

# 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45卷 第1期 (总第209期)

2025年2月25日出版

## 主管

上海科学院

## 主办

上海市实验动物学会  
上海实验动物研究中心

## 编辑

《实验动物与比较医学》编辑委员会

## 主编

王健

## 执行主编

吴宝金

## 出版

《实验动物与比较医学》编辑部  
地址: 上海市金科路3577号  
邮编: 201203  
电话: 021-50793657  
E-mail: bjb50793657@163.com  
网址: <http://www.slarc.org.cn/dwyx>

## 编辑部负责人

张俊彦

## 印刷

上海新开宝商务印刷有限公司

## 发行

上海市报刊发行局  
范围: 国内公开发行人  
邮发代号: 4-789

## 零售

《实验动物与比较医学》编辑部  
201203, 上海市金科路3577号  
电话: 021-50793657  
联系人: 王伟民

## 定价

每期30.00元, 全年180.00元

## 中国标准连续出版物号

ISSN 1674-5817  
CN 31-1954/Q

## 版权声明

本刊为开放获取期刊, 遵从CC BY-NC-ND 4.0协议。2025年版权归《实验动物与比较医学》编辑部所有。

作者向本刊投稿, 即视为愿意将著作权(包括但不限于信息网络传播权等)授予本刊。不同意者请在投稿时声明。

除非特别说明, 本刊刊出的所有文章不代表本刊编委会及主办单位的观点。

## 目次

### 主编卷首语

砥砺前行, 持续推动期刊高质量发展

王健, 吴宝金 ..... 1

### 实验动物资源开发与利用

基于UHPLC-QE-MS的高原鼠兔肾脏差异代谢物及低氧适应机制分析

何雨昕, 白振忠, 薛华, 郭子旭, 曹学锋 ..... 3

SHJH<sup>+/+</sup>小鼠的心脏衰老表型研究

刘荣乐, 程灏, 尚付生, 常书福, 徐平 ..... 13

不同毛色豚鼠的TYR及MC1R基因多态性及组织表达分析

汤银根, 冯亚仙, 钟敏, 卫振, 汪浏, 刘迪文 ..... 21

肥胖食蟹猴一般身体指标、血糖、血脂的动态监测及相关性分析

韦炎治, 申果, 张鹏飞, 石松平, 胡家豪, 张绪哲, 花慧源,  
花冠洋, 陆宏正, 曾勇, 季风, 韦祝梅 ..... 30

### 人类疾病动物模型

肝螺杆菌感染引起VDR<sup>-/-</sup>小鼠炎性肠病相关肠纤维化模型的建立及机制探讨

吴志浩, 曹舒扬, 周正宇 ..... 37

非人灵长类实验动物用于人类卵巢衰老研究进展

肖文娴, 吕龙宝 ..... 47

癌症动物模型研究及新型癌修补材料应用进展

费彬, 郭文科, 郭建平 ..... 55

### 动物实验技术与方法

一套无抓捕应激的实验猴椅设计及其初步应用

徐圣业, 黄俊锋, 陈一航, 常亮堂 ..... 67

不同光照时长对NIH小鼠体重和学习记忆能力的影响

张楠, 李怀银, 连晓娣, 魏娟鹏, 高明 ..... 73

利用辅助生殖技术挽救基因修饰小鼠的实例分析

王芊芊, 陶斯珏, 卫振, 金晖晖, 刘平, 汪浏 ..... 79

### 实验动物设施及管理

实验动物设施换气次数检测能力验证结果评价

刘巍, 张心妍, 侯丰田, 许中衍, 马丽颖 ..... 87

实验动物屏障环境设施安全准入体系建设的探索与实践——以南京大学仙林校区为例

侯冬霞, 铁祚麻, 陆勇, 南盼盼, 鲍洁..... 96

## 比较医学研究与报告规范

提高动物实验系统评价/Meta 分析的证据确定性: GRADE 方法的实证研究

李腾飞, 郑卿勇, 许建国, 李艺羿, 周泳佳, 徐彩花, 张明悦, 田杰祥, 王钢, 田金徽..... 101

## 科普讲坛

人源化小鼠模型培育史

孙强..... 112

## 附录

《实验动物与比较医学》稿约(2025年版)..... 117

## 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..... 29

《实验动物与比较医学》成功被 Scopus 数据库收录..... 54

2025年版 ICMJE 推荐规范更新内容说明..... 72

《实验动物与比较医学》有关实验动物福利伦理内容的说明..... 111

《实验动物与比较医学》出版伦理声明..... 116

广告..... 封二, 前插1~7, 后插1~6, 封三, 封底

期刊基本参数: CN 31-1954/Q\*1981\*b\* 大 16\*118\*zh\*P\*¥30.00\*2000\*15\* 2025-02

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

**本期责任编辑** 代解杰

**本期审稿专家** 常亮堂 陈国元 陈民利 陈仁金 代解杰 丁玉强 杜小燕 富群华

高彩霞 高静 葛龙 何国栋 和占龙 李顺 李垚 林惠然

刘恩岐 刘吉宏 刘晓宇 刘永刚 刘月环 刘真 吕龙宝 牛廷献

潘学营 施爱民 宋国华 谭娟 陶元清 王朝霞 王健 吴宝金

谢建芸 徐平 徐汪节 杨伟敏 杨文 杨玉琴 姚明 叶茂青

于士颜 张厚森 张涛 周晓辉 邹洪

**本期责任编辑** 张俊彦 丁宇菁

**本期责任排版** 王伟民

**本期特邀编校** 富群华 陶启辰 刘晓宇 吴凌波

**本期实习编校** 干明红 洪怡 李文杰 姜怡欣 陆佳雯 吴昊晟 张萍 周烁

翟玉凤

# LABORATORY ANIMAL AND COMPARATIVE MEDICINE

Bimonthly

Established in September, 1981 Volume 45, Issue 1

February 25, 2025

## 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© 2025 by the Editorial  
Office of *Laboratory Animal  
and Comparative Medicine*.

This is an open access journal under  
CC BY-NC-ND 4.0 license.

All articles published represent the opinions of  
the authors, and do not reflect the official  
policy of the Editorial Board of *Laboratory  
Animal and Comparative Medicine*, unless  
this is clearly specified.

## Executive Editors for This Issue

ZHANG Junyan, DAI Jiejie

## CONTENTS IN BRIEF

### Development and Utilization of Laboratory Animal Resources

Analysis of Kidney Differential Metabolites and Hypoxia Adaptation Mechanism  
of Plateau Pikas Based on UHPLC-QE-MS

HE Yuxin, BAI Zhenzhong, XUE Hua, GUO Zixu, CAO Xuefeng..... 3

Study on Cardiac Aging Phenotypes of SHJH<sup>hr</sup> Mice

LIU Rongle, CHENG Hao, SHANG Fusheng, CHANG Shufu, XU Ping..... 13

Polymorphism and Tissue Expression Analysis of *TYR* and *MC1R* Genes in Guinea  
Pigs with Different Coat-Color Phenotypes

TANG Yingen, FENG Yaxian, ZHONG Min, WEI Zhen, WANG Lie, LIU Diwen  
..... 21

Dynamic Monitoring and Correlation Analysis of General Body Indicators, Blood  
Glucose, and Blood Lipid in Obese Cynomolgus Monkeys

WEI Yanye, SHEN Guo, ZHANG Pengfei, SHI Songping, HU Jiahao,

ZHANG Xuzhe, HUA Huiyuan, HUA Guanyang, LU Hongzheng, ZENG Yong,

JI Feng, WEI Zhumei ..... 30

### Animal Models of Human Diseases

Establishment of an Intestinal Fibrosis Model Associated with Inflammatory Bowel  
Disease in VDR<sup>-/-</sup> Mice Induced by *Helicobacter hepaticus* Infection and  
Mechanism Exploration

WU Zhihao, CAO Shuyang, ZHOU Zhengyu ..... 37

Research Progress on Human Ovarian Aging Using Non-Human Primates as  
Laboratory Animals

XIAO Wenxian, LÜ Longbao ..... 47

Research Progress on Animal Models for Hernia Diseases and New Hernia Repair  
Materials

FEI Bin, GUO Wenke, GUO Jianping ..... 55

### Animal Experimental Techniques and Methods

Design of a Capture Stress-Free Marmoset Monkey Chair Device for Experiments  
and Its Preliminary Application

XU Shengye, HUANG Junfeng, CHEN Yihang, CHANG Liangtang ..... 67

Effects of Different Durations of Light Exposure on Body Weight and Learning  
and Memory Abilities of NIH Mice

ZHANG Nan, LI Huaiyin, LIAN Xiaodi, WEI Juanpeng, GAO Ming ..... 73

A Case Study of Using Assisted Reproductive Technology to Rescue Genetically  
Modified Mice with Reproductive Disorder Phenotypes

WANG Qianqian, TAO Sijue, WEI Zhen, JIN Huihui, LIU Ping, WANG Lie ..... 79

## Facilities and Management for Laboratory Animals

Evaluation of Proficiency Validation Results for Air Change Rate Testing in Laboratory Animal Facilities <i>LIU Wei, ZHANG Xinyan, HOU Fengtian, XU Zhongkan, MA Liying</i> .....	87
Exploration and Practice of Safe Access System Construction for Barrier Environment Facilities of Laboratory Animals: A Case Study on Xianlin Campus of Nanjing University <i>HOU Dongxia, TIE Zuoxiu, LU Yong, NAN Panpan, BAO Jie</i> .....	96

## Guidelines for Comparative Medical Research and Reporting

Improving the Certainty of Evidence in Animal Experiment Systematic Review/Meta-Analysis: An Empirical Study of the GRADE Method <i>LI Tengfei, ZHENG Qingyong, XU Jianguo, LI Yiyi, ZHOU Yongjia, XU Caihua, ZHANG Mingyue, TIAN Jiexiang, WANG Gang, TIAN Jinhui</i> .....	101
--	-----

\*\*\*\*\*

## 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
- 中国开放获取期刊数据库
- 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
  
- 荷兰Scopus数据库
- 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)

# 砥砺前行，持续推动期刊 高质量发展



岁序更替，华章日新。回顾2024年，本刊出版工作稳扎稳打，保质保量地完成了全年6期超700页的出版任务。为了提升读者的阅读体验，本刊改用了视觉友好型的王子双胶本白书纸，让学术知识的传递更加舒适宜人。同时，新辟了实验动物学专家主笔的“科普讲坛”专栏，每期1篇，旨在打破实验动物科学与生物医学等其他学科之间的专业壁垒，让更广泛的交叉学科研究人员甚至大众了解实验动物与比较医学的发展历史和专业特点，更好地理解动物实验伦理和福利要求。

为进一步提升期刊的学术引领力，本刊在不断完善编辑部初审、同行专家外审、主编及常务编委终审的三审机制基础上，继续加强约稿、组稿力度，推出了多篇具有较高行业影响力的优秀文献，包括：填补国内空白的中国首部神经疾病动物模型指南《自发性脑出血动物模型选择及临床前药物试验指南（2024年版）》，为神经疾病动物模型的研究和应用提供了权威的指导和规范；瞄准行业热点及难点的《中国实验猴产业的历史、现状、挑战与机遇》，引起了国内实验动物资源及科技产业工作者的广泛思考和积极讨论；借鉴国际指南ARRIVE、符合中国国情及相关法规标准的国内首份《动物实验与比较医学研究论文出版规范清单（2024年版）》，旨在进一步规范中国动物实验与比较医学研究论文的质量标准和出版流程，促进科技及期刊的高质量发展和国际交流。

为提高期刊传播力，本刊充分利用期刊官网、中国实验动物信息网、中国知网、万方医学网、维普网和中国超星等平台进行推广，并新增了新华网-学术中国、博看网、长江文库、中邮阅读网等平台，让本刊的可见度尽可能突破传统纸媒的局限，被更多读者阅读参考。2024年还推出了每期一篇的重点推优论文数字人视频，更灵活多样地展示和推广优秀学术成果。此外，从2024年10月起，新录用的稿件均可通过中国知网和期刊官网进行单篇网络首发，结合每篇文章专属的数字对象唯一标识符（digital object unique identifier, DOI），可突破双月刊整期出版的时间限制，加速学术成果的网络传播和作者首发权认可。

在编委队伍建设方面，2024年初本刊评选出了18位优秀编委和优秀特邀审稿专家，表彰他们作为期刊学术质量守护者、引领者的敬业精神，为编委会后续工作树立榜样，凝聚力量；另外，通过定向邀请、公开征集以及常务编委会审议，至2024年底，增补了7名来自美国、英国和日本等国家的国际编委，为期刊的国际影响力提升及下一届编委会升级工作奠定了坚实基础。

在期刊影响力方面,本刊的影响因子连续5年稳步提升,且连续3年成功入选“中国科协-科技期刊双语传播工程项目”;参与了由中国科学院中国激光杂志社牵头的期刊集群建设项目,并成功入选“中国科技期刊卓越行动计划(二期)集群(集团)化试点项目”(编号:集群-B5),为期刊进一步的数字化和精品化建设提供了更强大的支撑;2025年1月,本刊被Scopus数据库收录,期刊的学术水平、动物福利伦理关注和透明出版政策等均得到评委会的高度认可。

2024年,本刊还获得了以下荣誉:“人类疾病动物模型”栏目获评第7届华东地区期刊“优秀栏目”,这是对本刊栏目策划和内容建设方面的认可;2023年发表的1篇综述《精神分裂症动物模型的研究概述》和1篇基础研究类论文《猪血型PCR鉴定方法的建立》被评为2024年海上医刊高质量论文(SHMJ50),这是对作者们研究成果的认可,也是对期刊学术质量的肯定;编委会1人获得中国期刊协会颁发的“从事期刊出版工作30年荣誉证书”,编辑部1人被评为“长三角科技期刊优秀编辑”,这是对编委和编辑部工作人员长期辛勤付出的最好见证。

展望2025年,我们满怀信心,充满期待。这是期刊“十四五”规划的最后一年,也是第七届编委会工作的收官之年。因此,本刊将继续激发更多编委活力,凝聚国内外专家力量,进一步加强专题专栏出版,精心策划更多高质量的专题栏目,组织国内外知名专家撰写前沿综述、研究报告和述评文章,为读者呈现更多具有深度和引领性的学术内容;将进一步优化严格的审稿、专业的编辑加工和规范透明的出版流程,确保发表的每一篇文章都真实、可读、可借鉴,切实提升期刊的学术质量,促进行业内交流与共享;将依托主办单位的支持,稳定编辑部人才团队,通过加强培训、优化分工和管理制度建设,持续提升期刊编校质量和学术服务能力;将举办第七届编委会的第二次全体座谈会,通过深入交流和探讨,总结经验,共谋发展,随后启动第八届编委会换届工作,为期刊的更高水平发展注入新的活力和能量。

砥砺前行,笃行致远。在新的一年里,我们将继续秉承守正创新、兼容并蓄的理念,与广大作者、读者、审稿人和编委们携手共进,共同推动《实验动物与比较医学》期刊迈向更高水平,努力打造一个更加国际化、数字化、精品化的学术交流平台,为实验动物与比较医学领域的科技工作者提供更可信更实用的学术服务平台,为加快实现我国科技自立自强、创新突破及高质量发展做出更大贡献。

王 健(主编),吴宝金(执行主编)  
(2025年2月,写于上海)



曹学锋，医学博士，副教授，硕士研究生导师。现任职于青海大学医学院基础医学部，曾赴美国犹他大学人类分子遗传实验中心做访问学者，主要从事病理生理学及相关学科的教学与科研工作。主要研究方向为高原病与高原低氧适应机制及损伤干预，擅长从代谢、线粒体能量利用、高原病药物干预等角度，研究高原低氧下高原世居人群和土著动物适应极端环境的分子生物学机制以及损伤干预机制。2019年参与项目“青藏高原多民族地区医学机能实验平台搭建及实验教学改革创新实践研究”荣获国家教学成果二等奖；2022年获得青海省“高端创新人才”培养拔尖人才项目；2023年作为主要完成人参与的“高原鼠兔氧传递及细胞呼吸特征和白色脂肪棕色化机制”研究荣获青海省科学技术成果奖。近年来主持“藏药莪达夏干预低氧性肺动脉高压中的G6PD蛋白修饰组学研究”等国家级、省部级科研课题4项，参编《高原临床病理生理学》等国家规划教材3部，以第一作者身份发表SCI论文、国内核心期刊论文16篇。

## 基于UHPLC-QE-MS的高原鼠兔肾脏差异代谢物及低氧适应机制分析

何雨昕<sup>1</sup>，白振忠<sup>1,2</sup>，薛华<sup>1</sup>，郭子旭<sup>1</sup>，曹学锋<sup>1,2</sup>

(1. 青海大学医学院, 西宁810001; 2. 青海大学高原医学研究中心, 西宁810001)

**[摘要]** **目的** 运用超高效液相色谱-四极杆静电场轨道阱质谱 (ultra-high-performance liquid chromatography coupled with quadrupole electrostatic field orbital trap-mass spectrometry, UHPLC-QE-MS) 非靶向代谢组学分析法探讨不同海拔高原鼠兔肾脏低氧适应性代谢变化的潜在机制。**方法** 捕捉青海省果洛藏族自治州玛多县星宿海地区海拔4360 m (MD组) 和青海省海北藏族自治州门源地区海拔2900 m (MY组) 处的高原鼠兔各10只, 经麻醉后采集血清样本, 经安死死后采集肾脏样本, 分别进行一般生理生化指标测定和代谢组学分析。其中一部分血清样本用于血液学分析, 另一部分用于血气分析, 剩余部分检测生化指标。肾组织样本中代谢物提取后, 进行UHPLC-QE-MS分析, 运用代谢组学主成分分析 (principal component analysis, PCA) 和正交偏最小二乘判别分析 (orthogonal partial least squares discriminant analysis, OPLS-DA) 方法分析差异代谢物, 筛选标准为变量投影重要度 (variable importance in the projection, VIP) >1.5 且倍数变化 (fold change, FC) >1.5 且 FC < 1/1.5。利用相关性分析热力图、差异显著性分析火山图、信号通路识别气泡图和矩形图分别分析差异代谢物及相关信号通路。**结果** MD组高原鼠兔的红细胞计数、葡萄糖、尿素氮、尿酸和同型半胱氨酸含量高于MY组, 而血红蛋白、血细胞比容、肌酐和二氧化碳结合力低于MY组, 这表明不同海拔的高原鼠兔血液携氧能力存在明显差异。经主成分模式识别分析和OPLS-DA置换检验显示, MD组和MY组高原鼠兔肾脏代谢物具有明显的聚类型分布 ( $R^2Y=0.930$ ,  $Q^2=0.655$ )。按照筛选标准, 并经数据库比对发现, 不同海拔高原鼠兔的肾脏代谢物差异分子有46个, 其中MD组高原鼠兔的蟾蜍二烯羟酸内酯、腺苷、腺嘌呤、薯蓣皂苷、盐酸小檗碱、鼠尾草酚和虾青素表达水平平均显著升高 (VIP > 1.5,  $P < 0.05$ ), 花生四烯酸、组胺和香豆素水平显著下降 (VIP > 1.5,  $P < 0.05$ )。相关信号通路分析显示, 缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸生物合成通路具有最大影响因子 ( $P < 0.05$ ), 而泛酸盐和辅酶A生物合成通路呈现最显著富集 ( $P < 0.05$ )。**结论** 不同海拔高原鼠兔肾脏差异代谢物氨基酸、泛酸盐及辅酶A通路可能参与高原鼠兔高原低氧适应代谢机制。

**[关键词]** 高原低氧; 高原鼠兔; 肾脏; 超高效液相色谱-四极杆静电场轨道阱质谱; 代谢通路

**[中图分类号]** Q95-33; R-332 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2025)01-0003-10



**[基金项目]** 青海省昆仑英才·高端创新人才·培养领军项目(K9924072)

**[第一作者]** 何雨昕(1999—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 慢性高原病及低氧适应机制与损伤干预。E-mail: 2650279239@qq.com。ORCID: 0009-0004-5385-8905

**[通信作者]** 曹学锋(1977—), 男, 博士, 副教授, 硕士生导师, 研究方向: 慢性高原病及低氧适应机制与损伤干预。E-mail: 2002980001@qhu.edu.cn。ORCID: 0000-0002-0612-4616

## Analysis of Kidney Differential Metabolites and Hypoxia Adaptation Mechanism of Plateau Pikas Based on UHPLC-QE-MS

HE Yuxin<sup>1</sup>, BAI Zhenzhong<sup>1,2</sup>, XUE Hua<sup>1</sup>, GUO Zixu<sup>1</sup>, CAO Xuefeng<sup>1,2</sup>

(1. Medical College of Qinghai University, Xining 810001, China; 2. High Altitude Medical Research Center, Qinghai University, Xining 810001, China)

Correspondence to: CAO Xuefeng (ORCID: 0000-0002-0612-4616), E-mail: 2002980001@qhu.edu.cn

**[ABSTRACT] Objective** To explore the potential mechanisms of hypoxic adaptive metabolic changes in the kidneys of plateau pikas at different altitudes using non-targeted metabolomics analysis via ultra-high-performance liquid chromatography coupled with quadrupole electrostatic field orbital trap-mass spectrometry (UHPLC-QE-MS). **Methods** 10 plateau pikas were captured at an altitude of 4 360 m in Xingxiuhai area, Maduo County, Guoluo Tibetan Autonomous Prefecture, Qinghai Province (MD group), and 10 plateau pikas were captured at an altitude of 2 900 m in Menyuan area, Haibei Tibetan Autonomous Prefecture, Qinghai Province (MY group). After anesthesia, serum samples were collected, and kidney samples were collected after euthanasia. General physiological and biochemical indicators were measured and metabolomics analysis was performed. Part of the serum samples was used for hematology analysis, another part for blood gas analysis, and the remaining part for biochemical indicator detection. Metabolites were extracted from the kidney tissue samples and then analyzed using UHPLC-QE-MS. Differential metabolites were analyzed using metabolomics principal component analysis (PCA) and orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA), with screening criteria set as variable importance in projection (VIP) >1.5 and fold change (FC) >1.5, or VIP >1.5 and FC <1/1.5. Correlation analysis heatmaps, significance analysis volcano plots, signaling pathway recognition bubble charts, and rectangular graphs were used for the analysis of differential metabolites and related signaling pathways. **Results** The red blood cell count, glucose, urea nitrogen, uric acid, and homocysteine levels in the MD group plateau pikas were higher than those in the MY group, while hemoglobin, hematocrit, creatinine, and carbon dioxide combining power were lower than those in the MY group. This indicated a significant difference in the blood oxygen-carrying capacity of plateau pikas at different altitudes. The principal component pattern recognition analyses, and OPLS-DA permutation test showed that the kidney metabolites of the MD and MY groups of plateau pikas had distinct clustering distributions ( $R^2Y=0.930$ ,  $Q^2=0.655$ ). According to the screening criteria and database comparison, 46 differential metabolites were identified in the kidneys of plateau pikas at different altitudes. In the MD group of plateau pikas, the expression levels of bufadienolide, adenosine, adenine, diosgenin, berberine chloride, carnosol, and astaxanthin were significantly increased (VIP >1.5,  $P < 0.05$ ), while the levels of arachidonic acid, histamine, and coumarin were significantly decreased (VIP >1.5,  $P < 0.05$ ). The analysis of related signaling pathways showed that the biosynthetic pathways of valine, leucine, and isoleucine had the largest impact factors ( $P < 0.05$ ), while the biosynthetic pathways of pantothenate and coenzyme A showed the most significant enrichment ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** The differential metabolites of amino acids, pantothenate, and coenzyme A pathways in the kidneys of plateau pikas at different altitudes may be involved in the metabolic mechanisms of plateau pikas' hypoxia adaptation in high-altitude environments.

**[Key words]** High-altitude hypoxia; Plateau pika; Kidney; UHPLC-QE-MS; Metabolic pathway

青藏高原被称为“世界屋脊”，平均海拔4 500 m以上，具有低氧、高寒、强烈紫外线等严峻环境特征。高原鼠兔（plateau pikas，拉丁学名为 *Ochotona curzoniae*）是已经在青藏高原生存了约37万年的小型啮齿类土著动物，具备完善的高原低氧环境适应机

制<sup>[1]</sup>。截至目前，有关人类和动物在心、肺、脑器官方面的高原低氧适应及损伤性研究较多，而高原土著动物对低氧环境的肾脏适应机制研究鲜有报道<sup>[2]</sup>。

有文献报道，急进高原低氧暴露可破坏肾脏线粒体，甚至造成肾小球内皮细胞凋亡<sup>[2]</sup>。长期低氧暴露

增加交感神经兴奋性, 激活肾素-血管紧张素-醛固酮系统, 以致肾血管强烈收缩, 肾血液灌注下降, 进而出现组织缺血缺氧, 引起一系列肾损伤表现。然而, 高原鼠兔作为高原低氧适应的理想动物模型, 其肾脏在高原低氧环境下能够维持正常功能, 并不出现明显的损伤性变化。有研究认为, 高原鼠兔的高原低氧适应机制可能与其生成大量代谢物质有关<sup>[3-5]</sup>。

前人研究分析了高原缺氧的发病机制以及代谢组学在高原缺氧相关疾病研究中的应用<sup>[6]</sup>。本研究基于超高效液相色谱 (ultra-high-performance liquid chromatography, UHPLC) -四极杆静电场轨道阱质谱 (quadrupole electrostatic field orbital trap-mass spectrometry, QE-MS) 分析方法, 鉴定生活于不同海拔的高原鼠兔肾脏差异代谢标志物, 探讨标志性差异代谢物及其关键通路, 以期为高原鼠兔及高原土著动物肾脏低氧适应机制研究提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

选取生活于青海省果洛藏族自治州玛多县星宿海地区海拔4 360 m的高原鼠兔 (MD组) 和西藏自治区门源地区海拔2 900 m的高原鼠兔 (MY组) 各10只, 体重均在120~150 g, 3月龄左右, 雌雄各半。两组高原鼠兔的生存环境均为山地草原, 捕捉时间均在11月中旬。MD组动物生存环境温度为-8℃, 氧浓度为12%; MY组动物生存环境温度为-4℃, 氧浓度为14%。

### 1.2 主要试剂和仪器

甲醇 (批号167312)、乙腈 (批号789101)、乙酸铵 (批号112131)、22%氨水 (批号145161) 和甲酸 (批号130050) 均为质谱纯, 购自德国CNW Technologies公司; L-2-氯苯丙氨酸 (批号20240819) 购自上海康朗生物科技有限公司。

UHPLC系统 (1290 Infinity III LC) 购自美国Agilent公司; 高分辨质谱仪 (Triple TOF 6600) 购自美国AB Sciex公司; 高速离心机 (Heraeus Fresco17)、数据采集和分析软件 (Xcalibur 4.0.27) 和组合型四极杆静电场轨道阱质谱仪 Q Exactive (Orbitrap MS) 均购自美国Thermo Fisher Scientific公司; 天平 (BSA124S-CW) 购自德国Sartorius公司; 研磨仪 (JXFSTPRP-24) 购自上海净信科技有限公司; 明澈纯水仪 (D24

UV) 购自德国Merck Millipore公司; 超声仪 (PS-60AL) 购自深圳市雷德邦电子有限公司; ACQUITY UPLC HSS T3色谱柱 (2.1 mm×100 mm, 1.8 μm) 购自美国Waters公司; 全自动血液分析仪 (ADVIA 2120i) 购自德国Siemens公司; 全自动生化分析仪 (BS-1000M) 购自深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司; 干式血气分析仪 (ST2000) 购自武汉明德生物科技股份有限公司。

### 1.3 血液及肾脏样本采集

所有高原鼠兔在捕捉当天即转运至青海大学医学院/高原医学研究中心的实验室进行采样。按照体重计算麻醉用药剂量, 使用8 mL/kg乌拉坦经腹腔注射麻醉后进行腹主动脉采血。将血液常温静置2 h, 然后以3 000 r/min、4℃离心10 min, 收集上清液, 分装后置入-80℃冰箱备用。高原鼠兔的血液样本采集完毕后, 注射过量乌拉坦使动物安乐死, 然后摘取右侧肾脏, 立即置于液氮冷冻, 随后转移至-80℃冰箱保存。本研究中动物实验方案经青海大学医学院医学科学研究伦理委员会审查批准 (No. 2021-16), 实验操作过程中严格遵循《实验动物管理条例》和《医学实验动物管理实施细则》等规范文件。

### 1.4 一般生理生化指标测定

采集好的两组高原鼠兔血清样本, 一部分经全自动血液分析仪计算红细胞计数、血红蛋白浓度及血细胞比容, 另一部分用血气分析仪测定二氧化碳结合力, 剩余部分置于冰上用全自动生化分析仪检测葡萄糖含量、尿素氮含量、肌酐含量、同型半胱氨酸含量、尿酸含量等生化指标。

### 1.5 肾组织代谢组学分析

#### 1.5.1 代谢物提取

称取两组高原鼠兔每只50 mg右肾组织块样品, 加入1 000 μL提取液 (甲醇、乙腈和水的体积配比为2:2:1, 且含L-2-氯苯丙氨酸1 μg/mL), 涡旋混匀30 s; 加入钢珠, 45 Hz研磨处理4 min, 冰水浴中超声5 min。重复上述步骤2~3次, -20℃静置1 h。然后将样品在4℃条件下12 000 r/min离心15 min, 取上清液于进样瓶中上机检测。从所有待测样品中另取等量上清液混合成质控 (quality control, QC) 样品上机检测, 以评估仪器的稳定性和分析方法的可靠性, 从而确保实验数据的准确性和可信度。

#### 1.5.2 UHPLC-QE-MS测定及数据处理

使用1290 UHPLC系统进行液相色谱 (liquid

chromatography, LC) - 串联质谱联用 (tandem mass spectrometry, MS/MS) 分析, 使用的 UPLC HSS T3 色谱柱 (2.1 mm×100 mm, 1.8 μm) 与 Q Exactive 耦合。每份样品的进样体积为 2 μL。流动相 A 以 0.1% 甲酸水溶液为正离子模式, 以 5 mmol/L 乙酸铵水溶液为负离子模式; 流动相 B 为乙腈。洗脱梯度设置: 0 min, 99%A, 1%B; 1 min, 99%A, 1%B; 8 min, 1%A, 99%B; 10 min, 1%A, 99%B; 10.1 min, 99%A, 1%B; 12 min, 99%A, 1%B。流速为 0.5 mL/min。

在 LC/MS 实验信息依赖采集 (information dependent acquisition, IDA) 的基础上, 使用 Q Exactive 质谱仪获取 MS/MS 数据。Xcalibur 4.0.27 软件会根据事先设定的条件, 自动采集并触发 MS/MS 质谱图的生成, 同时实时分析全扫描测量的 MS 数据。同时, 电喷雾电离 (electrospray ionization, ESI) 源参数条件设置: 鞘气流 (Sheath) 气流速为 45 Arb, 辅助气流 (Aux) 速为 15 Arb, 质量即质荷比 ( $m/z$ ) 范围为 70~1 000, 毛细管温度 400 °C, 全扫描 MS 分辨率为 70 000, MS/MS 分辨率为 17 500, 噪声对比估计 (noise contrastive estimation, NCE) 模型中碰撞能量为 20/40/60 eV, 喷雾电压分别为 4.0 kV (正) 或 -3.6 kV (负)。

使用 ProteoWizard 软件将质谱原始数据转成 mzXML 格式。再使用 MAPS 软件 (XCMS 内核, 1.0 版本) 做保留时间矫正、峰识别、峰提取、峰积分、峰对齐等预处理, 生成由保留时间、 $m/z$  值和峰强度组成的数据矩阵。以上 UHPLC-QE-MS 测定由上海百趣生物医学科技有限公司完成, 并利用该公司的内部 MS2 数据库进行代谢物鉴定。

### 1.5.3 差异代谢物筛选及信号通路识别

主成分分析 (principal component analysis, PCA) 通过正交偏最小二乘判别分析 (orthogonal partial least squares discriminant analysis, OPLS-DA) 过滤代谢物中与分类变量不相关的正交变量, 进而发现差异性代谢物。筛选标准为 OPLS-DA 模型第一主成分的变量投影重要度 (variable importance in the projection, VIP) > 1.5 且倍数变化 (fold change, FC) > 1.5, 或 VIP > 1.5 且 FC < 1/1.5。对肾脏代谢物样本变量进行 PCA、OPLS-DA 以及第一、第二主成分的多元变量模式识别分析和 OPLS-DA 置换检验, 并绘制各图。其中, 置换检验后用决定系数 ( $R^2Y$ ) 表示模型对因变量  $Y$  的方差解释程度, 即模型能够解释的  $Y$  方差的比例; 取值范

围为 0~1, 值越接近 1, 表示模型对  $Y$  的拟合效果越好。同时用预测决定系数 ( $Q^2$ ) 评估模型对新数据的预测能力, 通常通过交叉验证计算, 反映了模型在未参与建模的数据上的预测性能; 取值范围为 0~1, 值越接近 1, 表示模型的预测能力越强。

运用相关性分析热力图、差异显著性分析火山图、信号通路识别气泡图和矩形图分别进行差异代谢物及相关信号通路分析。其中相关性分析热力图中通过颜色深浅表示代谢物之间的相关性强度, 颜色越深表示相关性越强; 其横轴和纵轴均为代谢物名称, 颜色表示相关性系数。火山图以对数变化值为横轴, 显著性值为纵轴, 通过点的位置和颜色区分显著性差异的代谢物; 点的位置越靠近右上角或左上角, 表示该代谢物的变化显著且变化幅度大。气泡图的横轴为富集因子 (表示代谢物在通路中的富集程度), 纵轴为通路名称; 气泡大小表示富集的代谢物数量, 颜色表示  $P$  值的显著性 (颜色越深表示  $P$  值越小)。利用矩形图进行相关信号通路分析, 以通路名称为横轴, 富集因子或  $P$  值为纵轴, 通过矩形的大小或颜色表示通路的富集程度或显著性; 矩形越大或颜色越深, 表示通路的富集程度越高或显著性越强。

## 1.6 统计学方法

使用 SPSS 27 软件进行统计学分析。数据均采用均值±标准差 ( $\bar{x}\pm s$ ) 表示。组间差异比较采用独立样本  $t$  检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 不同海拔高原鼠兔的一般生理生化比较

生活于海拔 4 360 m 和 2 900 m 的两组高原鼠兔红细胞计数、葡萄糖、尿素氮、肌酐和同型半胱氨酸含量差异无统计学意义 (均  $P > 0.05$ ), 而血红蛋白浓度、血细胞比容、尿酸和二氧化碳结合力有显著差异 ( $P < 0.05$ , 表 1), 提示生活于不同海拔的高原鼠兔血液中红细胞携氧能力已存在明显差异。其中 MD 组尿酸含量高于 MY 组, 而血红蛋白、血细胞比容和二氧化碳结合力水平低于 MY 组, 提示随着海拔升高, 高原鼠兔对低氧条件出现生理适应, 代谢和血液系统产生相应改变。

### 2.2 不同海拔高原鼠兔的肾脏代谢物出现明显的聚类型分布

PCA、OPLS-DA 以及第一、第二主成分的多元变量模式识别分析和 OPLS-DA 置换检验结果见图 1。

表1 不同海拔高原鼠兔的一般生理生化指标比较

Table 1 Comparison of general physiological and biochemical indicators of plateau pikas at different altitudes

项目 Item	$(\bar{x} \pm s)$			
	MD组 MD group (n=10)	MY组 MY group (n=10)	t值 tvalue	P值 Pvalue
RBC $C_{cell}/(10^{12} \cdot L^{-1})$	6.93±0.85	6.75±1.65	0.355	0.726
HGB $\rho/(g \cdot L^{-1})$	116.36±7.39	141.40±21.45	-4.074	0.001
HCT $\phi/(\%)$	36.45±2.62	42.58±7.09	-2.985	0.007
GLU $c/(mmol \cdot L^{-1})$	6.07±3.66	5.84±2.51	0.177	0.861
BUN $c/(mmol \cdot L^{-1})$	7.48±4.01	5.89±3.00	1.054	0.305
Cr $c/(\mu mol \cdot L^{-1})$	21.55±5.97	22.36±8.65	-0.258	0.799
UA $c/(\mu mol \cdot L^{-1})$	45.09±21.90	24.27±15.84	2.555	0.019
CO <sub>2</sub> CP $c/(mmol \cdot L^{-1})$	18.72±5.85	26.01±5.83	-2.928	0.008
HCY $c/(\mu mol \cdot L^{-1})$	25.03±10.31	18.35±12.09	1.393	0.179

注: MD, 来自青海省果洛藏族自治州玛多县星宿海地区海拔4 360 m的高原鼠兔; MY, 来自青海省海北藏族自治州门源地区海拔2 900 m的高原鼠兔。RBC, 红细胞计数; HGB, 血红蛋白; HCT, 血细胞比容; GLU, 葡萄糖; BUN, 尿素氮; Cr, 肌酐; UA, 尿酸; CO<sub>2</sub>CP, 二氧化碳结合力; HCY, 同型半胱氨酸。

Note: MD, plateau pikas from the Xingxiuhai area, Maduo County, Guoluo Tibetan Autonomous Prefecture, Qinghai Province at an altitude of 4 360 m; MY, plateau pikas from the Menyuan area, Haibei Tibetan Autonomous Prefecture, Qinghai Province at an altitude of 2 900 m. RBC, red blood cells; HGB, hemoglobin; HCT, hematocrit; GLU, glucose; BUN, blood urea nitrogen; Cr, creatinine; UA, uric acid; CO<sub>2</sub>CP, carbon dioxide combining power; HCY, homocysteine.

PCA模型得分散点图(图1A)显示, 海拔4 360 m(MD组)和2 900 m(MY组)的高原鼠兔肾脏代谢物样本分散在2个不同的区域; 主成分得分值基本集中于散点置信区内的区域无明显交叉和重叠, 表明两组之间存在肾脏组织主成分代谢物的差异。PCA散点图(图1B)显示, 所有样本包括质控用QC样本均基本在95%置信区间(霍特林T<sup>2</sup>置信椭圆, Hotelling's T-squared ellipse)内。OPLS-DA模型得分散点图(图1C)显示, MD和MY样品分散在2个不同的区域, 呈聚类型分布于圆形散点置信区内的2个区域, 结果显示OPLS-DA模式识别效果优于PCA。OPLS-DA模型置换检验(图1D)中 $R^2Y=0.930$ ,  $Q^2=0.655$ ; 其中,  $R^2Y$ 非常接近1, 说明建立的模型符合样本数据的真实情况;  $Q^2$ 值为0.655, 说明模型可以比较好地解释两组样本之间的差异。OPLS-DA模型置换检验(图1D)显示, 置换检验随机模型的 $Q^2$ 值均小于原模型的 $Q^2$ 值(0.930 vs 0.840),  $Q^2$ 的回归线与纵轴的截距为-0.61;

随着置换保留度逐渐降低, 置换的Y变量比例增大, 随机模型的 $Q^2$ 逐渐下降, 表明建立的模型具有良好的稳健性, 不存在过拟合现象。

### 2.3 不同海拔高原鼠兔的肾脏代谢物差异

UHPLC-QE-MS分析后, 经数据库比对和OPLS-DA筛选标准发现, 不同海拔高原鼠兔的肾脏代谢物差异分子有46个, 详细数据见表2。其中, 海拔4 360 m(MD组)的高原鼠兔肾脏代谢物中蟾蜍二烯羟酸内酯、腺苷、腺嘌呤、薯蓣皂苷、盐酸小檗碱、鼠尾草酚和虾青素等水平明显高于海拔2 900 m的高原鼠兔组(MY组),  $VIP > 1.5$ ,  $P < 0.05$ ; 同时, MD组高原鼠兔中花生四烯酸、组胺和香豆素等代谢物的水平低于MY组( $VIP > 1.5$ ,  $P < 0.05$ )。

### 2.4 不同海拔高原鼠兔肾脏差异代谢物的相关性 & 信号通路

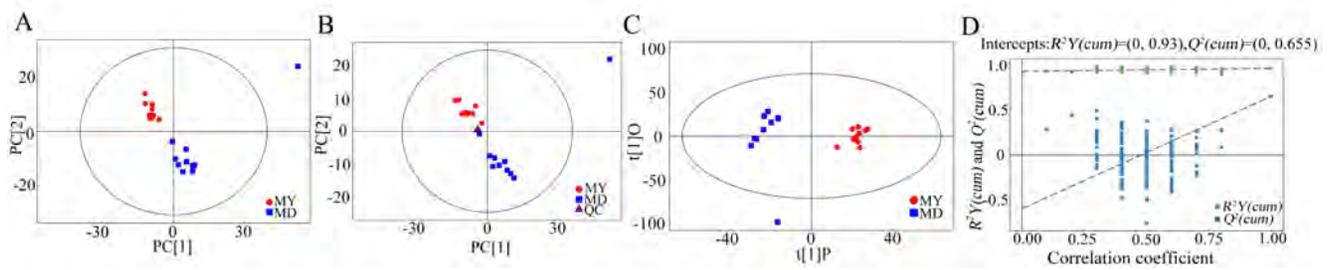
对不同海拔高原鼠兔肾脏差异代谢物的定量值进行Pearson相关系数计算, 结果以热力图表现(图2A)。图中, 横纵坐标代表两组对比的差异代谢物, 不同位置的色块代表对应位置代谢物间的相关系数大小, 红色表示正相关, 蓝色表示负相关; 非显著性相关用叉号进行标注。正相关 $r$ 值为0~1, 负相关 $r$ 值为-1~0;  $r$ 的绝对值越接近1, 两变量的关联程度越强; 反之,  $r$ 绝对值越接近0, 关联程度越弱。

火山图(图2B)中, 每个点代表一个代谢物, 横坐标代表该组对比各物质的FC(取以2为底的对数), 纵坐标表示 $t$ 检验的 $P$ 值(取以10为底的对数的负数), 散点大小代表OPLS-DA模型的VIP值(即散点越大, VIP值越大); 散点颜色代表最终的筛选结果, 显著上调的代谢物以红色表示, 显著下调的代谢物以蓝色表示, 非显著差异的代谢物以灰色表示。

通路识别气泡图(图2C)和矩形图(图2D)显示, 缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸生物合成通路在拓扑分析中的影响因子最大( $P < 0.05$ ); 泛酸盐和辅酶A生物合成通路富集程度最显著( $P < 0.05$ ), 提示上述通路可能参与高原鼠兔肾脏的高原低氧适应机制。

## 3 讨论

青藏高原有着独特的地理环境和气候特征。高原鼠兔是青藏高原土著小型啮齿类动物, 已经进化出特有的遗传和代谢机制来适应严峻的高原环境。有文献报告, 高原低氧暴露会造成不同程度的肾功能损伤<sup>[7]</sup>。然而高原低氧环境下高原土著动物肾脏适应的



注: A为生活于海拔4360 m的高原鼠兔(MD组)对生活于海拔2900 m的高原鼠兔(MY组)的主成分分析(PCA)模型得分散点图; B为全部样本(包括QC样本)的PCA得分散点图。图A-B中横坐标PC[1]和纵坐标PC[2]分别表示第一主成分和第二主成分得分,散点颜色和形状表示样本的实验分组。C为MD组对MY组的正交偏最小二乘判别分析(OPLS-DA)OPLS-DA模型得分散点图(横坐标表示预测主成分得分值,反映组间分离程度。纵坐标表示正交主成分得分值,反映样本组内差异分布)。D为MD组对MY组OPLS-DA模型置换检验(X轴上t[1]P和Y轴上t[1]O分别代表第一和第二区域的主要成分; $R^2Y=0.930$ ,  $Q^2=0.655$ )。

Note: A is the scatter plot of principal component analysis (PCA) model between MD group and MY group; B is the scatter plot obtained by PCA for all samples (including QC samples). In the figure A and B, the horizontal axis (PC[1]) and the vertical axis (PC[2]) represent the scores of the first and second principal components, respectively, and the color and shape of the scatter points indicate the experimental grouping of the samples. C is the scatter plot of the orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA) model between MD group and MY group (The horizontal axis represents the scores of the predictive principal components, reflecting the separation degree between groups. The vertical axis represents the scores of the orthogonal principal components, reflecting the distribution of differences within groups); D is the permutation test of the OPLS-DA model of MD group for MY group (X-axis (t[1]P) and Y-axis (t[1]O) represent the principal components of the first and second regions, respectively.  $R^2Y=0.93$ ,  $Q^2=0.655$ ).

图1 超高效液相色谱-四极杆静电场轨道阱质谱(UHPLC-QE-MS)分析不同海拔高原鼠兔的肾脏代谢组学

Figure 1 Ultra-high-performance liquid chromatography coupled with quadrupole electrostatic field orbital trap-mass spectrometry (UHPLC-QE-MS) analysis of kidney metabolomics in plateau pikas at different altitudes

代谢组学研究报告甚少。本研究选取生活于4360 m和2900 m海拔的高原鼠兔,鉴定其肾脏差异代谢物,并探讨其可能的低氧适应机制。通过OPLS-DA建模分析显示,该模型符合样本数据的真实情况,具有高解释力和稳健性;PCA模型的散点图也表明两组样本间存在明显差异。结果表明,两组高原鼠兔肾脏在适应高原低氧等特殊环境时存在不同的代谢物质基础。

由于高海拔氧分压的降低,高原鼠兔促红细胞生成素刺激红细胞增殖和血红蛋白浓度升高,从而增强血液携氧能力,确保组织能够获得足够的氧气。此外,高海拔高原鼠兔的尿酸水平升高可能与慢性缺氧环境下红细胞增多相关,血红蛋白嘌呤代谢产物尿酸也随之增多。尿酸在血清中具有抗氧化作用,能保护红细胞免受氧化应激损伤,维持红细胞形态,阻止棘形和球形红细胞的形成。高海拔地区的氧分压下降,动物需要增加呼吸频率和呼吸深度来补偿氧气的不足,这会导致呼出的二氧化碳量增加,二氧化碳结合力下降。

高原鼠兔受到长期低氧胁迫表现出适应高原环境的遗传和代谢机制改变。本研究表明,生活于海拔4360 m的MD组高原鼠兔肾脏组织中腺苷水平均显著大于生活于海拔2900 m的MY组。腺苷有助于血管扩

张和拮抗儿茶酚胺类物质的缩血管效应。有文献报告,在极端高海拔环境条件下,细胞外腺苷水平也随之升高<sup>[8]</sup>。然而腺苷二磷酸(adenosine diphosphate, ADP)和腺苷三磷酸(adenosine triphosphate, ATP)有助于细胞外腺苷的生成;在疾病状态下,外核苷酸酶表达增加和腺苷生成是保护细胞和抑制炎症的机制之一<sup>[9]</sup>。腺嘌呤经补救合成途径生成腺苷一磷酸(adenosine monophosphate, AMP)<sup>[10]</sup>。由此推测,MD组高原鼠兔的腺嘌呤增加可能是机体能量利用的适应机制之一。

本研究发现,MD组高原鼠兔的肾脏组织中薯蓣皂苷和盐酸小檗碱显著增加( $P<0.05$ )。薯蓣皂苷具有神经保护、抗癌、抗动脉粥样硬化以及保肝等作用<sup>[11]</sup>。在肾组织中,薯蓣皂苷具有抗氧化应激效应<sup>[12]</sup>。小檗碱能抑制一氧化氮水平的升高<sup>[13]</sup>。一氧化氮升高是否与小檗碱抑制有关,还有待进一步验证。本研究中MD组的花生四烯酸水平下降显著低于MY组,而花生四烯酸及其代谢产物能调节肾素的释放<sup>[14]</sup>,提示高原鼠兔可能通过花生四烯酸的代谢机制抵抗低氧胁迫,有利于维持血容量和血压相对恒定。

有研究发现,鼠尾草酸和鼠尾草酚可激活Kelch样

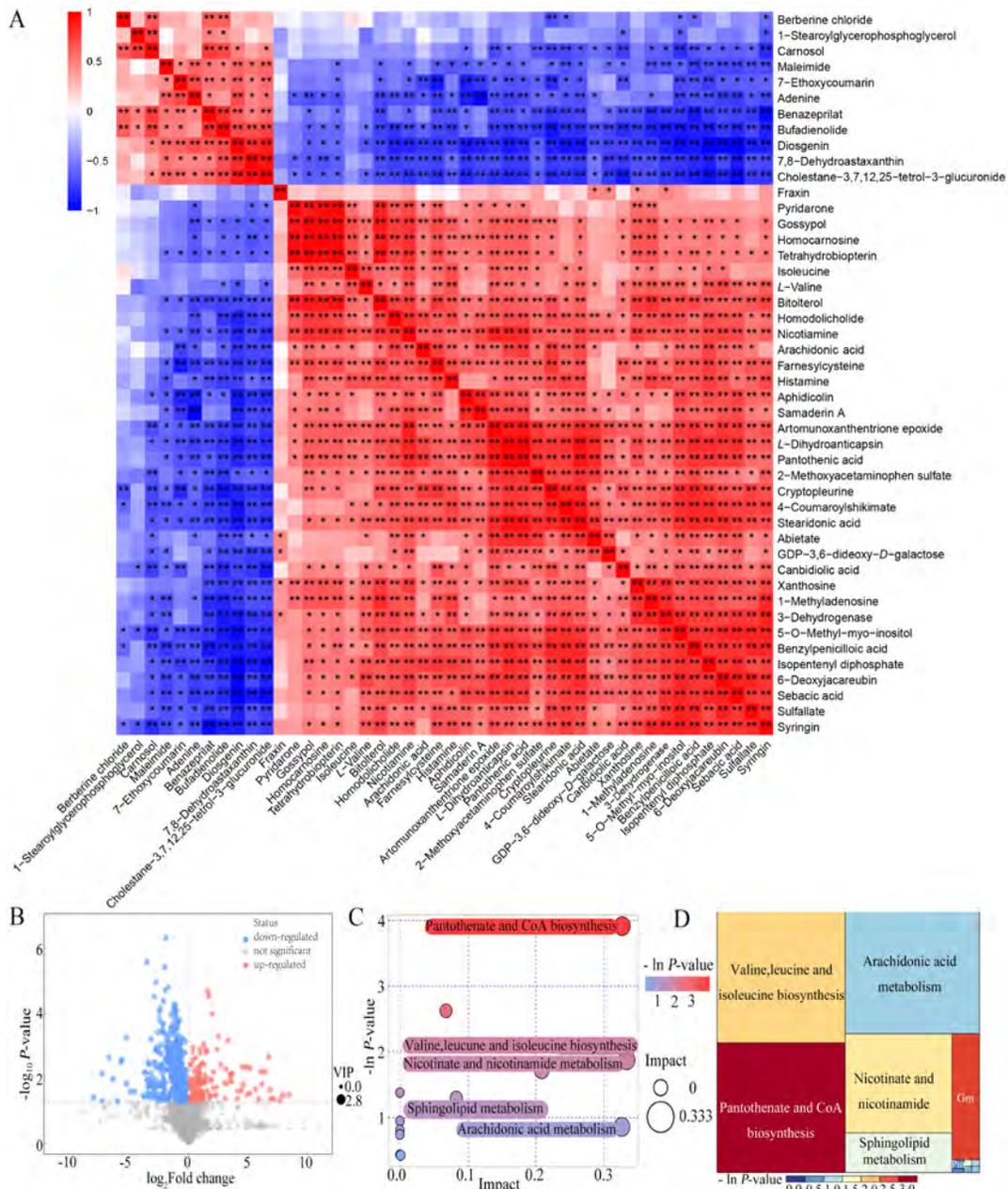
表2 不同海拔高原鼠兔的肾脏代谢物差异分子

Table 2 Differential molecules of kidney metabolites in plateau pikas at different altitudes

峰值 Peak	代谢物 Metabolites		MD组 vs MY组 MD group vs MY group			
	中文名 Chinese name	英文名 English name	RT/s	VIP	P value	FC
4217	蟾蜍二烯羟酸内酯	Bufadienolide	302.521	2.841	0.046 1	216.417
3586	薯蓣皂苷配基	Diosgenin	375.853	2.790	0.000 0	23.644
2596	盐酸小檗碱	Berberine chloride	448.647	1.684	0.010 1	2.418
5668	顺丁烯二酰亚胺	Maleimide	157.759	2.051	0.003 3	2.275
6118	腺嘌呤	Adenine	128.009	1.992	0.002 6	1.355
4040	7,8-脱氢虾青素	7,8-Dehydroastaxanthin	304.975	2.124	0.007 8	13.719
4168	贝那普利酯	Benazeprilat	279.705	2.212	0.000 8	10.772
4196	胆固醇-3,7,12,25-呋喃-3-葡萄糖醛酸	Cholestane-3,7,12,25-tetrol-3-glucuronide	273.513	2.149	0.001 2	5.633
4221	7-乙氧基香豆素	7-Ethoxycoumarin	261.173	1.795	0.017 9	2.839
3212	1-硬脂酰甘油磷酸甘油	1-Stearoylglycerophosphoglycerol	412.530	1.586	0.025 1	2.103
5578	2-甲氧基对乙酰氨基酚硫酸盐	2-Methoxyacetaminophen sulfate	36.282	2.150	0.000 5	0.453
5294	黄嘌呤	Xanthosine	57.261	1.863	0.007 7	0.448
5476	四氢生物蝶呤	Tetrahydrobiopterin	42.319	1.632	0.011 0	0.425
2896	小穗苈麻素	Cryptopleurine	440.968	2.258	0.000 3	0.292
3198	坎二酸	Canbidiolic acid	413.844	2.004	0.012 7	0.284
5570	GDP-3,6-二脱氧-D-半乳糖	GDP-3,6-dideoxy-D-galactose	36.317	1.735	0.001 6	0.197
5501	棉酚	Gossypol	41.544	1.725	0.019 3	0.160
4549	4-香豆素基莽草酸酯	4-Coumaroylshikimate	179.435	2.266	0.009 7	0.103
4596	紫丁香苷	Syringin	169.451	2.374	0.010 3	0.050
5805	5-O-甲基-间氨基-肌醇	5-O-Methyl-myo-inositol	33.358	2.543	0.000 5	0.026
5001	癸二酸	Sebacic acid	135.122	2.295	0.046 3	0.077
4671	萨马素 A	Samaderin A	163.209	1.535	0.037 8	0.217
4717	3-脱氢酶	3-Dehydrogenase	157.505	2.158	0.000 9	0.170
4514	硫烯草丹	Sulfallate	185.215	1.844	0.049 0	0.190
5688	双甲苯苄醇	Bitolterol	35.519	1.568	0.001 1	0.271
5523	烟碱	Nicotiamine	169.858	2.201	0.000 1	0.454
7265	吡达隆	Pyridarone	29.322	1.490	0.019 5	0.401
3058	高肌肽	Homocarnosine	412.238	1.966	0.006 3	0.390
3410	阿非迪霉素	Aphidicolin	388.298	2.133	0.005 0	0.205
3101	松香酸盐	Abietate	408.903	2.373	0.033 4	0.088
4573	秦皮苷	Fraxin	174.802	1.098	0.034 3	0.085
3554	高多环内酯	Homodolicholide	380.038	1.667	0.004 0	0.234
3984	法尼基半胱氨酸	Farnesylcysteine	328.343	2.148	0.015 9	0.224
59	泛酸	Pantothenic acid	157.754	2.460	0.000 1	0.480
6640	1-甲基腺苷	1-Methyladenosine	44.286	2.135	0.003 3	0.482
5674	L-二氢脱壳素	L-Dihydroantcapsin	157.754	2.510	0.000 1	0.463
3695	十八碳四烯酸	Stearidonic acid	359.953	2.698	0.003 7	0.103
4631	6-脱氧巴西红厚壳素	6-Deoxyjacareubin	237.103	2.310	0.011 0	0.096
5940	异戊烯焦磷酸	Isopentenyl diphosphate	142.170	2.771	0.038 3	0.004
6407	环氧化物青蒿琥酯	Artomunoxanthentriene epoxide	27.729	2.401	0.000 0	0.249
5768	苄基青霉酸	Benzylpenicilloic acid	151.870	2.655	0.025 4	0.034
302	异亮氨酸	Isoleucine	71.954	1.669	0.045 9	0.698
6496	L-缬氨酸	L-Valine	55.803	1.684	0.018 2	0.637
4165	鼠尾草酚	Carnosol	279.762	2.070	0.003 8	31.391
41	花生四烯酸	Arachidonic acid	466.526	1.614	0.010 5	0.695
5711	组胺	Histamine	35.217	1.740	0.042 9	0.537

注: MD, 来自青海省果洛藏族自治州玛多县星宿海地区海拔4 360 m的高原鼠兔; MY, 来自青海省海北藏族自治州门源地区海拔2 900 m的高原鼠兔。RT, 保留时间中值; VIP, 变量投影重要度; FC, 倍数变化, 即两组实验物质定量的比值; P value, 两组差异代谢物的显著性概率。

Note: MD, plateau pikas from the Xingxiuhai area, Maduo County, Guoluo Tibetan Autonomous Prefecture, Qinghai Province at an altitude of 4 360 m; MY, plateau pikas from the Menyuan area, Haibei Tibetan Autonomous Prefecture, Qinghai Province at an altitude of 2 900 m. RT, median retention time; VIP, variable importance in projection; FC, fold change, the quantitative ratio of two groups of experimental substances; P value, probability of significance of different metabolites between the two groups.



注：A为相关性分析热力图（Corr为变量相关系数）；B为火山图（VIP为变量投影重要度；FC为倍数变化，即两组代谢物定量的比值）；P值反映两组差异代谢物的显著性概率）；C为通路识别气泡图；D为通路识别矩形图（Gm即甘油磷脂代谢；Pm即嘌呤代谢）。

Note: A is correlation analysis heat map (Corr, correlation coefficients of variables); B is the volcano plot (VIP, variable importance in projection; FC, fold change, the quantitative ratio of two groups of experimental substances; P value, probability of significance of different metabolites between the two groups); C is the pathway recognition bubble chart; D is the path identification rectangular graph (Gm, glycerophospholipid metabolism; Pm, purine metabolism).

图2 不同海拔高原鼠兔的肾脏差异代谢物相关性及其相关通路

Figure 2 Correlation of kidney differential metabolites and related pathways in plateau pikas at different altitudes

ECH 相关蛋白 1 (Kelch-like ECH-associating protein 1, Keap1) /核因子E2 相关因子2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2) /抗氧化反应元件 (antioxidant response element, ARE) 信号转导通路而发挥抗氧化作用<sup>[15]</sup>。因此推测，低氧刺激导致高原鼠兔体内氧化应激增加，Keap1/Nrf2/ARE 经典抗氧化应激通路激活，

这可能是本研究中MD组高原鼠兔的鼠尾草酚水平显著高于MY组的分子机制。另外有文献报道，虾青素可激活Nrf2，促进Keap1与Nrf2解离，进而促进ARE下游基因氧化还原平衡因子表达，有利于高原鼠兔适应高原低氧条件下氧化应激环境。Hassanein等<sup>[16]</sup>研究发现，17种植物来源的香豆素衍生物可刺激Nrf2转

录, 致使下游 Keap1/ Nrf2/ARE 通路激活, 从而发挥抗氧化应激损伤效应。组胺对肾小球滤过率的影响被认为是组胺与 H1 受体介导肾小动脉收缩调节的结果<sup>[17-18]</sup>。本研究中, MD 组的组胺水平显著低于 MY 组, 推测低氧环境激活高原鼠兔肾脏组织中组胺 H1 受体激活, 导致入球动脉收缩, 肾小球血浆流量减少, 肾小球滤过率下降。

MD 组高原鼠兔的蟾蜍二烯羟酸内酯含量显著高于 MY 组。蟾蜍二烯羟酸内酯类化合物属于强心苷类, 具有抗肿瘤、抗炎、免疫调节、抗菌抗病毒、利钠、强心和收缩血管等作用<sup>[19-21]</sup>。推测蟾蜍二烯羟酸内酯可能影响高原鼠兔的肾脏血液分布, 进而改变钠水的重吸收, 有利于维持血容量的相对恒定, 以更好地适应高原极端环境。

本研究中氨基酸代谢差异表明其在肾脏高原适应机制中发挥核心作用, 它们不仅是蛋白质合成的基本单元, 还参与肾脏的多种代谢过程。肾脏中氨基酸通过不同的转运系统被重吸收和分泌, 维持血液中氨基酸的平衡, 并支持肾脏在滤过、重吸收和排泄代谢废物方面的功能。泛酸盐(维生素 B5)及其衍生物辅酶 A 在肾脏适应中扮演重要角色。泛酸盐是辅酶 A 的前体, 而辅酶 A 是脂肪酸氧化、糖异生和乙酰化反应等代谢通路的关键辅助因子。辅酶 A 有助于调节能量代谢与脂质代谢, 确保肾脏适应高原低氧下的代谢改变, 同时肾脏中氨基酸代谢改变对于维持内环境稳态至关重要。氨基酸代谢差异改变可作为高原鼠兔适应高原低氧的特征性改变, 对于不同海拔高原鼠兔的适应机制研究具有重要意义。

支链氨基酸 (branched-chain amino acids, BCAAs) 包括缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸, 在蛋白质合成、能量产生和信号转导中起着重要作用。它们的生物合成途径主要涉及丙酮酸衍生物类的氨基酸合成, 包括丙酮酸脱羧过程中, 丙酮酸与硫胺素焦磷酸 (thiamine pyrophosphate, TPP) 结合形成中间产物乙酰 TPP, 再与另一个丙酮酸缩合, 形成  $\alpha$ -乙酰乳酸, 然后通过一系列反应生成 BCAAs。BCAAs 的代谢与蛋白质合成和细胞生长密切相关, 其作用机制主要通过 mTOR 信号通路实现。泛酸是辅酶 A 的前体, 二者均为生物体内重要的代谢物, 在能量代谢及生物合成中发挥关键作用。辅酶 A 参与如脂肪酸氧化、糖酵解及三羧酸循环等生化反应。

蟾蜍二烯羟酸内酯、腺苷、腺嘌呤、薯蓣皂苷、

盐酸小檗碱、鼠尾草酚和虾青素等代谢物, 以及花生四烯酸、组胺和香豆素等, 在生物体内的代谢过程可能与 BCAAs 和辅酶 A 的生物合成途径存在交互影响。例如, 氨基酸代谢可能影响上述代谢物生成, 而辅酶 A 作为酰基载体参与脂肪酸的合成和氧化, 也可能影响上述代谢物的生成。上述代谢物的生物合成和代谢途径可能受到 BCAAs 和辅酶 A 代谢的影响, 因为其可能共享相同的代谢中间产物或由共同信号通路调控。总而言之, BCAAs 和辅酶 A 的生物合成途径与上述代谢物之间存在复杂的交互调控, 对于维持生物体的正常代谢过程发挥着重要作用。本研究中, 缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸生物合成通路及泛酸和辅酶 A 的生物合成通路的影响因子和富集程度依次下降且具有显著性, 表明上述通路可能在高原鼠兔低氧适应方面具有重要作用。本研究还发现其他一些高 VIP 值、P 值和 FC 值的差异性代谢物, 如环氧杂蒎酮在 MD 组表达水平显著低于 MY 组, 而藜芦胺和顺丁烯二酰亚胺等表达水平在 MD 组显著高于 MY 组。这些差异代谢物在低氧环境的调节机制目前仍不明确, 还需进一步研究。

综上所述, 本研究中发现的肾脏组织差异代谢物可能揭示不同海拔高原鼠兔的高原适应机制, 可作为低氧适应的生物标志物, 并为高海拔地区人类高原肾脏相关疾病治疗提供新的研究方向。

#### [医学伦理声明 Medical Ethics Statement]

本研究方案经青海大学医学院医学科学研究伦理委员会审查批准 (No. 2021-16)。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。

This study has been reviewed and approved by the Medical Research Ethics Committee of Qinghai University Medical School (No. 2021-16). 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]

何雨昕负责血液生化分析、质谱分析、信号通路等生物信息学分析, 制图制表, 整理数据, 统计分析, 撰写初稿;

白振忠负责动物捕捉, 参与研究设计;

薛华参与动物捕捉、采样、血液生化分析、质谱分析、信号通路等生物信息学分析, 以及制图制表;

郭子旭参与动物捕捉、采样、血液生化分析、质谱分析, 以及信号通路等生物信息学分析;

曹学锋负责动物捕捉, 研究设计和修订。

#### [利益声明 Declaration of Interest]

所有作者均声明本文不存在利益冲突。

**[参考文献References]**

- [1] 高聪慧, 李吉梅, 徐波, 等. 高原鼢鼠和高原鼠兔血液参数和血红蛋白亚型对不同海拔生境的响应[J]. 生理学报, 2023, 75(1):69-81. DOI: 10.13294/j.aps.2022.0105.  
GAO C H, LI J M, XU B, et al. Responses of blood parameters and hemoglobin subtypes in plateau pikas and plateau zokors to different altitude habitats[J]. Acta Physiol Sin, 2023, 75(1):69-81. DOI: 10.13294/j.aps.2022.0105.
- [2] 敖强国, 宋世涛, 邹慧. 高原低压低氧环境对平原健康男青年血像和肾功能影响[J]. 中华保健医学杂志, 2011, 13(6):456-458. DOI: 10.3969/j.issn.1674-3245.2011.06.009.  
AO Q G, SONG S T, ZOU H. Impact of hypoxia environment at plateau on renal function among healthy male youth[J]. Chin J Health Care Med, 2011, 13(6): 456-458. DOI: 10.3969/j.issn.1674-3245.2011.06.009.
- [3] 刘忠浩, 郭松长, 白祥慧, 等. 低氧暴露下高原鼠兔血液中三种内源性气体分子含量的变化[J]. 基因组学与应用生物学, 2021, 40(4):1539-1543. DOI: 10.13417/j.gab.040.001539.  
LIU Z H, GUO S C, BAI X H, et al. Changes of three endogenous gas molecules in the blood of plateau pika exposed to hypoxia[J]. Genom Appl Biol, 2021, 40(4): 1539-1543. DOI: 10.13417/j.gab.040.001539.
- [4] 张渭泽, 付林, 邹小艳, 等. 低氧暴露下高原鼠兔肺组织间隙连接蛋白40表达分析[J]. 兽类学报, 2022, 42(5):572-578. DOI: 10.16829/j.slxb.150686.  
ZHANG X Z, FU L, ZOU X Y, et al. Expression analysis of gap junction protein 40 in lung of plateau pika exposed to hypoxia [J]. Acta Theriol Sin, 2022, 42(5):572-578. DOI: 10.16829/j.slxb.150686.
- [6] CHANG Y, ZHANG W, CHEN K, et al. Metabonomics window into plateau hypoxia[J]. J Int Med Res, 2019, 47(11):5441-5452. DOI:10.1177/0300060519879323.
- [7] 杨卫波, 李素芝, 高钰琪, 等. 急性肾功能损伤在急性高原病发病过程中的差异研究[J]. 第三军医大学学报, 2018, 40(12):1109-1114. DOI: 10.16016/j.1000-5404.201710226.  
YANG W B, LI S Z, GAO Y Q, et al. Phenotypes of acute renal function injuries in different acute high-altitude diseases[J]. J Third Mil Med Univ, 2018, 40(12): 1109-1114. DOI: 10.16016/j.1000-5404.201710226.
- [8] BOREA P A, GESSI S, MERIGHI S, et al. Pharmacology of adenosine receptors: the state of the art[J]. Physiol Rev, 2018, 98(3): 1591-1625. DOI: 10.1152/physrev.00049.2017.
- [9] LI X Y, BERG N K, MILLS T, et al. Adenosine at the interphase of hypoxia and inflammation in lung injury[J]. Front Immunol, 2021, 11:604944. DOI:10.3389/fimmu.2020.604944.
- [10] DIAS L, POCHMANN D, LEMOS C, et al. Increased synaptic ATP release and CD73-mediated formation of extracellular adenosine in the control of behavioral and electrophysiological modifications caused by chronic stress [J]. ACS Chem Neurosci, 2023, 14(7): 1299-1309. DOI: 10.1021/acscchemneuro.2c00810.
- [11] SEMWAL P, PAINULI S, ABU-IZNEID T, et al. Diosgenin: an updated pharmacological review and therapeutic perspectives[J]. Oxid Med Cell Longev, 2022, 2022: 1035441. DOI:10.1155/2022/1035441.
- [12] YANG L F, REN S N, XU F, et al. Recent advances in the pharmacological activities of dioscin[J]. Biomed Res Int, 2019, 2019:5763602. DOI:10.1155/2019/5763602.
- [13] OCH A, PODGÓRSKI R, NOWAK R. Biological activity of berberine—a summary update[J]. Toxins(Basel), 2020, 12(11): 713. DOI:10.3390/toxins12110713.
- [14] SHELL B, FAULK K, THOMAS CUNNINGHAM J. Neural control of blood pressure in chronic intermittent hypoxia[J]. Curr Hypertens Rep, 2016, 18(3): 19. DOI: 10.1007/s11906-016-0627-8.
- [15] SATOH T, MCKERCHER S R, LIPTON S A. Nrf2/ARE-mediated antioxidant actions of pro-electrophilic drugs[J]. Free Radic Biol Med, 2013, 65:645-657. DOI:10.1016/j.freeradbiomed.2013.07.022.
- [16] HASSANEIN E H M, SAYED A M, HUSSEIN O E, et al. Coumarins as modulators of the Keap1/Nrf2/ARE signaling pathway[J]. Oxid Med Cell Longev, 2020, 2020:1675957. DOI: 10.1155/2020/1675957.
- [17] SUDARIKOVA A V, FOMIN M V, YANKELEVICH I A, et al. The implications of histamine metabolism and signaling in renal function[J]. Physiol Rep, 2021, 9(8): e14845. DOI: 10.14814/phy2.14845.
- [18] GRANGE C, GURRIERI M, VERTA R, et al. Histamine in the kidneys: what is its role in renal pathophysiology? [J]. Br J Pharmacol, 2020, 177(3):503-515. DOI:10.1111/bph.14619.
- [19] 喻昌燕, 孟令杰, 姜念, 等. 蟾皮化学成分和药理活性的研究进展 [J]. 中草药, 2021, 52(4): 1206-1220. DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.04.035.  
YU C Y, MENG L J, JIANG N, et al. Research progress on chemical constituents and pharmacological activities of Bofonis Corium[J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2021, 52(4):1206-1220. DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.04.035.
- [20] UDDIN M N, ALLEN S R, JONES R O, et al. Pathogenesis of pre-eclampsia: marinobufagenin and angiogenic imbalance as biomarkers of the syndrome[J]. Transl Res, 2012, 160(2):99-113. DOI:10.1016/j.trsl.2012.01.005.
- [21] CARULLO N, FABIANO G, D'AGOSTINO M, et al. New insights on the role of marinobufagenin from bench to bedside in cardiovascular and kidney diseases[J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(13):11186. DOI:10.3390/ijms241311186.

(收稿日期: 2024-07-10 修回日期: 2024-12-11)

(本文责任编辑: 张俊彦)

**[引用本文]**

何雨昕, 白振忠, 薛华, 等. 基于UHPLC-QE-MS的高原鼠兔肾脏差异代谢物及低氧适应机制分析[J]. 实验动物与比较医学, 2025, 45(1): 3-12. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.095.

HE Y X, BAI Z Z, XUE H, et al. Analysis of kidney differential metabolites and hypoxia adaptation mechanism of plateau pikas based on UHPLC-QE-MS[J]. Lab Anim Comp Med, 2025, 45(1): 3-12. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.095.



常书福, 博士, 毕业于复旦大学, 师从钱菊英和舒先红教授。毕业后留院工作, 现为复旦大学附属中山医院心内科副主任医师。临床主攻冠心病介入手术, 熟练掌握各种复杂冠状动脉介入技术, 且对疑难心血管疾病诊治和危重心血管疾病抢救经验丰富。基础科研聚焦于冠心病、冠脉微血管功能障碍和心脏衰老相关研究, 目前主持省级课题2项(临床冠心病和心脏衰老基础课题各1项), 市级和院级课题各1项; 参与多个临床研究课题(包括科技部重点研发项目和国家自然科学基金重点项目)和多个临床试验, 代表团队多次参加国内外学术交流。以第一作者或者通信作者身份发表学术论文多篇, 其中有8篇发表在 *European Heart Journal* 等 SCI 期刊; 获批实用新型专利3个。

刘荣乐, 博士, 毕业于复旦大学, 师从我国著名心脏病学专家葛均波院士, 曾赴美国南加利福尼亚大学做访问学者, 现为复旦大学附属中山医院心内科主治医师。临床主要从事结构性心脏病的诊疗及介入手术, 以及肿瘤心脏病学, 特别是免疫检查点抑制剂相关心肌炎的诊疗工作。基础研究主要涉及动脉粥样硬化、衰老和干细胞治疗等领域, 重点关注组织因子途径抑制物2对动脉粥样硬化的影响、平滑肌细胞表型转变在主动脉夹层和主动脉瘤中的作用机制, 以及内皮祖细胞对血管新生的影响等方面, 有着较为丰富的分子生物学、细胞学实验和动物实验基础, 包括构建多种基因敲除小鼠模型的经验。参与多项国家自然科学基金面上项目; 发表论文10余篇, 其中以第一作者身份发表SCI论文5篇。



## SHJH<sup>hr</sup>小鼠的心脏衰老表型研究

刘荣乐<sup>1</sup>, 程灏<sup>1</sup>, 尚付生<sup>2</sup>, 常书福<sup>1</sup>, 徐平<sup>3</sup>

(1. 复旦大学附属中山医院, 上海 200032; 2. 上海大学转化医学研究院, 上海 200444; 3. 上海吉辉实验动物饲养有限公司, 上海 201611)

**【摘要】** 目的 探讨自发性早衰SHJH<sup>hr</sup>小鼠心脏的衰老现象。方法 对不同周龄(10周龄和24周龄)的SHJH<sup>hr</sup>小鼠(SHJH<sup>hr</sup>组)和野生型ICR小鼠[用作野生组(wild-type, WT组)]进行对比研究。用小动物活体超声影像系统分析心脏功能, 安死后采集各脏器并称重, 了解心脏萎缩情况; 苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色后观察心脏病理损伤情况; Masson染色后分析心脏纤维化情况; 麦胚凝集素(wheat-germ agglutinin, WGA)染色后分析心脏心肌细胞面积; 酶联免疫吸附法检测心肌组织中氧化损伤指标包括超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GPX)和过氧化氢酶(catalase, CAT)的活性以及8-羟基-2'-脱氧鸟苷(8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, 8-OHdG)含量; 实时荧光定量PCR法检测炎症、纤维化、氧化应激相关标志因子的mRNA表达水平; 比色法检测丙二醛(malondialdehyde, MDA)水平。结果 与同周龄的WT组小鼠相比, 10周龄SHJH<sup>hr</sup>组小鼠的每搏输出量(stroke volume, SV)、射血分数(ejection fraction, EF)、缩短分数(fractional shortening, FS)和心肺重量无明显差异; 但是当小鼠达到24周龄时, SHJH<sup>hr</sup>组小鼠的SV、EF和FS值明显低于同周龄WT组小鼠(均  $P < 0.05$ ), 肺脏重量无显著变化, 但是心脏重量显著降低( $P < 0.05$ )。选取24周龄小鼠心脏组织进行组织学分析发现: 与WT组小鼠相比, SHJH<sup>hr</sup>组小鼠的心脏纤维化水平无明显差异, 但WGA染色显示心肌细胞面积显著减少( $P < 0.05$ )。PCR检测发现氧化应激标志因子 *Sod2*、*Gpx1* 和 *Cat* 基因的mRNA水平显著下调(均  $P < 0.05$ )。生化检测发现心肌组织中氧化损伤相关酶SOD、GPX和CAT活性显著降低(均  $P < 0.05$ ), 而氧化应激标志物8-OHdG和MDA水平显著增加(均  $P < 0.05$ )。结论 SHJH<sup>hr</sup>小鼠心脏出现早衰现象, 可能与心肌组织氧化应激损伤有关。

**【关键词】** SHJH<sup>hr</sup>小鼠; 心脏衰老; 氧化损伤

**【中图分类号】** R-332; Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1674-5817(2025)01-0013-08



**【基金项目】** 上海市科技创新行动计划项目“自发性早衰小鼠的心血管衰老相关表型分析及机制研究”(21140900103)

**【第一作者】** 刘荣乐(1988—), 男, 博士, 主治医师, 研究方向: 动脉粥样硬化和衰老。E-mail: liu.rongle@zs-hospital.sh.cn

**【通信作者】** 常书福(1981—), 男, 博士, 副主任医师, 研究方向: 心脏衰老和冠心病。E-mail: chang.shufu@zs-hospital.sh.cn。ORCID: 0000-0003-4190-3655

## Study on Cardiac Aging Phenotypes of SHJH<sup>hr</sup> Mice

LIU Rongle<sup>1</sup>, CHENG Hao<sup>1</sup>, SHANG Fusheng<sup>2</sup>, CHANG Shufu<sup>1</sup>, XU Ping<sup>3</sup>

(1. Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China; 2. Institute of Translational Medicine, Shanghai University, Shanghai 200444, China; 3. Shanghai Jihui Laboratory Animal Care Co., Ltd., Shanghai 201611, China)

Correspondence to: CHANG Shufu (ORCID: 0000-0003-4190-3655), E-mail: chang.shufu@zs-hospital.sh.cn

**[ABSTRACT] Objective** To investigate the spontaneous premature cardiac aging in SHJH<sup>hr</sup> mice. **Methods** A comparative study was conducted between SHJH<sup>hr</sup> mice (SHJH<sup>hr</sup> group) and wild-type ICR mice (WT group) at different ages (10 and 24 weeks). Cardiac function was analyzed using a small animal *in vivo* ultrasound imaging system. After euthanasia, organs were collected and weighed to assess the extent of cardiac atrophy. Cardiac pathological damage was observed using hematoxylin-eosin (HE) staining. Cardiac fibrosis was analyzed using Masson staining. Myocardial cell area was analyzed after wheat germ agglutinin (WGA) staining. The activities of oxidative damage indicators in myocardial tissue, including superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPX), and catalase (CAT), as well as the content of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG), were measured using enzyme-linked immunosorbent assay. Real-time fluorescence quantitative PCR was used to measure the mRNA expression levels of factors associated with inflammation, fibrosis, and oxidative stress. Colorimetric assay was used to measure malondialdehyde (MDA) levels. **Results** Compared to WT group mice of the same age, 10-week-old mice in the SHJH<sup>hr</sup> group showed no significant differences in stroke volume (SV), ejection fraction (EF), fractional shortening (FS), or heart and lung weights. However, at 24 weeks of age, mice in the SHJH<sup>hr</sup> group had significantly lower SV, EF, and FS values compared to mice of the same age in the WT group ( $P < 0.05$ ), with no significant change in lung weight but a significant reduction in heart weight ( $P < 0.05$ ). Histological analysis of heart tissue from 24-week-old mice revealed no significant difference in cardiac fibrosis levels between SHJH<sup>hr</sup> and WT groups, but WGA staining showed a significant reduction in myocardial cell area in mice in the SHJH<sup>hr</sup> group ( $P < 0.05$ ). PCR analysis revealed a significant downregulation of mRNA levels of oxidative stress factors *Sod2*, *Gpx1*, and *Cat* genes ( $P < 0.05$ ). Biochemical assays indicated significantly reduced activities of oxidative damage-related enzymes SOD, GPX, and CAT in myocardial tissue ( $P < 0.05$ ), while the levels of oxidative damage markers 8-OHdG and MDA significantly increased ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Mice in the SHJH<sup>hr</sup> group exhibit premature cardiac aging, which may be associated with oxidative stress damage in myocardial tissue.

