技术 信息系统安全等级保护基本要求》(GB/T 28448—2019)第三级标准构建安全体系,实施严格的访问控制、数据加密、安全审计、入侵检测和防御措施,以及确保系统的高可用性和灾难恢复能力。(3)审计跟踪。系统应记录所有用户的操作历史,建立完善的日志管理系统,以便于事后审计和问题追踪。定期进行安全评估和漏洞扫描,以及及时发现并修复潜在的安全问题。

3 伦理审查软件的设计

3.1 软件总体架构

依照华中科技大学实验动物中心实际情况,伦理审查软件的核心在于两个高级别应用:课题备案申请与动物实验申请。课题备案申请模块允许研究人员提交研究计划,包括研究目的、方法以及附件材料等。该模块的设计相对简单,其原则是,在确保信息完整性和准确性的基础上,尽可能快捷地帮助研究人员获

取项目备案报告。动物实验申请模块则是在课题备案的基础上, 提供智能指导和模板, 以帮助研究人员更好地准备和提交AP。同时, 该模块还包括了PAM, 用于监管动物实验是否严格按照实验申请开展, 以及是否符合伦理标准和法规要求。

为了支持这两个高级别应用, 系统还设计了一系列基础应用: (1) 人员管理。管理所有人员的信息, 包括研究人员、伦理委员会成员等。(2) 机构管理。维护所有机构信息, 确保信息的准确性和及时更新。(3) 角色管理。定义系统中不同用户的角色和权限, 以确保系统的安全性和合规性。(4) 流程管理。设计和维护整个伦理审查的流程, 包括申请提交、审核、反馈和批准等环节。(5) 报表管理。提供各种报表功能, 帮助管理人员和研究人员跟踪审查进度和结果。

上述应用构成了系统的应用层, 通过业务层、数

据层和服务层的支持, 实现了软件的稳定性、安全性与可扩展性。业务层负责处理具体的业务逻辑; 数据层负责数据的存储和管理; 服务层则提供系统所需的各种服务, 如认证服务、通知服务等。

前后端分离的设计思路, 使得访问层可以独立于应用层而存在, 实现了真正的跨平台兼容性。用户无论是通过桌面浏览器、移动设备还是平板电脑, 都可以方便地访问本系统, 极大地提高了软件的可用性和灵活性。

通过总体架构设计, 使整个系统更加模块化, 从而降低了各模块之间的耦合度。后端服务可以被多个前端应用复用, 有助于后续构建微服务, 提高软件的可重用性; 前端则可以快速迭代和发布新功能, 提升服务质量与用户体验。软件总体架构如图1所示。

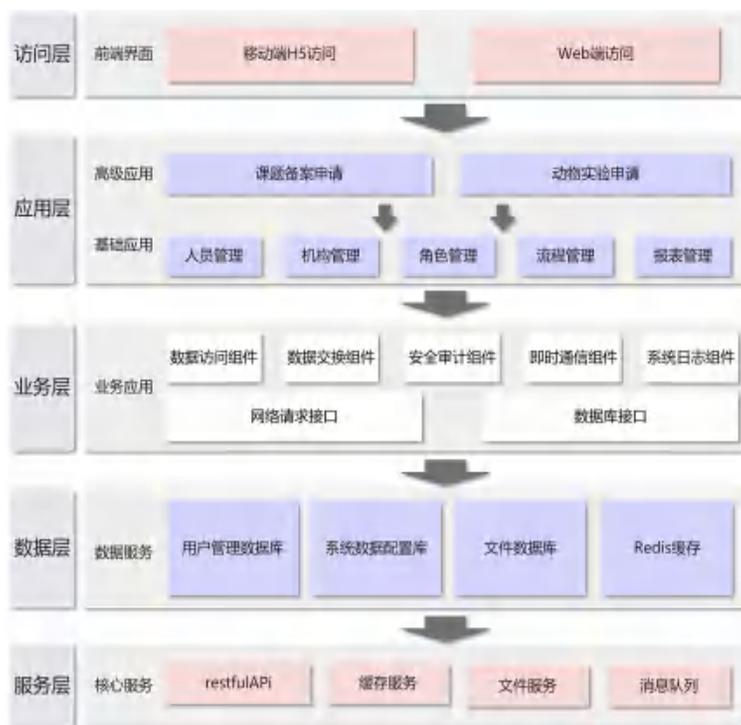


图1 软件整体架构图

Figure 1 Diagram of the overall software architecture

3.2 软件业务流程

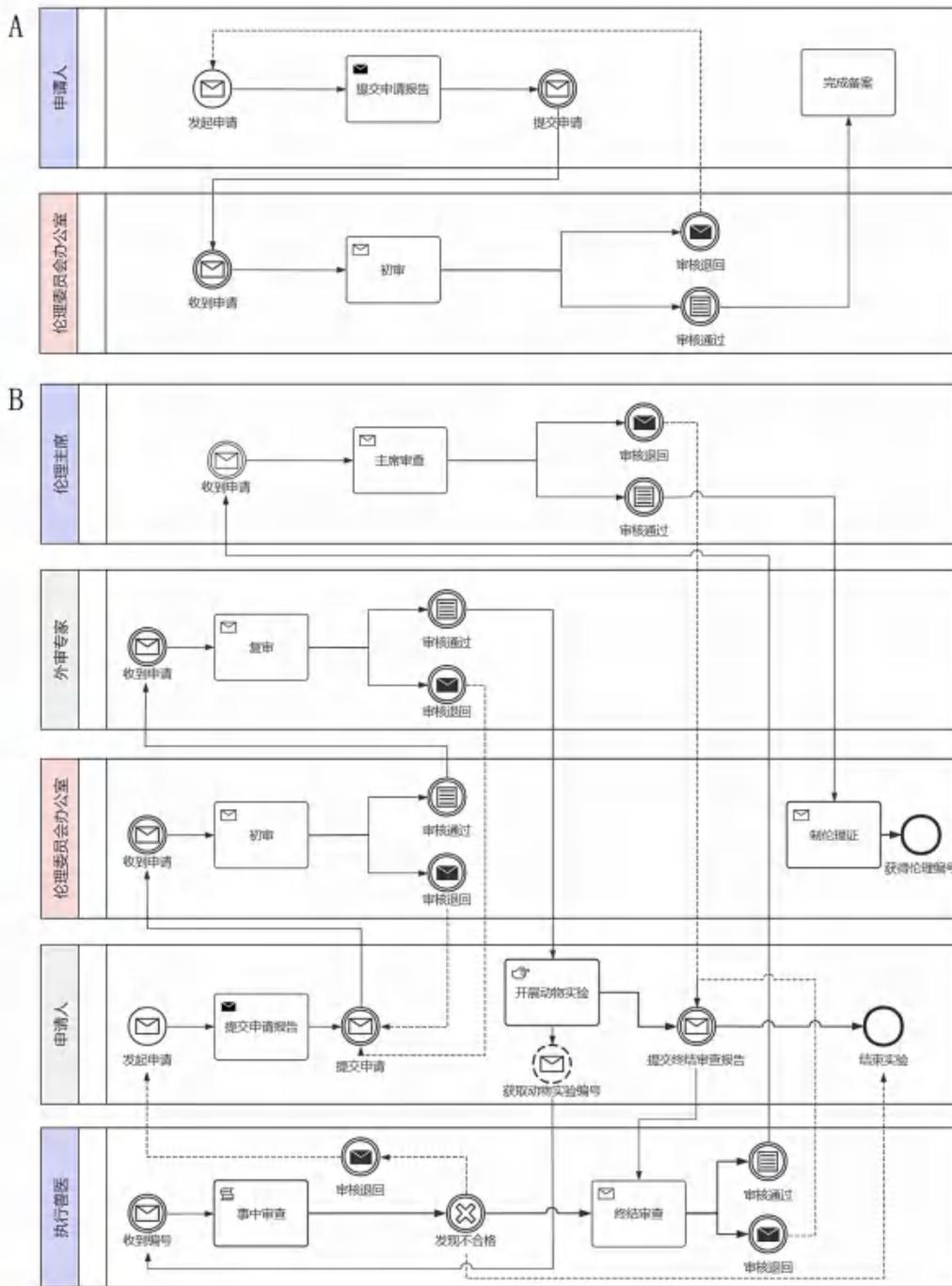
3.2.1 课题备案申请

课题备案申请, 主要用于支撑华中科技大学实验动物中心各类基金资助项目的申报。由申请人提交申报材料后, 经伦理委员会办公室对材料进行形式审查, 按照必要性原则、保护原则、福利原则、伦理原则等, 对申报材料的研究目的、实验设计、材料

方法等进行全面审查。审查通过后, 授予项目唯一的备案编号。课题备案申请的业务流程设计如图2A所示。

3.2.2 动物实验申请

动物实验的伦理审查严格执行“事前审批、事中监管、事后回顾”的设计思路。业务流程设计如图2B所示。



注：A，课题备案申请流程图；B，动物实验申请流程图。

Note: A, Flowchart of project registration process; B, Flowchart of animal experiment application process.

图2 软件业务流程图

Figure 2 Flowchart of the software application process

事前审批。根据PHS政策，对新申请AP的审查形式可以采用全员会议审查（full committee review, FCR）及指定成员审核（designated member review, DMR）的方式进行。DMR通常适用于那些风险较低的实验方案，而FCR则涉及更复杂或高风险的实验，因此线上审核的应用场景更加适合进行DMR审查。在申

请人提交AP后，由伦理委员会办公室进行初审，重点审核实验动物从业人员资质、申请资料的完整性等。初审通过后，系统在成员库内随机遴选2名能够满足审查要求的伦理委员会委员，依据“3R”原则开展外审，重点审查动物实验方案是否符合福利伦理要求，全部条件均通过后，申请人被授予动物实验备案编号，

允许开展动物实验。

此外, 根据 PHS 政策要求, DMR 的通过是实验开展的前提之一, 但不是唯一条件。在 DMR 开展时, 所有伦理委员会委员都必须能查看到方案, 并有权利要求进行 FCR 审查。因此, 在本系统中, 全体委员都可以访问到每份新申请的 AP 完整方案。

事中监管。在实际开展动物实验的过程中, 由执行兽医进行兽医验证和咨询 (veterinary verification and consultation), 采取“线下巡查、线上记录”的方式, 定期对动物实验及其参与人员进行人员、实验、动物三个方面的监管。对涉及动物实验与已批准 AP 情况不相符的, 根据具体情况, 要求实验人员进行方案修正 (amendments)。考虑到实际可操作性, 我们制定了明确标准, 将修正分为两类: 一是动物使用数量变更不超过 10% 的, 麻醉剂、镇痛剂、镇静剂和/或实验剂的化合物或剂量的变更, 实验人员的变更等, 申请人须暂停实验, 线上提交 AP 修正申请, 并且等待线上 DMR 审核 (一般不超过 3 个工作日) 通过后即可继续开展动物实验; 二是涉及手术程序的变更、导致动物痛苦增加的变更、安乐死方法的变更等, 需要暂停实验, 重新提交 DMR 甚至是 FCR 直至通过。对于情节较

为严重的, 执行兽医可以立即终止线下动物实验及线上动物实验流程, 并将相关人员列入黑名单, 依据规定开展处罚。

事后回顾。申请人在完成动物实验后, 应对动物实验全过程的记录进行整理, 形成回顾性终结审查报告。所涉及的记录包括: 实验操作记录、动物饲养记录、药品使用记录、仪器使用记录、动物安乐死记录等。回顾性终结审查报告由执行兽医初审, 伦理委员会办公室复核确认无误后, 提交伦理主席最终审批。审批通过后, 该伦理申请流程完结, 给予项目伦理编号。

