

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2期(总第210期)

2025年4月25日出版

主管

上海科学院

主办

上海市实验动物学会

上海实验动物研究中心

编辑

《实验动物与比较医学》编辑委员会

主编

王健

执行主编

吴宝金

出版

《实验动物与比较医学》编辑部

地址: 上海市金科路3577号

邮编: 201203

电话: 021-50793657

E-mail: bjb50793657@163.com

网址: <http://www.slarc.org.cn/dwyx>

编辑部负责人

张俊彦

印刷

上海新开宝商务印刷有限公司

发行

上海市报刊发行局

范围: 国内公开发刊

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

人类疾病动物模型

来曲唑缓释片皮下给药构建小鼠多囊卵巢综合征模型及其肝脏转录组学分析

许秋雨, 严国锋, 付丽, 范文华, 周晶, 朱莲, 仇淑雯,

张洁, 吴铃..... 119

异常子宫出血大鼠模型的构建与评价

连辉, 姜艳玲, 刘佳, 张玉立, 谢伟, 薛晓鸥, 李健..... 130

基于16S rRNA测序的2型糖尿病db/db小鼠模型口腔菌群差异分析

潘钱家, 葛峻沂, 胡楠, 华飞, 顾敏..... 147

啮齿类动物药物成瘾模型的构建方法 and 应用进展

王碧莹, 鲁家铄, 咎桂影, 陈若松, 柴景蕊, 刘景根, 王瑜璐..... 158

常见哮喘动物模型的建立方法与评价研究进展

罗世雄, 张赛, 陈慧..... 167

基于中西医临床病证特点的重症肌无力动物模型分析

陈钰涵, 陈瑾玲, 李欣, 区燕华, 王斯, 陈镜伊, 王兴易,

袁嘉丽, 段媛媛, 羊忠山, 牛海涛..... 176

实验动物与职业健康专题

实验动物与职业健康专题·导语

邵奇鸣..... 187

实验动物机构职业健康安全管理体系建设要点

邵奇鸣, 卞勇, 施爱民..... 188

浅谈非人灵长类实验动物从业人员的职业健康管理措施

李倩, 陈佳琦, 李丽红, 张飞燕, 毛华明, 吕龙宝..... 197

国内普通高校实验动物从业人员职业健康风险防控概述

张倩, 邓青秀, 蔡林..... 206

实验动物机构职业健康档案建立内容及要点

许超, 孙秋芳, 邵奇鸣..... 214

实验动物机构建设项目职业健康防护设施“三同时”的实施要求

蔡梦诗, 苏醒, 邵奇鸣..... 221

实验动物资源开发与利用

登革病毒对树鼩不同组织来源细胞的易感性及感染特性研究

刘欣, 杞梦迪, 王文广, 罕园园, 陆美丽, 李娜, 代解杰, 陆彩霞 229

实验动物福利与伦理

感染性动物实验的福利与伦理特殊要求

闵凡贵, 富宏坤, 刘永刚, 刘香梅, 刘忠华, 李垚, 陶雨风 239

科普讲坛

动物实验中性别“歧视”的危害与反思

孙强 247

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	129
华东地区第十七届实验动物科学学术交流会沪成功举办	146
《实验动物与比较医学》第5届(2024年)优秀审稿人获奖名单	157
上海实验动物科普志愿者服务队征集“实验动物百问百答”	220
《实验动物与比较医学》第5届(2022—2024)优秀论文获奖名单	附1
《实验动物与比较医学》2025年刊务理事会名单	附2
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*132*zh*P*¥ 30.00*2000*15*2025-04

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

本期责任编辑	周晓辉							
本期审稿专家	白玉	陈民利	陈瑛	代解杰	戴然然	丁玉强	富群华	江振洲
	李顺	李垚	刘晓宇	刘月环	刘真	陆尔奕	木良善	潘学营
	蒲小平	施爱民	宋国华	宋晓明	汤静	王朝霞	王健	魏强
	肖君华	谢建芸	谢淑武	熊炜	徐平	姚明	张璇	张周
	赵太云	郑茂恩	周晓辉					
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	韩凌霞	陶启辰	刘晓宇	吴凌波			
本期实习编校	崔占鼎	干明红	洪怡	李文杰	姜怡欣	陆佳雯	吴昊晟	于秀伟
	张萍	周培	周烁					

LABORATORY ANIMAL AND COMPARATIVE MEDICINE

Bimonthly Established in September, 1981 Volume 45, Issue 2 April 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, ZHOU Xiaohui