**[Key words]** SHJH<sup>hr</sup> mice; Cardiac aging; Oxidative damage

衰老是生物体随着时间的增长,生理、生化和机体功能逐渐退化直至丧失的一种生物过程<sup>[1]</sup>。研究发现,心血管疾病的发生率在老年人群中明显增高<sup>[2-3]</sup>,提示衰老是影响心血管健康的一个主要风险因素。在我国,随着人口老龄化的日益加剧,心血管疾病事件也持续增多<sup>[4]</sup>。因此,开发能够模拟人类心肌衰老的动物模型成为当前科研工作者的任务之一,这对于衰老引起的心血管疾病的研究有着重大意义。

在衰老研究中,动物模型通常分为自然衰老、加速衰老和基因编辑三种<sup>[5]</sup>。自然衰老小鼠模型最符合人类正常衰老特征,也是其他衰老模型的衡量器<sup>[6]</sup>。然而,自然衰老小鼠模型存在耗时、费力、成本高、

心血管疾病发生率低的缺点,因此不适合应用于心血管衰老研究<sup>[7]</sup>。加速衰老小鼠模型虽然具有建模周期短、重复性好等优点,但是其维系成本较高、模型表型差异大,在心血管衰老研究中的应用受到一定限制<sup>[8]</sup>。基因编辑小鼠模型可研究特定基因在单一衰老疾病中的作用,已被广泛应用于各种疾病研究<sup>[9]</sup>。随着基因编辑技术的日益成熟,基因敲除小鼠被广泛应用于衰老研究中,尤其是心血管衰老的研究<sup>[10]</sup>。

SHJH<sup>hr</sup>小鼠是国内自主培育的一种无毛(hairless, *hr*)基因突变小鼠,通过将ICR小鼠突变子代与亲代回交,其后代再进行自交,成功建立了无毛小鼠繁育群体;该小鼠具有甲状腺功能障碍<sup>[11]</sup>、皮肤老化<sup>[12]</sup>

和骨与关节退变<sup>[13]</sup>等自发性衰老表型<sup>[14]</sup>。本研究基于该品系小鼠的生物学特性,观察与分析其不同周龄小鼠心脏组织的衰老表型,为衰老引起心血管疾病的研究提供实验载体。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

实验分4组:10周龄SHJH<sup>hr</sup>小鼠、10周龄ICR小鼠、24周龄SHJH<sup>hr</sup>小鼠和24周龄ICR小鼠,每组6只,均为雌性<sup>[14]</sup>,由上海吉辉实验动物饲养有限公司[SCXK(沪)2017-0012]提供。动物饲养于上海大学转化医学院[SYXK(沪)2019-0020]和复旦大学附属中山医院[SYXK(沪)2021-0022]的屏障设施中。饲养环境温度为(22±2)℃,相对湿度为50%~60%,12 h自动昼夜循环,小鼠可自由进食进水。所有动物实验方案均经复旦大学附属中山医院动物伦理委员会(批号2021-05-07)和上海大学科技伦理委员会审查通过(批号ECSHU2020-101),并按照美国国立卫生研究院的《实验动物护理和使用指南》以及中国实验动物使用相关标准进行实验操作。

### 1.2 试剂耗材

组织固定液即4%中性甲醛溶液(FNB4-5L)、苏木素伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色液(HE-3-500)和Masson三色染色试剂盒(MST-100T)均购自上海科汇生物技术有限公司; iFluor488-麦胚凝集素(wheat germ agglutinin, WGA)染色试剂(绿光, G1730-100UL)和DAPI染色试剂(G1012-10ML)均购自武汉赛维尔生物科技有限公司; 荧光猝灭剂(P0128S)和Bradford蛋白浓度测定试剂盒(P0006)购自上海碧云天生物技术股份有限公司; 丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量检测试剂盒(BC0025)以及超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GPX)、过氧化氢酶(catalase, CAT)活性检测试剂盒(货号分别为BC0175、BC1190、BC0205)均购自北京索莱宝科技有限公司; 8-羟基-2'-脱氧鸟苷(8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, 8-OHdG)酶联免疫吸附法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)测定试剂盒(impELM14205-48T)购自上海毕合生物化学技术有限公司; 实时荧光定量PCR试剂盒(TB Green, RR420)、RNA提取试剂(TRIzol, 9108)和反转录试剂盒(RT Master Mix, RR036)均购自日本TaKaRa公

司; 移液器枪头、离心管、冻存管等常用耗材均购自无锡耐思生命科技股份有限公司。

### 1.3 仪器设备

超高分辨率小动物活体超声影像系统(Vevo2100)购自加拿大VisualSonics公司; 酶标仪(Infinite E Plex)购自瑞士TECAN公司; 研究级全玻片扫描系统VS200(含普通白光和荧光显微镜)购自日本Olympus公司; 动物用气体麻醉机购自美国Dwyer仪器仪表制造公司; qTOWER<sup>3</sup>系列PCR仪购自德国Analytik Jena AG公司。

### 1.4 心脏超声检测

取10周龄、24周龄的SHJH<sup>hr</sup>小鼠(即SHJH<sup>hr</sup>组)和ICR小鼠(即WT组)各6只,一共24只。4种小鼠经适应性饲养3 d后,进行心脏超声检测。具体步骤:小鼠放入麻醉诱导盒中,应用异氟烷气体进行麻醉,将已麻醉的小鼠以仰卧姿势固定在动物操作平台上; 将小鼠口鼻塞入麻醉面罩,以体积分数为2%、流量为0.41 mL/min的异氟烷维持麻醉; 在动物操作平台的电极涂上导电膏,并用医用胶带将小鼠的爪子固定在电极垫上,确保采集到正确的心电图,其间维持小鼠体温,并检查呼吸频率; 将脱毛膏涂抹在小鼠的胸部和上腹部,2 min后用湿纱布或湿纸巾擦去脱毛膏,用生理盐水擦拭干净; 调整探头位置,避免压迫心脏,进行数据采集。左心室胸骨旁长轴视图用于左心室容量和功能评估,取心尖四腔切面检测小鼠心脏舒张功能。心功能指标中每搏输出量(stroke volume, SV)、射血分数(ejection fraction, EF)和缩短分数(fractional shortening, FS)主要反映心脏的收缩功能,二尖瓣前向血流e峰与a峰的比值(E'/A')主要反映心脏的舒张功能。

### 1.5 脏器称重

随机选取10周龄和24周龄的WT小鼠和SHJH<sup>hr</sup>小鼠各6只,禁食过夜,取静脉血后,采用颈椎脱臼法实施动物安死术。分离并收集小鼠肺脏和心脏,称取其重量,然后固定保存心脏组织,用于后续的病理学分析和分子生化检测。脏器重量用胫骨长度进行校准,即以肺或心脏重量/胫骨长度比率反映肺或心脏的萎缩情况。

### 1.6 HE染色和Masson染色检测心脏组织病理

将24周龄的WT小鼠和SHJH<sup>hr</sup>小鼠(各6只)心脏组织经固定液固定48 h后,经过逐级脱水透明处理后进行石蜡包埋,随后行5 μm切片。分别用HE染色

液及 Masson 三色染色试剂盒进行染色, 然后用光学显微镜观察心脏组织的病理变化并拍照。HE 染色主要反映组织细胞坏死、水肿、变性和炎性细胞浸润等异常病理学改变; 而 Masson 染色主要反映组织纤维化。最后, 使用 Image-Pro Analyzer 7.0 软件定量分析心脏组织纤维化情况, 并用 Image J 图像分析软件计算胶原纤维面积与组织总面积的比值, 该比值越大表示纤维化程度越严重。

### 1.7 WGA 染色检测心肌细胞面积

将 24 周龄的 WT 小鼠和 SHJH<sup>hr</sup> 小鼠 (各 6 只) 心脏组织切片经脱蜡、抗原修复, 加入 WGA 工作液, 温箱中孵育 1 h。随后用 DAPI 对比染色细胞核, 并在加入荧光猝灭剂后进行固定。最后使用荧光显微镜捕获和分析图像, 并使用 Image-Pro Analyzer 7.0 软件定量分析心肌细胞面积。

### 1.8 ELISA 法和比色法检测心脏组织中氧化损伤指标

取 24 周龄的 WT 小鼠和 SHJH<sup>hr</sup> 小鼠 (各 6 只) 左心室心尖位置组织, 制备组织匀浆, 根据 ELISA 试剂盒生产商提供的说明书, 用相应试剂盒检测心脏组织中氧化损伤相关酶 SOD、GPX 和 CAT 的活性, 以及氧化应激标志物 8-OHdG 和 MDA 的含量。然后, 使用酶标仪测量吸光度, 绘制标准曲线, 计算每组样本中各生化指标的活性或含量。

### 1.9 实时定量 PCR 法检测相关因子表达水平

取 24 周龄的 WT 小鼠和 SHJH<sup>hr</sup> 小鼠 (各 6 只) 左心室心尖位置组织, 应用 TRIzol 试剂提取心脏组织中总 RNA, 用 RT Master Mix 试剂盒反转录生成 cDNA。然后以 cDNA 为模板, 应用实时荧光定量 PCR 试剂盒进行检测。目的基因包括氧化应激相关因子 *Sod2*、*Sod3*、*Gpx1* 和 *Cat*, 炎症因子 *Il1β*、*Il6*、*Tnf* 和 *Ccl2*, 纤维化因子 *Tgfβ1*、*Col1α1* 和 *Actα2*, 以及内参基因 *GAPDH* 的引物序列见表 1。PCR 反应条件: 95 °C 预变性反应 5 min, 95 °C 变性反应 10 s, 60 °C 退火反应 30 s, 设置 35 次循环。通过 2<sup>-ΔΔCt</sup> 法计算目的基因的 mRNA 相对水平。

### 1.10 统计学分析

实验结果使用平均数±标准差 ( $\bar{x}±s$ ) 的形式表示, 采用 Graphpad Prism 8.0 软件进行统计分析。两组间均数比较采用 *t* 检验; 多组间均数比较采用单因素方差分析, 然后使用 LSD-*t* 检验进行两两比较。*P*<0.05 表示差异具有统计学意义。

表 1 目的基因的 PCR 引物序列

Table 1 Primer sequences of target genes used for real-time fluorescent quantitative PCR

基因名称 Name of genes	引物序列 Sequence (5'→3')
<i>Sod2</i>	CAGACCTGCCTTACGACTATGG; CTCGGTGGCGTTGAGATTGTT
<i>Sod3</i>	CCTTCTTGTCTACGGCTTGC; TCGCCTATCTTCTCAACCAGG
<i>Gpx1</i>	CCACCGTGTATGCCTTCTCC; AGAGAGACGCGACATTCTCAAT
<i>Cat</i>	GGAGGCGGAACCCAATAG; GTGTGCCATCTCGTCAGTGAA
<i>Il1β</i>	GCAACTGTTCTGAACTCAACT; ATCTTTGGGGTCCGTCAACT
<i>Il6</i>	CCAAGAGGTGAGTGCTTCCC; CTGTTGTTTCTGACTCTCTCCCT
<i>Tnf</i>	CACGCTCTTCTGTCTACTGAACTTC; CTTGGTGGTTTGTGAGTGTGAGG
<i>Ccl2</i>	TAAAAACCTGGATCGGAACCAAA; GCATTAGCTTCAGATTTACGGGT
<i>Tgfβ1</i>	CCACCTGCAAGACCATCGAC; CTGGCGAGCCTTAGTTTGGAC
<i>Col1α1</i>	GCTCCTCTTAGGGGCCACT; ATTGGGGACCCTTAGGCCAT
<i>Actα2</i>	GTCCCAGACATCAGGGAGTAA; TCGGATACTTCAGCGTCAGGA
<i>GAPDH</i>	AGAAGGTGGTGAAGCAGGCATC; CGAAGGTGGAAGAGTGGGAGTTG

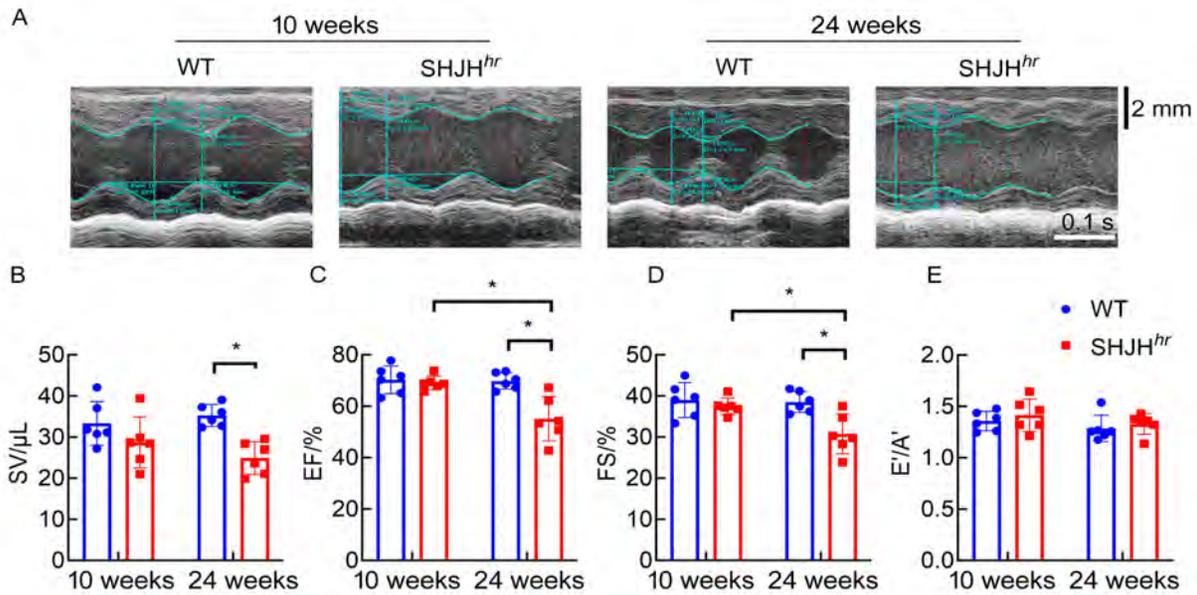
注: *Sod2*, 线粒体超氧化物歧化酶 2; *Sod3*, 线粒体超氧化物歧化酶 3; *Gpx1*, 谷胱甘肽过氧化物酶 1; *Cat*, 过氧化氢酶; *Il1β*, 白细胞介素 1β; *Il6*, 白细胞介素 6; *Tnf*, 肿瘤坏死因子; *Ccl2*, 趋化因子 (C-C 基元) 配体 2; *Tgfβ1*, 转化生长因子 β1; *Col1α1*, I 型胶原 α 链; *Actα2*, α-心肌肌动蛋白 2; *GAPDH*, 甘油醛-3-磷酸脱氢酶。

Note: *Sod2*, superoxide dismutase 2; *Sod3*, superoxide dismutase 3; *Gpx1*, glutathione peroxidase 1; *Cat*, catalase; *Il1β*, interleukin 1 beta; *Il6*, interleukin-6; *Tnf*, tumor necrosis factor; *Ccl2*, chemokine (C-C motif) ligand 2; *Tgfβ1*, transforming growth factor beta 1; *Col1α1*, collagen, type I, alpha-1; *Actα2*, actin alpha cardiac muscle 2; *GAPDH*, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

## 2 结果

### 2.1 24 周龄 SHJH<sup>hr</sup> 小鼠的心功能减退

10 周龄和 24 周龄的两组小鼠经小动物心脏超声检测心功能结果见图 1A。心功能结果分析发现, 10 周龄的 ICR 小鼠 (WT 组) 和 SHJH<sup>hr</sup> 小鼠心脏收缩功能指标 SV (图 1B)、EF (图 1C) 和 FS (图 1D) 之间没有显著差异 (均 *P*>0.05); 但是当达到 24 周龄时, SHJH<sup>hr</sup> 小鼠的 SV、EF 和 FS 值均明显低于 WT 组 ICR 小鼠 (均 *P*<0.05)。10 周龄和 24 周龄的 WT 和 SHJH<sup>hr</sup> 小鼠心脏



注：A，多普勒超声图；B~E，心功能指标的组间比较：每搏输出量（SV）、射血分数（EF）、缩短分数（FS）和二尖瓣前向血流e峰与a峰的比值（E'/A'）。以非早衰的野生型ICR小鼠（WT组）作为对照， $n=6$ ； $^*P<0.05$ 。

Note: A, Doppler ultrasound images; B to E, Intergroup comparison of cardiac function indicators: stroke volume (SV), ejection fraction (EF), fractional shortening (FS), and the ratio of the early (E') to late (A') mitral inflow velocities (E'/A'). Wild-type ICR mice without premature aging (WT group) were used as controls,  $n=6$ ;  $^*P<0.05$ .

图1 心脏超声检测不同周龄SHJH<sup>hr</sup>小鼠的心脏功能

Figure 1 Cardiac ultrasound examination of SHJH<sup>hr</sup> mice cardiac function at different ages

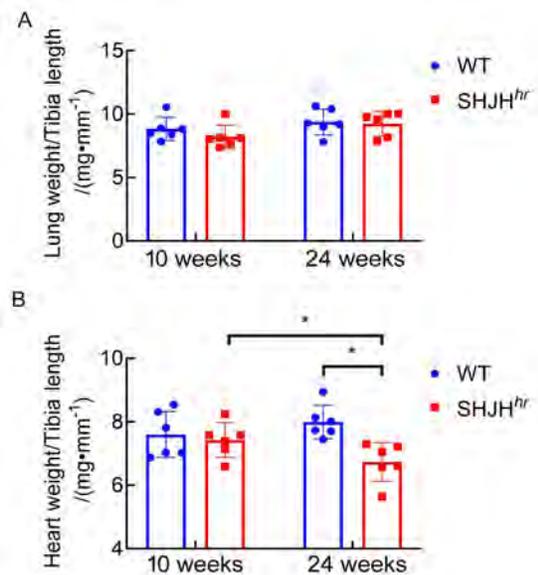
舒张功能指标E'/A'（图1E）之间也没有明显差异（ $P>0.05$ ）。

## 2.2 24周龄SHJH<sup>hr</sup>小鼠出现心脏萎缩

与WT小鼠相比，10周龄和24周龄的SHJH<sup>hr</sup>小鼠肺脏重量/胫骨长度的比率无明显变化（ $P>0.05$ ），提示肺组织无显著肥大反应（图2A）；10周龄时，WT小鼠与SHJH<sup>hr</sup>小鼠的心脏重量/胫骨长度比率之间也无明显差异（ $P>0.05$ ）；但当达到24周龄时，SHJH<sup>hr</sup>小鼠的心脏重量/胫骨长度比率明显低于10周龄SHJH<sup>hr</sup>小鼠和24周龄WT小鼠（均 $P<0.05$ ），提示24周龄SHJH<sup>hr</sup>小鼠心脏出现萎缩现象（图2B）。

## 2.3 24周龄SHJH<sup>hr</sup>小鼠心肌细胞面积减少

将24周龄的WT小鼠和SHJH<sup>hr</sup>小鼠心脏组织进行组织学染色观察（图3A），其中HE染色发现心肌炎性浸润的组间差异不明显，Masson染色显示两组心肌纤维化程度也无显著差异，而WGA染色显示心肌肥大标志物WGA在两组之间有显著变化。定量分析显示，SHJH<sup>hr</sup>小鼠的心脏纤维化水平与WT组小鼠差异无统计学意义（ $P>0.05$ ，图3B），而SHJH<sup>hr</sup>小鼠的心肌细胞面积明显小于WT组小鼠（ $P<0.05$ ，图3C）。



注：A，肺脏重量/胫骨长度比率；B，心脏重量/胫骨长度比率。以非早衰的野生型ICR小鼠（WT组）作为对照， $n=6$ ， $^*P<0.05$ 。

Note: A, Lung weight to tibia length ratio; B, Heart weight to tibia length ratio. Wild-type ICR mice without premature aging (WT group) were used as controls,  $n=6$ ,  $^*P<0.05$ .

图2 不同周龄SHJH<sup>hr</sup>小鼠的肺脏和心脏重量

Figure 2 Lung and heart weights of SHJH<sup>hr</sup> mice at different ages

将24周龄的WT小鼠和SHJH<sup>hr</sup>小鼠心肌组织进行实时荧光定量PCR法检测, 结果发现: 与WT组相比, SHJH<sup>hr</sup>小鼠心脏中炎症因子*Il1β*、*Il6*、*Tnf*和*Ccl2*基因的mRNA表达水平没有发生显著变化(均 $P>0.05$ , 图3D), 提示24周龄SHJH<sup>hr</sup>小鼠心脏未发生明显炎症; 与WT组相比, SHJH<sup>hr</sup>小鼠心脏中纤维化因子*Tgfb1*、*Col1α1*和*Actα2*基因的mRNA表达水平也没有发生显著变化(均 $P>0.05$ , 图3E), 提示24周龄SHJH<sup>hr</sup>小鼠心脏尚未出现显著的纤维化相关分子改变。

#### 2.4 24周龄SHJH<sup>hr</sup>小鼠心脏组织中氧化损伤指标观察

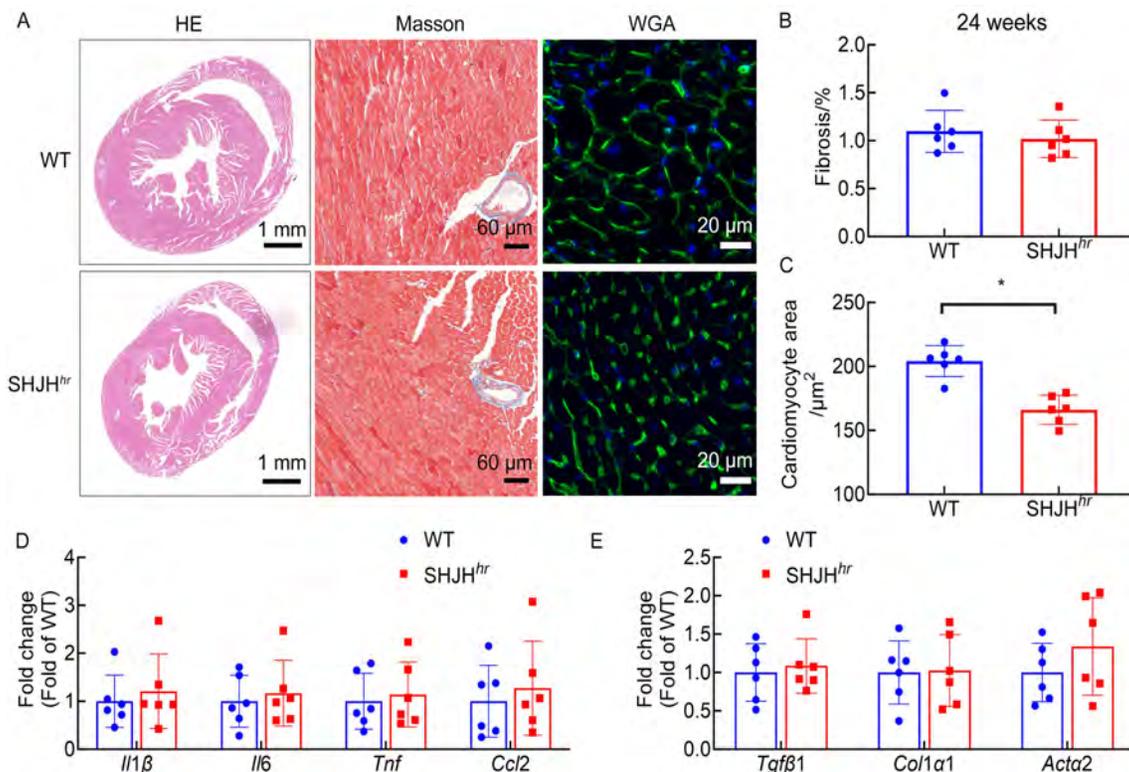
将24周龄的WT小鼠和SHJH<sup>hr</sup>小鼠心肌组织进行实时荧光定量PCR法检测, 结果发现: 与WT小鼠相比, SHJH<sup>hr</sup>小鼠心肌组织中氧化应激因子*Sod2*、*Gpx1*和*Cat*基因的mRNA水平明显降低(均 $P<0.05$ ), 而

*Sod3*的mRNA水平没有显著变化( $P>0.05$ , 图4A)。

分离24周龄两种小鼠的心肌组织后进行ELISA检测发现: 与WT小鼠相比, SHJH<sup>hr</sup>小鼠心肌组织中氧化损伤相关酶如SOD(图4B)、GPX(图4C)和CAT活性(图4D)均明显降低(均 $P<0.05$ ), 而心肌组织中氧化应激标志物8-OHdG(图4E)和MDA(图4F)水平均明显升高(均 $P<0.05$ )。

### 3 讨论

研究衰老离不开衰老动物模型。以往的研究中多用加速系统性衰老模型(如药物诱导、辐射诱导、基因调控等), 这一模型虽然能在一定程度上模拟自然衰老, 但并不能完全等同于自然衰老<sup>[5,9]</sup>。自然衰老动物模型被公认为最符合人类自然衰老特性的实验动物模型<sup>[15-16]</sup>; 但其存在周期长、费用高、健康状况差、

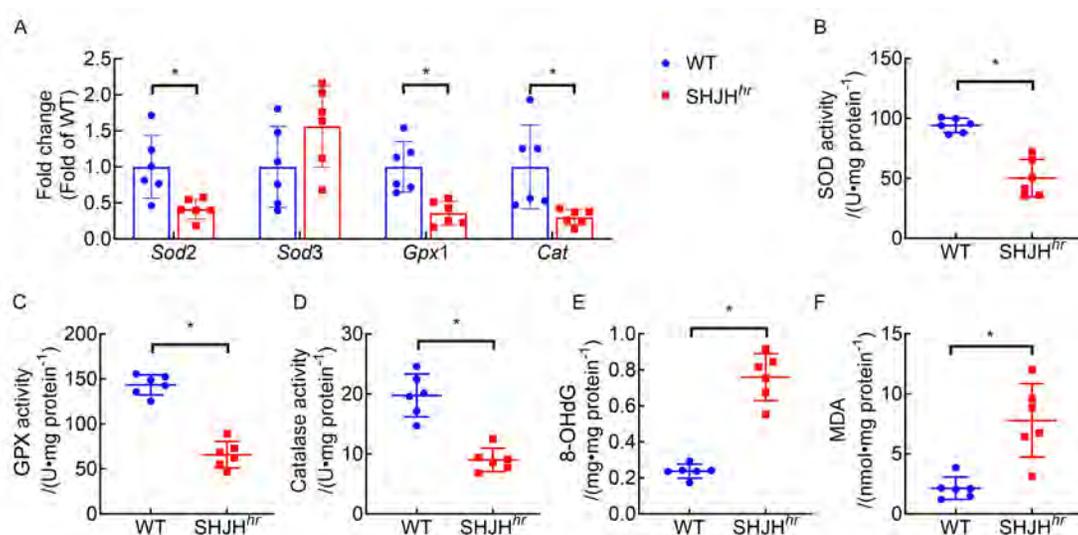


注: A, HE、Masson 和 WGA 染色的代表性图片; B, Masson 染色显示心肌纤维化水平统计; C, WGA 染色显示心肌 WGA 表达细胞所占面积分析; D, 实时荧光定量 PCR (RFQ-PCR) 检测心肌细胞中 *Il1β*、*Il6*、*Tnf* 和 *Ccl2* 基因的 mRNA 表达水平; E, RFQ-PCR 检测心肌细胞中 *Tgfb1*、*Col1α1* 和 *Actα2* 的 mRNA 表达水平。以非早衰的野生型 ICR 小鼠 (WT 组) 作为对照,  $n=6$ ; 与 WT 组比较,  $^*P<0.05$ 。

Note: A, Representative images of HE, Masson, and WGA staining; B, Statistical analysis of myocardial fibrosis levels shown by Masson staining; C, Analysis of the area occupied by WGA-positive cells in myocardial tissue as shown by WGA staining; D, Real-time fluorescent quantitative PCR (RFQ-PCR) measurement of mRNA expression levels of *Il1β*, *Il6*, *Tnf*, and *Ccl2* in cardiomyocytes; E, RFQ-PCR measurement of mRNA expression levels of *Tgfb1*, *Col1α1*, and *Actα2* in cardiomyocytes. Wild-type ICR mice without premature aging (WT group) were used as controls,  $n=6$ . Compared with the WT group,  $^*P<0.05$ .

图3 24周龄SHJH<sup>hr</sup>小鼠的心脏组织病理和相关因子转录水平分析

Figure 3 Analysis of cardiac histopathology and related factor transcriptional levels in 24-week-old SHJH<sup>hr</sup> mice



注：A，RT-PCR检测氧化应激因子超氧化物歧化酶 (*Sod*) 2、*Sod*3、谷胱甘肽过氧化物酶 (*Gpx*) 1和过氧化氢酶 (*Cat*) 的mRNA表达水平；B-D，ELISA法检测SOD、GPX和CAT活性；E，ELISA法检测8-羟基-2'-脱氧鸟苷 (8-OHdG) 含量表达；F，ELISA法检测丙二醛 (MDA) 水平。以非早衰的野生型ICR小鼠 (WT组) 作为对照， $n=6$ ，与WT组比较， $^*P<0.05$ 。

Note: A, RT-PCR was used to measure the mRNA expression levels of oxidative stress factors superoxide dismutase (*Sod*) 2, *Sod*3, glutathione peroxidase (*Gpx*) 1, and catalase (*Cat*); B to D, ELISA was used to determine the activities of SOD, GPX, and CAT; E, ELISA was used to measure the expression level of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG); F, ELISA was used to assess the level of malondialdehyde (MDA). Wild-type ICR mice without premature aging (WT group) were used as controls,  $n=6$ . Compared with the WT group,  $^*P<0.05$ .

图4 24周龄SHJH<sup>hr</sup>小鼠的心脏组织氧化损伤相关因子分析

Figure 4 Analysis of oxidative damage-related factors in cardiac tissue of 24-week-old SHJH<sup>hr</sup> mice

表型差异大、可重复性较差的特征，很难应用于抗衰老研究<sup>[17]</sup>。

本研究基于SHJH<sup>hr</sup>自发性早衰小鼠，探索其是否存在心脏衰老改变，为SHJH<sup>hr</sup>小鼠应用于心脏衰老研究提供依据。本研究中心脏超声检查发现，SHJH<sup>hr</sup>小鼠在生长到24周龄时，心脏收缩功能指标SV和EF显著低于WT组小鼠，提示SHJH<sup>hr</sup>小鼠在24周龄已经出现自发性心功能减退；结合心衰模型标准<sup>[18]</sup>，说明心脏功能自发性早衰模型构建成功。脏器称重发现，SHJH<sup>hr</sup>小鼠心脏在24周龄时出现萎缩，但是肺脏重量未出现变化；这提示尽管24周龄的SHJH<sup>hr</sup>小鼠心脏萎缩，心脏功能出现下降，但是尚未出现心衰现象，肺脏未发生水肿。

随后针对24周龄小鼠进行心脏组织学观察时，WGA染色发现SHJH<sup>hr</sup>小鼠的心肌细胞面积明显减少，这说明 $hr$ 突变会导致心肌细胞萎缩，从而加剧心脏功能下降。最后对24周龄小鼠的心肌组织氧化损伤因子进行了ELISA检测，结果发现 $hr$ 突变会下调SOD、GPX和CAT活性，促进氧化应激标志物8-OHdG表达，这些结果说明 $hr$ 突变诱发抗氧化系统功能障碍和心肌

组织氧化应激损伤。心脏生理性衰老与氧化应激之间存在密切关系。氧化应激是指体内氧化与抗氧化作用失衡的一种状态，倾向于氧化会导致细胞损伤和衰老。在心脏衰老过程中，氧化应激被认为是核心环节之一，直接导致细胞损伤，如内质网应激、细胞凋亡和铁死亡等<sup>[19]</sup>。但必须指出的是，在24周龄的SHJH<sup>hr</sup>小鼠心脏组织中未观察到明显的炎症和纤维化，而炎症细胞浸润和组织纤维化是心脏衰老发生的重要标志<sup>[20-21]</sup>。因此，本研究结果提示SHJH<sup>hr</sup>小鼠出现的自发性心脏衰老尚处于早期，还需要进一步的观察和更多的证据。在未来研究中，应将扩大年龄范围，进一步考察SHJH<sup>hr</sup>小鼠的心脏病理结构和衰老相关分子标志物的变化。

综上所述，本研究结果表明SHJH<sup>hr</sup>小鼠在24周龄时心脏功能减退，心脏萎缩，SOD、GPX和CAT活性降低，8-OHdG表达升高。这些结果提示SHJH<sup>hr</sup>小鼠可能出现了自发性心脏早衰，且与心肌组织氧化应激损伤有关。本研究将为今后针对衰老引起心脏疾病的基础研究和药物开发提供了一种非常有前景的动物模型。

### [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动物伦理委员会(批号:2021-05-07)和上海大学科技伦理委员会(批号:ECSHU2020-101)审查通过。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 Animal Ethics Committee of Zhongshan Hospital Affiliated to Fudan University (Approval No. 2021-05-07) and the Ethics Committee of Shanghai University (Approval No. ECSHU2020-101). 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]

刘荣乐负责动物实验、收集资料、数据分析及论文撰写;  
程灏负责分子生物学检测,参与动物实验和病理评价实验;  
尚付生参与动物实验和分子生物学实验;  
常书福负责课题设计及论文修改;  
徐平负责论文把关。

### [利益声明 Declaration of Interest]

所有作者均声明本文不存在利益冲突。

### [参考文献 References]

- LEIDAL A M, LEVINE B, DEBNATH J. Autophagy and the cell biology of age-related disease[J]. *Nat Cell Biol*, 2018, 20(12): 1338-1348. DOI:10.1038/s41556-018-0235-8.
- WAGNER J U G, TOMBOR L S, MALACARNE P F, et al. Aging impairs the neurovascular interface in the heart[J]. *Science*, 2023, 381(6660):897-906. DOI: 10.1126/science.ade4961.
- XIE S, XU S C, DENG W, et al. Metabolic landscape in cardiac aging: insights into molecular biology and therapeutic implications[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2023, 8(1): 114. DOI: 10.1038/s41392-023-01378-8.
- 马丽媛,王增武,樊静,等.«中国心血管健康与疾病报告2022»要点解读[J]. *中国全科医学*, 2023, 26(32):3975-3994. DOI: 10.12114/j.issn.1007-9572.2023.0408.  
MA L Y, WANG Z W, FAN J, et al. Interpretation of Report on Cardiovascular Health and Diseases in China 2022[J]. *Chin Gen Prac*, 2023, 26(32): 3975-3994. DOI: 10.12114/j.issn.1007-9572.2023.0408.
- 李雪婵,韩乐,王雪文,等.啮齿类动物衰老模型研究新进展[J]. *中国实验动物学报*, 2023, 31(12):1605-1609. DOI: 10.3969/j.issn.1005-4847.2023.12.011.  
LI X C, HAN L, WANG X W, et al. Research progress in aging rodent models [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2023, 31(12): 1605-1609. DOI: 10.3969/j.issn.1005-4847.2023.12.011.
- CAI N S, WU Y F, HUANG Y. Induction of accelerated aging in a mouse model[J]. *Cells*, 2022, 11(9): 1418. DOI: 10.3390/cells11091418.
- RIEHLE C, BAUERSACHS J. Small animal models of heart failure[J]. *Cardiovasc Res*, 2019, 115(13): 1838-1849. DOI: 10.1093/cvr/cvz161.
- PAPAIOANNOU V E, BEHRINGER R R. Obtaining or generating gene mutations in mice[J]. *Cold Spring Harb*

Protoc, 2023. DOI: 10.1101/pdb.over107956.

- HERRANZ N, GIL J. Mechanisms and functions of cellular senescence[J]. *J Clin Invest*, 2018, 128(4): 1238-1246. DOI: 10.1172/JCI95148.
- CACHEIRO P, SPIELMANN N, MASHHADI H H, et al. Knockout mice are an important tool for human monogenic heart disease studies[J]. *Dis Model Mech*, 2023, 16(5): dmm049770. DOI: 10.1242/dmm.049770.
- LI Y C, GAO J F, GUAN Y L, et al. Novel rhino-like SHJH<sup>hr</sup> mice with thyroid dysfunction[J]. *Zool Res*, 2021, 42(6):734-738. DOI: 10.24272/j.issn.2095-8137.2021.211.
- GAO J F, LI Y C, GUAN Y L, et al. The accelerated aging skin in rhino-like SHJH<sup>hr</sup> mice[J]. *Exp Dermatol*, 2022, 31(10): 1597-1606. DOI: 10.1111/exd.14632.
- WANG Y, SUN L, KAN T Y, et al. Hypermethylation of Bmp2 and Fgfr2 promoter regions in bone marrow mesenchymal stem cells leads to bone loss in prematurely aged mice[J]. *Aging Dis*, 2024. DOI: 10.14336/AD.2024.0324.
- 唐慧青,常书福,于志锋,等. SHJH<sup>hr</sup>小鼠部分生物学特性及衰老表型的测定与分析[J]. *实验动物与比较医学*, 2023, 43(01):44-52. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2022.069.
- TANG H Q, CHANG S F, YU Z F, et al. Investigation on biological characteristics and aging phenotype of SHJH<sup>hr</sup> mice[J]. *Lab Anim Comp Med*, 2023, 43(1): 44-52. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2022.069.
- MITCHELL S J, SCHEIBYE-KNUDSEN M, LONGO D L, et al. Animal models of aging research: implications for human aging and age-related diseases[J]. *Annu Rev Anim Biosci*, 2015, 3(1):283-303. DOI: 10.1146/annurev-animal-022114-110829.
- XIE K, EHNINGER D. Ageing-associated phenotypes in mice [J]. *Mech Ageing Dev*, 2023, 214: 111852. DOI: 10.1016/j.mad.2023.111852.
- Tabula Muris Consortium. A single-cell transcriptomic atlas characterizes ageing tissues in the mouse[J]. *Nature*, 2020, 583(7817):590-595. DOI: 10.1038/s41586-020-2496-1.
- NOLL N A, LAL H, DAVID MERRYMAN W. Mouse models of heart failure with preserved or reduced ejection fraction[J]. *Am J Pathol*, 2020, 190(8): 1596-1608. DOI: 10.1016/j.ajpath.2020.04.006.
- PAGAN L U, GOMES M J, GATTO M, et al. The role of oxidative stress in the aging heart[J]. *Antioxidants (Basel)*, 2022; 11(2):336. DOI: 10.3390/antiox11020336.
- Aging Biomarker Consortium, BAO H, CAO J, et al. Biomarkers of aging[J]. *Sci China Life Sci*, 2023, 66(5): 893-1066. DOI: 10.1007/s11427-023-2305-0.
- CAI Y S, SONG W, LI J M, et al. The landscape of aging[J]. *Sci China Life Sci*, 2022, 65(12): 2354-2454. DOI: 10.1007/s11427-022-2161-3.

(收稿日期:2024-07-19 修回日期:2024-12-11)

(本文责任编辑:张俊彦)

### [引用本文]

刘荣乐,程灏,尚付生,等. SHJH<sup>hr</sup>小鼠的心脏衰老表型研究[J]. *实验动物与比较医学*, 2025, 45(1): 13-20. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.100.

LIU R L, CHENG H, SHANG F S, et al. Study on cardiac aging phenotypes of SHJH<sup>hr</sup> mice[J]. *Lab Anim Comp Med*, 2025, 45(1): 13-20. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.100.



刘迪文, 研究员, 浙江省实验动物学专家。1982年原浙江农业大学(现浙江大学动物科学学院)兽医专业毕业, 分配至原浙江医科大学(现浙江大学医学院)实验动物中心, 从事医学实验动物教学、科研及管理工作, 1998年并入浙江大学实验动物中心工作。1983年参加国家科委举办的为期1年的“第一期全国实验动物专业科技人员进修班”学习。曾主持省部级课题4项, 厅局级课题若干项, 培育了Zmu-1:DHP远交系豚鼠新品种, 开发了国内特有的Zmu-1:DHP近交系豚鼠新品系; 围绕这些动物模型在学术期刊上发表论文50余篇, 获得浙江省科技进步三等奖和浙江省实验动物特殊贡献奖。参编实验动物专业书籍1部, 制定国家实验动物标准1项。

## 不同毛色豚鼠的 *TYR* 及 *MC1R* 基因多态性及组织表达分析

汤银根<sup>1</sup>, 冯亚仙<sup>1</sup>, 钟敏<sup>1</sup>, 卫振<sup>2</sup>, 汪浏<sup>2</sup>, 刘迪文<sup>2</sup>

(1. 浙江宏润生物科技有限公司, 桐乡 314512; 2. 浙江大学实验动物中心, 杭州 310013)

**[摘要]** **目的** 为定位豚鼠优势性状基因筛选遗传标志, 探索豚鼠酪氨酸酶 (tyrosinase, *TYR*)、黑素皮质素1受体 (melanocortin 1 receptor, *MC1R*) 基因多态性及其 mRNA 表达水平与毛色表型的关系。**方法** 选择自主培育的普通级豚鼠57只, 依据毛色分为白(22只)、花(22只)和黑(13只)3组。腹腔注射过量戊巴比妥钠对豚鼠施行安乐死后, 取背部皮肤, 提取组织中DNA。通过克隆测序, 检测各组豚鼠 *TYR*、*MC1R* 基因外显子编码序列 (coding sequence, CDS) 的多态性, 采用实时荧光定量PCR方法检测两个基因在皮肤组织中的 mRNA 表达, 进而探讨两基因与豚鼠毛色的关系。**结果** 在 *TYR* 外显子 I 的 CDS 区域发现1个单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 位点, 其碱基A被G替换。所有白色豚鼠的 *TYR* 基因呈G/G基因型; 深色(花、黑)豚鼠无G/G基因型, 多数为A/A型, 少数为A/G型; 黑色豚鼠的A/A基因型频率高于花色豚鼠。*MC1R* 基因外显子有2760 bp 序列缺失, 标记为-基因; 非缺失样本标记为N基因。大部分白色豚鼠的 *MC1R* 基因呈-/N基因型; 花色豚鼠以-/N为主; 黑色豚鼠以N/N为主, -/N次之。白色豚鼠的 *TYR* 基因表达水平较高, 花色豚鼠较低, 黑色豚鼠居中, 但三者无显著性差异 ( $P>0.05$ )。白色豚鼠的 *MC1R* 基因表达水平非常低, 花色及黑色豚鼠均极显著高于白色豚鼠 ( $P<0.01$ ), 黑色豚鼠又显著高于花色豚鼠 ( $P<0.05$ )。**结论** 豚鼠 *TYR* 与 *MC1R* 基因协同调控毛色。*TYR* 基因的G位点突变可能导致豚鼠白化, *MC1R* 基因的N位点改变影响毛色的深浅。

**[关键词]** 豚鼠; 基因多态性; 基因表达; 毛色; 酪氨酸酶; 黑素皮质素1受体

**[中图分类号]** Q95-33; R-332 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2025)01-0021-09



## Polymorphism and Tissue Expression Analysis of *TYR* and *MC1R* Genes in Guinea Pigs with Different Coat-Color Phenotypes

TANG Yingen<sup>1</sup>, FENG Yaxian<sup>1</sup>, ZHONG Min<sup>1</sup>, WEI Zhen<sup>2</sup>, WANG Lie<sup>2</sup>, LIU Diwen<sup>2</sup>

(1. Zhejiang Hongrun Biotechnology Co., Ltd., Tongxiang 314512, China; 2. Laboratory Animal Center, Zhejiang University, Hangzhou 310013, China)

Correspondence to: LIU Diwen (ORCID:0000-0002-2921-4227), E-mail: liudiwen2004@163.com

**[ABSTRACT]** **Objective** To explore the polymorphism of tyrosinase (*TYR*) and melanocortin 1 receptor (*MC1R*) genes and their mRNA expression levels in relation to coat-color phenotypes in guinea pigs, providing genetic markers for locating dominant traits in guinea pigs. **Methods** A total of 57 self-bred

**[基金项目]** 浙江省基础公益研究计划项目“通过重测序和FISH定位建立豚鼠SSR遗传检测方法的研究”(LTGD24C040001)

**[第一作者]** 汤银根(1973—),男,大专,兽医师,研究方向:实验动物繁育及管理。E-mail:185410091@qq.com

**[通信作者]** 刘迪文(1958—),男,本科,研究员,研究方向:实验动物培育及其生物学研究。E-mail:liudiwen2004@163.com。ORCID:0000-0002-2921-4227

ordinary-level guinea pigs were selected and divided into three groups based on coat color: white ( $n=22$ ), variegated ( $n=22$ ) and black ( $n=13$ ). The guinea pigs were euthanized with an overdose of pentobarbital sodium via intraperitoneal injection. DNA was then extracted from the dorsal skin tissue. Polymorphism in the coding sequence (CDS) of the exons of the *TYR* and *MC1R* genes in each group was detected by cloning and sequencing. The mRNA expression of the two genes in skin tissues was detected by real-time fluorescent quantitative PCR to investigate the relationship between these genes and guinea pig coat color. **Results** A single nucleotide polymorphism (SNP) site was found in the CDS region of *TYR* exon I, where the base A was replaced by G. All white guinea pigs had the G/G genotype for *TYR*, while no deep-colored (variegated and black) guinea pigs exhibited the G/G genotype for *TYR*. Most deep-colored guinea pigs had the A/A genotype, and a few had A/G genotype. The A/A genotype frequency in black guinea pigs was higher than in variegated guinea pigs. A 2 760 bp sequence deletion was identified in the exon of the *MC1R* gene, marked as the - gene, with non-deleted samples marked as N gene. Most white guinea pigs had the -/- genotype for *MC1R*, variegated guinea pigs mainly had the -/N genotype, and black guinea pigs mainly had the N/N genotype, with a few showing the -/N. The *TYR* gene expression level was higher in white guinea pigs, lower in variegated guinea pigs, and intermediate in black guinea pigs, but there was no significant difference among the three groups ( $P>0.05$ ). The *MC1R* gene expression level in white guinea pigs was extremely low, while both variegated and black guinea pigs showed significantly higher levels than white guinea pigs ( $P<0.01$ ). Black guinea pigs showed significantly higher levels than variegated guinea pigs ( $P<0.05$ ). **Conclusion** The *TYR* and *MC1R* genes synergistically regulate coat color of guinea pigs. The G-site mutation in the *TYR* gene may lead to albinism, and the change of N-site in the *MC1R* gene affects the depth of the coat color.

**[Key words]** Guinea pig; Gene polymorphism; Gene expression; Coat color; Tyrosinase; Melanocortin 1 receptor

豚鼠作为病毒学研究及疫苗开发的载体，是一种比较理想的实验动物<sup>[1]</sup>。本课题组曾报告，豚鼠对口蹄疫病毒攻击的易感性与其毛色表型存在显著相关性<sup>[2]</sup>，提示毛色基因结构及表达水平可能与豚鼠免疫力相关。已有研究表明，毛色调控基因黑素皮质素1受体 (melanocortin 1 receptor, *MC1R*) 的多态性与烧伤后创面感染易感性及免疫功能相关<sup>[3]</sup>。因此，毛色基因变化可能导致免疫功能变化，从而影响豚鼠对口蹄疫病毒的易感性。已知各品种豚鼠的毛色表型多样，毛色基因多态性与毛色表型紧密相关。

酪氨酸酶 (tyrosinase, *TYR*) 和 *MC1R* 是调控毛色的两个重要基因。*TYR* 是酪氨酸酶相关蛋白家族成员之一，酪氨酸酶是黑色素合成过程中的限速酶，*TYR* 表达量及活性的高低直接影响真黑素与褐黑素的表达，进而对动物毛色产生影响。*TYR* 由5个外显子和4个内含子组成，其编码区 (coding sequence, CDS) 为 1 593 bp。*MC1R* 是黑色素细胞中的 G 蛋白偶联受体，主要参与黑色素类型与数量的调控，导致真黑素 (黑色或棕色色素) 或褐黑素 (红色或黄色) 的产生。*MC1R* 基因有 1 个外显子，其 CDS 为 951 bp。2018

年，Yu等<sup>[4]</sup>检测了野生色、白棕斑块色及白色3种被毛豚鼠的*TYR*基因多态性，发现白色豚鼠*TYR*基因外显子I区域呈A→G点突变。同年，Vidal<sup>[5]</sup>发现，白色伴有棕色、棕黑色和黑色斑块3种被毛的豚鼠*MC1R*基因序列缺失多态性与毛色有关。国内赖伟宁等<sup>[6]</sup>还报告，黄毛色豚鼠的*MC1R*基因在603 260 ~ 606 019 bp处缺失一段2 760 bp的序列，其中包括CDS区域。在上述文献基础上，本研究拟通过对本课题组培育的3种毛色即白色、花色及黑色豚鼠的*TYR*和*MC1R*毛色基因CDS多态性及RNA表达量分析，探讨豚鼠毛色基因多态性和表达量在调控豚鼠毛色中的作用，以期为研究豚鼠毛色基因相关性状提供遗传标志。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

由中国医学科学院引进的白色豚鼠，与浙江大学实验动物中心原先饲养的花色豚鼠杂交，然后通过近亲繁殖11代，分离出白色、黑色和花色3种毛色群体。每个毛色群体再以封闭形式远交繁殖4代以上，最后

形成3个远交群。将白色豚鼠命名为Zmu-1:DHP品种,黑色豚鼠命名为Zmu-2:DHP品种,花色豚鼠命名为DHP品种。本实验取Zmu-1:DHP白色豚鼠22只,DHP花色豚鼠22只,Zmu-2:DHP黑色豚鼠13只,

体重约300~400 g,性别不论。所有动物均来自浙江宏润生物科技有限公司[SCXK(浙)2022-0010],质量合格证号为20240315Cddz0600999173。所有豚鼠毛色表型见图1。



图1 白色(A)、花色(B)和黑色(C)豚鼠的毛色表型

Figure 1 White (A), variegated (B), and black (C) coat-color phenotypes of the guinea pigs

## 1.2 试剂及仪器

DNA提取试剂盒(Code No.9765)、RNA提取试剂盒(Code No.9767)、RNA反转录试剂盒(Code No. RR037Q)和SYBR Green荧光定量PCR染料(Code No. RR820Q)均购自日本TaKaRa公司,2×Hieff®PCR预混液(Yeasen 10157)购自翌圣生物科技(上海)股份有限公司。DNA测序试剂BigDye3.1、5×测序缓冲液和高度去离子(Hi-Di)甲酰胺购自美国Applied Biosystems公司,虾碱酶(shrimp alkaline phosphatase, SAP)购自美国Promega公司,外切酶Exo I购自美国Epicentre公司。2720型PCR仪和3730XL型测序仪均购自美国Applied Biosystems公司,CFX-96荧光定量PCR检测仪、Gene Pluser Xcell型电泳仪和GelDoc XR(170-8170)型凝胶图像仪均购自美国Bio-Rad公司,Nano-Drop分光光度计购自美国Thermo公司。

## 1.3 皮肤组织取样

动物实验在浙江中医药大学动物实验研究中心[SYXK(浙)2021-0012]的豚鼠饲养室进行,普通级环境,相对湿度为40%~70%,室温保持在22~26℃,昼夜时长12/12 h。动物实验方案经浙江中医药大学实验动物管理与伦理委员会审查批准(IACUC-202305-11)。整个动物饲养及实验操作过程均按照中国动物伦理福利相关标准执行。获取实验材料前,先用过量戊巴比妥钠麻醉对豚鼠施行安乐死,然后剪取其背部直径为1.5 cm的皮肤,置于2 mL试管内,迅速放入液氮。等所有皮肤组织样本取完后,放置于-85℃冰箱保存。

## 1.4 DNA、RNA提取及RNA反转录

分别用DNA和RNA提取试剂盒,按照说明书提取豚鼠皮肤组织中DNA及RNA,然后电泳检测其质量。使用反转录试剂盒将RNA反转录成cDNA,以供后续实时荧光定量PCR检测;具体操作按照试剂盒说明书进行。

## 1.5 引物设计

在NCBI上查到豚鼠TYR、MC1R基因的DNA序列,包括外显子(含CDS)和部分内含子。在CDS及其旁侧序列上用Primer 5.0软件设计引物,使扩增的目标序列覆盖所有CDS。在TYR基因的CDS I区域设计2对引物,在CDS II-V区域各设计1对引物。因某些豚鼠个体的MC1R基因涉及序列缺失(包括CDS及其两侧序列缺失),所以该基因设计1对跨越缺失区的引物MC1R-F2和MC1R-R2,同时在缺失区内各设计1条引物MC1R-F和MC1R-R。扩增TYR和MC1R基因的引物序列见表1,MC1R两对引物在基因序列上的结合位置示意图2。

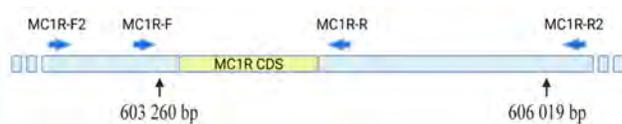
另外,用软件设计检测TYR、MC1R基因RNA表达量的引物序列,详见表2。

## 1.6 测序分析TYR和MC1R基因多态性

利用表1所示DNA引物,分别用PCR扩增3个品种豚鼠皮肤组织中的TYR、MC1R基因,电泳检测扩增产物。然后委托上海天昊生物科技有限公司对扩增的DNA片段进行测序,使用Polyphred软件分析基因结构、单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)突变点和突变区域。

表1 测序扩增 *TYR*、*MC1R* 基因编码序列的引物Table 1 Primers for amplifying the coding sequences of the *TYR* and *MC1R* genes

引物名称 Primer name	引物序列 (5'→3') Primer sequence (5' to 3')	扩增片段长度/bp Length of amplified fragment/bp	位置 Location
TYR-1F1	GCTCAAACAGAGTTTGAAGCA	534	外显子 I
TYR-1R1	AAACATGGGAGTTGATCCATTCTT		
TYR-1F2	GAGTGTCCCAGAGAAGGATAAATTC	571	外显子 I
TYR-1R2	ATGAGGTGCTCTGTAAGGACAGATA		
TYR-2F	CCTGATTATTAGAAATCAAAGCTGGTAAC	382	外显子 II
TYR-2R	AATTTAAACACAAAGTCAGGAGGAAA		
TYR-3F	TAGTCATTGGACTTTTATCAGGTAAACTA	387	外显子 III
TYR-3R	AATCCTACCAACTGGGTAAATTAGCATA		
TYR-4F	ATATTATGTAGGGCACAATAGCATGAA	462	外显子 IV
TYR-4R	TAGAGATAACACTCTAGAAACATAAACTT		
TYR-5F	AAAAATTGAGATTCCTTCTATTTTCAG	365	外显子 V
TYR-5R	GATCTTCACTGACAAACAGGGATT		
MC1R-F	CACTCTGGGACCCCTGGAT	1 249	外显子
MC1R-R	TTCTGCTTTTGGGGTCATACTC		
MC1R-F2	CCCCGTGATAAACAGCACAATGG	3 956 or 1 196	外显子 I
MC1R-R2	TTGTGCCTCCTTGTGCTGTGTC		



注：黄色区域为编码序列（CDS）区。两个直箭头之间为序列缺失区（某些个体具有）。

Note: Yellow area represents the coding sequence (CDS). The sequence missing area is between two arrows (present in some individuals).

图2 *MC1R* 基因的引物结合位置Figure 2 Primer binding site of *MC1R* gene

## 1.7 实时荧光定量 PCR 检测 *TYR* 和 *MC1R* 基因表达

按照 SYBR Premix Ex Taq™ II 荧光定量试剂盒说明书，配制下列扩增液：SYBR®Premix Ex Taq™ II

(2×) 10 μL，20 μmol/L 正反向引物各 1.0 μL，Rox 0.4 μL，cDNA 模板 1.0 μL，DEPC 处理水 6.6 μL，共 20 μL。引物序列见表 2。模板为 3 种毛色豚鼠的皮肤组织 cDNA。将该反应体系加到用于荧光定量反应的 8 联管内，用实时荧光定量 PCR 仪分别扩增 *TYR* 及 *MC1R* 基因，同时设置 β-actin 内参，灭菌双蒸水替代模板作为阴性对照组。cDNA 浓度及参照组进行统一归一化。扩增反应条件：预变性 95 °C 3 min；95 °C 10 s，60 °C 30 s，40 个循环。熔解曲线从 55 °C 开始，每 30 s 升高 0.5 °C，直到 95 °C，循环 1 次。所有反应信息资料由 ABI StepOnePlus PCR 仪收集，循环阈值 (cycle threshold, Ct) 值通过计算机软件测量和计算，经公式  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  计算目的基因的相对表达量。

表2 PCR 检测 *TYR*、*MC1R* 基因表达量的引物序列Table 2 Primers for PCR detection of *TYR* and *MC1R* gene expression

引物名称 Primer name	引物序列 (5'→3') Primer sequence (5' to 3')	扩增片段长度/bp Length of amplified fragment/bp	位置 Location
<i>TYR</i> -F	TGGAACAAGCACGTCAGATCTG	118	<i>TYR</i> 编码序列 V 区域
<i>TYR</i> -R	AGCTGCTTCTCTGTGATGGC		
<i>MC1R</i> -F	TCGCCGTGGACCGCTATATCTC	132	<i>MC1R</i> 编码序列
<i>MC1R</i> -R	AGGTGATGAAGAGGGTCTGGAG		
β-actin-F	TGTGGATCGGCGCTCTATC	79	β-actin
β-actin-R	GACTCATCGTACTCTGCTTGC		

## 1.8 统计学分析

使用 Chromas 2、Primer 5 和 DNAMAN 9 软件进行测序结果分析；使用 Cervus 3.0 软件分析基因频率和基因型频率。使用 SPSS 22.0 软件进行统计学分析。3 个毛色品种豚鼠的 *TYR*、*MC1R* 基因型和基因频率用百分率表示，组间比较采用卡方检验；基因表达量用平均值±标准差表示，组间比较采用单因素方差分析，组内比较采用 LSD-*t* 检验， $P<0.05$  表示差异有统计学意义。使用 GraphPad Prism 9 软件制作统计图。

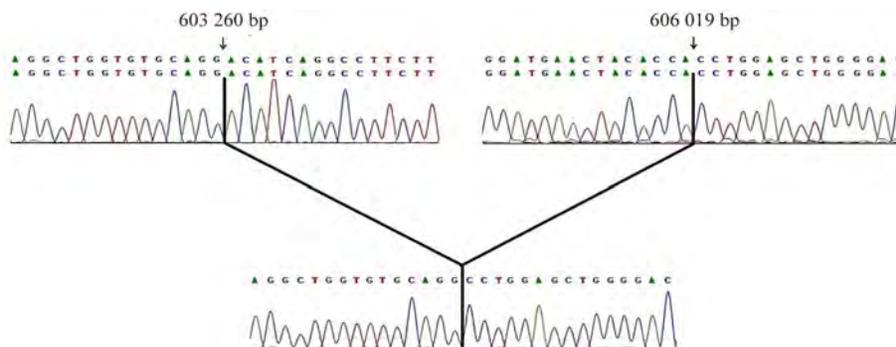
## 2 结果

### 2.1 *TYR* 基因的外显子 CDS 及氨基酸序列多态性

豚鼠 *TYR* 基因测序发现，外显子 I 的 CDS 区域有 1 个 SNP 变异点，其变异位置部分峰值图如图 3 所示，可见该区域第 710 bp 位置上核苷酸由野生型 A（图 3A）突变成白化型 G（图 3B），杂合型 R 见图 3C，等位基因由此形成 A/A、G/G、A/G 三种基因型，外显子 II-V 的 CDS 区域无突变。运用软件将 *TYR* 基因的 CDS I 翻译成 273 个氨基酸的序列，比对突变型和野生型序列，发现第 237 号氨基酸位置由密码子 *gac* 突变为 *ggc*，相对应天冬氨酸 D 变为甘氨酸 G。突变点附近的两条氨基酸序列见图 4。

### 2.2 *MC1R* 基因的 CDS 序列多态性

豚鼠 *MC1R* 基因外显子 CDS 及旁侧序列测序发现，部分个体的 *MC1R* 基因呈现两个断裂点，分别位于第 603 260 bp 和 606 019 bp 位置，断裂点之间缺失一段 DNA 序列，长度为 2 760 bp，其中包括 CDS 区域。因片段缺失而造成 *MC1R* 基因呈长度多态性，其插入序列及断裂点旁侧部分序列的峰值图见图 5。

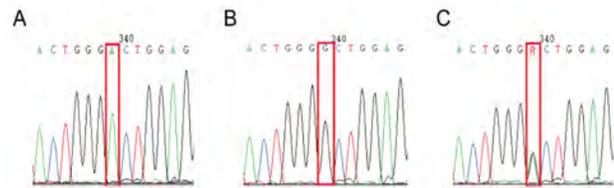


注：垂直箭头指示序列断裂点。

Note: Vertical arrow indicates the sequence breakpoint.

图 5 豚鼠 *MC1R* 基因外显子缺陷区域的峰值图

Figure 5 Peak plot of the deleted sequence region in the exon of *MC1R* gene in guinea pigs



注：A 为 A/A 野生纯合型；B 为 G/G 突变纯合型；C 为 A/G 杂合型（绿色峰与黑色峰合并）。

Note: A, A/A Wild homozygous; B, G/G Mutant homozygous; C, A/G Heterozygous (green peak combined with black peak).

图 3 豚鼠 *TYR* 基因外显子 I 编码序列区域的 SNP 峰值图

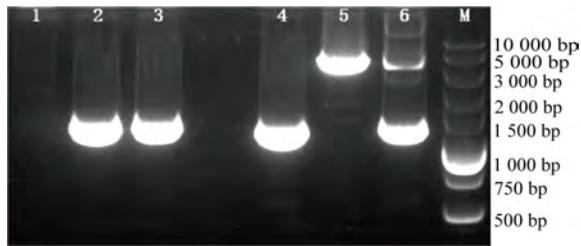
Figure 3 Single nucleotide polymorphism (SNP) peak plot in the coding sequence region of *TYR* gene exon I in guinea pigs

野生型 Wild type:	F-T-I-P-Y-W-D-W-R-D-A-E-N
突变型 Mutant type:	F-T-I-P-Y-W-G-W-R-D-A-E-N

图 4 豚鼠 *TYR* 基因外显子 I 编码序列区域的变异点氨基酸序列

Figure 4 Amino acid sequences at the mutation point in the coding sequence region of *TYR* gene exon I in guinea pigs

图 6 所示电泳图验证了 *MC1R* 序列缺失现象，可见用 *MC1R*-F/R1 引物扩增野生型样本能得到 1 249 bp 的片段（泳道 2），其单倍体基因标记为 N，而突变型样本不能扩出产物（泳道 1），其单倍体标记为-，泳道 3 为杂合型产物；用 *MC1R*-F2/R2 引物扩增野生型样本能得到 3 956 bp 的片段（泳道 5），而突变型样本只扩出 1 196 bp 的片段（泳道 4），泳道 6 为杂合型产物。因此，断定突变型比野生型缺少 2 760 bp 的片段。



注：1、4泳道为-/-突变纯合型，2、5泳道为N/N野生纯合型，3、6泳道为-/N杂合型。1、2、3泳道为MC1R F/R引物扩增产物，4、5、6泳道为MC1R F2/R2引物扩增产物。

Note: 1, 4 lanes are -/- Mutant homozygous type; 2, 5 lanes are N/N Wild homozygous type; 3, 6 lanes are -/N Heterozygous type. 1, 2, 3 lanes are the amplification products of MC1R F/R primers; 4, 5, 6 lanes are amplification products of MC1R F2/R2 primers.

图6 豚鼠MC1R基因PCR产物电泳图

Figure 6 Electrophoretic map of PCR products of MC1R gene in guinea pigs

### 2.3 TYR基因的基因型及基因频率

将3种豚鼠的TYR基因变异情况统计列于表3，可见每种豚鼠基因型和基因的最高频率如下：Zmu-1：DHP白色豚鼠的G/G基因型及G基因频率都高达100%；DHP花色豚鼠的A/A基因型为77%，A基因频

率为89%；Zmu-2：DHP黑色豚鼠的A/A基因型为85%，A基因频率为92%。因此说明白色豚鼠全部是G/G基因型，而花色及黑色豚鼠以A/A基因型为主，黑色豚鼠的A/A基因型频率又略高于花色豚鼠。随着豚鼠白色表型向黑色表型过渡，TYR等位基因由G转变至A。

### 2.4 MC1R基因的基因型及基因频率

将携带缺失片段的MC1R基因单倍体位点标记为-，片段未缺失的位点标记为N，则正常MC1R等位基因的基因型为N/N，一侧等位基因片段缺失的为N/-，两侧等位基因片段均缺失的为-/-。3种豚鼠的MC1R基因变异情况统计列于表4，从中可见每种豚鼠基因型和基因的最高频率如下：Zmu-1：DHP白色豚鼠的-/-基因型频率为82%，-基因频率为89%；DHP花色豚鼠的N/-基因型为55%，-和N基因频率各为50%；Zmu-2：DHP黑色豚鼠的N/N基因型为50%，略高于N/-基因型，N基因频率为71%。因此说明白色豚鼠以-/-基因型为主，花色豚鼠以N/-为主，黑色豚鼠以N/N为主。随着豚鼠白色向黑色表型过渡，MC1R等位基因由-转变至N。

表3 豚鼠TYR基因的基因型频率及基因频率

Table 3 Genotype and gene frequencies of the TYR gene in guinea pigs

品种 Breed	基因型频率(样本数) Genotypic frequency(Sample size)			基因频率(基因数) Gene frequency(Gene count)	
	G/G	G/A	A/A	G	A
Zmu-1:DHP (n=22)	1.00 (22)	0.00 (0)	0.00 (0)	1.00 (44)	0.00 (0)
DHP (n=22)	0.00 (0)	0.23 (5)	0.77 (17)	0.11 (5)	0.89 (39)
Zmu-2:DHP (n=13)	0.00 (0)	0.15 (2)	0.85 (11)	0.08 (2)	0.92 (24)

注：A为野生型基因，G为突变型基因。

Note: A is the wild-type gene, G is the mutant gene.

表4 豚鼠MC1R基因的基因型频率及基因频率

Table 4 Genotype and gene frequencies of the MC1R gene in guinea pigs

品种 Breed	基因型频率(样本数) Genotypic frequency(Sample size)			基因频率(基因数) Gene frequency(Gene count)	
	-/-	-/N	N/N	-	N
Zmu-1:DHP (n=22)	0.82 (18)	0.14 (3)	0.05 (1)	0.89 (39)	0.11 (5)
DHP (n=22)	0.23 (5)	0.55 (12)	0.23 (5)	0.50 (22)	0.50 (22)
Zmu-2:DHP (n=12)	0.08 (1)	0.42 (5)	0.50 (6)	0.29 (7)	0.71 (17)

注：N为野生型基因，-为突变型基因。

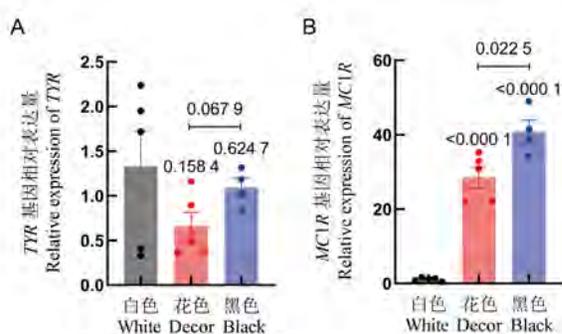
Note: N is the wild-type gene, - is the mutant gene.

### 2.5 TYR和MC1R基因的RNA相对表达量

实时荧光定量PCR分析5只白色、5只花色和4只

黑色豚鼠的TYR、MC1R基因表达水平，结果见图7。就TYR基因(图7A)来说，Zmu-1:DHP白色豚鼠的基

因表达量高于 DHP 花色和 Zmu-2:DHP 黑色豚鼠, 但无显著差异 ( $P>0.05$ ); Zmu-2:DHP 黑色豚鼠的 *TYR* 基因表达水平也高于 DHP 花色豚鼠, 但差异也不显著 ( $P>0.05$ )。就 *MC1R* 基因 (图 7B) 来说, DHP 花色和 Zmu-2:DHP 黑色豚鼠的基因表达量都极显著高于 Zmu-1:DHP 白色豚鼠 ( $P<0.01$ ); 而 Zmu-2:DHP 黑色豚鼠的 *MC1R* 基因表达水平明显高于 DHP 花色豚鼠 ( $P<0.05$ )。



注: *TYR* 基因中, 白色与花色和黑色豚鼠比较,  $P>0.05$ ; 花色与黑色豚鼠比较,  $P>0.05$ 。*MC1R* 基因中, 白色与花色和黑色豚鼠比较,  $P<0.01$ ; 花色与黑色豚鼠比较,  $P<0.05$ 。

Note: In the *TYR* gene, white group is compared with variegated (decor) and black groups,  $P>0.05$ ; variegated (decor) group is compared with black group,  $P>0.05$ . In the *MC1R* gene, white group is compared with variegated (decor) and black groups,  $P<0.01$ ; variegated (decor) group is compared with black group,  $P<0.05$ .

图 7 实时荧光定量 PCR 检测豚鼠 *TYR*、*MC1R* 基因的 RNA 表达量

Figure 7 RNA expression levels of *TYR* and *MC1R* genes in guinea pigs detected by real-time fluorescent quantitative PCR

### 3 讨论

与其他动物一样, 豚鼠的毛色演变机制比较复杂。已知 *TYR* 及 *MC1R* 是调控动物毛色比较重要的基因, 并且两者相互协同调控产生多种毛色。*TYR* 是调控酪氨酸生成黑色素的限速酶, 其活性高低与调控生成真黑色素还是褐黑色素, 即皮毛呈黑色还是浅色有关。*MC1R* 激活或抑制将影响 *TYR* 的表达和活性, 从而调节色素深浅<sup>[7]</sup>。色素基因的多态性及活性关系黑色素产生的量及比例, 能引起动物被毛的颜色深浅和斑块形成<sup>[8]</sup>。本研究检测了豚鼠 *TYR* 和 *MC1R* 基因的多态性及组织表达, 结果发现: *TYR* 基因 CDS I 区域第 710 bp 点突变呈 SNP, 产生野生型 A 和白化型 G 两

种核苷酸, 所有白色被毛表型的豚鼠 100% 呈现 G/G 基因型。这说明该 SNP 与白化表型呈完全共分离, 支持白化隐性遗传模式。该位点错义突变 710A>G, Asp237Gly 与豚鼠产生白化表型有关, 这与 Yu 等<sup>[4]</sup> 证明的白化豚鼠 *TYR* 基因变异结论相同。Yan 等<sup>[9]</sup> 认为, 白化机制是 A/A 变异为 G/G 后, 该位点插入了一个过早终止编码序列, 导致不能合成色素来调控皮毛产生深色之故。深色被毛 (花、黑) 表型豚鼠的 *TYR* 基因少量呈 A/G 基因型, 多数呈 A/A 基因型, 而且黑色豚鼠的 A/A 基因型频率高于花色豚鼠, 说明豚鼠毛色变成深色 (花、黑) 后, A 基因和 A/A 基因型频率快速增高。因此提示, A 是 *TYR* 控制深色表型的主要基因, 呈显性遗传特征。

本研究还发现, *MC1R* 基因外显子缺失 2 760 bp 序列, 因而出现基因长度多态性。据报道, *MC1R* 基因缺失 2 760 bp 片段后, 将失去调控产生黑色素的功能<sup>[5]</sup>, 或产生黄色被毛<sup>[6]</sup>。所以, *MC1R* 的缺失型为 -/- 突变型, 控制产生浅色被毛; 非缺失型为 N/N 野生型, 控制产生深色被毛。这从白毛豚鼠 *MC1R* 有比较高的 -/- 基因型频率, 深色豚鼠中的花色豚鼠以 -/N 基因型为主, 黑色豚鼠以 N/N 基因型为主, -/N 基因型次之可以看出。以上结果说明, 随着毛色由花色变为黑色, 豚鼠 *MC1R* 的 N 基因和 N/N 基因型频率逐渐增高。N 基因是 *MC1R* 调控深色被毛的主要基因, 呈显性遗传, 而 - 基因呈隐性遗传。由此可见, 豚鼠深色毛是 *TYR* 基因 A 位点及 *MC1R* 基因 N 位点共同调控的结果。本研究使用的豚鼠是本课题组培育品种, 与文中参考文献<sup>[6]</sup> 报告的豚鼠来源及遗传不同, 但相同毛色豚鼠的关键毛色基因突变位点仍一致, 进一步证明这些基因突变是促使毛色多样性的主要因素。

从基因表达结果来看, 白色豚鼠 *TYR* 的 G 基因表达率较高, *MC1R* 基因表达率极低, 证明豚鼠白色被毛主要由 *TYR* 的 G 基因调控。深色被毛豚鼠中, *TYR* 的 G 和 *MC1R* 的 - 基因频率降低, A 和 N 基因频率升高, 同时花色到黑色豚鼠的基因表达率增强, 表现毛色逐渐变深, 直至黑色, 这与中国家驴深色被毛变化的情况<sup>[10]</sup> 相似。然而在调控色素由浅变深的过程中, 两个基因在品种间的表达水平差异很大: *TYR* 基因表达组间  $P>0.05$ , 可见其调控力较弱; 而对 *MC1R* 基因来说, 花色及黑色豚鼠基因表达率均极显著高于白色豚鼠 ( $P<0.01$ ), 黑色豚鼠基因表达率又高于花色豚鼠 ( $P<0.05$ ), 可见其调控力极强。这说明, 豚鼠深色被

毛以 *MC1R* 调控力较显著, *TYR* 可能仅对每个个体深毛色起到不同程度的修饰及辅助作用, 这与朱谋等<sup>[11]</sup>提出的 *TYR* 较弱、*MC1R* 较强的结论相一致。杨永升等<sup>[12]</sup>认为, *MC1R* 是影响黑色素合成的主效基因, 该基因变异会导致不同的表型性状。本研究中间别 *MC1R* 的 *-/-* 基因型个体出现深色表型, 可能是 *TYR* 的 A 及其他有色基因与 *-/-* 基因共同调控的结果。因此, 豚鼠毛色变化与毛色基因紧密相关, 毛色基因的多态性变化与个体基因表达差异等因素复合构成豚鼠多种被毛颜色, 尤其还有其他毛色基因引起花色被毛的随机调和式变化。

毛色基因调控机体产生色素, 包括真黑色素和褐黑色素。据文献报告, 黑色素与抵抗病毒传染病有关。Manning 等<sup>[13]</sup>认为, 黑色素可以抑制艾滋病发生, 皮肤较黑的人感染艾滋病概率显著降低。胡国斌等<sup>[14]</sup>报告, 黑色素能抵抗流感病毒。鲁明等<sup>[15]</sup>阐述了黑色素的作用机制, 认为黑色素在皮肤及黏膜中起到增强抵抗病毒侵入的作用, 能够抑制人类免疫缺陷病毒 (human immunodeficiency virus, HIV) 的复制。笔者也曾发现, 课题组培育的 Zmu-1:DHP 白色豚鼠对口蹄疫病毒极敏感, 而脚爪部位伴有黑色毛的 DHP 花毛豚鼠则对该病毒呈抗性, 说明豚鼠黑色素的增多及其产生部位对病毒的易感性至关重要。结合豚鼠病毒易感性的表型, 从本文基因分析来看, *TYR* 控制白色毛的 G 基因可能是豚鼠对病毒敏感及免疫力较低表型的标志基因, 反之, 控制有色毛的 *TYR* 的 A 基因和 *MC1R* 的 N 基因可能是抵抗病毒及免疫力较高表型的标志基因。由于表型与基因存在相关性, 标志基因又可能与其他性状基因存在连锁关系, 因此本研究中这些色素基因位点可作为遗传标志, 为筛选豚鼠优势性状基因提供锚定位点或方向标。

#### [医学伦理声明 Medical Ethics Statement]

本研究所涉及的所有动物实验均已通过浙江中医药大学实验动物管理与伦理委员会批准 (终审编号: IACUC-202305-11)。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 approved by Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) of Zhejiang Chinese Medical University (Approval Number: IACUC-202305-11). All experimental processes were conducted in accordance with the relevant laws and regulations regarding experimental animals in China.

#### [作者贡献 Author Contribution]

汤银根提供资源, 提出实验方案。  
冯亚仙负责数据采集和统计分析;  
钟敏和卫振实施分子检测, 协助论文修改;  
汪浏对论文的知识性内容作批评性审阅, 并提供指导;  
刘迪文实施方案策划、实验设计和撰写论文。

#### [利益声明 Declaration of Interest]

所有作者均声明本文不存在利益冲突。

#### [参考文献 References]

- [1] 刘迪文, 谢敏, 陈雁虹, 等. Zmu-1: DHP 近交系豚鼠的培育及其分子遗传结构初步鉴定[J]. 中国实验动物学报, 2017, 25(1):90-96. DOI: 10.3969/j.issn.1005-4847.2017.01.017.  
LIU D W, XIE M, CHEN Y H, et al. Breeding of Zmu-1: DHP inbred strain guinea pig and preliminary analysis of molecular genetic structure of the strain[J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2017, 25(1):90-96. DOI: 10.3969/j.issn.1005-4847.2017.01.017.
- [2] 刘迪文. Zmu-1: DHP 豚鼠部分生物学特性研究[J]. 畜牧兽医学报, 2006, 37(5):492-495. DOI: 10.3321/j.issn: 0366-6964.2006.05.014.  
LIU D W. Study on some biological characters of Zmu-1: DHP guinea pig[J]. Acta Vet Zootechnica Sin, 2006, 37(5):492-495. DOI: 10.3321/j.issn: 0366-6964.2006.05.014.
- [3] 张亚楠, 高宁宁, 王思敏, 等. *MC1R* 基因多态性与烧伤后创面感染易感性及免疫功能的关联[J]. 中华医院感染学杂志, 2022, 32(5):731-734. DOI:10.11816/cn.ni.2022-210791.  
ZHANG Y N, GAO N N, WANG S M, et al. Association between *MC1R* gene polymorphism and susceptibility to burn wound infection and immune function[J]. Chin J Nosocom, 2022, 32(5):731-734. DOI:10.11816/cn.ni.2022-210791.
- [4] YU F, JIAO S Y, LAI W N, et al. Conserved aspartate-to-glycine mutation in tyrosinase is associated with albino phenotype in domestic guinea pigs (*Cavia porcellus*)[J]. Anim Genet, 2018, 49(4):354-355. DOI: 10.1111/age.12683.
- [5] VIDAL O. Deleterious mutations of *MC1R* in guinea pig[J]. Anim Genet, 2018, 49(5):498-499. DOI: 10.1111/age.12708.
- [6] 赖伟宁, 康建红, 于丰, 等. *MC1R* 基因多态性与豚鼠隐性黄毛色的相关性分析[J]. 四川动物, 2019, 38(5):506-511. DOI: 10.11984/j.issn.1000-7083.20190114.  
LAI W N, KANG J H, YU F, et al. Association analysis of polymorphism of *MC1R* gene with recessive yellow-coated color in *Cavia porcellus*[J]. Sichuan J Zool, 2019, 38(5):506-511. DOI: 11984/j.issn.1000-7083.20190114.
- [7] 赵净颖, 李丰耘, 豆腾飞, 等. 武定乌骨鸡 *MC1R* 基因多态性与黑色素沉积的关联研究[J]. 畜牧与兽医, 2023, 55(5):1-6.  
ZHAO J Y, LI F Y, DOU T F, et al. The association between *MC1R* gene polymorphism and melanin deposition in Wuding silky fowl[J]. Anim Husb Vet Med, 2023, 55(5):1-6.
- [8] 宋兴超, 刘琳玲, 潘虹军, 等. 水貂酪氨酸酶 (*TYR*) 基因克隆、SNPs 筛查及其皮肤组织 mRNA 差异表达分析[J]. 畜牧兽医学报, 2021, 52(1): 66-76. DOI: 10.11843/j.issn. 0366-6964.2021.01.007.  
SONG X C, LIU L L, PAN H J, et al. Cloning, SNPs screening

- and mRNA differential expression analysis of *TYR* gene in skin of mink (*Neovison vison*)[J]. Acta Vet Zootechnica Sin, 2021, 52(1):66-76. DOI: 10.11843/j.issn.0366-6964.2021.01.007.
- [9] YAN S Q, ZHAO D H, HU M Y, et al. A single base insertion in the tyrosinase gene is associated with albino phenotype in silver foxes (*Vulpes vulpes*)[J]. Anim Genet, 2019, 50(5):550. DOI: 10.1111/age.12816.
- [10] 马晓君, 苏咏梅, 朱文进, 等. 中国家驴 *TYRP1* 基因第二内含子多态性分析[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2024 (6):110-114. DOI: 10.13881/j.cnki.hljxmsy.2023.04.0183.
- MA X J, SU Y M, ZHU W J, et al. Analysis of polymorphisms in the second intron of *TYRP1* gene of Chinese domestic donkeys[J]. Heilongjiang Anim Sci Vet Med, 2024 (6):110-114. DOI:13881/j.cnki.hljxmsy.2023.04.0183. DOI:
- [11] 朱谋, 王继文. 鸭色素合成相关基因 *TYR* 外显子 1 单核苷酸多态性及其与羽色性状相关性分析[J]. 四川农业大学学报, 2018, 36(2):254-260. DOI: 10.16036/j.issn.1000-2650.2018.02.018.
- ZHU M, WANG J W. Association between single nucleotide polymorphisms of first exon of the melanogenic-related *TYR* gene and the plumage color traits of ducks[J]. J Sichuan Agric Univ, 2018, 36(2): 254-260. DOI: 10.16036/j. issn. 1000-2650.2018.02.018.
- [12] 杨永升, 邓学梅, 李宁, 等. *MC1R* 是控制鸡黑色素形成的候选主效基因[J]. 生物化学与生物物理进展, 2004, 31(6):500-505. DOI: 10.3321/j.issn: 1000-3282.2004.06.004.
- YANG Y S, DENG X M, LI N, et al. *MC1R* is the candidate gene regulating melanin synthesis in chicken[J]. Prog Biochem Biophys, 2004, 31(6): 500-505. DOI: 10.3321/j. issn: 1000-3282. 2004.06.004.
- [13] MANNING J T, BUNDRED P E, HENZI P. Melanin and HIV in sub-Saharan Africa[J]. J Theor Biol. 2003, 223(1):131-133. DOI: 10.1016/s0022-5193(03)00070-5.
- [14] 胡国斌, 郑从义, 屈三甫, 等. 黑色素抑制流感病毒诱导宿主细胞凋亡[J]. 中国病毒学, 1999, 14(2): 140-146.
- HU G B, ZHENG C Y, QU S F, et al. Studies on Inhibitory Effect of Melanin on the Apoptosis Induced by Influenza Virus in Host Cells[J]. Virol Sin, 1999, 14(2): 140-146.
- [15] 鲁明, 付欣, 于淼. 天然黑色素提取与生物功能研究进展[J]. 中国食品添加剂, 2020, 31(1):165-171. DOI: 10.19804/j.issn1006-2513.2020.01.020.
- LU M, FU X, YU M. Research progress of natural melanin extraction and its biological function[J]. China Food Addit, 2020, 31(1):165-171. DOI: 10.19804/j.issn1006-2513.2020.01.020.
- (收稿日期: 2024-07-23 修回日期: 2024-10-29)  
(本文责任编辑: 张俊彦)

#### 【引用本文】

汤银根, 冯亚仙, 钟敏, 等. 不同毛色豚鼠的 *TYR* 及 *MC1R* 基因多态性及组织表达分析[J]. 实验动物与比较医学, 2025, 45(1): 21-29. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.105.