3.3 项目功能模块

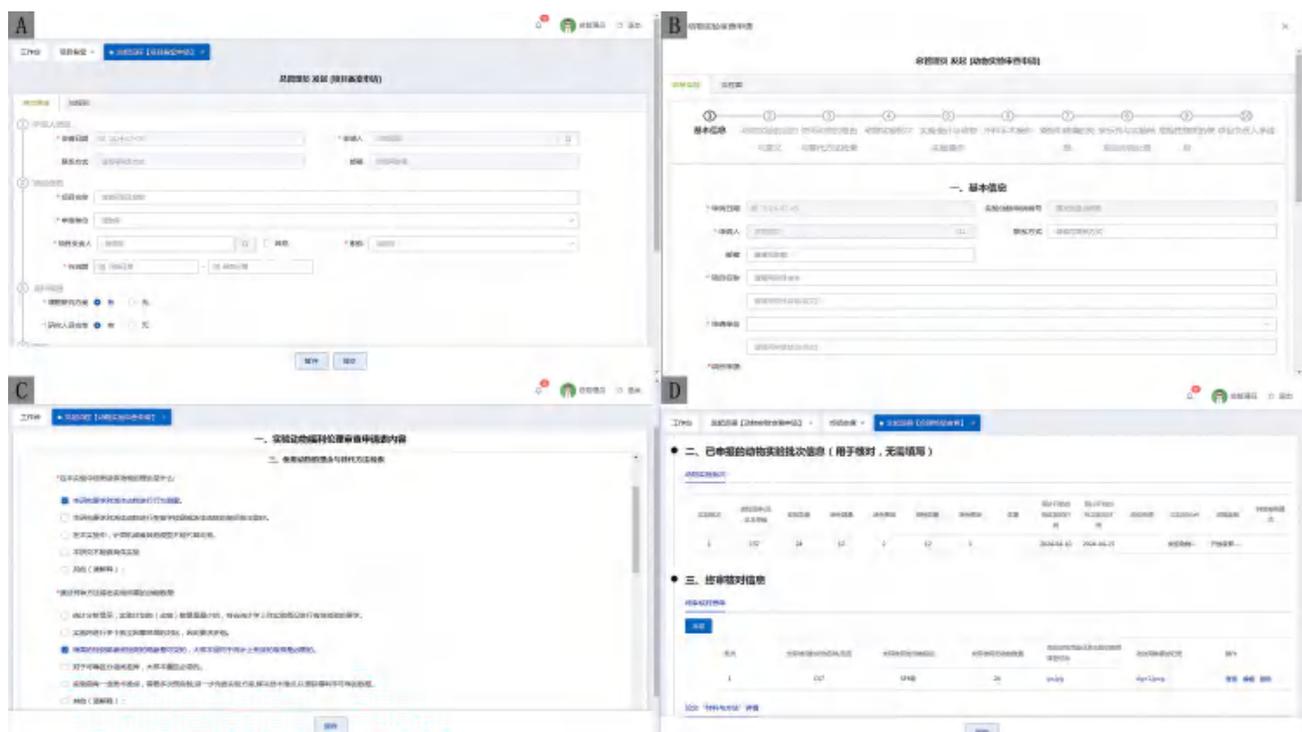
软件主要包括项目备案、动物实验审查、终结审查及辅助功能模块。

3.3.1 项目备案

在项目备案模块中, 申请人如实填写申请人信息、项目信息、资料报送情况及附件等 (图 3A)。通过审批即可获取备案报告。

3.3.2 动物实验审查

动物实验审查模块分为一般性动物实验和感染性动物实验。其中, 一般性动物实验审查从基本信息、动物实验的目的与意义、使用动物的理由与替代方案、



注: A, 项目备案功能界面; B~C, 动物实验审查功能界面; D, 终结审查功能界面。

Note: A, Project registration function interface; B-C, Animal experiment review function interface; D, Termination review interface.

图3 软件主要功能界面

Figure 3 Main function interface of the software

动物实验批次、实验设计与实验操作、外科手术操作、紧张与疼痛处理、安乐死与实验结束后动物处置、危险性物质的使用及项目负责人承诺共10个方面(图3B~C),全方位地审查动物实验是否符合国家和行业相关标准规范中关于动物福利伦理的具体要求。为优化用户使用体验,信息填写采用智能表格的形式,以减少不必要的输入错误。对于感染性动物实验,在一般性动物实验需填写的10个方面的基础上,增加一项感染性动物实验生物安全审查表,共计11项内容。

3.3.3 终结审查

传统线下审核方式中,动物实验可能存在多批次、不同时进行的特点,存在原始材料分散、整理工作量大、核对效率低等问题。针对这些痛点,本软件在功能设计上将已申报的动物实验信息整理汇总,并采用智能表格的形式展示每批次的原始记录。在终结审查时,由执行兽医重点核对实验动物实际使用情况与已申报的信息是否匹配,并结合原始记录进行溯源核对,从而实现实验方案的快速回顾与比对(图3D)。此外,为兼顾页面显示的内容全面并突出重点,将已填写的基本信息等9个方面的实验方案内容采用折叠形式,以方便查看。

3.3.4 辅助功能

辅助功能包括人员管理、机构管理、专家管理、报表管理等。

(1) 人员管理。用于管理人员的基础信息,如姓名、编号等。包含人员资质审核功能,用于审批及管理是否具有实验动物从业资格。(2) 机构管理。用于管理机构的基础信息及人员从属。基础信息如机构名称、二级组织等。人员从属即可以设置机构内人员数量及角色,动态调整各组织人员配置。(3) 专家管理。包括属性标签与权重系统。对于伦理委员会中的每个成员,设置其属性标签,用于在动物实验申请审查时按照其专长分配任务,如将感染类实验/非感染类实验推送给不同成员进行审查。结合实际情况设计超时代办机制,对于超过规定处理时效(3个工作日)的审查项目,将审查项目流转至专家秘书进行代办处理。结合实际情况设计动态权重系统,软件统计每名伦理委员会成员完成伦理审查的平均时长以计算权重,对于超过规定处理时效(3个工作日)次数较多的,调整其审查任务的推送频率,保证伦理审查整体流畅高效。(4) 报表管理。查询全部伦理审查资料的历史记录、详细信息及附件。按不同时间尺度统计分析各类伦理审查的申请数、审批完成数量等。

4 运行成效

经过半年试运行,全过程动物实验伦理审查软件整体效果符合预期。根据后台数据显示(图4),2024年1月—7月,该系统累计接收动物实验伦理申请452项,其中,审批通过360项,不通过92项,完成终结审查261项。得益于本软件,涉及DMR的伦理审查平均耗时从原来的7个工作日缩短至3个工作日,PAM工作得到了更加规范地开展,华中科技大学实验动物中心管理范围内的动物实验福利伦理和科学研究活动规范性得到了较好的保证。

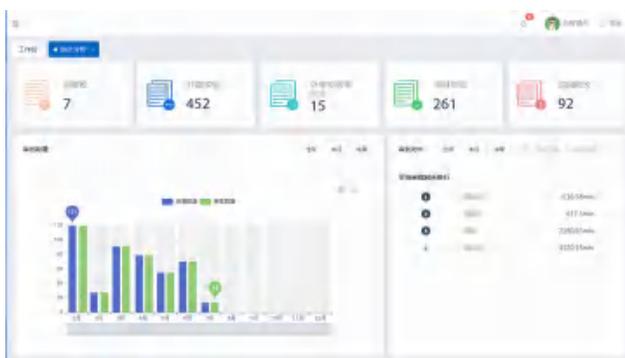


图4 2024年1—7月动物实验伦理审查整体情况

Figure 4 Overall status of animal experiment ethical review from January to July 2024

5 讨论

动物福利伦理审查与监督工作,更准确来说,AP及PAM已经成为高校IACUC工作职责的重中之重,这离不开“事前审批、事中监管、事后回顾”的全过程思维,而信息化手段的应用使其落地成为可能。全过程的动物伦理审查软件,具有明显的实用价值与现实意义。

本软件的设计与实施,有效地解决了华中科技大学实验动物中心在动物福利伦理审查与监督工作的部分问题,显著地提升了工作效率。然而,在实际工作中,依然存在一些问题。

信息化手段应用存在挑战。大多数现行的动物福利伦理政策都是在互联网普及前制定的,即使近年来,如通过美国国家卫生研究院实验动物福利办公室的OLAW认证等,提供了一些简化方案和线上手段建议,但线下面对面会议依然被认为是伦理委员会运行的标准流程。在实际操作中,部分委员兼职且参与度低,导致审核超时现象严重。即使软件设计了超时代办和

动态权重机制以保证响应时效,也无法完全解决这类问题,且这些处理方式与委员审核制度的初衷存在矛盾。

实验的迫切性和审查的严谨性难以平衡。在紧急情况下,研究者可能需要快速调整实验方案。这既要协调审查与实验之间的关系,又要确保动物实验顺利开展且不违反“3R”原则。这对伦理委员会本身的运行机制以及其和研究者之间的沟通机制建设提出了更高的要求。

PAM依然存在部分局限性。由于高等院校动物实验项目呈现分散性、分时性的特点,执业兽医只能以“巡查+抽查”的形式开展PAM,无法实现全部动物实验项目的实时监管。同时,在监管力度上,由于软件主要采取文字方案对比形式的审查,对实验动物研究及使用计划、审核及批准后监管难以做到每个环节都完全溯源追查。

下一步,动物实验伦理审查软件需要在动物福利伦理审查与监督的准确性和力度上继续提升,包括采用更多先进技术,如人工智能、大数据分析等。例如,可增加对多模态内容的识别来代替人工开展动物实验巡查;或通过机器学习算法对历史数据进行精准分析;还可以利用熵权分析等方法量化评估机构的动物福利状况等,从而为伦理审查提供数据参考。

[作者贡献 Author Contribution]

徐骁负责方案策划、方法设计及初稿撰写;

吴杰敏负责项目管理及有效验证;

梁翼负责软件程序开发;

叶明霞参与项目监督指导并提出建议;

周顺长负责监督指导及论文审核。

[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] 刘晓宇,贺争鸣.通过制度建设推进我国实验动物福利伦理审查工作[J].实验动物科学,2021,38(5):1-3,36. DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2021.05.001.
LIU X Y, HE Z M. Promotion of the ethical review of laboratory animal welfare through institutional construction[J]. Lab Anim Sci, 2021, 38(5): 1-3, 36. DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2021.05.001.
- [2] DAWKINS D S. The science of animal welfare: Understanding what animals want[M]. Oxford University Press, 2021. DOI: 10.1093/oso/9780198848981.001.0001.
- [3] OLSSON I A S, NIELSEN B L, CAMERLINK I, et al. An international perspective on ethics approval in animal behaviour and welfare research[J]. Appl Anim Behav Sci, 2022, 253:105658. DOI: 10.1016/j.applanim.2022.105658.
- [4] WEBB C E, WOODFORD P, HUCHARD E. Animal ethics and behavioral science: an overdue discussion[J]. BioScience, 2019, 69(10):778-788. DOI: 10.1093/biosci/biz082.
- [5] KIANI A K, PHEBY D, HENEHAN G, et al. Ethical considerations regarding animal experimentation[J]. J Prev Med Hyg, 2022, 63(2 Suppl 3): E255-E266. DOI: 10.15167/2421-4248/jpmh2022.63.2S3.2768.
- [6] RUST K, CLEGG I, FERNANDEZ E J. The voice of choice: a scoping review of choice-based animal welfare studies[J]. Appl Anim Behav Sci, 2024, 275: 106270. DOI: 10.1016/j.applanim.2024.106270.
- [7] BRØNSTAD A, NEWCOMER C E, DECELLE T, et al. Current concepts of harm-benefit analysis of animal experiments - report from the AALAS-FELASA working group on harm-benefit analysis - part 1[J]. Lab Anim, 2016, 50(1 Suppl): 1-20. DOI: 10.1177/00236772166642398.
- [8] KEUBLER L M, HOPPE N, POTSCHKA H, et al. Where are we heading? Challenges in evidence-based severity assessment [J]. Lab Anim, 2020, 54(1): 50-62. DOI: 10.1177/0023677219877216.
- [9] 刘丽艳,张宏馨,边佳悦,等.实验动物福利伦理审查发现问题之思考[J].中国比较医学杂志,2023,33(9):63-68. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.09.008.
LIU L Y, ZHANG H X, BIAN J Y, et al. Reflection of the problems found in the ethical review of experimental animal welfare[J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(9):63-68. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.09.008.
- [10] 鹿双双,师晓萌,刘晓宇,等.实验动物福利伦理审查与监管实践及探索[J].实验动物与比较医学,2020,40(4):339-343. DOI: 10.3969/j.issn.1674-5817.2020.04.011.
LU S S, SHI X M, LIU X Y, et al. Practice and exploration on laboratory animal welfare and ethical reviewing and monitoring[J]. Lab Anim Comp Med, 2020, 40(4):339-343. DOI: 10.3969/j.issn.1674-5817.2020.04.011.
- [11] 刘文华,张琴,孙玉花.医学期刊伦理审查的问题调研与对策探讨[J].编辑学报,2023,35(4):412-415. DOI: 10.16811/j.cnki.1001-4314.2023.04.012.
LIU W H, ZHANG Q, SUN Y H. Problem investigation and countermeasure discussion of ethical review in medical journals[J]. Acta Ed, 2023, 35(4):412-415. DOI: 10.16811/j.cnki.1001-4314.2023.04.012.
- [12] 刘凤华,陈立敏,李启明.我国生物医学期刊稿件中动物伦理和福利问题的调查与分析[J].中国科技期刊研究,2017,28(12):1128-1133. DOI: 10.11946/cjstp.201705080353.
LIU F H, CHEN L M, LI Q M. A survey of animal ethics and welfare in Chinese biomedical journals[J]. Chin J Sci Tech Period, 2017, 28(12): 1128-1133. DOI: 10.11946/cjstp.201705080353.
- [13] 杜盼盼,徐嘉.科技伦理治理中的全过程审查机制构建[J].云南大学学报(社会科学版),2024,23(1):47-55. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7511.2024.01.006.
DU P P, XU J. Construction of a whole-process review mechanism in the governance of sci-tech ethics[J]. J Yunnan Univ Soc Sci Ed, 2024, 23(1):47-55. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7511.2024.01.006.
- [14] Harvard University. E-IACUC[CP/OL]. [2024-11-06]. <https://iacuc.hms.harvard.edu/e-iacuc>.
- [15] Northwestern University. eIACUC [CP/OL]. [2024-11-06]. <https://iacuc.northwestern.edu/>.
- [16] Yale University. MAPS [CP/OL]. [2024-11-06]. <https://ires-iacuc.yale.edu/IACUC-Prod>.
- [17] Scionics Computer Innovation GmbH. PyRAT animal facility