CONTENTS IN BRIEF

Animal Models of Human Diseases

A Mouse Model of Polycystic Ovary Syndrome Established Through Subcutaneous
Administration of Letrozole Sustained-Release Pellets and Hepatic Transcriptome
Analysis
*XU Qiuyu, YAN Guofeng, FU Li, FAN Wenhua, ZHOU Jing, ZHU Lian,
QIU Shuwen, ZHANG Jie, WU Ling* 119

Construction and Evaluation of a Rat Model of Abnormal Uterine Bleeding
LIAN Hui, JIANG Yanling, LIU Jia, ZHANG Yuli, XIE Wei, XUE Xiaou, LI Jian
..... 130

Differential Analysis of Oral Microbiota in db/db Mouse Model of Type 2 Diabetes
Utilizing 16S rRNA Sequencing
PAN Qianjia, GE Junyi, HU Nan, HUA Fei, GU Min 147

Establishment Methods and Application Progress of Rodent Models for Drug
Addiction
*WANG Biying, LU Jiashuo, ZAN Guiying, CHEN Ruosong, CHAI Jingrui,
LIU Jinggen, WANG Yujun*..... 158

Research Progress in Establishment and Evaluation of Common Asthma Animal
Models
LUO Shixiong, ZHANG Sai, CHEN Hui..... 167

Analysis of Animal Models of Myasthenia Gravis Based on Its Clinical Characteristics
in Chinese and Western Medicine
*CHEN Yuhan, CHEN Jinling, LI Xin, OU Yanhua, WANG Si, CHEN Jingyi,
WANG Xingyi, YUAN Jiali, DUAN Yuanyuan, YANG Zhongshan, NIU Haitao*
..... 176

Laboratory Animals and Occupational Health

Key Points for Establishing Occupational Health and Safety Management System
in Laboratory Animal Institutions
SHAO Qiming, BIAN Yong, SHI Aimin..... 188

Occupational Health Risk Management Measures for Personnel Handling Non-Human
Primate Laboratory Animals: An Overview
LI Qian, CHEN Jiaqi, LI Lihong, ZHANG Feiyan, MAO Huaming, LÜ Longbao
..... 197

Review on Occupational Health Risk Prevention and Control for Laboratory Animal
Practitioners in Chinese General Universities
ZHANG Qian, DENG Qingxiu, CAI Lin 206

Establishment of Occupational Health Related Files in Laboratory Animal Institutions
XU Chao, SUN Qiufang, SHAO Qiming 214

Implementation of "Three Simultaneities" for Occupational Health Protection Facilities in Laboratory Animal Institution Construction Project
CAI Mengshi, SU Xing, SHAO Qiming..... 221

Development and Utilization of Laboratory Animal Resources

Study on Susceptibility and Infection Characteristics of Dengue Virus in Cells Sourced from Different Tissues of Tree Shrews
LIU Xin, QI Mengdi, WANG Wenguang, HAN Yuanyuan, LU Meili, LI Na, DAI Jiejie, LU Caixia..... 229

Laboratory Animal Welfare and Ethics

Special Welfare and Ethical Requirements for Infectious Animal Experiments
MIN Fangui, FU Hongkun, LIU Yonggang, LIU Xiangmei, LIU Zhonghua, LI Yao, TAO Yufeng..... 239

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(COAJ)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)



吴 铃, 博士, 上海交通大学医学院附属第九人民医院辅助生殖科胚胎实验室副主任技师, 硕士生导师。长期从事生殖内分泌的基础和临床研究, 发现高糖皮质激素通过改变精子中靶基因启动子区域的甲基化水平导致子代糖代谢异常的具体机制; 同时聚焦于多囊卵巢综合征发病机制以及治疗策略的研究, 发现肝脏分泌蛋白对卵巢的调控作用。相关研究入选2021年度中国代谢性疾病重要研究进展。主持国家自然科学基金3项, 局级课题1项; 以第一作者或通信作者(含共同)在 *Cell Metab*、*J Exp Med*、*Am J Obstet Gynecol*、*Cell Rep* 以及 *J Clin Endocrinol Metab* 等杂志发表论文近30篇。荣获上海交通大学医学院九龙青年优秀人才提名奖等奖励。