TANG Y G, FENG Y X, ZHONG M, et al. Polymorphism and tissue expression analysis of *TYR* and *MC1R* genes in guinea pigs with different coat-color phenotypes[J]. Lab Anim Comp Med, 2025, 45(1): 21-29. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.105.

\*\*\*\*\*

## 《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), 并被荷兰 Scopus、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, 以及中国开放获取期刊数据库、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”目录和中国科协组织的 2022—2024 年度“科技期刊双语传播工程”, 参与中国科技期刊卓越行动计划二期集群化试点项目(B5)。

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(荣获 2024 年华东地区期刊优秀栏目)、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。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!

本刊为中文双月刊, 大 16 开, 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

# 肥胖食蟹猴一般身体指标、血糖、血脂的动态监测及相关性分析

韦炎冶<sup>1</sup>, 申果<sup>1</sup>, 张鹏飞<sup>1,2</sup>, 石松平<sup>1</sup>, 胡家豪<sup>1</sup>, 张绪哲<sup>1</sup>, 花慧源<sup>3</sup>, 花冠洋<sup>3</sup>, 陆宏正<sup>3</sup>, 曾勇<sup>1,4</sup>, 季凤<sup>1,4</sup>, 韦祝梅<sup>1,4</sup>

(1. 广西华仁济瀛生物科技有限公司, 南宁 530000; 2. 广西科学院, 南宁 530007; 3. 来宾市新桂生物科技有限公司, 来宾 546108; 4. 广西华仁医学科技集团, 南宁 530000)

**[摘要]** **目的** 通过检测肥胖型食蟹猴的一般身体指标与血糖、血脂的动态变化, 探究各指标之间相关性, 为肥胖食蟹猴模型研究提供参考依据。**方法** 选取5~17岁的正常雄性食蟹猴30只(体重指数 $< 35 \text{ kg/m}^2$ 且糖化血红蛋白含量 $< 4.50\%$ )和自发性肥胖雄性食蟹猴99只(体重指数 $\geq 35 \text{ kg/m}^2$ 且糖化血红蛋白含量 $< 4.50\%$ ), 连续3年监测其腹围、皮脂厚度、体重、体重指数、空腹血糖、糖化血红蛋白以及血脂四项指标, 并使用重复测量方差分析、简单线性回归和多元线性回归相关性分析方法分析各指标间的相关性。**结果** 与正常食蟹猴相比, 肥胖食蟹猴的腹围、皮脂厚度、体重、体重指数和甘油三酯水平均显著升高(均 $P < 0.05$ ); 正常食蟹猴的皮脂厚度逐年上升, 其余指标维持稳定。与第1年相比, 肥胖食蟹猴第2年腹围、皮脂厚度、体重、体重指数、甘油三酯和空腹血糖水平显著升高(均 $P < 0.05$ ), 且升高趋势在第3年持续存在(均 $P < 0.05$ )。正常食蟹猴第2、3年的肥胖发生率分别为16.67%和23.33%, 糖尿病的发病率均为16.67%。肥胖食蟹猴第2、3年糖尿病的发病率分别为29.29%、44.44%, 其中在11~13岁群体发病率分别为36.36%、44.68%, 大于13岁群体的发病率(分别为28.13%和51.35%)。相关性分析结果显示, 糖尿病发病组食蟹猴的空腹血糖与年龄、腹围、皮脂厚度、体重、甘油三酯水平均显著相关(均 $P < 0.05$ )。**结论** 长期肥胖可导致食蟹猴的一般身体指标及空腹血糖水平升高, 并增加糖尿病的发病率; 在肥胖引起的糖尿病食蟹猴中, 其空腹血糖与年龄、体重、腹围、皮脂厚度、甘油三酯水平均高度相关, 这对于预测自发性糖尿病的发生有一定意义。

**[关键词]** 肥胖; 食蟹猴; 身体指标; 血糖; 血脂; 相关性分析

**[中图分类号]** Q95-33; R-332 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2025)01-0030-07



## Dynamic Monitoring and Correlation Analysis of General Body Indicators, Blood Glucose, and Blood Lipid in Obese Cynomolgus Monkeys

WEI Yanye<sup>1</sup>, SHEN Guo<sup>1</sup>, ZHANG Pengfei<sup>1,2</sup>, SHI Songping<sup>1</sup>, HU Jiahao<sup>1</sup>, ZHANG Xuzhe<sup>1</sup>, HUA Huiyuan<sup>3</sup>, HUA Guanyang<sup>3</sup>, LU Hongzheng<sup>3</sup>, ZENG Yong<sup>1,4</sup>, JI Feng<sup>1,4</sup>, WEI Zhumei<sup>1,4</sup>

(1. Guangxi Huaren Jiyong Biotechnology Co., Ltd., Nanning 530000, China; 2. Guangxi Academy of Sciences, Nanning 530007, China; 3. Laibin Xingui Biotechnology Co., Ltd., Laibin 546108, China; 4. Guangxi Huaren Medical Science and Technology Group, Nanning 530000, China)

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

**[ABSTRACT]** **Objective** This study aims to investigate the dynamic changes in general body parameters, blood glucose, and blood lipid profiles in obese cynomolgus monkeys, exploring the correlations among these parameters and providing a reference for research on the obese cynomolgus monkey model.

**Methods** 30 normal male cynomolgus monkeys aged 5 - 17 years old (with body mass index  $< 35 \text{ kg/m}^2$  and glycated hemoglobin content  $< 4.50\%$ ) and 99 spontaneously obese male cynomolgus monkeys (with

**[基金项目]** 南宁市良庆区重点科技计划专项“食蟹猴代谢异常疾病模型研究”(202309)

**[第一作者]** 韦炎冶(1994—),女,硕士,助理研究员,研究方向:实验动物代谢相关疾病模型。E-mail: weiyanye@hrjyswkj.com

**[通信作者]** 韦祝梅(1978—),女,硕士,兽医师,研究方向:灵长类实验动物疾病模型。E-mail: weizhumei@hrjyswkj.com。ORCID: 0000-0002-1846-7501

body mass index  $\geq 35$  kg/m<sup>2</sup> and glycated hemoglobin content  $< 4.50\%$ ) were selected. Over a period of three years, their abdominal circumference, skinfold thickness, body weight, body mass index, fasting blood glucose, glycated hemoglobin, and four blood lipid indicators were monitored. The correlations between each indicator were analyzed using repeated measurement ANOVA, simple linear regression, and multiple linear regression correlation analysis method. **Results** Compared to the control group, the obese group exhibited significantly higher levels of abdominal circumference, skinfold thickness, body weight, body mass index, and triglyceride ( $P < 0.05$ ). In the control group, skinfold thickness increased annually, while other indicators remained stable. Compared with the first year, the obese group showed significantly increased abdominal circumference, skinfold thickness, body weight, body mass index, triglyceride, and fasting blood glucose in the second year ( $P < 0.05$ ), with this increasing trend persisting in the third year ( $P < 0.05$ ). In the control group, the obesity incidence rates in the second and third years were 16.67% and 23.33%, respectively, while the prevalence of diabetes remained at 16.67%. In the obese group, the diabetes incidence rates were 29.29% and 44.44% in years 2 and 3, respectively. Among the 11-13 year age group, the incidence rates were 36.36% and 44.68%, while for the group older than 13 years, the rates were 28.13% and 51.35%. Correlation analysis revealed significant associations ( $P < 0.05$ ) between fasting blood glucose and age, abdominal circumference, skinfold thickness, body weight, and triglyceride in the diabetic monkeys. **Conclusion** Long-term obesity can lead to the increases in general physical indicators and fasting blood glucose levels in cynomolgus monkeys, and an increase in the incidence of diabetes. In diabetic cynomolgus monkeys caused by obesity, there is a high correlation between their fasting blood glucose and age, weight, abdominal circumference, skinfold thickness, and triglyceride levels, which is of some significance for predicting the occurrence of spontaneous diabetes.

**[Key words]** Obesity; Cynomolgus monkey; Body indicator; Blood glucose; Blood lipid; Correlation analysis

肥胖是一种慢性代谢性疾病，其特征是体内脂肪的过度积累和分布，导致体重增加。长期肥胖会引起机体糖脂代谢紊乱，进而导致糖尿病、高血脂等并发症。肥胖与糖尿病之间有着较大的关联性。研究表明，脂肪中产生的蛋白激酶 C $\epsilon$  (protein kinase C epsilon, PKC $\epsilon$ ) 可影响脂肪组织健康，干扰葡萄糖代谢，从而促进糖尿病等疾病发生<sup>[1]</sup>。肥胖是高脂血症的重要危险因素，并直接导致胆固醇代谢异常。食蟹猴 (Cynomolgus Monkeys, 拉丁学名为 *Macaca fascicularis*) 作为医学研究中常用的非人灵长类实验动物，和人类亲缘关系较近，基因组序列相似度高达 98%<sup>[2]</sup>。在众多临床前实验中，如新型冠状病毒疫苗的研发，相比啮齿类和其他类动物，食蟹猴能够较为准确地预测疫苗在人体中的反应，具有显著优势<sup>[3]</sup>。尽管已有灵长类实验动物用于肥胖和糖尿病研究的文献报道，但由于灵长类动物的饲养成本较高，其肥胖相关指标的长期监测数据相对匮乏。因此，本研究通过对肥胖食蟹猴的体重、体重指数 (body mass index, BMI)、腹围、皮脂厚度、血糖、血脂等指标进行为期 3 年 (2022—2024 年) 的动态监测，探究肥胖食蟹猴身体指标的变化规律、指标之间相关性以及相关并发症，为肥胖食

蟹猴模型研究提供基础数据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物及饲养条件

实验动物来源于来宾市新桂生物科技有限公司 [SCXK (桂) 2023-0004]。从常规饲养的年龄在 5~17 岁的 440 只雄性食蟹猴中筛选出正常食蟹猴 30 只 [BMI  $< 35$  kg/m<sup>2</sup> 且糖化血红蛋白 (glycosylated hemoglobin A1c, HbA1c)  $< 4.50\%$ ] 和自发性肥胖食蟹猴 99 只 (BMI  $\geq 35$  kg/m<sup>2</sup> 且 HbA1c  $< 4.50\%$ )，均为普通级，年龄 5~17 岁，体重 6~14 kg。

动物实验于 2022—2024 年在来宾市新桂生物科技有限公司实验动物设施中开展 [SYXK (桂) 2024-0001]，研究方案经来宾市新桂生物科技有限公司实验动物管理委员会审核批准 (IACUC 批准号: XGI-2022-08-001)。动物饲养在大笼中，每笼 5~10 只，饲养环境温度为 18~26 °C，相对湿度为 40%~70%，提供自然光照；饲喂全价猴颗粒饲料 (购自北京科澳协力饲料有限公司)，并辅以青饲料，24 h 自由饮水。

### 1.2 主要仪器及试剂

电子秤 (型号 RCS-20) 购自江苏苏宏医疗器械有

限公司；高速冷冻离心机（型号 Sorvall Legend Micro 17R）购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司；全自动生化仪（型号 ARCHITECT c16000）购自美国 Abbott Laboratories 公司；皮脂厚度仪（型号 PZJ-01）购自常熟市新枫仪表有限公司；水平尺（型号 DL700600C）为得力集团有限公司产品；硫酸阿托品注射液（批号 230301，规格 10 mL: 50 mg/支）为芮城县方宏动物药业有限公司产品；注射用舒泰 50（批号 9AE7A，规格 250 mg/瓶）为法国 Virbac 公司产品。

### 1.3 一般身体指标的检测

每年 6~8 月进行年度检疫时检测 1 次，连续检测 3 年。动物禁食 12 h 后，麻醉动物：麻醉前 15 min 于动物股外侧肌内注射硫酸阿托品注射液（0.01 mg/kg），15 min 后注射舒泰 50（3 mg/kg）。麻醉完成后，测量每只食蟹猴的体重、冠臀长、腹围和皮脂厚度，计算 BMI。体重测量：使用电子秤进行称重（kg）。冠臀长测量：动物自然侧卧于操作台上，身体保持舒展，平直，将水平尺刻度面朝上，调节水平尺中的气泡，使之位于两分划线中间，测量从头顶到尾根的长度（m）。腹围测量：动物双臂提起，使动物端坐在操作台上，用皮尺环绕肚脐位置的腹部一周测量腹围（cm）。皮脂厚度测量：使用皮脂厚度仪夹住动物肚脐下方皮肤，测量皮脂厚度（mm）。BMI=体重/冠臀长度<sup>2</sup>。

### 1.4 血液生化指标测定

每年 6~8 月进行年度检疫时检测 1 次，连续检测 3 年。动物禁食 12 h 后，麻醉动物，根据灵长类实验动物 24 h 内安全采血量公式 [体重（kg）×65（mL/kg）×7%] 计算出安全采血量，通过静脉采集相应血量。EDTA-K2 采血管（1 mL/只）用于检测 HbA1c；氟化钠+EDTA 采血管（1 mL/只），2 h 内离心分装，用于检测空腹血糖（fasting blood glucose, FPG）；普通生化采血管（2 mL/只），保存于 4~8 °C 约 2 h 后离心分装保存，用于检测总胆固醇（total cholesterol, TC）、甘油三酯（triglyceride, TG）、高密度脂蛋白胆固醇（high density lipoprotein cholesterol, HDL-C）和低密度脂蛋白胆固醇（low density lipoprotein cholesterol, LDL-C）。FPG≥5.56 mmol/L 或 HbA1c≥5% 判定为糖尿病<sup>[4]</sup>，TC≥3.0 mmol/L、TG≥1.10 mmol/L 且 LDL-C≥2.00 mmol/L 判定为高血脂<sup>[5]</sup>。

### 1.5 统计学分析

采用 SPSS 23.0 统计学软件进行测得数据分析，实验结果以平均值±标准差（ $\bar{x}±s$ ）表示。组间比较采用

独立样本 *t* 检验，同一组动物同一指标不同年份之间比较采用重复测量方差分析，肥胖组糖尿病动物各项指标之间的相关性分析采用简单线性回归和多元线性回归分析法，检验水准为  $\alpha=0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 正常与肥胖食蟹猴的一般身体指标比较

独立样本 *t* 检验分析结果显示，肥胖组食蟹猴连续 3 年（2022—2024 年）的腹围、皮脂厚度、体重和 BMI 均显著高于正常组（ $P<0.05$ ）；正常组食蟹猴的皮脂厚度在 2023 和 2024 年显著高于 2022 年（ $P<0.05$ ），而肥胖组食蟹猴的腹围、皮脂厚度、体重和 BMI 在 2023 年和 2024 年均显著高于 2022 年（ $P<0.05$ ）。进一步的重复测量方差分析结果显示：年龄和组别对腹围、皮脂厚度和 BMI 存在显著交互作用（ $P<0.05$ ），而且年龄和组别均对腹围、皮脂厚度、体重和 BMI 具有显著的主效应（ $P<0.05$ ）。以上结果表明，肥胖食蟹猴的腹围、皮脂厚度、体重和 BMI 随年龄呈正相关增长趋势，详见表 1。

### 2.2 血液生化指标

#### 2.2.1 血脂四项指标比较

独立样本 *t* 检验分析结果显示，与正常组相比，肥胖组食蟹猴的 TG 水平在 2022—2024 年均显著升高（ $P<0.05$ ）；与 2022 年相比，正常组 TC 在 2023 年，HDL-C 在 2023 和 2024 年均显著升高（ $P<0.05$ ）；肥胖组 TG 水平在 2023 年和 2024 年显著高于 2022 年（ $P<0.05$ ），TC 和 HDL-C 在 2023 年显著高于 2022 年（ $P<0.05$ ）。进一步的重复测量方差分析结果显示：年龄和组别对 TC 和 HDL-C 存在显著交互作用（ $P<0.05$ ）；年龄和组别对 TG 均有显著的主效应（ $P<0.05$ ），年龄对 TC、LDL-C 和 HDL-C 均有显著的主效应（ $P<0.05$ ），详见表 1。

#### 2.2.2 空腹血糖和糖化血红蛋白水平比较

重复测量方差分析结果显示，与 2022 年相比，肥胖组的 FPG 在 2023 和 2024 年均显著升高（ $P<0.05$ ），HbA1c 在 2023 年显著升高（ $P<0.05$ ）。同时，年龄增长对 FPG 具有显著的主效应（ $P<0.05$ ），详见表 1。

### 2.3 相关性分析

#### 2.3.1 正常与肥胖食蟹猴的年龄分布及糖尿病、高血脂症患病分析

患病率分析结果显示：正常组在 2023 年和 2024 年的肥胖发病率为 16.67% 和 23.33%，糖尿病发病率均为 16.67%，其中在 11~13 岁群体的发病率分别为 25.00%

表1 正常与肥胖食蟹猴各指标比较

Table 1 Comparison of various indicators between normal and obese cynomolgus monkeys

指标 Indicator	正常组 (N=30) Normal group			肥胖组 (N=99) Obese group			F值 F value			P值 P value		
	2022	2023	2024	2022	2023	2024	F <sub>交互</sub> <sup>a</sup> F <sub>时间</sub> <sup>b</sup> F <sub>组间</sub> <sup>c</sup>			P <sub>交互</sub> <sup>a</sup> P <sub>时间</sub> <sup>b</sup> P <sub>组间</sub> <sup>c</sup>		
AC //cm	37.12±4.27	38.13±5.14	36.93±6.42	46.58±7.35**	50.03±8.47** <sup>△△</sup>	49.77±8.53** <sup>△△</sup>	3.487	5.969	67.589	0.032	<0.01	<0.01
SFT d/mm	4.55±2.21	8.30±4.43 <sup>△△</sup>	8.17±4.82 <sup>△△</sup>	13.40±9.29**	18.76±10.14** <sup>△△</sup>	22.01±12.82** <sup>△△</sup>	3.524	20.057	39.045	0.032	<0.01	<0.01
BW m/kg	6.93±0.91	7.27±0.93	7.30±1.09	9.59±1.81**	10.50±2.20** <sup>△△</sup>	10.60±2.20** <sup>△△</sup>	2.893	13.517	70.542	0.059	<0.01	<0.01
BMI	33.13±3.45	34.20±4.67	34.51±5.81	42.88±6.10**	47.17±8.25** <sup>△△</sup>	48.57±0.59** <sup>△△</sup>	4.433	12.116	77.520	0.014	<0.01	<0.01
TG c/(mmol·L <sup>-1</sup> )	0.63±0.23	0.77±0.34	0.69±0.23	0.75±0.45	1.08±0.67 <sup>△△</sup>	0.98±0.49** <sup>△△</sup>	1.968	9.659	8.423	0.144	<0.01	0.040
TC c/(mmol·L <sup>-1</sup> )	1.86±0.41	2.26±0.42 <sup>△△</sup>	2.09±0.52	2.07±0.44**	2.47±0.55 <sup>△△</sup>	2.10±0.45	4.480	53.847	2.704	0.012	<0.01	0.103
LDL-C c/(mmol·L <sup>-1</sup> )	0.97±0.25	0.84±0.27	0.81±0.30	0.96±0.29	0.95±0.36	0.88±0.31 <sup>†</sup>	1.902	6.624	1.271	0.151	<0.01	0.262
HDL-C c/(mmol·L <sup>-1</sup> )	1.69±0.60	2.23±0.69 <sup>△△</sup>	2.29±0.69 <sup>△△</sup>	2.07±0.67	2.26±0.77 <sup>△</sup>	2.06±0.64	7.541	12.433	0.302	0.010	<0.01	0.584
FPG c/(mmol·L <sup>-1</sup> )	4.40±0.24	4.52±1.12	4.49±1.58	4.48±1.04	5.25±1.99 <sup>△△</sup>	5.10±1.83 <sup>△△</sup>	1.826	3.442	3.524	0.163	0.034	0.063
HbA1c ω/%	4.12±1.34	4.11±0.29	4.10±0.25	4.21±0.19	4.42±0.92 <sup>△</sup>	4.45±1.45	0.606	0.437	3.502	0.547	0.642	0.064

注: AC为腹围, SFT为皮脂厚度, BW为体重, BMI为体重指数; TG, 甘油三酯; TC, 总胆固醇; LDL-C, 低密度脂蛋白胆固醇; HDL-C, 高密度脂蛋白胆固醇; FPG, 空腹血糖; HbA1c, 糖化血红蛋白。与正常组相比, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ; 与2022年相比,  $^{\Delta}P < 0.05$ ,  $^{\Delta\Delta}P < 0.01$ 。<sup>a</sup>指方差分析交互作用的F值或P值; <sup>b</sup>指方差分析时间因素的F值或P值; <sup>c</sup>指方差分析分组因素的F值或P值。

Note: AC, abdominal circumference; SFT, skinfold thickness; BW, body weight; BMI, body mass index; TG, triglyceride; TC, total cholesterol; LDL-C, low density lipoprotein cholesterol; HDL-C, high density lipoprotein cholesterol; FPG, fasting blood glucose; HbA1c, glycosylated hemoglobin A1c. Compared with normal group, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ; Compared with 2022,  $^{\Delta}P < 0.05$ ,  $^{\Delta\Delta}P < 0.01$ . <sup>a</sup>F or P value for interaction; <sup>b</sup>F or P value for time; <sup>c</sup>F or P value for between groups.

和23.08%, 未观察到高脂血症; 肥胖组在2023年和2024年的糖尿病发病率分别为29.29%和44.44%, 其中在11~13岁群体的发病率分别为36.36%和44.68%, 13岁以上群体的发病率分别为28.13%和51.35%; 肥胖组在2023年和2024年高脂血症发病率均为1.01% (表2)。

### 2.3.2 糖尿病食蟹猴的各项指标相关性分析

简单线性回归分析结果显示, 糖尿病食蟹猴空腹血糖水平与年龄 ( $r=0.300$ ,  $P < 0.01$ )、腹围 ( $r=0.353$ ,  $P < 0.01$ )、皮脂厚度 ( $r=0.296$ ,  $P < 0.01$ )、体重 ( $r=0.488$ ,  $P < 0.01$ ) 呈显著正相关 (图1)。相关性矩阵分析结果显示, 糖尿病食蟹猴年龄与FPG ( $r=0.548$ ,  $P < 0.05$ ) 和TG ( $r=0.530$ ,  $P < 0.05$ ) 水平显著正相关; FPG与年龄 ( $r=0.548$ ,  $P < 0.05$ )、HbA1c ( $r=0.819$ ,  $P < 0.05$ )、体重 ( $r=0.492$ ,  $P < 0.05$ )、腹围 ( $r=0.481$ ,  $P < 0.05$ )、BMI ( $r=0.463$ ,  $P < 0.05$ ) 和TG ( $r=0.565$ ,  $P < 0.05$ ) 显著正相关 ( $P < 0.05$ ), 详见表3。多元线性回归分析结果显示, FPG与年龄、BMI、TG的标准化回归系数分别为0.353、0.394、0.329 ( $P < 0.05$ ), 决定系数 $R^2=0.740$ ,  $P < 0.05$ , 说明FPG的变化有74.0%是由年龄、BMI和TG变化引起的。

## 3 讨论

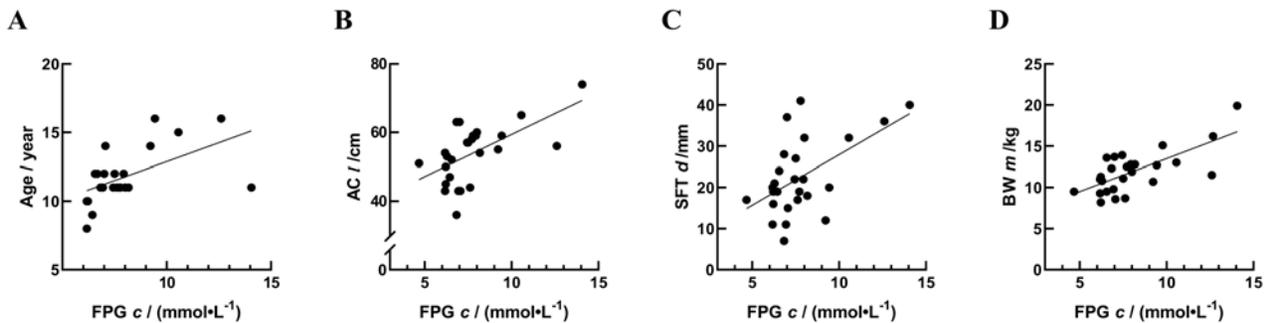
向心性肥胖 (腹部肥胖) 主要表现为腹围增加、内脏脂肪堆积和体重增加, 这是肥胖症的主要特征<sup>[6-7]</sup>。本研究选取了30只正常雄性食蟹猴及99只自发性肥胖型雄性食蟹猴, 持续监测它们在2022—2024年的身体指标变化。根据中国BMI分级标准,  $32 \leq \text{BMI} < 36$  为中度肥胖; 为排除因季节、环境和饲养条件等因素造成的短暂轻度肥胖, 本研究仅纳入中度及以上肥胖且无其余并发症的个体 ( $\text{BMI} \geq 35 \text{ kg/m}^2$  且  $\text{HbA1c} < 4.50\%$ ) 进行监测。结果显示, 与正常组相比, 肥胖组在2023年和2024年的腹围、皮脂厚度、体重、BMI和TG水平显著升高; 时间趋势分析显示, 正常组的皮脂厚度随年龄增长逐渐增加, 其余指标维持稳定; 与2022年相比, 肥胖组在2023年的腹围、皮脂厚度、体重、BMI、TG和FPG水平均显著升高, 2024年维持在2023年的水平, 表明肥胖显著促进了皮下脂肪的堆积、体重的增加, 以及空腹血糖的升高。

长期肥胖可导致胰岛素抵抗、心血管疾病, 甚至癌症<sup>[8]</sup>, 并被认为是心血管疾病和2型糖尿病的重要预测指标<sup>[9-10]</sup>。向心性肥胖患者更容易发展为2型糖尿病, 这可能与患者腹部皮下脂肪的异常堆积、前体

表2 正常与肥胖食蟹猴糖尿病、高脂血症并发症数据表

Table 2 Data table of diabetes and hyperlipidemia complications in normal and obese cynomolgus monkeys

组别 Group	患病 Disease	年龄/岁 Age/ years old	发病数/只 (发病率/%) Number of cases (Incidence rate / %)	
			2023	2024
			正常组 (N=30) Normal group	肥胖 Obese
		8-10	1 (8.33)	2 (33.33)
		11-13	2 (25.00)	3 (23.08)
		>13	2 (22.22)	2 (20.00)
		总计	5 (16.67)	7 (23.33)
	糖尿病 Diabetes mellitus	<8	0 (0.00)	0 (0.00)
		8-10	2 (16.67)	1 (16.67)
		11-13	2 (25.00)	3 (23.08)
		>13	1 (11.11)	1 (10.00)
		总计	5 (16.67)	5 (16.67)
肥胖组 (N=99) Obese group	肥胖 Obese	<8	5 (100.00)	2 (100.00)
		8-10	15 (83.33)	10 (90.91)
		11-13	44 (100.00)	44 (100.00)
		>13	32 (100.00)	34 (100.00)
		总计	96 (96.97)	90 (90.91)
	糖尿病 Diabetes mellitus	<8	0 (0.00)	0 (0.00)
		8-10	4 (22.23)	4 (33.33)
		11-13	16 (36.36)	21 (44.68)
		>13	9 (28.13)	19 (51.35)
		总计	29 (29.29)	44 (44.44)
	高脂血症 Hyperlipidemia	8-10	1 (5.56)	1 (8.33)
		总计	1 (1.01)	1 (1.01)



注: AC, 腹围; SFT, 皮脂厚度; BW, 体重; FPG, 空腹血糖。

Note: AC, abdomen circumference; SFT, skinfold thickness; BW, body weight; FPG, fasting blood glucose.

图1 糖尿病食蟹猴空腹血糖与年龄、腹围、皮脂厚度、体重的简单线性回归

Figure 1 Simple linear regression of FPG with age, abdominal circumference, skinfold thickness and body weight in diabetic cynomolgus monkeys

脂肪细胞分化障碍、过量的游离脂肪酸在内脏器官中蓄积, 导致各类代谢功能紊乱有关<sup>[11-12]</sup>。血脂异常也会使患者的胰岛素敏感性降低, 出现胰岛素抵抗, 最终导致血糖异常升高<sup>[13-14]</sup>。过多的脂肪积累会导致内源性胆固醇积累, 引起胰岛素抵抗, 继而引起了血糖升高以及胆固醇代谢紊乱, 表现出高胆固醇和高甘油三酯。既往研究表明, 性别、年龄和BMI是初诊T2DM

患者并发向心性肥胖的重要危险因素, 此外BMI、TG和HDL-C对向心性肥胖的诊断也有一定的预测价值<sup>[15]</sup>。肥胖患者合并糖尿病、高血压、高脂血症与高尿酸血症的风险增加, 身高和腰臀比可用于预测患者肝脏的脂肪变性程度<sup>[16]</sup>。

本研究对不同年龄段的正常和肥胖食蟹猴发生糖尿病和高血脂的情况进行分析。结果表明, 两组食蟹

表3 各指标相关性矩阵

Table 3 Correlation matrix of each indicator

指标 Indicator	年龄 Age	FPG	HbA1c	BW	AC	SFT	BMI	TG	TC	LDL-C	HDL-C
年龄 Age	-	0.548**	0.339	0.090	0.291	0.218	0.093	0.530**	0.281	0.224	-0.079
FPG		-	0.819**	0.492*	0.481*	0.338	0.463*	0.565**	-0.017	-0.003	-0.313
HbA1c			-	0.388	0.322	0.383	0.364	0.772**	0.077	0.025	-0.359
BW				-	0.907**	0.774**	0.944**	0.151	-0.427*	-0.117	-0.458*
AC					-	0.838**	0.870**	0.238	-0.386	-0.123	-0.472*
SFT						-	0.745**	0.389	-0.374	-0.222	-0.527**
BMI							-	0.112	-0.418*	-0.057	-0.461*
TG								-	0.169	-0.002	-0.395
TC									-	0.713**	0.681**
LDL-C										-	0.291
HDL-C											-

注: FPG, 空腹血糖; HbA1c, 糖化血红蛋白; BW, 体重; AC, 腹围; SFT, 皮脂厚度; BMI, 体重指数; TG, 甘油三酯; TC, 总胆固醇; LDL-C, 低密度脂蛋白胆固醇; HDL-C, 高密度脂蛋白胆固醇。\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ 。

Note: FPG, fasting blood glucose; HbA1c, glycosylated hemoglobin A1c; BW, body weight; AC, abdominal circumference; SFT, skinfold thickness; BMI, body mass index; TG, triglyceride; TC, total cholesterol; LDL-C, low density lipoprotein cholesterol; HDL-C, high density lipoprotein cholesterol. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ .

猴均在8岁开始出现糖尿病,提示8岁可能是食蟹猴的糖尿病敏感期。正常组食蟹猴在2023年和2024年发生肥胖的比例分别为16.67%和23.33%,呈现上升趋势;正常组在2023年和2024年发生糖尿病的比例均为16.67%,无明显变化。肥胖组中11~13岁食蟹猴的糖尿病患病比例在2023年为33.36%,2024年升高至44.68%;13岁以上食蟹猴的糖尿病发病率由2023年的28.13%升高至2024年的51.35%,表明11~13岁是肥胖食蟹猴的糖尿病高发年龄阶段,也说明除了肥胖,年龄也是糖尿病的重要危险因素。肥胖组食蟹猴在2023—2024年的肥胖比例有下降趋势,这可能与部分动物出现明显的糖尿病症状(“三多一少”),导致体重和BMI下降有关,这也与同一时间段的一般身体指标先显著上升后趋于平稳的现象相符。

本研究中相关性分析显示,糖尿病食蟹猴的空腹血糖与年龄、腹围、皮脂厚度、体重呈显著正相关,相关性矩阵和多元回归分析也证实了空腹血糖与年龄、BMI和TG水平有显著的正相关性,提示这些指标对于自发糖尿病具有一定的预测价值。既往研究表明,雌性食蟹猴的体重与瘦素、胰岛素、血糖和甘油三酯水平显著相关,是研究人类肥胖的良好模型<sup>[17]</sup>,这与本次研究的雄性食蟹猴结果有相似之处;但从雄性食蟹猴的一般身体指标、生化指标以及糖尿病的发病情况来看,雄性食蟹猴同样适合作为肥胖模型,同时也是自发糖尿病的良好模型。

本次研究具有一定的局限性,仅检测了3年肥胖

食蟹猴的相关数据,下一步应增加监测的年限,以发现肥胖食蟹猴的长期变化趋势,为肥胖症基础研究提供更准确的参考。另外,在研究长期变化趋势的同时,还应该根据动物情况优化研究方案,充分考虑长期研究风险并具有相应措施,例如动物的生理机能可能会出现自然衰退,对已发展成为糖尿病的动物应加强临床观察,减少动物应激,对于出现严重糖尿病症状的动物应给予相应的药物治疗,以保障动物福利。

#### [医学伦理声明 Medical Ethics Statement]

本研究涉及的所有动物实验已通过来宾市新桂生物科技有限公司实验动物管理委员会审核批准(批号:XGI-2022-08-001)。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 reviewed and approved by the Laboratory Animal Management Committee of Laibin Xingui Biotechnology Co., LTD. (Approval No. XGI-2022-08-001). 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]

韦炎治负责数据整理与分析、文章撰写及修改;

申果负责研究方案策划,参与文章修订;

张鹏飞参与研究方案策划、方法设计、文章修订;

石松平、胡家豪、张绪哲负责实验操作、数据收集;

花慧源、花冠洋、陆宏正提供实验材料,包括实验动物;

曾勇、季风提供研究经费,负责项目管理、研究方案的审核和批准;

韦祝梅负责实验项目监督指导、文章修订。

**[利益声明 Declaration of Interest]**

广西华仁济瀛生物科技有限公司为广西华仁医学科技集团旗下子公司,与来宾市新桂生物科技有限公司、广西科学院存在合作关系;本文涉及的单位和作者均无利益冲突。

**[参考文献 References]**

- [1] BRANDON A E, LIAO B M, DIAKANASTASIS B, et al. Protein kinase C *Epsilon* deletion in adipose tissue, but not in liver, improves glucose tolerance[J]. *Cell Metab*, 2019, 29(1):183-191. e7. DOI: 10.1016/j.cmet.2018.09.013.
- [2] 李瑞生, 李晓娟, 高蓉, 等. 食蟹猴微卫星 DNA 标记遗传监测及多态性分析[J]. *中国比较医学杂志*, 2011, 21(8):27-30. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7856.2011.08.007.  
LI R S, LI X J, GAO R, et al. Genetic monitoring and polymorphism analysis using microsatellite DNA markers in *Macaca fascicularis*[J]. *Chin J Comp Med*, 2011, 21(8): 27-30. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7856.2011.08.007.
- [3] IKEGAMI K, TAGAWA K, NARISAWA S, et al. Suitability of the *Cynomolgus* monkey as an animal model for drug absorption studies of oral dosage forms from the viewpoint of gastrointestinal physiology[J]. *Biol Pharm Bull*, 2003, 26(10): 1442-1447. DOI: 10.1248/bpb.26.1442.
- [4] 杨畅. 自发性糖尿病肾病食蟹猴生化与肾脏显微形态学的比较研究[D]. 昆明: 云南大学, 2016.  
YANG C. A comparative study on biochemical criterion and kidney micromorphological characteristics in spontaneous diabetic nephropathy *Cynomolgus* monkey[D]. Kunming: Yunnan University, 2016.
- [5] 杨永立, 李锋, 汪云龙, 等. 高脂血症食蟹猴模型的建立及分析[J]. *实验动物科学*, 2019, 36(4):31-34. DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2019.04.008.  
YANG Y L, LI F, WANG Y L, et al. Establishment and analysis of hyperlipidemia model in *Cynomolgus* monkey[J]. *Lab Anim Sci*, 2019, 36(4): 31-34. DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2019.04.008.
- [6] YU Y J, LI Z C, TIAN J L, et al. Why do people gain belly fat in rural areas? a study of urinary Metal(loid)s and abdominal obesity in China[J]. *Environ Sci Technol*, 2023, 57(21): 7938-7949. DOI: 10.1021/acs.est.2c09464.
- [7] IQBAL J, WU H X, HU N, et al. Effect of glucagon-like peptide-1 receptor agonists on body weight in adults with obesity without diabetes mellitus-a systematic review and meta-analysis of randomized control trials[J]. *Obes Rev*, 2022, 23(6): e13435. DOI: 10.1111/obr.13435.
- [8] CONWAY B, RENE A. Obesity as a disease: no lightweight matter[J]. *Obes Rev*, 2004, 5(3): 145-151. DOI: 10.1111/j.1467-789x.2004.00144.x.
- [9] 胡煜琳, 杜晓刚. 血脂水平及血脂异常不同临床分类与糖尿病肾病的相关性及预测价值研究[J]. *四川大学学报(医学版)*, 2023, 54(5): 1013-1018. DOI: 10.12182/20230960103.  
HU Y L, DU X G. Blood lipid indicators and different clinical classifications of dyslipidemia and diabetic kidney disease: Correlation and predictive value[J]. *J Sichuan Univ (Med Sci)*, 2023, 54(5): 1013-1018. DOI: 10.12182/20230960103.
- [10] POWELL-WILEY T M, POIRIER P, BURKE L E, et al. Obesity and cardiovascular disease: a scientific statement from the

American heart association[J]. *Circulation*, 2021, 143(21): e984-e1010. DOI: 10.1161/CIR.0000000000000973.

- [11] 张晓英, 韩彦渊. 内脏脂肪组织及其评估指标与糖尿病肾病的研究进展[J]. *临床医学进展*, 2023, 13(7): 11594-11600. DOI: 10.12677/ACM.2023.1371622.  
ZHANG X Y, HAN Y Y. Visceral adipose tissue and its evaluation index and the research progress of diabetic nephropathy[J]. *Adv Clin Med*, 2023, 13(7): 11594-11600. DOI: 10.12677/ACM.2023.1371622.
- [12] ROBBINS S. Ginger supplementation may improve fasting blood glucose, hemoglobin ale, and blood pressure in adults with type 2 diabetes[J]. *Herbalgram*, 2023(137): 1-2.
- [13] 时黛, 顾雯, 李晓英, 等. 代谢综合征患者血脂、血糖、血压及炎症介质与血清胰岛素生长因子-1的相关性[J]. *贵州医科大学学报*, 2023, 48(10): 1199-1203. DOI: 10.19367/j.cnki.2096-8388.2023.10.012.  
SHI D, GU W, LI X Y, et al. Correlation of serum insulin growth factor-1 with blood lipid, blood glucose, blood pressure and inflammatory mediators in patients with metabolic syndrome [J]. *J Guizhou Med Univ*, 2023, 48(10):1199-1203. DOI: 10.19367/j.cnki.2096-8388.2023.10.012.
- [14] SHIFERAW B, TAGESECH Y, ESHETE M A. Dyslipidemia and associated factors among diabetic patients attending Durame General Hospital in Southern Nations, Nationalities, and People's Region[J]. *Diabetes Metab Syndr Obes*, 2017, 10: 265-271. DOI: 10.2147/DMSO.S135064.
- [15] 张姗姗. 脂质代谢指标与2型糖尿病患者腹部脂肪分布的相关性研究[D]. 长春: 吉林大学, 2023. DOI: 10.27162/d.cnki.gjlin.2023.006556.  
ZHANG S S. Correlation of lipid metabolic indexes with abdominal fat distribution in patients with type 2 diabetes mellitus[D]. Changchun: Jilin University, 2023. DOI: 10.27162/d.cnki.gjlin.2023.006556.
- [16] 陈畅. 肥胖症患者非酒精性脂肪肝病临床特征分析及相关危险因素探索[D]. 济南: 山东大学, 2023. DOI: 10.27272/d.cnki.gshdu.2023.006983.  
CHEN C. Analysis of clinical characteristics of nonalcoholic fatty liverdisease in obese patients and exploration of related risk factors[D]. Jinan: Shandong University, 2023. DOI: 10.27272/d.cnki.gshdu.2023.006983.
- [17] CHEN Y, ONO F, YOSHIDA T, et al. Relationship between body weight and hematological and serum biochemical parameters in female *Cynomolgus* monkeys (*Macaca fascicularis*) [J]. *Exp Anim*, 2002, 51(2): 125-131. DOI: 10.1538/expanim.51.125.

(收稿日期: 2024-07-03 修回日期: 2024-11-15)

(本文责任编辑: 张俊彦)

**[引用本文]**

韦炎治, 申果, 张鹏飞, 等. 肥胖食蟹猴一般身体指标、血糖、血脂的动态监测及相关性分析[J]. *实验动物与比较医学*, 2025, 45(1): 30-36. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.091.

WEI Y Y, SHEN G, ZHANG P F, et al. Dynamic monitoring and correlation analysis of general body indicators, blood glucose, and blood lipid in obese cynomolgus monkeys[J]. *Lab Anim Comp Med*, 2025, 45(1): 30-36. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.091.



周正宇, 博士, 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, 苏州市科技进步奖二等奖、三等奖, 苏州市自然科学优秀论文二等奖。

## 肝螺杆菌感染引起VDR<sup>-/-</sup>小鼠炎性肠病相关肠纤维化模型的建立及机制探讨

吴志浩<sup>1</sup>, 曹舒扬<sup>2</sup>, 周正宇<sup>1</sup>

[1. 苏州大学苏州医学院实验动物中心, 苏州 215000; 2. 扬州大学兽医学院(比较医学研究院), 扬州 225000]

**[摘要]** **目的** 利用肝螺杆菌 (*Helicobacter hepaticus*, *H.hepaticus*) 致维生素D受体 (vitamin D receptor, VDR) 缺陷小鼠肠纤维化, 构建炎性肠病模型, 初步探究其病理特征及发病机制。**方法** 用 $2 \times 10^8$  CFU的 *H.hepaticus* 菌液灌胃野生型和VDR<sup>+/+</sup>雄性小鼠各5只 (分别命名为WT和VDR<sup>+/+</sup>小鼠感染组), 隔天1次, 连续3次; 同时设立未感染对照组, 即野生型和VDR<sup>+/+</sup>雄性小鼠各5只, 灌胃等体积PBS。最后一次灌胃后第7天检测小鼠感染情况, 确认感染后每周称量1次小鼠体重。于确认感染后第16周时剖检小鼠, 采集并测量结肠组织长度, 取粪便检测含水量; 将结肠组织分成4份, 一份做石蜡切片用于HE、阿尔辛蓝-过碘酸希夫 (alcian blue-periodic acid Schiff, AB-PAS)、Masson和免疫组织化学染色, 一份提取DNA后使用实时荧光定量PCR (real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction, RFQ-PCR) 检测 *H.hepaticus* 定植水平以判断感染效果, 一份提取RNA后采用反转录PCR (reverse transcription-PCR, RT-PCR) 法检测细胞因子表达情况, 另一份提取蛋白后采用蛋白质印迹法检测 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白 (alpha smooth muscle actin,  $\alpha$ -SMA) 和白细胞介素 (interleukin, IL) -33表达水平。**结果** 所有感染组小鼠经灌胃3次后均成功感染 *H.hepaticus*。与VDR<sup>+/+</sup>小鼠未感染对照组相比, VDR<sup>-/-</sup>小鼠感染 *H.hepaticus* 16周后体重明显减轻 ( $P < 0.05$ ), 并出现肠道出血情况, 粪便含水量显著多于未感染对照组和WT小鼠感染组 ( $P < 0.05$ )。与WT小鼠感染组相比, VDR<sup>-/-</sup>小鼠感染组的结肠组织经HE染色显示炎性细胞浸润, AB-PAS染色显示肠腺萎缩不规则、腺泡减少, Masson染色显示胶原面积增多。RT-PCR显示VDR<sup>-/-</sup>小鼠感染组的结肠组织中 *IL-6*、*IL-33*、肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , *TNF- $\alpha$* ) 和  $\alpha$ -SMA等炎症及纤维化相关基因的转录水平比WT小鼠感染组明显升高 ( $P < 0.0001$ ); 免疫组织化学法和蛋白质印迹结果显示 *IL-33* 和  $\alpha$ -SMA蛋白表达水平也明显增多 ( $P < 0.001$ )。**结论** VDR<sup>-/-</sup>小鼠感染 *H.hepaticus* 后表现为更严重的炎症反应, 出现黏膜炎性浸润、黏膜组织功能受损、胶原沉积等病变, 提示炎性肠病模型构建成功。进一步研究发现VDR缺陷可能通过影响 *IL-33* 表达加剧了炎性肠病相关的肠纤维化进程。

**[关键词]** 肝螺杆菌; 肠纤维化; 炎性肠病模型; 维生素D受体; 小鼠

**[中图分类号]** R574.62; Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2025)01-0037-10



## Establishment of an Intestinal Fibrosis Model Associated with Inflammatory Bowel Disease in VDR<sup>-/-</sup> Mice Induced by *Helicobacter hepaticus* Infection and Mechanism Exploration

**[第一作者]** 吴志浩(1996—), 男, 硕士, 助理实验师, 研究方向: 实验动物学。E-mail: zhww@suda.edu.cn

**[通信作者]** 周正宇(1973—), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向: 维生素D与糖尿病、动物模型与比较医学。E-mail: zacharyzhou@suda.edu.cn。ORCID: 0000-0001-5712-9495

WU Zhihao<sup>1</sup>, CAO Shuyang<sup>2</sup>, ZHOU Zhengyu<sup>1</sup>

[1. Laboratory Animal Center of Suzhou Medical College, Soochow University, Suzhou 215000, China; 2. College of Veterinary Medicine (Institute of Comparative Medicine), Yangzhou University, Yangzhou 225000, China]

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

**[ABSTRACT] Objective** To employ *Helicobacter hepaticus* (*H. hepaticus*, *H. h*) to induce intestinal fibrosis in vitamin D receptor deletion ( $VDR^{-/-}$ ) mice, thereby establishing a model of inflammatory bowel disease to investigate its pathological characteristics and underlying mechanisms. **Methods** Five male WT and five male  $VDR^{-/-}$  mice were orally administered a suspension containing  $2 \times 10^8$  CFU of *H. hepaticus* (referred to as the WT+*H. h* group and the  $VDR^{-/-}$ +*H. h* group, respectively), with treatments occurring every other day for three administrations. Concurrently, two uninfected control groups were established, consisting of five WT and five  $VDR^{-/-}$  mice, which were administered an equivalent volume of PBS. Seven days after the final administration, the infection status of the mice was assessed, and their body weight was recorded weekly. At the 16<sup>th</sup> week post-infection, the mice were dissected, and the length of the colon tissue was measured, with fecal moisture content analyzed. The colon tissue was partitioned into four parts: one for paraffin embedding for HE, alcian blue-periodic acid Schiff (AB-PAS), Masson's trichrome staining, and immunohistochemical analysis; one for DNA extraction to evaluate the colonization levels of *H. hepaticus* through real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction (RFQ-PCR), thereby assessing the impact of the infection; one for RNA extraction to analyze cytokine expression via reverse transcription-PCR (RT-PCR); and one for protein extraction to measure the expression levels of alpha smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) and interleukin (IL)-33 using Western blotting. **Results** All mice in the infected groups successfully were infected with *H. hepaticus* after three oral gavages. Compared to  $VDR^{-/-}$  control group,  $VDR^{-/-}$  mice exhibited significant weight loss ( $P < 0.05$ ), intestinal hemorrhage, and higher fecal water content after 16 weeks of *H. hepaticus* infection than the uninfected control group and the WT+*H. h* group ( $P < 0.05$ ). Compared to the WT+*H. h* group, HE staining of the  $VDR^{-/-}$ +*H. h* group showed inflammatory cell infiltration, AB-PAS staining revealed irregular atrophy of intestinal glands and reduced acini, and Masson staining showed increased collagen area. RT-PCR demonstrated that the transcription levels of inflammation and fibrosis-related genes, including *IL-6*, *IL-33*, tumor necrosis factor- $\alpha$  (*TNF- $\alpha$* ), and  $\alpha$ -SMA ( $P < 0.0001$ ), were significantly upregulated in the colon tissues of  $VDR^{-/-}$ +*H. h* group. Additionally, immunohistochemical analysis and Western blotting showed that the protein expression levels of IL-33 and  $\alpha$ -SMA were markedly increased ( $P < 0.001$ ) in the  $VDR^{-/-}$ +*H. h* group. **Conclusion**  $VDR^{-/-}$  mice infected with *H. hepaticus* exhibit more severe inflammatory responses, including mucosal inflammatory infiltration, impaired mucosal tissue function, and collagen deposition, indicating successful construction of the inflammatory bowel disease model. Further research suggests that VDR deficiency may exacerbate the intestinal fibrosis process associated with inflammatory bowel disease by affecting IL-33 expression.

**[Key words] *Helicobacter hepaticus*; Intestinal fibrosis; Inflammatory bowel disease model; Vitamin D receptor; Mice**

炎性肠病 (inflammatory bowel disease, IBD) 是一种以炎症和缓解反复交替发生的慢性肠道疾病, 根据临床表现和病因不同分为克罗恩病 (Crohn disease, CD) 和溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) [1]。流行病学调查显示, 随着工业化发展加快, 中国 IBD 患者数量逐年增多, 且环境和遗传多态性因素可能导致 IBD 患者在中国不同区域的分布存在差异 [2]。IBD 的发病涉及多种因素, 例如多种免疫细胞及炎症反应、肠道微生物群、患者遗传学因素和环境变化等 [3]。而病

因久积又导致肠道损伤与黏膜愈合循环发生, 最终促使细胞外基质沉积形成纤维化 [4]。

肝螺杆菌 (*Helicobacter hepaticus*, *H. hepaticus*) 是革兰阴性、弯曲状杆菌, 属于螺杆菌属的一员, 也是一种肠道致病菌, 可引起某些易感品系小鼠 (如 BALB/c、B6-IL10-KO 和 AJCr) 发生慢性结肠炎、盲肠炎、结肠癌 [5]。*H. hepaticus* 感染模型可被用于研究 IBD 发病机制, 为探究治疗 IBD 提供新方案 [6]。

研究表明, 维生素 D 的生物学功能取决于其活性

形式1,25-二羟基维生素D<sub>3</sub>[1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>]，其与维生素D受体(vitamin D receptor, VDR)结合并调节下游基因转录<sup>[7]</sup>。在肠上皮细胞中，VDR呈现高表达，亦可调节维生素D的生物活性，并通过VDR信号通路保护肠道上皮屏障，阻滞结肠炎的发生<sup>[8]</sup>。临床调查显示，在IBD患者血清检查中发现79%的患者缺乏维生素D，且VDR也呈现低表达水平，提示维生素D及其受体可能与IBD发展密切相关<sup>[9]</sup>。本研究使用*H.hepaticus*分别感染野生型C57BL/6小鼠和VDR缺失小鼠，然后探究该菌致肠道疾病发生的特性及潜在机制，以期为IBD相关研究提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株和实验动物

菌株*H.hepaticus* 3B1 (ATCC51449) 购自美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection)，保存于-80℃备用。10只SPF级、VDR缺乏的雄性C57BL/6J小鼠(以下简称VDR<sup>-/-</sup>)购自江苏集萃药康生物科技股份有限公司[SCXK(苏)2023-0009]。10只野生型雄性C57BL/6J小鼠(以下简称为WT)购自扬州大学兽医学院(比较医学研究院)[SCXK(苏)2022-0009]。所有动物每只体重均为(19±0.5)g，饲养于扬州大学兽医学院动物实验室[SYXK(苏)2022-0044]。环境温度为(22±2)℃，相对湿度为40%~60%，昼夜12h更替。10只VDR<sup>-/-</sup>小鼠及10只WT小鼠分别分为感染组和对照组，每组各5只。实验前所有小鼠的螺杆菌属检测均呈阴性。本研究方案经扬州大学实验动物伦理委员会审议通过(审批号202405003)。

### 1.2 主要试剂和仪器

布氏肉汤和布氏琼脂购自美国BD公司；脱纤维绵羊血、HE染色试剂盒、阿尔辛蓝(alcian blue, AB)-过碘酸希夫(periodic acid Schiff, PAS)染色试剂盒和改良Masson染色试剂盒均购自北京索莱宝科技有限公司；布氏肉汤添加剂购自青岛海博生物技术有限公司；RNA抽提试剂TRIzol购自美国Invitrogen公司；反转录试剂盒和2×ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司；细菌DNA提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司；兔抗α-平滑肌肌动蛋白(alpha smooth muscle actin, α-SMA)抗体、兔抗白细胞介素(interleukin, IL)-33抗体和兔抗β-actin抗体购自英国Abcam公司；用于免疫组织化学染色的辣根过氧化物酶标记的羊抗兔

SignalStain<sup>®</sup> Boost IHC Detection Reagent和用于蛋白质印迹的羊抗兔IgG均购自美国Cell Signaling Technology中国分公司；蛋白质印迹检测用Amersham<sup>™</sup> ECL Select试剂和BCA蛋白浓度测定试剂盒购自南京碧云天生物技术有限公司。

Thermo Scientific Steri-Cycle<sup>™</sup> iCO<sub>2</sub>三气培养箱和NanoDrop 2000分光光度计购自美国Thermo公司；T100<sup>™</sup> Thermal CyclerPCR扩增仪、Sub-Cell<sup>®</sup> GT电泳仪和ChemiDoc<sup>™</sup> MP Imaging System凝胶成像仪购自美国Bio-Rad公司；StepOne<sup>™</sup> 实时荧光定量PCR仪购自美国Applied Biosystems公司；RM2235石蜡切片机和DM1000光学显微镜及DFC450 C摄像系统购自德国Leica公司。

### 1.3 细菌培养与模型构建

将*H.hepaticus*菌液涂于含5%脱纤维绵羊血的布氏琼脂平板上，在37℃、微需氧(85%N<sub>2</sub>, 10%CO<sub>2</sub>, 5%O<sub>2</sub>)环境下培养5d后，刮取所有菌落并用PBS洗涤，使用分光光度计测量并调整菌液至600nm吸光度(A值)为1~1.5，此时*H.hepaticus*浓度约为1×10<sup>9</sup> CFU/mL(CFU为菌落形成单位, colony-forming unit)。

将10只WT小鼠和10只VDR<sup>-/-</sup>小鼠随机均分为对照组和感染组，即WT小鼠对照组(WT control)、WT小鼠感染组(WT+*H. h.*)、VDR<sup>-/-</sup>小鼠对照组(VDR<sup>-/-</sup> control)、VDR<sup>-/-</sup>小鼠感染组(VDR<sup>-/-</sup>+*H. h.*)，每组5只小鼠。感染组分别按每只0.2 mL菌悬液(PBS为溶剂，含*H.hepaticus*约2×10<sup>8</sup> CFU)进行灌胃，而对照组灌胃等体积PBS。每隔1d灌胃1次，累积3次，最后一次灌胃后第7天使用螺杆菌属环介导等温扩增(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)快速检测方法对感染组所有小鼠进行*H. hepaticus*定植检测，以LAMP扩增结束后反应管内呈绿色反应液为阳性判定<sup>[10]</sup>，以此判断感染成功与否，并将灌胃完成后第7天作为后续实验初始时间。

### 1.4 组织采样与收集

细菌感染成功后称量各组小鼠体重，并在每周日定期称量各组小鼠体重共计16周。同时，计算疾病活动指数(disease activity index, DAI)评分，相关指标包括体重减轻(无体重减轻，0分；1%~5%，1分；5%~10%，2分；10%~15%，3分；>15%，4分)、大便黏稠度(正常为0分，软便1分，稀便2分，水样便3分)和便血(正常为0分，隐血阳性为1分，明显便血为2分，大量出血为3分)<sup>[11]</sup>。于感染后第16周，安乐死后收集各组小鼠粪便，测定其含水量，计算公

式为：粪便含水量 (%) = (原粪便重量 - 烘干粪便重量) / 原粪便重量 × 100。

使用二氧化碳吸入法将小鼠安乐死后，采集并测量小鼠的结肠长度，用质量分数4%的多聚甲醛溶液固定近端结肠组织后，采用HE染色、AB-PAS染色、Masson染色以及免疫组织化学染色检测组织病理学变化。另取部分近端结肠组织匀浆处理后提取DNA，以16S rRNA为靶基因构建标准品质粒并定量，梯度稀释后作为标准品模板进行实时荧光定量PCR，进行标准曲线绘制后即可通过循环阈值 (cycle threshold, Ct) 计算DNA拷贝数，从而检测*H.hepaticus*定植水平<sup>[12]</sup>。将剩余的中段及远端结肠组织冻存于-80℃，液氮研磨后采用反转录PCR (reverse transcription-PCR, RT-PCR) 和蛋白质印迹法检测细胞因子转录水平和蛋白水平。

### 1.5 结肠组织病理学检测

结肠组织固定后脱水，用石蜡包埋、切片 (5 μm) 后分别进行HE染色、AB-PAS染色和Masson染色，具体操作根据试剂盒说明书进行。最后使用光学显微镜观察组织病理学病变，根据Image-Pro Plus 6.0分析软件计算肠组织的胶原面积，并使用如下评分标准对其进行组织学活动指数 (histological activity index, HAI) 病理评分。相关指标包括炎症 (无, 0分; 局限于黏膜

层, 1分; 扩展到黏膜下层, 2分; 扩展到肌层或浆膜层, 3分)、水肿 (无, 0分; 轻度, 1分; 中度, 2分; 重度, 3分)、上皮缺陷 (无, 0分; 隐窝结构轻微变形, 1分; 隐窝结构明显变形或部分缺失, 2分; 隐窝结构完全破坏或溃疡形成, 3分)、杯状细胞缺失 (无, 0分; 轻度减少, 1分; 中度减少, 2分; 重度减少或完全缺失, 3分) 以及增生 (无, 0分; 隐窝轻度拉长, 1分; 隐窝明显拉长, 2分; 隐窝显著拉长或增厚, 3分)。

### 1.6 RT-PCR检测细胞因子转录水平

选取中段结肠组织，液氮研磨后加入1 mL TRIzol，提取结肠RNA，在分光光度计上测260 nm和280 nm处吸光度 (A) 值。当 $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ 比值为1.8~2.0时，将高纯度RNA用反转录试剂盒获得cDNA，然后在RT-PCR仪上进行扩增，检测*IL-1β*、*IL-6*、*IL-33*、肿瘤坏死因子-α (tumor necrosis factor-α, *TNF-α*)、转化生长因子β (transforming growth factor-β, *TGF-β*) 和α-SMA等细胞因子基因的mRNA转录水平。引物设计序列见表1。扩增条件：95℃预变性2 min，95℃变性15 s，60℃退火30 s，40个循环。PCR分析得各组内参基因*GAPDH*和目的基因的Ct值，运用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 公式计算目的基因表达量。

表1 PCR引物序列

Table 1 Sequences of primers used for PCR

引物名称 Primer name	基因序列号 Gene ID	序列 Sequence	扩增片段长度/bp Amplicon size/bp
<i>TGF-β</i>	22059	F: CCACCTGCAAGACCATCGAC; R: CTGGCGAGCCTTAGTTGGAC	91
α-SMA	11475	F: CCCAGACATCAGGGAGTAATGG; R: TCTATCGGATACTTCAGCGTCA	104
<i>TNF-α</i>	21926	F: CAGGCGGTGCCTATGTCTC; R: CGATCACCCGAAGTTCAGTAG	89
<i>IL-1β</i>	16176	F: GAAATGCCACCTTTTGACAGTG; R: TGGATGCTCTCATCAGGACAG	116
<i>IL-6</i>	16193	F: TCTATACCACTTCACAAGTCGGA; R: GAATTGCCATTGCACAACCTTT	88
<i>IL-33</i>	77125	F: ATTTCCCCGGCAAAGTTCAG; R: AACGGAGTCTCATGCAGTAGA	118
<i>GAPDH</i>	14433	F: AGGTCGGTGTGAACGGATTTG; R: GGGGTCGTTGATGGCAACA	95

注：*TGF-β*，转化生长因子β；α-SMA，α-平滑肌肌动蛋白；*TNF-α*，肿瘤坏死因子-α；*IL-1β*，白细胞介素-1β；*IL-6*，白细胞介素-6；*IL-33*，白细胞介素-33；*GAPDH*，甘油醛-3-磷酸脱氢酶，作为内参。

Note: *TGF-β*, transforming growth factor-β; α-SMA, alpha smooth muscle actin; *TNF-α*, tumor necrosis factor-α; *IL-1β*, interleukin-1β; *IL-6*, interleukin-6; *IL-33*, interleukin-33; *GAPDH*, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, as the internal control.

### 1.7 免疫组织化学法检测IL-33蛋白表达

将结肠组织切片进行脱蜡，水洗3次，3%过氧化氢孵育15 min，水洗3次。用0.1 mmol/L枸橼酸盐进行高温抗原修复，冷却至室温后，再水洗3次。滴加5%牛血清白蛋白，于37℃封闭30 min，用PBS溶液水洗3次。加入兔抗IL-33一抗 (体积稀释比例为1:2000)，4℃孵育过夜，用PBS洗3次。加入辣根过氧化物酶标

记的羊抗兔二抗 (体积稀释比例为1:400)，37℃孵育30 min，用PBS洗3次。DAB显色3 min，用苏木精对比染色细胞核2 min，再用PBS溶液漂洗3次，晾干，用中性树脂封固，于光学显微镜下观察。IL-33阳性信号为棕色沉淀，细胞核与细胞质均有分布。

### 1.8 蛋白质印迹法检测纤维化相关蛋白表达

取近端结肠组织，经液氮研磨后加入RIPA裂解

液、蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂 ( $\times 100$ ), 冰上裂解 20 min;  $4^{\circ}\text{C}$ , 12 000 r/min 离心 15 min, 取上清液用 BCA 蛋白定量试剂盒校准蛋白浓度。取等量蛋白液加入 loading 蛋白上样缓冲液, 于  $100^{\circ}\text{C}$  煮沸 5 min 使蛋白变性。在 PAGE 胶中上样  $10\ \mu\text{L}$ , 电泳 ( $80\ \text{V}\ 40\ \text{min}$ ,  $120\ \text{V}\ 50\ \text{min}$ ) 后转膜 ( $200\ \text{mA}\ 60\ \text{min}$ ), 分别与抗 IL-33 抗体、抗  $\alpha$ -SMA 抗体、抗  $\beta$ -actin 抗体 (稀释比例均为 1:1 000) 在  $4^{\circ}\text{C}$  孵育 16 h; 随后, 将膜与辣根过氧化物酶偶联的羊抗兔 IgG (稀释比例为 1:20 000) 孵育 1 h, 用 Amersham ECL Select 试剂检测目的蛋白表达量。

## 1.9 数据统计分析

在光学显微镜下观察 HE 染色、AB-PAS 染色、Masson 染色及免疫组织化学染色结果, 记录组织结构、抗原位置及表达量, 统计肠道病理学评分; 结果数据用平均数 $\pm$ 标准差表示, 采用非配对双尾  $t$  检验进行组间比较。所有结果数据经 Graphpad Prism 9 软件进行差异分析并制图,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 *H.hepaticus* 感染引起 VDR<sup>-/-</sup> 小鼠体重减轻和结肠缩短

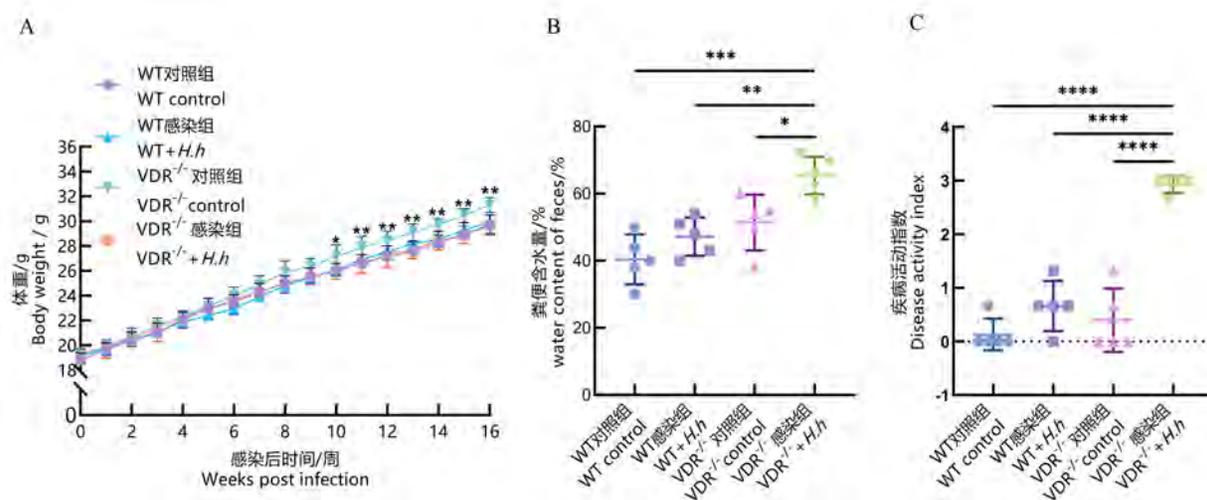
*H.hepaticus* 三次灌胃后第 7 天, 收集所有感染组小

鼠的粪便, 使用 LAMP 快速检测方法进行 *H.hepaticus* 定植检测。LAMP 扩增结束后, 反应管内均呈绿色反应液, 提示所有感染组小鼠均成功定植 *H.hepaticus*, 即感染成功。如图 1A 所示, 成功感染后第 8 周, VDR<sup>-/-</sup>+*H.h* 组小鼠体重增长速度放缓; 感染 10 周后, VDR<sup>-/-</sup> 小鼠体重显著低于 VDR<sup>-/-</sup> 小鼠未感染组 ( $P < 0.05$ ); 而 WT、VDR<sup>-/-</sup> 及 WT+*H.h* 组之间小鼠体重无显著差异 (均  $P > 0.05$ )。

小鼠结肠长度是评估小鼠结肠炎的重要参数。在成功感染后第 16 周时, 与 WT 小鼠对照组相比, WT+*H.h* 组小鼠结肠明显缩短 ( $P < 0.01$ ); 与 VDR<sup>-/-</sup> 小鼠相比, VDR<sup>-/-</sup>+*H.h* 组小鼠结肠明显缩短 ( $P < 0.01$ , 图 2)。此外, 与 WT 小鼠对照组相比, VDR<sup>-/-</sup> 小鼠对照组也出现结肠缩短 ( $P < 0.01$ ), 而 VDR<sup>-/-</sup>+*H.h* 组小鼠结肠较 VDR<sup>-/-</sup> 小鼠相比更短 ( $P < 0.01$ )。

粪便含水量是评估腹泻型肠炎的重要指标。VDR<sup>-/-</sup> 小鼠感染 *H.hepaticus* 后第 16 周, 出现腹泻和便血表征, 粪便含水指标显著高于对照组和 WT+*H.h* 组小鼠 ( $P < 0.05$ , 图 1B)。DAI 评分结果 (图 1C) 显示, VDR<sup>-/-</sup> 小鼠感染 *H.hepaticus* 后肠炎加重, 与其他各组的评分差异显著增加 ( $P < 0.0001$ )。

综上所述, *H.hepaticus* 感染可引起 VDR<sup>-/-</sup> 小鼠结肠炎, 并随着感染时间延长, 病情加重。

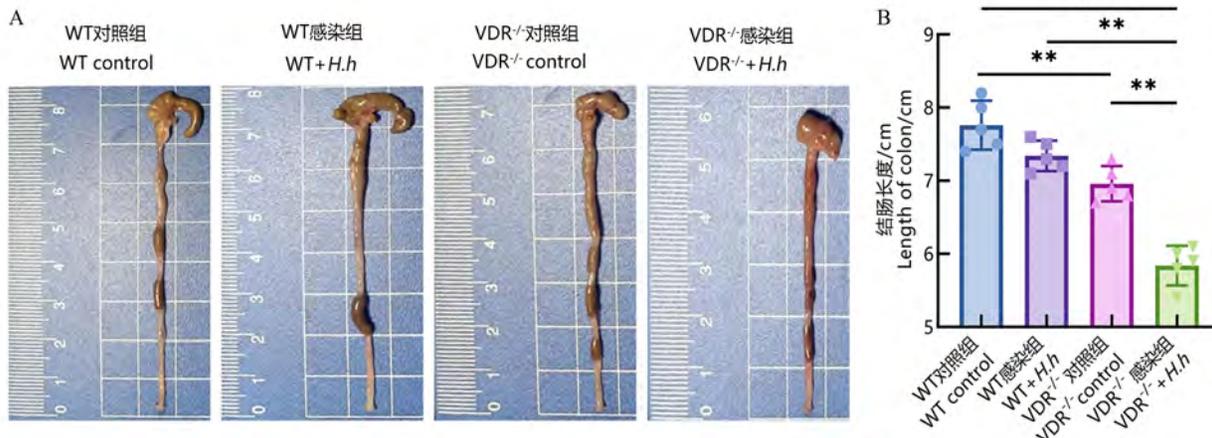


注: VDR<sup>-/-</sup>对照组与其他 3 组比较, 在感染 10 周后体重出现差异 ( $P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$ ,  $n=5$ )。VDR<sup>-/-</sup>感染组小鼠粪便含水量和疾病活动指数评分均显著高于其他组 ( $P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$ ,  $***P < 0.001$ ,  $****P < 0.0001$ ,  $n=5$ )。

Note: A significant disparity in body weight was observed after a 10-week infection period when comparing the VDR<sup>-/-</sup> control with the remaining three groups ( $P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$ ,  $n=5$ ). The fecal water content and disease activity index score in VDR<sup>-/-</sup>+*H.h* group mice were significantly higher compared to those in the other groups ( $P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$ ,  $***P < 0.001$ ,  $****P < 0.0001$ ,  $n=5$ ).

图 1 *H.hepaticus* 感染后各组小鼠的体重变化 (A)、粪便含水量 (B) 和疾病活动指数评分 (C) 比较

Figure 1 Body weight changes (A), fecal water content (B), and disease activity index score (C) of mice infected by *H.hepaticus*



注：A为各组1只小鼠的代表性结肠长度对比照片；B为*H.hepaticus*感染导致结肠缩短，并且VDR缺陷加重了这一病变 (\*\* $P<0.01$ ,  $n=5$ )。

Note: A, Comparison photos of representative colon lengths of one mouse from each group; B, *H.hepaticus* infection resulted in a significant reduction in colon length, and VDR deficiency further exacerbated this pathological effect (\*\* $P<0.01$ ,  $n=5$ ).

图2 *H.hepaticus*感染后各组小鼠的结肠长度

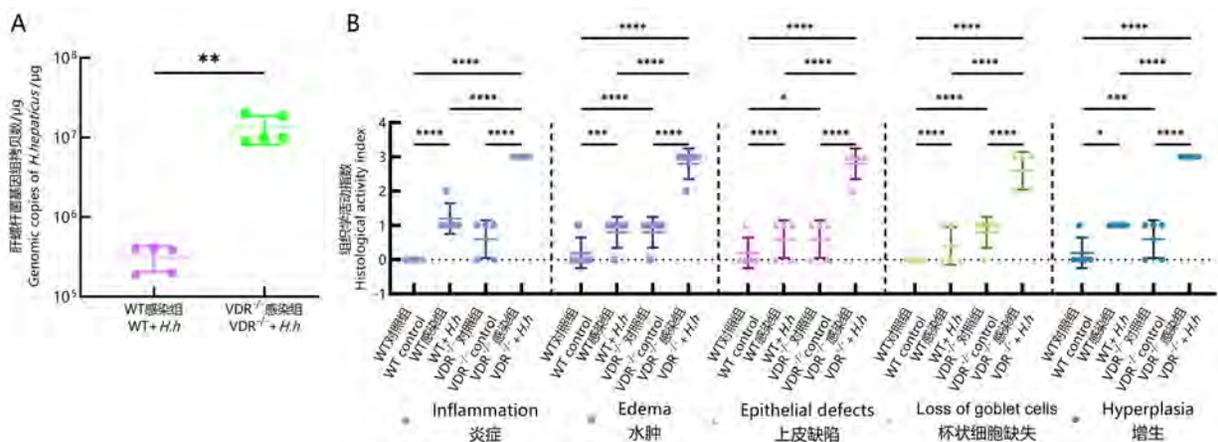
Figure 2 Colon length of mice in each group after *H. hepaticus* infection

## 2.2 VDR 缺失促进 *H.hepaticus* 在小鼠结肠中定植

为比较WT和VDR<sup>-/-</sup>小鼠感染*H.hepaticus*是否具有差异性，使用实时荧光定量PCR检测方法测定近端结肠中*H.hepaticus*拷贝数，从而反映细菌定植水平<sup>[11]</sup>。结果显示，*H.hepaticus*在VDR<sup>-/-</sup>小鼠结肠的定植水平显著高于WT小鼠(图3A)，这提示VDR缺失可能是导致小鼠感染*H.hepaticus*后体重和结肠长度差异的原因之一。

## 2.3 *H.hepaticus* 感染致VDR<sup>-/-</sup>小鼠发生结肠炎和肠纤维化

*H.hepaticus*感染16周后，取各组小鼠的近端结肠组织进行病理切片染色(图4)。HE染色结果(图4A)显示，VDR<sup>-/-</sup>小鼠感染组肠道杯状细胞减少，固有层淋巴细胞聚集，隐窝淋巴细胞浸润，部分组织隐窝结构消失，隐窝内肠腺数量减少，且大小形状不规则，黏膜上皮略有增厚；而WT小鼠感染组仅出现轻微的杯状细胞缺失和淋巴细胞浸润；WT和VDR<sup>-/-</sup>小鼠对照



注：VDR<sup>-/-</sup>小鼠感染组的*H.hepaticus*肠道载菌量显著高于WT小鼠感染组 (\*\* $P<0.01$ ,  $n=5$ )。组织学活动指数评分显示，*H.hepaticus*感染引起结肠病变，并且VDR缺陷加重了结肠病变 (\* $P<0.05$ , \*\*\* $P<0.001$ , \*\*\*\* $P<0.0001$ ,  $n=5$ )。

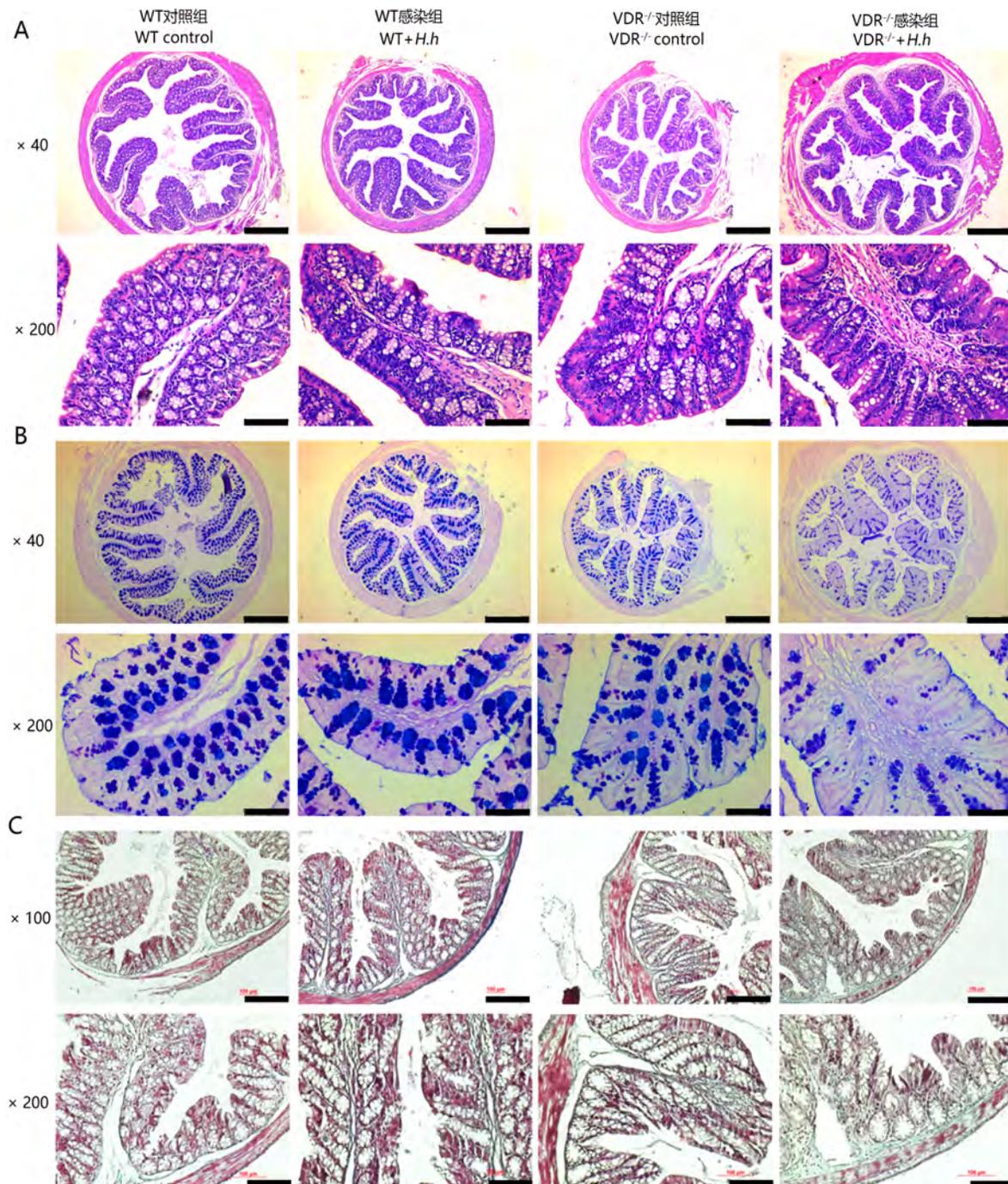
Note: The intestinal colonization of *H.hepaticus* was significantly higher in the VDR<sup>-/-</sup>+*H.h* group compared to the WT+*H.h* group (\*\* $P<0.01$ ,  $n=5$ ). Histological activity index showed that the infection with *H.hepaticus* induced colonic pathology, while VDR deficiency exacerbated the pathological changes in the colon (\* $P<0.05$ , \*\*\* $P<0.001$ , \*\*\*\* $P<0.0001$ ,  $n=5$ ).