- software[CP/OL]. [2024-11-06]. <https://www.scionics.com/pyrat.html>.
- [18] TICK@LAB. TICK@LAB software for laboratory animal research facilities [CP/OL]. [2024-11-06]. <http://www.a-tune.com/products-services-software/ticklab-mouse-colony-management-software/>.
- [19] CARVAJAL C, VALLEJOS C, LEMAITRE D, et al. A REDCap application that links researchers, animal facility staff and members of the IACUC in animal health monitoring[J]. Lab Anim, 2019, 53(5):500-507. DOI: 10.1177/0023677218815723.
- [20] 徐孝平, 张利棕, 潘永明, 等. 基于浏览器/服务器模式架构的高校动物实验管理系统开发与应用[J]. 实验动物与比较医学, 2019, 39(3):239-243. DOI: 10.3969/j.issn.1674-5817.2019.03.012.
- XU X P, ZHANG L Z, PAN Y M, et al. Development and application of college animal experiment management system based on browser/server mode architecture[J]. Lab Anim Comp Med, 2019, 39(3): 239-243. DOI: 10.3969/j.issn.1674-5817.2019.03.012.
- [21] 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.
- [22] 翟亚南, 卢静. 高等医学院校实验动物福利伦理审查工作的实践与探索[J]. 医学教育管理, 2023, 9(S1):119-122. DOI: 10.3969/j.issn.2096-045X.2023.S1.028.
- ZHAI Y N, LU J. Practice and exploration of ethical review of experimental animal welfare in medical colleges and universities[J]. Med Educ Manag, 2023, 9(S1):119-122. DOI: 10.3969/j.issn.2096-045X.2023.S1.028.
- (收稿日期:2024-06-13 修回日期:2024-11-06)
(本文编辑:翟玉凤,富群华,丁宇菁,洪怡)

[引用本文]

- 徐晓, 吴杰敏, 梁翼, 等. 全过程动物实验伦理审查软件的设计与实现[J]. 实验动物与比较医学, 2024, 44(6): 682-690. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.086.
- XU X, WU J M, LIANG Y, et al. Design and implementation of a software system for full-process animal experiment ethical review[J]. Lab Anim Comp Med, 2024, 44(6): 682-690. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.086.

《实验动物与比较医学》2024年支持单位致谢

《实验动物与比较医学》作为我国实验动物科学领域内第一本专业学术期刊,从创刊之日起就注重产、学、研融合发展。期刊在44年的发展历程中,得到了全国各地实验动物科研机构和技术企业的大力支持。值此辞旧迎新之际,我们特向2024年支持本刊发展的各单位致以最衷心的感谢!

愿2025年,我们继续携手,充分依靠本刊面向全国各地读者群体的纸版发行和数字传播平台,大力服务实验动物科学与比较医学相关科研团队的成果推广、交流合作及人才培养,并为科研团队与技术企业之间的供需转化搭建桥梁,共同致力于我国实验动物科学及相关行业的发展与繁荣!

2024年支持单位致谢名单(排名不分先后)如下:

苏州大学苏州医学院实验动物中心
大连医科大学实验动物中心
复旦大学实验动物中心
浙江中医药大学动物实验研究中心
中国科学院上海药物研究所实验动物室
华南农业大学实验动物中心
杭州师范大学实验动物中心
山东省实验动物中心
上海斯莱克实验动物有限责任公司
上海开纯洁净室技术工程有限公司
安维迪生命科学(浙江)有限公司
上海元上生物医学科技有限公司
上海韵嘉赛生物科技有限公司
鑫博海生物医疗科技有限公司
苏州市苏杭科技器材有限公司
瑞特培斯生物科技启东有限公司
佰泰科技有限公司

中国农业科学院哈尔滨兽医研究所
南方医科大学实验动物管理中心
上海交通大学医学院实验动物科学部
广东省医学实验动物中心
西安交通大学实验动物中心
浙江省实验动物中心
扬州大学比较医学中心
广州中医药大学动物实验中心
上海吉辉实验动物饲养有限公司
苏州苏净安发环境科技有限公司
泰尼百斯实验室设备贸易(上海)有限公司
上海业腾洁净技术有限公司
厦门抱壹智能科技有限公司
苏州市冯氏实验动物设备有限公司
上海鸣励实验室科技发展有限公司
上海必凯科翼生物科技有限公司
赛业(苏州)生物科技有限公司

《实验动物与比较医学》编辑部

一例干扰素受体缺失小鼠自发未成熟型睾丸畸胎瘤诊断

赵赫, 张帆, 肖宇宙, 安学芳, 张涛, 李丽

(中国科学院武汉病毒研究所, 武汉 430070)

[摘要] **目的** 观察干扰素受体缺失小鼠 (AG129) 睾丸自发性肿瘤, 为该品系小鼠的应用研究提供依据。**方法** AG129 小鼠种群饲养于 SPF 屏障环境中, 正常饲养繁殖, 在离乳的 3 周龄小鼠中发现其中一只雄性小鼠睾丸异常肿大, 同窝内其他小鼠无相似情况, 对该例小鼠自发的睾丸肿瘤进行持续观察, 于 9 周龄时对小鼠安乐死, 并解剖, 观察肿瘤组织大体形态并取材, 肿瘤组织经石蜡切片后进行 HE 染色。**结果** 小鼠经过持续数周观察发现, 肿瘤组织随小鼠日龄增长逐渐增大; 解剖后肿瘤组织被包囊包裹, 表面光滑, 切开包囊后, 肿瘤内组织形态不规则, 部分质地坚硬, 部分柔软; HE 染色结果显示, 肿瘤组织由多胚层组织发育而成, 内部有神经组织、骨组织、肌肉组织和脂肪组织等, 形态结构不规则。**结论** 结合肿瘤发生发展, 大体形态结构, 病理切片 HE 染色结果, 初步诊断该例小鼠睾丸肿块为小鼠未成熟型畸胎瘤。

[关键词] 干扰素受体; 小鼠; 睾丸; 未成熟型畸胎瘤

[中图分类号] R737; Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2024)06-0691-04



Preliminary Diagnosis and Characterization of a Spontaneous Immature Testicular Teratoma in an Interferon Receptor-Deficient Mouse Model

ZHAO He, ZHANG Fan, XIAO Yuzhou, AN Xuefang, ZHANG Tao, LI Li

(Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430070, China)

Correspondence to: ZHANG Fan (ORCID: 0009-0002-4393-3081), E-mail: zhangf@wh.iov.cn

[ABSTRACT] **Objective** To observe the spontaneous testicular tumors in interferon receptor-deficient mice (AG129) and provide a basis for further research using this mouse strain. **Methods** The AG129 mouse population was bred in an SPF barrier environment and reproduced normally. Among the 3-week-old weaned mice, we found that one male mouse had an abnormally enlarged testis, while none of the other mice in the same litter exhibited a similar condition. The spontaneous testicular tumor in this mouse was continuously monitored. The mouse was euthanized and dissected at 9 weeks of age. The gross morphology of the tumor was observed, and the tissue was then embedded in paraffin and sectioned for hematoxylin and eosin (HE) staining. **Results** After several weeks of observation, the tumor tissue gradually increased in size as the mice aged. Upon dissection, the tumor tissue was encapsulated in a smooth capsule. After opening the capsule, the tumor tissue was irregular in shape, with some areas being hard and others soft. The results of HE staining showed that the tumor tissue developed from tissues derived from multiple germ layers, with nerve tissue, bone tissue, muscle tissue, and adipose tissue inside, exhibiting an irregular morphological structure. **Conclusion** Based on the tumor development, gross morphological structure, and the HE staining results of the pathological sections, the tumor in this mouse was preliminarily diagnosed as an immature teratoma.

[Key words] Interferon receptor; Mouse; Testicle; Immature teratoma

[基金项目] 国家重点研发计划项目“基于新靶点的重大传染病人源化动物模型研发”(2021YFF0702000); 湖北省科技厅项目“实验动物生物安全标准化建设”(2022DFE023)

[第一作者] 赵赫(1987—), 男, 硕士, 实验师, 主要从事基因工程小鼠管理工作。E-mail: zhaoh@wh.iov.cn

[通信作者] 张帆(1985—), 男, 硕士, 高级实验师, 主要从事实验动物质量控制与管理工作。E-mail: zhangf@wh.iov.cn。ORCID: 0009-0002-4393-3081

干扰素是一类重要的免疫细胞因子，其本质是由白细胞、成纤维细胞和淋巴细胞等免疫细胞分泌的多功能活性蛋白^[1]。干扰素通过与细胞表面受体（即干扰素受体）相互作用，诱导细胞表达具有抗病毒作用的活性蛋白，从而达到抗病毒的效果^[2]。AG129小鼠是人为构建的干扰素受体缺失基因工程小鼠品系，这种小鼠体内的干扰素无法通过与受体结合来刺激细胞产生抗病毒蛋白，在感染性疾病动物模型复制中表现易感且呈现出符合临床症状的病理特征^[3]。因此，AG129小鼠已被用于建立感染性动物模型以及抗病毒药物的筛选与评价等方面^[4]。在繁殖性能方面，雌性AG129小鼠妊娠期为21 d左右，哺乳期也为21 d左右，与野生型雌性小鼠一致；而雄鼠AG129小鼠体成熟稍晚，雌鼠窝产仔数要低于正常野生型小鼠^[5]。AG129小鼠在生产繁育过程中偶见异常肿瘤发生，具体发生率未做统计。

1 病例资料

AG129小鼠^[6]的繁殖与保种于中国科学院武汉病毒研究所实验动物中心[SYXK(鄂)2022-0131]屏障环境中开展，小鼠种群规模有150只左右。工作人员于生产后21 d离乳时在一繁殖笼的6只小鼠(2♀, 4♂)中发现本病例。该病例系雄鼠，初步表现为单侧睾丸异常肿大，同窝其他小鼠未见明显异常。在后续饲养过程中观察发现，小鼠肿大部位的体积随周龄增大而持续增长。9周龄时小鼠行动能力已受到明显影响。为明确小鼠出现异常的原因，保障屏障内动物质量和动物福利，以及防止环境污染，工作人员对异常小鼠实施安乐死。同时对同笼架哨兵鼠进行微生物和寄生虫检测，检测结果均符合国家SPF级动物标准。

本实验中所有操作均符合中国科学院武汉病毒研究所实验动物相关管理制度和福利要求，并通过实验动物伦理审查(WIVA30202402)。

2 诊断方法

使用异氟烷气体麻醉小鼠后，以颈椎脱臼法实施安乐死。解剖睾丸肿大处观察并对肿块进行取材，置于10%体积分数的甲醛溶液中固定。固定一周后进行常规石蜡切片、HE染色及生物光学显微镜观察，观察结果使用NIS-Elements高清晰度彩色图文分析系统进行图片采集。

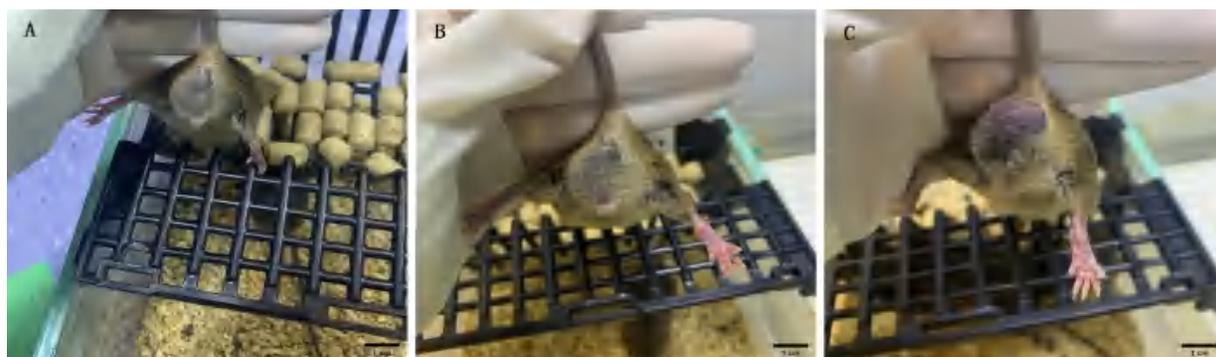
3 诊断结果

3.1 大体眼观病变

该病例发现后继续进行跟踪观察，分别于4周龄、6周龄、8周龄采集在体外观图片(图1)，9周龄时对小鼠进行安乐死。打开肿瘤部位皮肤，内有一边界清晰且具有囊性包膜的肿块，包膜内液体呈黄褐色，内部组织不规则。剪开包膜，内有结缔组织、脂肪组织等，有韧带连接至腹腔内。肿块质地不均匀，部分柔软，部分坚硬(图2)。仅对瘤体组织进行取材，未观察其他部分发生情况。

3.2 组织病理学观察

HE染色结果显示，瘤体组织由多种组织细胞组成，可见大量血管和结缔组织(图3A)；视野中央有钙化组织，周围分布有骨组织，骨组织周围包裹有大量的脂肪细胞(图3B)；可见神经细胞(黑色箭头指示位置)以及上皮组织(图3C)，并有散在的肌肉组织和腺泡细胞(图3D)。



注：A，4周龄时大小；B，6周龄时大小；C，8周龄时大小。

Note: A, Tumor size at 4 weeks of age; B, Tumor size at 6 weeks of age; C, Tumor size at 8 weeks of age.