来曲唑缓释片皮下给药构建小鼠多囊卵巢综合征模型及其肝脏转录组学分析

许秋雨¹, 严国锋², 付 丽², 范文华², 周 晶², 朱 莲², 仇淑雯¹, 张 洁¹, 吴 铃¹

(1. 上海交通大学医学院附属第九人民医院辅助生殖科, 上海 200011; 2. 上海交通大学医学院实验动物科学部, 上海 200025)

[摘要] **目的** 通过对青春期前小鼠进行来曲唑缓释片皮下给药和高脂饮食处理, 构建小鼠多囊卵巢综合征 (polycystic ovary syndrome, PCOS) 模型, 比较模型小鼠与安慰剂对照小鼠的肝脏转录组差异, 以探索PCOS发病过程中肝脏的作用机制。**方法** 定制剂量为2 mg的来曲唑缓释片, 缓释周期为40 d。分别将对照安慰剂缓释片和来曲唑缓释片包埋在3~4周龄的C57BL/6J小鼠颈后皮下, 每组8只, 构建对照组及来曲唑诱导的PCOS模型, 并在包埋次日给予小鼠高脂饮食处理。造模周期5周, 每周监测每组小鼠的体重和24 h进食量。收样时记录小鼠肝脏重量, 通过HE染色观察小鼠卵巢和肝脏组织病理变化, 通过油红O染色观察肝脏脂质沉积水平, 通过F4/80免疫组织化学染色观察肝脏巨噬细胞浸润程度, 通过Masson染色观察肝脏纤维化水平; 通过转录组学测序技术分析对照组和模型组小鼠肝脏组织中基因表达的差异, 并对显著差异表达的基因进行富集分析; 通过实时荧光定量PCR验证两组小鼠肝脏组织中显著差异表达的基因。**结果** 与对照组相比, 来曲唑缓释片皮下给药和高脂饮食处理后的模型组小鼠体重显著增加 ($P<0.001$), 卵巢的多囊样表型显著, 肝重比显著下降 ($P<0.05$), 但小鼠的肝脏重量、肝组织形态和脂质沉积没有显著影响 ($P>0.05$)。转录组学测序发现, 来曲唑处理后小鼠肝脏中有119个上调、217个下调的差异表达基因, 广泛参与胆固醇和类固醇合成、类固醇激素合成及炎症反应相关通路。荧光定量PCR结果显示, 与对照组相比, 模型组小鼠肝脏的 *HSD3B2* 和 *HMGCR* 基因的mRNA表达上调 ($P<0.01$), *IL4*、*CCL2* 和 *COL1A1* 基因的mRNA表达下调 ($P<0.05$)。但Masson染色与F4/80免疫组织化学染色未见肝脏纤维化水平与巨噬细胞浸润程度的显著改变。**结论** 来曲唑缓释片皮下给药和高脂饮食处理可以成功构建小鼠PCOS模型。模型小鼠肝脏中基因表达变化显著, 可能通过调控胆固醇和类固醇代谢, 参与PCOS的发病机制。

[关键词] 来曲唑; 多囊卵巢综合征; 肝脏; 转录组测序; 小鼠

[中图分类号] Q95-33; R-332 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2025)02-0119-11



A Mouse Model of Polycystic Ovary Syndrome Established Through Subcutaneous Administration of Letrozole Sustained-Release Pellets and Hepatic Transcriptome Analysis

XU Qiuyu¹, YAN Guofeng², FU Li², FAN Wenhua², ZHOU Jing², ZHU Lian², QIU Shuwen¹, ZHANG Jie¹, WU Ling¹

(1. Department of Assisted Reproduction, Shanghai Ninth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目“父代抗生素过度使用增加子代肥胖风险的作用和机制研究”(82171685)

[第一作者] 许秋雨(2000—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 生殖内分泌。E-mail: xqy1047817@163.com

[通信作者] 吴 铃(1985—), 女, 博士, 副主任技师, 研究方向: 生殖内分泌的基础和临床研究。E-mail: wuling9hospital@126.com。ORCID: 0000-0001-9217-9412

School of Medicine, Shanghai 200011, China; 2. Department of Laboratory Animal Science, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200025, China)

Correspondence to: WU Ling (ORCID: 0000-0001-9217-9412), E-mail: wuling9hospital@126.com