图3 小鼠感染*H.hepaticus*后的肠道载菌量(A)和结肠组织HAI评分(B)

Figure 3 Colonic bacterial colonization (A) and HAI score of colon tissues (B) in mice infected with *H.hepaticus*

组小鼠肠道结构正常，肠腺清晰，未见明显病变。AB-PAS 染色结果（图 4B）表明，VDR<sup>-/-</sup>小鼠感染组

肠道杯状细胞缺失，黏液减少，而 WT 感染组和 WT、VDR<sup>-/-</sup>小鼠对照组肠道结构正常。Masson 染色结果



注：VDR<sup>-/-</sup>小鼠感染组表现为更为严重的淋巴细胞浸润，杯状细胞缺失和黏液分泌减少，并且胶原纤维沉积变多。其中放大倍数×40的比例尺为500 μm，×200的比例尺为100 μm，×100的比例尺为200 μm。

Note: The VDR<sup>-/-</sup>+*H.h* group exhibited more severe lymphocyte infiltration, loss of goblet cells, and reduced mucus secretion, along with increased collagen fiber deposition. The magnification is ×40 with a scale bar of 500 μm, ×200 with a scale bar of 100 μm, or ×100 with a scale bar of 200 μm.

图4 *H.hepaticus*感染小鼠16周后结肠组织HE染色(A)、阿尔辛蓝-过碘酸希夫染色(B)和Masson染色(C)

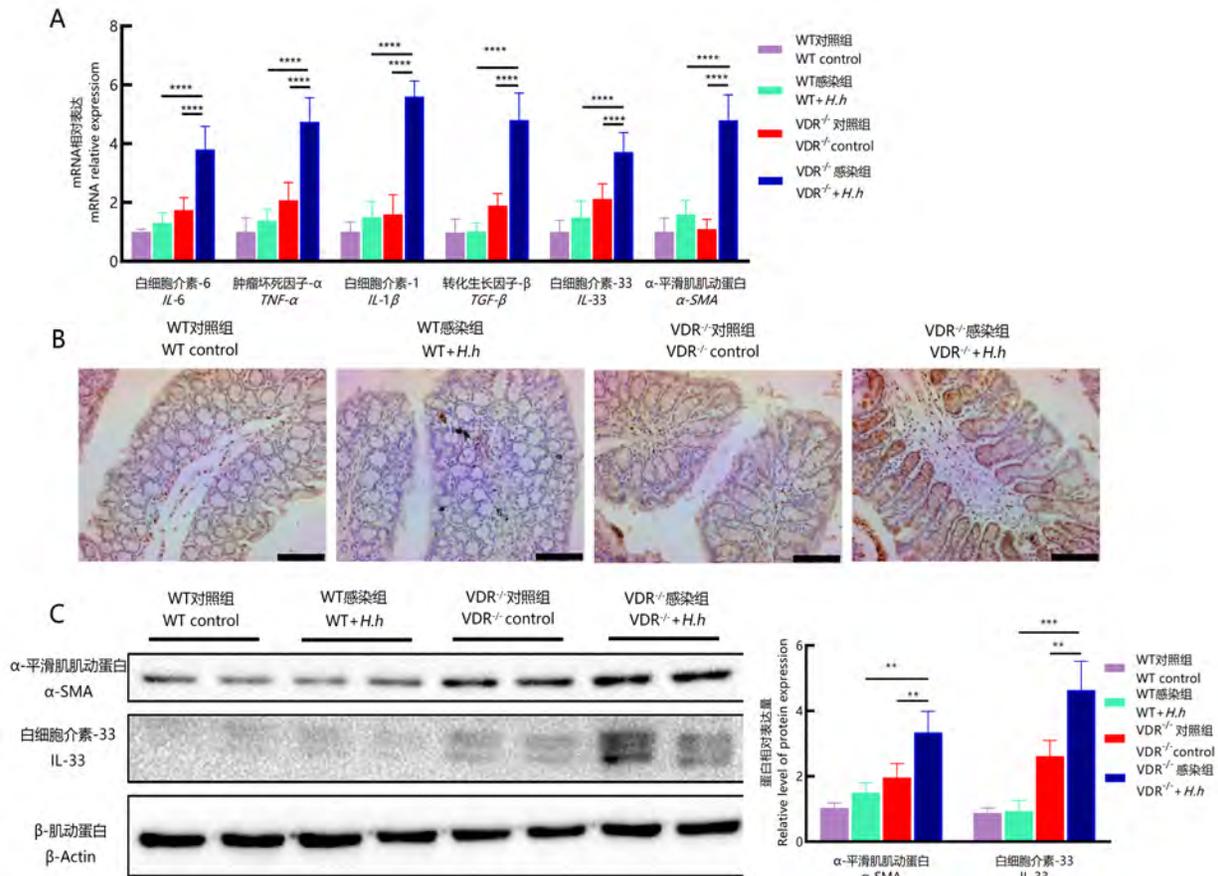
Figure 4 HE staining (A), AB-PAS staining (B) and Masson staining (C) of colon tissue of mice infected with *H.hepaticus* for 16 weeks

(图4C)显示,  $VDR^{-/-}$ 小鼠感染组肠道胶原纤维增多, 肠纤维化程度加重, 而WT小鼠感染组胶原沉积较少, WT、 $VDR^{-/-}$ 小鼠对照组肠道无胶原沉积。综上所述,  $VDR$ 缺失会促进 *H.hepaticus* 感染, 引起小鼠肠炎和肠纤维化。

## 2.4 *H.hepaticus* 感染促进 $VDR^{-/-}$ 小鼠结肠组织中炎症及纤维化因子表达

通过比较在  $VDR^{-/-}$  和 WT 小鼠感染 *H.hepaticus* 后的结肠组织多种炎症因子的表达水平, 探究肠纤维化发

病机制。RT-PCR 检测结果如图 5A 所示, 在  $VDR^{-/-}$  小鼠中, *H.hepaticus* 感染引起促炎和促纤维化因子转录水平升高。具体而言,  $VDR^{-/-}$  小鼠感染组主要炎症因子 *IL-6*、*TNF- $\alpha$*  和 *IL-1 $\beta$*  基因转录水平较 WT 小鼠感染组明显升高 ( $P < 0.0001$ ), 纤维化相关指标  $\alpha$ -SMA、*TGF- $\beta$* 、*IL-33* 转录水平比 WT 感染组也明显升高 ( $P < 0.0001$ )。结果表明, *H.hepaticus* 感染  $VDR^{-/-}$  小鼠引起结肠炎症因子和纤维化因子的表达, 促进了肠纤维化的发展。



注: RT-PCR 检测显示, 与 WT 小鼠感染组相比,  $VDR^{-/-}$  小鼠感染组促炎因子和促纤维化因子转录水平显著升高 ( $****P < 0.0001$ ,  $n=5$ ); 免疫组织化学和蛋白质印迹也发现纤维化相关蛋白如 IL-33 和  $\alpha$ -SMA 表达的上调 ( $**P < 0.01$ ,  $***P < 0.001$ )。图 B 中放大倍数为 200, 比例尺为  $100\ \mu\text{m}$ 。  
Note: RT-PCR showed that, compared to the WT + *H.h* group, the transcription levels of pro-inflammatory and pro-fibrotic factors were significantly elevated in the  $VDR^{-/-}$  + *H.h* group ( $****P < 0.0001$ ,  $n=5$ ). Immunohistochemistry and Western blotting also revealed an upregulation of fibrosis-related proteins such as IL-33 and  $\alpha$ -SMA ( $**P < 0.01$ ,  $***P < 0.001$ ). In Figure B, the magnification is  $\times 200$ , and the scale bar is  $100\ \mu\text{m}$ .

图5 *H.hepaticus* 感染小鼠 16 周后结肠组织 mRNA 表达水平检测(A)、IL-33 免疫组织化学染色(B)和蛋白质印迹(C)

Figure 5 Detection of mRNA expression levels in colon tissue of mice infected with *H. hepaticus* after 16 weeks (A), IL-33 immunohistochemical staining (B), and Western blotting (C)

## 2.5 *H.hepaticus* 感染通过促进 IL-33 表达和释放引起 $VDR^{-/-}$ 小鼠肠纤维化

为探究 *H.hepaticus* 感染引起  $VDR^{-/-}$  小鼠肠纤维化的

致病机制, 对肠道组织中相关因子表达进行免疫组织化学(图5B)和蛋白质印迹(图5C)检测。 $\alpha$ -SMA 是反映胶原沉积的重要指标<sup>[13]</sup>。蛋白质印迹结果显示,

VDR<sup>-/-</sup>小鼠感染组 $\alpha$ -SMA蛋白表达水平高于WT感染组 ( $P < 0.01$ ), 这提示VDR缺乏可导致*H.hepaticus*促进了肠炎向肠纤维化发展。IL-33是一种多效性细胞因子, 参与组织修复, 包括纤维化疾病的发生、发展<sup>[14]</sup>。免疫组织化学和蛋白质印迹结果均显示, 与WT小鼠感染组相比, VDR<sup>-/-</sup>小鼠感染组肠道中IL-33水平升高 ( $P < 0.001$ ), 提示VDR的缺失引起IL-33表达上调, 可能是加剧肠纤维化的原因之一。

### 3 讨论

IBD临床表现包括持续过度的炎症反应、肠纤维化导致的肠管狭窄以及肠道菌群紊乱等<sup>[15]</sup>, IBD的发病与维生素D水平低有关<sup>[9]</sup>。*H.hepaticus*感染小鼠通常为持续性状态, 持续性的炎症反应能够使一些免疫缺陷鼠很好地模拟IBD<sup>[16-17]</sup>, 但其在免疫健全鼠如C57BL/6中感染症状不明显。本研究使用*H.hepaticus*感染C57BL/6J及相同背景的VDR<sup>-/-</sup>小鼠, 发现*H.hepaticus*感染C57BL/6J小鼠后引起了轻微的肠炎症状, 而*H.hepaticus*感染VDR<sup>-/-</sup>小鼠后出现结肠缩短、黏膜炎性浸润、黏膜组织功能受损、胶原沉积等症状更为明显, 并且VDR<sup>-/-</sup>小鼠未感染对照组无任何病变。本研究在模拟IBD病理改变的同时, 能够模拟IBD患者的低VDR信号, 可为IBD模型构建及其发病机制和治疗研究提供一定参考。

VDR在多种组织中均有表达(如皮肤、肠道等), 具有广泛的生物学功能, 参与调控自噬、细胞增殖、肠屏障、肠道微生物群系和免疫反应<sup>[18]</sup>。本研究发现, VDR缺陷使*H.hepaticus*感染小鼠模型的DAI评分增加, *H.hepaticus*定植量增多, 肠腺功能受损, 这可能与VDR的肠屏障保护功能有关。已有研究表明, VDR通过一系列作用参与维持黏液层和肠道上皮的完整性, 如调控紧密连接和黏附连接等成分的表达, 以及抗菌肽和黏蛋白的释放<sup>[19]</sup>。此外, VDR可作为先天免疫对病原微生物威胁反应的关键调节因子, 广泛参与免疫调控, 发挥免疫抑制功能<sup>[20]</sup>, 这可能是*H.hepaticus*感染VDR<sup>-/-</sup>小鼠引起了更为严重的炎症反应的原因之一。肠纤维化是IBD的一种临床表现, 由于有害刺激未及时消除, 造成肠炎伤口愈合延长或中断, 于肠黏膜中反复出现并最终形成结缔组织<sup>[21]</sup>。本研究发现*H.hepaticus*感染VDR<sup>-/-</sup>小鼠引起了更高的促纤维化因子(如IL-33、TGF- $\beta$ )转录水平和更严重的胶原沉积。IL-33在各种屏障部位高度表达, 不仅促进伤口愈合和

组织修复, 还参与炎症和组织修复间失衡引起的纤维化进程, 在IBD纤维化中起一定作用<sup>[22]</sup>。本研究结果显示, IL-33表达水平在VDR<sup>-/-</sup>+*H.h*组中显著升高, 并且 $\alpha$ -SMA表达量上调表明纤维化加剧, 这提示VDR信号可能通过抑制IL-33表达来阻止纤维化进程。

综上所述, *H.hepaticus*感染VDR<sup>-/-</sup>小鼠成功构建了IBD模型; VDR缺陷导致了肠屏障功能受损和免疫反应紊乱, 并通过影响IL-33表达加剧了纤维化进程。*H.hepaticus*引起VDR<sup>-/-</sup>小鼠肠纤维化是一种新型模型, 相比于常规品系小鼠, *H.hepaticus*能够在VDR<sup>-/-</sup>小鼠中长期感染并引起肠炎症状, 拓展了*H.hepaticus*肠炎模型的运用范围。并且, 本模型能够模拟IBD患者的低VDR信号特征, 可为研究IBD发病机制、探索肠纤维化治疗新措施和筛选治疗新药物提供了新的选择, 这具有重要的临床意义。与此同时, *H.hepaticus*在实验动物群体中广泛传播带来的巨大威胁也应引起高度重视。

#### [医学伦理声明 Medical Ethics Statement]

本研究涉及的所有动物采样及实验过程均严格遵守中国实验动物福利伦理相关法律法规, 并通过扬州大学实验动物伦理委员会审查批准(批准号: 202405003)。

All animal sampling and experimental procedures involved in this study strictly adhere to the relevant laws and regulations on the welfare ethics of experimental animals in China, and have been reviewed and approved by Experimental Animal Ethics Committee of Yangzhou University (Approval No: 202405003).

#### [作者贡献 Author Contribution]

吴志浩负责相关实验操作、数据整理及论文初稿撰写; 曹舒扬负责动物和相关材料提供、模型建立和标本采集; 周正宇负责实验设计、实验结果把关以及文章定稿。

#### [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] KHAN I, ULLAH N, ZHA L J, et al. Alteration of gut microbiota in inflammatory bowel disease (IBD): cause or consequence? IBD treatment targeting the gut microbiome[J]. Pathogens, 2019, 8(3):126. DOI: 10.3390/pathogens8030126.
- [2] GEARRY R B. IBD and environment: are there differences between east and west[J]. Dig Dis, 2016, 34(1-2):84-89. DOI: 10.1159/000442933.
- [3] OTT S J, MUSFELDT M, WENDEROTH D F, et al. Reduction in diversity of the colonic mucosa associated bacterial microflora in patients with active inflammatory bowel disease [J]. Gut, 2004, 53(5):685-693. DOI: 10.1136/gut.2003.025403.
- [4] BETTENWORTH D, RIEDER F. Pathogenesis of intestinal fibrosis in inflammatory bowel disease and perspectives for

- therapeutic implication[J]. *Dig Dis*, 2017, 35(1-2): 25-31. DOI: 10.1159/000449079.
- [5] FOX J G, GE Z, WHARY M T, et al. *Helicobacter hepaticus* infection in mice: models for understanding lower bowel inflammation and cancer[J]. *Mucosal Immunol*, 2011, 4(1): 22-30. DOI: 10.1038/mi.2010.61.
- [6] NAGALINGAM N A, ROBINSON C J, BERGIN I L, et al. The effects of intestinal microbial community structure on disease manifestation in IL-10<sup>-/-</sup> mice infected with *Helicobacter hepaticus*[J]. *Microbiome*, 2013, 1(1): 15. DOI: 10.1186/2049-2618-1-15.
- [7] LU Y Y, CHEN Y E, LI Y H, et al. Monotropin inhibits colitis associated cancer through VDR/JAK1/STAT1 regulation of macrophage polarization[J]. *Int Immunopharmacol*, 2023, 124 (Pt A): 110838. DOI: 10.1016/j.intimp.2023.110838.
- [8] ASSA A, VONG L, PINNELL L J, et al. Vitamin D deficiency promotes epithelial barrier dysfunction and intestinal inflammation[J]. *J Infect Dis*, 2014, 210(8): 1296-1305. DOI: 10.1093/infdis/jiu235.
- [9] CHETCUTI ZAMMIT S, ELLUL P, GIRARDIN G, et al. Vitamin D deficiency in a European inflammatory bowel disease inception cohort: an epi-IBD study[J]. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 2018, 30(11): 1297-1303. DOI: 10.1097/MEG.0000000000001238.
- [10] 钱淼, 冯洁, 张泉, 等. 螺杆菌属 LAMP 快速检测方法的研究[J]. *扬州大学学报(农业与生命科学版)*, 2020, 41(4): 77-81. DOI: 10.16872/j.cnki.1671-4652.2020.04.013.
- QIAN M, FENG J, ZHANG Q, et al. The study of rapid detection of *Helicobacter* species using loop-mediated isothermal amplification[J]. *J Yangzhou Univ Agric Life Sci Ed*, 2020, 41(4): 77-81. DOI: 10.16872/j.cnki.1671-4652.2020.04.013.
- [11] WU Y, RAN L, YANG Y, et al. Deferasirox alleviates DSS-induced ulcerative colitis in mice by inhibiting ferroptosis and improving intestinal microbiota[J]. *Life Sci*, 2023, 314: 121312. DOI: 10.1016/j.lfs.2022.121312.
- [12] 孙靖瑜, 谢立志, 冯洁, 等. 啮齿类螺杆菌 SYBR Green II 荧光定量 PCR 检测方法的建立[J]. *实验动物与比较医学*, 2018, 38(2): 91-97. DOI: 10.3969/j.issn.1674-5817.2018.02.003.
- SUN J Y, XIE L Z, FENG J, et al. Establishment of SYBR green II based real-time PCR method for detection of *Helicobacter rodentium*[J]. *Lab Anim Comp Med*, 2018, 38(2): 91-97. DOI: 10.3969/j.issn.1674-5817.2018.02.003.
- [13] WANG R, WANG D J, WANG H W, et al. Therapeutic targeting of Nrf2 signaling by maggot extracts ameliorates inflammation-associated intestinal fibrosis in chronic DSS-induced colitis[J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 670159. DOI: 10.3389/fimmu.2021.670159.
- [14] ANDOH A, NISHIDA A. Pro- and anti-inflammatory roles of interleukin (IL) -33, IL-36, and IL-38 in inflammatory bowel disease[J]. *J Gastroenterol*, 2023, 58(2): 69-78. DOI: 10.1007/s00535-022-01936-x.
- [15] XAVIER R J, PODOLSKY D K. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease[J]. *Nature*, 2007, 448(7152): 427-434. DOI: 10.1038/nature06005.
- [16] CAHILL R J, FOLTZ C J, FOX J G, et al. Inflammatory bowel disease: an immunity-mediated condition triggered by bacterial infection with *Helicobacter hepaticus*[J]. *Infect Immun*, 1997, 65(8): 3126-3131. DOI: 10.1128/iai.65.8.3126-3131.1997.
- [17] BURICH A, HERSHBERG R, WAGGIE K, et al. *Helicobacter*-induced inflammatory bowel disease in IL-10- and T cell-deficient mice[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2001, 281(3): G764-G778. DOI: 10.1152/ajpgi.2001.281.3.G764.
- [18] BATTISTINI C, BALLAN R, HERKENHOFF M E, et al. Vitamin D modulates intestinal microbiota in inflammatory bowel diseases[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 22(1): 362. DOI: 10.3390/ijms22010362.
- [19] DOMAZETOVIC V, IANTOMASI T, BONANOMI A G, et al. Vitamin D regulates claudin-2 and claudin-4 expression in active ulcerative colitis by p-Stat-6 and Smad-7 signaling[J]. *Int J Colorectal Dis*, 2020, 35(7): 1231-1242. DOI: 10.1007/s00384-020-03576-0.
- [20] ISMAILOVA A, WHITE J H. Vitamin D, infections and immunity [J]. *Rev Endocr Metab Disord*, 2022, 23(2): 265-277. DOI: 10.1007/s11154-021-09679-5.
- [21] SMILLIE C S, BITON M, ORDOVAS-MONTANES J, et al. Intra- and inter-cellular rewiring of the human colon during ulcerative colitis[J]. *Cell*, 2019, 178(3): 714-730.e22. DOI: 10.1016/j.cell.2019.06.029.
- [22] KOTSIU O S, GOURGOULIANIS K I, ZAROGIANNIS S G. IL-33/ST2 axis in organ fibrosis[J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 2432. DOI: 10.3389/fimmu.2018.02432.

(收稿日期: 2024-06-27 修回日期: 2024-10-09)

(本文责任编辑: 张俊彦)

#### [引用本文]

吴志浩, 曹舒扬, 周正宇. 肝螺杆菌感染引起 VDR<sup>-/-</sup>小鼠炎性肠病相关肠纤维化模型的建立及机制探讨[J]. *实验动物与比较医学*, 2025, 45(1): 37-46. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.090.

WU Z H, CAO S Y, ZHOU Z Y. Establishment of an intestinal fibrosis model associated with inflammatory bowel disease in VDR<sup>-/-</sup> mice induced by *Helicobacter hepaticus* infection and mechanism exploration[J]. *Lab Anim Comp Med*, 2025, 45(1): 37-46. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.090.

# 非人灵长类实验动物用于人类卵巢衰老研究进展

肖文娴<sup>1,2</sup>, 吕龙宝<sup>1,2,3</sup>

(1. 中国科学院昆明动物研究所, 昆明 650223; 2. 国家非人灵长类实验动物资源库, 昆明 650223; 3. 中国科学院大学, 北京 100049)

**[摘要]** 卵巢具有卵泡发生与激素分泌两大功能, 与女性的生殖能力密切相关。卵巢衰老表现为卵巢形态改变、卵子数量减少和激素水平变化, 不仅导致女性生育力下降, 也被认为是多器官衰老的始动因素。此外, 卵巢衰老伴随的性激素分泌紊乱还可能诱发心血管疾病、睡眠障碍、潮热等疾病和症状。由于社会压力与自身职业规划等因素的影响, 现代女性的生育年龄普遍延迟, 而卵巢功能的衰老进程却不会随年龄的增加而减缓。许多女性面临着想要生育时, 却已错过最佳适育年龄, 出现不孕不育等问题。这使人们日益关注延缓卵巢衰老的研究。非人灵长类实验动物在进化上与人类的亲缘关系最为接近, 与人类基因组的序列同一性高达93%, 因此在生理代谢、生殖内分泌、发育衰老等研究中具有其他模式动物无法比拟的优点, 在非人灵长类实验动物上得到的研究结果转化应用到人类医学上也更为可靠。本文首先从卵巢衰老与治疗现状为切入点, 概述非人灵长类实验动物作为卵巢衰老研究模式动物的优势, 接着从生殖内分泌激素水平、卵巢的形态结构与功能、卵巢衰老的其他生理变化等方面。综述了非人灵长类实验动物应用于卵巢衰老研究的进展, 并对存在的问题与展望进行总结, 以期对读者有所帮助。

**[关键词]** 非人灵长类实验动物; 卵巢衰老; 性激素; 卵泡

**[中图分类号]** R-332; Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2025)01-0047-08



## Research Progress on Human Ovarian Aging Using Non-Human Primates as Laboratory Animals

XIAO Wenxian<sup>1,2</sup>, LÜ Longbao<sup>1,2,3</sup>

(1. Kunming Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650223, China; 2. National Resource Center for Non-Human Primates, Kunming 650223, China; 3. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Correspondence to: LÜ Longbao (ORCID:0000-0002-8437-6333), E-mail: lvlongbao@mail.kiz.ac.cn

**[ABSTRACT]** The ovary has two main functions: folliculogenesis and hormone secretion, both of which are closely related to female fertility. Ovarian aging is characterized by morphological changes, a reduction in follicle numbers, and fluctuations in hormone levels. It not only leads to a decline in female fertility, but is also considered to be a key driver of multi-organ aging. In addition, the disruption of sex hormone secretion associated with ovarian aging can lead to the occurrence of related diseases and symptoms, such as cardiovascular diseases, sleep disorders, and hot flashes. Due to the influence of social pressures and personal career planning, many modern women are increasingly postponing childbearing. However, ovarian aging does not slow down with advancing age. As a result, many women face issues such as infertility when they are ready to have children, having missed their optimal childbearing age. This leads to growing interest in research on delaying ovarian aging. Non-human primates share the closest evolutionary relationship with humans, with a genomic sequence identity of 93%, which grants them unparalleled advantages over

**[基金项目]** 国家重点研发计划“灵长类实验动物育种、繁育、SPF猴培育及资源保护研究”(2022YFF0710900); 云南(昆明)院士专家工作站计划“云南(昆明)贺争鸣实验动物专家工作站”(YSZJGZZ-2022063); 云南省院士专家工作站“云南省贺争鸣专家工作站”(202305AF150160)

**[第一作者]** 肖文娴(1997—),女,硕士,工程师,研究方向:实验动物学。E-mail: xiaowenxian@mail.kiz.ac.cn。ORCID: 0009-0009-8336-5649

**[通信作者]** 吕龙宝(1974—),男,硕士,正高级工程师,研究方向:实验动物学。E-mail: lvlongbao@mail.kiz.ac.cn。ORCID: 0000-0002-8437-6333

other model animals in studies on physiological metabolism, reproductive endocrinology, and developmental aging. Findings obtained in non-human primates are also more reliably translatable to human medical research. This study begins by discussing the current state of ovarian aging research and treatment strategies, highlighting the advantages of non-human primates as laboratory animals for ovarian aging research. It then reviews research progress in areas such as reproductive endocrine hormone levels, ovarian morphology and function, and other physiological changes associated with ovarian aging. Furthermore, it summarizes existing challenges and future research directions, aiming to provide valuable insights for researchers.

**[Key words] Laboratory non-human primates; Ovarian aging; Sex hormones; Follicles**

随着生物医药技术的迅速发展, 人类的寿命较之从前大大延长, 而女性的生育年龄却没有相应延长。社会压力增大导致许多女性推迟生育, 从而错过了最佳适育年龄, 致使不孕不育率增高、生育力下降等问题的出现。卵巢是维持女性生育能力的重要性腺器官, 如何延缓卵巢自然衰老, 将女性的生育年龄适当延长, 是人们越来越关注的问题。目前治疗卵巢衰老的方法主要有激素替代治疗、注射间充质干细胞等, 但这些方法均有局限性。

非人灵长类实验动物的遗传和生理特征与人类最为相近, 在人类遗传学、生理代谢、生殖、衰老等方面的研究中具有极大的应用价值, 是啮齿类等实验模式动物所无法替代的。在非人灵长类实验动物上的研究结果更可能转化应用于医药领域。20世纪60~90年代, 对非人灵长类实验动物的研究主要集中在观察分析整个月经周期或不同年龄段(如幼年期、生殖力旺盛期、围绝经期, 主要集中在围绝经期)激素分泌水平以及卵泡数目的变化, 并发现非人灵长类实验动物的激素变化水平与人类女性的月经期不同阶段及整个生命过程的变化基本一致, 卵泡储备功能的变化也极为相近。

近年来, 利用非人灵长类实验动物模型进行的卵巢衰老研究越来越多。目前国际上的研究主要集中在卵巢早衰和卵巢癌等所致的卵巢病理性衰老, 对于卵巢自然衰老所发生变化的研究则较少。本文将从激素水平、卵泡数目、卵巢形态与功能等方面进行阐述, 并结合现有的国内外研究进展及实验猴在繁殖方面存在的问题, 提出一些建议和展望。

## 1 卵巢衰老及其治疗的现状

女性生育力在20~30岁达到顶峰, 35岁左右卵巢

功能开始减退, 由此导致生育力和内分泌功能衰退, 进入绝经过渡期, 最终导致绝经<sup>[1-2]</sup>。研究表明, 大多数女性在49~52岁进入绝经, 绝经平均年龄为50岁, 这意味着女性有较大一段生存时间处于绝经后阶段<sup>[3-4]</sup>。卵巢衰老意味着妇女逐渐进入围绝经期, 同时会有潮热、夜间出汗、情绪障碍、泌尿生殖疾病、阴道干燥等症状<sup>[5]</sup>, 成为女性衰老的“多重起搏器”<sup>[6]</sup>。在人类预期寿命不断延长的同时, 女性卵巢衰老的脚步却并未减缓。随着越来越多的育龄夫妇选择推迟生育, 许多育龄妇女想要生育时已经错过了其最佳适育年龄, 这使得人们对于如何改善女性卵巢功能、延缓卵巢衰老越来越重视。

女性随着年龄的增长, 卵巢的功能逐渐衰退, 卵泡数量下降, 由小窦状卵泡颗粒细胞分泌的抑制素B(inhibin B)减少<sup>[7]</sup>, 使得下丘脑-垂体-卵巢轴功能出现紊乱, 垂体分泌的卵泡刺激素(follicle-stimulating hormone, FSH)和黄体生成素(luteinizing hormone, LH)增多, 而卵巢分泌的雌二醇(estradiol, E<sub>2</sub>)减少<sup>[8]</sup>。FSH分泌增多会加剧卵泡的募集及丢失。同时, 由于生长状态的窦前卵泡及小窦卵泡数量下降, 由其颗粒细胞分泌的抗米勒管激素(anti-Müllerian hormone, AMH)也随之减少。此外, 卵巢萎缩出现纤维化, 闭锁卵泡增多。临床上常用年龄、AMH、FSH、E<sub>2</sub>及窦状卵泡数来评价卵巢的储备功能<sup>[9]</sup>。

现在治疗女性卵巢衰老的方法主要有激素替代治疗及近几年新兴的间充质干细胞移植治疗。若采用激素替代治疗, 应短期内使用低剂量, 因为长期的激素替代治疗会引起子宫内膜癌、乳腺癌、动脉疾病、卒中、高脂血症及高血压等并发症<sup>[10-12]</sup>。虽然在小鼠上的研究显示, 间充质干细胞的确可适当改善卵巢环境, 但由于“肺部首过效应”, 绝大部分干细胞滞留于肺部

中, 只有极少部分干细胞可到达卵巢<sup>[13-14]</sup>, 而且干细胞移植存在免疫排斥反应的风险。

## 2 非人灵长类实验动物作为卵巢衰老研究模式动物的优势

目前, 卵巢衰老的研究中使用最多的非人灵长类实验动物为猕猴属的普通猕猴(也称恒河猴, rhesus macaque, 拉丁学名为 *Macaca mulatta*) 及食蟹猴 (cynomolgus macaque, 拉丁学名为 *Macaca fascicularis*)<sup>[15-16]</sup>。猕猴地理分布很广, 从阿富汗和印度横跨亚洲到达太平洋的中国海岸。作为一种旧大陆猴, 该物种与人类亲缘关系密切, 其最后的共同祖先来自大约2 500万年前<sup>[17-18]</sup>。由于伦理问题, 许多研究无法直接在人类身上开展, 因此迫切需要合适的动物模型。研究表明<sup>[19]</sup>, 非人灵长类实验动物与人类在DNA序列上的相似性高达98.77%, 在生理、解剖、免疫及神经学方面也均有许多相似之处, 因此在众多研究领域具有无可替代的作用, 是医学研究实验中的绝佳模式动物。

在艾滋病、结核病、流感和肝炎等人类传染病的研究中<sup>[20-21]</sup>, 非人灵长类实验动物对于与人类病原体相关的传染性病原体(包括猿免疫缺陷病毒和流感)的反应, 使其成为疫苗开发的首选模型<sup>[18]</sup>。因它们与人类极为相似, 非人灵长类实验动物的平均寿命比大多数其他同等体型的哺乳动物的平均寿命高出近4倍。它们还表现出自然发生(即不需要基因操作)与年龄相关的疾病, 这些疾病在个体生命中自然出现, 其发展过程与人类的情况非常相似<sup>[22]</sup>。对机体衰老的研究集中于心血管疾病、肺部、肌肉骨骼、代谢等方面<sup>[23-24]</sup>。

许多非人灵长类物种, 尤其是猕猴的生殖生物学, 与人类极为相似。例如, 猕猴的月经生殖周期在繁殖季时每月固定一次, 平均为24~31 d<sup>[25-26]</sup>。这些周期在许多方面与人类的月经周期相似, 包括激素分泌模式、子宫组织变化、卵泡发育、月经周期中期的排卵和月经来潮<sup>[27]</sup>。此外, 猕猴的衰老速度约为人类的3倍, 青春期在2.5~4.5岁, 围绝经期约为26岁, 中位寿命为27岁, 最长寿命约为40岁<sup>[28]</sup>。因此, 使用非人灵长类实验动物作为卵巢生殖衰老研究的模式动物可避免人类伦理学上的问题, 同时可以更好地模拟出人类生殖上的衰老表征进程及变化。

## 3 非人灵长类实验动物用于卵巢衰老研究的相关进展

### 3.1 生殖内分泌水平的变化

#### 3.1.1 促性腺激素

促性腺激素(gonadotropic hormone, GnH)包括LH和FSH, 两者都是由腺垂体嗜碱性细胞分泌的一种由 $\alpha$ 和 $\beta$ 亚基组成的糖蛋白激素, 参与调控卵巢中卵泡发育以及类固醇激素(性激素)的合成与分泌<sup>[29]</sup>。排卵期GnH分泌量的激增是由雌激素反馈作用诱导产生的。FSH的主要功能是促进卵泡发育, 而LH能促使优势卵泡的排出。此外, LH还能与FSH共同促进未受精的优势卵泡发育为黄体, 并使其释放孕激素。

Matteri等<sup>[30]</sup>在1992年报告了成年雌性猕猴月经周期的增生期和黄体期FSH、LH激素的波动范围值, 并发现在月经周期第8~10天分泌具有生物活性的FSH, 也是卵泡生长发育的关键时期; Hillier等<sup>[31]</sup>以普通猕猴为研究对象, 通过实验证实了颗粒细胞对FSH和LH的反应性增加与卵泡成熟度有关, 而FSH能直接诱导GnH反应性卵泡发育的相关变化, 凸显了普通猕猴作为实验动物模型在研究与人类相关排卵前卵泡发育机制方面的应用价值; Shideler等<sup>[32]</sup>通过分析老年雌性猕猴的全年数据, 发现与年龄有关的月经周期异常发生后, 雌性猕猴尿液中FSH $\beta$ 亚基的基线水平显著增高。

#### 3.1.2 性腺激素

性腺激素主要包括雌激素、孕激素(孕酮)、雄激素(睾酮)等类固醇激素(甾体激素)。雌激素和雄激素对生殖系统的调控作用会贯穿整个青春期, 在成年期达到分泌高峰<sup>[33]</sup>。卵巢不仅能分泌雌激素和孕酮, 也少量分泌睾酮。其中, 雌激素有两个分泌高峰, 第一个高峰出现在排卵期, 由优势卵泡分泌雌激素; 第二个高峰由黄体细胞分泌, 此次高峰的雌激素值低于第一个高峰。雌激素主要由成熟卵泡的内膜细胞和黄体细胞产生。天然雌激素包括雌酮、 $E_2$ 和雌三醇等, 其中 $E_2$ 活性最强。通常情况下, 正常女性体内主要分泌 $E_2$ , 而多囊卵巢综合征患者体内主要分泌雌酮。孕酮(progesterone,  $P_4$ )由卵巢的黄体细胞分泌, 在月经周期中, 若检测出 $P_4$ 的分泌高峰, 即证明此月经周期已排卵; 如未受孕, 黄体则会萎缩凋亡,  $P_4$ 分泌减少。而孕早期的黄体与月经周期中的黄体在形态和功能上均不同, 孕期 $P_4$ 分泌量持续增加, 在人类妊娠第

11 或 12 周, 其分泌量仍保持较高的水平<sup>[27]</sup>。研究表明, 非人灵长类实验动物小窦状卵泡内的卵母细胞核成熟与  $E_2$ 、 $P_4$  和 AMH 水平下降有关<sup>[34]</sup>。

女性在中年时卵巢功能衰退, 卵巢类固醇分泌停止, 绝经后抑郁症和注意力缺失症的发病率也随之增加。有研究通过利用猕猴围绝经期手术模型, 采用短期或长期  $E_2$  或  $E_2+P_4$  替代疗法, 发现卵巢类固醇激素尤其是  $E_2$  对血清素神经元的功能和健康至关重要, 而在绝经后妇女中, 因  $E_2$  缺乏而促进血清素神经元向凋亡方向恶化, 导致注意力缺失症<sup>[35]</sup>。

一项研究通过对卵巢切除的松鼠猴和猕猴进行不同时间长度 (0、2、4、7、14 d) 的  $E_2$  治疗发现, 2 d 的治疗已可引起足够的雌激素效应, 雌激素受体 (estrogen receptor, ER) 和孕激素受体 (progesterone receptor, PR) 与药物莫西孕酮和普美孕酮的结合活性也达到最大值; 松鼠猴子宫组织中 ER 和 PR 的表达水平分别约为猕猴的三分之一和八分之一, 但受体亲和力相似, 而且松鼠猴中  $E_2$  和  $P_4$  浓度的增加可以弥补其 ER 和 PR 表达量的减少<sup>[36]</sup>。Kohama 等<sup>[37]</sup> 通过观察手术诱导绝经后不久的老年猕猴的体内激素与认知水平, 以探究体内激素替代对记忆和注意力的影响, 最终得出: 在卵巢激素丧失后不久, 长期服用雌激素对改善认知功能有益处。

### 3.1.3 抗米勒管激素

AMH 主要表达于次级、窦状卵泡的颗粒细胞中, 在闭锁卵泡中不表达, 因此, AMH 是准确反映卵巢储备功能情况的内分泌学指标。AMH 能保障发育卵泡的质量, 并防止卵泡过快过早地消耗, 保持卵巢的储备功能。有研究提示, 在雌性猕猴的青春前期, AMH 对卵泡生长起正反馈作用, 但对窦状卵泡的成熟则有负反馈作用<sup>[38]</sup>; 一项研究通过对 219 只猕猴及 529 只食蟹猴进行血清 AMH 检测, 结果显示, 食蟹猴的平均 AMH 水平均高于猕猴, 猕猴及食蟹猴的血清 AMH 水平在幼年期、成年期和老年期呈动态变化, 但在月经周期的不同阶段以及体重指数对 AMH 水平没有明显影响<sup>[39]</sup>; 为探究非人灵长类实验动物围绝经期的早期生物标志物, Downs 等<sup>[40]</sup> 检测老年雌性猕猴从绝经前到围绝经期和绝经过渡期猴体内生殖激素水平的变化, 发现与年龄有关的 FSH、LH、抑制素 B 和 AMH 分泌量的变化可能是向围绝经期过渡的第一个内分泌表现。

## 3.2 卵巢结构与功能的变化

卵巢衰老在结构与功能上主要表现为卵巢体积萎

缩、纤维化、卵泡数量减少、生长卵泡和黄体减少、闭锁卵泡增多。卵泡的逐渐减少导致卵巢功能日益衰退从而进入围绝经期直至绝经。卵泡的发育成熟是一个由卵巢内和卵巢外事件相互关联的复杂过程, 最终导致成熟卵母细胞排卵、破裂卵泡转化为黄体。原始卵泡由处于减数分裂二分裂阶段的未成熟卵母细胞组成, 周围有一层相对未分化的颗粒细胞。卵母细胞保持未成熟状态的原因很多, 其中之一是颗粒细胞分泌的卵母细胞成熟抑制剂 (oocyte maturation inhibitor)<sup>[41]</sup>。卵泡颗粒细胞可能会通过分泌卵泡抑制素 (follistatin) 来抑制垂体中 FSH 的生成, 从而间接抑制卵泡的发育成熟。虽然颗粒细胞上存在大量 LH 受体, 但卵泡液中的雌激素和黄体生成抑制因子 (luteinizing inhibitor) 等因素会阻止这些颗粒细胞过早地生成黄体<sup>[41]</sup>。

随着排卵前 LH 分泌量的激增, 卵母细胞减数分裂得以恢复, 随之出现卵泡破裂和黄体形成。黄体主要由颗粒细胞构成, 会在一段时间内分泌较多的孕酮。在排卵前, 卵泡必须接触到足够水平的 LH 和 FSH 并产生相应的反应, 黄体才能分泌高浓度的孕酮, 以维持其正常的生命周期<sup>[41]</sup>。有研究发现<sup>[42]</sup>, 幼年期与青年期猕猴的卵巢脏器指数、卵巢细胞凋亡率均不存在显著性差异, 但二者与老年期猕猴均存在显著性差异; 而且随着年龄增长, 猕猴卵巢组织中的卵泡数量逐渐减少, 间质则排列散乱, 髓质被大量卵巢组织包括纤维结缔组织和血管所填充。另有研究显示<sup>[43]</sup>, 在 1.5 岁日本猕猴的卵巢组织中可观察到发育中的三级卵泡, 而从老年猕猴卵巢组织中获得的未成熟卵母细胞, 经体外诱导卵母细胞成熟和受精后, 也能获得胚胎<sup>[44]</sup>。

Nichols 等<sup>[45]</sup> 将 1~25 岁的雌性猕猴分为 5 个不同年龄组后发现, 卵巢中原始卵泡和初级卵泡的比例在不同年龄组间均有显著差异, 接近或正处于绝经过渡期 (20~25 岁) 的样本显示出卵巢衰老的迹象, 卵泡稀疏, 排列分散且闭锁, 原始卵泡数量较少, 基质组织减少; Lu 等<sup>[46]</sup> 应用时空转录组学技术检测并比较了年轻与衰老的非人灵长类实验动物卵巢后发现, 炎症反应、衰老相关分泌表型、衰老和纤维化可能是促进卵巢衰老的主要因素; 一项基于猕猴卵巢衰老模型的研究证实, 高活性间充质干细胞疗法可通过多种细胞和分子机制改善卵巢的组织结构和分泌功能, 从而抵抗卵巢衰老<sup>[47]</sup>。此外, 通过向老年猕猴体内注射骨髓间充质干细胞, 也能增加卵巢体积, 增强性激素的

调节能力,减轻肺纤维化程度,抑制细胞凋亡,增加血管密度,促进卵泡再生,从而逆转卵巢颗粒细胞老化进程<sup>[48-49]</sup>。上述研究表明,猕猴的卵巢储备耗竭情况与人类极为相似,提示非人灵长类实验动物可作为研究人类卵巢衰老模型的理想动物模型。

### 3.3 卵巢衰老的其他生理变化

在人类卵巢衰老的过程中,因卵泡耗损会导致小窦状卵泡的颗粒细胞减少,进而导致抑制素B浓度下降<sup>[7,50]</sup>,在B超下还可见卵巢窦状卵泡数目减少、卵巢体积减小,以及间质血流减小等症状<sup>[51]</sup>,而这些变化在非人灵长类实验动物上还未有报道。此外,月经周期或动情周期紊乱的出现可能是卵巢储备功能减退的第一个信号。值得注意的是,人类女性的月经周期并没有明显的季节性,而实验室猕猴在半自然的户外条件下会表现出一年一度的非繁殖季节。暴露在自然环境下的猕猴会在秋冬季节提前受孕,若没受孕则会持续几个排卵周期,而在非繁殖季节时无排卵和黄体期缩短的情况增多。雌性猕猴生殖具有季节性,这与体内激素、气候水平等有关;在3~9月的非繁殖季节,猕猴的月经周期不规则且长,甚至可能出现闭经,子宫内膜较薄,子宫内膜线清晰可见;而在10月至来年2月的生殖季节,猕猴月经周期则相对稳定且短,子宫内膜在月经周期中出现分泌、增生等周期性变化<sup>[52]</sup>。Wang等<sup>[53]</sup>通过检测分析年轻和老年的非人灵长类实验动物卵巢单细胞转录组图谱,发现7种具有不同基因表达特征的卵巢细胞类型;进一步分析这些细胞类型特异性衰老相关转录组学变化后发现,早期卵母细胞和颗粒细胞的特异性抗氧化信号转导受到干扰,这表明氧化损伤可能是卵巢功能随年龄衰退的关键因素。

## 4 存在的问题及展望

现代人类在寿命延长的同时,生育年龄却没有随之相应改变,女性的生殖能力衰退是不可避免的,女性的自然绝经年龄及可生育年龄范围较之从前并无变化。随着社会压力的增加,许多女性想生育,却已错过最佳适育年龄,卵巢早衰也呈年轻化趋势且发病率逐渐上升。在中国,随着“三孩”优生政策的推出,卵巢衰老所引发的生育问题愈加严重。此外,卵巢衰老还会带来骨密度降低、泌尿系统疾病、心血管疾病等并发症,这大大降低了围绝经期女性的生活质

量。因此,将重点放在缓解女性生殖衰老,以保持生育能力和维护与年龄相关的激素分泌功能,进行相关生物医学研究显得极为重要。

非人灵长类实验动物作为人类的近亲,可以再现人类的衰老过程和老年相关疾病的发展情况,因此其在传染病、生殖医学、衰老相关的疾病等方面被广泛应用于动物模型,可以避免在人类上进行研究的伦理学问题,并且在非人灵长类实验动物上的研究成果也更易转化应用到人类医学上;另一方面,因生物大分子的发展迅猛、试剂抗体的研发等,实验猴供不应求,这使得在非人灵长类实验动物上的研究越来越重要,其地位已作为国家战略资源受到高度重视。

2020年,中国实验灵长类养殖开发协会对国内26家会员单位的调查显示:国内实验食蟹猴总存栏数超过18万只,其中繁殖母猴不到4万只,占比仅21.7%。此外,目前人类人口在非人灵长类实验动物分布的地区不断扩大、气候变化等因素,直接或间接地削弱了非人灵长类实验动物栖息地和降低生物多样性<sup>[54]</sup>。在生产繁育方面,较之啮齿类等其他实验动物,非人灵长类实验动物还存在繁殖周期及哺育时间长、繁殖次数少、胎仔数少等客观事实,因此提高非人灵长类实验动物的繁殖性能、增加新生非人灵长类实验动物的数量尤为重要。总之,研究非人灵长类实验动物的卵巢衰老问题,在改善非人灵长类实验动物的繁育能力的同时,对人类医学研究方面的进步也具有重要的参考借鉴与指导意义。

目前,在非人灵长类实验动物卵巢衰老上的研究也存在以下问题:(1)因伦理限制和非人灵长类实验动物资源的相对缺失,国外在非人灵长类实验动物上卵巢衰老的研究在20世纪60~90年代较为集中,且多为对月经周期中的激素分泌波动变化的探究。国内外在非人灵长类实验动物的生殖方面的研究多见于辅助生殖,尤其是子宫内膜功能方面的研究,包括检查猕猴的妊娠状况<sup>[55-57]</sup>、监测卵泡的发育情况<sup>[58-59]</sup>,以及根据检测到的激素水平、卵泡发育情况等,对动物个体进行输精等操作。(2)目前在卵巢研究中以病理学研究居多,包括卵巢早衰、多囊卵巢综合征等,且多在小鼠、大鼠等啮齿类动物上进行<sup>[60-61]</sup>,而对于卵巢自然生理性衰老的研究则相对较少。之后可在非人灵长类实验动物上建立相关卵巢自然衰老的评价指标,从而为开展卵巢衰老的相关研究提供参考指标及评判标准,有助于改善非人灵长类实验动物的卵巢衰老状

况, 提高其繁殖性能。中国应充分发挥非人灵长类实验动物资源方面现有的独特优势, 持续推进卵巢衰老相关研究。

间充质干细胞具有很大的应用前景, 但如何提高注入体内细胞的注射效率, 并且降低机体自身的免疫排斥反应, 从而改善卵巢衰老带来的一系列生殖问题, 相信该问题的解决对于缓解卵巢衰老及带来的生育问题非常重要。人类卵巢极难获取, 随着生物信息学的兴起, 可通过获取年轻生殖力旺盛与年老处于围绝经期的非人灵长类实验动物卵巢组织, 筛选出差异表达基因, 比较二者卵巢在表达上的差异和涉及的相关代谢通路, 从而开展相关分子机制的研究。也可通过基因编辑技术, 在相应实验动物上对卵巢衰老相关的差异表达基因进行修饰, 并进行探究及验证。通过将新型的生物技术与动物实验相结合, 为开展人类卵巢衰老的研究及治疗提供更为可靠的动物模型及指导依据, 从而缓解现有的社会生育压力问题。

#### [作者贡献 Author Contribution]

肖文娟负责查阅文献, 并撰写稿件;  
吕龙宝负责综述框架构思及文章修改。

#### [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]

- HANSEN K R, KNOWLTON N S, THYER A C, et al. A new model of reproductive aging: the decline in ovarian non-growing follicle number from birth to menopause[J]. *Hum Reprod*, 2008, 23(3):699-708. DOI: 10.1093/humrep/dem408.
- DE BRUIN J P, BOVENHUIS H, VAN NOORD P A, et al. The role of genetic factors in age at natural menopause[J]. *Hum Reprod*, 2001, 16(9):2014-2018. DOI:10.1093/humrep/16.9.2014.
- GOLD E B. The timing of the age at which natural menopause occurs[J]. *Obstet Gynecol Clin North Am*, 2011, 38(3):425-440. DOI: 10.1016/j.ogc.2011.05.002.
- TAKAHASHI T A, JOHNSON K M. Menopause[J]. *Med Clin North Am*, 2015, 99(3):521-534. DOI:10.1016/j.mcna.2015.01.006.
- NELSON H D. Menopause[J]. *Lancet*, 2008, 371(9614):760-770. DOI:10.1016/S0140-6736(08)60346-3.
- WISE P M, KRAJNAK K M, KASHON M L. Menopause: the aging of multiple pacemakers[J]. *Science*, 1996, 273(5271): 67-70. DOI:10.1126/science.273.5271.67.
- WELT C K, SCHNEYER A L. Differential regulation of inhibin B and inhibin a by follicle-stimulating hormone and local growth factors in human granulosa cells from small antral follicles[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2001, 86(1):330-336. DOI: 10.1210/jcem.86.1.7107.
- HALL J E. Neuroendocrine changes with reproductive aging in women[J]. *Semin Reprod Med*, 2007, 25(5):344-351. DOI: 10.1055/s-2007-984740.
- 邓成艳, 孙爱军, 杨欣, 等. 女性性激素临床应用与病例解读[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2021. Deng C Y, SUN A J, YAN X, et al. *Clinical application of female sex hormones and case interpretation*[M]. Beijing: China Medical Science and Technology Press, 2021.
- GAMBRELL R D Jr. The menopause: benefits and risks of estrogen-progestogen replacement therapy[J]. *Fertil Steril*, 1982, 37(4):457-474. DOI:10.1016/s0015-0282(16)46149-2.
- JUDD H L, MELDRUM D R, DEFTOS L J, et al. Estrogen replacement therapy: indications and complications[J]. *Ann Intern Med*, 1983, 98(2): 195-205. DOI: 10.7326/0003-4819-98-2-195.
- ASHLEY HILL D, CRIDER M, HILL S R. Hormone therapy and other treatments for symptoms of menopause[J]. *Am Fam Physician*, 2016, 94(11):884-889.
- NYSTEDT J, ANDERSON H, TIKKANEN J, et al. Cell surface structures influence lung clearance rate of systemically infused mesenchymal stromal cells[J]. *Stem Cells*, 2013, 31(2): 317-326. DOI:10.1002/stem.1271.
- FISCHER U M, HARTING M T, JIMENEZ F, et al. Pulmonary passage is a major obstacle for intravenous stem cell delivery: the pulmonary first-pass effect[J]. *Stem Cells Dev*, 2009, 18(5):683-692. DOI:10.1089/scd.2008.0253.
- LANKAU E W, TURNER P V, MULLAN R J, et al. Use of nonhuman Primates in research in North America[J]. *J Am Assoc Lab Anim Sci*, 2014, 53(3):278-282.
- DIDIER E S, MACLEAN A G, MOHAN M, et al. Contributions of nonhuman Primates to research on aging[J]. *Vet Pathol*, 2016, 53(2):277-290. DOI:10.1177/0300985815622974.
- KUMAR S, HEDGES S B. A molecular timescale for vertebrate evolution[J]. *Nature*, 1998, 392(6679): 917-920. DOI: 10.1038/31927.
- GIBBS R A, ROGERS J, KATZE M, et al. Evolutionary and biomedical insights from the rhesus macaque genome[J]. *Science*, 2009, 316:222-234. DOI:10.1126/SCIENCE.1139247.
- FUJIYAMA A, WATANABE H, TOYODA A, et al. Construction and analysis of a human-chimpanzee comparative clone map [J]. *Science*, 2002, 295(5552): 131-134. DOI: 10.1126/science.1065199.
- ZHANG X L, PANG W, HU X T, et al. Experimental Primates and non-human primate (NHP) models of human diseases in China: current status and progress[J]. *Dongwuxue Yanjiu*, 2014, 35(6):447-464. DOI: 10.13918/j.issn.2095-8137.2014.6.447.
- 雷爱华, 庞伟, 张高红, 等. 平顶猴在 HIV/AIDS 动物模型中的应用及研究进展[J]. *动物学研究*, 2013, 34(2):77-88. DOI: 10.3724/SP.J.1141.2013.02077. LEI A H, PANG W, ZHANG G H, et al. Use and research of pigtailed macaques in nonhuman primate HIV/AIDS models [J]. *Zool Res*, 2013, 34(2): 77-88. DOI: 10.3724/SP. J. 1141.2013. 02077.
- COLMAN R J. Non-human Primates as a model for aging[J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2018, 1864(9 Pt A):2733-2741. DOI: 10.1016/j.bbdis.2017.07.008.

- [23] SIMMONS H A. Age-associated pathology in rhesus macaques (*Macaca mulatta*) [J]. Vet Pathol, 2016, 53(2):399-416. DOI:10.1177/0300985815620628.
- [24] UNO H. Age-related pathology and biosenescent markers in captive rhesus macaques[J]. AGE, 1997, 20(1): 1-13. DOI: 10.1007/s11357-997-0001-5.
- [25] WALKER M L. Menopause in female rhesus monkeys[J]. Am J Primatol, 1995, 35(1):59-71. DOI:10.1002/ajp.1350350106.
- [26] GILARDI K V, SHIDELER S E, VALVERDE C R, et al. Characterization of the onset of menopause in the rhesus macaque[J]. Biol Reprod, 1997, 57(2): 335-340. DOI: 10.1095/biolreprod57.2.335.
- [27] LANE M A. Nonhuman primate models in biogerontology[J]. Exp Gerontol, 2000, 35(5):533-541. DOI:10.1016/s0531-5565(00)00102-9.
- [28] COLMAN R J, ANDERSON R M, JOHNSON S C, et al. Caloric restriction delays disease onset and mortality in rhesus monkeys[J]. Science, 2009, 325(5937): 201-204. DOI: 10.1126/science.1173635.
- [29] RYLE M. Gonadotropins and ovarian function[J]. Acta Eur Fertil, 1973, 4(3):113-122.
- [30] MATTERI R L, BRIDSON W E, DIERSCHKE D J, et al. The secretion of bioactive and immunoreactive follicle-stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone (LH) throughout the menstrual cycle of the rhesus monkey (*Macaca mulatta*) [J]. Am J Primatol, 1992, 26(4):243-257. DOI: 10.1002/ajp.1350260403.
- [31] HILLIER S G, HARLOW C R, SHAW H J, et al. Cellular aspects of pre-ovulatory folliculogenesis in primate ovaries[J]. Hum Reprod, 1988, 3(4): 507-511. DOI: 10.1093/oxfordjournals.humrep.a136736.
- [32] SHIDELER S E, GEE N A, CHEN J, et al. Estrogen and progesterone metabolites and follicle-stimulating hormone in the aged macaque female[J]. BiolReprod, 2001, 65(6):1718-1725. DOI:10.1095/biolreprod65.6.1718.
- [33] LUINE V N. Estradiol and cognitive function: past, present and future[J]. Horm Behav, 2014, 66(4):602-618. DOI: 10.1016/j.yhbeh.2014.08.011.
- [34] PELUFFO M C, HENNEBOLD J D, STOUFFER R L, et al. Oocyte maturation and in vitro hormone production in small antral follicles (SAFs) isolated from rhesus monkeys[J]. J Assist Reprod Genet, 2013, 30(3):353-359. DOI:10.1007/s10815-013-9937-9.
- [35] BETHEA C L, REDDY A P, CHRISTIAN F L. How studies of the serotonin system in macaque models of menopause relate to Alzheimer's Disease1[J]. J Alzheimers Dis, 2017, 57(4):1001-1015. DOI:10.3233/JAD-160601.
- [36] CHROUSOS G P, BRANDON D, RENQUIST D M, et al. Uterine estrogen and progesterone receptors in an estrogen-and progesterone-"resistant"primate[J]. J Clin Endocrinol Metab, 1984, 58(3):516-520. DOI:10.1210/jcem-58-3-516.
- [37] KOHAMA S G, RENNER L, LANDAUER N, et al. Effect of ovarian hormone therapy on cognition in the aged female rhesus macaque[J]. J Neurosci, 2016, 36(40):10416-10424. DOI: 10.1523/jneurosci.0909-16.2016.
- [38] XU J, BISHOP C V, LAWSON M S, et al. Anti-Müllerian hormone promotes pre-antral follicle growth, but inhibits antral follicle maturation and dominant follicle selection in primates[J]. Hum Reprod, 2016, 31(7):1522-1530. DOI:10.1093/humrep/dew100.
- [39] LONG H, WANG Y, WANG L, et al. Age-related nomograms of serum anti-Müllerian hormone levels in female monkeys: Comparison of rhesus(*Macaca mulatta*) and Cynomolgus (*Macaca fascicularis*) monkeys[J]. Gen Comp Endocrinol, 2018, 269:171-176. DOI:10.1016/j.ygcen.2018.09.012.
- [40] DOWNS J L, URBANSKI H F. Neuroendocrine changes in the aging reproductive axis of female rhesus macaques (*Macaca mulatta*) [J]. Biol Reprod, 2006, 75(4): 539-546. DOI: 10.1095/biolreprod.106.051839.
- [41] CHANNING C P, SCHAEFER F W, ANDERSON L D, et al. Ovarian follicular and luteal physiology[J]. Int Rev Physiol, 1980, 22:117-201.
- [42] 田川, 杨再玲, 朱向情, 等. 猕猴从幼年到老年的卵巢组织学变化 [J]. 实验动物科学, 2020, 37(6):37-43. DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2020.06.007.
- TIAN C, YANG Z L, ZHU X Q, et al. Histological changes of ovaries in rhesus monkeys from juvenile to elderly[J]. Lab Anim Sci, 2020, 37(6):37-43. DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2020.06.007.
- [43] NOZAKI M, YAMASHITA K, SHIMIZU K. Age-related changes in ovarian morphology from birth to menopause in the Japanese monkey, *Macaca fuscata fuscata*[J]. Primates, 1997, 38:89-100. DOI:10.1007/BF02385925.
- [44] HIRAYAMA R, TAKETSURU H, NAKATSUKASA E, et al. Production of marmoset eggs and embryos from xenotransplanted ovary tissues[J]. Sci Rep, 2023, 13(1):18196. DOI:10.1038/s41598-023-45224-x.
- [45] NICHOLS S M, BAVISTER B D, BRENNER C A, et al. Ovarian senescence in the rhesus monkey (*Macaca mulatta*) [J]. Hum Reprod, 2005, 20(1):79-83. DOI:10.1093/humrep/deh576.
- [46] LU H F, JING Y, ZHANG C, et al. Aging hallmarks of the primate ovary revealed by spatiotemporal transcriptomics[J]. Protein Cell, 2024, 15(5): 364-384. DOI: 10.1093/procel/pwad063.
- [47] WANG K, YAO X, LIN S Q, et al. Cellular and molecular mechanisms of highly active mesenchymal stem cells in the treatment of senescence of rhesus monkey ovary[J]. Stem Cell Res Ther, 2024, 15(1):14. DOI:10.1186/s13287-023-03631-x.
- [48] TIAN C, HE J, AN Y Y, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells derived from juvenile macaques reversed ovarian ageing in elderly macaques[J]. Stem Cell Res Ther, 2021, 12(1): 460. DOI:10.1186/s13287-021-02486-4.
- [49] TIAN C, AN Y Y, ZHAO J, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells reversed ovarian aging-related m6A RNA methylation modification profile in aged granulosa cells[J]. Stem Cell Rev Rep, 2023, 19(4):953-967. DOI:10.1007/s12015-022-10485-y.
- [50] BROEKMANS F J, SOULES M R, FAUSER B C. Ovarian aging:

- mechanisms and clinical consequences[J]. *Endocr Rev*, 2009, 30(5):465-493. DOI:10.1210/er.2009-0006.
- [51] 罗爱月, 王世宣. 基于卵巢衰老理念管理绝经相关问题[J]. *实用妇产科杂志*, 2020,36(9):641-644.  
LUO A Y, WANG S X. Management of menopausal related problems based on the concept of ovarian aging[J]. *J Pract Obstet Gynecol*, 2020,36(9):641-644.
- [52] 杜永洪, 邹建中, 赵卫华, 等. 彩色多普勒超声在恒河猴生殖生理研究中的应用[J]. *临床超声医学杂志*, 2000,2(2): 65-67. DOI:10.3969/j.issn.1008-6978.2000.02.001.  
DU Y H, ZOU J Z, ZHAO W H, et al. Color Doppler ultrasonography in the study of macaque reproductive physiology[J]. *J Clin Ultrasavnd Med*, 2000, 2(2): 65-67, 129. DOI: 10.16245/j.cnki.issn1008-6978.2000.02.001.
- [53] WANG S, ZHENG Y X, LI J Y, et al. Single-cell transcriptomic atlas of primate ovarian aging[J]. *Cell*, 2020, 180(3): 585-600. e19. DOI:10.1016/j.cell.2020.01.009.
- [54] ESTRADA A, GARBER P A, CHAUDHARY A. Current and future trends in socio-economic, demographic and governance factors affecting global primate conservation[J]. *PeerJ*, 2020, 8:e9816. DOI:10.7717/peerj.9816.
- [55] 范春梅, 王雁玲, 李志雄, 等. 猕猴早期妊娠的B型超声测值[J]. *中国实验动物学杂志*, 2002,12(2):102-104. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7856.2002.02.012.  
FAN C M, WANG Y L, LI Z X, et al. B-mode ultrasonographic measurements in early pregnant *Rhesus monkey*[J]. *Chin J Lab Anim Sci*, 2002, 12(2): 102-104. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7856.2002.02.012.
- [56] 范春梅, 周建华, 刘雅英. 猕猴早孕模型的建立及超声学诊断[J]. *动物学杂志*, 2001,36(5):62-63. DOI: 10.13859/j.cjz.2001.05.019.  
FAN C M, ZHOU J H, LIU Y Y. Establishment of Rhesus monkey early pregnancy model and ultrasonic diagnosis[J]. *Chin J Zool*, 2001,36(5):62-63. DOI: 10.13859/j.cjz.2001.05.019.
- [57] 李志雄, 范春梅, 周建华. 实验猕猴早孕早诊断[J]. *福建畜牧兽医*, 2011,33(1):23-24. DOI: 10.3969/j.issn.1003-4331.2011.01.012.  
LI Z X, FAN C M, ZHOU J H. Early pregnancy diagnosis in Rhesus monkey[J]. *Fujian J Anim Husb Vet Med*, 2011,33(1):23-24. DOI:10.3969/j.issn.1003-4331.2011.01.012.
- [58] 唐东红, Maria Alejandra Fuentes Priego, Maria Elena Ortiz, 等. 卷尾猴的卵泡生长发育及排卵的超声监测[J]. *中国实验动物学报*, 2007,15(1):25-29. DOI: 10.3969/j.issn.1005-4847.2007.01.007.  
TANG D H, PRIEGO M, ORTIZ M, et al. Evaluation of ultrasonic monitoring follicular growth and ovulation in new world monkey *Cebus apella*[J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2007,15(1):25-29. DOI: 10.3969/j.issn.1005-4847.2007.01.007.
- [59] YANG S H, HE X C, HILDEBRANDT T B, et al. Superovulatory response to a low dose single-daily treatment of rhFSH dissolved in polyvinylpyrrolidone in rhesus monkeys[J]. *Am J Primatol*, 2007, 69(11):1278-1284. DOI:10.1002/ajp.20433.
- [60] ISOLA J V V, OCAÑAS S R, HUBBART C R, et al. A single-cell atlas of the aging mouse ovary[J]. *Nat Aging*, 2024, 4(1):145-162. DOI:10.1038/s43587-023-00552-5.
- [61] CRUZ G, FERNANDOIS D, PAREDES A H. Ovarian function and reproductive senescence in the rat: role of ovarian sympathetic innervation[J]. *Reproduction*, 2017, 153(2): R59-R68. DOI:10.1530/REP-16-0117.

(收稿日期:2024-08-02 修回日期:2024-12-04)

(本文责任编辑:丁宇菁)

#### 【引用本文】

肖文娟, 吕龙宝. 非人灵长类实验动物用于人类卵巢衰老研究进展[J]. *实验动物与比较医学*, 2025, 45(1): 47-54. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.114.

XIAO W X, LÜ L B. Research progress on human ovarian aging using non-human primates as laboratory animals[J]. *Lab Anim Comp Med*, 2025, 45(1): 47-54. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.114.

\*\*\*\*\*

## 《实验动物与比较医学》成功被 Scopus 数据库收录

2025年1月,本刊编辑部收到Scopus评审委员会的邮件通知:由上海市实验动物学会与上海实验动物研究中心联合主办的《实验动物与比较医学》(ISSN 1674-5817; CN 31-1954/Q)已通过Scopus Content Selection & Advisory Board (CSAB)的严格审查,被国际著名数据库Scopus正式收录!本刊近年来发表的文章摘要都将陆续收录在Scopus数据库,并有望于2025年获得第一个CiteScore(国际期刊评价数据)。

Scopus是由荷兰爱思唯尔(Elsevier)公司于2004年创立的全球文献摘要与引文数据库,涵盖了科学、技术、医学、社会、艺术和人文等学术领域。Scopus评审委员会通过严格的遴选标准(主要包括期刊政策、内容质量、学术影响即被引频次和编委声誉、定期出版、线上可及性),确保只收录高质量的期刊和文献。本次遴选评价过程中,CSAB对本刊的动物福利伦理及透明出版政策给予了高度肯定。

Scopus数据库收录是《实验动物与比较医学》期刊质量提升及国际化进程中的一个重要里程碑,标志着本刊的学术水平和影响力已获得了国际学术界和出版界的一定认可,未来本刊的国际传播度和认可度将得到进一步提升。在此,我们向一直以来关心并支持《实验动物与比较医学》期刊发展的各位领导、编委、审稿人、作者、读者和同仁朋友们,致以最衷心的感谢!

《实验动物与比较医学》编辑部

# 疝疾病动物模型研究及新型疝修补材料应用进展

费彬<sup>1</sup>, 郭文科<sup>2</sup>, 郭建平<sup>2</sup>

(1. 山西医科大学汾阳学院, 汾阳 032200; 2. 山西医科大学附属汾阳医院, 汾阳 032200)

**[摘要]** 疝是普外科常见病和多发病, 指体内器官整体或一部分离开正常的解剖位置, 通过先天或后天形成的薄弱点、缺损或空隙进入其他部位。疝的发生机制复杂, 与腹壁薄弱或腹腔内压增高等多种因素有关, 临床表现多样, 因类型、部位和严重程度的不同而有所差异。随着老龄化社会进程不断加剧, 疝的发病率呈逐年上升趋势。动物模型作为研究疝疾病的重要手段, 一方面能够检验新修补材料和新技术的安全性和有效性; 另一方面有助于临床医师探索新的手术方式, 并对某些疝疾病及其并发症的发生机制和新疗法展开研究。由于不同类型的疝疾病在病理生理机制上存在显著差异, 其动物模型的建立方法和评价标准也呈现出明显的多样性。此外, 动物模型的建立方法与实验目的密切相关, 不同的实验目的对动物模型的要求各不相同。因此, 根据不同的实验目的精准选择动物模型的建立方法, 是确保研究顺利开展并取得可靠成果的关键。为此, 本文综述了建立腹外疝(包括腹壁切口疝、腹股沟疝、脐疝、造口旁疝、嵌顿疝及盆底疝)、先天性膈疝、食管裂孔疝及脑疝动物模型的有效方法, 详细分析了这些模型的优缺点及相关的评价标准; 同时, 总结了一些新型疝修补材料在临床前疝疾病动物模型研究中的应用, 以期对疝疾病相关研究及治疗提供有价值的参考。

**[关键词]** 疝; 动物模型; 修补材料; 研究进展

**[中图分类号]** Q95-33; R-332 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2025)01-0055-12



## Research Progress on Animal Models for Hernia Diseases and New Hernia Repair Materials

FEI Bin<sup>1</sup>, GUO Wenke<sup>2</sup>, GUO Jianping<sup>2</sup>

(1. Fenyang College, Shanxi Medical University, Fenyang 032200, China; 2. Fenyang Hospital Affiliated to Shanxi Medical University, Fenyang 032200, China)

Correspondence to: GUO Jianping (ORCID: 0009-0005-2655-7127), E-mail: gjphr@126.com

**[ABSTRACT]** Hernia is a common and frequently occurring condition in general surgery, referring to the displacement of an organ or part of an organ from its normal anatomical position through a congenital or acquired weak point, defect, or space into another area. Its pathogenesis is complex, involving multiple factors such as abdominal wall weakness or increased intra-abdominal pressure. The clinical manifestations of hernia vary depending on its type, location, and severity. As the aging of the population continues to advance, the incidence of hernia has been increasing annually. Animal models serve as an important tool in hernia research. They enable the evaluation of the safety and efficacy of new repair materials and techniques, as well as assisting clinicians in developing new surgical methods and investigating the mechanisms and novel therapies for certain hernia diseases and their complications. Given the significant differences in the pathophysiological mechanisms of different types of hernia diseases, the methods and evaluation criteria for establishing animal models are highly diverse. Furthermore, the methods for establishing animal models are closely related to experimental objectives, and different experimental goals require different animal models. Therefore, selecting appropriate animal models based on experimental objectives is crucial for ensuring the smooth progress of research and obtaining reliable results. To this end, this review summarizes effective methods for establishing animal

**[基金项目]** 山西省教育厅高校科技创新项目“铜绿假单胞菌注射液对腹腔镜疝修补术后血清肿治疗的探索”(2022L177)

**[第一作者]** 费彬(1999—),男,硕士研究生,研究方向:胃肠、疝外科疾病的诊疗。E-mail: feibin2022@163.com。ORCID:0009-0007-9428-4890

**[通信作者]** 郭建平(1964—),男,本科,主任医师,研究方向:胃肠、疝外科疾病的诊疗。E-mail: gjphr@126.com。ORCID:0009-0005-2655-7127

models for external abdominal hernias (including incisional hernia, inguinal hernia, umbilical hernia, parastomal hernia, incarcerated hernia, and pelvic floor hernia), congenital diaphragmatic hernia, hiatal hernia, and cerebral hernia. It provides a detailed analysis of the advantages, disadvantages, and evaluation criteria of these models. Additionally, this review summarizes recent preclinical applications of new hernia repair materials, aiming to provide references for animal experimental research in the field of hernia studies.