图1 小鼠肿瘤在体外观的生长变化

Figure 1 Growth changes of the tumor in the mouse

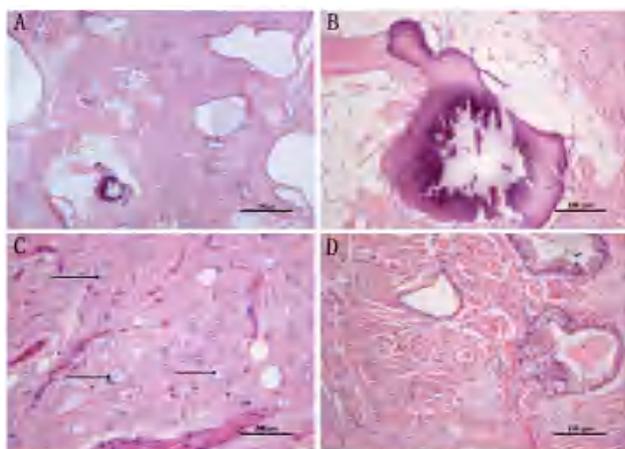


注: A, 瘤体囊性组织结构; B, 瘤体实体组织结构。

Note: A, Cystic tissue structure of the tumor; B, Solid tissue structure of the tumor.

图2 小鼠肿瘤大体解剖观察

Figure 2 General anatomical observation of the tumor in the mouse



注: A, 结缔组织 (标尺=500 μm); B, 骨组织 (标尺=100 μm); C, 神经组织 (标尺=50 μm), 黑色箭头指示部分神经细胞位置; D, 肌肉组织 (标尺=100 μm)。

Note: A, Connective tissue ($\times 40$, scale bar = 500 μm); B, Bone tissue ($\times 100$, scale bar = 100 μm); C, Nerve tissue ($\times 400$, scale bar = 50 μm), with the black arrow indicating the location of nerve cells; D, Muscle tissue ($\times 100$, scale bar = 100 μm)

图3 小鼠肿瘤组织学观察(HE染色)

Figure 3 Histological observation of the tumor in the mouse (HE staining)

3.3 诊断结果

通过大体解剖和病理组织切片观察, 初步诊断该病例为小鼠未成熟型睾丸畸胎瘤。

4 讨论

畸胎瘤是一种结构复杂的肿瘤, 一般由多个胚层发育的组织组成, 组织内包括外胚层组织(表皮和神经系统)、中胚层组织(骨骼系统和肌肉组织)和内胚层组织(消化腺和呼吸系统)。其主要发生在性腺部位, 如卵巢畸胎瘤和睾丸畸胎瘤; 其他非性腺部位也

偶有发生, 如前纵隔、胃肠道和头颈部。根据肿瘤细胞的分化程度可以分为成熟型畸胎瘤和未成熟型畸胎瘤, 成熟型大多为良性肿瘤, 未成熟型较少见且一般为恶性肿瘤^[7]。

在不同物种之间, 畸胎瘤发生率有所不同。在犬^[8]、豚鼠^[9]中比较常见, 但在马^[10]和牛^[11]中的相关报道则较少; 在猫中的报道一般发生在性腺内单侧, 性腺外的较少, 睾丸畸胎瘤病例较少^[12-13]; 在野生动物中也有相关报道, 如雪貂^[14]。在小鼠中, 多种品系小鼠均有发生畸胎瘤的报道, 有的发生在性腺内, 有的发生在性腺外。性腺内的畸胎瘤, 如在C3H、C3HeB、Swiss小鼠以及FVB/n^[15]等品系中有关于卵巢畸胎瘤的案例报道; ICR^[16]、A/HeJ、DBA/2J、129等品系有关于自发性睾丸畸胎瘤的案例报道。129/terSV小鼠高发睾丸畸胎瘤, 并且大部分发生在左侧睾丸^[17]。性腺外畸胎瘤, 如眼内畸胎瘤, 曾在B6.129S2-Trp53tm1Tyj品系小鼠中有报道^[18]。在大部分报道的畸胎瘤中, 一般为良性肿瘤也就是成熟型畸胎瘤。除自发性睾丸畸胎瘤外, 也可以人工诱导睾丸畸胎瘤的发生, 使用的是129/SvJ品系小鼠, 成功率可达29%^[19]。国内关于小鼠自发睾丸畸胎瘤的报道较少^[20-21], 本病例中肿瘤发生于小鼠幼龄期, 且肿瘤大小随年龄增长而逐渐增大, 影响小鼠的生活状态和生产性能。安乐死后经组织学检查可在肿瘤中观察到神经组织、肌肉组织、上皮组织以及骨组织等, 符合畸胎瘤的特征, 这是国内首次关于该品系自发性睾丸畸胎瘤的报道。但本研究也有不足之处, 例如: 由于缺少病例分析经验, 诊断中只侧重观察了瘤体组织, 忽略了其他部位组织器官的病理观察; 同时由于仪器设备的欠缺未能完成血液生化和影像学的检测及诊断。如在后续的生产繁育中如发现相似病例, 将进行进一步研究。

[医学伦理声明 Medical Ethics Statement]

本研究所涉及的所有动物实验方案均已通过中国科学院武汉病毒研究所生命科学研究伦理审查委员会批准(批号WIVA30202402), 所有实验操作均按照中国科学院武汉病毒研究所实验动物中心标准操作规程进行, 遵照中国实验动物相关法律法规条例要求。

All animal experimental protocols involved in this study have been approved by the Institutional Review Board of Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Sciences (Approval No. WIVA30202402), and all experimental operations have been carried out in accordance with the standard operating procedures of the Experimental Animal Center, and in compliance with the requirements of the relevant laws and regulations on experimental animals in China.

[作者贡献 Author Contribution]

赵赫负责实验操作和初稿写作；
张帆负责实验方案设计并获取项目资助；
肖宇宙负责实验数据采集和图片处理；
安学芳负责实验监督和写作指导；
张涛、李丽参与方案设计并提供文献及实验试剂。

[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] 孙亚萍, 王英明, 乔守怡. 干扰素及其最新研究进展[J]. 中国免疫学杂志, 2006, 22(7): 676-679. DOI: CNKI:SUN:ZMXZ.0.2006-07-021.
SUN Y P, WANG Y M, QIAO S Y. Interferon and its latest research progress[J]. Chin J Immunol, 2006, 22(7): 676-679. DOI: CNKI:SUN:ZMXZ.0.2006-07-021.
- [2] 李军, 曾芸. 病毒诱导 I 型干扰素产生的机制[J]. 生命的化学, 2006, 26(5): 395-398. DOI: 10.3969/j. issn. 1000-1336.2006.05.004.
LI J, ZENG Y. The mechanism of induction of type I interferons by virus[J]. Chem Life, 2006, 26(5):395-398. DOI: 10.3969/j.issn.1000-1336.2006.05.004.
- [3] 吴文煜, 韩梅芳. 干扰素信号通路对病毒性肝炎抗病毒疗效的影响[J]. 实用肝脏病杂志, 2016, 19(3):261-263. DOI: 10.3969/j.issn.1672-5069.2016.03.002.
WU W Y, HAN M F. Impact of interferon signal tunnel on antiviral efficacy of patients with viral hepatitis[J]. J Pract Hepatol, 2016, 19(3): 261-263. DOI: 10.3969/j. issn. 1672-5069. 2016.03.002.
- [4] 张帆, 安学芳, 赵赫, 等. I 型干扰素受体缺失小鼠体外受精实验研究[J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(3):351-357. DOI: 10.3969/j. issn.1005-4847.2020.03.009.
ZHANG F, AN X F, ZHAO H, et al. *In vitro* fertilization using type I interferon receptor-deficient mice[J]. Acta Lab Animalis Sci Sin, 2020, 28(3):351-357. DOI: 10.3969/j.issn.1005-4847.2020.03.009.
- [5] 张帆, 安学芳, 赵赫, 等. 还原型谷胱甘肽在 AG129 小鼠生物净化及快速繁殖中的应用[J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(1):96-99. DOI: 10.3969/j.issn.1005-4847.2020.01.014.
ZHANG F, AN X F, ZHAO H, et al. Application of reduced glutathione in biological purification and rapid propagation of AG129 mice[J]. Acta Lab Animalis Sci Sin, 2020, 28(1):96-99. DOI: 10.3969/j.issn.1005-4847.2020.01.014.
- [6] LI N, DENG C L, LI Q, et al. A safe replication-defective Zika virus vaccine protects mice from viral infection and vertical transmission[J]. Antiviral Res, 2023, 211: 105549. DOI:10.1016/j. antiviral.2023.105549.
- [7] SABA, GUERRIERO S, SULCIS R, et al. Mature and immature ovarian teratomas: CT, US and MR imaging characteristics[J]. Eur J Radiol, 2009, 72(3): 454-463. DOI: 10.1016/j. ejrad. 2008. 07.044.
- [8] AGNEW D W, MACLACHLAN N J. Tumors of the genital systems[M]//MEUTEN D J. Tumors in Domestic Animals. 5th ed. New York: Wiley, 2016: 689-722. DOI: 10.1002/9781119181200.ch16.
- [9] BARTHOLD S W, GRIFFEY S M, PERCY D H. Pathology of laboratory rodents and rabbits[M]. 4th ed. New York: Wiley, 2016: 213-252. DOI: 10.1002/9781118924051.
- [10] CHARLES L N. Metastatic ovarian teratocarcinoma in a horse [J]. J Comp Pathol, 2020, 181: 68-72. DOI: 10.1016/j. jcpa.2020.10.002.
- [11] CARLUCCIO A, ZEDDA M T, CONTRI A, et al. Immature ovarian teratoma in two heifers[J]. Vet Ital, 2017, 53(4):327-330. DOI: 10.12834/VetIt.738.3603.2.
- [12] MACHIDA Y, MICHISHITA M, WADA M, et al. Malignant oestrogen-producing teratoma in a cat[J]. J Comp Pathol, 2017, 156(2-3):178-182. DOI: 10.1016/j.jcpa.2016.11.273.
- [13] NAGUMO T, YOSHII R, UZUKA Y, et al. Computed tomographic characteristics of testicular teratoma in a cat [J]. Vet Radiol Ultrasound, 2024, 65(5):496-500. DOI: 10.1111/vru.13380.
- [14] FIDDES K R, MURRAY J, WILLIAMS B H. Testicular Teratocarcinoma in a Ferret (*Mustela putorius furo*) [J]. J Comp Pathol, 2020, 181:63-67. DOI: 10.1016/j.jcpa.2020.09.017.
- [15] DE OLIVEIRA P A M, FAUSTINO-ROCHA A I, DA COSTA R M G, et al. A spontaneous ovarian teratoma in an FVB/n female mouse: case report and literature review[J]. Open Vet J, 2023, 13(9):1223-1227. DOI: 10.5455/OVJ.2023.v13.i9.19.
- [16] TANI Y, MURATA S, MAEDA N, et al. A spontaneous testicular teratoma in an ICR mouse[J]. Toxicol Pathol, 1997, 25(3):317-320. DOI: 10.1177/019262339702500309.
- [17] BUSTAMANTE-MARIN X M, CAPEL B. Oxygen availability influences the incidence of testicular teratoma in *Dnd1Ter⁰* mice[J]. Front Genet, 2023, 14: 1179256. DOI: 10.3389/fgene.2023.1179256.
- [18] SMITH R S, MILLER J V, SUNDBERG J P. Intraocular teratoma in a mouse[J]. Comp Med, 2002, 52(1): 68-72. DOI: 10.1053/svms.2002.30835.
- [19] SUNDSTRÖM J, PELLINIEMI L J, KUOPIO T, et al. Characterization of the model for experimental testicular teratoma in 129/SvJ-mice[J]. Br J Cancer, 1999, 80(1-2): 149-160. DOI: 10.1038/sj.bjc.6690334.
- [20] 孙慧, 宁连胜, 韩宝国. 小鼠自发卵巢恶性畸胎瘤: 一例报告[J]. 实验动物科学, 1989, 20(2):8-9. DOI:CNKI:SUN:SYDG.0.1989-02-002.
SUN H, NING L S, HAN B G. Spontaneous malignant ovarian teratoma in mice: a case report[J]. Lab Anim Sci, 1989, 20(2):8-9. DOI:CNKI:SUN:SYDG.0.1989-02-002.
- [21] 高亚奇, 陈伟盛, 梁宁, 等. 一例小鼠自发性成熟型畸胎瘤[J]. 实验动物与比较医学, 2019, 39(5):405-407. DOI: 10.3969/j. issn. 1674-5817.2019.05.013.
GAO Y Q, CHEN W S, LIANG N, et al. A case of spontaneous mature teratoma in mice[J]. Lab Anim Comp Med, 2019, 39(5): 405-407. DOI: 10.3969/j.issn.1674-5817.2019.05.013.