[ABSTRACT] Objective Prepubertal mice are administered subcutaneously with letrozole sustained-release pellets behind the neck and treated with a high-fat diet to establish a mouse model of polycystic ovary syndrome (PCOS). The liver transcriptomes of the model mice are compared with those of the placebo control mice to investigate the underlying mechanisms of liver involvement in the pathogenesis of PCOS. **Methods** A customized 2 mg dose of letrozole sustained-release pellets with a 40-day release period was used. The control placebo and letrozole pellets were implanted subcutaneously in the dorsal cervical region of 3-4-week-old C57BL/6J mice (8 mice per group) to establish the control group and letrozole-induced PCOS model group. Both groups were treated with a high-fat diet starting the day after administration. The modeling period lasted for 5 weeks, during which body weight and 24-hour food intake were monitored in each group every week. When samples were collected, liver weight was recorded. Pathological changes in ovarian and hepatic tissues were examined by hematoxylin-eosin (HE) staining, while hepatic lipid deposition was observed by Oil Red O staining. The extent of macrophage infiltration in the liver was evaluated via F4/80 immunohistochemical staining, and hepatic fibrosis levels were observed by Masson's trichrome staining. Transcriptomic sequencing was performed to analyze differentially expressed genes (DEGs) in liver tissues between the control and model groups, followed by enrichment analysis of significant DEGs. Quantitative real-time fluorescent quantitative PCR (qPCR) was subsequently used to validate the expression of significant DEGs in liver tissues of both groups. **Results** Compared with the control group, the model group which received subcutaneous letrozole sustained-release pellets combined with a high-fat diet exhibited significantly increased body weight ($P < 0.001$), prominent polycystic ovarian morphology, and significantly decreased liver-to-body weight ratio ($P < 0.05$). However, no significant changes were observed in absolute liver weight ($P > 0.05$), hepatic histomorphology, or lipid deposition. Transcriptome sequencing identified 119 upregulated and 217 downregulated DEGs in the liver tissues of letrozole-treated mice, which were predominantly enriched in pathways related to cholesterol and steroid biosynthesis, steroid hormone metabolism, and inflammatory responses. qPCR validation demonstrated that mRNA expression of *HSD3B2* and *HMGCR* was significantly upregulated in liver ($P < 0.01$), while mRNA expression of *IL4*, *CCL2* and *COL1A1* was downregulated ($P < 0.05$) in the model group compared with the control group. However, Masson's trichrome staining and F4/80 immunohistochemical analysis showed no significant changes in hepatic fibrosis or macrophage infiltration. **Conclusion** Subcutaneous administration of letrozole sustained-release pellets combined with a high-fat diet successfully establishes a mouse model of PCOS. The model mice exhibited significant changes in hepatic gene expression. Liver may contribute to PCOS pathogenesis through regulating cholesterol and steroid metabolism.

[Key words] Letrozole; Polycystic ovary syndrome; Liver; Transcriptome sequencing; Mice

多囊卵巢综合征 (polycystic ovary syndrome, PCOS) 以高雄激素血症、卵巢多囊样改变、排卵异常、高抗米勒管激素 (anti-Müllerian hormone, AMH) 水平为主要诊断标准, 同时伴有肥胖、胰岛素抵抗等代谢功能障碍; 其作为一种生殖内分泌疾病, 是导致无排卵性不孕最常见的原因^[1], 影响全球范围内大约 10%~13% 的女性^[2]。PCOS 是一种慢性疾病, 目前尚无法治愈, 一经诊断, 常伴随终身。临床上通常会根据患者的临床表现及需求, 在管理生活方式的基础上

给予相应的对症治疗, 从而改善 PCOS 患者出现的代谢、内分泌及不孕症状; 然而 PCOS 的不良影响并不止这些, 目前针对患者全身代谢和内分泌功能异常的治疗仍面临许多挑战^[3]。

PCOS 动物模型的建立方法多样, 包括外源高雄激素造模、芳香化酶抑制剂造模、产前雄激素或 AMH 造模、胰岛素造模、肠道菌群造模等, 但至今还没有一种模型能够完全复制模拟 PCOS 患者的临床特点。本研究组选择芳香化酶抑制剂造模方法, 使用芳香化酶抑

制剂来曲唑阻断雄激素向雌激素转化的过程。研究表明,在青春期前开始持续接受来曲唑治疗的小鼠可以呈现出许多PCOS的生殖和代谢特点,包括肥胖、雄激素和黄体生成素升高、卵巢多囊样表现和动情周期紊乱^[4];而来曲唑结合高脂饮食,会在此基础上诱导出更明显的代谢异常,包括肥胖、胰岛素抵抗和血脂异常等^[5]。另外,相较于其他方式,通过缓释片给药的造模方法简便,仅需要一次皮下包埋,且缓释稳定。因此,在青春期前接受来曲唑缓释片皮下包埋结合高脂饮食处理,可以模拟多数PCOS患者的内分泌和代谢表型。