**[Key words] Hernia; Animal model; Repair material; Research progress**

疝是指组织或器官的一部分因组织薄弱、缺损或异常的腔内压力升高，而离开正常的解剖位置，并向组织薄弱、缺损处突出而形成的结构，俗称疝气。临床中常见的腹外疝包括腹股沟疝、切口疝、脐疝、造口旁疝及嵌顿疝等，其他疝还有先天性膈疝、食管裂孔疝、脑疝和脊髓疝等。随着现代外科的发展，疝修补手术已从传统张力修补发展到目前广泛开展的开放无张力修补术和腹腔镜疝修补术，甚至出现了机器人手术系统的运用。此外，材料科学的不断创新和发展，能够帮助临床医师进行更加精简的手术，以提炼出更加安全可靠的手术方式<sup>[1]</sup>。在修补材料和技术不断创新的过程中，动物实验发挥了不可替代的作用。新型手术方式和修补材料需要基于大量动物实验才能进入临床使用，而一个良好的动物模型是实验成功的关键因素。本综述通过总结各种疝疾病相关动物模型的建立方法、优缺点，以及一些新型疝修补材料的临床前应用情况，归纳了建立稳定疝模型的有效方法，以期为疝疾病的动物实验研究提供参考。

## 1 腹外疝动物模型

腹外疝 (external abdominal hernia) 是临床上一种常见外科疾病，主要指腹腔内脏器或组织通过腹壁薄弱点或缺损处向外突出，形成可见或可触及的肿块。常见的腹外疝包括切口疝、腹股沟疝、脐疝、造口旁疝及嵌顿疝等。腹外疝动物模型是研究腹外疝发病机制、治疗方法和新型修补技术的重要工具，为临床转化提供了关键支持。每种腹外疝发生发展过程不同，其动物模型构建方法亦不同，现总结如下。

### 1.1 腹壁切口疝动物模型

切口疝 (incisional hernia) 是由于切口表面的皮肤虽愈合，但切口部位的肌肉或筋膜未愈合或仅部分愈合，导致组织或内脏从切口膨出，从而继发的一系列病理生理学变化。切口疝的发生，一方面与患者的自身因素有关，如年龄、体重、吸烟与否、营养状况及基础疾病等；另一方面，外科医师对各种手术细节的

把控也起到至关重要的作用，如切口的选择、术中对切口的保护及切口的缝合关闭技术等<sup>[2]</sup>。

腹部手术后切口疝发生率高达 12.7%~23%，因此，在腹壁疝动物模型中以腹壁切口疝为主<sup>[3]</sup>。为了更好地模拟实际临床，此动物模型均为手术诱发模型。造模层次和方法大致可分为 3 种：腹膜前全层肌肉切开但不切除肌肉组织 (方法 1)；切除部分肌层，即去除腹膜前部分腹直肌层，缺损面积较大的也会去除部分腹外斜肌和腹内斜肌 (方法 2)；腹膜前全层肌肉缺损或全层腹壁切除 (含腹膜) (方法 3)。目前，尚无评价腹壁切口疝模型的统一标准，但一般应满足以下几点：形成明显包块；无死亡或体重改变；无自愈倾向。此外，腹壁缺损大小，目前也无统一标准，不同学者对此有不同的理解，或根据实验目的而定标准。目前，该模型常用的实验动物有猪、兔和鼠等，相关总结如表 1 所示。

#### 1.1.1 猪模型

猪具有体型大，在腹壁厚度、强度和组织构成方面与人类腹壁比较接近等优势，常被用作腹壁疝修补术的临床前模型<sup>[3]</sup>。但也存在成本高，手术及麻醉操作难度大等缺点，导致近几年其使用率呈逐渐下降趋势<sup>[4]</sup>。

有学者通过方法 1，于体重为 20~25 kg 的雌性小型猪上腹部中线造 10 cm 切口，再分离腹白线两侧肌层形成疝缺损，结果于术后 1 周可形成典型的切口疝；但也有学者认为此法仅行单纯腹壁切口，由于肌肉交错容易使伤口自愈，导致造模成功率低<sup>[3,5]</sup>。Sahoo 等<sup>[6]</sup>通过方法 2 和方法 3 创建了 3 种不同损伤程度的疝模型：腹直肌部分厚度缺损 (10 cm×5 cm)，保留腹直肌后鞘；腹膜前全层肌肉缺损 (15 cm×7.5 cm)，同时制造腹膜切口缺损并缝合关闭腹膜缺损；腹膜前全层肌肉缺损 (11 cm×10 cm)。以上 3 种模型均在术后 2 周出现明显切口疝。但有学者认为术中腹壁肌肉层次较难判断，且术后动物的运动导致各层腹壁肌肉受力改变，导致疝形成率和疝环的尺寸不稳定<sup>[3]</sup>。仲洁

等<sup>[3]</sup>按照人类平均身高170 cm,大腹壁疝的腹壁缺损最大径>12 cm的比例,设计大小约4 cm×2 cm椭圆形猪下腹部腹壁全层缺损,结果术后1个月所有实验猪均出现明显腹壁切口疝;术后3个月行疝环单纯修补术后又均出现疝复发,这表明该模型无自愈倾向,可推荐使用。

### 1.1.2 犬模型

犬体型相对适中,腹壁解剖结构在很多方面与人类较为相似,也被用作腹壁切口疝动物模型。国外学者通过切除腹壁全层组织构建切口疝模型,缺损大小不一,多用于修补材料的组织学评估<sup>[7-8]</sup>。但由于犬饲养管理和手术麻醉复杂等原因,近年来很少使用。

### 1.1.3 兔模型

家兔腹壁结构与人体大致相似,存在腹内斜肌、腹外斜肌及腹横肌等组织结构,具有体型小、易操作等优点,也是常用的动物模型,但近几年其使用率也呈逐渐下降趋势<sup>[4]</sup>。国内学者根据人类平均身高170 cm,大腹壁疝的腹壁缺损最大径>12 cm的比例,设计缺损大小,经实验验证,制造大小约3 cm×3 cm的缺损是一种可靠的方法<sup>[9-10]</sup>;而在国外的研究中,形成缺损大小不一,如Benito-Martínez等<sup>[11]</sup>和Pérez-Köhler等<sup>[12]</sup>的研究中实验人员于侧腹部制造大小为5 cm×2 cm缺损、大小6 cm×4 cm缺损等。在这些研究中,研究重点在修补材料,可能忽略了这种造模方法是否可行的问题。

### 1.1.4 大鼠模型

国内外学者通过同样的手术方法制备出大鼠腹壁切口疝模型,该模型不仅简单有效、重复性好,还兼顾经济性和易行性,其使用率呈逐年上升趋势<sup>[4,13-14]</sup>。Sahin等<sup>[15]</sup>比较了单纯腹壁切口与腹壁肌肉切除造模效果,发现通过腹壁肌肉切除形成的大鼠疝模型,在疝囊大小、张力和延伸值方面,都是统计学上最理想的切口疝模型。此外,国内有学者通过在大鼠腹部切除3 cm×0.6 cm全层腹壁肌肉组织,再使用商业化聚丙烯补片对腹壁缺损进行无张力修复评估,结果同样表明,这一制作切口疝小动物模型的方法操作简便,成功率高且可重复性好<sup>[13]</sup>。

## 1.2 腹股沟疝动物模型

腹股沟疝(inguinal hernia)是指发生在腹股沟区域的腹外疝,其发病机制目前尚不明确,可能与性别、年龄、家族史、先天因素如鞘状突未闭、腹股沟管发育短等,及后天因素如机体生长发育及一些慢性病,

如肝病、腹水、肾病等相关<sup>[16]</sup>。目前,腹股沟疝的手术技术已十分成熟,难以从无张力疝修补术的理念方面进行突破,当前更多聚焦于修补材料的研发。在这个不断创新的领域中,腹股沟疝动物模型发挥着重要作用。腹股沟疝动物模型分为自发型、转基因型及手术诱发型。目前尚无统一评价标准,理想的腹股沟疝动物模型应具有与人类腹股沟区相似的解剖结构,能够形成大小适中,又便于进行观察和手术修复的疝缺损。该模型常用的实验动物有猪、兔和鼠等,相关总结如表1所示。

### 1.2.1 自发模型

常用的自发模型有猪模型和兔模型。猪的腹股沟区解剖结构与人类非常接近,其动物模型更加贴合临床。有报道称小型猪腹股沟阴囊疝发生率可达51.6%。小型猪腹股沟阴囊疝是由于小型猪小肠及网膜经腹股沟管进入鞘膜腔内引起,这与人类腹股沟斜疝在解剖结构与发病机制上十分相似,可作为一种自发型腹股沟疝模型<sup>[17]</sup>。缺点是饲养经济成本高和实验操作复杂。

家兔先天具有腹股沟管内环口永不闭合的特点,即使家兔并不能自发形成疝,仍被大多数研究者采用<sup>[18]</sup>,故笔者将其归纳为自发模型。有研究表明,兔模型更适合小儿微创手术训练模型<sup>[19]</sup>,其缺点是腹股沟管内部空间小,局部解剖差异较大,适用条件有限。

### 1.2.2 转基因模型

腹股沟疝发生的一个潜在原因是作用于腹壁肌肉的性类固醇激素水平的改变,下腹肌组织中的芳香化酶将睾酮转化为雌二醇,会引起强烈的纤维化,导致肌肉萎缩和腹股沟疝<sup>[20]</sup>。Zhao等<sup>[21]</sup>的研究中,构建了含有完整的人类芳香化酶编码区,一个>75 kb的启动子区,包括启动子I.4、I.7、I.f、I.6、I.3和P II以及3'-聚腺苷化位点的芳香化酶转基因小鼠。在12周时,90%以上的雄性芳香化酶转基因小鼠可观察到双侧腹股沟阴囊疝。此模型主要用于性激素在疝疾病发病机制的相关研究。

### 1.2.3 手术诱发模型

手术诱发模型指通过外科手术在动物的腹股沟区制造缺损或薄弱区,模拟腹股沟疝的发生。通过切除或破坏腹股沟管的壁层结构,在精索旁、皮肤和腹腔之间形成缺损,缺损的内部被认为是深环(内口),外部被认为是浅环(外口),腹腔内容物可通过内口突出而形成疝<sup>[22]</sup>。但此模型与人类腹股沟疝的形成差距较

大, 适用条件有限。

### 1.3 脐疝动物模型

脐疝 (umbilical hernia) 是常见的腹壁疝之一, 主要症状为肠管等腹腔内容物通过脐部薄弱区域突出体外。有研究表明, 脐疝的病因主要与腹壁结构发育和胶原代谢有关<sup>[23]</sup>。脐疝动物模型为自发模型, 目前此模型尚无统一评价标准, 但一般包括以下几点: 脐部出现局限性的球形、半球形或椭圆形突起, 大小适中, 可重复性好; 疝内容物为正常腹壁脏器组织。该模型常用实验动物为大鼠, 相关总结如表1所示。

恽时锋等<sup>[24]</sup>首次在SD大鼠繁育过程中发现3例大鼠自发性脐疝。另一项研究发现, 通过近交繁殖先天性脐疝大鼠获得能稳定遗传的大鼠脐疝模型, 随着近交系数增大, 大鼠脐疝发生率升高, F12、F13代脐疝发生率可达100%<sup>[25]</sup>。孙天奇等<sup>[26]</sup>的进一步研究表明, 遗传性脐疝大鼠模型表型特征明确, 生物学特性有别于SD大鼠, 可用于研究脐疝致病机制及其易感基因。

### 1.4 造口旁疝动物模型

造口旁疝 (parastomal hernia) 是一种特殊类型的切口疝, 由小肠或者结肠经造口侧方脱出所致。其病因主要与造口位置位于腹膜外, 腹壁筋膜开口过大, 造口肠段与腹膜、腹壁筋膜固定或愈合不良及持续性腹腔高压等有关<sup>[27]</sup>。为了更好地评估修补补片在造口旁疝修补术中的生物相容性及力学性能, 临床前动物模型实验是不可或缺的环节。造口旁疝动物模型为手术诱发模型, 目前尚无统一评价标准, 但一个理想和典型的造口旁疝动物模型应该有明显的疝环、突出的疝囊以及一个造口。该模型常用实验动物为大鼠, 相关总结如表1所示。

Zhu等<sup>[28]</sup>首次建立了造口旁疝动物模型, 在研究过程中发现造口旁疝评分与切除肌肉的位置和形状显著相关, 而非切除肌肉的体积。在动物选择方面, 发现兔对结肠造口手术表现出不耐受, 表现为持续腹泻并最终死亡; 而大鼠对结肠造口术的耐受性良好, 推荐使用。通过设计4种不同手术方式进行比较, 该研究发现, 通过在造口周围建立大小约(纵)3 cm×(横)2 cm椭圆形腹直肌缺损形成造口旁疝模型, 其评分显著高于其他组, 可推荐作为建立大鼠造口旁疝模型的最佳方法。

### 1.5 嵌顿疝动物模型

嵌顿疝 (incarcerated hernia) 是指肠管等疝内容物

进入疝囊后无法自行还纳回腹腔的一种状态, 若疝内容物不能及时复位, 进而会发生血运障碍形成绞窄疝。建立嵌顿疝动物模型对于进一步研究其病理生理反应、探索早期诊断和治疗方法有重要意义。嵌顿疝动物模型为手术诱发模型, 目前尚无统一评价标准, 一般根据观察不同时间节点的肠管形态及组织学观察来模拟临床中疝内容物从嵌顿到较窄再到坏死的变化。该模型常用实验动物为大鼠, 相关总结如表1所示。

模型构建方法为腹部纵行切口进腹, 取回盲部近端肠管约4 cm并标记嵌顿部位, 测量嵌顿部位肠管直径分别为 $d_1$ 、 $d_2$ , 将肠管置于皮肤与腹壁肌肉间的间隙, 确保皮肤缝合后对脱出肠管无压迫; 设定疝环直径为 $D$ , 腹腔内注射生理盐水2 mL, 然后从上至下连续缝合腹膜及腹壁肌肉, 将肠管嵌顿于切口远心端, 形成人工疝环口, 直径为 $D=0.8 \times [(d_1+d_2)/2]$ , 最后连续缝合皮肤。此造模操作简单易行, 已被多数学者应用并认可<sup>[28-29]</sup>。

### 1.6 盆底疝动物模型

盆底疝 (pelvic floor hernia) 是指疝囊在骨盆盆缘以下的腹外疝, 主要分为闭孔疝、坐骨孔疝、盆底腹膜疝及会阴疝。盆底疝形成的病因有两方面: 各种原因导致的腹内压或盆腔内压力升高; 手术或非手术因素造成的盆底筋膜组织损伤<sup>[30]</sup>。

盆底疝动物模型可分为手术诱发模型和转基因模型, 目前无统一评价标准, 一般应包括可还纳的疝囊并可触及疝环, 或通过再次解剖观察疝囊与疝环位置进一步验证。该模型常用实验动物有犬和小鼠, 相关总结如表1所示。

#### 1.6.1 犬手术诱发模型

模型建立首先通过外科手术游离犬盆底肌肉筋膜组织间隙(肛门外括约肌、坐骨尾骨肌和肛提肌、闭孔内肌间的间隙), 然后围手术期诱导便秘以提高实验犬腹内压。术后1个月, 实验犬均出现盆底疝, 经局部解剖进一步证实<sup>[31]</sup>。

#### 1.6.2 小鼠转基因模型

有研究发现, 一种源自野生C57BL/6品系的尿激酶型纤溶酶原激活剂缺陷转基因小鼠的直肠脱垂发生率很高, 可观察到直肠黏膜不可逆的脱出和整个会阴区域的肿胀现象; 经组织学检查发现, 该小鼠的周围肌组织出现不同程度的损伤和纤维化<sup>[32]</sup>。此模型为盆底疝的发病机制研究提供了一种可选方法。

表1 腹外疝动物模型的构建方法及优缺点

Table 1 Methods for establishing animal models of external abdominal hernia, and their advantages and disadvantages

疝疾病类型 Types of hernia	构建方法 Establishment Methods	实验动物 Laboratory Animals	优点 Advantages	缺点 Disadvantages
腹壁切口疝 Incisional hernia	手术诱发	猪	腹壁结构、生理功能与人类相似程度高, 临床转化率较高 <sup>[3-4]</sup>	成本较高, 手术、麻醉操作复杂 <sup>[3-4]</sup>
		犬	腹壁结构、腹腔压力变化规律等与人类相似 <sup>[7-8]</sup>	成本较高, 饲养管理和手术麻醉操作复杂 <sup>[7-8]</sup>
		兔	成本较低, 体型小, 操作简单 <sup>[4,11-12]</sup>	腹壁厚度、强度与人类差异较大 <sup>[4,11-12]</sup>
		鼠	成本低, 操作简单, 模型重复性好 <sup>[4,13-15]</sup>	腹壁厚度、强度与人类差异较大 <sup>[4,13-15]</sup>
腹股沟疝 Inguinal hernia	自发	猪	疝的发生机制更贴合临床实际, 可研究疾病自然发生过程 <sup>[17]</sup>	发生率低, 样本获取难度大; 遗传背景不明确 <sup>[17]</sup>
		兔	成本较低; 存在永不闭合内环口; 体积大小适中, 更适合腹腔镜手术操作训练 <sup>[18-19]</sup>	腹股沟区解剖与人类差距较大; 不能形成疝, 适用条件有限 <sup>[18-19]</sup>
	转基因	小鼠	可重复性强, 多用于机制研究 <sup>[20]</sup>	技术难度及成本高, 适用条件有限 <sup>[21]</sup>
		大鼠	可控制疝种类及严重程度, 快速成模型 <sup>[22]</sup>	与临床实际差距较大, 应用较少
脐疝 Umbilical hernia	自发	大鼠	发生机制更贴合临床, 可用于基因的研究 <sup>[26]</sup>	个体差异大 <sup>[24]</sup>
造口旁疝 Parastomal hernia	手术诱发	大鼠	成本低, 操作简单; 模型重复性好 <sup>[28]</sup>	腹壁厚度、强度与人类差异较大
嵌顿疝 Incarcerated hernia	手术诱发	大鼠	简单易行, 可控性和重复性好 <sup>[28-29]</sup>	疝内容物、疾病进展速度及治疗效果等多方面与临床存在一定差异 <sup>[28-29]</sup>
盆底疝 Pelvic floor hernia	手术诱发	犬	疝的发生机制更贴合临床实际情况 <sup>[31]</sup>	盆底局部解剖复杂, 不易识别, 与人类存在差异 <sup>[31]</sup>
	转基因	小鼠	可用于盆底疝的发病机制研究 <sup>[32]</sup>	技术难度及成本高, 适用条件有限 <sup>[32]</sup>

## 2 先天性膈疝动物模型

先天性膈疝 (congenital diaphragmatic hernia) 是一种出生缺陷, 每 2 000 ~ 4 000 例活产新生儿中就会出现 1 例<sup>[33]</sup>。其特点是膈肌闭合不全, 胎儿腹腔器官疝入胸腔, 导致肺发育不良和血管重塑, 引起出生后肺动脉高压和心功能不全, 致死率可达 50%<sup>[34]</sup>。先天性膈疝的病因尚不清楚, 但约有三分之一的病例被认为与多基因遗传有关<sup>[35]</sup>。除了手术方法外, 先天性膈疝的治疗选择很有限。因为对其病因知之甚少, 因此需要更好的实验模型来阐明其发病机制, 同时测试新的治疗方法。

先天性膈疝动物模型尚无统一评价标准, 不同学者根据自己的研究目的和方法, 采用不同的评价指标。一般来说, 膈疝发生率及与人类先天性膈疝发生的相似程度 (如膈肌缺损位置, 及临床表现等) 是重点观察指标。膈疝动物模型可分为转基因模型、药物诱发模型及外科手术诱发模型, 相关总结如表 2 所示。

### 2.1 转基因模型

先天性膈疝转基因模型指通过基因敲除而诱发先天性膈疝的啮齿类动物模型。迄今为止, 大约 30% 的

先天性膈疝新生儿已被确定为遗传因素所致<sup>[35-36]</sup>。随着近年来创新分子技术的出现, 先天性膈疝转基因动物模型越来越普遍, 为膈缺损及相关肺异常的发病机制和病因提供了新的候选基因和信号通路<sup>[37]</sup>。目前, 小鼠基因组数据库 (<http://www.informatics.jax.org>) 中已列出了 18 种与人类先天性膈疝表型相似的小鼠模型。先天性膈疝转基因动物模型不仅可以模拟膈疝的自然发生, 而且有助于人们了解其所涉及的基因以及这些基因的修饰如何改变疾病的进程, 是研究产前治疗先天性膈疝最常用的动物模型<sup>[38]</sup>, 但这种模型也存在技术难度和成本高的缺点。

### 2.2 药物诱发模型

药物诱发模型指将硝基酚用于受孕啮齿动物, 其会导致动物后代出现先天性膈疝和肺发育不良的情况<sup>[39]</sup>。通常情况下, 将 100 mg 硝基酚溶解在 1 mL 橄榄油中, 在妊娠第 9.5 天给药时, 40% ~ 60% 的后代出现左侧先天性膈疝; 而在妊娠第 11 天给药时, 出现右侧先天性膈疝更为常见<sup>[40]</sup>。这种模型经济、方便, 同时可模拟人类膈疝不同严重程度的肺和膈胚胎发育研究<sup>[41]</sup>, 但也存在一些缺点: 首先, 硝基酚仅应用于啮齿动物, 尚无研究显示其对大型动物有效; 其次, 硝

基酚干预的无先天性膈疝胎儿也出现肺发育不良, 因为其致畸作用涉及多个器官, 特别是对各种肺细胞的影响; 因此, 无法区分肺发育不良是由于疝内容物的机械压迫还是致畸作用所致<sup>[39]</sup>。

### 2.3 手术诱发模型

手术模型的优点在于手术诱导的先天性膈疝模型几乎不受致畸物诱导效应的影响, 可以在大、小型动物上进行研究; 但手术模型仅限于从小管期开始的对胎儿肺的研究, 因为早期进行手术死亡率为100%<sup>[40]</sup>。

#### 2.3.1 羊模型

第一个手术模型是在绵羊胎儿中进行的, Harrison等<sup>[42]</sup>在妊娠晚期肺发育的假腺期, 通过在左侧肋间隙打开胎儿胸部, 切除部分横膈肌, 制造膈疝缺损。实验分析观察了肺大小和体积在不同手术胎龄(从98 d到138 d, 妊娠期共145~150 d)的变化。目前, 手术先天性膈疝羊模型已标准化, 手术在妊娠60~63 d(肺发育的伪腺体阶段)之间进行<sup>[43]</sup>。羊模型的主要优点是胎儿尺寸更大, 更容易形成疝缺损; 其缺点主要是绵羊成本高、妊娠周期长以及窝产仔数量少<sup>[44]</sup>。

#### 2.3.2 兔模型

兔模型具有成本较低、妊娠期较短、窝产仔数较多及肺部生理学与人类具有一定的相似性等优点。一研究中, 兔先天性膈疝手术模型是在妊娠23~26 d的兔胎进行的(肺发育假腺期, 兔胎儿足月需31~32 d), 结果死亡率>45%, 且无明显肺发育不全<sup>[45]</sup>。另一研究, 在妊娠第20天造模, 死亡率100%<sup>[46]</sup>; 在妊娠第24天和第25天造模, 胎儿成活率达70%, 发生明显肺发育不全及肺血管厚度增加。此外, 有研究在妊娠第23天进行手术, 并在妊娠第25、27、29、30天采集胎儿样本, 发现肺发育不全随时间延长而加重<sup>[47]</sup>。手术过程大致如下: 剖开孕兔腹部和子宫, 在胎儿胸侧血管之间的标志处行一侧胸廓切开术, 当肺收缩显露横膈膜时造成膈肌缺损。

#### 2.3.3 大鼠模型

由于硝基酚诱导的先天性膈疝模型仅限于啮齿动物, 因此Sbragia等<sup>[40]</sup>首次在大鼠中建立先天性膈疝模型, 这有助于使用新的组学技术来探索先天性膈疝环境下肺异常发育的机制, 而不受致畸物的干扰。在Sbragia等<sup>[40]</sup>的报告中, 手术在妊娠第18.5天(相当于人类肺小管发育阶段)进行, 方法与兔先天性膈疝模型类似, 研究结果表明, 在肺重比(总肺肿瘤/胎儿体重)和肺组织学上的变化均与硝基酚诱导的先天性

膈疝模型相似。大鼠先天性膈疝模型的其他优点是存在足够大的疝缺损, 这与在人类身上发现的一致。而大鼠先天性膈疝模型的局限性包括: 手术为显微操作, 术者需要有显微操作基础; 手术在肺发育假腺期后, 因此不能观察膈肌缺损对之前肺发育的影响。

## 3 食管裂孔疝动物模型

食管裂孔疝(hiatal hernia)是指胃和(或)其他腹部脏器通过食管裂孔从腹腔突出并进入胸腔。该病的发病机制尚不清楚, 可能主要是由膈肌食管裂孔周围韧带结构弹性降低或胃内压力增加, 导致腹腔内容物疝入胸腔, 因此老年及肥胖是该病的主要危险因素<sup>[48]</sup>。

食管裂孔疝动物模型分为自发模型和手术诱发模型, 目前尚无统一评价标准。理想的食管裂孔疝动物模型应具有与人类相似的食管裂孔及其周围组织结构, 并且体积适中, 能够提供足够视野进行腹腔镜手术等操作。常用实验动物有猪、犬和兔等, 相关总结如表2所示。

### 3.1 自发模型

#### 3.1.1 猪模型

猪的食管裂孔较大, 相当于较小的食管裂孔疝, 并且左右膈肌脚清楚, 各解剖标志与人体基本相似, 不需要特殊干预就可以建立动物训练模型<sup>[49]</sup>。有学者认为, 在进行猪模型手术时, 其立体感、方向感与进行人体腹腔镜手术时基本一致<sup>[50]</sup>。同样, 在猪模型上进行机器人食管裂孔疝修补联合胃底折叠手术安全可行。该模型为外科医师提供了机器人手术系统缝合打结技术以及不同折叠术式的操作训练平台<sup>[49]</sup>, 但也存在一定缺点, 如: 猪的肝左叶大、胃底宽、膈肌位置深, 这给手术区域的显露造成了一定的困难; 猪的脾脏狭长、质地脆、游离胃底时易发生出血, 术中应谨慎操作。

#### 3.1.2 鼠和兔发模型

有学者在鼠和兔体内进行食管裂孔疝修补术, 用于研究不同补片在食管裂孔处对膈肌的影响及其组织学变化<sup>[51-52]</sup>, 但这种模型与人类解剖差异较大, 因此, 适用条件有限, 近年来较少使用。

### 3.2 食管裂孔疝手术诱发模型

#### 3.2.1 猪模型

Brody等<sup>[53]</sup>经胸入路游离了5头家猪的食管裂孔区, 并切断胃短血管, 使胃底上升至胸腔内, 成功复

刻了食管裂孔疝模型。此外, Smith等<sup>[54]</sup>通过切除猪的左膈肌脚和部分左膈,建立了两种缺损尺寸的大裂孔疝模型,包括40 mm×30 mm的标准大小缺损和40 mm×50 mm的更大缺损,为后续进行巨大食管裂孔疝的相关研究提供了可靠的参考依据。

### 3.2.2 犬模型

Desai等<sup>[55]</sup>通过左侧胸腔镜入路,首先离断下肺韧带,在辨认出食管和迷走神经后,将膈食管膜切开,并对胃食管连接处进行环形解剖,后将食管下段和胃底牵拉至后纵隔,将胃体固定在膈肌的左后脚处,成功建立食管裂孔疝模型,为食管裂孔疝的相关研究提供了一种可选的动物模型。

## 4 脑疝动物模型

脑疝(cerebral hernia)是由颅内压增高引起的部分脑组织移位,当移位超过一定的解剖界限时则称之为脑疝。其基本病因有颅脑损伤、急性脑血管病、颅内肿瘤及囊肿等<sup>[56]</sup>。为了进一步研究其病理生理机制,并探索诊断及治疗方法,脑疝动物模型应运而生。目前,脑疝动物模型有广西巴马小型猪急性颅内高压合并脑疝模型和兔脑中心疝模型。二者均为手术诱发模型,分别具有各自的评价标准,相关总结如表2所示。

### 4.1 广西巴马小型猪急性颅内高压合并脑疝模型

此模型通过向右侧顶叶、颞叶和额叶内注射自体股动脉血以制备颅内出血,注血速度为1 mL/min,致急性颅内高压致脑疝症状出现<sup>[57]</sup>。其诊断标准为:颅内压 $\geq 50$  mmHg;呼吸频率明显减慢( $\leq 6$ 次/min)或呼吸停止或出现潮式呼吸;心率 $\geq 200$ 次/min,或 $\leq 50$ 次/min和/或伴心律失常;单侧或双侧瞳孔散大至边缘;头颅CT或磁共振成像(magnetic resonance imaging, MRI)可见颅内血肿形成、中线偏移。符合以上3条及以上即可做出诊断。此模型具有稳定性和重复性好的优点,且与啮齿动物相比,猪脑的解剖结构和生理学特性与人类更为相似。同时,猪脑容积大,更易于影像学检查明确血肿占位及颅内压的监测等,但也存在麻醉、手术操作技术难度大等不足。

### 4.2 兔脑中心疝模型

脑中心疝又称经小脑幕疝或小脑幕疝,通常由肿瘤特别是额叶、顶叶或枕叶肿瘤引起。模型构建方法为通过带导丝的可注水球囊沿大脑镰于前纵裂范围内,向前插入直至颅底中线部位并固定,深度2.5 cm,然

后以0.01 mL/min向球囊内注入生理盐水<sup>[58]</sup>。该模型构建成功的标准为出现典型的脑中心疝生命体征变化,经MRI检查后可观察到额底注水球囊占位,解剖形态学可见脑中线结构向后下移位。此模型使用水球囊可将初始病灶局限于额底区域,相较于输入自体血,具有可控性高、干扰因素较少等优点。但该模型也存在手术操作技术复杂、难度大等缺点。

## 5 新型疝修补材料的应用

### 5.1 液体修补材料

East等<sup>[59]</sup>提出,液体纳米纤维支架是一种液体形式的外科修补材料。该支架由纤维蛋白密封胶和聚- $\alpha$ -己内酯纳米纤维组成,在家兔腹壁正中行5 cm切口并一期缝合,将液体纳米纤维支架均匀平铺于术区。于术后6周时处死动物,对其腹壁进行组织学和生物力学评价。结果发现,该支架能够改善愈合筋膜的生物力学特性,表明这种“液体补片”可能对切口疝形成有预防作用。

### 5.2 超细单丝新型聚对苯二酯防粘连网片

腹腔内置补片容易引起肠粘连和瘘管等并发症,目前已有各种防粘连的复合补片被开发应用。有研究表明,腹腔内粘连形成除了与补片材料有关外,还与孔隙大小和表面积有关,且带有超细单个聚对苯二酯链的多丝可以减弱异物反应,形成较小的异物肉芽肿。因此,Helmedag等<sup>[14]</sup>开发了一种具有超细单丝直径的新型聚对苯二酯网,通过将其植入大鼠皮下和在腹腔镜下固定于家兔腹膜内,分别评估其生物相容性和防粘连效果,结果表明,新型聚对苯二酯网具有更轻的异物反应及粘连形成情况。

### 5.3 计算机体层摄影可检测的复合补片

补片疝修补术后,可能出现肠道粘连、瘘管,甚至网状物侵入输精管,导致生育障碍等并发症,可能的原因是宿主组织的收缩和折叠使补片发生移位。因此,开发一种通过常规成像技术可检测的补片,该补片在并发症的预防及早期诊断中发挥着重要作用。Ding等<sup>[60]</sup>研发了一种由硫酸钡纳米颗粒与聚丙烯熔融而成的聚合物,其硫酸钡浓度为30%,细胞毒性试验表明,其不影响细胞活性和增殖。观察兔腹壁切口疝模型可知,该聚合物在CT下成像清楚而且生物相容性良好。

表2 先天性膈疝模型、食管裂孔疝模型及脑疝动物模型的构建方法及优缺点

Table 2 Methods for establishing animal models of congenital diaphragmatic hernia, hiatal hernia, and cerebral hernia, and their advantages and disadvantages

疝疾病类型 Types of hernia	构建方法 Establishment methods	实验动物 Laboratory animals	优点 Advantages	缺点 Disadvantages
先天性膈疝 Congenital diaphragmatic hernia	转基因	小鼠	可模拟疾病自然发生;特定基因的功能研究 <sup>[37-38]</sup>	技术难度及成本高 <sup>[37-38]</sup>
	药物诱发	大鼠、小鼠	经济易行;可模拟人类膈疝不同程度的肺和膈胚胎发育研究 <sup>[39-41]</sup>	缺乏对大型动物的实验研究;存在硝基酚本身致畸作用的影响 <sup>[39]</sup>
	手术诱发	羊	胎儿尺寸大,易形成疝缺损 <sup>[44]</sup>	成本高,妊娠周期长,窝产仔数少;仅限于从小管期开始的胎儿肺的研究 <sup>[44]</sup>
		兔	成本较低,妊娠期短,窝产仔数多,肺部生理学与人类相似 <sup>[45-47]</sup>	仅限于从小管期开始的胎儿肺的研究 <sup>[45-47]</sup>
		大鼠	成本低,妊娠期短,窝产仔数多 <sup>[40]</sup>	手术操作难度大,需显微操作基础;仅限于从小管期开始的胎儿肺的研究 <sup>[40]</sup>
食管裂孔疝 Hiatal hernia	自发	猪	重要解剖结构与人类相似;多用作手术训练模型 <sup>[49-50]</sup>	成本高;麻醉、围术期监护等复杂 <sup>[49-50]</sup>
		鼠、兔	简单易行 <sup>[51-52]</sup>	与临床差距较大;适用条件有限,近年来较少使用 <sup>[51-52]</sup>
	手术诱发	猪	重要解剖结构与人类相似;可作为手术训练模型 <sup>[53-54]</sup>	成本高;麻醉、围术期监护等复杂 <sup>[53-54]</sup>
		犬	重要解剖结构与人类相似 <sup>[55]</sup>	成本高;麻醉、围术期监护等复杂 <sup>[55]</sup>
脑疝 Cerebral hernia	手术诱发	广西巴马	大脑解剖及生理与人类相似;脑容积较大,易于影像学评估 <sup>[57]</sup>	成本高;麻醉、围术期监护等复杂 <sup>[57]</sup>
		小型猪		
		兔	病灶局限,可控性高 <sup>[58]</sup>	手术操作技术难度较大 <sup>[58]</sup>

## 5.4 3D打印器官源脱细胞外基质血管支持补片

3D打印作为一种新型制造技术,可以有效减少材料浪费,并根据体内缺陷的不同结构,制备出合适形状的组织工程支架<sup>[61]</sup>。张海光等<sup>[62]</sup>以脱细胞真皮基质和聚乳酸为材料,制备3D打印血管支撑补片,体外实验表明,其缝合载荷、抗拉强度、亲水性和降解率均显著高于猪小肠黏膜下层补片和聚乳酸补片,且细胞相容性良好。将其植入大鼠腹壁切口疝模型中,术后4周观察发现,缺损区域修复良好,无明显感染、血清肿、血肿等情况发生,表明其生物相容性良好,在未来有望应用于腹壁重建。

## 5.5 新型网状缝合线

传统缝合线有明显的缺点,即在高张力闭合中切割和拉穿组织会导致切口疝发生。一种新的由多根聚丙烯细线组成的网状缝合线,其设计具有灵活大孔外壁和中空的核心,允许组织生长进入到缝线中,从而提高早期伤口强度,减少缝线撕裂<sup>[63]</sup>。选择单纯腹中线切口的猪或鼠腹壁切口疝模型进行实验验证,结果表明,腹壁强度明显增强,病理组织学发现,网状缝合线的中空部分充满成纤维细胞、胶原蛋白及血管<sup>[64]</sup>。此

外, Scheiber等<sup>[65]</sup>使用离体的猪腹壁通过循环应力球破裂模型比较网状缝线与常规缝线,结果发现,网状缝线最大牵引力明显高于常规缝合线(850.1 N *v.s.* 714.7 N,  $P < 0.0095$ )。这表明,用合理的缝线设计来改善缝线-组织界面的力分布可能是防止缝线拉穿组织导致切口疝的可行策略。

## 6 总结与展望

腹壁切口疝的动物模型已较为成熟,但缺乏手术操作规范和模型评估标准。因此,在未来,首先应建立手术操作和模型评估标准;其次应建立长期慢性模型及合并症模型,以模拟临床实际情况。腹股沟疝动物模型由于腹股沟区解剖结构的特殊性,与临床存在较大差异,因此,应根据实验目的灵活选择和设计模型,以满足实验要求。在未来,还需优化动物模型设计,开发出更加贴合临床实际的模型。脐疝动物模型可用于脐疝致病机制及易感基因的研究,但由于小儿先天性脐疝自愈率高且修复技术简单,所以脐疝并未受到普遍重视,因此其相关动物模型的研究和应用较少。未来,需进一步开发脐疝相关的动物模型。造口

旁疝动物模型可用于评估修补材料, 致力于降低造口旁疝修补术后的复发率。目前, 仅有少量实验研究建立了大鼠造口旁疝动物模型, 为了更好地模拟临床实际情况, 未来应尝试在大型动物体内建模。嵌顿疝动物模型主要用于研究缺血肠道的病理生理变化和药物干预对缺血肠道的影 响。现有的造模方法简单易行, 能够较好地模拟临床嵌顿疝的病理生理变化, 但是, 目前主要依赖于大鼠模型, 未来应补充建立其他实验动物模型。

先天性膈疝动物模型构建方法多样, 在机制研究中具有互补优势。但与临床实际情况仍存在一定差异。未来, 应致力于开发更接近临床的模型构建技术, 并制定相关的建模标准和操作规范, 提高模型的质量和可重复性, 加速临床转化。

近年来, 食管裂孔疝动物模型主要作为食管裂孔疝修补术和胃底折叠术手术训练的模型。由于大型动物猪腹腔内空间和解剖结构与人类相似, 手术效果良好, 因此受到多数研究者青睐。

脑疝动物模型有统一的评价标准。在颅脑损伤的相关研究中, 发挥着重要作用。常用实验动物为猪, 能够最大程度地模拟临床实际情况。

综上所述, 各种疝疾病的动物模型都发挥着不可替代的作用, 是连接基础研究和临床应用的重要桥梁。但其仍存在缺陷与不足, 因此, 需要不断完善和更新疝疾病动物模型, 这需要所有专科医师及相关生物医学工作者的共同努力。

#### [作者贡献 Author Contribution]

费彬负责构思设计内容、检索文献和撰写论文;  
郭文科和郭建平负责修改和核定内容。

#### [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] 陈静宇, 洪阁, 郭宁, 等. 疝修复补片: 材料设计与应用的最新进展[J]. 中国组织工程研究, 2025, 29(16): 3494-3502. DOI: 10.12307/2025.437.  
CHEN J Y, HONG G, GUO N, et al. Hernia repair patch: recent advances in material design and application[J]. Chin J Tissue Eng Res, 2025, 29(16):3494-3502. DOI: 10.12307/2025.437.
- [2] 陈双, 江志鹏. 切口疝、腹壁力学与外科技术[J]. 中国普通外科杂志, 2023, 32(10): 1453-1459. DOI: 10.7659/j.issn.1005-6947.2023.10.002.  
CHEN S, JIANG Z P. Incision hernia, abdominal wall mechanics and surgical techniques[J]. China J Gen Surg, 2023, 32(10): 1453-1459. DOI: 10.7659/j.issn.1005-6947.2023.10.002.
- [3] 仲洁, 逯景辉, 林振华, 等. 模拟临床的猪腹壁切口疝模型建立研究[J/OL]. 中华疝和腹壁外科杂志(电子版), 2024, 18(2):168-172. DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-392X.2024.02.008.  
ZHONG J, LU J H, LIN Z H, et al. Study on the establishment of porcine abdominal incisional hernia model simulating clinical practice[J/OL]. Chin J Hernia Abdom Wall Surg Electron Ed, 2024, 18(2):168-172. DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-392X.2024.02.008.
- [4] LIU H, GIELEN M M, BOSMANS J M, et al. Inadequate awareness of adherence to ARRIVE guidelines, regarding reporting quality of hernia models repaired with meshes: a systematic review[J]. Hernia, 2022, 26(2):389-400. DOI:10.1007/s10029-020-02351-y.
- [5] 邓美海, 林楠, 胡昆鹏, 等. 猪切口疝模型的建立及使用生物型补片修补的研究[J]. 中华实验外科杂志, 2008, 25(10):1260-1261. DOI: 10.3321/j.issn:1001-9030.2008.10.014.  
DENG M H, LIN N, HU K P, et al. Empirical study of establishing piglet model of incisional hernia and repairing the hernia with biotic patch[J]. Chin J Exp Surg, 2008, 25(10): 1260-1261. DOI: 10.3321/j.issn:1001-9030.2008.10.014.
- [6] SAHOO S, BAKER A R, HASKINS I N, et al. Development of a critical-sized ventral hernia model in the pig[J]. J Surg Res, 2017, 210:115-123. DOI:10.1016/j.jss.2016.10.026.
- [7] ZHARIKOV A N, LUBYANSKY V G, GLADYSHEVA E K, et al. Early morphological changes in tissues when replacing abdominal wall defects by bacterial nanocellulose in experimental trials[J]. J Mater Sci Mater Med, 2018, 29(7):95. DOI:10.1007/s10856-018-6111-z.
- [8] NAKAYAMA Y, OSHIMA N, TATSUMI E, et al. iBTA-induced bovine Biosheet for repair of abdominal wall defects in a beagle model: proof of concept[J]. Hernia, 2018, 22(6):1033-1039. DOI:10.1007/s10029-018-1799-8.
- [9] 周岩. 新型兔腹壁疝模型建立及评价的研究[D]. 昆明: 云南中医学院, 2018.  
ZHOU Y. Research on the establishment and evaluation of a new rabbit abdominal wall hernia model [D]. Kunming: Yunnan University of Traditional Chinese Medicine, 2018.
- [10] 邹振玉, 杨硕, 王明刚, 等. 新型巨大腹壁疝及腹腔高压动物模型的实验研究[J]. 首都医科大学学报, 2018, 39(6):900-904. DOI: 10.3969/j.issn.1006-7795.2018.06.019.  
ZOU Z Y, YANG S, WANG M G, et al. Experimental study on a novel rabbit model of giant ventral hernia and intraabdominal hypertension[J]. J Cap Med Univ, 2018, 39(6): 900-904. DOI: 10.3969/j.issn.1006-7795.2018.06.019.
- [11] BENITO-MARTÍNEZ S, PÉREZ-KÖHLER B, RODRÍGUEZ M, et al. Antibacterial biopolymer gel coating on meshes used for abdominal hernia repair promotes effective wound repair in the presence of infection[J]. Polymers, 2021, 13(14):2371. DOI: 10.3390/polym13142371.
- [12] PÉREZ-KÖHLER B, PASCUAL G, BENITO-MARTÍNEZ S, et al. Thermo-responsive antimicrobial hydrogel for the *in situ* coating of mesh materials for hernia repair[J]. Polymers, 2020, 12(6):1245. DOI:10.3390/polym12061245.

- [13] 朱佳琳. 大鼠切口疝腹膜前间隙补片修补术对腹壁肌肉病理变化的影响研究[D]. 成都: 成都医学院, 2023. DOI:10.27843/d.cnki.gcdyy.2023.000149.  
ZHU J L. Study on the influence of preperitoneal mesh repair of incisional hernia on the pathological changes of abdominal wall muscles in rats [D]. Chengdu: Chengdu Medical College, 2023. DOI: 10.27843/d.cnki.gcdyy. 2023. 000149.
- [14] HELMEDAG M J, HEISE D, EICKHOFF R M, et al. Ultra-fine polyethylene hernia meshes improve biocompatibility and reduce intraperitoneal adhesions in IPOM position in animal models[J]. *Biomedicines*, 2022, 10(6): 1294. DOI: 10.3390/biomedicines10061294.
- [15] SAHIN M, SAYDAM M, YILMAZ K B, et al. Comparison of incisional hernia models in rats: an experimental study[J]. *Hernia*, 2020, 24(6): 1275-1281. DOI: 10.1007/s10029-020-02234-2.
- [16] 祁伟伟, 黄博. 成人腹股沟疝危险因素及外科治疗的研究进展[J]. *国际外科学杂志*, 2024, 51(4):283-288. DOI:10.3760/cma.j.cn115396-20240103-00006.  
QI W W, HUANG B. Research progress on risk factors and treatment of adult inguinal hernia[J]. *Int J Surg*, 2024, 51(4): 283-288. DOI:10.3760/cma.j.cn115396-20240103-00006.
- [17] 何永平, 陈德威, 于梅芳. 小型猪自发性腹股沟疝模型[J]. *上海实验动物科学*, 1992, 12(1):14-15.  
HE Y P, CHEN D W, YU M F. Spontaneous inguinal hernia model in miniature pigs[J]. *Shanghai Lab Anim Sci*, 1992, 12(1): 14-15.
- [18] TAKEGAWA Y, TSUTSUMI N, YAMANAKA K, et al. Impact of different fibrin glue application methods on inguinal hernia mesh fixation capability[J]. *Sci Rep*, 2024, 14(1): 12773. DOI: 10.1038/s41598-024-63682-9.
- [19] FUNG A C H, CHUNG P H Y, CHAN I H Y, et al. Enhancing neonatal thoracoscopic surgical training with rabbit model [J]. *Heliyon*, 2024, 10(10): e31498. DOI:10.1016/j.heliyon. 2024. e31498.
- [20] POTLURI T, TAYLOR M J, STULBERG J J, et al. An estrogen-sensitive fibroblast population drives abdominal muscle fibrosis in an inguinal hernia mouse model[J]. *JCI Insight*, 2022, 7(9): e152011. DOI:10.1172/jci.insight.152011.
- [21] ZHAO H, ZHOU L, LI L, et al. Shift from androgen to estrogen action causes abdominal muscle fibrosis, atrophy, and inguinal hernia in a transgenic male mouse model[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018, 115(44): E10427-E10436. DOI:10.1073/pnas.1807765115.
- [22] 陈昊强, 程军胜, 张旭升, 等. 骨髓间充质干细胞覆膜聚乳酸-羟基乙酸/ I 型胶原蛋白支架补片在腹股沟疝模型中的作用[J]. *中华实验外科杂志*, 2022, 39(2):377. DOI:10.3760/cma.j.cn421213-20210808-00599.  
CHEN H Q, CHENG J S, ZHANG X S, et al. Bone marrow mesenchymal stem cell-coated polylactic acid-hydroxyacetic acid/type I collagen scaffold patches in an inguinal hernia model[J]. *Chin J Exp Surg*, 2022, 39(2):377. DOI:10.3760/cma.j.cn421213-20210808-00599.
- [23] MORADIAN S, KLOSOWIAK J L, BOCTOR M J, et al. Novel approach for umbilical hernia repair using mesh strips[J]. *Plast Reconstr Surg Glob Open*, 2023, 11(4): e4947. DOI: 10.1097/GOX.0000000000004947.
- [24] 恽时锋, 孙敬方. 大鼠自发性脐疝观察初报[J]. *畜牧与兽医*, 1998 (3):30-31. DOI:CNKI:SUN:XMYS.0.1998-03-015.  
YUN S F, SUN J F. Preliminary report on observation of spontaneous umbilical hernia in rats[J]. *Anim Husb Vet Med*, 1998(3): 30-31. DOI:CNKI:SUN:XMYS.0.1998-03-015.
- [25] 张涛, 尚世臣, 张广州, 等. 遗传性大鼠脐疝模型的选育[J]. *中国实验动物学报*, 2014, 22(5):84-86,8. DOI:10.3969/j.issn.1005-4847.2014.05.019.  
ZHANG T, SHANG S C, ZHANG G Z, et al. Selective breeding of a rat model of congenital umbilical hernia[J]. *Acta Lab Animalis Sci Sin*, 2014, 22(5):84-86, 8. DOI:10.3969/j.issn.1005-4847.2014.05.019.
- [26] 孙天奇, 秦佟童, 张睿, 等. 遗传性脐疝大鼠生物学特性的初步研究[J]. *实验动物科学*, 2022, 39(1):38-43. DOI:10.3969/j.issn.1006-6179.2022.01.008.  
SUN T Q, QIN T T, ZHANG R, et al. Preliminary study on biological characteristics of umbilical hernia rats[J]. *Lab Anim Sci*, 2022, 39(1):38-43. DOI:10.3969/j.issn.1006-6179.2022. 01.008.
- [27] 李明磊, 傅晓键, 姚琪远. 造口旁疝修补的技术发展[J]. *中华胃肠外科杂志*, 2022, 25(11):1033-1038. DOI:10.3760/cma.j.cn441530-20220421-00170.  
LI M L, FU X J, YAO Q Y. Dechnical development of parastomal hernia repair techniques[J]. *Chin J Gastrointest Surg*, 2022, 25(11): 1033-1038. DOI: 10.3760/cma. j. cn441530-20220421-00170.
- [28] ZHU X, LIU J, LIU Z, et al. Establishment and evaluation of rat models of parastomal hernia[J]. *Hernia*, 2024, 28(5):1657-1665. DOI:10.1007/s10029-024-03010-2.
- [29] CHEN Y, QIN C F, WANG G H, et al. Contribution of heparin to recovery of incarcerated intestine in a rat incarcerated hernia model[J]. *Hernia*, 2019, 23(6): 1155-1161. DOI: 10.1007/s10029-019-01985-x.
- [30] 曹迪, 张玉茹. 经腹腔镜生物补片修补直结肠癌根治术后盆底疝1例[J/OL]. *中华普外科手术学杂志(电子版)*, 2024, 18(1):115-116. DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-3946.2024.01.030.  
CAO D, ZHANG Y R. A case of pelvic floor hernia repaired by laparoscopic biological patch after radical resection of rectal cancer[J/OL]. *Chin J Oper Proced Gen Surg (Electron Ed)*, 2024, 18(1): 115-116. DOI: 10.3877/cma. j. issn. 1674-3946.2024. 01.030.
- [31] 杨硕, 陈杰, 申英末, 等. 犬盆底疝动物模型的建立[J]. *中华实验外科杂志*, 2013, 30(1):163-164. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1001-9030.2013.01.057.  
YANG S, CHEN J, SHEN Y M, et al. Establishment of dog pelvic floor hernia model[J]. *Chin J Exp Surg*, 2013, 30(1):163-164. DOI:10.3760/cma.j.issn.1001-9030.2013.01.057.
- [32] YIOU R, DELMAS V, CARMELIET P, et al. The pathophysiology of pelvic floor disorders: evidence from a histomorphologic study of the perineum and a mouse model of rectal prolapse

- [J]. *J Anat*, 2001, 199(Pt 5): 599-607. DOI: 10.1046/j. 1469-7580.2001.19950599.x.
- [33] 中华医学会妇产科学分会产科学组. 胎儿先天性膈疝临床管理指南(2022)[J]. *中华妇产科杂志*, 2022, 57(10):721-732. DOI:10.3760/cma.j.cn112141-20220421-00261.  
Department of Obstetrics and Gynecology, Chinese Medical Association. Clinical management guideline for fetal congenital diaphragmatic hernia (2022) [J]. *Chin J Obstet Gynecol*, 2022, 57(10): 721-732. DOI: 10.3760/cma. j. cn112141-20220421-00261.
- [34] PULIGANDLA P, SKARSGARD E, BAIRD R, et al. Diagnosis and management of congenital diaphragmatic hernia: a 2023 update from the Canadian Congenital Diaphragmatic Hernia Collaborative[J]. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*, 2024, 109(3):239-252. DOI:10.1136/archdischild-2023-325865.
- [35] ZANI A, CHUNG WK, DEPREST J, et al. Congenital diaphragmatic hernia[J]. *Nat Rev Dis Primers*. 2022, 8(1):37. DOI:10.1038/s41572-022-00362-w.
- [36] PUGNALONI F, CAPOLUPO I, PATEL N, et al. Role of microRNAs in congenital diaphragmatic hernia-associated pulmonary hypertension[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(7): 6656. DOI:10.3390/ijms24076656.
- [37] GÜRÜN LÜOĞLU K, DÜNDAR M, UNVER T, et al. Global gene expression profiling in congenital diaphragmatic hernia (CDH) patients[J]. *Funct Integr Genomics*, 2022, 22(3): 359-369. DOI:10.1007/s10142-022-00837-9.
- [38] MARULANDA K, TSIHLIS N D, MCLEAN S E, et al. Emerging antenatal therapies for congenital diaphragmatic hernia-induced pulmonary hypertension in preclinical models[J]. *Pediatr Res*, 2021, 89(7):1641-1649. DOI: 10.1038/s41390-020-01191-x.
- [39] JANK M, SCHWARTZ J, MIYAKE Y, et al. Dysregulation of CITED2 in abnormal lung development in the nitrofen rat model[J]. *Pediatr Surg Int*, 2024, 40(1):43. DOI:10.1007/s00383-023-05607-7.
- [40] SBRAGIA L, ORIA M, SCORLETTI F, et al. A novel surgical toxicological-free model of diaphragmatic hernia in fetal rats [J]. *Pediatr Res*, 2022, 92(1):118-124. DOI: 10.1038/s41390-021-01702-4.
- [41] DE BIE F R, REGIN Y, DUBOIS A, et al. Prenatal treprostinil improves pulmonary arteriolar hypermuscularization in the rabbit model of congenital diaphragmatic hernia[J]. *Biomed Pharmacother*, 2024, 170: 115996. DOI: 10.1016/j. biopha. 2023. 115996.
- [42] HARRISON M R, BRESSACK M A, CHURCH A M, et al. Correction of congenital diaphragmatic hernia in utero. II. Simulated correction permits fetal lung growth with survival at birth[J]. *Surgery*, 1980, 88(2):260-268.
- [43] RUSSO F M, DA CUNHA M G M C M, JIMENEZ J, et al. Complementary effect of maternal sildenafil and fetal tracheal occlusion improves lung development in the rabbit model of congenital diaphragmatic hernia[J]. *Ann Surg*, 2022, 275(3): e586-e595. DOI:10.1097/SLA.0000000000003943.
- [44] GILLEY J, HANNEMAN S K, OTTOSEN M J, et al. Endothelial-to-mesenchymal transition in human and murine models of congenital diaphragmatic hernia[J]. *Neonatology*, 2024, 121(4): 512-518. DOI:10.1159/000537802.
- [45] OHI R, SUZUKI H, KATO T, et al. Development of the lung in fetal rabbits with experimental diaphragmatic hernia[J]. *J Pediatr Surg*, 1976, 11(6):955-959. DOI:10.1016/s0022-3468(76) 80073-5.
- [46] FAUZA D O, TANNURI U, AYOUB A A, et al. Surgically produced congenital diaphragmatic hernia in fetal rabbits[J]. *J Pediatr Surg*, 1994, 29(7):882-886. DOI:10.1016/0022-3468(94) 90008-6.
- [47] WU J, YAMAMOTO H, GRATACOS E, et al. Lung development following diaphragmatic hernia in the fetal rabbit[J]. *Hum Reprod*, 2000, 15(12): 2483-2488. DOI: 10.1093/humrep/ 15.12.2483.
- [48] 赵颖, 胡海清. 食管裂孔疝的治疗进展[J]. *现代消化及介入诊疗*, 2023, 28(10): 1318-1323. DOI: 10.3969/j. issn. 1672-2159.2023. 10.026.  
ZHAO Y, HU H Q. Progress in treatment of esophageal hiatal hernia[J]. *Mod Interv Diagn Treat Gastroenterol*, 2023, 28(10): 1318-1323. DOI:10.3969/j.issn.1672-2159.2023.10.026.
- [49] 艾克拜尔·艾力, 黎鑫, 克力木·阿不都热依木, 等. 机器人食管裂孔疝修补联合胃底折叠术动物模型实验研究[J]. *中国实用外科杂志*, 2024, 44(7):829-831. DOI: 10.19538/j. cjps. issn1005-2208. 2024.07.21.  
Aikebaier Aili, LI X, Kelimu Abudureyimu, et al. Experimental study on an animal model of robotic esophageal hiatal hernia repair combined with fundoplication[J]. *Chin J Pract Surg*, 2024, 44(7): 829-831. DOI: 10.19538/j. cjps. issn1005-2208.2024. 07.21.
- [50] 古丽帕丽·哈里甫, 克力木·阿不都热依木, 阿力木江·麦提斯依提. 腹腔镜下食管裂孔疝补片修补+短松Nissen胃底折叠术在猪动物模型中的应用[J]. *中华胃食管反流病电子杂志*, 2016, 3(4):176-178. DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-6899.2016.04.010.  
Gulipali Halifu, Kelimu Abudureyimu, Alimujiang Maisiyiti. The application of laparoscopic hiatal hernia repair and short fold Nissen fundoplication in swine models[J]. *Chin J Gastroesoph Reflux Dis (Electron Ed)*, 2016, 3(4):176-178. DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-6899.2016.04.010.
- [51] JANSEN M, OTTO J, LYNEN JANSEN P, et al. Mesh migration into the esophageal wall after mesh hiatoplasty: comparison of two alloplastic materials[J]. *Surg Endosc*, 2007, 21(12):2298-2303. DOI:10.1007/s00464-007-9514-3.
- [52] 买买提·伊斯热依力, 阿力木江·麦斯依提, 艾克拜尔·艾力, 等. 不同材质补片固定大鼠膈肌后的炎症反应、粘连及补片皱缩情况对比研究[J]. *中国普通外科杂志*, 2023, 32(4):548-556. DOI:10.7659/j.issn.1005-6947.2023.04.009.  
MAIMAITI-Yisireyili, ALIMUJIANG-Maisiyiti, AIKEBAIER-Aili, et al. Comparative study of inflammatory reaction, adhesion and mesh shrinkage following diaphragmatic fixation with different types of meshes in rats[J]. *Chin J Gen Surg*, 2023, 32(4):548-556. DOI:10.7659/j.issn.1005-6947.2023.04.009.
- [53] BRODY F J, HUNT J, SACKIER J. Transthoracic induction of a hiatal hernia in domestic swine[J]. *Surg Endosc*, 1998, 12(8):

- 1061-1063. DOI:10.1007/s004649900781.
- [54] SMITH G S, HAZEBROEK E J, ECKSTEIN R, et al. Evaluation of DualMesh for repair of large hiatus hernia in a porcine model [J]. *Surg Endosc*, 2008, 22(7):1625-1631. DOI:10.1007/s00464-007-9669-y.
- [55] DESAI K M, DIAZ S, DORWARD I G, et al. Histologic results 1 year after bioprosthetic repair of paraesophageal hernia in a canine model[J]. *Surg Endosc*, 2006, 20(11):1693-1697. DOI:10.1007/s00464-006-0680-5.
- [56] 谭波, 张钺, 杨佳强, 等. 创伤性脑疝患者去骨瓣减压术后脑积水危险因素分析以及贝叶斯网络模型构建[J]. *中国现代神经疾病杂志*, 2024, 24(6):442-449. DOI:10.3969/j.issn.1672-6731.2024.06.005.
- TAN B, ZHANG Y, YANG J Q, et al. Risk factors analysis and Bayesian network model construction of Hydrocephalus after decompressive craniectomy in patients with cerebral hernia after traumatic brain injury[J]. *Chin J Contemp Neurol Neurosurg*, 2024, 24(6):442-449. DOI:10.3969/j.issn.1672-6731.2024.06.005.
- [57] 吴红月, 朱晓玲, 牟思瞳, 等. 超声测量视神经鞘直径评估猪急性颅内高压合并脑疝的研究[J]. *蛇志*, 2022, 34(2):163-166. DOI:10.3969/j.issn.1001-5639.2022.02.005.
- WU H Y, ZHU X L, MOUS T, et al. Evaluation of acute intracranial hypertension with cerebral hernia in swine by ultrasonic measurement of optic sheath diameter[J]. *J Snake*, 2022, 34(2):163-166. DOI:10.3969/j.issn.1001-5639.2022.02.005.
- [58] 胡旭, 董吉荣, 蔡学见, 等. 脑中心疝动物模型的建立[J]. *中华神经外科杂志*, 2012, 28(9):953-956. DOI:10.3760/cma.j.issn.1001-2346.2012.09.030.
- HU X, DONG J R, CAI X J, et al. Animal Models of brain central herniation[J]. *Chin J Neurosurg*, 2012, 28(9):953-956. DOI:10.3760/cma.j.issn.1001-2346.2012.09.030.
- [59] EAST B, WOLESKÝ J, DIVÍN R, et al. Liquid resorbable nanofibrous surgical mesh: a proof of a concept[J]. *Hernia*, 2022, 26(2):557-565. DOI:10.1007/s10029-022-02582-1.
- [60] DING X Z, ZHU J C, LIU A N, et al. Preparation and biocompatibility study of contrast-enhanced hernia mesh material[J]. *Tissue Eng Regen Med*, 2022, 19(4):703-715. DOI:10.1007/s13770-022-00460-6.
- [61] 夏建福, 袁航, 陈浩, 等. 三维打印技术在腹部外科的应用与局限性[J]. *腹腔镜外科杂志*, 2021, 26(5):388-391. DOI:10.13499/j.cnki.fqjwkzz.2021.05.388.
- XIA J F, YUAN H, CHEN H, et al. Application and limitation of three-dimensional printing technology in abdominal surgery [J]. *J Laparosc Surg*, 2021, 26(5):388-391. DOI:10.13499/j.cnki.fqjwkzz.2021.05.388.
- [62] 张海光, 汪辉, 胡庆夕. 3D打印器官源脱细胞外基质血管支持补片重建腹壁的组织工程方法[J]. *上海大学学报(自然科学版)*, 2023, 29(2):234-243. DOI:10.12066/j.issn.1007-2861.2468.
- ZHANG H G, WANG H, HU Q X. Tissue engineering approach for abdominal wall reconstruction using 3D printed vascular supportive patches made of organ-derived decellularized extracellular matrix[J]. *J Shanghai Univ Nat Sci Ed*, 2023, 29(2):234-243. DOI:10.12066/j.issn.1007-2861.2468.
- [63] BHARADWAJ S N, RAIKAR C H, DUMANIAN G A, et al. Novel mesh suture may resist bone cutting seen with wire-based sternal closures[J]. *JTCVS Tech*, 2023, 20:130-137. DOI:10.1016/j.xjtc.2023.06.002.
- [64] DUMANIAN G A. Suturable mesh demonstrates improved outcomes over standard suture in a porcine laparotomy closure model[J]. *Plast Reconstr Surg Glob Open*, 2021, 9(10):e3879. DOI:10.1097/GOX.0000000000003879.
- [65] SCHEIBER C J, KURAPATY S S, GOLDMAN S M, et al. Suturable mesh better resists early laparotomy failure in a cyclic ball-burst model[J]. *Hernia*, 2020, 24(3):559-565. DOI:10.1007/s10029-020-02133-6.
- (收稿日期:2024-08-21 修回日期:2024-12-03)  
(本文责任编辑:丁宇菁)

#### [引用本文]

费彬, 郭文科, 郭建平. 疝疾病动物模型研究及新型疝修补材料应用进展[J]. *实验动物与比较医学*, 2025, 45(1): 55-66. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.121.

FEI B, GUO W K, GUO J P. Research progress on animal models for hernia diseases and new hernia repair materials[J]. *Lab Anim Comp Med*, 2025, 45(1): 55-66. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.121.



常亮堂, 高级实验师, 中国科学院脑科学与智能技术卓越创新中心实验动物中心狨猴主管。主要从事实验狨猴饲养繁殖和技术服务管理, 以及非人灵长类实验动物的行为学实验等科学研究工作。现管理的狨猴动物房拥有1 000余只狨猴, 是国内最大的实验狨猴种群, 且带领一支高水平、专业的狨猴饲养繁殖技术人员和兽医团队。参与国家科技部“科技创新2030-脑科学与类脑研究”、中国科学院战略先导专项、中国科学院青年团队、国家自然科学基金面上项目等课题项目。擅长利用非人灵长类动物猕猴和狨猴进行高级认知行为学研究, 掌握建立猕猴镜像自我识别模型的核心训练技术。所在团队建立了国际上首个猕猴镜像自我识别自我意识模型, 相关成果以第一作者发表在 *Current Biology* 和 *PNAS* 等期刊。

## 一套无抓捕应激的实验狨猴椅设计及其初步应用

徐圣业<sup>1,2</sup>, 黄俊锋<sup>1,3</sup>, 陈一航<sup>1,2</sup>, 常亮堂<sup>1</sup>

(1. 中国科学院脑科学与智能技术卓越创新中心实验动物中心, 上海 200031; 2. 南京医科大学基础医学院, 南京 210029; 3. 临港实验室, 上海 201602)

**[摘要] 目的** 为避免实验狨猴因直接抓捕引发应激反应的问题, 提高狨猴在行为学、双光子成像和电生理等实验中的适应性和实验效率, 研制一种无须抓捕即可将狨猴保定的实验猴椅装置。**方法** 通过3D图形设计和打印, 制作一套可在狨猴实验时配合使用的转运笼和猴椅。首先将转运笼与实验饲养笼的食盆出口对接, 轻微驱赶狨猴进入转运笼, 之后将转运笼与猴椅连接, 再次轻微驱赶狨猴进入猴椅, 保定后进行后续实验。通过观察转运和保定的时间效率、狨猴的配合度以及应激反应等进行有效性测试和改进。**结果** 经过测试与改进, 该装置可以在无须抓捕的情况下, 顺利完成狨猴的保定, 显著提高了实验的流畅度和效率。随着操作次数的增加, 狨猴会更加配合, 操作速度加快, 实验效率得到了显著提升。使用该装置后, 实验狨猴的应激反应明显减少。特别是与传统的抓捕方法相比, 使用该装置能显著减少狨猴的焦虑和不适, 提高了其在实验中的配合度。**结论** 本团队设计的猴椅装置能够在无须抓捕的情况下轻松实现狨猴的保定, 在确保后续实验顺利进行的同时, 还能保障动物福利。该装置具有操作简便、实用性强、成本低等优点, 易于推广使用。

**[关键词]** 普通狨猴; 猴椅; 保定; 应激

**[中图分类号]** Q95-33; Q-337 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2025)01-0067-06



## Design of a Capture Stress-Free Marmoset Monkey Chair Device for Experiments and Its Preliminary Application

XU Shengye<sup>1,2</sup>, HUANG Junfeng<sup>1,3</sup>, CHEN Yihang<sup>1,2</sup>, CHANG Liangtang<sup>1</sup>

(1. Laboratory Animal Center, Center for Excellence in Brain Science and Intelligence Technology, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China; 2. School of Basic Medical Sciences, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China; 3. Lingang Laboratory, Shanghai 201602, China)

Correspondence to: CHANG Liangtang (ORCID: 0009-0000-5308-3792), E-mail: changliangtang@ion.ac.cn

**[ABSTRACT] Objective** To avoid stress responses in experimental monkeys caused by direct capture, and to improve the adaptability and experimental efficiency of marmosets in behavioral, two-photon imaging, and electrophysiological experiments, a device for immobilizing marmosets without the need for capture is developed. **Methods** A set of compatible transport cage and monkey chair was produced through 3D graphic design and printing. First, the transport cage was aligned with the feeding outlet of the

**[第一作者]** 徐圣业(1996—), 男, 博士研究生, 研究方向: 灵长类语音交流神经机制研究。E-mail: 907092079@qq.com

**[通信作者]** 常亮堂(1982—), 男, 硕士, 高级实验师, 研究方向: 灵长类行为实验研究。E-mail: changliangtang@ion.ac.cn. ORCID: 0009-0000-5308-3792

experimental housing cage, and the marmoset was gently guided into the transport cage. Then, the transport cage was connected to the monkey chair, and the marmoset was gently guided into the chair for immobilization. Subsequent experiments were carried out afterward. The effectiveness was evaluated by observing the efficiency of transport and immobilization, the marmoset cooperation level, and stress responses. **Results** After testing and improvements, the device successfully completed immobilization of marmosets without the need for capture, significantly improving the fluency and efficiency of the experiment. As the number of operations increased, the marmosets became more cooperative, and the operation speed was significantly enhanced. After using the device, the stress responses were noticeably reduced, with marmosets showing lower stress levels. In particular, compared to traditional capture methods, the use of this device significantly reduced marmoset anxiety and discomfort, increasing their cooperation levels during the experiment. **Conclusion** The monkey chair device designed allows for restraint of marmosets without the need for capture, ensuring smooth progress of subsequent experiments while also safeguarding animal welfare. This device is easy to operate, highly practical, cost-effective, and has great potential for widespread application.

**[Key words] Common marmoset; Monkey chair; Restraint device; Stress**

普通狨猴 (common marmoset, 拉丁学名为 *Callithrix jacchus*) 是一种新大陆猴, 属于灵长目卷尾猴科狨亚科狨属的一种。随着医学、生命科学, 尤其脑科学研究的不断深入, 使用狨猴作为实验动物开展研究越来越广泛, 而在动物实验过程中常常需要将狨猴适当保定后进行行为训练、药物注射等实验。目前, 国内外大多采用抓捕的方式使狨猴进入保定装置<sup>[1-4]</sup>。然而, 狨猴是一种易应激的实验动物<sup>[5]</sup>, 其应激因素包括环境变化 (如噪声、光照、温度波动, 以及转运过程)、社会因素 (如孤立或群体竞争)、实验操作 (如身体约束和频繁操作) 和健康问题等。这些应激反应往往会影响实验效率, 并降低实验结果的可靠性。因此, 在实验过程中, 应尽量避免直接抓捕保定, 减少狨猴应激反应, 以防对实验的顺利进行或实验结果带来不利影响。为此, 本研究团队设计了一套无须抓捕即可将狨猴保定, 进而顺利开展动物实验的猴椅。现将结果报告如下, 以供同行参考借鉴。

## 1 技术方案

### 1.1 设计思路

本研究团队使用狨猴进行的行为学实验、双光子成像实验和电生理实验中, 均需要猴椅这一保定装置。实验狨猴常规上猴椅的步骤如下: (1) 将实验转运笼挂在实验饲养笼食盆口处; (2) 通过挤压方式将狨猴驱赶至转运笼内; (3) 将装有狨猴的转运笼移至实验室, 通过防咬手套抓捕并保定狨猴, 然后上猴椅进行保定; (4) 开展相关实验。由于用防咬手套抓捕并保定狨猴这一步骤对狨猴的刺激非常大。狨猴发生应激

反应常常会导致实验进展缓慢甚至受阻。因此, 本团队设计转运笼与猴椅共两部分, 实验前将转运笼与猴椅对接, 通过轻微挤压或者驱赶, 使狨猴无须抓捕即可从转运笼转移至猴椅, 进而进行保定操作, 开展相应的实验。

### 1.2 转运笼的设计及材质结构

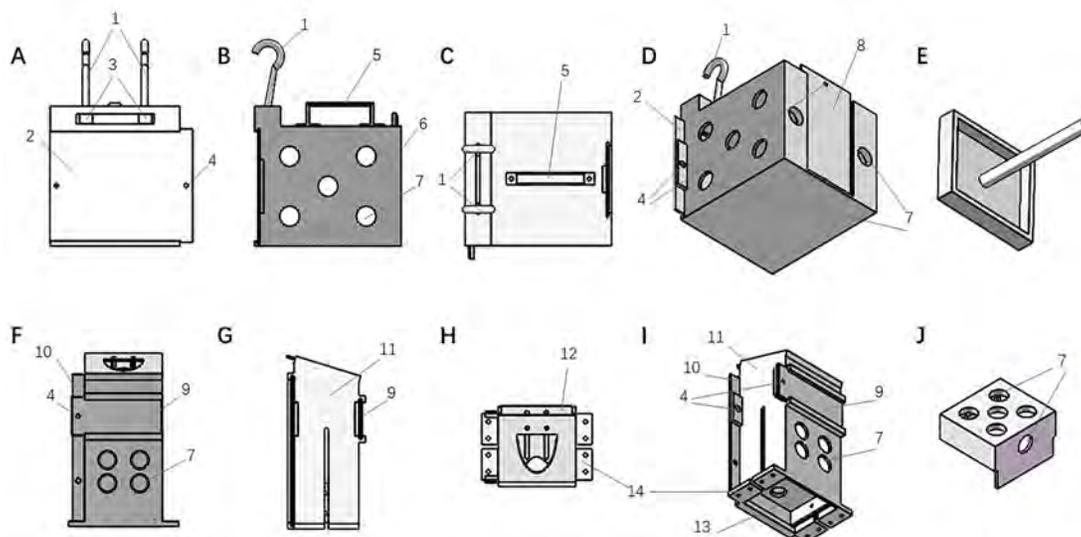
转运笼的设计功能是保证将动物转运到猴椅进行保定。具体包括: (1) 转运笼与实验饲养笼的食盆出口对接, 通过挤压方式轻微驱赶实验狨猴进入转运笼中; (2) 能够与猴椅进行对接, 使实验人员通过轻微驱赶即可将实验狨猴引导至猴椅中; (3) 在转运过程中, 能够观察到动物的状态。

转运笼结构如图1所示。转运笼主体与其他5个部分 (包括挂钩、后挡板、可移动挂钩配套螺母固定块、提手、前挡板) 通过螺丝或者卡槽固定在一起 (实体见图2A)。图1E中的推板 (实体见图2B) 为转运笼的辅助工具, 用于驱赶狨猴进入猴椅。

转运笼各部件包括后挡板、可移动挂钩配套螺母固定块、提手、主体、前挡板, 均通过图形软件设计, 方便根据实验需求调整, 并通过3D打印完成。转运笼部件的材质为3D打印用丙烯腈-苯乙烯-丁二烯共聚物 (acrylonitrile butadiene styrene, ABS) 树脂, 能够满足实验需求, 易于清洗消毒。挂钩材质采用不锈钢, 需要承受整个转运笼和狨猴的重量, 同时便于清洁消毒。

### 1.3 猴椅的设计及材质结构

猴椅的设计功能包括: (1) 能够与转运笼进行对接, 实验人员可通过驱赶训练方式将实验狨猴引导至

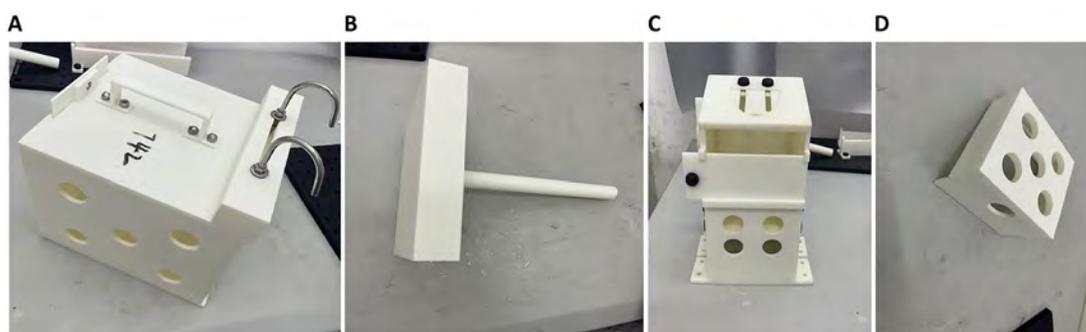


注：A，转运笼前视图；B，转运笼左视图；C，转运笼俯视图；D，转运笼侧视图；E，推板；F，猴椅前视图；G，猴椅左视图；H，猴椅俯视图；I，猴椅侧视图；J，防冲罩。1，挂钩；2，转运笼后挡板；3，可移动挂钩配套螺母固定块；4，挡板锁紧螺母孔；5，提手；6，转运笼主体；7，圆形观察孔；8，转运笼前挡板；9，猴椅前挡板；10，猴椅后挡板；11，猴椅主体；12，猴椅卡板；13，可升降底座；14，猴椅固定脚。

Note: A, Front view of the transport cage; B, Left view of the transport cage; C, Top view of the transport cage; D, Side view of the transport cage; E, Push plate; F, Front view of the monkey chair; G, Left view of the monkey chair; H, Top view of the monkey chair; I, Side view of the monkey chair; J, Anti-collision cover. 1, Hook; 2, Rear panel of the transport cage; 3, Movable hook nut fixture block; 4, Locking nut hole for the panel; 5, Handle; 6, Main body of the transport cage; 7, Circular observation hole; 8, Front panel of the transport cage; 9, Front panel of the monkey chair; 10, Rear panel of the monkey chair; 11, Main body of the monkey chair; 12, Monkey chair clamping plate; 13, Adjustable base; 14, Fixed legs of the monkey chair.

图1 转运笼和猴椅的结构示意图

Figure 1 Schematic diagram of the transport cage and monkey chair



注：A，转运笼；B，推板；C，猴椅；D，防冲罩。

Note: A, Transport cage; B, Push plate; C, Monkey chair; D, Anti-collision cover.

图2 转运笼和猴椅的实体照片

Figure 2 Photos of the transport cage and monkey chair

猴椅中；(2) 打开猴椅卡板（图1-12），待狨猴伸出头部，立即收紧猴椅卡板对狨猴颈部进行束缚和保定，卡板的位置可以根据狨猴颈部的大小进行调节，或更换不同尺寸的卡板；(3) 通过调节可升降底座，使狨猴在猴椅中更容易适应；(4) 当需要狨猴使用前肢进行实验操作时，可拆卸或更换前挡板；(5) 当需要狨

猴头部保定以进行实验操作时，可以通过加装固定器装置，与固定头柱相连，进行狨猴头部的保定控制；(6) 圆形观察孔则用于观察狨猴的状态。

猴椅结构如图1所示，分为猴椅主体与其他5个部分（包括前挡板、后挡板、卡板、可升降底座和固定脚），主体与这些部分通过M6螺母或者卡槽固定在一

起(实体见图2C)。图1J中的防冲罩(实体见图2D)为辅助工具,用于防止狨猴在卡住颈部和松开颈部时冲出猴椅。

猴椅主体和配件均通过图形软件设计,方便根据实验需求调整,并通过3D打印完成。猴椅材质均为3D打印用ABS树脂,能够满足实验需求,且易于清洗消毒。

## 1.4 转运笼及猴椅配套使用方法

### 1.4.1 上猴椅过程

首先利用提手,通过挂钩,将转运笼整体挂在实验饲养笼上,并与打开的食盆出口对接,保证转运笼前挡板处于关闭状态;打开转运笼后挡板,通过实验饲养笼的挤压杆将狨猴驱赶至转运笼中,立刻关闭转运笼后挡板;通过转运笼主体上的圆形观察孔,可以观察狨猴在转运过程中的状态。将装有狨猴的转运笼前挡板与猴椅后挡板对接牢固后,将转运笼前挡板与猴椅后挡板同时打开,可通过轻微拍打转运笼,让狨猴进入猴椅;或者用辅助工具推板(图1E和图2B)的挡板遮盖转运笼后挡板,然后将转运笼后挡板撤掉,用手抓住辅助工具手柄,缓慢往猴椅侧推动,以驱赶狨猴进入猴椅。保证防冲罩(图1J和图2D)固定在猴椅上,打开猴椅卡板,待狨猴伸出头部,立即收紧猴椅卡板对狨猴颈部进行束缚和保定;拆卸防冲罩,即可进行后续实验。可根据实验需求固定头部,拆卸或更换前挡板。

### 1.4.2 下猴椅过程

实验后,狨猴从猴椅返回饲养笼的过程与其上猴椅的顺序相反。首先要将防冲罩固定,然后松开猴椅卡板,狨猴返回转运笼,通过转运笼对接返回饲养笼。操作过程中应密切注意衔接处稳固,防止动物逃逸。

## 1.5 测试与改进

转运笼最初设计时采用了固定位置的挂钩。后期考虑到不同饲养笼的悬挂范围不一样,将设计改进为可移动的挂钩螺母固定块。这样可以根据不同饲养笼的需求调整挂钩的位置。为确保这一改进的有效性,本研究团队进行了为期2周的实地测试,重点关注挂钩的稳定性、调整灵活性、结构耐久性和时间效率。测试中发现,螺母固定块在频繁调节时可能出现微小松动,影响稳定性。因此,进一步优化了螺母的紧固设计,加入了防松垫片以提高稳定性,同时让固定块在槽中可以快速移动,简化了操作步骤。

改进后的优点和效果包括:(1)转运笼适配狨猴

饲养笼,可以通过移动挂钩位置来适应不同的狨猴饲养笼;(2)猴椅底座可以升降,卡板可以更换为不同规格,以适应不同体型的狨猴;(3)转运笼和猴椅均为树脂材质,不仅轻便、耐用、方便清洗与消毒,并且对狨猴无刺激;(4)转运笼和猴椅外壳上的圆形观察孔有利于通风和观察狨猴的状态。

## 2 初步应用结果

使用该设备可以无须抓捕就能将未经训练的狨猴保定在猴椅上进行实验。具体操作流程:先引导狨猴从饲养笼进入转运笼,随后实验人员将转运笼移至实验室内;接着,把转运笼的前挡板与猴椅的后挡板精准对接,移除挡板后,轻轻驱赶狨猴进入猴椅,即可开始实验;实验完毕,撤掉猴椅的后挡板,狨猴就能自行返回转运笼,随后被送回饲养笼。对于初次使用该设备的狨猴,整个操作过程一般耗时5~6 min,参见视频1(请至文末扫描二维码,或见期刊官网的增强出版视频)。而对于经过长期训练并已熟悉设备的狨猴,上述流程会更高效,整个过程可缩短至2~3 min,参见视频2(请扫文末二维码,或见期刊官网)。

目前,该设备已经成功应用于多项狨猴在头部固定状态下的行为学实验。例如,狨猴通过主动拉杆获得水奖励的舔水任务实验,以及通过气味刺激进行选择判断的行为实验等,参见视频3(请扫文末二维码,或见期刊官网)。此装置在狨猴舔水过程中,已连接电容传感器记录舔水的次数和时长,实现自动化数据采集。此外,在进行狨猴气味抉择实验时,气味刺激通过美国National Instruments公司的NI卡(USB-6009)进行数据采集,后续可用Matlab R2024a软件进行数据分析。这些实验过程中,该设备提供了稳定的固定和操作平台,有效减少了狨猴的应激反应,保证了实验的顺利进行。

## 3 讨论

本团队设计了一种新型的无抓捕应激性狨猴保定猴椅装置,包括转运笼和猴椅,旨在提高狨猴在接受训练和研究过程中的舒适度和安全性,保障实验的准确性和效率,以及提高实验动物福利。传统的抓捕狨猴上猴椅的方式往往会使狨猴产生应激反应,影响其行为和生理指标的准确性。为了克服这些问题,在设计过程中考虑了以下几个关键因素。(1)舒适性设计:材料选择不会引起刺激的树脂,并且通过可更换可移

动的卡板和底座对狨猴进行保定，可以适应不同体型的狨猴，提供良好的支撑和舒适的体位，减少长时间固定带来的不适。(2) 安全性保障：采用螺母固定的方式，可确保狨猴在转运和上猴椅过程中不会逃脱。(3) 操作便捷性：转运笼和猴椅的各个部分能够拆卸，可以根据实验需要进行调整和更换；另外，树脂材质相对不锈钢更加轻便，便于清洁和维护；同时在设计上考虑了实验人员的操作便捷性，减少对狨猴的直接接触和干扰。(4) 实验准确性：转运笼和猴椅设计稳固，不易摇晃，确保在实验过程中狨猴保持稳定，减少外界因素对实验结果的影响；更为重要的是，整个上下猴椅流程简单，操作时间短，狨猴应激小，可有效保障实验数据的准确性。因此，本团队设计的新型转运笼和猴椅不仅提升了狨猴的舒适度和安全性，还为实验提供了更加稳定和准确的条件。这种人性化的设计理念不仅体现了研究人员对动物福利的重视，也有助于提高实验结果的可靠性和有效性。

需要说明，在实验过程中应注意该猴椅的使用范围。(1) 最佳适用场景是长期需要上猴椅进行清醒状态的狨猴实验，或者抓捕过程会明显影响狨猴表现和研究结果的实验。比如主动拉杆舔水任务实验，是一个长期训练的实验，每次实验都要求狨猴在清醒状态下上猴椅，如果抓捕后上猴椅，会造成狨猴应激，造成行为实验的不稳定。因此，这类实验非常适合使用该猴椅。(2) 推荐使用场景是短期上猴椅实验，即使有抓捕过程也不会影响实验表现和结果，但是从动物福利的角度推荐使用本装置。例如行为学实验、双光子成像和电生理实验等<sup>[1-4]</sup>，笔者也推荐可以用本装置提高动物福利。另外，本装置中转运笼和猴椅可以分开使用，转运笼可以作为普通转运笼使用，搭配其他猴椅或者实验装置使用。猴椅单独使用时也可采取直接抓捕方式上猴椅。(3) 不适合使用场景是需要狨猴采取俯卧式进行的实验，比如清醒狨猴核磁实验需要设计俯卧式保定装置<sup>[6]</sup>。

另外，在使用过程中遇到以下问题时，建议采取相应辅助措施。(1) 某些狨猴在实验前期，由于不愿意上猴椅，或者对实验训练产生抗拒行为，不愿意从饲养笼进入转运笼，或者不愿意从转运笼进入猴椅，都会造成上猴椅的难度增加和时间延长。这时可以通过使用挤压笼和辅助工具推板(图1E和图2B)进行主动驱赶。随着训练时间延长，完成任务获得奖励越来越多，这种情况会逐渐改善，最终到达熟练状态，只需轻微或者无须驱赶就能完成上猴椅。(2) 某些狨猴

在实验前期，由于被猴椅卡板卡住颈部，产生抗拒行为，不主动把头从猴椅伸出，无法进行保定颈部操作。这时可以通过食物诱导，适当加上禁食，增加配合动力来解决。随着训练时间延长，完成任务获得奖励越来越多，这种情况会逐渐改善，最终达到熟练状态，主动伸出头部，完成保定操作。(3) 某些狨猴在猴椅中会不停转动，无法进行实验。这时可通过安装转头柱进行头部固定解决。

综上所述，本团队设计的无抓捕应激狨猴保定猴椅装置已在科研领域发挥重要作用，相信将其作推广应用会推动狨猴相关研究的进一步发展。本装置已提交专利申请，猴椅的发明专利申请号为202510218404.6，转移笼的实用新型专利申请号为202520318181.6，本文发表前处于审查阶段。另外，本装置可能需要配合挤压饲养笼使用，挤压饲养笼是由常规狨猴饲养笼改造设计定制而成。如需要转运笼、猴椅及挤压饲养笼的图纸设计相关信息，可联系本团队。

附件：



视频1



视频2



视频3

#### [医学伦理声明 Medical Ethics Statement]

本研究所涉及的所有动物实验均已通过中国科学院脑科学与智能技术卓越创新中心生命科学伦理委员会的相关项目审查(项目序号: CEBSIT-2021055)。所有实验过程均遵照中国实验动物相关法律条例要求进行。

All animal experiments involved in this study have been reviewed and approved by the Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) of the Center for Excellence in Brain Science and Intelligence Technology (CEBSIT), Chinese Academy of Sciences (Project Number: CEBSIT-2021055). All experimental procedures were conducted in accordance with relevant laws and regulations regarding laboratory animals in China.

#### [作者贡献 Author Contribution]

徐聖业负责图纸设计，装置测试改进，论文撰写与修改；  
黄俊锋参与装置测试改进，参与文章撰写思路探讨、论文审核及修改；  
陈一航参与装置测试改进，参与文章撰写思路探讨；  
常亮堂负责装置的设计思路，撰写方案策划，论文审核及修改。

**[利益声明 Declaration of Interest]**

所有作者均声明本文不存在利益冲突。

**[参考文献 References]**

- [1] 李星怡, 谌小维. 实验用绒猴座椅: CN108095851A[P]. 2018-06-01.  
LI X Y, CHEN X W. Chair for experimental marmoset: CN108095851A[P]. 2018-06-01.
- [2] WAKABAYASHI M, KOKETSU D, KONDO H, et al. Development of stereotaxic recording system for awake marmosets (*Callithrix jacchus*)[J]. Neurosci Res, 2018, 135:37-45. DOI: 10.1016/j.neures.2018.01.001.
- [3] JOHNSTON K D, BARKER K, SCHAEFFER L, et al. Methods for chair restraint and training of the common marmoset on oculomotor tasks[J]. J Neurophysiol, 2018, 119(5):1636-1646. DOI: 10.1152/jn.00866.2017.
- [4] SEDAGHAT-NEJAD E, HERZFELD D J, HAGE P, et al. Behavioral training of marmosets and electrophysiological recording from the cerebellum[J]. J Neurophysiol, 2019, 122(4):

1502-1517. DOI: 10.1152/jn.00389.2019.

- [5] PEREIRA L C, MAIOR R S, BARROS M. Rightward tympanic membrane temperature bias during acute restraint-isolation stress in marmoset monkeys[J]. Front Neurosci, 2019, 13:913. DOI: 10.3389/fnins.2019.00913.
- [6] SILVA A C, LIU J V, HIRANO Y, et al. Longitudinal functional magnetic resonance imaging in animal models[J]. Methods Mol Biol, 2011, 711:281-302. DOI: 10.1007/978-1-61737-992-5\_14.

(收稿日期: 2024-07-13 修回日期: 2024-10-16)

(本文责任编辑: 张俊彦)

**[引用本文]**

徐圣业, 黄俊锋, 陈一航, 等. 一套无抓捕应激的实验猕猴椅设计及其初步应用[J]. 实验动物与比较医学, 2025, 45(1): 67-72. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.097.