(收稿日期: 2024-05-20 修回日期: 2024-10-10)
(本文编辑: 翟玉凤, 富群华, 丁宇菁, 张萍)

[引用本文]

赵赫, 张帆, 肖宇宙, 等. 一例干扰素受体缺失小鼠自发未成熟型睾丸畸胎瘤诊断[J]. 实验动物与比较医学, 2024, 44(6): 691-694. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.070.
ZHAO H, ZHANG F, XIAO Y Z, et al. Preliminary diagnosis and characterization of a spontaneous immature testicular teratoma in an interferon receptor-deficient mouse[J]. Lab Anim Comp Med, 2024, 44(6): 691-694. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.070.

一例新西兰白兔系统性淀粉样变性病理学诊断

林晴晴^{1,2,3}, 戴锦龙^{1,2,3}, 陈志森^{1,2,3}, 郭健敏^{1,2,3}, 杨威^{1,2,3}

(1. 广东莱恩医药研究院有限公司, 广州 510990; 2. 广州湾区生物医药研究院, 广州 510990; 3. 广东省药物非临床评价与研究重点实验室, 广州 510990)

[摘要] 目的 通过1例新西兰白兔系统性淀粉样变性的病理学诊断, 为实验动物淀粉样变性的诊断提供参考。**方法** 在一项为期6个月的重复滴眼给药毒性试验中, 发现1只新西兰白兔的常规大体解剖检查异常, 随后将其各脏器组织制作成石蜡切片, 进行苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色和刚果红染色, 于光学显微镜和偏振光显微镜下观察其病理组织学特征。**结果** 大体解剖后肉眼形态观察见该例动物的脾脏偏大, 肺脏颜色和质地改变。对各脏器组织进行HE染色后显示: 脾脏组织结构被破坏, 脾脏白髓周围被致密淀粉样沉积物以结节环的形式包围, 白髓可见压力性萎缩; 颌下淋巴结、肠系膜淋巴结以及回肠、圆小囊、蚓突、空肠、盲肠和直肠亦可见淀粉样蛋白沉积。刚果红染色显示, 各受影响脏器组织内淀粉样蛋白呈鲑鱼粉色, 在偏振光显微镜下呈现特殊的苹果绿双折光。**结论** 该例新西兰白兔的各脏器组织病理特征符合系统性淀粉样变性的诊断特征。

[关键词] 淀粉样变性; 脾脏; 病理形态学; 新西兰白兔

[中图分类号] S852.31; Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2024)06-0695-05



Pathological Diagnosis of Systemic Amyloidosis in a New Zealand White Rabbit

LIN Qingqing^{1,2,3}, DAI Jinlong^{1,2,3}, CHEN Zhisen^{1,2,3}, GUO Jianmin^{1,2,3}, YANG Wei^{1,2,3}

(1. Guangdong Lewwin Pharmaceutical Research Institute Co., Ltd., Guangzhou 510990, China; 2. Guangzhou Bay Area Institute of Biomedicine, Guangzhou 510990, China; 3. Guangzhou Provincial Key Laboratory of Drug Non-Clinical Evaluation and Research, Guangzhou 510990, China)

Correspondence to: YANG Wei (ORCID: 0000-0001-9731-197X), E-mail: ywdoccn@163.com

[ABSTRACT] Objective To provide a reference for the diagnosis of amyloidosis in experimental animals through the pathological diagnosis of systemic amyloidosis in a case of a New Zealand white rabbit. **Methods** In a 6-month repeated ocular toxicity study, an abnormal finding was noted during the routine gross anatomical examination of one New Zealand white rabbit. Its organs were prepared as paraffin sections and stained with hematoxylin-eosin (HE) staining and Congo red staining. The histopathological features were observed under optical and polarized light microscopy. **Results** Gross anatomical examination of the animal revealed an enlarged spleen and changes in the color and texture of the lung. HE staining showed that the splenic tissue structure was destroyed, the white pulp of the spleen was surrounded by dense amyloid deposition in the form of nodular rings, along with pressure atrophy of the white pulp. Amyloid deposits were also observed in the submandibular lymph nodes, mesenteric lymph nodes, ileum, sacculus rotundus, vermiform appendix, jejunum, cecum, and rectum. Congo red staining showed that the amyloid deposition in the affected organs appeared salmon-pink, and exhibited characteristic apple green birefringence under polarized light microscopy. **Conclusion** The histopathological features of the New Zealand white rabbit are consistent with the diagnostic characteristics of systemic amyloidosis.

[Key words] Amyloidosis; Spleen; Pathological morphology; New Zealand white rabbit

[基金项目] 广东省科技计划项目(科技创新平台类)“广东省药物非临床评价研究企业重点实验室”(2023B1212070029); 广东省重大人才工程项目“广东特支计划”科技创业领军人才-杨威”(2021TY060021)

[第一作者] 林晴晴(1994—), 女, 硕士, 研究方向: 毒性病理学。E-mail: linqingqing@lewin.com.cn

[通信作者] 杨威(1978—), 男, 博士, 高级工程师, 研究方向: 新药临床前安全性评价研究工作。E-mail: ywdoccn@163.com。ORCID: 0000-0001-9731-197X

淀粉样变性 (amyloidosis) 是淀粉样蛋白在机体局部或全身性多器官沉积导致组织结构破坏、器官功能障碍的一类进行性疾病的总称。系统性淀粉样变性已在多种物种中被观察到, 包括人类、家畜及实验动物^[1-3]。相较于人类, 动物系统性淀粉样变性的研究较少, 尤其在新西兰白兔中, 自发性系统性淀粉样变性未见相关文献报道。本课题组在一项使用实验动物新西兰白兔的为期6个月的重复滴眼给药毒性试验过程中, 发现受试动物低剂量组有1例新西兰白兔的既定病理学检查结果疑似系统性淀粉样变性。因此, 本文通过总结该病例各脏器的肉眼观察、HE染色及刚果红染色结果, 对其病理组织学特征进行初步探讨, 以期为新西兰白兔的自发性系统性淀粉样变性诊断提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验动物

本研究对象来自一项为期6个月、使用新工艺阿托品滴眼液的重重复滴眼毒性试验。该实验设5组, 共120只新西兰白兔, 分别为阴性对照组、低剂量组 (0.02 mg/d)、中剂量组 (0.04 mg/d)、高剂量组 (0.08 mg/d) 以及旧工艺高剂量组 (0.08 mg/d), 每天滴眼给药1次 (100 μ L/眼), 连续给药5个月, 分别于给药中期、给药末期以及给药结束后恢复4周, 按实验计划对动物进行病理学检查。该例新西兰白兔为连续5个月滴眼给予中剂量阿托品滴眼液的恢复期动物, 雌性, 普通级, 7月龄, 安乐死前体重为2.992 kg, 购自湖南太平生物科技有限公司 [SCXK (湘) 2020-0005]。动物饲养于广东莱恩医药研究院有限公司的普通级环境兔/豚鼠观察室 [SYXK (粤) 2022-0146], 单笼饲养, 环境温度为16~26 $^{\circ}$ C, 相对湿度为40%~70%。该重复滴眼给药毒性试验的研究方案及过程符合实验动物福利伦理相关要求, 并通过广东莱恩医药研究院有限公司动物管理与使用委员会批准 (IA-SE2022081-01、IASE2022081-02)。

1.2 实验仪器

ASP300S全自动组织脱水机、EG1150H石蜡包埋机、EG1150C冷台、RM2016轮转式切片机、ST5020多功能染色机、DM3000生物显微镜和DMC4500病理图像分析系统均购自德国LEICA公司; Aperio GT 450扫片机购自徕卡显微系统 (上海) 有限公司; BCE224-1CCN电子天平购自赛多利斯科学仪器 (北

京) 有限公司。

1.3 主要试剂

苏木精染液购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司 (批号G2115209); 伊红Y (醇溶性) 购自上海麦克林生化科技股份有限公司 (批号I2018021); 甲醇刚果红染色液购自珠海贝索生物技术有限公司 (批号C240301)。

1.4 病理学检查

重复滴眼给药毒性试验结束后, 根据受试动物体重, 使用丙泊酚乳状注射液, 通过静脉注射进行全身麻醉, 麻醉剂量为16 mg/kg。在动物进入外科麻醉期后, 通过腹主动脉采血方式实施安乐死。按既定方案进行常规大体解剖检查 (含全身46个脏器), 留取组织样本并用体积分数为10%的中性甲醛溶液固定 (眼和睾丸用Davison's固定液进行快速固定)。当发现其他任何组织器官出现体积、颜色、质地等异常改变时, 均详细记录并加以固定。所有固定后的组织样本经常规取材、脱水、石蜡包埋, 参照HE染色操作流程以及甲醇刚果红试剂说明书进行HE染色和甲醇刚果红染色, 然后在光学显微镜及偏振光镜下观察染色结果。本研究对象在之前饲养及试验过程中未出现明显异常, 而是在给安乐死后的系统剖检时发现异常。

2 结果

2.1 肉眼形态观察及脏器系数

该例新西兰白兔的体表检查完好无损, 生理腔道未见异常分泌物; 脏器剖检后肉眼观察可见: 脾脏偏大, 测量尺寸约为7.5 cm \times 1.5 cm \times 0.5 cm (图1), 质量为5.209 g, 脏体系数为0.174, 脏脑系数为0.533; 肺脏多处呈灰红色, 较正常肺组织质地略硬; 其余脏器的解剖位置正常, 颜色正常且有光泽, 质地均匀, 未见异常增大或缩小。



图1 1例疑似系统性淀粉样变性新西兰白兔的脾脏
Figure 1 Spleen of a New Zealand white rabbit suspected of systemic amyloidosis