肝脏是机体的重要代谢器官,与PCOS之间存在许多潜在的关联。以代谢功能障碍相关脂肪性肝病为例,多项研究已证实其与PCOS有很高的共患率和相关性,互为发病的风险因素^[6-7]。肝脏分泌的多种因子在PCOS患者血液中水平异常,如性激素结合蛋白(sex hormone-binding globulin, SHBG)、FutuinA和成纤维细胞生长因子21(fibroblast growth factor-21, FGF21)等^[8-10]。但PCOS模型中肝脏组织和功能的变化仍不清楚。本研究拟通过来曲唑缓释片皮下包埋和高脂饮食相结合的方法构建PCOS小鼠模型,然后对模型小鼠的肝脏进行转录组测序及差异基因分析,并进一步作功能富集分析,为探讨PCOS发病过程中肝脏的作用机制和有效筛选PCOS作用靶点提供模型和数据参考。

1 材料与方法

1.1 实验动物

16只SPF级雌性C57BL/6J小鼠,3周龄,体重为(11.9±1.1)g,购自上海灵畅生物科技有限公司[SCXK(沪)2023-0003],质量合格证号为20180003027971。所有实验小鼠均饲养于上海交通大学医学院实验动物科学部[SYXK(沪)2023-0041]的屏障环境实验动物设施中,每笼饲养4只小鼠,提供充足的无菌水和饲料,保持环境内温度20~22℃,相对湿度50%~60%,光照明暗12h交替。本实验经上海交通大学医学院实验动物饲养管理与使用委员会批准(批号JUMC-2023-066-B),实验过程中严格遵守我国动物实验伦理和使用相关准则。

1.2 主要试剂与仪器

来曲唑缓释片(批号SX-999-2mg)及对照安慰剂缓释片(批号SC-111-2mg)通过美国IRA公司定制,均为直径约3mm的片剂,缓释周期为40d,缓释剂量

为50μg/d。高脂饲料D12492(批号22090102)购自美国Research Diets公司。舒泰(批号98CKA)购自法国Virbac公司。右美托咪定(批号190625BP)购自江苏恒瑞医药股份有限公司。异氟烷(批号20211201)购自江苏恒丰强生物技术有限公司。通用型组织固定液(批号G1101)、F4/80免疫组织化学染色所用一抗(批号GB113373)和辣根过氧化物酶标记山羊抗兔二抗(批号GB23303)购自武汉赛维尔生物科技有限公司。TRIzol试剂(批号15596)购自美国Thermo Fisher Scientific公司。RNA反转录试剂盒(批号RR036A)与定量PCR试剂盒TB Green Premix Ex Taq(批号RR420A)购自日本TaKaRa公司。小鼠体重测量用电子天平(型号Secura612-1CN)和肝脏重量称量用电子天平(型号BSA224S-CW)均购自德国Sartorius公司。Matrix VWR小动物麻醉机购自美国MIDMARK公司。

1.3 PCOS模型小鼠构建

参考相关文献^[11-12]所描述的方法,将16只3周龄C57BL/6J雌鼠随机分为两组:安慰剂对照组8只,来曲唑造模组8只。用试剂盒中的灭菌稀释液溶解舒泰粉末,取1mL舒泰溶液(50mg),加入等体积的右美托咪定溶液(0.1mg),使用生理盐水稀释。所有小鼠在屏障环境内适应3d后,按50mg/kg舒泰联合0.1mg/kg右美托咪定的剂量腹腔注射进行麻醉。使用剃毛机脱去小鼠后颈部毛发,用镊子提起皮肤,用眼科剪在颈后剪开约2~3mm长的竖直小口,使用镊子钝性分离皮肤,将缓释片塞进皮下,缓释片会自动贴合小鼠皮肤组织,随后用镊子夹紧并缝合手术创口。术后,将小鼠放置在新的饲养笼里,每笼4只,并用高压灭菌后的纸巾覆盖保暖。术后8~24h观察小鼠麻醉苏醒情况,并在24h内更换两组小鼠饲料为新鲜高脂饲料,持续饲喂5周。