XU S Y, HUANG J F, CHEN Y H, et al. Design of a capture stress-free marmoset monkey chair device for experiments and its preliminary application[J]. Lab Anim Comp Med, 2025, 45(1): 67-72. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.097.

\*\*\*\*\*

## 2025年版 ICMJE 推荐规范更新内容说明

2025年1月, 国际医学期刊编辑委员会 (International Committee of Medical Journal Editors, ICMJE) 发布《学术研究实施与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》(Recommendations for the Conduct, Reporting, Editing and Publication of Scholarly Work in Medical Journals) 更新版, 简称“2025年版 ICMJE 推荐规范”。现将主要的更新内容介绍如下。完整的中文翻译版和正式的英文原版本请见 [www.icmje.org](http://www.icmje.org)。若需引用, 请用英文官方版本。

### 更新主题1: 掠夺性或假期刊 (II.C.1.a)

II.C.1.a 节新增“多个组织推出的指南可以用于帮助识别声誉良好的同行评议期刊的特征 (详见 [www.wame.org/identifying-predatory-or-pseudo-journals](http://www.wame.org/identifying-predatory-or-pseudo-journals)、[www.wame.org/principles-of-transparency-and-best-practice-in-scholarly-publishing](http://www.wame.org/principles-of-transparency-and-best-practice-in-scholarly-publishing) 和 <https://icmje.org/news-and-editorials/predatory-journals-editorial.pdf>)。

### 更新主题2: 期刊同行评审过程中的时效性和响应性、多元性和包容性 (II.C.2.b 和 II.C.2.e)

II.C.2.b 节新增: 期刊应该及时回应作者想要了解稿件所处状态的请求。如果作者真诚地提交了撤稿请求, 即使没有收到期刊的确认回复, 也可以认为稿件已被撤回。

II.C.2.e 节新增: 在公开展示人物图像时, 要注意尊严、平等和团结的价值观: 避免使用描绘处于困境或脆弱处境, 或者可能固化偏见或刻板印象的人物图像。应考虑这些图像是否确实对理解文稿有必要。

### 更新主题3: 更正和版本管理 (III.A)

III.A 节修改: 无意的错误 (honest errors) 是科学与出版的一个部分。当发现错误时, 应发布更正启事。对出版时本应注意到的事实错误进行更正很有必要的。争议本身、科学演进、方法改进不属于错误。这些问题最好以给编辑写信、发布印刷或电子版的读者来信、在期刊主办的在线论坛上发帖, 或发表最新出版物等形式解决。

III.A 节新增: 实际上, 由于作者或基础数据的可及性问题, 要公正地评判和纠正过去 (例如超过10年) 发表论文中的潜在错误可能更加困难。此外, 这些纠正可能对科学或临床实践的影响较小。在这种情况下, 编辑可以合理地决定不进行更正。

### 更新主题4: 作者在引用参考文献准确性方面的责任 (IV.A.3.g.i)

IV.A.3.g.i 节修改: 作者负责准确引用参考文献, 并应该核对所引用的参考文献可以支持文稿中相关陈述。为尽量减少参考文献引用错误, 应使用如 PubMed 这样的文献目录或原始文献来核实参考文献。

此外, ICMJE 还发表了一篇社论《掠夺性期刊: 我们能为保护受害者做些什么?》(<https://icmje.org/news-and-editorials/predatory-journals-editorial.pdf>), 强调了掠夺性期刊和假期刊所带来的危险。

(张俊彦、于笑天、汪源摘译)

# 不同光照时长对 NIH 小鼠体重和学习记忆能力的影响

张楠, 李怀银, 连晓娣, 魏娟鹏, 高明

(兰州生物制品研究所有限责任公司, 兰州 730046)

**[摘要]** **目的** 研究不同光照时长对发育期 NIH 小鼠体重和学习记忆能力的影响。**方法** 实验选取体重相近的发育期 NIH 小鼠 40 只, 雌雄各半。小鼠经每天 12 h 光照时长适应性饲养 1 周后, 被随机分为每天 0、6、12、18、24 h 光照时长组, 每组 8 只, 实验周期为 7 周, 其中前 5 周为不同光照时长条件下的饲养阶段, 后 2 周为行为学实验阶段。通过体重监测以及 T 型迷宫、新位置识别和八臂迷宫等行为学实验, 分析光照时长对小鼠体重和学习记忆能力的影响。**结果** 在光照处理期间, 各组小鼠间的体重变化无显著差异 ( $P > 0.05$ ); 在光照处理第 2 周和第 3 周, 每天 24 h 光照时长组小鼠的体重增长量显著高于每天 0 h 和 6 h 光照时长组 ( $P < 0.05$ )。在光照处理 5 周后, T 型迷宫实验中, 每天 0 h 光照时长组小鼠的潜伏期时间极显著长于每天 12 h 光照时长组 ( $P < 0.01$ ); 每天 24 h 光照时长组小鼠的潜伏期时间显著长于每天 12 h 光照时长组 ( $P < 0.05$ )。新位置识别实验中, 每天 12 h 光照时长组小鼠的辨别指数和新位置观察时间均长于其他组, 且与每天 18 h 光照时长组差异极显著 ( $P < 0.01$ ), 与每天 24 h 光照时长组差异显著 ( $P < 0.05$ ); 八臂迷宫实验中, 每天 12 h 光照时长组小鼠找到饲料的时间、参考记忆错误比率和工作记忆错误比率均短于每天 0 h 光照时长组, 且差异显著 ( $P < 0.05$ ); 而每天 24 h 光照时长组小鼠的工作记忆错误比率高于每天 12 h 光照时长组, 且差异显著 ( $P < 0.05$ )。**结论** 每天 24 h 光照会影响 NIH 小鼠的体重增长, 而每天光照时长超过 18 h 或低于 6 h 会减弱 NIH 小鼠的学习记忆能力。

**[关键词]** NIH 小鼠; 光照时长; 体重; 学习记忆能力

**[中图分类号]** Q95-33; R-332 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2025)01-0073-06



## Effects of Different Durations of Light Exposure on Body Weight and Learning and Memory Abilities of NIH Mice

ZHANG Nan, LI Huaiyin, LIAN Xiaodi, WEI Juanpeng, GAO Ming

(Lanzhou Institute of Biological Products Co., Ltd., Lanzhou 730046, China)

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

**[ABSTRACT]** **Objective** This study aims to investigate the effects of varying durations of light exposure on body weight and learning and memory abilities of pubertal NIH mice. **Methods** Forty pubertal NIH mice, evenly split by gender and with similar initial weights, were subjected to a 12 h light-dark cycle for one week. They were then randomly assigned to groups with daily light exposure durations of 0, 6, 12, 18, and 24 hours, with 8 mice in each group. The experimental period lasted for 7 weeks, with the first 5 weeks as the feeding phase under different light exposure conditions, and the last 2 weeks as the behavioral testing phase. Their body weight was monitored, and learning and memory abilities were assessed using the T-maze, object location test, and eight-arm maze tests. **Results** During the light exposure period, there were no significant differences in body weight among groups ( $P > 0.05$ ). However, the weight gain of mice in the 24 h group was significantly higher than that of the 0 h group and the 6 h group during the second and third weeks of light exposure ( $P < 0.05$ ). After five weeks of light exposure, in the T-maze test, the latency time of the 0 h light exposure group was significantly longer than that of the 12 h group ( $P < 0.01$ ), and the latency time of the 24 h light exposure group was significantly longer than that of the 12 h group ( $P < 0.05$ ). In the object location test, the mice in 12 h group exhibited a higher discrimination index and spent more time observing the new

**[第一作者]** 张楠 (1996—), 男, 本科, 助理工程师, 研究方向为实验动物学。E-mail: 1765062156@qq.com。ORCID: 0009-0009-0481-956X

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

location compared to the other groups, with significant differences in comparison to the 18 h group ( $P<0.01$ ) and the 24 h group ( $P<0.05$ ). In the eight-arm maze test, the time to find food, the reference memory error rate, and the working memory error rate in the 12 h group were all lower than those in the 0 h group, with significant differences ( $P<0.05$ ). Moreover, the working memory error rate in the 24 h group was higher than that in the 12 h group, with significant differences ( $P<0.05$ ). **Conclusion** Continuous 24 h light exposure affects body weight gain, while light exposure durations exceeding 18 h or below 6 h per day weaken the learning and memory abilities of NIH mice.

**[Key words]** NIH mice; Light exposure duration; Body weight; Learning and memory abilities

对动物而言，环境光是使生物钟与外部时间同步的关键信号，不仅支持着小鼠对周围环境的认知及活动，也对动物体内激素平衡、神经反应、昼夜节律及繁殖等调节具有重要影响<sup>[1-5]</sup>。研究发现，光照变化可以引起动物肥胖和代谢异常<sup>[6]</sup>，产生抑郁样行为<sup>[7]</sup>，剥夺动物的学习记忆能力<sup>[8]</sup>。强光照刺激会使动物脑组织内发生应激和氧化损伤，诱发认知障碍<sup>[9]</sup>，同时会引起哺乳动物生理性紊乱和视网膜损伤，并导致学习记忆障碍<sup>[10]</sup>；因此，与正常动物相比，强光照刺激的动物会产生行为上的变化，从而影响一些以行为学评价为评估方法的疾病诊断和实验结果。很多关于光照对小鼠影响的研究<sup>[11-13]</sup>选取的小鼠不在小鼠发育的关键阶段，错过了对外界环境的敏感时期，且光照实验时间较短，未能更好地观察到其对小鼠产生的影响。所以，本实验选择发育期的小鼠作为研究对象，在离乳后至个体成熟的整个阶段进行不同时长光照处理。考虑到小鼠在部分行为学实验中可能因为需要训练而产生压力情绪，或因为小鼠自身运动障碍对行为学检测结果产生影响，本实验采用依靠动物自身的探索天性、无训练压力影响的T型迷宫实验和新位置识别实验，结合八臂迷宫实验来综合分析小鼠的学习记忆能力，排除了动物自身机能障碍对观察指标产生的影响。本研究为提高NIH小鼠在光照时长方面的动物福利，降低NIH小鼠自身对未来动物实验结果评估的影响提供了参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

3周龄体重相近的SPF级NIH小鼠40只，雌雄各半，均来源于兰州生物制品研究所有限责任公司实验动物室[SCXK(甘)2023-0001]，并饲养于屏障设施中[SYXK(甘)2023-0001]。

### 1.2 试剂与仪器

分析纯无水乙醇购自国药集团化学试剂有限公司(批号20230208)。T型迷宫、新位置识别探索箱和八

臂迷宫均由本实验室自制，用料为单层纸板箱，其内部表面粘有黑色塑料膜。T型迷宫和八臂迷宫跑道的长、宽、臂高均为30 cm×10 cm×30 cm；新位置识别探索箱是长、宽、高均为40 cm的正方体箱。电子秤购自上海友声衡器有限公司(型号BS-3000L)。

### 1.3 实验分组

选取体重相近的3周龄SPF级NIH小鼠40只，随机分为5组，每组8只，雌雄各半分笼(即每笼4只)进行预饲养。大鼠、小鼠维持饲料购自北京科澳协力饲料有限公司，满足动物营养需求。不同组的小鼠饲养在屏障系统同一区域的不同房间(此区域为其他区域维保时待用区，实验进行时为闲置状态)，环境条件：室温(23±2)℃，相对湿度维持在(60±5)%，动物笼盒长、宽、高为26 cm×15 cm×12 cm，聚丙烯PP塑料盒，锯末垫料。LED白光灯置于饲养盒上方30 cm处，光照强度为300 lx，光照时长为12 h，小鼠在此条件下适应7 d。于小鼠4周龄时，将5组的光照时长分别设置为每天0 h(光照剥夺)、6 h、12 h(对照组)、18 h和24 h(持续光照)。实验期间，小鼠共饲养7周，其中前5周为不同光照时长条件下的饲养阶段，除每周不超出0.5 h的称量动物体重、添加饲料和饮水、更换饲养盒等工作在工作照度下进行外，其余时间小鼠均处于实验设置的光照环境中；后2周为行为学实验阶段，八臂迷宫实验需要对小鼠限饲，需在最后进行，防止对其他行为学实验有影响。除行为学实验前训练时间和行为学实验时间在工作照度下进行外，其余时间小鼠同样均处于实验设置的光照环境中。实验结束后，各组小鼠均采用二氧化碳吸入法致死。本实验方案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福利伦理审批(审批编号：IACUC-LIBP-202402004)。

### 1.4 小鼠体重的测定

预饲养结束后称量小鼠体重。光照实验开始后，每周记录1次各组小鼠的体重，持续记录5周以进行统计分析。

## 1.5 T型迷宫实验

光照处理5周后,进行T型迷宫实验。实验开始前5 d,每天抓取、轻抚动物,使动物熟悉实验人员。实验开始时,将动物限制在T型迷宫的主干臂上10 s。解除限制,当动物自由选择一个目标臂(以尾尖进入目标臂为标准),将动物限制在目标臂上30 s,然后将动物放回主干臂。限制其在主干臂内10 s再进行下一轮实验;若动物60 s内没有进入任何臂,则记录实验失败,开始进行下一轮实验,每只动物共循环进行5次实验。用摄像装置记录动物连续进入不同臂的次数,这些次数为交替数,基于交替数来计算交替百分比,以评价动物的空间记忆能力,交替百分比越高则空间记忆能力越强,交替百分比(%)=(交替数/5)×100,以及选择的潜伏期(动物从主干臂解除限制后到进入一个目标臂之间的时间),来评价动物的运动能力和对环境探索的积极性,动物的积极性与运动能力越强则潜伏期越短,反之潜伏期越长。每只动物实验结束后用75%的乙醇溶液擦拭迷宫,待干燥后进行下一只动物实验。完成一个实验的上限时间为2 min,若动物超时,将其从迷宫中移出,放回饲养笼,这次实验视为无效,至少30 min后再次进行测试。

## 1.6 新位置识别实验

T迷宫实验结束1 d后进行新位置识别实验,将动物放入没有物体的实验箱中,适应3 d,每只每天10 min。3 d后在实验箱中放入两个完全相同的物体。打开摄像装置,将动物背向物体放入,进行5 min的识别活动,活动结束后用75%乙醇溶液对实验箱和物体进行擦拭。2 h后开始测试实验,将两物体中的一个移到新的位置。再次将动物背向物体放入并计时5 min,记录动物对两物体的识别时间;实验结束后,用75%乙醇溶液对实验箱和物体进行擦拭。识别行为为动物鼻子朝向物体,且鼻尖距离该物体2 cm以内。辨别指数=(新位置物体的识别时间-旧位置物体的识别时间)/识别总时长,辨别指数和新位置观察时间越长,则表示动物对新位置物体的兴趣更大,具有更好的空间记忆能力。

## 1.7 八臂迷宫实验

新位置识别实验结束1 d后,对各组小鼠进行限饲,每天每只仅给予正常饲料2~3粒,直至八臂迷宫实验结束。实验期间每天称量各组小鼠体重,保证每只小鼠体重不低于限饲前体重的85%。第2天,在八臂与中央区撒几粒饲料,每次将4只小鼠一起放入中央区,自由进食、探索10 min;第3天,重复第2天的

内容;第4天,每次放入1只动物,每个臂的外端放1粒饲料,小鼠自由摄食,饲料吃完或者10 min结束停止实验;第5天,重复第4天的内容;第6天摄像记录,随机选择4个臂外端放1粒饲料,将动物限制在迷宫中央30 s,然后让动物自由探索,直到动物将饲料吃完或10 min仍没吃完饲料,终止实验,每只动物进行5次重复实验,其间间隔1.5 h。动物去除气味方法同上。测试指标:工作记忆错误比率,即动物再次进入已经吃过饲料的臂中的次数/总入臂次数;参考记忆错误比率,即动物进入不曾放过饲料的臂中的次数/总入臂次数;找到饲料的时间,即臂门打开后至第一次找到饲料的时间,用工作记忆错误比率和参考记忆错误比率来评价动物的学习记忆能力,比率越高说明对记忆削弱的影响力越大,用找到饲料的时间来评价动物的运动活性,时间越短则运动活性越强。

## 1.8 数据分析

采用SPSS 26.0软件对实验结果进行统计分析,结果数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示。各组数据进行单因素方差分析(one-way ANOVA);当多组间有差异时,采用LSD多重比较方法进行两两比较分析。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

# 2 结果

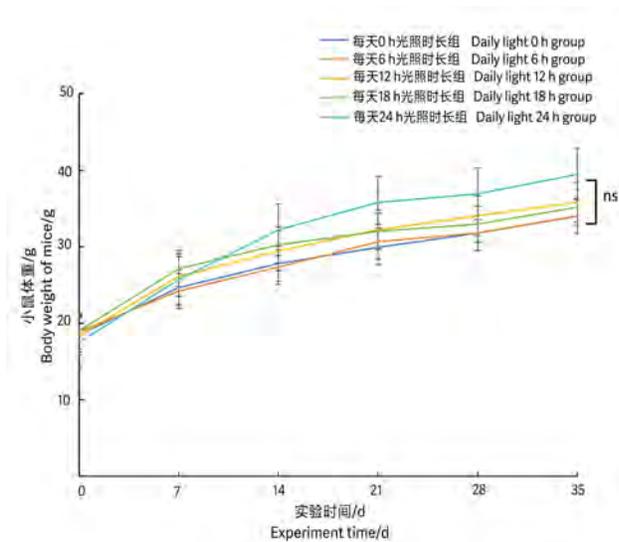
## 2.1 光照时长对小鼠体重变化的影响

由图1可知,5组小鼠在光照处理各阶段的体重无显著差异( $P>0.05$ )。比较光照处理各阶段的体重可知,光照处理1周后,每天6 h光照时长组小鼠体重增长量均小于其他组,且与每天12 h和18 h光照时长组小鼠相比差异显著( $P<0.05$ ),与每天24 h光照时长组小鼠相比差异极显著( $P<0.01$ );光照处理2周后,每天24 h光照时长组小鼠体重增长量均大于每天0 h和6 h光照时长组,且与每天0 h光照时长组小鼠相比差异显著( $P<0.05$ ),与每天6 h光照时长组小鼠相比差异极显著( $P<0.01$ );光照处理3周后,每天24 h光照时长组小鼠体重增长量均大于每天0 h和6 h光照时长组,且差异显著( $P<0.05$ );光照处理4周后,每天24 h光照时长组小鼠体重增长量大于每天6 h光照时长组,且差异显著( $P<0.05$ );光照处理5周后,各组小鼠体重增长量基本趋于一致( $P>0.05$ )。

## 2.2 光照时长对小鼠学习记忆能力的影响

### 2.2.1 T型迷宫实验结果

由表1可知,5组小鼠T型迷宫实验的潜伏期差异具有统计学意义:每天0 h光照时长组小鼠的潜伏期极



注: ns, 差异无统计学意义; 每组小鼠各8只。

Note: ns, differences were not statistically significant; There are 8 mice in each group.

图1 不同组别小鼠的体重变化

Figure 1 Changes in the body weight of mice in different groups

显著长于每天12 h光照时长组 ( $P < 0.01$ ); 每天24 h光照时长组小鼠的潜伏期显著长于每天12 h光照时长组 ( $P < 0.05$ )。对于T型迷宫实验的交替百分比, 5组小鼠间的差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 但是每天12 h光照时长组的交替百分比在所有组别中最高。

### 2.2.2 新位置识别实验结果

由表2可知, 5组小鼠新位置识别实验的辨别指数差异具有统计学意义: 与每天24 h光照时长组相比,

表1 5周光照实验后第1周光照时长对NIH小鼠T型迷宫实验结果的影响

Table 1 Effects of light exposure duration in the first week after a 5-week light experiment on the results of T-maze test in NIH mice

组别(每天光照时长)	潜伏期/s	交替百分比/%
Groups (daily light duration)	Incubation period/s	Alternation percentage/%
0 h	26.50±5.42**	0.53±0.18
6 h	18.86±3.60	0.48±0.26
12 h	17.86±3.44	0.60±0.24
18 h	17.00±5.18	0.42±0.20
24 h	22.75±4.43*	0.50±0.28

注: 以每天12 h光照时长组为对照组, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , 每组  $n=8$ 。

Note: The daily 12 h light exposure group was used as the control group, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ,  $n=8$ .

每天12 h光照时长组小鼠的辨别指数显著更高 ( $P < 0.05$ ); 与每天18 h光照时长组相比, 每天12 h光照时长组小鼠的辨别指数极显著更高 ( $P < 0.01$ )。小鼠新位置识别实验的新位置观察时间具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ): 与每天24 h光照时长组相比, 每天12 h光照时长组小鼠的新位置观察时间显著更长 ( $P < 0.05$ ); 与每天18 h光照时长组相比, 每天12 h光照时长组小鼠的新位置观察时间极显著更长 ( $P < 0.01$ )。

表2 5周光照实验后第1周光照时长对NIH小鼠新位置识别实验结果的影响

Table 2 Effects of light exposure duration in the first week after a 5-week light experiment on the results of new location observation test in NIH mice

组别(每天光照时长)	辨别指数	新位置观察时间/s
Groups (daily light duration)	Discrimination index	Exploration time/s
0 h	0.17±0.09	59.14±15.01
6 h	0.34±0.23	67.15±11.40
12 h	0.38±0.24	69.10±11.77
18 h	-0.30±0.34**	48.53±16.88**
24 h	0.06±0.27*	52.75±13.22*

注: 以每天12 h光照时长组为对照组, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , 每组  $n=8$ 。

Note: The daily 12 h light exposure group was used as the control group, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ,  $n=8$ .

### 2.2.3 八臂迷宫实验结果

由表3可知, 5组小鼠八臂迷宫实验找到饲料的时间差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 与每天12 h光照时长组相比, 每天0 h光照时长组小鼠找到饲料的时间显著更长 ( $P < 0.05$ ); 5组小鼠八臂迷宫实验参考记忆错误比率差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 与每天12 h光照时长组相比, 每天0 h光照时长组小鼠的参考记忆错误比率显著更高 ( $P < 0.05$ ); 5组小鼠八臂迷宫实验工作记忆错误比率差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 与每天12 h光照时长组相比, 每天0 h和24 h光照时长组小鼠的工作记忆错误比率显著更高 ( $P < 0.05$ )。

## 3 讨论

本次实验发现, 在不同的光照条件下小鼠的体重均有增加, 其中经过每天24 h持续光照处理的小鼠, 其体重及平均体重增长速度均比其他组高, 这与余丽芝等<sup>[14]</sup>的研究结论相一致。但并不是光照时长越长就越有利于动物的生长。昼夜节律系统使动物在特定

表3 5周光照实验后第2周光照时长对NIH小鼠八臂迷宫实验结果的影响

Table 3 Effects of light exposure duration in the second week after the 5-week light experiment on the results of eight-arm maze test in NIH mice

组别(每天光照时长) Groups (daily light duration)	找到饲料的时间/s Time to find food/s	参考记忆错误比率/% Reference memory error rate/%	工作记忆错误比率/% Working memory error rate/%
0 h	18.50±10.41*	29.13±8.63*	31.63±6.41*
6 h	7.13±4.94	19.00±9.26	19.71±8.01
12 h	10.75±8.63	18.13±7.61	16.38±8.16
18 h	7.63±3.34	18.63±5.76	18.88±8.29
24 h	11.75±6.71	25.50±9.12	28.63±6.21*

( $\bar{x}\pm s$ )注:以每天12 h光照时长组为对照组,\* $P < 0.05$ ,每组  $n=8$ 。Note: The daily 12 h light exposure group was used as the control group, \* $P < 0.05$ ,  $n=8$ .

的时间进食,昼夜节律失调使动物在低摄食阶段进食,这会严重影响其健康<sup>[15]</sup>。例如在光照期(夜行啮齿动物休息期)喂食的小鼠容易患糖尿病、代谢综合征和肥胖<sup>[16]</sup>。在谭吉凤等<sup>[17]</sup>的研究中发现,每天12 h光照环境下生活的小鼠体重增加量低于每天24 h光照环境下生活的小鼠,这与本实验的结果相似。由此可以推测:动物体重受一定光照时长的影响,在研究饮食等以体重增长为考量因素的实验时应考虑光照因素,建议动物暴露在光照环境下的时长宜在每天18 h以内。

有研究表明,持续黑暗和持续光照均会使小鼠产生昼夜节律紊乱和心律失常<sup>[18-19]</sup>。夜间活动的啮齿动物在黑暗阶段暴露于光线下会增加其抑郁样和焦虑样行为发生的概率<sup>[20]</sup>。长期强光照会使动物情绪变得消极,休息行为增加<sup>[21]</sup>。在T型迷宫实验中,与每天12 h光照时长组相比,每天0 h光照时长组小鼠的潜伏期极显著更长( $P < 0.01$ );与每天12 h光照时长组相比,每天24 h光照时长组小鼠的潜伏期显著更长( $P < 0.05$ )。在八臂迷宫实验中,与每天12 h光照时长组相比,每天0 h光照时长组小鼠找到食物的时间均显著更长( $P < 0.05$ )。推测在完全黑暗或完全光照环境下生活的小鼠会产生消极或抑郁情绪,最终导致取食行为减少。

在T型迷宫实验中,各光照时长组间的交替百分比无统计学意义( $P > 0.05$ )。在新位置识别实验中,接近每天12 h光照时长组的小鼠,其辨别指数最高和新位置观察时间最长;且每天18 h、24 h光照时长组小鼠的辨别指数最低。这说明每天光照时长接近12 h时,动物的学习记忆能力可能达到最佳状态;每天光照时长大于18 h时,光照时长越长,对小鼠学习记忆能力的负面影响越大。八臂迷宫实验也得出相似的结果:每天光照时长在12 h左右时,参考记忆和工作记

忆错误比率最低,这与张昊康等<sup>[11]</sup>、Huang等<sup>[22]</sup>的研究结果相同。值得注意的是,谢雯等<sup>[12]</sup>的研究结果表明,光照实验周期为一周,对于小鼠的学习记忆没有影响。可能是因为研究因素上的差异,谢雯等研究的处理条件为光照强度,而本实验为光照时长。此外,本实验光照处理的时间为35 d,比谢雯等研究的处理时间更长。本研究结果显示,光照时间对NIH小鼠辨别指数和新位置识别实验结果有一定影响,如在研究中未考虑光照因素,会影响实验结果的可靠性和准确性。

综合分析体重和3种行为学检测结果可知,每天光照时长为12 h时更适宜NIH小鼠健康生长,且该条件下其学习记忆能力最佳。

#### 【医学伦理声明 Medical Ethics Statement】

本研究所涉及的所有动物实验均已通过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核批准(批准号:IACUC-LIBP-202402004)。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 Laboratory Animal Management and Use Committee of Lanzhou Institute of Biological Products Co., Ltd. (Approval number: IACUC-LIBP-202402004). All experiments were carried out in accordance with the relevant laws and regulations of laboratory animals in China.

#### 【作者贡献 Author Contribution】

张楠负责动物实验、数据分析及撰写论文;  
李怀银参与动物实验和查阅文献;  
连晓娣参与动物实验和记录数据;  
魏娟鹏参与实验动物饲养管理和动物实验;  
高明负责审核实验方案、修改论文和定稿。

#### 【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] HANIFIN J P, DAUCHY R T, BLASK D E, et al. Relevance of electrical light on circadian, neuroendocrine, and neurobehavioral regulation in laboratory animal facilities[J]. *ILAR J*, 2020, 60(2):150-158. DOI: 10.1093/ilar/ilaa010.
- [2] ZHANG Z, BEIER C, WEIL T, et al. The retinal ipRGC-preoptic circuit mediates the acute effect of light on sleep[J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1):5115. DOI: 10.1038/s41467-021-25378-w.
- [3] 刘贵珍, 柴艺汇, 王庆学, 等. 光照时长及昼夜饮食节律对大鼠糖脂代谢及单胺类神经递质的影响[J]. *中兽医学杂志*, 2023(11):4-6. DOI: 10.19656/j.cnki.1002-2406.180039.
- LIU G Z, CHAI Y H, WANG Q X, et al. Effects of light duration and circadian diet rhythm on glucose and lipid metabolism and monoamine neurotransmitters in rats[J]. *Chin J Tradit Vet Sci*, 2023(11):4-6. DOI: 10.19656/j.cnki.1002-2406.180039.
- [4] CAIN S W, MCGLASHAN E M, VIDAFAR P, et al. Evening home lighting adversely impacts the circadian system and sleep[J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1):19110. DOI: 10.1038/s41598-020-75622-4.
- [5] JONG M D, LAMERS K P, EUGSTER M, et al. Effects of experimental light at night on extra-pair paternity in a songbird[J]. *J Exp Zool A Ecol Integr Physiol*, 2018, 329(8-9):441-448. DOI: 10.1002/jez.2193.
- [6] WYSE C A, SELMAN C, PAGE M M, et al. Circadian desynchrony and metabolic dysfunction; did light pollution make us fat? [J]. *Med Hypotheses*, 2011, 77(6):1139-1144. DOI: 10.1016/j.mehy.2011.09.023.
- [7] AN K, ZHAO H, MIAO Y, et al. A circadian rhythm-gated subcortical pathway for nighttime-light-induced depressive-like behaviors in mice[J]. *Nat Neurosci*, 2020, 23(7):869-880. DOI: 10.1038/s41593-020-0640-8.
- [8] 陈洪丽, 高静静, 姜忠迪, 等. 光疗对睡眠剥夺小鼠学习记忆以及BDNF-TrkB信号通路的影响[J]. *中国激光*, 2022, 49(5):0507401. DOI: 10.3788/CJL202249.0507401.
- CHEN H L, GAO J J, JIANG Z D, et al. Effects of phototherapy on learning memory and BDNF-TrkB signaling pathway in sleep-deprived mice[J]. *Chin J Lasers*, 2022, 49(5):0507401. DOI: 10.3788/CJL202249.0507401.
- [9] 彭鸿碧, 贾婷, 朱万龙, 等. 交通噪音对中缅树鼩行为、学习记忆和氧化应激的影响[J]. *兽类学报*, 2021, 41(2):164-172. DOI: 10.16829/j.sixb.150479.
- PENG H B, JIA T, ZHU W L, et al. Effects of traffic noise on behavior, learning and memory and oxidative stress in *Tupaia belangeri*[J]. *Acta Theriol Sin*, 2021, 41(2):164-172. DOI: 10.16829/j.sixb.150479.
- [10] 彭鸿碧, 贾婷, 王政昆, 等. 光照对哺乳动物学习和记忆的影响及其机制研究进展[J]. *野生动物学报*, 2022, 43(2):557-561. DOI: 10.12375/ysdwxb.20220238.
- PENG H B, JIA T, WANG Z K, et al. Research advance on the effects of light on learning and memory in mammalian and their mechanisms[J]. *Chin J Wildl*, 2022, 43(2):557-561. DOI: 10.12375/ysdwxb.20220238.
- [11] 张昊康, 范腾飞, 刘鹏, 等. 光照时长对小鼠情绪及认知活动的影响[J]. *中华行为医学与脑科学杂志*, 2016, 25(8):673-676. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1674-6554.2016.08.001.
- ZHANG H K, FAN T F, LIU P, et al. Effect of illumination time on emotion and cognitive activities in mice[J]. *Chin J Behav Med Brain Sci*, 2016, 25(8):673-676. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1674-6554.2016.08.001.
- [12] 谢雯, 孟凯, 王兴会, 等. 光照对发育期小鼠体重和学习记忆的影响[J]. *西安交通大学学报(医学版)*, 2010, 31(5):536-538, 569. DOI: CNKI:SUN:XAYX.0.2010-05-005.
- XIE W, MENG K, WANG X H, et al. Effects of light on body weight, learning and memory of growing mice[J]. *J Xi'an Jiaotong Univ Med Sci*, 2010, 31(5):536-538, 569. DOI: CNKI:SUN:XAYX.0.2010-05-005.
- [13] 田晓康, 仲蕊, 钱冰, 等. 光照强度和光照时间对性未成熟小鼠雌二醇的影响[J]. *中国儿童保健杂志*, 2015, 23(2):150-152. DOI: 10.11852/zgetbjzz2015-23-02-12.
- TIAN X K, ZHONG R, QIAN B, et al. Effect of illumination intensity and time on estradiol of immature mouse[J]. *Chin J Child Health Care*, 2015, 23(2):150-152. DOI: 10.11852/zgetbjzz2015-23-02-12.
- [14] 余灵芝, 罗嘉惠, 张华, 等. 持续光照对大鼠血糖和体重的影响[J]. *中外医学研究*, 2018, 16(12):15-16. DOI: 10.14033/j.cnki.cfmr.2018.12.006.
- SHE L Z, LUO J H, ZHANG H, et al. Effects of continuous light on blood glucose and body weight in rats[J]. *Chin Foreign Med Res*, 2018, 16(12):15-16. DOI: 10.14033/j.cnki.cfmr.2018.12.006.
- [15] ULGHERAIT M, MIDOUN A M, PARK S J, et al. Circadian autophagy drives iTRF-mediated longevity[J]. *Nature*, 2021, 598(7880):353-358. DOI: 10.1038/s41586-021-03934-0.
- [16] POTTER G D M, CADE J E, GRANT P J, et al. Nutrition and the circadian system[J]. *Br J Nutr*, 2016, 116(3):434-442. DOI: 10.1017/S0007114516002117.
- [17] 谭吉凤, 肖轶卉, 王果, 等. 高脂饮食联合光照周期改变对不同性别小鼠体重的影响[J]. *现代生物医学进展*, 2022, 22(10):1817-1820, 1855. DOI: 10.13241/j.cnki.pmb.2022.10.004.
- TAN J F, XIAO Y H, WANG G, et al. Effects of eigh fat diet combined with light cycle change on body weight of mice with different sex[J]. *Prog Mod Biomed*, 2022, 22(10):1817-1820, 1855. DOI: 10.13241/j.cnki.pmb.2022.10.004.
- [18] KETELAURI P, SCHAROV K, VON GALL C, et al. Acute circadian disruption due to constant light promotes caspase 1 activation in the mouse hippocampus[J]. *Cells*, 2023, 12(14):1836. DOI: 10.3390/cells12141836.
- [19] ROTINEN M. "defining the independence of the liver circadian clock" & "BMAL1-driven tissue clocks respond independently to light to maintain homeostasis"[J]. *Front Neurosci*, 2020, 14:107. DOI: 10.3389/fnins.2020.00107.
- [20] BEDROSIAN T A, WEIL Z M, NELSON R J. Chronic dim light at night provokes reversible depression-like phenotype: possible role for TNF[J]. *Mol Psychiatry*, 2013, 18(8):930-936. DOI: 10.1038/mp.2012.96.
- [21] FERNANDEZ D C, FOGERSON P M, LAZZERINI OSPRI L, et al. Light affects mood and learning through distinct retina-brain pathways[J]. *Cell*, 2018, 175(1):71-84. e18. DOI: 10.1016/j.cell.2018.08.004.
- [22] HUANG X D, HUANG P C, HUANG L, et al. A visual circuit related to the nucleus reuniens for the spatial-memory-promoting effects of light treatment[J]. *Neuron*, 2021, 109(2):347-362.e7. DOI: 10.1016/j.neuron.2020.10.023.

(收稿日期: 2024-04-26 修回日期: 2024-08-11)

(本文责任编辑: 丁宇菁)

## [引用本文]

张楠, 李怀银, 连晓娣, 等. 不同光照时长对 NIH 小鼠体重和学习记忆能力的影响[J]. *实验动物与比较医学*, 2025, 45(1): 73-78. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.062.

ZHANG N, LI H Y, LIAN X D, et al. Effects of different durations of light exposure on body weight and learning and memory abilities of NIH mice[J]. *Lab Anim Comp Med*, 2025, 45(1): 73-78. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.062.

# 利用辅助生殖技术挽救基因修饰小鼠的实例分析

王芊芊, 陶斯珏, 卫振, 金晖晖, 刘平, 汪浏

(浙江大学实验动物中心, 杭州 310058)

**[摘要]** **目的** 利用辅助生殖技术挽救生殖障碍的基因修饰小鼠品系, 为完善珍贵实验小鼠品系的拯救技术更新提供参考。**方法** 对28种不同品系的9~18月龄不育雄性小鼠实施体外受精-胚胎移植 (*in vitro* fertilization-embryo transfer, IVF-ET) 技术, 即通过观察不育雄性小鼠的精子密度、精子活动等指标, 选择活力较强的精子用于IVF-ET实验, 在仔鼠出生后统计受精率、异形卵率和仔鼠出生率。对12种不同品系的8~18月龄不孕雌性小鼠实施优化的卵巢移植技术, 即选取相同背景的6周龄雌性小鼠作为受体小鼠, 摘除受体小鼠一侧完整的卵巢并结扎其另一侧输卵管, 然后分离出供体小鼠一侧卵巢, 将其原位植入受体小鼠摘除卵巢的一侧。术后21 d将受体小鼠与相同背景的8周龄野生型雄性小鼠合笼繁育, 待仔鼠出生后, 统计卵巢移植受体妊娠率、受体活产率等数据。**结果** 利用IVF-ET技术成功挽救28种小鼠品系, 雄性小鼠最大年龄为18月龄。首轮IVF-ET实验成功率为89.29% (25/28)。生殖障碍雄性小鼠IVF的平均受精率为(51.01±14.97)%, 异形卵率为(9.03±5.28)%, 仔鼠出生率(18.60±7.03)%。40只卵巢移植受体小鼠中39只存活, 卵巢移植受体妊娠率为33.33% (13/39), 卵巢移植后受体活产率为17.95% (7/39)。采用卵巢移植技术成功挽救4种小鼠品系, 其中雌性小鼠最大年龄为18月龄; 另外, 8种品系因最终未获得存活至性成熟的子代小鼠而未被挽救。**结论** 针对不同原因引起的生殖障碍雄性小鼠, 特别是对于错过最佳繁育年龄的小鼠, IVF-ET技术可有效进行品系挽救, 获得子代小鼠。针对老龄雌性小鼠的品系挽救, 卵巢移植技术可作为重要备选方案, 但成功率相对IVF-ET技术较低, 存在一定实验风险。

**[关键词]** 基因修饰小鼠; 中老年; 生殖障碍; 体外受精-胚胎移植; 卵巢移植

**[中图分类号]** Q95-33; R-332 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2025)01-0079-08



## A Case Study of Using Assisted Reproductive Technology to Rescue Genetically Modified Mice with Reproductive Disorder Phenotypes

WANG Qianqian, TAO Sijue, WEI Zhen, JIN Huihui, LIU Ping, WANG Lie

(Laboratory Animal Center of Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

Correspondence to: WANG Lie (ORCID: 0000-0001-5094-012X), E-mail: wanglie@zju.edu.cn

**[ABSTRACT]** **Objective** The utilization of assisted reproductive technology to rescue genetically modified mouse strains with reproductive disorders provides a reference for improving techniques to preserve valuable experimental mouse strains. **Methods** *In vitro* fertilization-embryo transfer (IVF-ET) technology was performed on 28 strains of infertile male mice aged 9-18 months. Several indicators such as sperm density and sperm motility in infertile male mice were assessed to select the most viable sperm for IVF-ET experiments. Fertility rate, abnormal egg rate, and birth rate were recorded after the birth of the pups. An optimized ovarian transplantation procedure was applied to 12 strains of infertile female mice aged 8-18 months. 6-week-old female mice with the same genetic background were selected as recipients. One intact ovary was removed from each recipient mouse, and the contralateral oviduct was ligated. An ovary from a donor mouse was isolated and transplanted orthotopically into the side where the ovary had been removed in the recipient mouse. Twenty-one days post-surgery, recipient mice were co-housed with 8-

**[基金项目]** 浙江省科技计划项目“利用SpCas9高保真突变体的基因编辑技术制备定点基因修饰小鼠及其与常规SpCas9系统的比较研究”(2017C37148)

**[第一作者]** 王芊芊(1983—),女,硕士,实验师,研究方向:实验小鼠生物净化、胚胎冷冻复苏,基因修饰小鼠的研制等。E-mail: angelawang@zju.edu.cn

**[通信作者]** 汪浏(1976—),男,博士,教授,研究方向:免疫学。E-mail: wanglie@zju.edu.cn。ORCID:0000-0001-5094-012X

week-old wild type male mice of the same genetic background for breeding. Data such as the pregnancy rate and live birth rate of the recipients were recorded after the birth of the pups. **Results** IVF-ET successfully rescued 28 mouse strains, with the oldest male mice being 18 months old. The success rate of the first round of IVF-ET experiments was 89.29% (25/28). The average fertility rate of IVF in infertile male mice was (51.01±14.97)%, the abnormal egg rate was (9.03±5.28)%, and the birth rate of offspring mice was (18.60±7.03)%. 39 out of 40 ovarian transplant recipient mice survived, with a pregnancy rate of 33.33% (13/39) for ovarian transplant recipients, and a live birth rate of 17.95% (7/39). Four mouse strains were successfully rescued using optimized ovarian transplantation technology, with the oldest female mice being 18 months old. 8 strains were not rescued as they failed to produce offspring that survived to sexual maturity. **Conclusion** IVF-ET is an effective approach for rescuing mice with reproductive disorders caused by different reasons, especially for those beyond the optimal breeding age. Ovarian transplantation technology can also be used as an alternative for aged female mice. But its success rate is relatively lower than that of IVF-ET, and carries a higher experimental risk.

**[Key words]** Genetically modified mouse; Middle-aged and aged; Reproductive disorders; *In vitro* fertilization-embryo transfer; Ovarian transplantation

基因修饰小鼠在生命科学和医药学中的应用需求与日俱增<sup>[1-3]</sup>。小鼠在繁育过程中会出现由繁殖方案不合适、感染、疾病或自身品种品系因素等导致的生殖障碍，特别是一些特殊的基因敲除小鼠品系会出现繁殖力低下等问题<sup>[4-7]</sup>。对于仅存少量中老龄个体的小鼠品系，辅助生殖技术是挽救濒危小鼠品系的重要手段。常规的辅助生殖技术包括体外受精 (*in vitro* fertilization, IVF)<sup>[8]</sup>、卵胞质内单精子注射 (intracytoplasmic sperm injection, ICSI)<sup>[9]</sup>、胚胎移植 (embryo transfer, ET)<sup>[10]</sup> 和卵巢移植<sup>[11]</sup> 等。本文总结分析浙江大学实验动物中心小鼠生物净化团队在2020年12月至2024年3月间，利用辅助生殖技术开展基因修饰小鼠品系挽救工作的成功实例，为同行挽救中老龄、濒危的基因修饰小鼠品系提供技术参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

中老龄的雄性不育基因修饰小鼠28种品系，共31只，9~18月龄；同品系的青年基因修饰可育雄性小鼠各1只，共28只，3~6月龄，作为中老龄组的对照组。雄性小鼠均由浙江大学各个课题组提供，品系背景为C57BL/6J，用于IVF-ET法挽救基因修饰小鼠品系。

用于体外受精、收集受精卵的SPF级3~4周龄C57BL/6J雌性小鼠，用于代孕的SPF级6~8周龄ICR雌性小鼠，用于制备假孕雌性小鼠的SPF级6~8周龄ICR雄性小鼠，均购自上海斯莱克实验动物有限责任公司[SCXK(沪)2017-0005]和江苏集萃药康生物

科技股份有限公司[SCXK(苏)2018-0008]。其中ICR雄性小鼠在屏障环境内适应性饲养1周后进行输精管结扎手术。

不孕的基因修饰雌性小鼠12种品系，共18只，8~18月龄，由浙江大学各个课题组提供，品系背景为C57BL/6J。SPF级6周龄C57BL/6J卵巢受体雌性小鼠购自江苏集萃药康生物科技股份有限公司[SCXK(苏)2018-0008]，用于卵巢移植技术挽救基因修饰小鼠品系。

所有小鼠均饲养在浙江大学实验动物中心屏障环境[SYXK(浙)2018-0016]的独立通风饲养笼盒内。雄性小鼠单笼饲养，同基因型雌性小鼠每笼5只饲养。小鼠可自由饮食饮水。饲养间内温度为22~24℃，相对湿度为40%~70%，光照周期为12h/12h明暗交替。所有实验方案经浙江大学实验动物福利与伦理委员会审核批准(批准号分别为ZJU20220403、ZJU20230022)。所有实验严格依照实验动物福利的“3R”原则进行，并在动物饲养与实验过程中予以人道关怀。

### 1.2 体外受精-胚胎移植技术

主要技术流程为雌性小鼠超数排卵及卵子团的收集、雄性小鼠精子团的采集、体外受精、胚胎移植假孕雌性小鼠的准备、2-细胞期胚胎的清洗和移植以及仔鼠的基因型鉴定。

雄性小鼠精子团的采集方法(图1):从不育雄性小鼠先采集一侧附睾尾中的精子团，将其置于提前预热的精子获能液滴(180 μL)(美国Sigma-Aldrich公司，货号MR-070-D)中，30 min后，吸取5 μL精子

悬液在倒置显微镜 (OLYMPUS, 型号 IX71) 下观察并记录精子密度, 判断精子活力、形态等。如遇精子稀薄 (与正常 C57BL/6J 雄性小鼠精子数量<sup>[12]</sup> 相比, 不

育雄性小鼠精子数量  $< 2 \times 10^5 / \text{mL}$ ) 或活力较差的情况, 应立即采集另一侧附睾的精子团, 或更换其他备用雄性小鼠。其余技术参照文献 [13] 所述方法。



注: A, 采集的雄性小鼠一侧附睾尾与一段输精管; B, 将附睾尾中采集的精子团放入精子获能液滴中; C, 2只不同品系雄性小鼠的精子在获能1h后的精子状态, 左侧培养液滴中的精子稀薄, 右侧培养液滴中精子散开均匀。

Note: A, The unilateral cauda epididymidis and a segment of the vas deferens from a male mouse; B, Sperm masses collected from the cauda epididymidis placed into droplets of sperm capacitation medium; C, The sperm status of two different strains of male mice after 1 h of capacitation: in the left culture droplet, the sperm were sparse, while in the right culture droplet, they were evenly dispersed.

图1 雄性小鼠采集精子团及获能1h后的精子状态

Figure 1 Sperm masses collected from male mice and sperm status after 1 h of capacitation

### 1.3 卵巢原位移植技术

受体雌性小鼠单侧输卵管结扎: 依据供体雌性小鼠卵巢数量及重量, 麻醉相应数量的受体雌性小鼠, 固定卵巢、输卵管和子宫的方法同胚胎移植, 用非吸收缝线 (10-0) 分别在输卵管两处进行结扎, 并用眼科角膜剪小心离断结扎点之间的输卵管 (图2A)。然后将卵巢、输卵管和子宫放入小鼠腹腔, 分别缝合肌肉层和皮肤。

分离供体小鼠卵巢: 将供体小鼠腹腔注射 1.25% 阿佛丁 (美国 Sigma-Aldrich 公司, 货号 T48402-5G) 麻醉, 备皮并消毒皮肤, 分层剪开腹部皮肤和腹壁肌肉层, 分离出双侧卵巢并称重记录 (图2B)。迅速将供体卵巢放入 37 °C 预热的 M2 培养液 (美国 Sigma-Aldrich 公司, 货号 M7167) 中清洗, 待移植。

受体雌性小鼠自体对侧卵巢摘除: 在受体小鼠另一侧以同样的方式固定卵巢、输卵管和子宫 (图2C), 在输卵管伞口对侧的卵巢囊膜上剪开一个适度大小的切口, 将自体卵巢从囊膜中小心剥离出来, 并用眼科角膜剪剪断卵巢蒂, 摘除完整的卵巢。

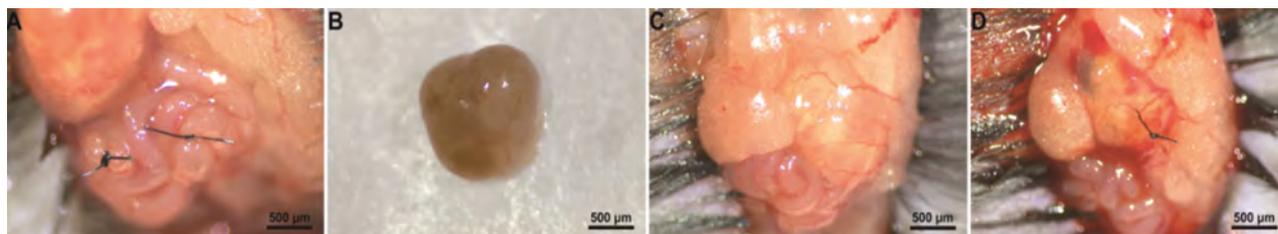
供体卵巢原位移植: 根据供体卵巢重量和大小, 将完整或 1/2 卵巢轻轻放入受体小鼠已去除自体卵巢的卵巢囊膜内, 用缝线 (10-0) 将卵巢囊膜缝合 (图2D), 将植入卵巢、输卵管和子宫放回小鼠腹腔, 逐层缝合肌肉层和皮肤。

受体雌性小鼠合笼繁育: 术后将受体雌性小鼠放置在 37 °C 保温毯上直至苏醒, 雌性小鼠饲喂实验鼠生长繁殖饲料 (江苏省协同医药生物工程有限责任公司, 货号 XT101FZ-010), 并在笼中放置适量的高温高压灭菌过的做窝材料。待移植术后 21 d 按 1:1 将其与同背景、8 周龄野生型雄性小鼠合笼进行繁育。仔鼠出生后, 进行基因型鉴定。统计自合笼之日起至 6 个月内受体小鼠的生产情况, 如有阳性子代小鼠存活, 记为成功挽救的小鼠品系。

### 1.4 数据处理及统计

实验结果数据经 Excel 2016 软件整理, 数据用均值  $\pm$  标准差表示, 并以 GraphPad Prism 8 软件绘图。采用 SPSS 16.0 统计软件对结果进行单因素方差分析 (ANOVA 检验) 和 *t* 检验, 以  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。采用 SPSS 16.0 中相关性分析程序, 分析小鼠年龄与 IVF 受精率之间的关系, 通过 Pearson 相关系数检验进行验证。当  $P < 0.05$  时, 为相关性显著; 当  $P < 0.01$  时, 为相关性极显著。

各变量计算公式如下: 经 IVF-ET 技术挽救小鼠成功率 (%) = 经 IVF-ET 技术获得阳性仔鼠的品系数 / 生殖障碍供精雄性小鼠品系总数  $\times 100$ ; 受精率 (%) = 2-细胞期胚胎数 / (2-细胞期胚胎数 + 未受精卵数 + 异形卵子数)  $\times 100$ ; 异形卵率 (%) = 异形卵子数 / (2-细胞期胚胎数 + 未受精卵数 + 异形卵子数)  $\times 100$ ; 仔鼠出生



注: A, 在受体小鼠一侧输卵管的两处位置进行结扎; B, 摘取供体小鼠一侧完整的卵巢组织; C, 固定受体小鼠另一侧卵巢和输卵管; D, 将供体小鼠一侧完整的卵巢组织移植入摘除了受体小鼠卵巢的囊膜内, 并缝合囊膜。

Note: A, Ligation was performed at two sites on the oviduct of one side of the recipient mouse; B, An intact ovary from one side of the donor mouse was harvested; C, The ovary and oviduct on the other side of the recipient were stabilized; D, The intact ovary from the donor was transplanted into the ovarian capsule of the recipient at the site where the ovary had been removed, followed by suturing of the capsule.

图2 小鼠卵巢移植手术

Figure 2 Ovarian transplantation surgery in mice

率 (%) = 出生仔鼠数/移植2-细胞期胚胎数 $\times$ 100; 卵巢移植受体妊娠率 (%) = 卵巢移植后妊娠受体只数/卵巢移植后存活受体总数 $\times$ 100; 卵巢移植受体活产率 (%) = 受体妊娠、产下活仔且仔鼠存活至离乳的受体只数/卵巢移植后存活受体总数 $\times$ 100; 经卵巢移植挽救小鼠成功率 (%) = 经卵巢原位移植后获得阳性仔鼠的品系数/生殖障碍供卵小鼠品系总数 $\times$ 100。

## 2 结果

### 2.1 利用IVF-ET法挽救基因修饰小鼠品系的结果统计

本研究中, 生殖障碍供精雄性小鼠品系共28种, 利用IVF-ET技术共挽救28种基因修饰小鼠品系, 成功率100%。其中25种品系经一轮IVF-ET实验即成功获得阳性子代小鼠, 首轮实验成功率为89.29% (25/28); 另外3种品系通过两轮实验最终获得阳性子代小鼠, 成功被挽救。不育基因修饰小鼠经IVF-ET的异形卵率、受精率及仔鼠出生率见表1。中老龄组平均受精率为(51.01 $\pm$ 14.97)% ( $n=28$ , 统计最终成功的28种品系28只雄性小鼠的数据, 以下均同此), 较青年组(76.37 $\pm$ 11.16)% ( $n=28$ )有极显著性差异 ( $P < 0.001$ ) (图3A); 中老龄组异形卵率为(9.03 $\pm$ 5.28)% ( $n=28$ ), 较青年组(6.57 $\pm$ 2.71)% ( $n=28$ )有显著差异 ( $P < 0.05$ ) (图3B); 中老龄组仔鼠出生率(18.60 $\pm$ 7.03)% ( $n=28$ )较青年组(20.96 $\pm$ 7.44)% ( $n=28$ )略低, 但差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ) (图3C)。

通过SPSS 16.0软件分析得出: IVF受精率与供精雄性小鼠年龄呈极显著负相关 ( $P < 0.01$ ), 相关系数为

-0.682, 提示随着雄性小鼠日龄增长, IVF受精率呈下降趋势 (图3D); 异形卵率与供精雄性小鼠年龄呈正相关, 相关系数为0.214, 但相关性无统计学意义 ( $P > 0.1$ ); 仔鼠出生率与供精雄性小鼠年龄呈负相关, 相关系数为-0.203, 其相关性同样无统计学意义 ( $P > 0.1$ )。

统计自雌性小鼠注射第一针孕马血清促性腺激素 (pregnant mare serum gonadotropin, PMSG) (宁波三生生物科技股份有限公司, 兽药字110914564, 1000 U/瓶冻干粉) 之日 (记为第1天) 至仔鼠出生的时间, IVF-ET技术平均获得仔鼠时间为(25.79 $\pm$ 7.56) d ( $n=28$ )。除3种品系经两轮IVF实验获得仔鼠所需时间分别为41 d、43 d和55 d外, 其余品系自IVF之日 (19~21) d仔鼠即出生。

### 2.2 利用卵巢移植技术挽救基因修饰小鼠品系的结果统计

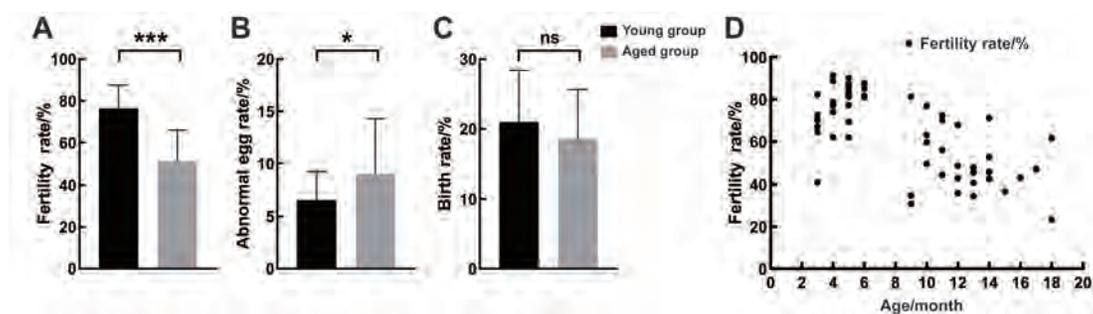
采用卵巢原位移植技术将12种基因修饰小鼠品系共18只老龄雌性小鼠的单/双侧卵巢移植入40只受体小鼠体内。供体小鼠左侧卵巢平均重量(3.19 $\pm$ 1.20) mg ( $n=16$ , 18只老龄雌性小鼠中有2只鼠的左侧卵巢有囊肿, 弃用; 取剩余16只雌性小鼠的左侧卵巢), 右侧卵巢平均重量(4.06 $\pm$ 1.76) mg ( $n=18$ , 取18只老龄雌性小鼠的右侧卵巢)。

术后除1只受体雌性小鼠死亡外, 其余39只均存活, 并于术后21 d开始与8周龄野生型C57BL/6J雄性小鼠合笼。合笼后, 仅13只受体雌性小鼠妊娠并生产, 卵巢移植受体妊娠率为33.33% (13/39), 其中7只受体雌性小鼠产下活仔且仔鼠存活至离乳, 卵巢移植后受体活产率为17.95% (7/39)。统计自合笼日 (记为第1天) 至首窝仔鼠出生时间, 平均为(88.92 $\pm$

表1 经体外受精-胚胎移植挽救的不育基因修饰小鼠的异形卵率、受精率及仔鼠出生率

Table 1 Abnormal egg rate, fertility rate and birth rate of infertile genetically modified mice rescued by *in vitro* fertilization-embryo transfer

不育雄性小鼠月龄/月 Age of Infertile male mice/month	动物数量 <i>n</i>	异形卵率/% Abnormal egg rate/%	受精率/% Fertility rate/%	仔鼠出生率/% Birth rate/%
9	3	4.35±2.21	48.99±28.09	19.87±13.93
10	4	11.55±8.29	62.34±11.32	16.84±5.43
11	4	9.38±2.35	60.85±10.46	17.41±10.46
12	4	7.14±1.12	48.87±13.72	19.04±5.31
13	4	9.50±6.44	42.21±5.86	19.68±1.92
14	4	13.15±7.72	53.07±12.79	16.51±4.60
15	1	6.13	36.79	12.82
16	1	5.04	43.17	15.00
17	1	9.09	47.20	20.00
18	2	8.31±3.53	42.45±27.12	27.66±10.50

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

注：A，青年组与中老年组小鼠体外受精后的受精率比较；B，青年组与中老年组小鼠体外受精后的异形卵率比较；C，青年组与中老年组小鼠体外受精-胚胎移植后的仔鼠出生率比较。 $^*P < 0.05$ ， $^{***}P < 0.001$ ，ns，差异无统计学意义；D，雄性小鼠年龄与受精率的关系。

Note: A, Comparison of *in vitro* fertilization (IVF) fertilization rates between the young group and the middle-aged and aged group; B, Comparison of IVF abnormal egg rates between the young group and the middle-aged and aged group; C, Comparison of IVF-embryo transfer (ET) birth rate between the young group and the middle-aged and aged group.  $^*P < 0.05$ ,  $^{***}P < 0.001$ ; ns, differences were not statistically significant; D, Correlation between male mice age and fertility rate.

图3 青年组与中老龄组受精率、异形卵率和仔鼠出生率的比较

Figure 3 Comparison between the young group and the middle-aged and aged group in their fertility rates, abnormal egg rates, and birth rates

36.60) d ( $n=13$ , 统计13只妊娠雌性小鼠的数据)。综上所述, 经卵巢移植技术共挽救老龄基因修饰小鼠品系4种, 供体雌性小鼠月龄分别为10月龄、15月龄、15月龄和18月龄, 妊娠率及活产率见表2。经卵巢移植技术挽救基因修饰小鼠成功率为33.33% (4/12)。

### 3 讨论

超过6~8月龄的基因修饰小鼠可能由于多种原因出现繁殖障碍, 如亲本小鼠更新不及时、繁殖小鼠过晚配繁、繁殖笼内雌性小鼠年龄过大等<sup>[14-16]</sup>, 或同时合并多种因素, 如亲本小鼠老龄且患病, 或特殊品种

品系的低繁殖力等。多重因素的叠加会增加辅助生殖技术的难度, 同时品系丢失的风险也随之增大。本研究观察到, 不育基因修饰雄性小鼠虽然异形卵率较青年组有显著差异, 提示精子质量随年龄增大而下降, 且体外受精的胚胎发育率较适龄雄性小鼠显著降低, 但大部分仍可通过常规IVF-ET技术获得阳性子代。IVF体系的稳定性至关重要, 在开展实验前应确保各批次试剂及实验条件均已通过预实验测试, 且在正式实验中不随意更改实验参数。值得注意的是, 一定要选择3~4周龄的雌性小鼠(不少于5只)进行一轮IVF实验, 因为若促排卵雌性小鼠年龄过大或数量太

表2 经卵巢移植成功挽救的不育基因修饰小鼠的供体小鼠月龄、妊娠率和活产率

Table 2 Age of donor mice, pregnancy rate and live birth rate of infertile genetically modified mice successfully rescued through ovarian transplantation

供体雌性小鼠月龄/ 月 Age of donor mice/ month	左侧卵巢移植的受体小鼠数/只 The number of recipients for donor's left ovarian transplantation	右侧卵巢移植的受体小鼠数/只 The number of recipients for donor's right ovarian transplantation	妊娠率/% Pregnancy rate/%	活产率/% Live birth rate/%
10	1	1	100.00 (2/2)	100.00 (2/2)
15	1	1	50.00 (1/2)	100.00 (1/1)
15	1	2	66.67 (2/3)	100.00 (2/2)
18	1	1	100.00 (2/2)	100.00 (2/2)

少, 将无法保证获取足够多的卵细胞, 加之不育雄性小鼠的精子质量不可控, 易最终导致实验失败。对于仅剩1~2只雄性小鼠的品系, 建议麻醉雄性小鼠采集单侧附睾尾中精子团进行体外受精, 如最终获得子代小鼠数量太少, 可择日取该雄性小鼠另一侧附睾尾再进行一轮IVF-ET实验。对于无法通过常规体外受精获得足够多2-细胞期胚胎的不育雄性小鼠, 可采用ICSI技术, 但需要较高的成本投入, 技术门槛也更高, 所以建议优先选择IVF-ET技术<sup>[17]</sup>。

卵巢内卵泡的发育受下丘脑-垂体-卵巢轴的调控<sup>[18]</sup>。神经内分泌功能障碍、卵泡储备下降和老龄雌性卵巢分泌物均能导致生殖功能下降<sup>[19]</sup>, 因此雌性小鼠的最适繁育年龄段较雄性小鼠更短, 一旦配种不及时, 易出现生殖障碍而导致该品系丢失。以往国内文献有关小鼠卵巢移植的研究, 供体雌性小鼠多为新生小鼠或适龄小鼠<sup>[20-21]</sup>, 而对于老龄雌性小鼠卵巢移植的研究鲜有报告。2009年, Niikura等<sup>[22]</sup>研究表明, 老龄雌性小鼠的卵巢组织中仍存在极少量减数分裂前的生殖细胞, 将20月龄雌性小鼠的卵巢移植入2月龄雌性小鼠卵巢囊膜中, 老龄雌性小鼠卵巢内休眠的干细胞仍能被重新激活并产生卵母细胞, 但这些卵母细胞是否具备受精能力并能由受体小鼠产出活体小鼠, 该研究并未深入探索。本研究发现18月龄不孕雌性小鼠的卵巢经原位移植到年轻雌性小鼠体内后, 不但能定植、产生卵母细胞, 且能正常受精并活产小鼠至离乳。

通过对比郁丽雨等<sup>[20]</sup>的研究结果, 同为C57BL/6J背景的小鼠, 经卵巢原位异体移植后, 10日龄的供体小鼠可获得最高移植后妊娠率, 为100% ( $n=5$ ); 20日龄供体小鼠移植后妊娠率为60% ( $n=5$ ); 4周龄供体小鼠移植后妊娠率仅为40% ( $n=5$ )。左琴等<sup>[21]</sup>将10日龄C57BL/6J雌性小鼠的新鲜卵巢原位移植到4周龄C57BL/6J雌性小鼠体内, 妊娠率为80% ( $n=5$ )。以上

研究结果均显示, 卵巢移植成功率与供体小鼠的年龄呈负相关<sup>[20-21]</sup>。裴承斌等<sup>[23]</sup>将6~8周龄ICR雌性小鼠的卵巢原位异体移植120 h后腹腔注射10 U/只PMSG, 48 h后取出卵巢组织, 经切片、HE染色后观察卵泡形态并作分类计数。与对照组(未做卵巢移植的6~8周龄ICR雌性小鼠)相比, 移植后卵巢内的次级卵泡数和窦卵泡数均低于对照组 ( $n=6$ ,  $P < 0.05$ )。此结果也与李宇彬等<sup>[24]</sup>的研究结果一致, 提示即使对于较为年轻的雌性小鼠, 卵巢原位移植操作仍可能造成一定程度的生育力损失。本研究也观察到, 老龄雌性小鼠卵巢移植后活产率并不高, 可能与供体小鼠年龄较大, 其卵巢储备很可能已近衰竭有关。已有研究报告表明, 卵巢组织经分离、切割和移植后, 机械损伤和缺血性损伤会导致原卵巢组织中大量卵泡的丢失<sup>[25-26]</sup>, 这可能是影响本研究中卵巢移植后受体雌性小鼠活产率的重要原因。卵巢移植技术的关键在于受体和供体小鼠必须具备组织相容性, 否则, 供体卵巢将因排异而坏死, 从而导致移植失败; 因此, 一般建议使用裸小鼠、NSG等免疫缺陷小鼠作为供体小鼠<sup>[11]</sup>。本研究选择使用与供体小鼠同遗传背景的C57BL/6J小鼠。

以往的研究中, 卵巢原位移植为多采用摘取受体双侧卵巢, 并移植供体双侧卵巢的方法, 且多将供体卵巢放入卵巢囊膜后即将其回纳入腹腔<sup>[20-21, 27]</sup>。此方法不需要缝合卵巢囊膜, 操作更简便且用时更短, 但弊端是移植后的供体卵巢组织容易从囊膜内滑出, 或者由于术后移植卵巢不能被很好地固定, 影响血供和血管重建, 最终导致移植失败。李茗薇等<sup>[27]</sup>在C57BL/6J雌性小鼠卵巢原位移植术后35 d观察卵巢组织形态学, 发现有10%的卵巢消失, 40%的卵巢萎缩, 推测这是由于卵巢囊膜无法将游离的供体卵巢组织固定于原位, 小鼠在活动中卵巢组织滑脱或血供不足引起萎缩所致。因此, 针对老龄不孕供体小鼠, 本研究

优化了卵巢原位移植术,即结扎并离断一侧输卵管,摘除另一侧卵巢并移植供体卵巢的方法,保留受体小鼠的一侧卵巢正常分泌激素的功能,以帮助受体小鼠在卵巢移植后快速建立下丘脑-垂体-卵巢轴功能,促进卵母细胞成熟。同时,本研究还优化了手术细节,即缝合卵巢囊膜,此法可避免供体卵巢从囊膜中滑出,有助于供体卵巢的定植和移植后的血管重建。手术过程中的要点包括:卵巢囊膜的开口不宜过大,移除受体卵巢时应注意不要剪破卵巢蒂底部的卵巢囊膜,否则易致供体卵巢滑脱;由于卵巢囊膜很薄,缝线点不宜与切口边缘过近,打结不宜过紧,以防止缝线从囊膜上拉脱;应选择粗细适中的手术缝合线,建议用10-0手术缝合线,视卵巢囊膜的切口大小缝合1~2针。

综上所述,本研究证实,对于具有明显生殖障碍表型的基因修饰小鼠可以通过IVF-ET技术和卵巢移植技术等辅助生殖技术进行品系挽救。此外,相较于IVF-ET技术,卵巢移植技术获得子代时间较长且时间不可控,对操作人员的手法精准度和熟练程度要求较高,且成功率相对较低,可应用于在仅剩不孕中老龄雌性小鼠或珍贵雌性小鼠突然死亡的情况下,也可作为IVF-ET技术挽救濒危基因修饰小鼠品系的技术补充。

#### [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浙江大学实验动物福利与伦理委员会审批(批准号:ZJU20220403;ZJU20230022)。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 approved by the Laboratory Animal Welfare and Ethics Committee of Zhejiang University (Approval number: ZJU20220403; ZJU20230022). All experimental procedures were conducted in compliance with the requirements of Chinese laws and regulations related to laboratory animals.

#### [作者贡献 Author Contribution]

王芊芊负责资助项目申请、研究方案策划、实验设计、实验数据统计和初稿写作;

陶斯珏、卫振负责实验数据处理和分析,图表制作;

金晖晖负责所有实验小鼠的饲养繁育和生产数据统计;

刘平负责部分小鼠体外受精和胚胎移植实验,以及实验试剂配制;

汪浏负责项目管理和修改文稿。

#### [利益声明 Declaration of Interest]

所有作者声明不存在利益冲突。

#### [参考文献 References]

- [1] KINTER L B, DEHAVEN R, JOHNSON D K, et al. A brief history of use of animals in biomedical research and perspective on non-animal alternatives[J]. *ILAR J*, 2021, 62(1-2): 7-16. DOI: 10.1093/ilar/ilab020.
- [2] 高晗, 钟蓓. 转基因技术和转基因动物的发展与应用[J]. *现代畜牧科技*, 2020(6):1-4, 18. DOI: 10.19369/j.cnki.2095-9737.2020.06.001.  
GAO H, ZHONG B. The development and application of transgenic technology and transgenic animals[J]. *Mod Anim Husb Sci Technol*, 2020(6):1-4, 18. DOI: 10.19369/j.cnki.2095-9737.2020.06.001.
- [3] LIU W, PAN H F, WANG Q, et al. The application of transgenic and gene knockout mice in the study of gastric precancerous lesions[J]. *Pathol Res Pract*, 2018, 214(12):1929-1939. DOI: 10.1016/j.prp.2018.10.022.
- [4] CAMPBELL K M, XU Y D, PATEL C, et al. Loss of TDP-43 in male germ cells causes meiotic failure and impairs fertility in mice[J]. *J Biol Chem*, 2021, 297(5): 101231. DOI: 10.1016/j.jbc.2021.101231.
- [5] 刘庆玲, 赵振军, 徐文秀, 等. AKR7A5 基因敲除对雄性小鼠生殖的影响[J]. *烟台大学学报(自然科学与工程版)*, 2024, 37(1):102-106. DOI: 10.13951/j.cnki.37-1213/n.220634.  
LIU Q L, ZHAO Z J, XU W X, et al. Effects of AKR7A5 gene knockout on reproduction of male mouse[J]. *J Yantai Univ Nat Sci Eng Ed*, 2024, 37(1):102-106. DOI: 10.13951/j.cnki.37-1213/n.220634.
- [6] 孙晓梅, 李名聪, 李涛, 等. LSS 基因功能缺失对雄性小鼠生殖的影响[J]. *安徽医科大学学报*, 2022, 57(2):208-212. DOI: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.02.009.  
SUN X M, LI M C, LI T, et al. The effects of knockout of LSS on female mice fertility[J]. *Acta Univ Med Anhui*, 2022, 57(2):208-212. DOI: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.02.009.
- [7] 龚晓娟, 马盼, 孙敏, 等. DRD1 基因敲除影响雄性生育的分子机理研究[J]. *实验动物科学*, 2021, 38(2):53-56, 60. DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2021.02.009.  
GONG X J, MA P, SUN M, et al. Study on molecular mechanism of male mice reproduction in DRD1 knockout[J]. *Lab Anim Sci*, 2021, 38(2):53-56, 60. DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2021.02.009.
- [8] TAFT R. *In vitro* fertilization in mice[J]. *Cold Spring Harb Protoc*, 2017, 2017(11): pdb. prot094508. DOI: 10.1101/pdb. prot094508.
- [9] MOREIRA P N, POZUETA J, PÉREZ-CRESPO M, et al. Improving the generation of genomic-type transgenic mice by ICSI[J]. *Transgenic Res*, 2007, 16(2):163-168. DOI: 10.1007/s11248-007-9075-1.
- [10] LARSON M A. Embryo transfer surgery[J]. *Methods Mol Biol*, 2020, 2066:101-106. DOI: 10.1007/978-1-4939-9837-1\_8.
- [11] BEHRINGER R. Mouse ovary transplantation[J]. *Cold Spring Harb Protoc*, 2017, 2017(3): 254-256. DOI: 10.1101/pdb. prot094458.
- [12] 黎桂玲, 刘科, 杨林, 等. 精子数量对小鼠体外受精与胚胎早期发育的影响[J]. *广东农业科学*, 2020, 47(1):131-136. DOI: 10.16768/j.

- issn.1004-874X.2020.01.018.  
LI G L, LIU K, YANG L, et al. Effects of sperm counts on *in vitro* fertilization and early embryonic development of mice [J]. Guangdong Agric Sci, 2020, 47(1):131-136. DOI: 10.16768/j.issn.1004-874X.2020.01.018.
- [13] 王芊芊, 刘迪文, 洪胜辉, 等. 小鼠生物净化技术平台的设计、运行及维护[J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(8):122-126. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.08.016.  
WANG Q Q, LIU D W, HONG S H, et al. Design, operation, and maintenance of the technology platform of mouse rederivation[J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(8):122-126. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.08.016.
- [14] 吴清洪, 顾为望, 张嘉宁, 等. SPF级C57BL/6J小鼠生长发育和繁殖性能指标的测定[J]. 中国比较医学杂志, 2006, 16(10):606-607, 614. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7856.2006.10.009.  
WU Q H, GU W W, ZHANG J N, et al. Characterization of growth and reproductive performance in SPF C57BL/6J mice [J]. Chin J Comp Med, 2006, 16(10):606-607, 614. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7856.2006.10.009.
- [15] 孙侠, 刘科, 杨林, 等. 6种常用SPF级大小鼠繁殖性能测定与分析[J]. 中国比较医学杂志, 2016, 26(10):9-13. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.10.003.  
SUN X, LIU K, YANG L, et al. Measurement and analysis of the reproductive performance in six commonly used SPF mice and rats[J]. Chin J Comp Med, 2016, 26(10):9-13. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.10.003.
- [16] 陆少君, 曾昭智, 张锦红, 等. 胎间隔和交配间隔时间对昆明小鼠繁殖性能的影响[J]. 动物医学进展, 2018, 39(8):74-77. DOI: 10.16437/j.cnki.1007-5038.2018.08.016.  
LU S J, ZENG Z Z, ZHANG J H, et al. Effects of fetal interval and mating interval on reproductive performance in KM mice [J]. Prog Vet Med, 2018, 39(8):74-77. DOI: 10.16437/j.cnki.1007-5038.2018.08.016.
- [17] 聂永强, 王朝霞. 濒危基因编辑小鼠品系拯救技术及其应用探讨[J]. 实验动物与比较医学, 2023, 43(6):636-640. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2023.080.  
NIE Y Q, WANG Z X. Rescue technology and its application of endangered gene-edited mice[J]. Lab Anim Comp Med, 2023, 43(6):636-640. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2023.080.
- [18] RICHARDS J S, PANGAS S A. The ovary: basic biology and clinical implications[J]. J Clin Invest, 2010, 120(4): 963-972. DOI: 10.1172/JCI41350.
- [19] NELSON J F, BERGMAN M D, KARELUS K, et al. Aging of the hypothalamo-pituitary-ovarian axis: hormonal influences and cellular mechanisms[J]. J Steroid Biochem, 1987, 27(4-6):699-705. DOI: 10.1016/0022-4731(87)90139-7.
- [20] 郁丽丽, 刘丽均, 王俊风, 等. 同品系小鼠卵巢移植方法的建立[J]. 中国比较医学杂志, 2013, 23(7):41-43. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7856.2013.07.010.  
YU L L, LIU L J, WANG J F, et al. Established a method of ovarian heterotopically transplantation in same strain[J]. Chin J Comp Med, 2013, 23(7):41-43. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7856.2013.07.010.
- [21] 左琴, 王劲松, 范涛, 等. 遗传工程小鼠冻存卵巢异体原位移植比较研究[J]. 实验动物科学, 2020, 37(3):65-68, 72. DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2020.03.011.  
ZUO Q, WANG J S, FAN T, et al. Study for cryopreservation and orthotopic transplantation of genetically engineering mice ovary[J]. Lab Anim Sci, 2020, 37(3): 65-68, 72. DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2020.03.011.
- [22] NIIKURA Y, NIIKURA T, TILLY J L. Aged mouse ovaries possess rare premeiotic germ cells that can generate oocytes following transplantation into a young host environment[J]. Aging, 2009, 1(12): 971-978. DOI: 10.18632/aging.100105.
- [23] 裴承斌, 俞晓丽, 马建军, 等. 小鼠卵巢异体不同部位无血管吻合移植后的血管重建及对促性腺激素的反应[J]. 宁夏医科大学学报, 2017, 39(6):616-620, 626, 739. DOI: 10.16050/j.cnki.issn1674-6309.2017.06.002.  
PEI C B, YU X L, MA J J, et al. Vascular remodeling and response to gonadotropin in different parts of transplantation in mice without vascular anastomosis[J]. J Ningxia Med Univ, 2017, 39(6): 616-620, 626, 739. DOI: 10.16050/j.cnki.issn1674-6309.2017.06.002.
- [24] 李宇彬, 麦庆云, 李涛, 等. 去势手术方式对小鼠卵巢组织自体皮下移植效果的影响[J]. 广东医学, 2014, 35(11):1647-1649. DOI: 10.13820/j.cnki.gdyx.2014.11.005.  
LI Y B, MAI Q Y, LI T, et al. Influence of castration methods on the subcutaneous auto- transplantation of mouse ovaria[J]. Guangdong Med J, 2014, 35(11):1647-1649. DOI: 10.13820/j.cnki.gdyx.2014.11.005.
- [25] GAVISH Z, SPECTOR I, PEER G, et al. Follicle activation is a significant and immediate cause of follicle loss after ovarian tissue transplantation[J]. J Assist Reprod Genet, 2018, 35(1): 61-69. DOI: 10.1007/s10815-017-1079-z.
- [26] RONESS H, MEIROW D. FERTILITY PRESERVATION: Follicle reserve loss in ovarian tissue transplantation[J]. Reproduction, 2019, 158(5): F35-F44. DOI: 10.1530/REP-19-0097.
- [27] 李茗薇, 黄茹, 严青秀, 等. 小鼠卵巢组织冷冻保存和自体移植技术的研究[J]. 医学信息, 2024, 37(6):120-124.  
LI M W, HUANG R, YAN Q X, et al. Study on the cryopreservation and autologous transplantation technique of mouse ovarian tissues[J]. J Med Inf, 2024, 37(6):120-124.

(收稿日期:2024-07-25 修回日期:2024-10-14)

(本文责任编辑:丁宇菁)

#### [引用本文]

王芊芊, 陶斯珏, 卫振, 等. 利用辅助生殖技术挽救基因修饰小鼠的实例分析[J]. 实验动物与比较医学, 2025, 45(1): 79-86. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.107.

WANG Q Q, TAO S J, WEI Z, et al. A case study of using assisted reproductive technology to rescue genetically modified mice with reproductive disorder phenotypes[J]. Lab Anim Comp Med, 2025, 45(1): 79-86. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.107.