2.2 系统性淀粉样变性的病理学诊断

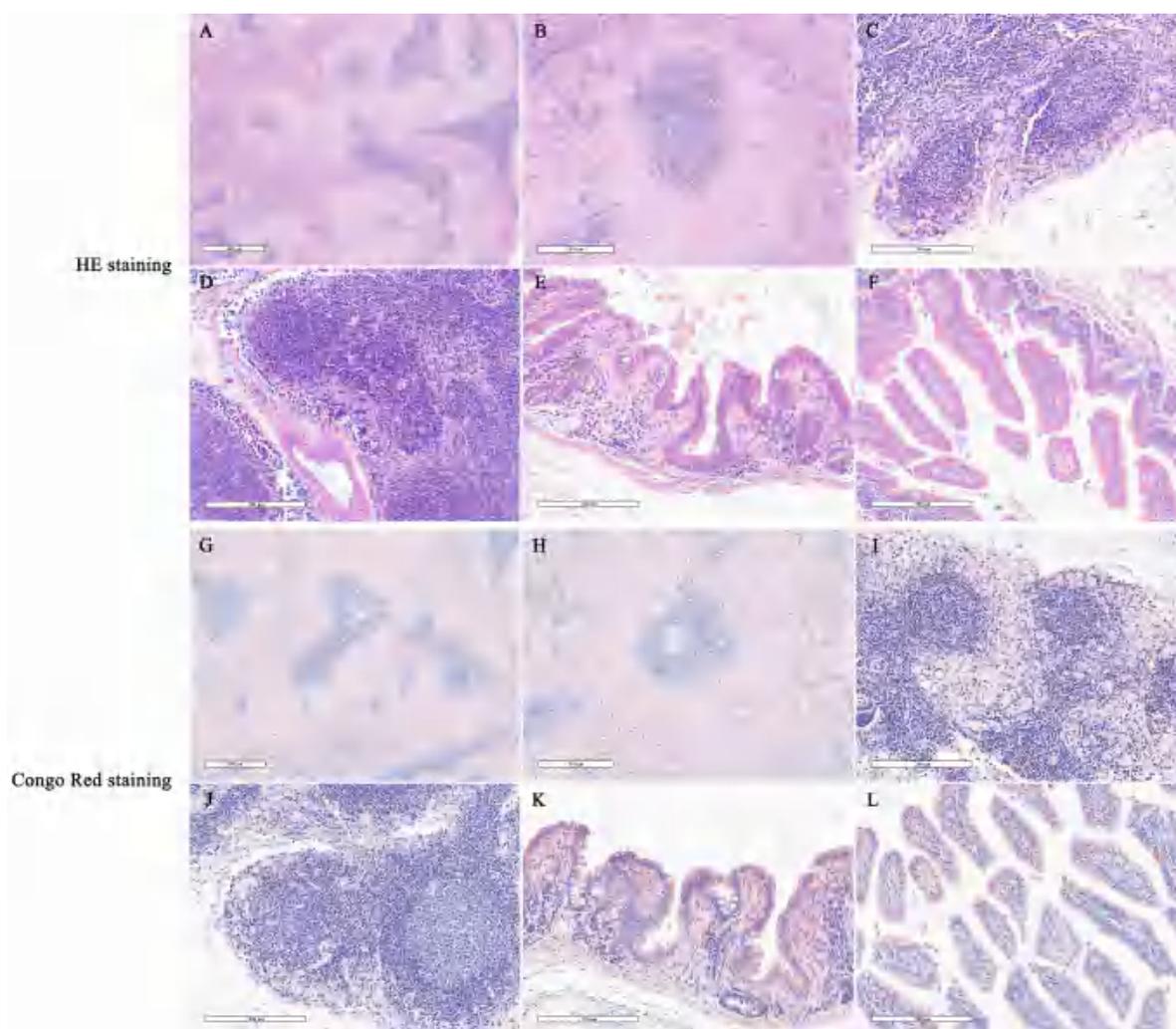
2.2.1 HE 染色的组织学检查结果

经常规石蜡制片及HE染色后,在光学显微镜下检查这例新西兰白兔全身46个脏器组织,包括心脏、肝脏、脾脏、肾脏、肺脏、胸腺、胸骨、股骨、淋巴结、胃肠道等。其中,在脾脏、肠系膜淋巴结、颌下淋巴结及各肠道等部位可见疑似淀粉样沉积(图2)。

在低倍镜下,脾脏组织结构被破坏,骨髓周围被致密的、疑似嗜酸性淀粉样蛋白团块所环绕,导致白

髓面积占比及其细胞数量明显减少,即骨髓呈压力性萎缩(图2A);在高倍镜下,脾脏骨髓边缘区淋巴细胞已不可见,仅残存部分动脉周围淋巴鞘(图2B)。

受影响的免疫组织还包括颌下淋巴结(图2C)及肠系膜淋巴结(图2D),其中不定形的淀粉样物质沉积在淋巴结被膜下位置,甚至可延至浅层皮质区。此外,在胃肠道组织,如回肠、圆小囊、蚓突、空肠、盲肠和直肠的黏膜层,亦可见疑似淀粉样蛋白沉积(图2E~F)。



注: A~F分别为HE染色后低倍镜下脾脏($\times 40$)以及高倍镜下脾脏($\times 100$)、颌下淋巴结($\times 200$)、肠系膜淋巴结($\times 200$)、直肠($\times 200$)和回肠($\times 200$)的淀粉样蛋白沉积; G~L为刚果红染色后同一倍数显微镜下的脾脏、颌下淋巴结、肠系膜淋巴结、直肠和回肠的组织学形态。各图标尺分别为 $600\ \mu\text{m}$ (A、G)、 $300\ \mu\text{m}$ (B、H)和 $200\ \mu\text{m}$ (C~F、I~L)。

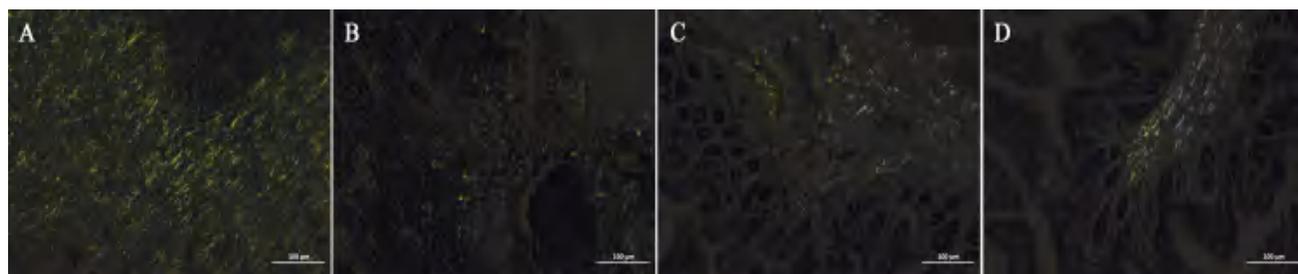
Note: A-F show amyloid deposition in the spleen at low magnification ($\times 40$) and high magnification ($\times 100$), submandibular lymph node ($\times 200$), mesenteric lymph nodes ($\times 200$), rectum ($\times 200$) and ileum ($\times 200$); G-L show histological morphology of spleen, submandibular lymph nodes, mesenteric lymph nodes, rectum, and ileum under the same magnification after Congo red staining. Scale bars: $600\ \mu\text{m}$ (A, G), $300\ \mu\text{m}$ (B, H), $200\ \mu\text{m}$ (C-F, I-L).

图2 1例系统性淀粉样变性新西兰白兔受影响器官组织的普通光学显微观察

Figure 2 General optical microscopic observation of affected organs in a New Zealand white rabbit with systemic amyloidosis

2.2.2 刚果红染色的组织学检查结果

刚果红染色结果显示, 新西兰白兔的脾脏、肠系膜淋巴结、颌下淋巴结及各肠道等受影响脏器组织内的淀粉样蛋白呈鲑鱼粉色(图2G~L), 其粉染的淀粉样蛋白的分布区域与HE染色结果相一致, 分别位于脾脏白髓周围、淋巴结的被膜下区以及肠道的黏膜层。在偏振光显微镜下, 脾脏、淋巴结和肠道组织内沉积的淀粉样蛋白呈现特殊的苹果绿双折光(图3), 表明该病例符合系统性淀粉样蛋白变性的诊断特征。

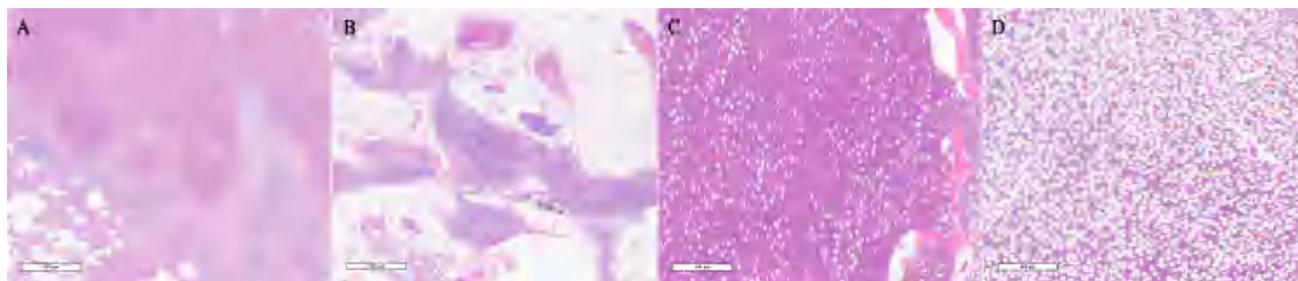


注: A, 脾脏; B, 颌下淋巴结; C, 直肠; D, 回肠。标尺为100 μm。

Note: A, spleen; B, submandibular lymph nodes; C, rectum; D, ileum. Scale bar: 100 μm (A-D).

图3 1例系统性淀粉样变性新西兰白兔受影响器官组织的偏振光显微检查(刚果红染色, ×200)

Figure 3 Polarized light microscopy of affected organ tissue in a New Zealand white rabbit with systemic amyloidosis (Congo red staining, ×200)



注: A, 肺脏重度弥漫性炎症; B, 胸腺萎缩; C, 骨髓腔内细胞数量弥漫性增多; D, 同期正常对照动物的骨髓细胞。图中所有标尺为600 μm。

Note: A, Severe diffuse inflammation of the lungs; B, Thymic atrophy; C, Diffuse increase in cellularity in the bone marrow cavity; D, Bone marrow micrograph of normal control animals at the same time point. All scale bars in the figure are 600 μm (A-D).

图4 1例系统性淀粉样变性新西兰白兔的其他脏器组织病理学观察(HE染色, ×40)

Figure 4 Histopathology of other organs of a New Zealand white rabbit with systemic amyloidosis (HE staining, ×40)

3 讨论

根据国际淀粉样变性学会(International Society of Amyloidosis)所发布的指南,“淀粉样蛋白”一词主要指细胞外的纤维蛋白沉积物, 这些沉积物可通过刚果红染色及偏振光显微镜相结合而识别, 并可基于淀粉样蛋白类型进行分类^[4]。目前, 动物中已知的淀粉样蛋白共分为10种, 其中多数哺乳动物和鸟类的淀粉样蛋白为AA型, 即其淀粉样原纤维蛋白来源于血清淀粉

2.3 其他脏器组织的异常改变

HE染色结果显示, 该例动物其余脏器组织还表现出以下异常的改变; 肺脏呈现重度弥漫性炎症, 以中性粒细胞和单个核细胞浸润为主, 同时可见肺泡腔渗出/水肿(图4A); 胸腺萎缩表现为皮髓质淋巴细胞数量减少, 分界不清, 周围见脂肪组织(图4B); 骨髓腔内细胞数量弥漫性增多, 以中性粒细胞和浆细胞为主, 脂肪细胞数量相对减少(图4C); 同期正常对照动物的骨髓情况见图4D。

样蛋白A (serum amyloid A, SAA)。AA型淀粉样变性通常与感染性、炎症性疾病和恶性肿瘤相关, 来源于急性期反应物——SAA的降解, 也被称为继发性淀粉样变性^[5]。本研究中, 该例动物的病理学检查显示其存在严重的肺脏炎症, 提示这种炎症可能与全身多脏器组织的淀粉样蛋白沉积相关。

在淀粉样变性晚期病例中, 几乎所有脏器组织都可能受到影响, 但大多数哺乳动物的淀粉样变性通常发生在特定器官或器官群中^[6]。早期研究中, Jakbo^[6]

根据淀粉样蛋白沉积部位的解剖学分类方法,分析了典型的淀粉样沉积特征,即淀粉样蛋白主要沉积在脾脏、肝脏、肾脏和肾上腺中,并随着物种不同而改变沉积偏好部位;而在非典型案例中,其他器官组织也可受影响。脾脏作为典型淀粉样变性中最常受影响的器官,淀粉样蛋白常沉积在淋巴滤泡、红髓、小动脉壁和被膜。在本研究中,这例新西兰白兔的脾脏中发现了相对大量的淀粉样蛋白沉积,提示脾脏为淀粉样变性典型的好发部位,且其淀粉样蛋白主要沉积在滤泡周围及红髓中,并在白髓周围呈结节状分布;这种严重的脾脏淀粉样变性可导致白髓压力性萎缩,进而使脾脏的功能受损。与脾脏相比,该动物其余淋巴结、肠道等部位的淀粉样蛋白沉积相对较少。

在小鼠和豚鼠等实验动物中,可以通过持续性给予炎症刺激诱导AA型淀粉样变性^[2,7-8]。当实验性地通过口服或静脉注射外源蛋白诱导动物发生AA型淀粉样变性时,观察到最早的淀粉样蛋白沉积在脾脏中^[9-11]。这可能与脾脏过滤功能相关,即与其他器官组织相比,淀粉样蛋白在循环经过脾脏时更容易被蓄积。也有文献支持淀粉样蛋白可能通过体内免疫细胞转运^[8],这可以解释本研究中观察到各淋巴结中也有淀粉样蛋白沉积的现象。除主要的淀粉样沉积部位外,其他部位如胃肠道也是系统性淀粉样变性的常见受影响部位。

综上,本研究通过分析1例新西兰白兔疑似系统性淀粉样变性的组织形态学特征,为该种属动物淀粉样沉积部位的解剖学模式提供参考。

[医学伦理声明 Medical Ethics Statement]

本研究涉及的所有动物实验已通过广东莱恩医药研究院有限公司动物管理与使用委员会批准(批号:IA-SE2022081-01、IASE2022081-02),所有实验操作均按照广东莱恩医药研究院有限公司标准操作规程进行,遵循中国实验动物相关法律法规条例要求。

All animal experimental protocols involved in the study have been approved by the Animal Management and Use Committee of the Guangdong Lewwin Pharmaceutical Research Institute Co., Ltd. (Approval No. IA-SE2022081-01, IASE2022081-02). All experimental operations have been carried out in accordance with the standard operating procedures of the Guangdong Lewwin Pharmaceutical Research Institute Co., Ltd., and in compliance with the requirements of the relevant laws and regulations on experimental animals in China.