1.4 小鼠日增重与卵巢、肝脏的组织学检测

缓释片包埋后的第7、14、21和28天,测量所有动物体重,计算体重变化率[(被测当天体重-初始体重)/初始体重×100%]。从造模当天起,每周最后一天检测小鼠24h进食量:于当天上午9点,给小鼠换用新鲜颗粒状的高脂饲料,称取饲料重量并记录;次日上午9点,再次称取每笼的高脂饲料重量并记录,计算得到24h全笼摄食量(即饲料重量差值)及每笼中每只小鼠的平均日摄食量(饲料重量差值/每笼小鼠数目)。每周监测1d,连续监测5周。

第36天称量小鼠体重后,使用小动物麻醉机和异氟烷麻醉小鼠。通过颈椎脱臼法安乐死小鼠后迅速剪开胸腔,收集所有小鼠的卵巢和肝脏,称量肝脏重量。将每只小鼠的肝脏左叶组织,用剪刀纵剖为左右两部分。将右侧卵巢和一半肝脏左叶迅速投入通用型组织固定液中,用于制备石蜡切片,通过HE染色观察组织病理学变化,通过Masson染色观察纤维化情况。另一半肝左叶迅速投入通用型组织固定液,用于制备冰冻切片,进行油红O染色,观察脂质沉积情况。肝脏剩余部分先在液氮中速冻,之后冻存于-80℃冰箱。

1.5 肝脏 F4/80 免疫组织化学染色

利用巨噬细胞表面标志物 F4/80 (即小鼠表皮生长因子样含模块黏蛋白样激素受体) 进行肝脏免疫组织化学检测。将组织切片脱蜡脱水,并依次进行抗原修复、内源性过氧化氢酶阻断、山羊血清封闭;滴加 F4/80 抗体工作液,4℃过夜孵育;清洗后室温孵育二抗,然后滴加 DAB 显色液并在光学显微镜下观察;特异性棕色出现后,洗去 DAB 染色液,使用苏木精对比染色细胞核;分化、脱水、透明、封片固定后,在显微镜下观察。

1.6 肝脏转录组学分析

随机选取 6 个肝脏组织样本 (安慰剂对照组和来曲唑造模组各 3 个),使用 TRIzol 提取样本总 RNA。对 RNA 进行富集、片段化、逆转录、二链合成,末端修复并加接头后对 cDNA 进行 PCR 扩增、纯化,获得测序文库后上机进行双端测序。筛选差异表达基因的主要指标为差异倍数 (fold change, FC) 和 P 值,以 $\log_2FC \geq 1$ 且 $P < 0.05$ 作为标准。对得到的差异基因进行 GO 功能注释、KEGG 通路和 GSEA 富集分析。

1.7 实时荧光定量 PCR 验证肝组织中差异表达基因

选择 2 个上调基因和 3 个下调基因,运用定量 PCR 法对其转录水平进行验证。使用 TRIzol 试剂提取肝脏组织总 RNA,利用反转录试剂盒反转录得到 cDNA,质量浓度为 5 ng/μL。每个反应体系 10 μL,包括 5 μL 的 2×TB Green、正向和反向引物各 0.5 μL 以及 4 μL 的 cDNA。定量 PCR 反应条件:95℃预变性反应 30 s,95℃变性反应 5 s,60℃退火反应 30 s,设置 40 次循环。以 36B4 基因为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算目标基因 3β-羟类固醇脱氢酶 2 (3 beta- and steroid delta-isomerase 2, *HSD3B2*)、3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶 (3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase, *HMGCR*)、白细胞介素-4 (interleukin-4,

IL4)、C-C 基序趋化因子配体 2 (C-C motif chemokine ligand 2, *CCL2*) 和 I 型胶原 α 链 (collagen, type I, alpha 1, *COL1A1*) 的 mRNA 相对表达水平,基因引物序列见表 1。

表 1 引物序列
Table 1 Sequences of primers

引物名称 Primer name	引物序列 Sequence (5'→3')
36B4-F	AGATTCGGGATATGCTGTTGGC
36B4-R	TCGGGTCTAGACCAGTGTTC
<i>HSD3B2</i> -F	GGTTTTGGGGCAGAGGATCA
<i>HSD3B2</i> -R	GGTACTGGGTGTCAAGAATGTCT
<i>HMGCR</i> -F	CAACATTGTCACCGCCATC
<i>HMGCR</i> -R	CCACCCACCGTTCCTATCTC
<i>IL4</i> -F	GGTCTCAACCCCCAGCTAGT
<i>IL4</i> -R	GCCGATGATCTCTCTCAAGTGAT
<i>CCL2</i> -F	TTAAAAACCTGGATCGGAACCAA
<i>CCL2</i> -R	GCATTAGCTTCAGATTACGGGT
<i>COL1A1</i> -F	GCTCCTCTTAGGGGCCACT
<i>COL1A1</i> -R	CCACGTCTCACCATTGGGG