# 实验动物设施换气次数检测能力验证结果评价

刘巍<sup>1,2</sup>, 张心妍<sup>1,2</sup>, 侯丰田<sup>1,2</sup>, 许中衍<sup>1,2</sup>, 马丽颖<sup>1,2</sup>

(1. 中国食品药品检定研究院, 北京 102629; 2. 国家啮齿类实验动物资源库, 北京 102629)

**[摘要] 目的** 通过组织实施换气次数检测实验室能力验证计划, 探索实验动物设施环境领域能力验证方式, 初步了解相关实验室在标准应用及检测水平的现状, 规范换气次数检测方法, 确保检测结果的准确性和可靠性。

**方法** 2023年9—11月, 中国食品药品检定研究院负责组织开展实验动物设施换气次数检测的实验室能力验证计划(编号NIFDC-PT-417)。此次能力验证计划的现场测试分为两个部分: 笔试和实际操作。笔试采用开卷形式, 判断题着重考察参加者对标准条款的掌握情况, 应用题则是通过构建模拟检测场景考察实验人员对数据处理的应用; 实际操作按照中国合格评定国家认可委员会(China National Accreditation Service for Conformity Assessment, CNAS)相关准则, 通过分割水平样品对的形式, 准备2个实验房间作为能力验证样品。2个房间均按照CNAS相关要求, 经过均匀性、稳定性测试, 并且测试结果合格。参与能力验证的实验室需要对这2个实验间各进行3次测试, 要求在规定时间内完成换气次数的检测和计算, 并提交本次检测的结果报告单和原始记录。**结果** 共有27家实验室报名并参加本次能力验证, 均在规定时间内反馈结果, 所有参测实验室的结果均被评定为满意。**结论** 本次能力验证客观且科学地评估了国内部分实验室在换气次数方面的检测能力, 有效地促进了行业整体检测水平的提升, 为监管部门规范检测机构提供了技术支撑, 为委托单位购买检测服务提供了可靠的参考依据。通过本次能力验证, 组织方发现部分实验室对仪器的校准及校准结果的利用不够充分, 未来需进一步完善相关标准, 以提高检测的准确性和可靠性。

**[关键词]** 实验动物; 洁净室; 换气次数; 能力验证; 风量罩

**[中图分类号]** Q95-33; TU834.33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2025)01-0087-09



## Evaluation of Proficiency Validation Results for Air Change Rate Testing in Laboratory Animal Facilities

LIU Wei<sup>1,2</sup>, ZHANG Xinyan<sup>1,2</sup>, HOU Fengtian<sup>1,2</sup>, XU Zhongkan<sup>1,2</sup>, MA Liying<sup>1,2</sup>

(1. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 102629, China; 2. National Rodent Laboratory Animal Resources Center, Institute for Laboratory Animal Resources, Beijing 102629, China)

Correspondence to: MA Liying (ORCID: 0009-0009-1851-5575), E-mail: maly@nifdc.org.cn

**[ABSTRACT] Objective** By organizing and implementing a laboratory proficiency validation plan for air change rate testing, this study aims to explore proficiency testing approaches in laboratory animal facilities, assess the current status of relevant laboratories regarding standard application and test capabilities, standardize air change rate testing methods, and ensure the accuracy and reliability of test results. **Methods** From September to November 2023, the National Institutes for Food and Drug Control (NIFDC) organized a laboratory proficiency validation plan for air change rate testing in laboratory animal facilities (Plan Number: NIFDC-PT-417). The proficiency testing was conducted on-site and consisted of two parts: a written test and practical operation. The written test was open-book. True/false questions focused on participants' understanding of specific clauses in relevant standards, while application-based questions assessed their ability to handle data processing in simulated testing scenarios. The practical operation was conducted according to the relevant criteria of the China National Accreditation Service for Conformity Assessment (CNAS). Two laboratory animal rooms were prepared as proficiency testing samples using a

**[第一作者]** 刘巍(1987—),男,硕士,主管技师,研究方向:实验动物设施检测与管理。E-mail: liuwe@nifdc.org.cn。ORCID: 0000-0002-6330-8454

**[通信作者]** 马丽颖(1972—),女,硕士,主任技师,研究方向:医学免疫学,实验动物质量管理。E-mail: maly@nifdc.org.cn。ORCID: 0009-0009-1851-5575

sample splitting approach. These rooms underwent uniformity and stability testing according to CNAS requirements and were approved. Participating laboratories were required to conduct three tests on each of the two laboratory animal rooms, complete the testing and calculation of air change rate within the specified timeframe, and submit their test result reports and original records. **Results** A total of 27 laboratories registered and participated in the proficiency testing. All participating laboratories submitted their results within the designated timeframe, and the outcomes of all tested laboratories were rated as satisfactory. **Conclusion** This proficiency validation program objectively and scientifically evaluates the air change rate testing capabilities of selected domestic laboratories, effectively promoting the overall improvement of testing capabilities in the industry. It provides technical support for regulatory authorities to standardize testing institutions and offers reliable references for the purchase of testing services. Through this activity, it was identified that some laboratories need to further enhance their calibration of instruments and the utilization of calibration results. Future efforts should focus on refining related standards to improve the accuracy and reliability of testing.

**[Key words]** Laboratory animal; Cleanroom; Air change rate; Proficiency validation; Air flow hood

换气次数 (air change rate, 又称 ventilating times) 不仅反映了实验动物设施及其他类型洁净室机组的运行效能, 而且是调节室内温湿度, 降低有害气体 (如氨气) 和微生物气溶胶浓度, 维持洁净度等环境参数的重要手段<sup>[1-5]</sup>。换气次数检测是实验动物质量检测站 (中心) 以及相关领域第三方检测机构须具备的基本检测能力之一, 检测结果不仅反映了实验动物设施是否符合要求, 还反映出设施运行能耗及管理水平的<sup>[6]</sup>。

中国合格评定国家认可委员会 (China National Accreditation Service for Conformity Assessment, CNAS) 要求检测机构在初次认可、定期监督等环节应具有参加相关能力验证活动的经历, 并以此作为外部质控的手段<sup>[7-8]</sup>。因此, 按照实验室认可和实验室资质认定的有关要求, 2023年9—11月, 中国食品药品检定研究院 (以下简称中检院) 首次组织实施实验动物设施换气次数检测能力验证计划。本次能力验证拟按验证方案检验实验动物环境及设施的换气次数, 主要目的是通过能力验证, 发现、分析并解决洁净环境检测中存在的问题, 监控实验室检测能力的维持情况, 识别实验室间存在的差异, 进而促进各实验室共同提高检测水平<sup>[9]</sup>。

## 1 材料与方法

### 1.1 参比实验室

本次能力验证活动采用网上公开报名的形式, 吸引来自全国共17个省、自治区、直辖市的各级食品药品检验机构、实验动物检测机构、药品生产企业、第三方检测机构等, 共27家实验室参与本次能力验证活

动, 每家实验室派人到中检院参加现场测试。

### 1.2 检测仪器

风量罩是专门用于测量各种风口风量的仪器, 通常包含基座、捕风罩及框架、传感器、主机等, 通过内置笛形管感知风压变化, 再由主机计算并显示风量测量值。激光测距仪通过计算激光自设备发射到目标反射回来所用时间来测量长度。本次能力验证的27家实验室所用差压式传感器风量罩涉及国内外9个品牌, 测量范围能够覆盖本次待测风量范围, 且所有风量罩均可满足国标要求, 即“风量罩分辨率应为1 m<sup>3</sup>/h以上”。测距设备有6家实验室使用钢卷尺, 另有21家实验室使用激光测距仪。

测距设备可分为钢卷尺和激光测距仪两大类10个品牌18种型号, 《实验动物 环境及设施》(GB 14925—2010) 对测距设备类型、分辨率、量程等未提出明确要求, 通过查看各型号说明书及计量证书, 确认各实验室测距的设备测量范围能够覆盖本次待测房间尺寸。各实验室所用的设备情况见表1。

根据《实验动物 环境及设施》(GB 14925—2010) 要求, 检测机构应使用热球式风速仪或风量罩测量房间全部送风口 (正压) 或排风口 (负压) 的风量 (m<sup>3</sup>/h), 使用钢卷尺或激光测距仪等测距设备测量房间长、宽、高, 并计算出房间室内容积 (m<sup>3</sup>), 再计算风量/容积的比值, 即得到该房间的换气次数 (次/h 或 air change rate, ACH)<sup>[10]</sup>。

### 1.3 能力验证方案设计

#### 1.3.1 现场考核内容

现场考核分为笔试和实际操作两部分。笔试试卷由中检院长期从事实验动物设施检测, 具有中级及以

表1 27家实验室的设备使用情况

Table 1 Equipment usage status of 27 laboratories

实验室设备 Laboratory equipment	第三方 检测机构 Third-party laboratory category	实验动物 检验检测机构 Laboratory animals testing institution	食品药品检验机构 Food and drug inspection and testing institution	药品生产企业 Pharmaceutical manufacturing enterprise	总计 Total
各品牌风量罩 Various brands of air flow hoods					
加野KANOMAX	/	1	/	/	1
Shortridge	/	1	/	/	1
宏瑞净化 Honri airclean	/	/	/	1	1
华宇净化 HuaYu purification equipment	/	/	/	1	1
西瓦卡 Cvokly	/	1	/	/	1
苏净 SuJing	/	/	1	1	2
凯茂 KIMO	/	/	2	/	2
德图 TESTO	/	2	/	1	3
特赛 TSI	3	8	4	/	15
不同测距设备 Different ranging equipment					
钢卷尺 Steel measuring tapes	1	2	1	2	6
激光测距仪 Laser distance meters	2	11	6	2	21

上职称的人员讨论形成，笔试试卷共包括5道判断题，1道应用题。判断题着重考察实验人员对标准条款的细节掌握，应用题则是通过构建模拟检测场景考察实验人员对数据处理的应用。每家实验室派1名实验人员参加笔试考核。

实际操作的考核为2间动物实验间，分别记为房间1和房间2；根据《能力验证样品均匀性和稳定性评价指南》(CNAS—GL003)对房间的均匀性和稳定性分别进行考察<sup>[11]</sup>。现场考核使用的风量罩分辨率不低于1 m<sup>3</sup>/h，测距设备分辨率不低于1 mm。在报名参加项目时，能力验证管理系统随机赋予每间实验室1个由3位数字组成的实验室代码，该代码是实验室在本次能力验证活动中的唯一性标识，其目的在于增加实验室间数据串通的难度，并由组织方对各实验室的结果保密。

参与本次能力验证活动的实验人员到达测试现场后，按作业指导书的要求进行检测：仪器性能确认，即确认仪器能否正常使用，并提供在有效期内的计量证书。房间状态确认，即确认2个房间标识及运行状况是否正常。现场测定，即在10 min内按要求对房间进风量及房间容积进行检测，并记录数据，若时限内未完成数据采集，则该测定记为不合格；每个房间检测3次(风量、房间容积)。离开测试现场到数据处理

间，计算3次换气次数的平均值，该结果作为实验室结果提交。

### 1.3.2 考核打分细则

参测实验室的换气次数检测能力总分为笔试和实际操作分值的和，满分为100。得分60分及以上者，评价结果为满意；得分60分以下者，评价结果为不满意。

笔试部分总分为50分，其中判断题30分，应用题20分。应用题共2道，分别为：正确写出实验动物设施检测遵循的标准名称及标准号；根据模拟检测场景和数据，准确写出换气次数计算公式，并按要求的格式提交计算结果。

对于参加实验室测量换气次数准确度的现场考核，本轮次2间实验间为分割水平样品对，采用《能力验证结果的统计处理和评价指南》(CNAS—GL002)<sup>[12]</sup>推荐的中位值和标准化四分位距法进行统计和结果评价。实验室能力判断采用稳健 $z$ 比分数， $ZB = [S - \text{med}(S)] / \text{NIQR}(S)$ ，式中： $ZB$ 为实验室间比分数， $S$ 为一对样品测量结果的标准化和， $\text{med}(S)$ 为 $S$ 数据的中位数， $\text{NIQR}(S) = 0.7413 \times (S_3 - S_1)$ ， $\text{NIQR}(S)$ 为 $S$ 数据的标准化四分位距， $S_3$ 为上四分位数， $S_1$ 为下四分位数。 $ZW = [S - \text{med}(D)] / \text{NIQR}(D)$ ，式中： $ZW$ 为实验室内比分数， $D$ 为一对

样品测量结果的标准化差,  $med(D)$  为  $D$  数据的中位数,  $NIQR(D) = 0.7413 \times (D_3 - D_1)$ ,  $NIQR(D)$  为  $D$  数据的标准化四分位距,  $D_3$  为上四分位数,  $D_1$  为下四分位数。 $ZB$  和  $ZW$  的判定准则同  $z$  比分数。 $ZB$  主要反映结果的系统误差,  $ZW$  主要反映结果的随机误差。对于样品对,  $ZB \geq 3$  表明该样品对的两个结果过高;  $ZB \leq -3$  表明其结果过低;  $ZW \geq 3$  表明两个结果间的差值过大。该部分总分为 50 分, 具体打分明细见表 2。

表 2 实际操作打分明细

Table 2 Score breakdown of actual operations

分值 Score	打分明细 Score breakdown
50	两个 Z 值均为 " $ Z  \leq 2$ "
40	一个 Z 值为 " $ Z  \leq 2$ ", 另一个 Z 值为 " $2 <  Z  < 3$ "
30	一个 Z 值为 " $ Z  \leq 2$ ", 另一个 Z 值为 " $ Z  \geq 3$ "
20	两个 Z 值均为 " $2 <  Z  < 3$ "
10	一个 Z 值为 " $2 <  Z  < 3$ ", 另一个 Z 值为 " $ Z  \geq 3$ "
0	两个 Z 值均为 " $ Z  \geq 3$ "

注: 表格中的 Z 值分别指代  $ZB$  和  $ZW$ ;  $ZB$  为实验室间比分数,  $ZW$  为实验室内比分数。

Note: The Z values in the table refer to  $ZB$  and  $ZW$  respectively;  $ZB$  represents the inter-laboratory score,  $ZW$  represents the intra-laboratory score.

### 1.3.3 指定值的确定

指定值是指对能力验证物品的特定性质赋予的值, 本轮能力验证活动指定值为参比实验室测量结果的中位值。指定值的标准不确定度反映本次能力验证活动指定值的可信程度:

$$\text{标准不确定度} = \frac{1.25 \times \text{稳健标准差}^{[13]}}{\sqrt{\text{实验室数量}}}$$

## 1.4 统计学方法

使用 Excel 2019 整理数据, 绘制柱形图和尧敦图

(Youden)<sup>[14-15]</sup>。使用 SPSS 26.0 软件进行统计学处理, 计算所得数据用  $\bar{x} \pm s$  表示, 绘制频次直方图并拟合正态曲线。对风量罩品牌与风量检测结果、测距仪种类与房间尺寸分别进行相关性分析, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 能力验证样品指定值及标准不确定度

本次能力验证样品为中检院实验动物资源研究所的 2 个动物实验间, 房间均匀性和稳定性均符合要求。以所有参加单位测得结果的中位值作为房间 1 和房间 2 指定值, 2 个房间指定值分别为 18.9 次/h 和 19.1 次/h, 2 个房间指定值的标准不确定度计算分别为 0.19 次/h 和 0.10 次/h。

### 2.2 各实验室测量换气次数的能力验证判断

参与本次能力验证的 27 家实验室中, 有 19 家实验室获得笔试满分; 在实际操作环节, 27 家参比实验室换气次数结果分布呈正态分布 (图 1), 汇总统计结果详见表 3, 这表明参比实验室之间并不存在群体性的系统偏差。

分别计算 27 份结果的  $ZB$  和  $ZW$  值。26 家实验室的  $|ZB| \leq 2$ , 占比 96%; 1 家实验室的  $2 < |ZB| \leq 3$ , 占比 4%。26 家实验室的  $|ZW| \leq 2$ , 占比 96%; 1 家实验室的  $|ZW| > 3$ , 占比 4%。换气次数稳健  $Z$  比分数柱状图的数值从左往右, 由小到大依次排列 (图 2)。

2 家实验室 (编号 410、449) 的测试结果均处于外圈椭圆外。具体为, 410 实验室提交的房间数据整体偏大; 449 实验室提交的房间 1 数据偏大, 其结果与图 3 结果相呼应。对此, 建议 410 实验室可从设备、操作等方面进行排查并改善相关情况; 449 实验室可从人员、操作等环节进行查找并解决暴露出来的问题。

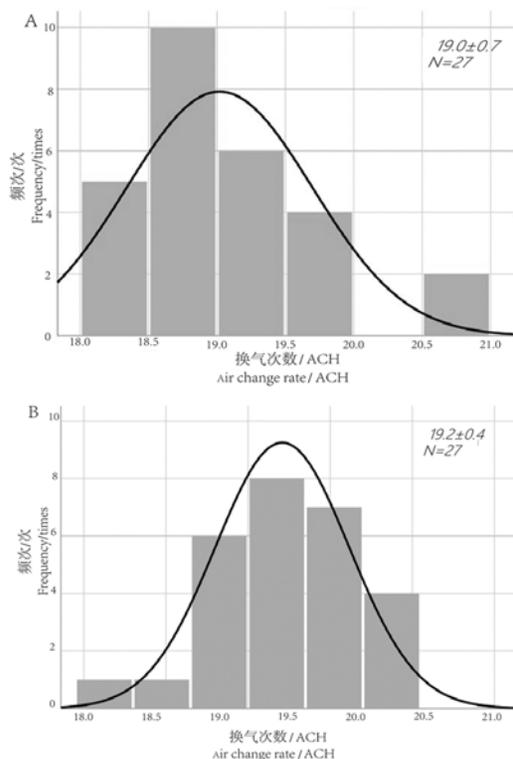
表 3 27 家参与实验室的反馈结果汇总统计量

Table 3 The summary statistics of the feedback results from 27 laboratories

统计量 Statistics	参加实验室数/个 Number of laboratories	中位值/ACH Median/ACH	标准化四分位距 (NIQR) Normalized interquartile range	稳健 CV/% Robust CV/%	最大值/ACH Maximum/ACH	最小值/ACH Minimum/ACH	极差/ACH Range/ACH
房间 1 Room 1	27	18.9	0.786	4.16	20.6	18.0	2.6
房间 2 Room 2	27	19.1	0.419	2.20	19.8	18.3	1.5

注: ACH, 换气次数。

Note: ACH, air change rate.



注：A、B 分别代表房间1和房间2的换气次数结果分布；ACH，换气次数。

Note: A and B represent the distribution of air change rates for Room 1 and Room 2 respectively; ACH, air change rate.

图1 换气次数结果分布图

Figure 1 Distribution chart of air change rate results

### 2.3 不同品牌风量罩对风量结果的影响

对房间1和房间2的测量结果进行分析，分别对不同风量罩品牌进行平均值比较，结果显示，不同品牌风量罩对测量结果影响差异不显著（房间1， $P=0.178$ ；房间2， $P=0.908$ ）。

### 2.4 不同种类测距设备对房间尺寸测量的影响

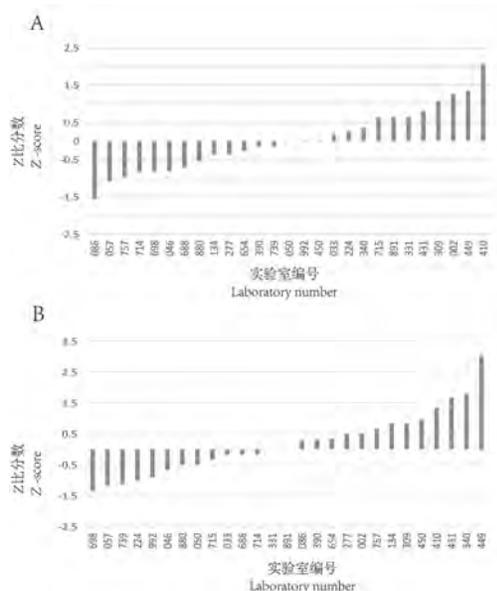
对钢卷尺、激光测距仪在测量两个房间尺寸的结果进行了相关性分析，结果显示，相比于房间长度、宽度，房间高度与测量器具种类间的相关性极其显著 ( $P<0.01$ ) (表4)。

## 3 讨论

本次能力验证为全国范围内实验动物设施环境检测领域的首次能力验证，一方面考察参加实验室对检测标准的正确理解和掌握；另一方面考察参加实验室的仪器操作和实验水平。

### 3.1 笔试

判断题是对《实验动物 环境及设施》(GB 14925—2010) 换气次数相关条款的辨析，目的是考察各实验



注：A，实验室间比分数（ZB，Z指代ZB），ZB表示实验室间比分数，用于评估不同实验室之间的测量一致性；B，实验室内比分数（ZW，Z指代ZW），ZW表示实验室内比分数，用于评估同一实验室内部测量结果的稳定性。

Note: A represents the inter-laboratory score (ZB, Z represents ZB), where ZB stands for the inter-laboratory score used to evaluate the consistency of measurements among different laboratories; B represents the intra-laboratory score (ZW, Z represents ZW), where ZW stands for the intra-laboratory score used to assess the stability of measurement results within the same laboratory.

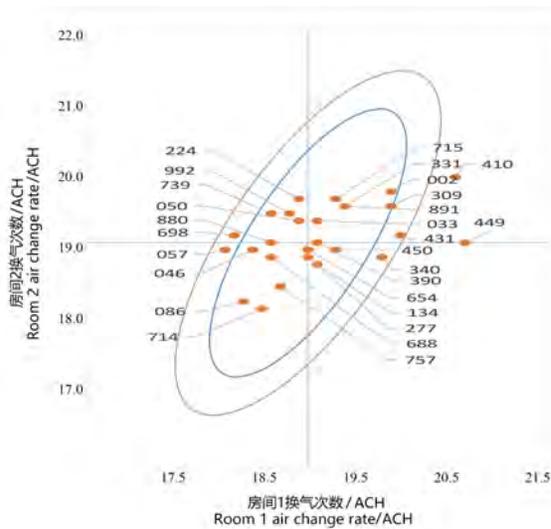
图2 27家实验室参与测试的实验室间和实验室内分数值

Figure 2 The inter-laboratory score and intra-laboratory score score values tested by 27 laboratories

室对标准的掌握程度。全部实验室都获得该部分的满分，说明各实验室对《实验动物 环境及设施》(GB 14925—2010) 中关于各房间换气次数的规定熟悉情况良好。

应用题是基于日常检测场景，考察实验室在面对特殊房间构型的情况下获得正确换气次数的能力，并按保留3位有效数字的要求计算换气次数。部分实验室不理解“有效数字”和“保留3位小数”的意义导致丢分。有效数字在数学上是“从第一个非零数到末尾数字止”；在检测工作中实际测量到的数字，包括所有的准确数字和最后一位可疑数字，与“保留3位小数”概念不相同。

笔试反映出部分实验室对有效数字的理解和掌握仍有欠缺，建议相应机构加强标准培训和宣贯。具体到本次换气次数检测项目中，风量罩测定值是3位有效数字（如765 m<sup>3</sup>/h），激光测距仪根据其设备测量精度具有3~5位有效数字（如5.235 1 m、5.235 m、5.24 m），



注：图中的内、外圈椭圆分别表示95%和99%概率的置信区域，椭圆的中心为2个房间中位值的交点将各实验室的结果对输入坐标体系，尧敦图中每个实验室的结果对用圆点表示，其中有2家实验室对应的是同一圆点（即同数值）。

Note: The inner and outer ellipses in the graph represent confidence regions with probabilities of 95% and 99%, respectively. The center of the ellipses corresponds to the intersection point of the median values of the two rooms. All laboratory results are plotted on this coordinate system, with each laboratory's result represented by a data point in the Youden diagram. Two laboratories correspond to the same data point (i.e., the same value).

图3 结果分布尧敦图

Figure 3 Youden plot of result distribution

表4 房间边长与不同测量设备的相关性验证

Table 4 Verification of the correlation between room side length and different measuring devices

$(\bar{x} \pm s, N=27)$			
设备类型	参数	房间1	房间2
Type of meters	Parameter	Room 1	Room 2
钢卷尺	长	3.675±0.018	4.264±0.028
	宽	2.053±0.033	3.769±0.029
	高	2.693±0.012**	2.700±0.006**
激光测距仪	长	3.683±0.005	4.265±0.003
	宽	2.050±0.012	3.761±0.006
	高	2.705±0.003**	2.705±0.003**

注：使用不同类型测量设备测量房间的不同参数，与长度、宽度相比较，\*\* $P < 0.01$ 。

Note: Using different types of measuring devices to measure different parameters of a room, comparing these parameters with length and width, \*\* $P < 0.01$ .

钢卷尺具有4位有效数字（5.235 m）。根据《数值修约规则与极限数值的表示和判定》（GB/T 8170—2008）中规定，实验动物设施检测应采用“全数值比较法”，即将

计算值不经修约处理与标准进行比较<sup>[16]</sup>，3位有效数字的报告值为18.9次/h（示例）。

### 3.2 实际操作

换气次数测量项目主要误差来源于操作环境、设备和人员。操作环境在能力验证实施时间段内，有专人维护操作环境的稳定性，保障了能力验证房间换气次数的稳定性。换气次数需要使用两类设备，一类是用于测量风量的风量罩；另一类是测量长度的卷尺或激光测距仪。

根据《实验动物 环境及设施》（GB 14925—2010）附录C的要求，测量仪器校准后才可使用。风量罩的校准时间间隔由使用者根据仪器使用情况、仪器本身性能等因素决定，建议复校时间间隔不超过12个月。在本次能力验证检测中，27家参与的实验室均提交了在计量有效期内的计量证书。

#### 3.2.1 测距设备

在测量房间容积时，特别是高度时，相较于激光测距仪，钢卷尺受其自身材质挠性的影响，在没有辅助工具的情况下，难以在有圆弧角的墙壁上准确测得房间尺寸，这容易导致长度读数偏大，从而使测量的房间换气次数偏小。

在使用激光测距仪的实验室中，有1家的测量精度为0.1 m，该测量精度低于钢卷尺，因此建议《实验动物 环境及设施》（GB 14925—2010）在换气次数检测方法中，建议使用激光测距仪，同时增加对测距设备精度的要求，如精度不低于0.01 m。

#### 3.2.2 风量罩的校准规范及校准结果应用

随着社会和科技的发展，对风量罩测量技术的要求越来越高。国内的不同地区采用了不同的检定规程/校准规范，缺乏统一的风量罩校准规范（表5），导致在生产使用过程中，较难满足量值溯源和周期校准的需求，将造成风量罩检定结果难以直接判定<sup>[10,17]</sup>。为确保风量罩测量值的可信和准确，国家有必要制定统一的风量罩校准规范，以便进行正确可靠的量值溯源，规范中国风量罩测量仪器的检测方法，提高中国风量罩测量仪器的设计水平和产品质量，保证量值传递的准确一致。

同时，现场实际操作部分反映出，部分实验室未能根据校准证书对测量结果进行校正，也未能根据风量罩的常用测量范围选择合理的校准风量点。检测实验室应以实验动物设施内常见风口风量范围为依据，选取适宜的流量校准点。

获得校准证书后，应对设备校准结果进行结果符

表5 本次参比风量仪校准依据

Table 5 Calibration basis of the wind gauge in this experiment

序号 Serial number	标准名称 Standard name	标准号 Standard code
1	风量罩计量校准规范	JCJ/1201004.1
2	数字风量罩校准规范	JJF(闽)1068—2015
3	差压式流量计	JJG 640—2016
4	电接风向风速仪	JJG 613—1989
5	数字压力计	JJG 875—2019
6	风量罩校准规范	JJF(苏)179—2015
7	热球式换气次数仪	JJG(建设)0001—1992
8	风量罩校准规范	JJF(辽)230—2015
9	风量罩校准规范	JJF(浙)1150—2018
10	风量罩计量校准规范	JJF(京)116—2023

合性评定, 风量罩的示值误差 $|\Delta| \leq$ 最大允许误差的绝对值-示值误差的扩展不确定度为合格<sup>[18]</sup>, 风量罩的准确度/测量不确定度一般为5%<sup>[19-20]</sup>。

结合校准证书结果可利用回归分析原理, 建立基于实际测量值与仪器示值之间的近似线性函数关系, 使用最小二乘法对已知数据进行最佳直线拟合<sup>[21-22]</sup>, 可在Excel软件或WPS表格中, 使用LINEST函数求斜率和截距, 使用方法: =LINEST(标准器示值数组, 待校仪器示值数组, TRUE或省略, FALSE或省略), 再将仪器示值转化为实际测量值。

### 3.2.3 背压补偿

当气体流经风量罩, 由于罩体的阻力会导致压力降低, 使得笛形管感受到的压差比实际风量所产生的压差更小。因此, 需要对笛形管所测压力进行附加, 即背压补偿(back pressure compensated)。不同品牌不同型号的风量罩, 对于背压补偿功能具有不同的使用要求, 实验室应根据设备说明书按需使用背压补偿功能。以TSI 8380风量罩为例, 当风量大于850 m<sup>3</sup>/h时应使用背压补偿功能<sup>[23]</sup>。经过查阅原始记录, 在本次能力验证中, 仅编号为410的实验室使用背压补偿功能进行风量测量。本次各送风口风量均不大于850 m<sup>3</sup>/h, 因此错误使用背压补偿功能将导致所测风量结果大于实际值, 最终导致410实验室对房间1和房间2测量的换气次数偏高。

### 3.2.4 人员

为准确测定2间动物实验间的换气次数, 尽可能降低人员操作对测定结果的影响, 在本次能力验证测试中制定了详尽的作业指导书, 统一规范现场测试的具体操作细节。虽然各家实验室所用风量罩的品牌及型号不完全一样, 但其零件及结构相近。通过现场观

察及问询, 在本次能力验证测试中发现, 个别实验室人员不熟悉风量罩结构组成和组装方式, 缺少风量罩使用经验, 这说明该实验室实验人员应加强设备操作的培训。

本次测试中长、宽、高的测点位置是特定的, 测试结果与操作人员摆放激光测距仪的位置密切相关, 尤其是探头部位的位置。现场观察到部分实验室在使用激光测距仪时, 仪器未与墙壁方向保持垂直, 这导致其测距光路变长, 房间容积的测量结果偏大, 造成换气次数偏少。

## 4 总结

### 4.1 探索行业发展痛点的解决方法

实验动物标准化一直是实验动物学科发展的重点, 质量管理是实验动物管理的核心和切入点。中国实验动物标准化体系经过多年发展, 已形成一定规模和水准。实验动物设施环境检测技术标准化是实验动物行业发展的支点和交汇点。相较于实验动物细菌、病毒和遗传位点检测等项目的能力验证活动<sup>[24-26]</sup>, 实验动物环境因其无法运输、始终处于动态稳定的状态、人员聚集、场地限制等困难因素而难以开展。设施环境检测机构缺少外部质控活动, 不易发现自身存在问题, 影响检测结果准确性。检测结果质量是检测实验室始终关注的重点。为保证检测结果, 质量监控是检测实验室质量管理的重要一环。通过组织和开展能力验证活动, 可以为各地实验动物监管机构(实验动物管理办公室)提供技术支撑, 帮助其开展监督工作, 为实验动物设施运营方采购实验动物设施建设、运营和管理相关服务的提供参考依据。

### 4.2 为标准制(修)订提供参考依据

本次能力验证活动的能力评价标准偏差 $\sigma$ , 可作为同类型检测能力验证活动及实验室内部质控活动的目标偏差参考值。经过多轮次的能力验证活动, 能力平均标准差可作为检测机构的质控要求, 并被纳入检测标准或规范, 从而逐步提升检测行业标准, 促进标准化的应用与行业的提升。目前在换气次数检测中, 标准对测距设备无要求。结合本次能力验证结果, 建议标准在检测仪器中增加对测距设备的要求, 有助于各检测机构统一数据。

### 4.3 提升参加实验室能力

能力验证不仅是实验室外部质控评价手段, 同时也是对外宣传的工具、解决质量纠纷的方法<sup>[27]</sup>、市场监管部门对检测市场的监督手段。质量管理和控制是

检测机构持续发展的关键<sup>[28]</sup>。促进质量管理体系建设,不仅提高了检验人员的检测能力,而且加强了对所用仪器设备、原始记录和报告的规范化管理<sup>[29]</sup>,为各机构查找不足起到促进和提高的作用。

### [作者贡献 Author Contribution]

刘巍负责实施策划、分析结果、编写报告、制备和验证样品环节的能力验证活动,以及构思论文及撰写初稿;  
张心妍参与协调、制备和验证样品环节的能力验证活动;  
侯丰田参与制备和验证样品;  
许中衍参与实施策划能力验证活动;  
马丽颖参与控制质量、编写报告及审核签字环节的能力验证项目。

### [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] 刘蕾,罗涛,胡仰耆,等. ASHRAE 170-2021关键技术及与中国标准的对比分析[J]. 暖通空调, 2023, 53(11):67-72, 14. DOI: 10.19991/j.hvac1971.2023.11.11.  
LIU L, LUO T, HU Y Q, et al. Contrastive analysis of key technologies between ASHRAE Standard 170-2021 and Chinese standards[J]. Heat Vent Air Cond, 2023, 53(11):67-72, 14. DOI: 10.19991/j.hvac1971.2023.11.11.
- [2] 陈红兵,王文谦,王聪聪,等. 北京某高校教室自然通风下新冠感染概率实验和模拟研究[J]. 暖通空调, 2023, 53(5):124-129, 135. DOI: 10.19991/j.hvac1971.2023.05.20.  
CHEN H B, WANG W Q, WANG C C, et al. Experimental and simulation study on infection rate of SARS-CoV-2 under natural ventilation in classrooms of a university in Beijing[J]. Heat Vent Air Cond, 2023, 53(5):124-129, 135. DOI: 10.19991/j.hvac1971.2023.05.20.
- [3] 黄晨,黄翠,李浩,等. 非单向流洁净室内含尘浓度分布影响因素的实验研究[J]. 建筑节能(中英文), 2021, 49(5):31-36. DOI: 10.3969/j.issn.2096-9422.2021.05.006.  
HUANG C, HUANG C, LI H, et al. Experimental study about influencing factors on particle concentration distribution in non-unidirectional flow cleanroom[J]. Build Energy Effic, 2021, 49(5):31-36. DOI: 10.3969/j.issn.2096-9422.2021.05.006.
- [4] 藤田省吾,小原彻,田中郁郎,等. 实验动物房的换气次数与温度、湿度的分布[J]. 上海畜牧兽医通讯·实验动物科学专辑, 1982, 2(4):218-219, 170.  
FUJITA S, OHARA T, TANAKA I, et al. Distribution of air exchange frequency, temperature and humidity in laboratory animal room[J]. Shanghai Livestock Vet Comm - Lab Anim Sci, 1982, 2(4): 218-219, 170.
- [5] 钟加晨,王志毅,吴强. 基于节能的实验动物人工环境气流组织数值模拟[J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(3):104-110. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7856.2021.03.016.  
ZHONG J C, WANG Z Y, WU Q. Numerical simulation of air distribution in an artificial laboratory animal environment designed to minimize energy costs[J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(3):104-110. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7856.2021.03.016.
- [6] 李雪柏,谷鑫,王晓雪,等. 变频器在生物安全二级实验室通风系统中的节能应用[J]. 中国医学装备, 2020, 17(11):205-208. DOI: 10.

- 3969/J.ISSN.1672-8270.2020.11.051.  
LI X B, GU X, WANG X X, et al. Energy saving application of frequency converter in ventilation system of BSL-2 laboratory[J]. China Med Equip, 2020, 17(11): 205-208. DOI: 10.3969/J.ISSN.1672-8270.2020.11.051.
- [7] 中国合格评定国家认可委员会. 实验室认可规则: CNAS—RL01[S/OL]. (2019-12-30) [2004-06-08]. [https://www.cnas.org.cn/rkgf/sysrk/rkgz/zygz/art/2024/art\\_3c3b608317c74ecb97f881569c1ad63f.html](https://www.cnas.org.cn/rkgf/sysrk/rkgz/zygz/art/2024/art_3c3b608317c74ecb97f881569c1ad63f.html).  
China National Accreditation Service for Conformity Assessment. Rules for the Accreditation of Laboratories: CNAS-RL01[S/OL]. (2019-12-30) [2004-06-08]. [https://www.cnas.org.cn/rkgf/sysrk/rkgz/zygz/art/2024/art\\_3c3b608317c74ecb97f881569c1ad63f.html](https://www.cnas.org.cn/rkgf/sysrk/rkgz/zygz/art/2024/art_3c3b608317c74ecb97f881569c1ad63f.html).
- [8] 中国合格评定国家认可委员会. 能力验证规则: CNAS—RL02[S/OL]. (2023-09-30)[2004-06-08]. [https://www.cnas.org.cn/rkfw/sys/rkyq/rkgz/art/2024/art\\_311722765.html](https://www.cnas.org.cn/rkfw/sys/rkyq/rkgz/art/2024/art_311722765.html).  
China National Accreditation Service for Conformity Assessment. Rules for Proficiency Testing: CNAS-RL02[S/OL]. (2023-09-30)[2004-06-08]. [https://www.cnas.org.cn/rkfw/sys/rkyq/rkgz/art/2024/art\\_311722765.html](https://www.cnas.org.cn/rkfw/sys/rkyq/rkgz/art/2024/art_311722765.html).
- [9] 范春艳,原鹏飞,周超. 实验室比对对实验检测质量的控制[J]. 四川水力发电, 2019, 38(5):101-103, 107. DOI: 10.3969/j.issn.1001-2184.2019.05.033.  
FAN C Y, YUAN P F, ZHOU C. Laboratory comparison for test quality control[J]. Sichuan Water Power, 2019, 38(5):101-103, 107. DOI: 10.3969/j.issn.1001-2184.2019.05.033.
- [10] 国家市场监督管理总局, 国家标准化管理委员会. 实验动物 环境及设施: GB 14925—2010[S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.  
State Administration for Market Regulation, National Standardization Administration. Laboratory animal — Environment and housing facilities: GB 14925-2010[S]. Beijing: Standards Press of China, 2010.
- [11] 中国合格评定国家认可委员会. 能力验证样品均匀性和稳定性评价指南: CNAS—GL003[S/OL]. (2018-03-01) [2004-06-08]. [https://www.cnas.org.cn/rkgf/sysrk/rkzn/art/2024/art\\_518a0229730a4cc9b2a68b05e4dd2fb6.html](https://www.cnas.org.cn/rkgf/sysrk/rkzn/art/2024/art_518a0229730a4cc9b2a68b05e4dd2fb6.html).  
China National Accreditation Service for Conformity Assessment. Guidance on Evaluating the Homogeneity and Stability of Samples Used for Proficiency Testing: CNAS-GL003[S/OL]. (2018-03-01)[2004-06-08]. [https://www.cnas.org.cn/rkgf/sysrk/rkzn/art/2024/art\\_518a0229730a4cc9b2a68b05e4dd2fb6.html](https://www.cnas.org.cn/rkgf/sysrk/rkzn/art/2024/art_518a0229730a4cc9b2a68b05e4dd2fb6.html).
- [12] 中国合格评定国家认可委员会. 能力验证结果的统计处理和评价指南: CNAS—GL002[S/OL]. (2018-03-01)[2004-06-08]. [https://www.cnas.org.cn/rkfw/sys/rkyq/rkzn/art/2024/art\\_2007741598.html](https://www.cnas.org.cn/rkfw/sys/rkyq/rkzn/art/2024/art_2007741598.html).  
China National Accreditation Service for Conformity Assessment. Guidance on Statistic Treatment of Proficiency Testing Results and Performance Evaluation: CNAS-GL002[S/OL]. (2018-03-01)[2004-06-08]. [https://www.cnas.org.cn/rkfw/sys/rkyq/rkzn/art/2024/art\\_2007741598.html](https://www.cnas.org.cn/rkfw/sys/rkyq/rkzn/art/2024/art_2007741598.html).
- [13] 国家市场监督管理总局, 国家标准化管理委员会. 利用实验室间比对进行能力验证的统计方法: GB/T 28043-2019[S]. 北京: 中国标准出版社, 2019.  
State Administration for Market Regulation, National Standardization Administration. Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparison: GB/T 28043-2019[S]. Beijing: Standards Press of China, 2019.

- [14] 熊薇, 葛宇. Youden图在实验室能力验证中的应用及绘制方法[J]. 计量技术, 2008(4):63-65, 69. DOI: 10.3969/j.issn.1000-0771.2008.04.020.  
XIONG W, GE Y. Application and drawing method of Youden diagram in laboratory ability verification[J]. Metrol Sci Technol, 2008(4):63-65, 69. DOI: 10.3969/j.issn.1000-0771.2008.04.020.
- [15] 王林波, 杨美成, 陈祝康, 等. 运用Excel软件制作Youden图的方法及Youden图在能力验证计划数据统计中的应用[J]. 中国药事, 2012, 26(4):364-367. DOI: 10.16153/j.1002-7777.2012.04.008.  
WANG L B, YANG M C, CHEN Z K, et al. A method of drawing Youden graph by excel and the application of Youden graph in analysis of proficiency testing result[J]. Chin Pharm Aff, 2012, 26(4):364-367. DOI: 10.16153/j.1002-7777.2012.04.008.
- [16] 国家市场监督管理总局, 国家标准化管理委员会. 数值修约规则与极限数值的表示和判定: GB/T 8170—2008[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.  
General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China; National Standardization Administration. Rules of rounding off for numerical values & expression and judgement of limiting values: GB/T 8170-2008[S]. Beijing: Standards Press of China, 2008.
- [17] 任志伟, 厉龙, 吴振一, 等. 风量仪校准方法的研究[J]. 工业计量, 2017, 27(2): 7-9. DOI: 10.13228/j. boyuan. issn1002-1183.2017.9003.  
REN Z W, LI L, WU Z Y, et al. Study on calibration method of air volume meter[J]. Ind Metrol, 2017, 27(2):7-9. DOI: 10.13228/j. boyuan.issn1002-1183.2017.9003.
- [18] 国家市场监督管理总局. 测量仪器特性评定: JJF 1094—2002[S]. 北京: 中国标准出版社, 2002.  
General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China. Evaluation of the characteristic of measuring instruments: JJF 1094-2002[S]. Beijing: Standards Press of China, 2002.
- [19] 国家市场监督管理总局, 国家标准化管理委员会. 洁净室及相关受控环境 第3部分:检测方法: GB/T 25915.3—2024[S]. 北京: 中国标准出版社, 2024.  
State Administration for Market Regulation, National Standardization Administration. Cleanrooms and associated controlled environments—Part 3: Test methods: GB/T 25915.3-2024[S]. Beijing: Standards Press of China, 2024.
- [20] 国家市场监督管理总局, 国家标准化管理委员会. 洁净室及相关受控环境 检测技术分析与应用: GB/T 36066—2018[S]. 北京: 中国标准出版社, 2018.  
General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China; National Standardization Administration. Cleanrooms and associated controlled environments—Analysis and application of test technology: GB/T 36066-2018[S]. Beijing: Standards Press of China, 2018.
- [21] 龚磊, 戚宁武, 龚中字, 等. 风量仪校准方法探讨[J]. 中国计量, 2022(8):117-119. DOI: 10.16569/j.cnki.cn11-3720/t.2022.08.040.  
GONG L, QI N W, GONG Z Z, et al. Discussion on calibration method of air volume meter[J]. China Metrol, 2022(8):117-119. DOI: 10.16569/j.cnki.cn11-3720/t.2022.08.040.
- [22] 福建省质量技术监督局. 数字风量罩校准规范: JJF(闽)1068—2015[S/OL]. (2015-03-01)[2004-06-08]. [http://scjgj.fujian.gov.cn/fw/cxfw/dfjjs/202011/t20201130\\_5462387.htm](http://scjgj.fujian.gov.cn/fw/cxfw/dfjjs/202011/t20201130_5462387.htm).  
Fujian Province Bureau of Quality and Technical Supervision. Calibration specification for digital air flow hood: JJF(Min) 1068-2015[S/OL]. (2015-03-01)[2004-06-08]. [http://scjgj.fujian.gov.cn/fw/cxfw/dfjjs/202011/t20201130\\_5462387.htm](http://scjgj.fujian.gov.cn/fw/cxfw/dfjjs/202011/t20201130_5462387.htm).
- [23] TSI incorporated. DP-CALCTM micromanometer model 8715 and ACCUBALANCE® modular air balancing tool model 8380 operation and service manual[EB/OL]. [2004-06-08]. [https://tsi.com/getmedia/baf5f232-2d06-4bbe-b541-ec58f9ffbe02/8715-8380\\_AccuBalance\\_Op\\_Svc\\_Mnl\\_6005723?ext=.pdf](https://tsi.com/getmedia/baf5f232-2d06-4bbe-b541-ec58f9ffbe02/8715-8380_AccuBalance_Op_Svc_Mnl_6005723?ext=.pdf).
- [24] 王洪, 魏杰, 邢进, 等. 2013—2021年实验动物质量检测能力验证情况[J]. 实验动物科学, 2024, 41(2):22-27. DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2024.02.004.  
WANG H, WEI J, XING J, et al. Study on 2013-2021 proficiency testing of laboratory animals quality monitoring[J]. Lab Anim Sci, 2024, 41(2): 22-27. DOI: 10.3969/j. issn. 1006-6179.2024.02.004.
- [25] 邢进, 冯育芳, 王洪, 等. 2013—2020年7次实验动物病原菌项目国际比对结果分析[J]. 实验动物与比较医学, 2021, 41(6):521-527. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2021.104.  
XING J, FENG Y F, WANG H, et al. Analysis of seven performance evaluation program results for pathogenic bacteria from laboratory animals in 2013-2020[J]. Lab Anim Comp Med, 2021, 41(6):521-527. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2021.104.
- [26] 王洪, 魏杰, 付瑞, 等. 2011—2017年实验动物遗传质量评价能力验证结果分析[J]. 实验动物科学, 2019, 36(1):1-4, 9. DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2019.01.001.  
WANG H, WEI J, FU R, et al. Analysis of proficiency testing results of laboratory animals' genetic quality during 2011-2017[J]. Lab Anim Sci, 2019, 36(1):1-4, 9. DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2019.01.001.
- [27] 刘朝朋. 实验室间比对在质量投诉调查中的应用[J]. 石油商技, 2023, 41(1): 92-95. DOI: 10.3969/j.issn.1006-1479.2023.01.014.  
LIU Z P. Application of inter-laboratory comparison in quality complaint investigation[J]. Petrol Prod Appl Res, 2023, 41(1): 92-95. DOI: 10.3969/j.issn.1006-1479.2023.01.014.
- [28] 甄书秀. 技术机构如何服务经济发展[N]. 中国质量报, 2011-03-28(4).  
ZHEN S X. How to serve economic development of technical institutions[N]. China Quality Daily, 2011-03-28(4).
- [29] 李玲, 朱爱丽, 荆知敏. 从实验室间比对和能力验证分析基层药检机构的发展[J]. 中国药事, 2022, 36(11):1239-1245. DOI: 10.16153/j.1002-7777.2022.11.005.  
LI L, ZHU A L, JING Z M. Analysis of the development of primary drug testing institutions from interlaboratory comparisons and proficiency testing[J]. Chin Pharm Aff, 2022, 36(11):1239-1245. DOI: 10.16153/j.1002-7777.2022.11.005.

(收稿日期: 2024-07-22 修回日期: 2024-10-02)

(本文责任编辑: 丁宇菁)

**[引用本文]**

- 刘巍, 张心妍, 侯丰田, 等. 实验动物设施换气次数检测能力验证结果评价[J]. 实验动物与比较医学, 2025, 45(1): 87-95. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.101.  
LIU W, ZHANG X Y, HOU F T, et al. Evaluation of proficiency validation results for air change rate testing in laboratory animal facilities[J]. Lab Anim Comp Med, 2025, 45(1): 87-95. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.101.

# 实验动物屏障环境设施安全准入体系建设的探索与实践——以南京大学仙林校区为例

侯冬霞<sup>1</sup>, 铁祚麻<sup>2</sup>, 陆勇<sup>1</sup>, 南盼盼<sup>3</sup>, 鲍洁<sup>1</sup>

(1. 南京大学生命科学学院, 南京 210023; 2. 南京大学现代工程与应用科学学院, 南京 210023; 3. 南京大学实验室与设备管理处, 南京 210023)

**[摘要]** 实验动物在高校进行的科学研究和实验教学中具有重要地位, 是顺利开展相关研究和教学工作必不可少的支撑条件。高校开展生命科学、医学、药学、化学、生物医学工程等学科的科研和教学工作, 都离不开动物实验。规范化运行的实验动物屏障环境设施 (barrier environmental facility for laboratory animal) 是保障动物实验结果稳定、科学和可靠的重要平台。加强实验动物屏障设施准入的科学管理, 是保障实验动物屏障设施规范化运行、控制实验动物质量和稳定性、避免实验动物和工作人员遭受病原微生物污染, 甚至避免暴发人兽共患病等生物安全事故的重要防线。本文以南京大学仙林校区2019年开始运行的3个实验大鼠、小鼠小型实验动物屏障设施为例, 针对屏障设施的安全准入管理体系, 根据近5年来实验动物屏障设施运行的实际情况, 并结合这些年在不断探索和优化其准入管理体系过程中的经验, 从管理制度建设和标准操作规程 (standard operating procedure) 制订与执行角度出发, 探讨了以下5个方面: 屏障设施人员、动物、物品和仪器设备准入管理, 以及屏障系统空气进出控制管理; 同时, 对这5个方面进行了全面系统地梳理、总结, 以期能为学校动物实验平台的建设和管理起到有益的借鉴作用, 并对后续开展科学研究、保障公共卫生安全和确保实验人员健康提供支持。

**[关键词]** 实验动物; 屏障环境设施; 准入管理; 生物安全

**[中图分类号]** Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2025)01-0096-05



## Exploration and Practice of Safe Access System Construction for Barrier Environment Facilities of Laboratory Animals: A Case Study on Xianlin Campus of Nanjing University

HOU Dongxia<sup>1</sup>, TIE Zuoxiu<sup>2</sup>, LU Yong<sup>1</sup>, NAN Panpan<sup>3</sup>, BAO Jie<sup>1</sup>

(1. School of Life Sciences, Nanjing University, Nanjing 210023, China; 2. College of Engineering and Applied Sciences, Nanjing University, Nanjing 210023, China; 3. Laboratory and Equipment Management Office, Nanjing University, Nanjing 210023, China)

Correspondence to: HOU Dongxia (ORCID: 0009-0003-2279-266X), E-mail: dxhou128@nju.edu.cn

**[ABSTRACT]** Laboratory animals are essential in scientific research and experimental teaching in colleges and universities. Disciplines such as life sciences, medicine, pharmacy, chemistry, and biomedical engineering heavily rely on animal experiments. The standardized barrier environmental facility for laboratory animals provides a fundamental platform for stable, scientific, and reliable animal experiment results. Rigorous access management for such facilities is a vital safeguard for maintaining standardized operations of facilities, controlling the quality and stability of laboratory animals, mitigating pathogen contamination risks among animals and laboratory staff, and preventing biosecurity incidents such as zoonotic disease outbreaks. Taking the small-scale barrier facilities for laboratory rats and mice at Nanjing University's Xianlin Campus, operational since 2019, as an example, this study focuses on the safety access management system of these facilities. Based on five years of operational data and accumulated

**[基金项目]** 南京大学2023年度实验室安全研究课题“实验动物屏障设施的安全准入体系研究”(LSK202302)

**[第一作者]** 侯冬霞(1984—), 女, 博士, 高级工程师, 主要从事实验动物设施运行管理及动物实验研究。E-mail: dxhou128@nju.edu.cn。

ORCID: 0009-0003-2279-266X

experience in studying and optimizing the access management system, this study, from the perspectives of management system development and the formulation and implementation of standard operating procedures, reviews five aspects of access management: personnel access, animals access, material access, equipment access, and air circulation control. Furthermore, these aspects are systematically analyzed and summarized to serve as a reference for the construction and management of the laboratory animal facilities in universities, while also contributing to scientific research, public health security, and the well-being of experimental personnel.

**[Key words] Laboratory animal; Barrier environmental facility; Access management; Biosafety**

实验动物屏障环境设施 (barrier environmental facility for laboratory animal, 以下简称“屏障设施”) 是满足无特定病原体 (special pathogen free, SPF) 级实验动物使用要求, 以研究、实验、教学、生物制品和药品及相关产品生产、检定等为目的, 能够严格控制人员、物品和空气的进出, 而进行动物实验和应用的建筑物和设备的总和, 是目前应用最广泛、最多的一类实验动物设施<sup>[1]</sup>。屏障设施的规范化稳定运行是保障生命科学、医学、药学、化学和生物医学工程学科相关动物实验顺利开展的必要条件<sup>[2]</sup>。

实验动物屏障设施是一个较为封闭的系统, 建成之后, 需要经过严格的卫生消毒、环境检测、主管部门验收合格等一系列准备工作后方可投入使用<sup>[3]</sup>。屏障设施启用后, 就会有人员、动物、物品、设备和空气等持续进出设施<sup>[4]</sup>。为了保障在屏障设施内开展的动物实验具有稳定性、科学性和可靠性, 如何优化屏障设施的管理和使用, 控制病原微生物等危害设施内环境的因素传入屏障设施成为防控关键。因此, 做好屏障设施的安全准入管理至关重要。从2019年开始, 南京大学(以下简称“本校”)仙林校区先后共有3个实验大鼠、小鼠小型屏障环境设施(面积分别为432 m<sup>2</sup>、150 m<sup>2</sup>、454 m<sup>2</sup>)投入使用, 分别是南京大学生命科学、生物医学工程和化学生物学学科科研和教学相关动物实验的重要支撑平台。3个小型设施严格遵守国家、地区和行业的相关法规和标准, 进行规范化运行管理。而随着动物实验需求的日益增长, 本校仙林校区的动物实验人员日渐增多, 现有实验动物屏障设施面临着前所未有的管理压力, 也让本校动物实验平台的建设迫在眉睫。本文结合现有3个小型设施的运行管理经验, 基于最早投入使用的生命科学学院的屏障设施(面积432 m<sup>2</sup>), 就本校仙林校区屏障设施的安全准入管理体系, 从管理规章制度建设和标准操作规程 (standard operating procedure, SOP) 的制订与执行出发, 主要是对人员准入、动物准入、物品准入、

设备准入和空气进出控制管理5个方面进行系统总结和探讨(图1), 以期南京大学及其他高校的动物实验平台建设和管理提供有益借鉴。

## 1 管理规章制度建设和标准操作规程制订

实验动物屏障设施的管理规章制度和SOP是保障屏障设施运行的基础。管理规章制度是屏障设施规范化、制度化管理的纲领性文件, 不仅明确了相关人员的职责, 还给出了详细的操作流程, 因此该文件应该全面、规范以确保各项工作顺利运行。SOP是以文字的形式, 统一的格式来系统描述操作人员日常重复性工作的操作步骤和遵守事项<sup>[5]</sup>。SOP是指导相关人员“如何进行操作”的指导性文件, 具有针对性、程序性、规范性和可操作性, 能确保相关人员按标准和步骤顺利完成任务。屏障设施管理制度和SOP的制订与编写既要参照国家、地区和行业的相关标准, 也要结合自身的实际情况, 实现“写你所做, 做你所写”的目标<sup>[6-7]</sup>。基于此, 针对现有屏障设施的实际情况, 本校动物实验平台的管理人员先后制订了《动物实验规定(试行)》《实验人员违规处理办法(试行)》《实验动物生物安全事件应急预案》等管理文件; 制订并不断修订及更新SOP, 其内容主要包括质量标准、通用管理、屏障设施动物饲养、屏障设施动物繁育、屏障设施动物实验和仪器管理6个方面, 共55个文件、40个表格。这些文件具体包括屏障设施准入管理的相关内容, 涉及人员、动物和设备等多方面的管理与维护要求。总而言之, 屏障设施的准入管理体系包含人员准入管理、动物准入管理、物品准入管理、设备准入管理和空气进出控制管理。

## 2 屏障设施安全准入管理

### 2.1 屏障设施人员准入管理

人员的流动是影响屏障设施运行质量的关键动态因素<sup>[8]</sup>。首先, 申请进入屏障设施的人员必须遵守规

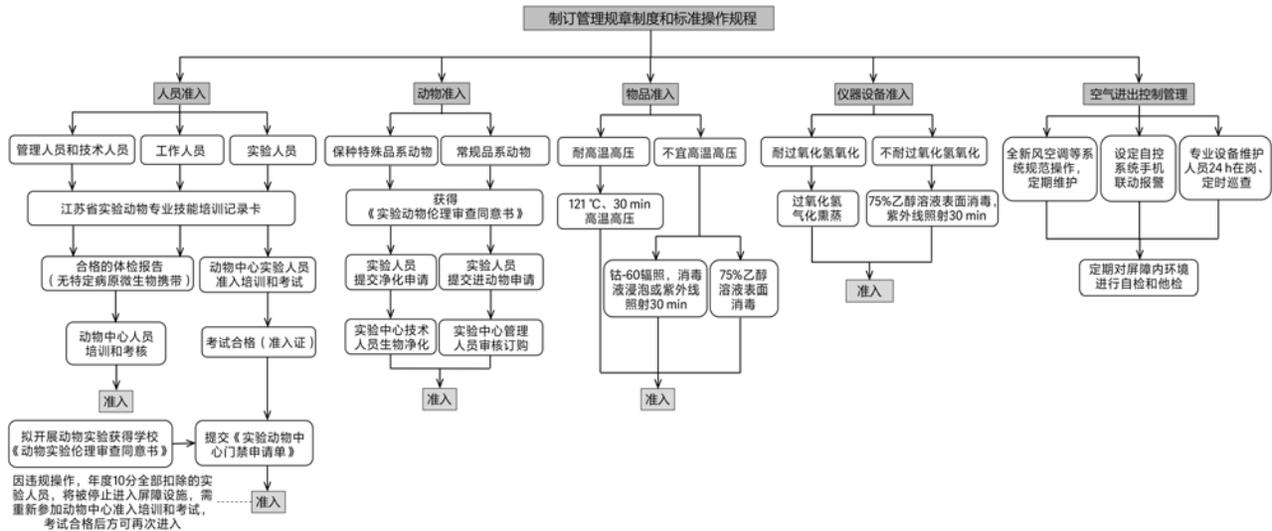


图1 实验动物屏障设施安全准入体系

Figure 1 Safe access system for barrier environment facilities of laboratory animals

定, 与实验动物饲养、实验、屏障设施运行管理无关的人员一律不得进入屏障设施<sup>[9]</sup>; 其次, 需要进入屏障设施的人员, 主要分为管理人员、技术人员、工作人员, 以及高校里流动性很大的实验人员。针对进入屏障设施的不同人员, 建立各自的准入制度, 对人员准入进行分类细化的管理。

**管理人员和技术人员:** 需持有江苏省实验动物专业技能培训记录卡; 身体健康 (出具合格的体检报告, 无特定病原微生物携带); 经过实验动物中心的人员培训, 熟悉和掌握本屏障设施的SOP和管理制度, 方可进入。**工作人员:** 主要包括动物饲养人员和专业设备维护人员, 需身体健康 (出具合格的体检报告, 无特定病原微生物携带) 并获得江苏省实验动物专业技能培训记录卡; 经过实验动物中心工作人员的培训和考核, 熟悉本屏障设施的SOP和管理制度, 具备良好的无菌观念, 方可进入。此外, 未从事过实验动物相关工作的饲养人员, 进入屏障设施第一个月由现有的饲养人员带领工作, 待进一步掌握日常动物饲养工作的所有操作内容和细节, 方可进行独立饲养实验动物的工作。**实验人员:** 需持有江苏省实验动物专业技能培训记录卡; 参加动物中心实验人员准入培训并通过考核, 培训内容根据培训对象和培训目的而定<sup>[10]</sup>。

针对高校研究生为主体的实验人员, 培训的主要内容包括: 生物安全相关法律法规、屏障设施的风险评估与管理、本校实验动物生物安全应急预案的解读;

动物实验福利伦理审查的概念、必要性及其原则, 以及本校实验动物福利伦理审查的工作规程和申请流程; 屏障设施的概况、使用屏障设施开展动物实验的SOP和管理制度; 实验动物相关基础知识, 实验大鼠、小鼠的品种品系、命名和繁殖策略等; 小鼠保定、给药、采血和安乐死等基础操作技术, 动物实验中麻醉剂和镇痛药物的选择策略等。培训以线下讲解、线上交互式网页教学和实验动物操作视频教学相结合的形式进行。此外, 获得省实验动物专业技能培训记录卡和动物中心准入证的实验人员, 若进入屏障设施内开展动物实验, 在申请屏障设施准入权限时, 还需要持有南京大学科学与技术伦理委员会实验动物福利伦理分委会审查通过的《动物实验伦理审查同意书》。最后, 获得屏障设施准入权限的实验人员, 首次进入屏障设施时, 由中心动物饲养人员进行带教, 以进一步熟悉进出和使用屏障设施的流程和规程。

## 2.2 屏障设施动物准入管理

实验动物的进出也是影响屏障设施运行质量的重要环节。科学研究的目的是和方法不同, 进入屏障设施的动物品种和品系也大不相同。强化屏障设施的动物准入管理也是保障屏障设施稳定运行的重要举措<sup>[9]</sup>。所有在屏障设施内开展的动物实验项目都需经过动物福利伦理的审查, 进入屏障设施的实验动物需通过屏障设施管理人员的审批。因研究课题需要, 拟进入屏障设施保种扩繁的特殊品系动物, 均需通过生物净化

后,方可进入屏障设施繁殖区饲养。其他常规品系的实验动物由实验人员提交采购动物申请,屏障设施管理人员审批通过后,统一从具有《实验动物生产许可证》且资质较好的实验动物供应单位采购。实验动物进入屏障设施前,饲养人员需要查验进动物审批单、随动物一同来的动物质量合格证,以及动物外包装盒的完整性。全部确认无误后,对外包装进行喷雾消毒,并经传递窗将动物传入屏障设施隔离检疫室饲养观察4~7 d,无异容后再移入相应饲养室内。

### 2.3 屏障设施物品准入管理

屏障设施运行和动物实验操作相关物品进入屏障设施的管理也是屏障设施准入管理体系的重要组成部分。所有物品在进入设施前均需进行灭菌处理,不得随人员直接带入屏障设施。灭菌处理方式以其是否耐高温高压来进行区分。耐高温高压的物品,如动物饲养笼盒、垫料、抹布、笼牌、记录用纸、净化服、口罩、手套、离心管和常规手术器械等,必须经过高温高压蒸汽灭菌后方可进入屏障设施;宜辐照灭菌的物品,如动物饲料、记录用笔、垃圾袋和胶带纸等,均采用真空后钴-60辐照灭菌,再经消毒液浸泡后由工作人员通过传递窗紫外照射后传入屏障设施;不耐耐高温高压的未开封血糖试纸、一次性注射器等耗材,利用75%乙醇溶液表面喷洒、紫外线照射30 min进行消毒,再经传递窗由工作人员传入屏障设施;不耐耐高温高压、不可紫外线照射的试剂、药品和细胞悬液等物品,利用75%乙醇溶液对包装外表面消毒,经传递窗由工作人员传入屏障设施。

### 2.4 屏障设施仪器设备准入管理

屏障设施正常运行也不可避免需要传入相关仪器设备,仪器设备进入屏障设施前也需要进行灭菌处理。区分设备准入管理的方法主要根据仪器设备的耐氧化性质确定。耐过氧化氢氧化的设备,如大鼠、小鼠独立通风笼盒(individually ventilated cage, IVC)的主机和笼架等经低温消毒间利用过氧化氢发生器设备产生的过氧化氢气化(约39.16 mmol/m<sup>3</sup>)熏蒸后传入屏障设施;不耐过氧化氢的设备,如相机、体视显微镜、小动物气体麻醉机、低温冰箱等,需新开封设备,经低温消毒间利用75%乙醇溶液表面擦拭、紫外线照射30 min后传入屏障设施。

### 2.5 屏障系统空气进出控制管理

内环境稳定是实验动物屏障设施规范化运行的基本保障,主要是指温度、日温差、相对湿度、换气次

数、正负压差、空气洁净度、空气沉降菌、氨浓度、噪声、照度等参数均符合相应国家标准,且保持稳定<sup>[1]</sup>。空气的进出是影响屏障设施内环境稳定的关键因素,空气进出控制管理也是屏障设施准入管理体系不可缺少的组成部分。控制管理空气进出屏障设施主要需要确保屏障设施使用的全新风空调、净化、加湿和排风等系统处于正常工作状态<sup>[11]</sup>。

在屏障设施运行中,一方面,按照已安装全新风空调等系统的操作和维护要求,进行规范操作,以保持内环境相关参数的稳定性;另一方面,设定了自控系统与手机联动的报警机制,并安排专业设备维护人员24 h在岗,手机出现报警提示后,立即安排设备维护人员进行排查,并联系管理人员商定解决办法。与此同时,设备维护人员每2 h巡查一次,巡视空调等系统运行情况,并记录屏障设施内每个房间的温湿度、压力等参数,如发现异常,立即做出响应。此外,每年定期会请专业的检测人员对屏障设施内环境进行动态检测,并记录包括空气沉降菌、氨浓度、噪声和照度等各项参数。

## 3 总结

实验动物屏障环境设施的运行成本高,一旦发生故障或污染,后果很严重。因此,必须加强科学管理,避免因操作不规范造成实验动物遭受病原微生物污染,甚至暴发人兽共患病等事故,确保屏障设施内动物实验的稳定性和可靠性。实验动物屏障设施的安全准入管理体系是保障屏障设施性能的基础安全防线。本校仙林校区的实验动物屏障设施自运行以来,根据自身的实际运行情况,不断探索和优化其准入管理体系。近5年来,先后共有982名师生通过了动物中心实验人员培训考核,共计完成139个实验小鼠品系的净化;使用了79 679只小鼠、2 644只大鼠,支撑了200多个科研项目的顺利开展,发表了400余篇实验动物相关的国际学术论文,支撑了608学时的实验动物相关教学;动物存活率达99.97%以上,已实现屏障设施规范化稳定运行目标。基于此,笔者对目前设施准入管理体系的探索和建设进行了梳理总结,以期为学校动物实验平台的建设和管理起到有益的借鉴作用。

#### [作者贡献 Author Contribution]

侯冬霞构思文章框架、撰写文章、修改并定稿;  
铁祚麻参与讨论文章思路和修改文章;  
陆勇、南盼盼和鲍洁参与讨论文章思路。

**[利益声明 Declaration of Interest]**

所有作者均声明本文不存在利益冲突。

**[参考文献 References]**

- [1] 国家市场监督管理总局, 国家标准化管理委员会. 实验动物 环境及设施: GB 14925—2023[S]. 北京: 中国标准出版社, 2023. State Administration for Market Regulation, National Standardization Administration. Laboratory animal-Environment and housing facilities: GB 14925-2023[S]. Beijing: Standards Press of China, 2023.
- [2] 刘琪帅, 李朝, 任晓霞. "双一流"高校建设背景下新型实验动物中心的建设与管理[J]. 实验技术与管理, 2022, 39(9):266-268. DOI: 10.16791/j.cnki.sjg.2022.09.045. LIU Q S, LI Z, REN X X. Construction and management of new laboratory animal center under background of "Double First-Class" university construction[J]. Exp Technol Manag, 2022, 39(9):266-268. DOI: 10.16791/j.cnki.sjg.2022.09.045.
- [3] 杨九祥. 实验动物设施屏障环境设计与建造要点[J]. 洁净与空调技术, 2021(4):92-96. DOI: 10.3969/j.issn.1005-3298.2021.04.023. YANG J X. The key points design and construction of experiment facility for laboratory animal about barrier environment[J]. Contam Contr Air Cond Technol, 2021(4):92-96. DOI: 10.3969/j.issn.1005-3298.2021.04.023.
- [4] 彭丽娜, 王朝霞. 高校实验动物屏障设施微生物监控管理[J]. 实验动物与比较医学, 2018, 38(2): 154-159. DOI: 10.3969/j.issn.1674-5817.2018.02.015. PENG L N, WANG Z X. Microbial monitoring and management of laboratory animal barrier facilities in higher education institutions[J]. Lab Anim Comp Med, 2018, 38(2): 154-159. DOI: 10.3969/j.issn.1674-5817.2018.02.015.
- [5] 王金恒, 范昌发, 刘佐民. 屏障设施实验动物生产管理 SOP 的制定和实施[J]. 实验动物科学, 2010, 27(3):32-33. DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2010.03.009. WANG J H, FAN C F, LIU Z M. Establishment and implementation of SOPs for the laboratory animals production management in barrier system[J]. Lab Anim Sci, 2010, 27(3):32-33. DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2010.03.009.
- [6] 刘艳, 赵赤鸿, 李晓燕, 等. 实验动物屏障设施运行管理标准操作规程的制定和实施[J]. 中国医学装备, 2014, 11(1):14-16. DOI: 10.3969/J.ISSN.1672-8270.2014.01.005. LIU Y, ZHAO C H, LI X Y, et al. Establishment and implementation of SOPs of CDC for the laboratory animal management in barrier facilities[J]. China Med Equip, 2014, 11(1):14-16. DOI: 10.3969/J.ISSN.1672-8270.2014.01.005.
- [7] 张薇, 王牧孜, 邓少嫦. 实验动物屏障设施微生物污染防控管理要点[J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(7):117-122. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.07.015. ZHANG W, WANG M Z, DENG S C. Operational management and prevention of contamination in barrier environment facilities of laboratory animals[J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(7):117-122. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.07.015.
- [8] 陈秋荷, 刘晓玲. 浅谈实验动物屏障设施的建设及管理体会: 以广州中医药大学中药学院实验动物屏障设施为例[J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(5):98-101. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.05.014. CHEN Q H, LIU X L. Construction and management experience of laboratory animal barrier facilities: Case study of specific pathogen-free barrier facility for laboratory animals in the School of Pharmaceutical Sciences of Guangzhou University of Chinese Medicine [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(5): 98-101. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.05.014.
- [9] 杨玉琴. 实验动物屏障设施管理中面临的生物安全问题及对策探讨[J]. 实验动物与比较医学, 2022, 42(2):95-101. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2021.164. YANG Y Q. Biosafety problems and countermeasures in the management of barrier facilities for laboratory animals[J]. Lab Anim Comp Med, 2022, 42(2):95-101. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2021.164.
- [10] 朱少平, 欧华俊, 陈一淑, 等. 动物实验培训内容与方法改革的探讨[J]. 教育教学论坛, 2022(31):29-32. ZHU S P, OU H J, CHEN Y S, et al. Discussion on the content and method reform of animal experiment training[J]. Educ Teach Forum, 2022(31):29-32.
- [11] 练高建, 何理平, 苏泽红, 等. 屏障环境动物实验室的建设及管理[J]. 中国动物保健, 2021, 23(8):116-118. DOI: 10.3969/j.issn.1008-4754.2021.08.076. LIAN G J, HE L P, SU Z H, et al. China Anim Health, 2021, 23(8): 116-118. DOI: 10.3969/j.issn.1008-4754.2021.08.076.

(收稿日期: 2024-07-25 修回日期: 2024-12-06)

(本文责任编辑: 丁宇菁)

**[引用本文]**

侯冬霞, 铁祚麻, 陆勇, 等. 实验动物屏障环境设施安全准入体系建设的探索与实践——以南京大学仙林校区为例[J]. 实验动物与比较医学, 2025, 45(1): 96-100. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.106. HOU D X, TIE Z X, LU Y, et al. Exploration and practice of safe access system construction for barrier environment facilities of laboratory animals: A case study on Xianlin Campus of Nanjing University[J]. Lab Anim Comp Med, 2025, 45(1): 96-100. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.106.

# 提高动物实验系统评价/Meta 分析的证据确定性： GRADE 方法的实证研究

李腾飞<sup>1,2,3</sup>, 郑卿勇<sup>1,2</sup>, 许建国<sup>1,2</sup>, 李艺羿<sup>1,2,3</sup>, 周泳佳<sup>1,2,3</sup>, 徐彩花<sup>1,2</sup>, 张明悦<sup>1,2</sup>, 田杰祥<sup>4</sup>, 王 钢<sup>4</sup>, 田金徽<sup>1,2</sup>

(1. 兰州大学循证医学中心, 兰州大学基础医学院, 兰州 730000; 2. 甘肃省循证医学重点实验室, 兰州 730000; 3. 甘肃中医药大学护理学院, 兰州 730000; 4. 甘肃中医药大学附属医院风湿免疫科, 兰州 730000)

**[摘要]** 动物实验是生物医学研究中的重要手段, 是连接基础研究与临床研究的桥梁。动物实验的系统评价/Meta 分析 (systematic review/meta-analysis, SRs/MAs) 是整合动物实验证据的重要手段, 能够促进成果向临床研究转化, 降低转化风险, 并推动基础研究的资源整合。随着证据推荐分级的评估、制订与评价 (grading of recommendations assessment, development and evaluation, GRADE) 方法的不断发展, 其在动物实验 SRs/MAs 中的应用受到了越来越多的关注。本文首先阐述了 GRADE 方法在动物实验 SRs/MAs 中的应用原理及具体应用类型, 包括定性描述的系统评价、Meta 分析及网状 Meta 分析; 接着深入分析了 GRADE 方法在实际应用中的误用情况, 主要包括未正确进行证据体分级、证据体分级不当、误用于定性系统评价、升降级过程记录与结果不一致, 以及误用于提供推荐意见; 此外, 还全面探讨了 GRADE 方法在动物实验 SRs/MAs 中的证据确证度升降级因素, 包括偏倚风险、间接性、不一致性、不精确性和发表偏倚对证据降级的影响, 以及大效应量和跨物种一致性对证据升级的作用; 最后, 针对上述问题提出了改进策略, 包括进一步研究与优化 GRADE 方法在动物实验 SRs/MAs 中的应用细节、制定符合动物实验研究特点的 SRs/MAs 报告规范, 以及加强研究人员在 GRADE 方法上的专业培训等。本文旨在通过提升动物实验 SRs/MAs 的证据质量, 增强其在临床决策中的可靠性, 促进动物实验研究成果更高效地转化为临床实践。

**[关键词]** 动物实验; 系统评价; Meta 分析; 推荐分级的评估、制订与评价; 证据确证度; 证据分级

**[中图分类号]** Q95-33; R-332 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2025)01-0101-11



## Improving the Certainty of Evidence in Animal Experiment Systematic Review/Meta-Analysis: An Empirical Study of the GRADE Method

LI Tengfei<sup>1,2,3</sup>, ZHENG Qingyong<sup>1,2</sup>, XU Jianguo<sup>1,2</sup>, LI Yiyi<sup>1,2,3</sup>, ZHOU Yongjia<sup>1,2,3</sup>, XU Caihua<sup>1,2</sup>, ZHANG Mingyue<sup>1,2</sup>, TIAN Jiexiang<sup>4</sup>, WANG Gang<sup>4</sup>, TIAN Jinhui<sup>1,2</sup>

(1. Evidence-based Medicine Center, School of Basic Medical Sciences, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China; 2. Key Laboratory of Evidence-based Medicine of Gansu Province, Lanzhou 730000, China; 3. School of Nursing, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China; 4. Department of Rheumatology, The Affiliated Hospital of Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China)

Correspondence to: WANG Gang, E-mail: 1256935844@qq.com;

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

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

**[第一作者]** 李腾飞 (1998—), 男, 硕士研究生, 研究方向: 循证医学与医学信息学。E-mail: ltf980102@163.com。ORCID: 0009-0005-1168-3075; 郑卿勇 (1998—), 男, 博士研究生, 研究方向: 循证医学与医学信息学。E-mail: easonzz@foxmail.com。ORCID: 0000-0002-9480-0169

**[通信作者]** 王 钢 (1965—), 男, 博士, 主任医师, 博士生导师, 研究方向: 中西医结合治疗自身免疫性疾病的临床与实验研究。E-mail: 1256935844@qq.com; 田金徽 (1978—), 男, 博士, 教授, 研究方向: 网状 Meta 分析与卫生技术评估。E-mail: tjh996@163.com。ORCID: 0000-0002-3859-9587

**[ABSTRACT]** Animal experiments are essential tools in biomedical research, serving as a bridge between basic research and clinical trials. Systematic reviews and meta-analyses (SRs/MAs) of animal experiments are crucial methods for integrating evidence from animal experiment, which can facilitate the translation of findings into clinical research, reduce translational risks, and promote resource integration in basic research. With the continuous development of the Grading of Recommendations, Assessment, Development, and Evaluation (GRADE) methodology, its application in SRs/MAs of animal experiments has gained increasing attention. This article first outlines the principles and specific applications of the GRADE methodology in SRs/MAs of animal experiments, including qualitative descriptive systematic reviews, meta-analyses, and network meta-analyses. It then deeply analyzes the misuse of the GRADE methodology in practice, including incorrect evidence grading, improper classification of evidence, misapplication in qualitative systematic reviews, inconsistencies between the documentation of the upgrading and downgrading process and results, and inappropriate use for making recommendations. Furthermore, this article comprehensively discusses the factors influencing the grading of evidence certainty in SRs/MAs of animal experiments, including the impact of bias risk, indirectness, inconsistency, imprecision, and publication bias on evidence downgrading, as well as the role of large effect sizes and cross-species consistency in evidence upgrading. Finally, in response to the issues discussed, improvement strategies are proposed, including further research and optimization of the GRADE methodology for SRs/MAs of animal experiments, the development of reporting guidelines tailored to the characteristics of SRs/MAs in animal experiment research, and enhanced professional training for researchers in the GRADE methodology. This article aims to improve the quality of evidence in SRs/MAs of animal experiments, strengthen their reliability in clinical decision-making, and promote the more efficient translation of findings from animal experiment research into clinical practice.

**[Key words]** Animal experiment; Systematic reviews; Meta-analyses; Grading of recommendations assessment, development and evaluation; Certainty of evidence; Evidence grading

动物实验是医学和生物学领域中知识探索和问题解决的重要工具<sup>[1]</sup>，即使用动物在受控的实验室条件下进行科学研究。作为实验动物科学的组成部分，动物实验对于临床试验和医学证据的转化具有不可替代的作用<sup>[2]</sup>。在医疗实践中，动物实验的系统评价/Meta分析（systematic reviews/meta-analyses, SRs/MAs）发挥着重要作用，它们不仅能够加速动物实验研究发现的临床应用，还能有效避免时间浪费<sup>[3-4]</sup>。特别是在缺乏人类研究证据的情况下，动物实验的SRs/MAs能够为临床决策和卫生政策制订提供支持<sup>[2]</sup>。然而，证据体的质量即确信度（certainty of evidence）对于医疗决策至关重要，因此对动物实验SRs/MAs的证据体质量进行分级评价是必要的。

证据推荐分级的评估、制订与评价（grading of recommendations assessment, development and evaluation, GRADE）方法是一种评估证据体质量和推荐意见强度的重要工具<sup>[5]</sup>。在动物实验SRs/MAs中应用GRADE方法，可以使得证据体分级更加合理，从而提高SRs/MAs结果的可靠性<sup>[6]</sup>。尽管已有研究对动物实验SRs/MAs中GRADE方法的应用进行了理论阐述，并提供了

实例分析<sup>[6-8]</sup>，但目前GRADE方法在动物实验SRs/MAs中的实际应用情况尚不清楚。

因此，本研究全面收集国内外已发表的使用GRADE方法进行证据体质量评估的动物实验SRs/MAs文献，评估GRADE方法在动物实验SRs/MAs中的应用现状、存在的问题以及证据体质量分级情况，以期为未来的动物实验研究提供有价值的参考。

## 1 GRADE方法的分级原理

GRADE方法提供了一个清晰的框架来评估证据体的质量，将证据体分为高、中、低、极低共4个等级。这种方法首先根据研究设计来评估证据体的初始质量，通常将无明显缺陷的随机对照试验（randomized controlled trial, RCT）的证据体质量定为高等级。证据体的初始质量受到研究的偏倚风险、结果的不一致性、不精确性、间接性以及发表偏倚的影响而降低<sup>[9-13]</sup>。将观察性研究的初始证据体质量通常定为低等级，大效应量、存在剂量-效应关系和负偏倚会提升其证据体质量<sup>[14]</sup>。图1呈现了使用GRADE方法进行证据体质量分级的过程。



图1 使用GRADE方法进行证据体确信心度分级

Figure 1 Using the GRADE methodology to grade the certainty of evidence

此外，GRADE方法还定义了推荐强度，反映了推荐意见对目标人群潜在影响的不确定性。推荐强度分为强推荐和弱推荐<sup>[15]</sup>，这一分类不仅基于证据体的质量，还综合考虑了患者的偏好与价值观、利弊平衡和资源的可利用性<sup>[16-17]</sup>。GRADE方法综合考虑了研究设计、研究质量、结果一致性和其他相关因素，以确定证据体的质量和推荐强度，从而为临床实践和决策提供指导。

## 2 动物实验SRs/MAs中GRADE方法的应用类型

在动物实验SRs/MAs中，数据合并策略通常分为3种主要类型：定性系统评价、Meta分析以及网状Meta分析。对于不同数据分析方法的GRADE分级见图2。

### 2.1 基于定性描述的动物实验系统评价

使用评估定性系统评价证据可信度的工具(confidence in the evidence from reviews of qualitative research, CERQual)来评价证据质量。它从方法学局限性、相关性、一致性和数据充分性4个维度进行评价。方法学局限性关注原始研究的设计和和实施；相关性评估研究目的和对象与系统评价问题的匹配度；一致性检查合并结果与原始研究结果的一致性；数据充分性评价支持系统评价结果的数据量和丰富性。基于这4个方面的评估，CERQual为动物实验SRs的每个结果提供高、中、低、极低的信度分级。

**实例分析：**Zhou等<sup>[18]</sup>的研究使用CERQual对定性证据进行了质量评估。结果显示，由于纳入研究设计的局限性、结果的不一致性以及证据的不精确性，

定性证据的质量普遍较低，影响了证据的可靠性和对临床实践的推荐强度。

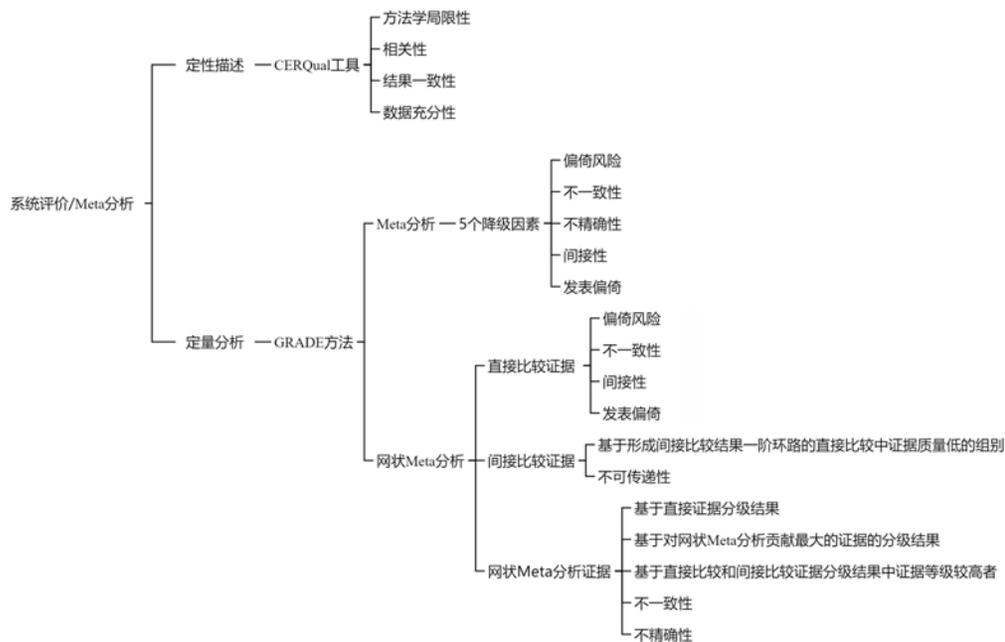
### 2.2 基于Meta分析的动物实验SRs/MAs

动物RCT的起始证据级别为“高”，主要考虑偏倚风险、间接性、不一致性、不精确性和发表偏倚5个降级因素。使用荷兰动物实验系统评价研究中心(systematic review center for laboratory animal experimentation, SYRCLE)发布的SYRCLE动物实验偏倚风险评估工具评估动物研究的偏倚风险；间接性从研究对象、干预措施、比较组、结果的角度进行评估；不一致性通过考虑置信区间(confidence interval, CI)的重叠程度、各个纳入研究效应量的大小和方向、异质性检验的P值和I<sup>2</sup>值进行评估；精确性评估考虑样本是否达到最优信息样本量(optimal information size, OIS)以及可信区间的宽窄程度；发表偏倚结合定性和定量方法全面考虑。动物观察性研究的起始证据级别为低，但确定升级因素的方法仍需进一步研究。

**实例分析：**何冰等<sup>[19]</sup>的研究使用GRADE方法对黄连制剂治疗大鼠代谢综合征的传统Meta分析结果进行了证据质量评级。结果显示，由于纳入研究的方法学质量问题、样本量不足以及显著的统计学异质性，大多数结果的证据质量被评为极低，Lee's指数的改善效果证据质量被评为低。这表明，虽然黄连制剂显示出对代谢综合征大鼠模型的潜在疗效，但由于证据质量的限制，其结论的可靠性和临床应用的推荐强度受到限制，需要更多高质量的研究来验证这些发现。

### 2.3 基于网状Meta分析的动物实验SRs/MAs

与Meta分析方法不同，网状Meta分析方法可同时



注：CERQual，定性系统评价证据可信度；GRADE，推荐分级的评估、制订与评价。

Note: CERQual, confidence in the evidence from reviews of qualitative research; GRADE, grading of recommendations assessment, development and evaluation.