[作者贡献 Author Contribution]

林晴晴负责实验操作、论文撰写;

戴锦龙参与实验操作、指导工作;
陈志森负责动物剖检工作;
郭健敏、杨威负责指导工作以及文章修改。

[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] MURAKAMI T, ISHIGURO N, HIGUCHI K. Transmission of systemic AA amyloidosis in animals[J]. *Vet Pathol*, 2014, 51(2): 363-371. DOI: 10.1177/0300985813511128.
- [2] MURAKAMI T, INOSHIMA Y, ISHIGURO N. Systemic AA amyloidosis as a prion-like disorder[J]. *Virus Res*, 2015, 207:76-81. DOI: 10.1016/j.virusres.2014.12.019.
- [3] MIRIOGLU S, ULUDAG O, HURDOGAN O, et al. AA amyloidosis: a contemporary view[J]. *Curr Rheumatol Rep*, 2024, 26(7):248-259. DOI: 10.1007/s11926-024-01147-8.
- [4] BENSON M D, BUXBAUM J N, EISENBERG D S, et al. Amyloid nomenclature 2018: recommendations by the International Society of Amyloidosis (ISA) nomenclature committee[J]. *Amyloid*, 2018, 25(4): 215-219. DOI: 10.1080/13506129.2018.1549825.
- [5] 赵亮, 黄湘华. AA型淀粉样变性的研究进展[J]. *肾脏病与透析肾移植杂志*, 2021, 30(1): 69-74. DOI: 10.3969/j.issn.1006-298X.2021.01.015.
- [6] ZHAO L, HUANG X H. Advances in AA amyloidosis[J]. *J Nephrol Dialy Transplant*, 2021, 30(1): 69-74. DOI: 10.3969/j.issn.1006-298X.2021.01.015.
- [7] JAKOB W. Spontaneous amyloidosis of mammals[J]. *Vet Pathol*, 1971, 8(4):292-306. DOI: 10.1177/030098587100800402.
- [8] KUROIWA M, AOKI K, IZUMIYAMA N. Histological study of experimental murine AA amyloidosis[J]. *J Electron Microsc* (Tokyo), 2003, 52(4):407-413. DOI: 10.1093/jmicro/52.4.407.
- [9] MCADAM K P, SIPE J D. Murine model for human secondary amyloidosis: genetic variability of the acute-phase serum protein SAA response to endotoxins and casein[J]. *J Exp Med*, 1976, 144(4):1121-1127. DOI: 10.1084/jem.144.4.1121.
- [10] IWAIDE S, OBA R, KOBAYASHI N, et al. Local administration of amyloid enhancing factor initiates *in situ* amyloid A deposition followed by systemic lesions in mice[J]. *Exp Anim*, 2023, 72(2):218-223. DOI: 10.1538/expanim.22-0125.
- [11] MURAKAMI T, MUHAMMAD N, INOSHIMA Y, et al. Experimental induction and oral transmission of avian AA amyloidosis in vaccinated white hens[J]. *Amyloid*, 2013, 20(2): 80-85. DOI: 10.3109/13506129.2013.783474.
- [12] KENNEL S J, MACY S, WOOLIVER C, et al. Phagocyte depletion inhibits AA amyloid accumulation in AEF-induced hull-6 transgenic mice[J]. *Amyloid*, 2014, 21(1): 45-53. DOI: 10.3109/13506129.2013.876400.

(收稿日期:2024-07-06 修回日期:2024-10-11)

(本文编辑:张俊彦,富群华,丁宇菁,吴昊晟)

[引用本文]

林晴晴, 戴锦龙, 陈志森, 等. 一例新西兰白兔系统性淀粉样变性病理学诊断[J]. *实验动物与比较医学*, 2024, 44(6): 695-699. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.092.

LIN Q Q, DAI J L, CHEN Z S, et al. Pathological diagnosis of systemic amyloidosis in a New Zealand white rabbit[J]. *Lab Anim Comp Med*, 2024, 44(6): 695-699. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.092.



孙强，研究员，博士生导师，中国科学院脑科学与智能技术卓越创新中心非人灵长类研究平台主任。系国家杰出青年科学基金获得者、科技部中青年科技创新领军人才，并且荣获2018年谈家桢生命科学创新奖、2019年国务院政府特殊津贴、2020年药明康德生命化学研究奖-学者奖、2022年度上海市自然科学奖一等奖。同时是中国实验动物学会理事、灵长类实验动物专业委员会常务理事，上海市实验动物学会理事、生物安全专业委员会委员。长期致力于实验动物管理和模式动物构建及相关技术的研发工作，获得中国首批“试管食蟹猴”，利用慢病毒转染和基因编辑技术先后构建了多种实验猴疾病动物模型，建立了基于精巢异种移植和激素注射的实验猴成熟加速技术，并在国际上首次得到体细胞克隆猴和胚胎干细胞高比例嵌合的食蟹猴。同时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，是“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。

殊途同归的免疫缺陷小鼠培育史

孙强

(中国科学院脑科学与智能技术卓越创新中心, 上海 200031)



[中图分类号] Q95-33 [文献标志码] B [文章编号] 1674-5817(2024)06-0700-04

继本专栏推出的《近交系小鼠培育及其背后的故事》^[1]《NOD小鼠培育接力赛》^[2]之后，本期我们将目光投向具有独特免疫缺陷特性的实验小鼠模型——无胸腺裸鼠（又称“裸小鼠”）和重症联合免疫缺陷（severe combined immunodeficiency, SCID）小鼠。接下来的内容将详细介绍裸小鼠和SCID小鼠的培育历程、生物学特性及其在科研中的应用价值，以期为读者提供一个全面而深入的视角，增进对这些具有特殊表型的实验小鼠的理解和认识，推动相关领域的发展与进步。

早在基因工程技术应用于小鼠模型构建之前，裸小鼠和SCID小鼠就因先天性免疫缺陷而成为医学生物学研究领域不可或缺的实验动物，特别是在肿瘤学和免疫学研究、药品与生物制品的安全性评价、有效药品的临床前筛选等方面，都发挥了重要的作用。然而，这两种小鼠的培育历程却截然不同。

1 裸小鼠的起源及发现历程

1.1 裸小鼠的起源与遗传特性

裸小鼠的起源可追溯至20世纪60年代初，最先是由英国格拉斯哥（Glasgow）鲁契尔医院病毒实验室的玛格丽特·格里斯特（Margaret Grist）博士在其饲养的白化小鼠种群（非近交系）中发现的。1962年，有关这一突变小鼠的详细信息被正式记录并发表于《小

鼠简讯》^[3]。但在当时，格里斯特博士对这只全身赤裸、无被毛的小鼠并没有多大兴趣，故未对其开展深入的探索与分析。

4年后，爱丁堡动物遗传研究所（the Institute of Animal Genetics, IAG）的斯坦利·帕特里克·佛拉纳根（Stanley Patrick Flanagan）从格里斯特处得到1只裸小鼠和2只同窝有被毛个体，并对其进行了遗传学和生物学特性分析。遗憾的是，这只裸小鼠（雄性）在死亡前没有得到后代；而另外两只被毛正常（雌雄各一）的个体在交配后，成功产下两窝共23个子代。佛拉纳根利用这些子代小鼠进行互交，其中一对产下的后代中再次出现了无毛个体。根据后代性状分离数据，他确定产下无毛个体的这对父母为杂合子。随后，佛拉纳根利用这对杂合子和它们的后代建立了裸小鼠种群，并将导致无毛特征的突变基因命名为“Nude”，简称为“nu”。

佛拉纳根还发现雌性裸小鼠的生育能力极其低下。他将46只雌性裸小鼠与正常被毛雄鼠进行配对后，仅有4只成功产子，且这些雌性裸小鼠因乳腺发育不良无法产生乳汁而不能将子代养大。之后，佛拉纳根还对裸小鼠的生长状况、毛发发育过程、nu基因与已知突变基因的连锁情况进行了研究，并在1966年将上述结果进行整理后发表^[4]。遗憾的是，尽管佛拉纳根的研究涵盖了多个方面，但当时尚未发现裸小鼠最重要

的特性——无胸腺。

1.2 裸小鼠的免疫缺陷特性及其发现历程

在裸小鼠出现之前，细胞免疫学领域的研究常依赖于两种手段来操控小鼠的T细胞生成：一是使用药物抑制小鼠T细胞的产生，二是通过外科手术摘除小鼠的胸腺。早在1944年，McEndy等^[5]就发现早期切除高发白血病的AKR小鼠胸腺可以降低小鼠的白血病发生率；而切除C58小鼠的胸腺可有效抑制化学或辐射诱导的白血病发生。胸腺切除后，不仅会导致小鼠循环系统内淋巴细胞数目减少，还会导致抗体生成量减少。这些发现均表明，胸腺在免疫应答过程中发挥着重要作用。因此，胸腺切除术也成为当时制备免疫缺陷动物模型的常规方法。然而，胸腺切除术也存在致命的弱点。即幼年动物在胸腺切除后，往往因感染而在1~3周内死亡，或因胸腺切除不彻底而导致实验失败^[6]。同时，在模型制作过程中，胸腺切除不可避免地会给实验动物带来疼痛和不适。

1968年，苏格兰斯特拉斯克莱德大学（University of Strathclyde）生物学系的佩蒂路易斯（E. M. Pantelouris）从爱丁堡动物遗传研究所得到了裸小鼠。在解剖过程中，意外地发现裸小鼠胸腺发育不全^[7]。佩蒂路易斯进一步分析发现，裸小鼠的白细胞数量明显低于正常小鼠，仅为同窝野生型小鼠的1/4。裸小鼠天生缺乏胸腺，即意味着其有望替代胸腺切除小鼠，成为一种天然的免疫缺陷动物模型。这一发现的重要性远远超出其裸露无毛表型。因此，佩蒂路易斯的相关成果一经报告，便迅速引起了科学界的广泛关注。然而，在裸小鼠成为广泛可用的动物模型之前，如何提升其繁殖效率与生存能力是亟待解决的关键问题。

佛拉纳根在分析裸小鼠的生物学特性时发现，纯合型裸小鼠的生长速度比野生型或杂合同窝小鼠减缓了约30%。同时，他还发现，雌性裸小鼠的卵巢体积小，黄体缺失；雄性裸小鼠的精子活力差，精子尾部有卷曲等现象。这些特性都预示着裸小鼠的生殖能力存在问题。此外，裸小鼠的生存能力也是个大问题。因为在20世纪60年代，还不具有饲养无特定病原菌（specific pathogen free, SPF）级别动物的设施条件，无法控制动物种群中各种病原微生物的污染。裸小鼠因其免疫缺陷特性而无法抵抗病原微生物的侵袭。因此，在最初发现裸小鼠时，有超过一半的个体在出生后第2周死亡，仅有10%的个体能够存活至12周龄。若上述问题未能得到有效解决，裸小鼠便无法成为真

正可用的动物模型。

利用裸小鼠与其他品种小鼠进行杂交，是否可以筛选出携带 nu 基因的高生育力品系？这项研究最先是由丹麦哥本哈根病理解剖研究所的病理学家——雷加德（Rygaard）和波维森（Povlsen）开展的。有趣的是，他们开展该实验的目的是验证当时新提出的“肿瘤免疫监控理论”。为此，他们将从爱丁堡动物遗传研究所得到的裸小鼠分别和纯系BALB/c、C3H、C57BL/6小鼠交配，并不断选育，成功获得了3种近交系裸小鼠新品系^[8]。这项工作是在1969—1972年完成的。在此期间，雷加德和波维森将 nu 基因引入到不同遗传背景的近交系小鼠中，虽然在一定程度上改善了裸小鼠的生物学性状，但仍未能克服其繁殖力低下和存活时间过短的问题。

1974年，美国国立卫生研究院（National Institutes of Health, NIH）的汉森团队取得了突破性进展。他们成功地将BALB/c背景品系下的 nu 基因引入到了Swiss NIH远交系小鼠中，从而培育出了远交系裸小鼠。这一新品系裸小鼠的繁殖能力和抗病能力都得到了明显加强，研究者可以直接利用 nu/nu 纯合型雌雄鼠进行交配繁育后代^[9]。在进一步引入了SPF饲养体系后，裸小鼠感染病原微生物的风险显著降低，从而极大地延长了裸小鼠的寿命，使其能够达到接近于常规近交系小鼠的寿命水平。