注: 36B4, 核糖体蛋白侧柄亚基 P0, 作为内参; *HSD3B2*, 3β-羟类固醇脱氢酶 2; *HMGCR*, 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶; *IL4*, 白细胞介素-4; *CCL2*, C-C 基序趋化因子配体 2; *COL1A1*, I 型胶原 α 链。F, 正向; R, 反向。
Note: 36B4, ribosomal protein lateral stalk subunit P0; *HSD3B2*, 3 beta- and steroid delta-isomerase 2; *HMGCR*, 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-coenzyme A reductase; *IL4*, interleukin-4; *CCL2*, C-C motif chemokine ligand 2; *COLA1*, collagen, type I, alpha 1. F, forward; R, reverse.

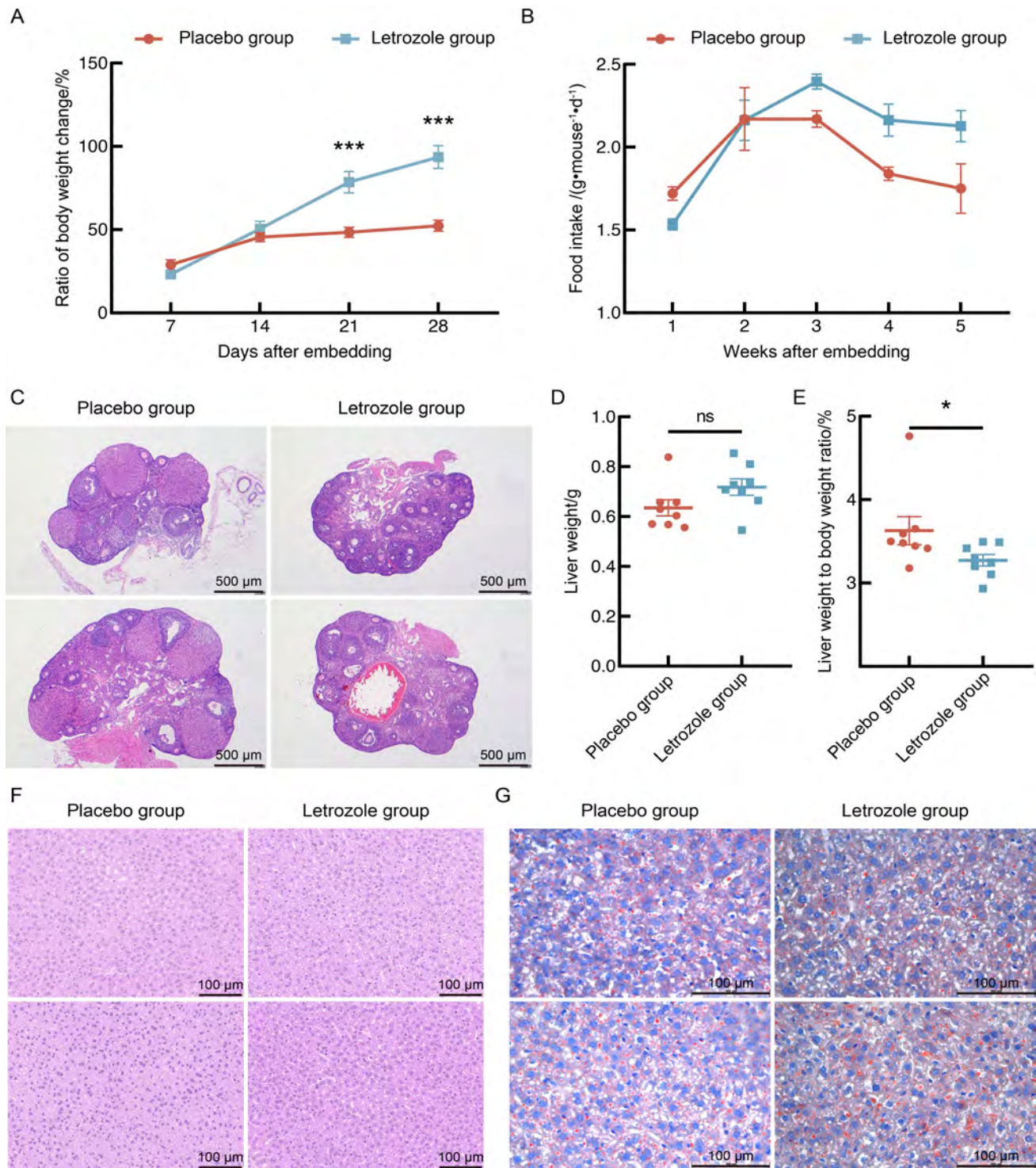
1.8 统计学方法

应用 GraphPad Prism 9.0 软件进行统计分析与绘图,实验结果采用均数±标准误表示,采用独立样本 t 检验确定差异显著性, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 来曲唑和高脂饮食造模后的小鼠体重和肝脏状况

在造模期间监测小鼠体重和进食量,发现与同样高脂饮食的安慰剂对照组和造模组初始体重相比,来曲唑缓释片包埋并高脂饮食 2 周起,模型组小鼠的体重增加更为显著 ($P < 0.001$, 图 1A),但摄食量没有显著差异 ($P > 0.05$, 图 1B)。卵巢石蜡切片的 HE 染色结果显示,在对照组中,卵巢组织可见黄体且卵泡形态正常,表明存在正常排卵现象;而模型组小鼠的卵巢发育期卵泡明显增多,且缺乏黄体,局部甚至出现了



注: A, 与初始体重相比, 小鼠前4周每周体重变化率; B, 小鼠造模期间每周24 h摄食量; C, 小鼠卵巢HE染色 (×50); D, 小鼠肝脏重量; E, 小鼠肝重比; F, 小鼠肝脏HE染色 (×400); G, 小鼠肝脏油红O染色 (×400)。每组8只小鼠; 与安慰剂组相比, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, ^{ns} $P > 0.05$ 。C、F和G图中, 上图与下图分别代表两个独立的生物学重复实验。