图2 不同数据分析方法的GRADE分级

Figure 2 GRADE for different data analysis methods

纳入直接比较和间接比较证据，使得分级过程相对复杂。GRADE工作组建议分四步对其进行证据质量分级：第一步，分别呈现直接比较和间接比较的效应量和可信区间。第二步，不考虑不精确性，对每一组直接比较和间接比较的证据质量分别进行分级。如果直接证据等级为高且对网状Meta分析结果的贡献大于等于间接证据，则网状Meta分析证据质量基于直接证据的质量等级；否则仍需对间接证据质量进行分级。第三步，基于形成间接证据一阶环路的直接证据质量等级，采取就低原则决定间接证据质量，并考虑不可传递性。第四步，基于直接证据和（或）间接证据等级，考虑不一致性和不精确性，最终确定网状Meta分析的证据质量。

**实例分析：**Zhou等<sup>[18]</sup>的研究使用GRADE方法对定量证据进行了质量评估。结果显示，由于大多数研究存在结果不一致、不精确性以及可能的选择偏倚和报告偏倚，整体证据质量被评为低。此外，大多数研究未能清晰报告基线特征，进一步影响了证据的可靠性。因此，尽管研究提供了关于不同可降解膜在引导骨/组织再生中的疗效的证据，但由于上述局限性，证据的整体质量较低，限制了对研究结果的解释和应用。

### 3 动物实验SRs/MAs中应用GRADE方法的文献特征分析

检索中国知网、万方、中国生物医学文献数据库、PubMed、Embase和Web of Science数据库，检索时间从各数据库建立至2024年4月1日。检索策略结合主题词（MeSH/Emtree）和关键词。中文检索词包括：“动物实验”“鼠”“兔”“狗”“犬”“蛙”“蟾蜍”“猴”“猿”“猪”“猩猩”“鱼”“果蝇”“系统评价”“Meta分析”等。英文检索词包括：“animal experimentation”“animal model”“mice”“rat”“rabbit”“dog”“frog”“toad”“monkey”“ape”“pig”“swine”“paniscus”“bonobo”“chimpanzee”“gorilla”“pongo”“fish”“fruit fly”“systematic review”“meta-analysis”等。经过筛选，共得到42篇使用GRADE方法的动物实验SRs/MAs的文献，其中英文文献39篇<sup>[18,20-57]</sup>，中文文献3篇<sup>[19,58-59]</sup>，卡方检验显示，中英文文献在应用GRADE方法学频率方面差异无统计学意义（ $\chi^2=0.23$ ， $P=0.63$ ）。

纳入动物实验SRs/MAs的基本特征：鼠、犬和猫是最常用的动物模型。根据国际疾病分类第十一次修

订本 (international classification of diseases-11, ICD-11), 消化系统疾病 (9篇, 21.43%) 和肌肉骨骼系统疾病 (7篇, 16.67%) 是 GRADE 方法应用较多的领域; 药物 (20篇, 47.62%) 是最常见的干预措施, 其次是手术 (7篇, 16.67%) 和饮食干预 (5篇, 11.90%); 暴露因素主要是化学物质和环境暴露 (3篇, 7.14%)。27篇 (64.29%) 文献采用了 Meta 分析方法, 2篇 (4.76%) 文献同时采用了 Meta 分析和定性描述, 13篇 (30.95%) 文献采用了定性描述; 14篇 (33.33%) 文献纳入了 1~10 个原始研究, 18篇 (42.86%) 文献纳入了 11~30 个, 10篇 (23.81%) 文献纳入了大于 30 个。

纳入动物实验 SRs/MAs 的证据确定性评级特点: 首次采用 GRADE 方法评估证据体确定性的文献发表于 2012 年。38篇 (90.48%) 文献采用了 GRADE 方法, 2篇 (4.76%) 文献采用了 GRADE 方法的改编版本, 2篇 (4.76%) 文献同时使用了 GRADE 和 CERQual 两种方法; 41篇 (97.62%) 文献将证据体质量分为高、中、低、极低共 4 个等级, 1篇 (2.38%) 文献将证据体质量分为高、中、低共 3 个等级; 19篇 (45.24%) 文献采用了证据概要表 (evidence profiles, EP), 8篇 (19.05%) 文献使用了结果总结表 (summary of findings, SoF), 15篇 (35.71%) 文献未使用这两种标准化模板。

## 4 动物实验 SRs/MAs 中误用 GRADE 方法的主要类型

### 4.1 未对证据体进行正确分级

8篇文献错误地将纳入的原始研究视为一个评分单元。根据 GRADE 方法, 证据体质量分级应针对每个结局指标单独进行, 这是其与传统证据分级系统的主要区别。即使 SRs/MAs 只纳入了一项研究但报告了多个不同的结局指标, 也应对每个结局指标分别进行质量分级。当存在多个结局指标时, GRADE 建议根据其临床重要性对这些指标进行优先级排序, 区分为“至关重要”和“重要”的指标。在这种情况下, 整体的证据体质量评级应依据“至关重要”结局中评级最低的证据来确定<sup>[60]</sup>。

### 4.2 证据体级别分类不当

1篇文献错误地将证据体分为高、中、低共 3 个等级。这与 GRADE 方法所采用的 4 个等级 (高、中、低、极低) 不符, 分类错误可能会对证据体质量和推荐强度的准确评估产生不利影响。

### 4.3 误用于定性系统评价

13篇文献错误地将 GRADE 方法应用于定性系统评价的证据质量评估。目前, GRADE 方法主要适用于定量 SRs/MAs 的分级, 并不适用于定性系统评价。CERQual 工具最早开发于 2010 年, 是由多个国际机构共同制定的定性系统评价分级系统<sup>[61-62]</sup>。CERQual 工具通过评估方法学上的局限性、相关性、结果的一致性以及数据的充分性 4 个维度来对定性系统评价进行证据质量评级。与 GRADE 方法相似, 二者都旨在衡量证据的可信度, 并且使用高、中、低、极低共 4 个等级来表示证据质量。未来研究需要进一步评估 CERQual 工具在动物实验 SRs/MAs 中的适用性和局限性。

### 4.4 升降级过程记录与结果不一致

3篇文献在升降级过程中的记录与其最终的评级结果不匹配, 这可能反映出评级过程缺乏透明度和详细记录。EP 和 SoF 是标准化的模板, 用于结构化地呈现证据分级结果<sup>[63]</sup>。为了提高证据质量结果的呈现质量, 建议采用 EP 和 SoF。此外, 研究者应基于研究设计设定的起点和升降级因素进行仔细审查, 以确保最终等级的准确性。

### 4.5 误用于提供推荐意见

2篇文献错误地将 GRADE 方法用作直接提供推荐意见的工具。虽然 GRADE 方法在多个研究领域都有应用, 但其在不同领域的应用方式和目的存在差异。在临床实践指南的制定中, GRADE 方法不仅评估证据的质量, 还进一步对基于这些证据的推荐意见进行强度分级以指导临床决策。在卫生技术评估中, GRADE 方法的应用重点在于证据质量的评估, 是否提供具体推荐意见取决于评估的具体目的和需求<sup>[64-65]</sup>。在动物实验 SRs/MAs 中, GRADE 方法主要用于证据质量分级, 而不是直接提供推荐意见。

## 5 动物实验 SRs/MAs 中 GRADE 方法的升降级因素

在排除了 19篇 (45.24%) GRADE 方法使用不当的文献后, 对剩余的 23篇 (54.76%) 文献进行深入分析以探讨升降级因素的特征。23篇文献共评估了 232 个证据体, 其中, 7个 (3.02%) 证据体为高质量; 36个 (15.52%) 证据体为中等质量; 71个 (30.60%) 证据体为低质量; 118个 (50.86%) 证据体为极低质量。在这些 SRs/MAs 中, 共记录了 4 个升级因素和 437 个降级因素。主要的升级因素包括大效应量 (2 个,

50.00%) 和跨物种一致性 (2 个, 50.00%)。主要的降级因素包括严重的偏倚风险 (161 个, 36.8%)、结果不精确 (127 个, 29.1%)、不一致性 (108 个, 24.7%) 和其他 (41 个, 9.4%)。

### 5.1 升级因素

在 232 个证据体中, 4 个 (1.72%) 证据体因特定的正面因素而被上调, 其中, 2 个 (50.00%) 证据体由于显示出大效应量; 2 个 (50.00%) 证据体因在多个物种中观察到一致的研究结果, 这些因素均增强了研究结论的普适性和可信度。

在 GRADE 方法中, 虽然观察性研究的初始证据确定性等级通常较低。但在发现大效应量或者跨物种动物实验显示出一致的效应方向和大小, 证据确定性等级可以得到提升。然而, 不同动物物种间结果的一致性如何被评估 (是作为升级因素还是作为不一致性或间接性的指标) 仍需在未来的研究中进一步探讨。

## 5.2 降级因素

### 5.2.1 偏倚风险

在 232 个证据体中, 161 个 (69.40%) 证据体因存在严重的偏倚风险而被降级。而这 161 个证据体中, 61 个 (37.89%) 证据体因 SYRCLE 评分低于 8, 表明这些研究在设计上有严重缺陷; 18 个 (11.18%) 证据体因缺乏分配隐藏和盲法; 15 个 (9.32%) 证据体未透明报告随机序列产生和 (或) 盲法的实施; 12 个 (7.45%) 证据体因纳入的大多数研究存在偏倚; 12 个 (7.45%) 证据体因无随机或系统抽样、样本量选择依据不充分、选择性报告研究结果等原因; 43 个 (26.71%) 证据体未具体说明导致偏倚风险的原因。

SYRCLE 偏倚风险评估工具是专为动物实验设计的, 旨在评估研究的内在真实性。该工具包括了选择性偏倚、实施偏倚、测量偏倚、失访偏倚和报告偏倚多个维度<sup>[66-67]</sup>。SYRCLE 工具对每个条目的偏倚风险进行单独评估, 将风险分为低、高或不明确共 3 个等级, 而不是提供一个总体评分<sup>[66,68]</sup>。这种评估方法避免了为工具内各个要素之间分配固定“权重”, “权重”分配往往缺乏合理标准, 并且可能因研究结果和评审而异<sup>[66]</sup>。

选择性偏倚主要涉及“分配序列”“基线特征”“隐蔽分组”3 个条目。由于动物实验通常样本量较小且随机分配并非动物实验研究中的标准实践模式, 基线特征的差异可能对实验结果产生显著影响<sup>[69]</sup>。因此, 未来的研究需要特别重视基线特征的均衡性, 尤

其是在未实施随机分配或样本量较小的实验中。

此外, 研究者应当更注重随机化方法和隐蔽分组策略的应用, 以降低选择性偏倚。在动物实验中, 科研人员应加强对随机化安置和盲法实施的认知。饲养环境因素 (温度、湿度、光照和水质) 对实验结果有显著影响, 因此, 必须采用标准化程序, 确保实验动物饲养在统一的环境中, 以减少由环境引起的偏倚。盲法的实施能够有效减少干预和结果测量过程中的偏倚, 在评估主观性指标时, 盲法的实施尤为重要<sup>[69-70]</sup>。

### 5.2.2 间接性

在 232 个证据体中, 29 个 (12.50%) 证据体因存在严重的间接性而被降级。间接性主要来源于研究对象选择、干预措施的限制和结果测量。其中, 人群外推 (37.93%) 是导致间接性的最常见原因; 其次是评估方法的差异性 (17.24%) 和干预措施的变异性 (6.90%); 其余的证据体 (37.93%) 未具体说明导致间接性降级的原因。

在评估动物实验证据的间接性时, 需要考虑 4 个主要问题: 首先是研究对象, 需确保使用的动物模型与所研究的疾病紧密相关, 并考虑不同模型因地理和资源条件的差异; 其次是干预或对照措施, 研究中的干预应与研究兴趣相符, 且生物或社会因素相似, 以减少间接性; 再次是结果的类型, 如果研究仅报告替代结果而非直接的临床结果, 那么, 其在临床实践中的应用可能受限; 最后是间接比较, 当缺乏直接比较时, 需通过共同对照进行间接推断<sup>[8]</sup>。

在评估研究对象的间接性时, 需考虑两种特殊情况: 当 SRs/MAs 的目标是为规划临床试验提供信息时, 如果研究包含了低级动物模型, 必须评估其从动物到人类的外推性差异, 在这种情况下, 使用非人类灵长类动物模型的研究通常不考虑间接性问题; 第二, 当研究结果直接用于指导临床决策或制定卫生政策时, 以低级动物模型为基础的研究被认为具有非常严重的间接性, 而以非人类灵长类动物为模型的研究则被认为具有严重的间接性<sup>[6]</sup> (图 3)。

### 5.2.3 不一致性

在 232 个证据体中, 108 个证据体 (46.55%) 因不一致性而被降级, 主要原因是效果的不明确性 (69.44%), 表现为结果虽然倾向于支持或反对某种治疗, 但它们跨越了多个有效性类别或由于试验数量不足而无法评估一致性。此外, 15.74% 的证据体因高异

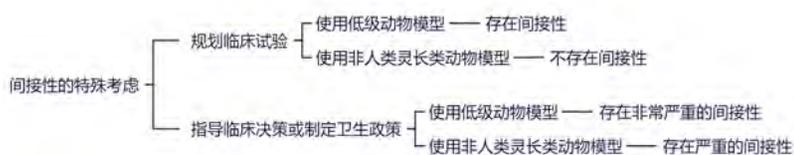


图3 研究对象间接性的特殊情况考虑

Figure 3 Special considerations for indirectness in the study population

质性或  $I^2 > 50\%$  而被降级；1.85% 的证据体因为结果的不一致性；0.93% 的证据体则因为 95%CI 较宽；13 个 (12.04%) 证据体未具体说明导致不一致性降级的原因。

评估动物实验中的不一致性包括分析 CI 的重叠程度、效应量的大小和方向、异质性检验的  $P$  值和  $I^2$  值。当研究存在无法合理解释的异质性时，建议降低证据的确定性等级；如果异质性可以通过考虑动物的种类、干预措施、比较措施或研究的偏倚风险等因素得到解释，研究者应该在 SRs/MAs 中提供或实施适当的亚组分析。未来的研究应深入分析和解释异质性并通过实施针对性的亚组分析来探究其潜在来源<sup>[8]</sup>。

### 5.2.4 不精确性

在 232 个证据体中，127 个 (54.74%) 证据体因不一致性而被降级，其中，57 个 (44.88%) 证据体显示出有限的一致性，表现为效果既不显著也不确定，甚至可能有负面效果；26 个 (20.47%) 证据体因小样本量和 (或) 95%CI 穿过零效应线；9 个 (7.09%) 证据体由于 95%CI 过宽；5 个 (3.94%) 证据体由于纳入研究的高异质性；30 个 (23.62%) 证据体未具体说明导致不精确性降级的原因。

证据体的精确性评估主要关注样本量是否达到 OIS 以及 CI 的宽窄程度。在动物实验中，样本量的计算可以参考 Charan 等<sup>[71]</sup> 在 2013 年提出的动物实验样本量计算公式。连续型数据的样本量计算公式为： $2 \times SD^2 \times (Z_{\alpha/2} + Z_{\beta}) \times 2/d^2$ ，式中， $SD$  为之前同类研究或预实验的标准差； $Z_{\alpha/2} = Z_{0.025} = 1.96$ ； $Z_{\beta} = Z_{0.20} = 0.842$ ； $d$  为两组均值的差值。二分类数据的样本量计算公式为： $2 \times (Z_{\alpha/2} + Z_{\beta})^2 \times P \times (1-P) / (p_1 - p_2)^2$ ，式中， $Z_{\alpha/2} = Z_{0.025} = 1.96$ ； $Z_{\beta} = Z_{0.20} = 0.842$ ； $p_1 - p_2$  为两组事件发生率的差值； $P$  为合并的发生率，即 (干预组发生率 + 对照组发生率) / 2。在解释动物实验结果时，效应量的方向通常比其大小更为重要。在评估精确性时，主要基于 CI 是否包含了无效值。此外，如果 CI 包含了两个或多个级

别，则可考虑降级<sup>[6]</sup>。当前面临的挑战包括开发和验证将不同实验单位纳入 OIS 计算的方法，探索如何将动物实验的效应量转化为临床上的决策阈值，以及对于未进行 Meta 分析的动物实验系统评价，如何更准确地描述和评价其结果的精确性。

### 5.2.5 发表偏倚

在 232 个证据体中，12 个 (5.17%) 证据体因发表偏倚而被降级，其中，6 个 (50.00%) 证据体是由于漏斗图的不对称性和 Egger 检验的显著性 ( $P < 0.05$ )；4 个 (33.33%) 证据体是由于小样本量；2 个 (16.67%) 证据体是由于漏斗图的不对称性。

发表偏倚在证据降级中出现的频率最低，其评估主要基于漏斗图和 Egger 检验。然而，这两种方法都可能会低估或高估发表偏倚<sup>[72]</sup>。因此，需要全面评估发表偏倚的风险，包括细致分析研究结果的分布以识别是否存在阳性结果的过度报告，尤其是小样本研究；审视资金来源和利益冲突的透明度，特别是由制药行业资助的研究；以及评估 SRs/MAs 检索策略的全面性。

## 6 总结及建议

尽管动物实验的 SRs/MAs 结果不是临床决策或卫生政策制定的最佳证据，但当人类面临研究数据不足的公共卫生紧急情况时，决策者可能会依赖动物研究的证据来制定政策。因此，探索如何在动物研究领域有效应用 GRADE 方法，对于提高动物研究证据的质量和适用性至关重要。未来研究应关注以下几个领域：需要进一步研究和优化 GRADE 方法在临床前动物实验 SRs/MAs 中的应用，包括确定 OIS 的计算方法，制定和规范间接性的标准和定义，以及确立升级标准的准则；开发和制定一套符合动物实验研究特性的 SRs/MAs 报告规范，并推动规范在期刊中的采纳<sup>[73]</sup>；确保研究人员在应用 GRADE 方法进行证据质量评级前接受方法论方面的专业培训，以提高评级的专业性和分级结果的透明度；建议推广 GRADE 方法的知识，并在动物实验

SRs/MAs中加强其使用。

GRADE方法虽然为评估证据质量提供了一个结构化的框架,但在动物实验SRs/MAs中的应用尚未广泛普及,并且在实施过程中也出现了一些误用情况。当前,采用GRADE方法进行评级的动物实验SRs/MAs普遍显示出较低的证据质量,这可能限制了它们在临床决策中的应用。为了提升证据的质量和可靠性,未来的研究需要进行更严格的研究设计;相关机构应鼓励进一步的研究以强化GRADE方法的应用;加强研究者对GRADE方法的接受度和理解;在动物实验证据合成中建立和推广GRADE方法的知识体系。

#### [作者贡献 Author Contribution]

李腾飞负责撰写和修改论文;  
郑卿勇、许建国和李艺羿进行文献检索与数据提取;  
周泳佳、徐彩花、张明悦和田杰祥进行数据整理与图表绘制;  
王钢和田金徽构建论文框架,并指导文稿撰写及修改。

#### [利益声明 Declaration of Interest]

本文所有作者均声明不存在利益冲突。

#### [参考文献 References]

- [1] 赵冰. 中医药领域动物实验系统评价报告指南的构建研究[D]. 兰州: 兰州大学, 2022. DOI: 10.27204/d.cnki.glzhu.2022.001639. ZHAO B. Research on the establishment of reporting guidelines for systematic review of animal experiments in the field of traditional Chinese medicine[D]. Lanzhou: Lanzhou University, 2022. DOI: 10.27204/d.cnki.glzhu.2022.001639.
- [2] ROBERTS I, KWAN I, EVANS P, et al. Does animal experimentation inform human healthcare? Observations from a systematic review of international animal experiments on fluid resuscitation[J]. *BMJ*, 2002, 324(7335): 474-476. DOI: 10.1136/bmj.324.7335.474.
- [3] SANDERCOCK P, ROBERTS I. Systematic reviews of animal experiments[J]. *Lancet*, 2002, 360(9333): 586. DOI: 10.1016/S0140-6736(2)09812-4.
- [4] HOOIJMANS C R, RITSKES-HOITINGA M. Progress in using systematic reviews of animal studies to improve translational research[J]. *PLoS Med*, 2013, 10(7): e1001482. DOI: 10.1371/journal.pmed.1001482.
- [5] ATKINS D, ECCLES M, FLOTTORP S, et al. Systems for grading the quality of evidence and the strength of recommendations I: critical appraisal of existing approaches The GRADE Working Group[J]. *BMC Health Serv Res*, 2004, 4(1):38. DOI:10.1186/1472-6963-4-38.
- [6] WEI D, TANG K, WANG Q, et al. The use of GRADE approach in systematic reviews of animal studies[J]. *J Evid Based Med*, 2016, 9(2):98-104. DOI:10.1111/jebm.12198.
- [7] 赵冰, 姜彦彪, 尚志忠, 等. 动物实验系统评价中应用GRADE系统的实例解读[J]. *中国循证心血管医学杂志*, 2019, 11(11):1285-1287. DOI: 10.3969/j.issn.1674-4055.2019.11.02. ZHAO B, JIANG Y B, SHANG Z Z, et al. Interpretation on the application of GRADE approach in systematic review of animal studies[J]. *Chin J Evid Based Cardiovasc Med*, 2019, 11(11):1285-1287. DOI: 10.3969/j.issn.1674-4055.2019.11.02.
- [8] 张婷, 王欢, 邢丹, 等. GRADE在动物实验系统评价中的应用与挑战[J]. *中国循证医学杂志*, 2019, 19(2):248-252. DOI: 10.7507/1672-2531.201809068. ZHANG T, WANG H, XING D, et al. The application and challenge of GRADE in systematic reviews of animal studies [J]. *Chin J Evid Based Med*, 2019, 19(2):248-252. DOI: 10.7507/1672-2531.201809068.
- [9] GUYATT G H, OXMAN A D, VIST G, et al. GRADE guidelines: 4. Rating the quality of evidence--study limitations (risk of bias) [J]. *J Clin Epidemiol*, 2011, 64(4): 407-415. DOI: 10.1016/j.jclinepi.2010.07.017.
- [10] GUYATT G H, OXMAN A D, MONTORI V, et al. GRADE guidelines: 5. Rating the quality of evidence--publication bias [J]. *J Clin Epidemiol*, 2011, 64(12): 1277-1282. DOI: 10.1016/j.jclinepi.2011.01.011.
- [11] GUYATT G H, OXMAN A D, KUNZ R, et al. GRADE guidelines 6. Rating the quality of evidence--imprecision[J]. *J Clin Epidemiol*, 2011, 64(12):1283-1293. DOI:10.1016/j.jclinepi. 2011. 01.012.
- [12] GUYATT G H, OXMAN A D, KUNZ R, et al. GRADE guidelines: 7. Rating the quality of evidence--inconsistency[J]. *J Clin Epidemiol*, 2011, 64(12):1294-1302. DOI:10.1016/j.jclinepi. 2011. 03.017.
- [13] GUYATT G H, OXMAN A D, KUNZ R, et al. GRADE guidelines: 8. Rating the quality of evidence--indirectness[J]. *J Clin Epidemiol*, 2011, 64(12):1303-1310. DOI:10.1016/j.jclinepi. 2011. 04.014.
- [14] GUYATT G H, OXMAN A D, SULTAN S, et al. GRADE guidelines: 9. Rating up the quality of evidence[J]. *J Clin Epidemiol*, 2011, 64(12): 1311-1316. DOI:10.1016/j.jclinepi. 2011. 06.004.
- [15] ANDREWS J C, SCHÜNEMANN H J, OXMAN A D, et al. GRADE guidelines: 15. Going from evidence to recommendation--determinants of a recommendation's direction and strength[J]. *J Clin Epidemiol*, 2013, 66(7): 726-735. DOI: 10.1016/j.jclinepi.2013.02.003.
- [16] ZHANG Y, COELLO P A, GUYATT G H, et al. GRADE guidelines: 20. Assessing the certainty of evidence in the importance of outcomes or values and preferences--inconsistency, imprecision, and other domains [J]. *J Clin Epidemiol*, 2019, 111: 83-93. DOI: 10.1016/j.jclinepi.2018.05.011.
- [17] ZHANG Y, ALONSO-COELLO P, GUYATT G H, et al. GRADE Guidelines: 19. Assessing the certainty of evidence in the importance of outcomes or values and preferences--Risk of bias and indirectness[J]. *J Clin Epidemiol*, 2019, 111: 94-104. DOI:10.1016/j.jclinepi.2018.01.013.
- [18] ZHOU Z L, YUN J H, LI J, et al. Comparison of the efficacy of different biodegradable membranes in guided bone/tissue regeneration: a systematic review and network meta-analysis [J]. *Biomed Mater*, 2023, 18(3). 1088/1748-605X/acc99a DOI: 10.1088/1748-605X/acc99a.
- [19] 何冰, 林建鹏, 陈冠霖, 等. 黄连制剂治疗大鼠代谢综合征的

- Meta分析[J]. 中国医学创新, 2021, 18(18): 165-171. DOI: 10.3969/j.issn.1674-4985.2021.18.041.
- HE B, LIN J P, CHEN G L, et al. A meta-analysis of Huanglian preparations in the treatment of metabolic syndrome in rats [J]. Med Innov China, 2021, 18(18):165-171. DOI: 10.3969/j.issn.1674-4985.2021.18.041.
- [20] CORDELLI E, ARDOINO L, BENASSI B, et al. Effects of Radiofrequency Electromagnetic Field (RF-EMF) exposure on pregnancy and birth outcomes: A systematic review of experimental studies on non-human mammals[J]. Environ Int, 2023, 180: 108178. DOI: 10.1016/j.envint.2023.108178.
- [21] KHATIB M N, SHANKAR A, KIRUBAKARAN R, et al. Effect of ghrelin on mortality and cardiovascular outcomes in experimental rat and mice models of heart failure: a systematic review and meta-analysis[J]. PLoS One, 2015, 10(5): e0126697. DOI: 10.1371/journal.pone.0126697.
- [22] LIN F, CHEN J R, CHEN M M, et al. Protective effect and possible mechanisms of resveratrol in animal models of osteoporosis: A preclinical systematic review and meta-analysis[J]. Phytother Res, 2023, 37(11): 5223-5242. DOI: 10.1002/ptr.7954.
- [23] PARCIANELLO R G, AMERIO E, GINER TARRIDA L, et al. Local hormones and growth factors to enhance orthodontic tooth movement: A systematic review of animal studies[J]. Orthod Craniofac Res, 2022, 25(3): 281-303. DOI: 10.1111/ocr.12544.
- [24] PATIKORN C, NERAPUSEE O, SOONTORNVIPART K, et al. Efficacy and safety of cannabidiol for the treatment of canine osteoarthritis: a systematic review and meta-analysis of animal intervention studies[J]. Front Vet Sci, 2023, 10: 1248417. DOI: 10.3389/fvets.2023.1248417.
- [25] QIN C, GUO Y, YANG D G, et al. Induced pluripotent stem cell transplantation improves locomotor recovery in rat models of spinal cord injury: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials[J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 47(5):1835-1852. DOI: 10.1159/000491064.
- [26] SCAHILL K, JESSEN L R, PRIOR C, et al. Efficacy of antimicrobial and nutraceutical treatment for canine acute diarrhoea: A systematic review and meta-analysis for European Network for Optimization of Antimicrobial Therapy (ENOVAT) guidelines[J]. Vet J, 2024, 303: 106054. DOI: 10.1016/j.tvjl.2023.106054.
- [27] SILVEIRA F M, SCHUCH L F, SCHIMIDT T R, et al. Potentially carcinogenic effects of hydrogen peroxide for tooth bleaching on the oral mucosa: A systematic review and meta-analysis[J]. J Prosthet Dent, 2024, 131(3):375-383. DOI: 10.1016/j.prosdent.2022.02.001.
- [28] XIANG N Y, LIN Y F, SU X Y, et al. Assessing the application of barbed sutures in comparison to conventional sutures for surgical applications: a global systematic review and meta-analysis of preclinical animal studies[J]. Int J Surg, 2024, 110(5): 3060-3071. DOI: 10.1097/JS9.0000000000001230.
- [29] YE X J, GU Y, BAI Y J, et al. Does low-magnitude high-frequency vibration (LMHFV) worth for clinical trial on dental implant? A systematic review and meta-analysis on animal studies[J]. Front Bioeng Biotechnol, 2021, 9: 626892. DOI: 10.3389/fbioe.2021.626892.
- [30] ZHAO Y, ZHANG Y Z, MENG S J, et al. Effects of S-adenosylmethionine on cognition in animals and humans: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials[J]. J Alzheimers Dis, 2023, 94(s1): S267-S287. DOI: 10.3233/JAD-221076.
- [31] WILHELM B, RAJIĆ A, PARKER S, et al. Assessment of the efficacy and quality of evidence for five on-farm interventions for *Salmonella* reduction in grow-finish swine: a systematic review and meta-analysis[J]. Prev Vet Med, 2012, 107(1-2): 1-20. DOI: 10.1016/j.prevetmed.2012.07.011.
- [32] YANG J W, KANG Y H, ZHAO W L, et al. Evaluation of patches for rotator cuff repair: A systematic review and meta-analysis based on animal studies[J]. Bioact Mater, 2022, 10: 474-491. DOI: 10.1016/j.bioactmat.2021.08.016.
- [33] SHOJAEI-ZARGHANI S, FATTAHI M R, KAZEMI A, et al. Effects of garlic and its major bioactive components on non-alcoholic fatty liver disease: A systematic review and meta-analysis of animal studies[J]. J Funct Foods, 2022, 96: 105206. DOI: 10.1016/j.jff.2022.105206.
- [34] ARAGOSA F, CATERINO C, DELLA VALLE G, et al. Tibial tuberosity advancement techniques (TTAT): A systematic review[J]. Animals, 2022, 12(16): 2114. DOI: 10.3390/ani12162114.
- [35] BUDSBERG S C, TORRES B T, SANDBERG G S. Efficacy of postoperative antibiotic use after tibial plateau leveling osteotomy in dogs: A systematic review[J]. Vet Surg, 2021, 50(4): 729-739. DOI: 10.1111/vsu.13603.
- [36] DOLAN E, SWINTON P A, PAINELLI V S, et al. A systematic risk assessment and meta-analysis on the use of oral  $\beta$ -alanine supplementation[J]. Adv Nutr, 2019, 10(3): 452-463. DOI:10.1093/advances/nmy115.
- [37] NGUYEN T, PURCELL E, SMITH M J, et al. Umbilical cord blood-derived cell therapy for perinatal brain injury: A systematic review & meta-analysis of preclinical studies[J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(5): 4351. DOI: 10.3390/ijms24054351.
- [38] PEIXOTO H M, DE OLIVEIRA M R F, ROMERO G A S. Serological diagnosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil: systematic review and meta-analysis[J]. Trop Med Int Health, 2015, 20(3): 334-352. DOI: 10.1111/tmi.12429.
- [39] REEVES L A, ANDERSON K M, LUTHER J K, et al. Treatment of idiopathic chylothorax in dogs and cats: a systematic review[J]. Vet Surg, 2020, 49(1):70-79. DOI:10.1111/vsu.13322.
- [40] ROSSETTI B R, LEMOS A F, SÓ B B, et al. Effects of estrogen deficiency on the progression of apical periodontitis. A systematic review of preclinical studies[J]. Arch Oral Biol, 2022, 142: 105496. DOI: 10.1016/j.archoralbio.2022.105496.
- [41] SCHEUERMANN L M, GORDON-EVANS W J, NAULT A J. Systematic review of the treatment options for pericardial effusions in dogs[J]. Vet Surg, 2021, 50(1): 20-28. DOI: 10.1111/vsu.13475.
- [42] SELMIC L E, RUPLE A. A systematic review of surgical margins utilized for removal of cutaneous mast cell tumors in dogs[J]. BMC Vet Res, 2020, 16(1): 5. DOI: 10.1186/s12917-019-2227-8.
- [43] CHISARI E, WOUTHUYZEN-BAKKER M, FRIEDRICH A W, et al. The relation between the gut microbiome and osteoarthritis:

- A systematic review of literature[J]. PLoS One, 2021, 16(12): e0261353. DOI: 10.1371/journal.pone.0261353.
- [44] CHANG T Y, WANG H A, WANG Y P, et al. Efficacy of traditional Chinese medicine on animal model of IgA nephropathy: A systematic review and meta-analysis[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2022, 2022: 6106993. DOI: 10.1155/2022/6106993.
- [45] DONATI P, TARDECCI A, ZANATTA R, et al. Angiotensin-converting enzyme inhibitors in preclinical myxomatous mitral valve disease in dogs: systematic review and meta-analysis[J]. J Small Anim Pract, 2022, 63(5): 362-371. DOI: 10.1111/jsap.13461.
- [46] DONATI P A, TARRAGONA L, FRANCO J V A, et al. Efficacy of tramadol for postoperative pain management in dogs: systematic review and meta-analysis[J]. Vet Anaesth Analg, 2021, 48(3): 283-296. DOI: 10.1016/j.vaa.2021.01.003.
- [47] JABBAR-LOPEZ Z K, UNG C Y, ALEXANDER H, et al. The effect of water hardness on atopic eczema, skin barrier function: A systematic review, meta-analysis[J]. Clin Exp Allergy, 2021, 51(3): 430-451. DOI: 10.1111/cea.13797.
- [48] TANG S Q, RUAN Z, MA A X, et al. Effect of vitamin K on wound healing: A systematic review and meta-analysis based on preclinical studies[J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 1063349. DOI: 10.3389/fphar.2022.1063349.
- [49] DOMÍNGUEZ-OLIVA A, MOTA-ROJAS D, SEMENDRICH I, et al. The impact of vegan diets on indicators of health in dogs and cats: A systematic review[J]. Vet Sci, 2023, 10(1): 52. DOI: 10.3390/vetsci10010052.
- [50] ELMA Ö, LEBUF E, MARNEF A Q, et al. Diet can exert both analgesic and pronociceptive effects in acute and chronic pain models: A systematic review of preclinical studies[J]. Nutr Neurosci, 2022, 25(10): 2195-2217. DOI: 10.1080/1028415X.2021.1934956.
- [51] WHITTAKER A L, BARKER T H. The impact of common recovery blood sampling methods, in mice (mus Musculus), on well-being and sample quality: a systematic review[J]. Animals, 2020, 10(6): 989. DOI: 10.3390/ani10060989.
- [52] PASKAL W, GOTOWIEC M, STACHURA A, et al. VEGF and other gene therapies improve flap survival-a systematic review and meta-analysis of preclinical studies[J]. Int J Mol Sci, 2024, 25(5): 2622. DOI: 10.3390/ijms25052622.
- [53] DINI C, NAGAY B E, MAGNO M B, et al. Photofunctionalization as a suitable approach to improve the osseointegration of implants in animal models-a systematic review and meta-analysis[J]. Clin Oral Implants Res, 2020, 31(9): 785-802. DOI: 10.1111/clr.13627.
- [54] KATSAMAKIS S, SLOT D E, VAN DER SLUIS L W M, et al. Histological responses of the periodontium to MTA: a systematic review[J]. J Clin Periodontol, 2013, 40(4): 334-344. DOI: 10.1111/jcpe.12058.
- [55] MATTHEWS J J, DOLAN E, SWINTON P A, et al. Effect of carnosine or  $\beta$ -alanine supplementation on markers of glycemic control and insulin resistance in humans and animals: A systematic review and meta-analysis[J]. Adv Nutr, 2021, 12(6): 2216-2231. DOI: 10.1093/advances/nmab087.
- [56] PEREIRA M B, SYDOR B G, MEMARE K G, et al. *In vivo* efficacy of meglumine antimoniate-loaded nanoparticles for cutaneous leishmaniasis: a systematic review[J]. Nanomedicine, 2021, 16(17): 1505-1518. DOI: 10.2217/nnm-2021-0119.
- [57] WEISSHEIMER T, BISCHOFF K F, MICHEL C H T, et al. Does photobiomodulation on the root surface decrease the occurrence of root resorption in reimplanted teeth? A systematic review of animal studies[J]. Restor Dent Endod, 2023, 48(3): e24. DOI: 10.5395/rde.2023.48.e24.
- [58] 吴倩妮, 田宏亮, 张丽茵, 等. 丹参对大鼠肝再生过程影响的 Meta 分析[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(17):2630-2634. DOI: 10.4268/cjcmm20121726.
- WU Q N, TIAN H L, ZHANG L H, et al. Meta-analysis on impact of Danshen on liver regeneration in rats[J]. China J Chin Mater Med, 2012, 37(17): 2630-2634. DOI: 10.4268/cjcmm20121726.
- [59] 马红, 钟宏婧. 高脂饮食与小鼠/大鼠肠道微生态结构改变相关性的 Meta 分析[J]. 循证医学, 2019, 19(2): 92-101. DOI: 10.12019/j.issn.1671-5144.2019.02.010.
- MA H, ZHONG H J. The meta analysis of the relationship between high fat diet and the changes of intestinal microecology in mice/rats[J]. J Evid Based Med, 2019, 19(2): 92-101. DOI: 10.12019/j.issn.1671-5144.2019.02.010.
- [60] 陈耀龙, 姚亮, NORRIS S, 等. GRADE 在系统评价中应用的必要性及注意事项[J]. 中国循证医学杂志, 2013, 13(12):1401-1404. DOI: 10.7507/1672-2531.20130240.
- CHEN Y L, YAO L, NORRIS S, et al. Application of GRADE in systematic reviews: necessity, frequently-asked questions and concerns[J]. Chin J Evid Based Med, 2013, 13(12): 1401-1404. DOI: 10.7507/1672-2531.20130240.
- [61] LEWIN S, GLENTON C, MUNTHER-KAAS H, et al. Using qualitative evidence in decision making for health and social interventions: an approach to assess confidence in findings from qualitative evidence syntheses (GRADE-CERQual) [J]. PLoS Med, 2015, 12(10): e1001895. DOI: 10.1371/journal.pmed.1001895.
- [62] 拜争刚, 刘少堃, 黄崇斐, 等. 定性系统评价证据分级工具: CERQual 简介[J]. 中国循证医学杂志, 2015, 15(12): 1465-1470. DOI: 10.7507/1672-2531.20150238.
- BAI Z G, LIU S K, HUANG C F, et al. An introduction of quality classification tool for qualitative evidence: CERQual[J]. Chin J Evid Based Med, 2015, 15(12): 1465-1470. DOI: 10.7507/1672-2531.20150238.
- [63] GUYATT G H, THORLUND K, OXMAN A D, et al. GRADE guidelines: 13. Preparing summary of findings tables and evidence profiles-continuous outcomes[J]. J Clin Epidemiol, 2013, 66(2): 173-183. DOI: 10.1016/j.jclinepi.2012.08.001.
- [64] 杨珂璐, 葛龙, 刘明, 等. GRADE 在卫生技术评估中的应用[J]. 中国药物评价, 2020, 37(6): 411-416. DOI: 10.3969/j.issn.2095-3593.2020.06.003.
- YANG K L, GE L, LIU M, et al. Application of GRADE in health technology assessment[J]. Chin J Drug Eval, 2020, 37(6):411-416. DOI: 10.3969/j.issn.2095-3593.2020.06.003.
- [65] 杨珂璐, 胡志伟, 刘明, 等. GRADE 在卫生技术评估中应用的实例解析[J]. 中国药物评价, 2021, 38(1):8-13. DOI: 10.3969/j.issn.2095-3593.2021.01.002.

- YANG K L, HU Z W, LIU M, et al. Application of GRADE in health technology assessment: a case analysis[J]. Chin J Drug Eval, 2021, 38(1):8-13. DOI: 10.3969/j.issn.2095-3593.2021.01.002.
- [66] HOOIJMANS C R, ROVERS M M, DE VRIES R B M, et al. SYRCL's risk of bias tool for animal studies[J]. BMC Med Res Methodol, 2014, 14: 43. DOI: 10.1186/1471-2288-14-43.
- [67] 陶功财, 张楠, 尚志忠, 等. 评估动物实验偏倚风险的SYRCL工具实例解读[J]. 中国循证心血管医学杂志, 2019, 11(3):292-295, 300. DOI: 10.3969/j.issn.1674-4055.2019.03.06.
- TAO G C, ZHANG N, SHANG Z Z, et al. Interpretation on examples of SYRCL' tool for interviewing risk of bias in animal experimentation[J]. Chin J Evid Based Cardiovasc Med, 2019, 11(3): 292-295, 300. DOI: 10.3969/j.issn.1674-4055.2019.03.06.
- [68] 陈匡阳, 马彬, 王亚楠, 等. SYRCL动物实验偏倚风险评估工具简介[J]. 中国循证医学杂志, 2014, 14(10):1281-1285. DOI: 10.7507/1672-2531.20140206.
- CHEN K Y, MA B, WANG Y N, et al. SYRCL's risk of bias tool for animal studies[J]. Chin J Evid Based Med, 2014, 14(10): 1281-1285. DOI: 10.7507/1672-2531.20140206.
- [69] 张维益, 李艳飞, 戴岩瑞, 等. SYRCL偏倚风险评估工具发布是否提高动物实验方法质量?[J]. 中国循证心血管医学杂志, 2019, 11(10):1165-1168, 1173. DOI: 10.3969/j.issn.1674-4055.2019.10.04.
- ZHANG W Y, LI Y F, DAI Y R, et al. Does the publication of SYRCL's risk of bias tool improve the methodological quality of animal experiments? [J]. Chin J Evid Based Cardiovasc Med, 2019, 11(10): 1165-1168, 1173. DOI: 10.3969/j.issn.1674-4055.2019.10.04.
- [70] 牛牧町, 赵跃, 易少威, 等. 动物实验的研究计划指南——PREPARE 解读[J]. 兰州大学学报(医学版), 2024, 50(2):55-59. DOI: 10.13885/j.issn.1000-2812.2024.02.009.
- NIU M T, ZHAO Y, YI S W, et al. Guidelines for planning animal experiments for research: a PREPARE interpretation[J]. J Lanzhou Univ Med Sci, 2024, 50(2): 55-59. DOI: 10.13885/j.issn.1000-2812.2024.02.009.
- [71] CHARAN J, BISWAS T. How to calculate sample size for different study designs in medical research? [J]. Indian J Psychol Med, 2013, 35(2): 121-126. DOI: 10.4103/0253-7176.116232.
- [72] KOREVAAR D A, HOOFT L, TER RIET G. Systematic reviews and meta-analyses of preclinical studies: publication bias in laboratory animal experiments[J]. Lab Anim, 2011, 45(4): 225-230. DOI: 10.1258/la.2011.010121.
- [73] 陈耀龙. 医学研究报告规范的发展与简介[J]. 兰州大学学报(医学版), 2022, 48(1): 1-4. DOI: 10.13885/j.issn.1000-2812.2022.01.001.
- CHEN Y L. J Lanzhou Univ Med Sci, 2022, 48(1): 1-4. DOI: 10.13885/j.issn.1000-2812.2022.01.001.
- (收稿日期: 2024-07-26 修回日期: 2024-12-03)  
(本文责任编辑: 丁宇菁)

#### 【引用本文】

- 李腾飞, 郑卿勇, 许建国, 等. 提高动物实验系统评价/Meta分析的证据确定性: GRADE方法的实证研究[J]. 实验动物与比较医学, 2025, 45(1): 101-111. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.109.
- LI T F, ZHENG Q Y, XU J G, et al. Improving the certainty of evidence in animal experiment systematic review/Meta-analysis: An empirical study of the GRADE method[J]. Lab Anim Comp Med, 2025, 45(1): 101-111. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.109.

\*\*\*\*\*

## 《实验动物与比较医学》有关实验动物福利伦理内容的说明

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

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

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

3. 实验动物的用药, 尤其是麻醉镇痛药物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



孙强，研究员，博士生导师。中国科学院脑科学与智能技术卓越创新中心（神经科学研究所）非人灵长类研究平台主任。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。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。此外，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90余篇。

## 人源化小鼠模型培育史

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(2025)01-0112-05

本专栏在之前的两篇文章《NOD小鼠培育接力赛》<sup>[1]</sup>和《殊途同归的免疫缺陷小鼠培育史》<sup>[2]</sup>中，介绍了常用模式动物——免疫缺陷小鼠及其背景品系的生物学特性和培育历程。从中我们可以了解到实验小鼠与生命科学研究史的密切关联，以及科学家们在这一领域的不懈努力和创新精神。事实上，实验小鼠的培育与应用探索从未止步，在免疫缺陷小鼠的基础上又发展出人源化的实验小鼠，这为研究人类疾病提供了更加合适的动物模型。本篇将聚焦于人源化小鼠模型的培育史，为读者朋友们详细介绍其发展过程中的几次关键突破，以进一步理解实验动物资源对推动人类医学进步及健康事业发展的重要价值。

### 1 人源化小鼠培育的3次突破

复杂的生物过程通常需要在个体水平上（体内）进行研究和分析，然而基于伦理考虑，大多数介入性生物学研究并不能以人类作为实验对象。作为人类的替难者，小鼠无疑是生物学和医学领域最常用的实验动物模型。其中，免疫缺陷小鼠的出现，使得在其体内移植人体免疫组织或细胞来构建人鼠嵌合模型，即人源化小鼠成为可能。自1988年首次成功将人体造血细胞移植到重症联合免疫缺陷（severe combined immunodeficiency, SCID）小鼠起，人源化小鼠培育历经了三十余年的发展。至今，人源化小鼠模型已成为

研究人类造血功能、先天性和适应性免疫、自身免疫、传染病、癌症生物学和再生医学等领域的重要模型工具。

无胸腺裸小鼠因发生 *Foxn1*<sup>tm</sup> 基因纯合突变致胸腺发育不良，从而缺乏成熟的T细胞，不发生依赖T细胞的免疫排斥反应。但由于其仍具有B细胞和自然杀伤（natural killer, NK）细胞，因此无法作为人源化小鼠模型的受体动物。SCID小鼠因携带 *Prkdc*<sup>scid</sup> 纯合突变（scid突变）导致T细胞和B细胞均存在成熟缺陷，这使得部分人体细胞可以在该小鼠体内存活。在此基础上，1988年科学家就已成功将人外周血单个核细胞（peripheral blood mononuclear cell, PBMC）和人造血干细胞（hematopoietic stem cell, HSC）移植到SCID小鼠体内，构建了人源化SCID小鼠模型。因此，可以把SCID小鼠的出现视为人源化小鼠培育的第一个突破。

然而，基于SCID小鼠的人源化小鼠模型仍存在一些缺点：（1）植入的人体细胞在SCID小鼠体内重建水平非常低，且不能产生功能性免疫系统；（2）SCID小鼠存在“渗漏”现象，随着年龄的增长，会部分恢复T和B细胞功能；（3）SCID小鼠体内的NK细胞和其他先天免疫活性处于高水平，限制了HSC的植入成功率；（4）移植时为了清除SCID小鼠的内源性造血干细胞，需要对其进行半致死剂量的放射性辐照，而scid突变产生DNA损伤修复缺陷，会导致其抗辐照能力差。基

于以上原因,在人源化小鼠的培育上还需要寻找新的突破。新的契机来自将scid突变导入到非肥胖糖尿病(non-obese diabetes, NOD)小鼠中,即第二代人源化小鼠NOD/scid小鼠的成功培育。

前文《NOD小鼠培育接力赛》<sup>[1]</sup>中已经介绍NOD小鼠不仅血糖代谢异常,还存在多种免疫缺陷(包括NK细胞和补体C5功能缺陷)。将NOD小鼠与SCID小鼠杂交,并连续回交10代以上后,可得到scid突变纯合的同源导入近交系(congenic inbred strain) NOD.Cg-Prkdc<sup>scid</sup>小鼠(简称NOD/scid小鼠)。在遗传组成上,NOD/scid小鼠与NOD小鼠的唯一不同就在于Prkdc这个位点,前者携带纯合的scid突变,而后者是野生型<sup>[3]</sup>。NOD/scid小鼠不仅没有了NOD小鼠的自发糖尿病和胰岛炎表型,而且与包括C3H/scid、C57BL/6-scid在内的scid突变同源导入近交系小鼠和scid突变来源的CB.17/scid小鼠相比,还具有支持更高水平的人体造血细胞植入的能力。研究表明,NOD/scid小鼠的人源细胞移植效率比其他品系scid突变小鼠高5~10倍<sup>[4]</sup>。因此,可以说NOD/scid小鼠是人源化小鼠培育工作的第二个突破。

NOD/scid小鼠的培育成功不仅推动了人源化小鼠模型的广泛使用,也为进一步优化人源化小鼠提供了方向。但NOD/scid小鼠同样存在着诸多不足,主要表现为:(1)因自发淋巴瘤,平均寿命仅有8个月<sup>[5]</sup>;(2)NK细胞仍具有一定活性,同时免疫“渗漏”问题也未得到解决;(3)scid突变导致抗辐照能力弱的问题依然存在。这些缺陷说明人源化小鼠模型培育工作仍有很大的提升空间。基于对免疫系统发育的理解,应用遗传操作技术构建出极重度免疫缺陷小鼠,自然而然地成为了人源化小鼠培育的第三个突破。

当给NOD/scid小鼠注射NK细胞发育相关抗体,阻断NK细胞发育后,可以提高其人体造血细胞移植水平,说明残留的NK细胞活性仍然是影响NOD/scid小鼠人源造血细胞移植能力的主要因素之一<sup>[6]</sup>。如果将残余的NK细胞活性全部消除,是不是可以进一步提升NOD/scid小鼠的人类造血细胞移植能力呢?随着小鼠遗传操纵技术的成熟,科学家几乎可以构建任意基因和任意类型遗传突变的小鼠模型。在此背景下,不同突变类型的白细胞介素(interleukin, IL)-2受体(IL-2 receptor, IL-2R)γ链基因(IL2rg)敲除小鼠被相继构建成功,这为人源化小鼠培育带来了新的突破。

IL-2Rγ链是IL家族中IL-2、IL-4、IL-7、IL-9、

IL-15和IL-21高亲和力受体的关键组成部分,为受体传导这些细胞因子信号发挥重要作用。IL-2Rγ链的缺失会导致T细胞、B细胞发育和功能严重受损,并完全阻止了NK细胞的发育。因此,在NOD/scid背景下通过引入IL2rg突变,就可以形成T、B和NK3种细胞功能同时缺失的小鼠。在这个思路指引下,日本东京大学和美国杰克森(Jackson)实验室先后培育了NOG、NSG和NRG等多种极重度免疫缺陷小鼠。

NSG是商品名NOD scid gamma (NSG<sup>™</sup>)的简称,其正式名称为NOD.Cg-Prkdc<sup>scid</sup> IL2rg<sup>tm1Wjl</sup>/ShiLtSzJ。该小鼠是由Jackson实验室用雌性NOD/scid小鼠与雄性IL2rg基因敲除小鼠B6.129S4-IL2rg<sup>tm1Wjl</sup>/J交配,再用NOD/scid小鼠回交8代后的子代近交培育而成的同源导入近交系小鼠。NOG是NOD.Cg-Prkdc<sup>scid</sup> IL2rg<sup>tm1Sug</sup>/ShiJic简称,由日本东京大学实验动物中心培育。NOG小鼠是比NSG小鼠更早开发出来的极重度免疫缺陷小鼠,与NSG小鼠相比,最大的区别在于IL2rg位点。NOG小鼠引入了一个截短的IL2rg基因(缺乏胞内段,可以结合细胞因子,但不能传递信号),而NSG小鼠则是引入了全长IL2rg基因片段删除。除此之外,NOG小鼠培育使用的是日本保有的NOD/Shi-scid小鼠,而NSG小鼠培育使用的是Jackson实验室保有的NOD/Lt-scid小鼠。这也可能给二者带来一些差异,例如:在人体脐带血移植能力上,NSG小鼠略高于NOG小鼠;在体重上,NSG小鼠要比NOG小鼠重一些<sup>[7]</sup>。而在主要的免疫学性状上,二者高度相似,都是缺少功能性T、B和NK淋巴细胞,同时存在巨噬细胞和补体功能缺陷。

NSG和NOG小鼠很少自发淋巴瘤。现有研究数据表明,NOG和NSG小鼠的胸腺瘤发病率不足1%,而NOD/scid小鼠的胸腺瘤发病率高达67%<sup>[8]</sup>。因此,低自发淋巴瘤的NSG和NOG小鼠更加长寿,不会像NOD/scid小鼠那样只有不到8个月的寿命。需要注意的是,小鼠的IL2rg基因位于X染色体上,因此雌性NSG小鼠为IL2rg<sup>tm1Wjl</sup>纯合子,雄性小鼠为IL2rg<sup>tm1Wjl</sup>半合子。

为了解决scid突变导致小鼠抗辐照能力弱的问题,Jackson实验室又培育了NOD.Cg-Rag1<sup>tm1Mom</sup>IL2rg<sup>tm1Wjl</sup>/SzJ小鼠(简称NRG小鼠)。与NSG和NOG小鼠不同的是,NRG小鼠的T、B细胞功能缺失是由免疫细胞成熟发育的另一个关键基因——重组激活基因(recombination activating gene 1, Rag1)突变所致。由于Rag1基因突

变不影响DNA损伤修复,所以NRG小鼠不存在因携带scid突变导致抗辐照能力差的问题。理论上, NRG小鼠是一种比NOG和NSG小鼠更优秀的极重度免疫缺陷小鼠<sup>[9]</sup>。

与所有先前培育的免疫缺陷小鼠模型相比,引入*IL2rg*基因突变的免疫缺陷小鼠极大地提高了人体造血细胞植入能力,也使得NOG、NSG和NRG等成为人源化小鼠模型构建中最常用的受体动物,它们不仅能够支持大量的人类免疫细胞长期植入和稳定存在,还能形成部分人类造血功能<sup>[10]</sup>。因此,可以把引入*IL2rg<sup>null</sup>*或*Rag1*突变,培育出NOG、NSG和NRG等极重度免疫缺陷小鼠,视作人源化小鼠培育的第三个突破。

## 2 使用NOD背景品系小鼠培育的原因

在上述人源化小鼠培育过程,人们不禁要问:为何常用的极重度免疫缺陷小鼠如NSG、NOG、NRG和B-NDG等都要以NOD小鼠作为背景品系进行培育呢?

研究表明,以C57BL/6(B6)为背景品系,敲除重组激活基因(*Rag2*)和*IL2rg*得到纯合BRG小鼠(B6-*Rag2<sup>null</sup>IL2rg<sup>null</sup>*)同样会出现T、B和NK细胞功能缺失,成为极重度免疫缺陷小鼠<sup>[11]</sup>。但使用BRG小鼠进行人类细胞(如HSC)移植造模时,其HSC定植和生长分化能力要远低于在NOD小鼠遗传背景下培育的具有相同基因突变的NRG(NOD-*Rag2<sup>null</sup>IL2rg<sup>null</sup>*)小鼠。那么是什么原因导致了这一差异呢?

哺乳动物免疫系统中除了T、B和NK细胞外,还有一种被称为巨噬细胞的免疫细胞。它们以细胞吞噬的方式清除体内的细胞碎片、外来病原菌或异物<sup>[12]</sup>。巨噬细胞的吞噬作用受其细胞表面的各种信号分子调控。其中有一种细胞表面受体分子被称为信号调控蛋白a(signal-regulatory protein  $\alpha$ , SIRP- $\alpha$ )。SIRP- $\alpha$ 与其配体CD47结合后,会向巨噬细胞发送减少或停止吞噬的信号。CD47是HSC表面分子之一,因此,在人源化小鼠中,HSC可借助CD47与宿主巨噬细胞上的SIRP- $\alpha$ 结合来抑制巨噬细胞的吞噬作用<sup>[13]</sup>。从免疫排斥的角度理解,亦可把CD47看作是HSC在宿主中实现“自我”身份识别的标志。这种作用机制类似于HSC向巨噬细胞发出了“别吃我”(don't eat me)的信息。因此,宿主小鼠体内巨噬细胞上的SIRP- $\alpha$ 对HSC所携带CD47的识别能力强弱,将决定HSC的最终命运。其识别能力弱,就无法有效向巨噬细胞发送“别吃我”信号,这将导致多数HSC被巨噬细胞吞噬;其

识别能力强,就能有效地发送出“别吃我”信号,得以让更多的HSC存活。

进一步的疑问是,为何NOD背景品系的小鼠可以如此高效地接收来自HSC的“别吃我”信号呢?

通过基因比对分析发现,原来NOD小鼠巨噬细胞上的SIRP- $\alpha$ 序列非常独特。与129和B6等其他小鼠品系相比,NOD小鼠的SIRP- $\alpha$ 蛋白序列和空间结构与人类的SIRP- $\alpha$ 更为相似。这令NOD小鼠的SIRP- $\alpha$ 与人源CD47的亲合力(识别能力)远高于B6等其他品系小鼠(提高10倍以上)。因此,将HSC移植到具有NOD背景的免疫缺陷小鼠体内后,“别吃我”信息传递更高效,从而极大地降低了巨噬细胞对植入HSC的吞噬清除作用。

以同源导入的方式将NOD小鼠的SIRP- $\alpha$ 基因(NOD<sup>SIRP $\alpha$</sup> )导入到BRG小鼠,得到背景品系为B6并携带NOD-SIRP $\alpha$ 基因的BRGS(B6-*Rag2<sup>null</sup>IL2rg<sup>null</sup>NOD<sup>SIRP $\alpha$</sup>* )小鼠<sup>[14]</sup>。该小鼠的HSC移植效率不仅远高于BRG小鼠,甚至比具有NOD背景的NRG小鼠还要高。

## 3 人源化免疫系统小鼠模型的培育

在人源化小鼠的培育上,美国和日本科学家们一直是你追我赶又互通有无,激烈地比拼着(图1)。美国的Jackson实验室先于日本培育出了NOD/scid小鼠,但日本的东京大学却先于美国培育出了含*IL2rg*基因功能缺失突变的NOG小鼠(2002年日本培育出NOG小鼠,2005年美国培育出NSG小鼠),随后美国科学家们(来自Jackson实验室)又培育出了抗辐照的NRG小鼠。2015年,中国的百奥赛图公司通过基因编辑技术直接将NOD/scid小鼠的*IL2rg*基因敲除(大片段删除),也获得了类似NOG和NSG的极重度免疫缺陷小鼠,即NOD-*Prkdc<sup>scid</sup>IL2rg<sup>tm1</sup>*/Bcgen小鼠,商品名为B-NDG<sup>®</sup>。从生长曲线看,B-NDG<sup>®</sup>与NSG小鼠类似。B-NDG<sup>®</sup>的*IL2rg*基因突变是在NOD/scid小鼠上直接实施的,不同于通过同源导入方式引入*IL2rg*突变的NSG和NOG小鼠。因此,B-NDG<sup>®</sup>小鼠具有更高的NOD背景纯度。

有了极重度免疫缺陷小鼠后,通过将人类免疫系统的一部分(如PBMC)移植到其(如NSG小鼠)体内即可以得到人源化PBMC(Hu-PBMC)小鼠模型。一方面,该模型的构建速度通常较快,可在较短时间内获得成熟的人类T细胞,常被用于T细胞功能研究和肿瘤免疫治疗评价;另一方面,PBMC主要以成熟的T



图1 免疫缺陷小鼠培育简史

细胞为主，因此容易引发移植物抗宿主病（graft versus host disease, GVHD），导致小鼠生存时间缩短，进而限制了其长期使用。另外，人类免疫系统的其他成分（如B细胞、巨噬细胞、NK细胞）也难以在这种模型中完全重建。

如果将HSC中的CD34<sup>+</sup>细胞移植到新生或免疫缺陷小鼠体内，就会得到Hu-CD34小鼠。相比Hu-PBMC小鼠，Hu-CD34小鼠具有更全面的免疫系统，通常会包括T细胞、B细胞、巨噬细胞和NK细胞。因此，Hu-CD34小鼠更适合用于研究复杂的免疫反应，并可以进行长期研究，适合模拟慢性传染病和癌症免疫疗法的研究。该小鼠的缺点是免疫系统重建速度较慢，通常需要几个月的时间才能获得成熟的免疫细胞；此外，人类免疫系统的重建并非总是完全成功，某些特定的免疫细胞群体可能出现功能不全的表现。

上述两种人源化小鼠模型移植的人类细胞均来自造血系统的免疫细胞，因此被称为人源化免疫系统小鼠模型。除此之外，通过将人类肝细胞移植到免疫缺陷小鼠的肝脏中，亦可以得到人源化肝脏小鼠模型。该模型可以模拟人类肝脏的药物代谢，因此，在药物代谢、毒性评价、相互作用等研究中发挥着重要应用，常被用于研究与肝脏相关的疾病，如肝炎、肝纤维化和肝癌等。但该模型也有其缺点，主要表现为小鼠的肝脏微环境与人类差别很大，移植的人类肝细胞无法完全再现其在人体中的功能；另一个缺点是肝脏人源化水平受小鼠寿命和免疫系统的限制，很难做到长期维持人类肝脏功能。

除了直接用于免疫等相关疾病研究外，通过将肿瘤患者的原代肿瘤组织移植到免疫缺陷小鼠体内，还可以获得人源化肿瘤小鼠模型，即患者来源的异种移植肿瘤（patient-derived xenograft, PDX）模型。该模型的特点是保留了人类肿瘤的绝大多数基因组和组织学特征，进而保持了移植肿瘤的异质性和患者特异性，较好地反映了人类肿瘤的生物学特征。PDX模型常用于抗癌药物筛选和个性化癌症治疗研究，能较为准

确地预测药物在人类患者中的疗效。但正是由于缺乏人类免疫系统，该模型无法用于研究肿瘤免疫反应或免疫治疗。此外，肿瘤在小鼠体内的生长环境与在人体内完全不同，因此药物反应可能也有所不同。另外，在肿瘤移植过程中，选择压力也会导致部分肿瘤特性改变，肿瘤无法完全保持其原始状态。

总而言之，尽管历经多年研究，人源化小鼠的培育得到了极大发展，也为人类疾病的研究做出了不可估量的贡献，但由于人类细胞和小鼠微环境之间存在着无法克服的物种屏障，时至今日，人源化小鼠仍然只能重构部分人体功能。这也意味着在研究某些复杂疾病和筛选新药时，必须结合更多临床与体外模型的数据来验证，从而获得更客观、全面的结论。有鉴于此，目前通过遗传操作技术将人类基因（如细胞因子、人类主要组织相容性抗原等）移植到NSG等免疫缺陷小鼠体内，实现对其微环境的改造，令其更好地支持人体功能的重建，已经成为当下人源化小鼠培育的新方向。这一做法不仅有助于人类免疫细胞的归巢和增殖，还可以在更大程度上模拟人类的免疫反应过程，为疾病机制研究及药物评估提供了更精准的动物模型。此外，读者朋友们也不妨思考一下，为何相较于NOD和NOD/scid小鼠，NSG和NOG小鼠很少自发淋巴瘤？

**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. 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.
- [2] 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.
- [3] GREINER D L, SHULTZ L D, YATES J, et al. Improved engraftment of human spleen cells in NOD/LtSz-scid/scid mice as compared with C.B-17-scid/scid mice[J]. Am J Pathol, 1995, 146(4):888-902. DOI:10.1111/j.1399-0039.1995.tb02469.x.
- [4] HESSELTON R M, GREINER D L, MORDES J P, et al. High levels of human peripheral blood mononuclear cell engraftment and enhanced susceptibility to human immunodeficiency virus type 1 infection in NOD/LtSz-scid/

- scid mice[J]. J Infect Dis, 1995, 172 (4): 974-82. DOI:10.1093/infdis/172.4.974.
- [5] IMADA K. Immunodeficient mouse models of lymphoid tumors[J]. Int J Hematol, 2003, 77(4): 336-341. DOI: 10.1007/BF02982640.
- [6] SHULTZ L D, ISHIKAWA F, GREINER D L. Humanized mice in translational biomedical research[J]. Nat Rev Immunol, 2007, 7(2):118-130. DOI:10.1038/nri2017.
- [7] NAGATANI M, KODERA T, SUZUKI D, et al. Comparison of biological features between severely immuno-deficient NOD/Shi-*scid* *Il2rg*<sup>null</sup> and NOD/LtSz-*scid* *Il2rg*<sup>null</sup> mice[J]. Exp Anim, 2019, 68(4):471-482. DOI:10.1538/expanim.19-0024.
- [8] TILLMAN H, JANKE L J, FUNK A, et al. Morphologic and Immunohistochemical Characterization of Spontaneous Lymphoma/Leukemia in NSG Mice[J]. Vet Pathol, 2020, 57(1): 160-171. DOI:10.1177/0300985819882631.
- [9] AKAMATSU Y, OETTINGER M A. Distinct roles of RAG1 and RAG2 in binding the V(D)J recombination signal sequences [J]. Mol Cell Biol. 1998, 18(8): 4670-4678. DOI: 10.1128/MCB.18.8.4670.
- [10] ZHANG P, LIU Y, LIAN C, et al. SH3RF3 promotes breast cancer stem-like properties via JNK activation and PTX3 upregulation[J]. Nat Commun, 2020, 11(1): 2487. DOI: 10.1038/s41467-020-16051-9.
- [11] GARRETT W S, LORD G M, PUNIT S, et al. Communicable ulcerative colitis induced by T-bet deficiency in the innate immune system[J]. Cell, 2007, 131(1): 33-45. DOI: 10.1016/j.cell.2007.08.017.
- [12] REN W, RUBINI P, TANG Y, et al. Inherent P2X7 receptors regulate macrophage functions during Inflammatory diseases[J]. Int J Mol Sci, 2021, 23(1): 232. DOI: 10.3390/ijms23010232.
- [13] KWONG L S, BROWN M H, BARCLAY A N, et al. Signal-regulatory protein  $\alpha$  from the NOD mouse binds human CD47 with an exceptionally high affinity— implications for engraftment of human cells[J]. Immunology, 2014, 143(1): 61-67. DOI:10.1111/imm.12290.
- [14] MURATA Y, KOTANI T, OHNISHI H, et al. The CD47-SIRP $\alpha$  signalling system: its physiological roles and therapeutic application[J]. J Biochem, 2014, 155(6):335-44. DOI:10.1093/jb/mvu017.

(收稿日期:2024-10-23 修回日期:2025-02-22)

(本文责任编辑:丁宇菁)

#### 【引用本文】

孙强. 人源化小鼠模型培育史[J]. 实验动物与比较医学, 2025, 45(1): 112-116. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.154.

\*\*\*\*\*

## 《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

# 《实验动物与比较医学》稿约(2025年版)



《实验动物与比较医学》(CN 31-1954/Q, ISSN 1674-5817)创刊于1981年,系国内第一本实验动物科技领域的专业学术性刊物。本刊兼顾普及与提高,刊登实验动物和比较医学领域的研究新成果、新进展和各种信息,内容主要涉及人类疾病动物模型构建、实验动物资源开发与利用、实验动物设施及管理、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,以及实验动物应用于生物医药各领域的基础与应用研究。目前本刊为中文双月刊,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主办。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。欢迎各方作者投稿。

## 1 稿件写作要求和注意事项

**1.1 总体要求:** 研究论著的内容必须构思有据、设计严密、材料标准、方法可靠、数据精确且运用恰当的统计学方法分析处理,应在前人工作基础上有所发展,提供新知;具体要求参见本刊发布的《动物实验与比较医学研究论文出版规范清单(2024年版)》。文献综述或实践探索类文稿应由相关科研团队基于自身近年来的研究成果或实践经验撰写,要求有较强的前瞻性和指导性。

**1.2 论文结构:** 论文内容一般按下列顺序分节排列。中文和英文对照的文题、作者姓名、单位名称(含城市和邮编)、结构式摘要和关键词,引言,材料与方法,结果,讨论,参考文献。基金项目、第一作者和通信作者简介(含E-mail和ORCID)放在首页脚注位置,致谢、医学伦理声明、作者贡献及利益声明等信息放在讨论之后。正文中各级标题层次按1、1.1、1.1.1、……的形式排列。

**1.3 文题及摘要:** 论文标题力求简明、具体、确切,应能概括出文章要旨。中文题目字数一般以少于20个汉字为宜,尽量不使用非公知的缩略词;英文标题内容应与中文对应一致,且各个实词的首字母大写。中英文摘要应具有独立性和自明性,尽量完整、准确地呈现论文的主要内容,字数应在500字以上;其中,研究论著、系统综述和Meta分析类论文的摘要撰写应采用IMRAD结构,即分目的、方法、结果和结论四部分,一般应是800字以上、具有自明性的长摘要。关键词应尽量选用美国国立医学图书馆Medical Subject Headings(MeSH)中的主题词,3~5个,中英文相对应。

**1.4 正文要点:** 正文中引言部分需说明本研究背景和创新

点。方法部分应介绍清楚研究方案及其关键信息,包括研究对象的数量和纳入及排除标准、实验动物麻醉和安乐死等福利伦理要点、改进和创新的方法及操作步骤、检测指标和研究观察的主要及次要结局等,以保障研究的可重复性。此外,研究中所用试剂应注明生产厂家和批号,仪器应注明制造商和型号;实验分组应详细说明,应设空白对照、阴性对照及阳性对照。正文中结果部分应与之前的方法部分一一对应,并包含具体的统计学分析数据。有关本实验结果的讨论性文字应放在讨论部分,需深入讨论和比对国内外相关研究文献并提出展望。

**1.5 统计学要求:** 应用恰当的统计学方法进行定量分析,并列出具体的统计分析软件名称及版本号。统计学符号按GB/T 3358—2009《统计学词汇及符号》的有关规定书写,如:(1)正态分布的计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示,非正态分布时用中位数 $M$ (四分位数)表示;(2)计数资料的卡方检验应给出 $\chi^2$ 值;(3)两组比较的独立样本 $t$ 检验应给出 $t$ 值;(4)多组比较的方差分析应给出 $F$ 值,然后组内两两比较应用LSD- $t$ 检验或SNK- $q$ 检验等,给出相应的 $t$ 值或 $q$ 值;(5)相关性分析应给出相关系数 $r$ 值;(6)差异是否有统计学意义应给出具体的 $P$ 值范围。

**1.6 图表要求:** 图表分别按其在正文中出现的先后次序连续编码。每幅图表应有中英文对照的标题、表头及注解说明。整个图表及其注解内容应具有自明性。照片图要求有足够的清晰度和对比度,需按在正文中出现的顺序陈列每张高清组合图。显微照片还需注明放大倍数(或给出标尺)和染色方法。非原创图表必须提供授权使用证明。

**1.7 单位、数字和符号:** 计量单位按《中华人民共和国法定计量单位》要求书写,并以单位符号表示。数字使用执行GB/T 15835—2011标准《出版物上数字用法》的相关规定,公历世纪、年代、年、月、日、时刻和计数、计量均采用阿拉伯数字表示。

**1.8 名词术语:** 科技名词应规范使用正确术语(参考“术语在线”,<https://www.termonline.cn>),药品名应用通用名(非商品名),非常见物种应列出拉丁学名。非常用缩略语需要在首次出现时按照“中文全称(英文全称,英文缩略词)”的格式介绍,后面直接用缩略语即可。

**1.9 参考文献:** 无论是综述、论著,还是经验交流类文章都需引用足量的参考文献,且应尽量引用新而有代表性的原创性文献,避免引用已撤销文献、会议摘要及人工智能(AI)生成资料。综述文章的参考文献中最近3年的一般应占50%以上,论著类文章应占30%以上。参考文

献引用格式应参照GB/T 7714—2015《信息与文献 参考文献著录规则》要求,采用顺序编码制著录,即依照其在正文(含图表)中出现的先后顺序用阿拉伯数字加方括号上标在相应文字之后。文后对应的参考文献应详细著录其著作者姓名、文题、出处、年卷期、页码及DOI等完整信息,中文文献还应给出英文翻译。常见的参考文献标识包括:图书M、期刊J、报纸N、学位论文D、会议报告C、标准S、专利P、档案(包括条例、法规及公文等)A、电子公告EB。

## 2 投稿要求及注意事项

**2.1 投稿方式:** 请通过本刊官网(<http://www.slarc.org.cn/dwyx>)的在线投稿系统(官网首页左上角“作者投稿”)进行投稿。投稿前请仔细阅读官网首页的“期刊政策”和“投稿必看”中相关说明。投稿时请按照系统要求步骤填写所有正确信息。

**2.2 投稿材料:** 投稿时需上传必要的补充材料,清单如下。(1) WORD文稿;(2) 投稿自查清单(逐条打钩);(3) 单位介绍信(盖章);(4) 基金资助证明(如有);(5) 实验动物及动物实验有关的“三证一表”(如涉及),包括实验动物生产许可证、实验动物质量合格证、实验动物使用许可证和动物福利伦理审查表;(6) 人体试验伦理审批证明文件(如涉及);(7) 作者贡献声明表;(8) 利益冲突声明表;(9) 版权转让协议;(10) 其他辅助材料(如高清图原图、原始数据、视频及音频等)。以上材料均提供电子文件即可。

**2.3 学术诚信:** 来稿须是作者独立取得的原创性成果,无抄袭、剽窃、涉密、一稿多投、署名争议等问题,且保证文稿中所有实验材料、方法和结果等陈述内容(包括数据)均真实可信。本刊杜绝第三方代投、代写和代修行为,也不接收AI合成的稿件(包括图像)。如有AI辅助,则必须在投稿时说明涉及部分及使用工具。一旦发现来稿存在学术不端行为,将撤稿处理,并通报作者所在单位。

**2.4 作者署名:** 作者署名及单位信息(包括顺序)需在投稿时确认。多中心合作论文须确保无知识产权争议。集体(团队)署名的论文须指定主要负责人作通信作者。在线投稿时请填写每一位署名作者的完整信息,并在文末说明所有署名作者的具体贡献及利益冲突情况。署名即是确认知情并能够对本文内容负责,其中第一作者或通信作者负责与期刊联系并能回应读者疑问。

**2.5 医学伦理:** 实验动物的使用需遵守《实验动物管理条例》和《实验动物福利伦理审查指南》(GB/T 35892—2018)等国家法规及标准,以及ARRIVE 2.0、IGP 2012等国际规范。动物实验需遵守“3R”原则,经得所在单

位实验动物福利伦理委员会(或相关机构)的审查批准,其中实验动物麻醉、安乐死及肿瘤负荷等均需符合动物福利伦理要求。人体临床试验需先注册(提供注册号),并经所在单位的医学伦理委员会审批通过,其中受试内容及其标本获取等需签署知情同意书。

**2.6 评审政策:** 本刊执行严格的三审三校制度,并遵循国内外出版伦理相关规范,包括COPE和ICMJE推荐规范等国际指南。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(其间遵守发表前保密义务),才能决定录用与否。作者投稿后可在线查询审稿进度,若有疑问或加急需求可直接联系编辑部。退修稿件逾期3个月未回复时,视作自动撤稿。

**2.7 编校修改:** 按照《中华人民共和国著作权法》有关规定,在遵循作者文责自负原则的基础上,本刊有权对录用稿件做文字方面的编辑加工(修改或删除)。凡有涉及原意的修改,会请作者审核确认。送印前,还会请作者认真校对清样。逾期未回复者视为同意修改和发表。发表后如需勘误,须经规范的申请更正流程。

**2.8 版权说明:** 本刊为开放获取期刊,使用CC BY-NC-ND 4.0协议。所有文章一经发表即可永久供读者免费阅读和下载。作者向本刊投稿,即视为愿意将著作财产权(包括但不限于复制权、发行权、翻译权、汇编权、改编权、信息网络传播权等)授予本刊,而且本刊有权将上述权利转授给第三方。所有稿件均须署名作者签署版权转让协议书。

**2.9 相关费用:** 本刊对所有来稿免收审稿费。稿件确认录用后,需支付包含彩版制作费在内的论文发表费(200元/千字,彩版1000元)。优秀稿件可酌情减免版面费。稿件刊出后,编辑部一次性支付稿酬(包含所有版权转让的报酬),并赠当期杂志2册。

**2.10 数字推广:** 本刊为中国科技论文统计源期刊(即中国科技核心期刊),并被SCOPUS、DOAJ、CA、Ulrichsweb和WPRIM等多个国际重要数据库收录。本刊提供网络首发即优先在线出版服务,文稿一经录用即可通过中国知网和期刊官网优先数字发布。期刊正式出版后,读者可在本刊官网、中国知网、万方、维普和超星等国内多家数字平台以及国际数据库中实现文献检索。同时,本刊官网中所有过刊文献及相关资料均可免费下载。

**2.11 联系地址:** 上海市浦东新区金科路3577号,《实验动物与比较医学》编辑部(邮政编码:201203)。电话:021-50793657。E-mail: [hjb50793657@163.com](mailto:hjb50793657@163.com)。投稿咨询QQ群:750879769。

《实验动物与比较医学》编辑部