1996年，决定裸小鼠表型的突变基因被确定，是由 $Foxn1$ 基因点突变导致编码蛋白提前终止，从而形成截短的无功能蛋白。该突变基因被称为 $Foxn1^{nu}$ ^[10]。显然 $Foxn1$ 基因具有多效性，能够同时影响小鼠的毛发和胸腺发育。裸体特征是携带纯合 $Foxn1^{nu}$ 的小鼠毛囊中毛杆无法正常穿透表皮生长所致。

综上，裸体是一个易于观察和发现的表型，但很少有人会将其与免疫缺陷相联系。佛拉纳根虽然对裸小鼠的生物学特性进行了系统的分析，但却与发现裸小鼠的胸腺发育不良这一重要特性失之交臂。相比之下，佩蒂路易斯则更为细心和幸运，在裸小鼠突变体首次出现后的7年里，经过坚持不懈探索，最终发现了胸腺缺乏这一重要的生物学特性。鉴于当时艰难的保种和繁育条件，以及裸小鼠低生育力和低生存能力的背景，能够成功保留该突变个体实属难得。若不是因为发现其无胸腺，裸小鼠很可能早已淡出科学家的视野。尽管其裸露表型显而易见，但胸腺发育不良这一关键特性的发现却需要研究者具有细致入微的观察

力和些许运气，而这也正是科学探索的魅力所在。

2 SCID小鼠的发现及培育历程

2.1 SCID小鼠的发现与遗传特性

SCID小鼠是一种比裸小鼠更为严重的免疫缺陷型小鼠，无疑是继裸小鼠之后另一种极具研究价值的免疫缺陷型实验动物。然而，SCID小鼠的发现和培育却经历了与裸小鼠培育完全不同的历程。

20世纪80年代初，位于美国费城的福克斯蔡斯癌症研究中心（Fox Chase Cancer Center）的研究人员梅尔文·波斯玛（Melvin J. Bosma），采用免疫球蛋白重链（immunoglobulin heavy chain, Igh）同源导入近交系小鼠C.B-17，开展血清内不同亚型免疫球蛋白的定量分析实验。同源导入近交系是指通过连续多次回交后将一个基因导入到另一个近交系而培育成的新近交系。C.B-17就是通过连续的回交，将C57BL/6小鼠所携带的Igh^b亚型等位基因导入BALB/c小鼠，进而替代BALB/c原有的Igh^a亚型等位基因，从而形成的同源导入近交系小鼠。C.B-17小鼠与BALB/c小鼠唯一的不同就是Igh位点，前者为Igh^b/Igh^b，而后者为Igh^a/Igh^a。

2.2 SCID小鼠的免疫功能研究历程

在分析C.B-17小鼠血清中的Igh表达量时，波斯玛意外发现有4只（4/35）小鼠的血清内未检测到Igh^b基因的表达产物^[11]（产物浓度 $\leq 1 \mu\text{g/mL}$ ）。起初，波斯玛认为可能是这几只小鼠在繁殖过程中出现了遗传污染，且污染源最有可能是BALB/c小鼠。为了验证这一假设，细心的波斯玛利用特异性检测Igh^a表达产物的试剂，对这4份血清样本进行了分析。然而，结果仍是阴性，说明这4只小鼠并未如先前所推测的那样，受到来自BALB/c小鼠的遗传污染。

面对这一难以解释的现象，波斯玛决定采取更为全面的检测策略，对其目前可用的所有免疫球蛋白相关试剂进行了测试。令人惊讶的是，这4只小鼠的免疫球蛋白家族成员中IgM、IgG3、IgG2b、IgG2a和IgA也不见了。这是一个极不寻常的结果。为便于后续的描述与分析，我们将此类无法检测到免疫球蛋白的个体暂时命名为Ig⁻小鼠；相应地，将可检测到免疫球蛋白的个体称为Ig⁺小鼠。

波斯玛通过谱系检查发现，这4只Ig⁻小鼠是同窝出生的兄妹，该窝另有3只Ig⁺个体。血清学分析结果显示，该窝小鼠的父亲也是Ig⁻，而母亲则是Ig⁺。上述结果表明，这些Ig⁻小鼠很可能是由于遗传突变所致。

为了验证这个假设，波斯玛用4只Ig⁻小鼠（雌雄各2只）两两进行交配后，发现所得5只后代全部为Ig⁻。接着，他将其中一只Ig⁻雄鼠与同窝的Ig⁺雌鼠进行交配，得到的5只后代中，有3只为Ig⁻，2只为Ig⁺。基于孟德尔遗传学定律，结合谱系与遗传分析结果，波斯玛得出结论：Ig⁻表型是由某个隐性突变基因所导致的。

进一步的分析结果表明，Ig⁻小鼠同时缺乏功能性T淋巴细胞和B淋巴细胞。早在20世纪50年代，学术界就有因先天性缺乏功能性T、B两种淋巴细胞而导致一类被称为SCID的病例报告^[12]。基于此，波斯玛将这个突变基因命名为*Scid*，并将这种小鼠命名为SCID小鼠^[13]。具体而言，纯合的C.B-17^{scid/scid}小鼠为Ig⁻个体，杂合型C.B-17^{+scid}小鼠为Ig⁺个体。

SCID小鼠的外观与其主要遗传背景来源的BALB/c小鼠呈现高度相似性，不仅毛色继承了BALB/c小鼠的白化表型，并且在体重和生长发育指标上也与之相似。但SCID小鼠的胸腺、脾脏和淋巴结的重量不及野生型BALB/c小鼠对应器官重量的30%。通过组织病理学检查发现：SCID小鼠的胸腺被脂肪组织包围，无皮质结构，仅残存髓质，淋巴细胞缺陷；SCID小鼠胸腺在细胞组成上主要由类上皮细胞和成纤维细胞构成，边缘偶见灶状淋巴细胞群；脾脏是功能性B淋巴细胞成熟的重要组织，在SCID小鼠中表现为骨髓区域不明显、脾小体主要由网状细胞构成、无淋巴细胞聚集；此外，SCID小鼠淋巴结无明显皮质区，副皮质区缺失，由网状细胞占据，小鼠肠黏膜下和支气管淋巴结少见，且结构内无淋巴细胞聚集^[14]。

1996年，SCID小鼠的突变基因也被鉴定出来，是淋巴细胞发育过程中V(D)J重组所必需蛋白激酶的一个亚基（protein kinase, DNA-activated, catalytic subunit）的编码基因，简称为*Prkdc*。*Prkdc*^{scid}是由于*Prkdc*基因发生了点突变，导致蛋白翻译过程提前终止^[15]。在携带*Prkdc*^{scid}突变的SCID小鼠淋巴细胞发育过程中，抗原受体基因重组过程无法正常进行，从而无法产生功能正常的抗原受体蛋白，受影响的淋巴细胞在成熟之前就会死亡，或被体内的巨噬细胞、粒细胞和自然杀伤（natural killer, NK）细胞清除。由于SCID小鼠的非淋巴性造血细胞分化过程并未受该突变基因的影响，因此在SCID小鼠体内移植外源性正常骨髓细胞或胎肝细胞后，其淋巴组织将获得部分或完全重建，恢复正常生理功能^[16]。重建的淋巴细胞来自供体而非宿主本身，这一特性奠定了SCID小鼠可作为外

源细胞或组织移植模型的重要基础。

值得注意的是,并非所有SCID小鼠都缺乏功能性淋巴细胞,有2%~23%的个体具有数量有限的T、B淋巴细胞,并能恢复部分免疫功能,即所谓的SCID小鼠“渗漏”现象^[17]。渗漏SCID小鼠虽然携带纯合的*Prkdc^{scid}*基因,但仍会有少量淋巴细胞不受影响而发育成熟。谱系分析和选育研究结果表明,SCID小鼠的渗漏特性并不具备遗传性,而是与年龄和饲养环境相关^[17],随着年龄增长,渗漏SCID小鼠比例呈现上升趋势。在渗漏SCID小鼠的血清样本内,还可检测出一定水平的免疫球蛋白,在其组织内亦能检测出少量B细胞。此外,胸腺内的T细胞受体(T-cell receptor, *TCR*)基因可发生重排,并且可检测出携带T细胞特异性抗原标志的细胞。约有50%的渗漏个体对同种异型皮肤移植有排斥作用^[17]。目前,关于SCID小鼠的渗漏机制尚不明确,需要进一步研究以揭示其过程。

综上,相较于无胸腺裸小鼠历经了数年和多位研究者共同努力才得以发现的艰辛历程,SCID小鼠的发现过程似乎没有那么复杂。但*Scid*基因突变也没有如*nu*基因突变那样形成一个显而易见的关联表型(裸体),因此并不容易被发现或检测到。在面对低比例(4/35)的异常实验结果时,波斯玛并未置之不理,而是对其产生原因提出了假设,并通过严格检验和分析来验证这些假设,最后抽丝剥茧般揭示了这一意料之外的重要发现。这一过程不仅体现了科学研究的严谨性,也彰显了科学研究的真谛和魅力所在。

致谢:本文得到了“中国科学院战略生物资源专项实验动物平台项目”(编号:KFJ-BRP-005)的支持。

[参考文献References]

- [1] 孙强. 近交系小鼠培育及其背后的故事[J]. 实验动物与比较医学, 2024, 44(3): 335-338. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.085.
- [2] 孙强. NOD小鼠培育接力赛[J]. 实验动物与比较医学, 2024, 44(5): 583-586. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.144.
- [3] ISAACSON J H, CATTANACH B M. Two new 'hairless' mutants - Sha and Hfh11[J]. *Mouse News Lett*, 1962, 27:31.
- [4] FLANAGAN S P. 'Nude', a new hairless gene with pleiotropic effects in the mouse[J]. *Genet Res*, 1966, 8(3): 295-309. DOI: 10.1017/s0016672300010168.
- [5] MCENDY D P, BOON M C, FURTH J. On the role of *Thymus*, *spleen*, and gonads in the development of leukemia in a high-leukemia stock of mice[J]. *Cancer Res*, 1944, 4:377-383.
- [6] MILLER J F. Burnet oration. The thymus then and now[J]. *Immunol Cell Biol*, 1994, 72(5): 361-366. DOI: 10.1038/icb.1994.54.
- [7] PANTELOURIS E M. Absence of *Thymus* in a mouse mutant [J]. *Nature*, 1968, 217(5126):370-371. DOI: 10.1038/217370a0.
- [8] PANTELOURIS E M. Athymic development in the mouse[J]. *Differentiation*, 1973, 1(6): 437-450. DOI: 10.1111/j. 1432-0436.1973.tb00143.x.
- [9] RYGAARD J, POVLSEN C O. The mouse mutant nude does not develop spontaneous tumours. An argument against immunological surveillance[J]. *Acta Pathol Microbiol Scand B Microbiol Immunol*, 1974, 82(1): 99-106. DOI: 10.1111/j. 1699-0463.1974.tb02299.x.
- [10] SEGRE J A, NEMHAUSER J L, TAYLOR B A, et al. Positional cloning of the nude locus: genetic, physical, and transcription maps of the region and mutations in the mouse and rat[J]. *Genomics*, 1995, 28(3): 549-559. DOI: 10.1006/geno.1995.1187.
- [11] BOSMA M J, CARROLL A M. The SCID mouse mutant: definition, characterization, and potential uses[J]. *Annu Rev Immunol*, 1991, 9:323-350. DOI: 10.1146/annurev.iy.09.040191.001543.
- [12] GLANZMANN E, RINIKER P. Essential lymphocytopenia: new clinical aspect of infant pathology[J]. *Ann Paediatr*, 1950, 175(1-2):1-32.
- [13] BOSMA G C, CUSTER R P, BOSMA M J. A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse[J]. *Nature*, 1983, 301(5900):527-530. DOI: 10.1038/301527a0.
- [14] CUSTER R P, BOSMA G C, BOSMA M J. Severe combined immunodeficiency (SCID) in the mouse. Pathology, reconstitution, neoplasms[J]. *Am J Pathol*, 1985, 120(3): 464-477.
- [15] BLUNT T, GELL D, FOX M, et al. Identification of a nonsense mutation in the carboxyl-terminal region of DNA-dependent protein kinase catalytic subunit in the scid mouse[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996, 93(19):10285-10290. DOI: 10.1073/pnas.93.19.10285.
- [16] 郑亚伟, 郝莎, 胡林萍, 等. 免疫缺陷小鼠和人源化小鼠模型的发展及其在血液学研究中的应用[J]. *中华血液学杂志*, 2015, 36(11): 966-971. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2015.11.018.
- [17] BOSMA G C, FRIED M, CUSTER R P, et al. Evidence of functional lymphocytes in some (leaky) scid mice[J]. *J Exp Med*, 1988, 167(3):1016-1033. DOI: 10.1084/jem.167.3.1016.

(收稿日期:2024-10-23 修回日期:2024-12-10)

(本文编辑:丁宇菁,张俊彦,干明红)

[引用本文]

孙强. 殊途同归的免疫缺陷小鼠培育史[J]. 实验动物与比较医学, 2024, 44(6): 700-703. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.153.