Note: A, Weekly rate of body weight change of mice during the first 4 weeks compared to their initial body weight; B, Weekly food intake of mice in 24 hours during the modeling period; C, Ovary HE staining of mice (×50); D, Liver weight of mice; E, Liver-to-body weight ratio of mice; F, Liver HE staining of mice (×400); G, Liver Oil Red O staining of mice (×400). Each group consisted of 8 mice. Compared with placebo group, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, ^{ns} $P > 0.05$. In fig. C, F and G, the upper and lower panels show two independent biological replicates.

图1 来曲唑和高脂饮食造模对小鼠体重、摄食量和肝脏的影响

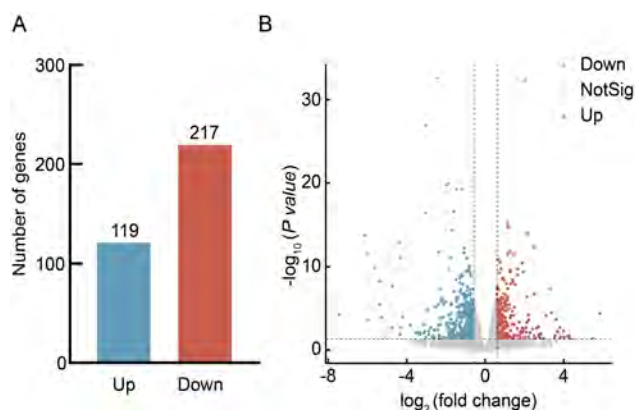
Figure 1 Effects of letrozole and high-fat diet modeling on body weight, food intake and liver in mice

出血性囊肿,提示排卵功能障碍(图1C),表明PCOS模型构建成功。

对两组小鼠的肝脏重量进行比较,结果显示,两组间肝脏重量没有显著差异($P>0.05$,图1D),但模型组的肝脏指数即肝重比显著低于对照组($P<0.05$,图1E)。HE染色结果显示,两组间肝细胞均有损伤,但肝组织形态没有显著差异,肝细胞脂质沉积程度未见明显差异(图1F)。油红O染色结果也显示,两组间肝脏脂质沉积程度相似(图1G)。

2.2 来曲唑和高脂饮食诱导的PCOS模型小鼠的肝脏转录组学分析

每组随机选取3个肝脏组织样本的转录组测序结果显示:与安慰剂对照组相比,来曲唑造模组小鼠的肝脏中共有336个差异表达基因($|\log_2\text{FC}| \geq 1$ 且 $P<0.05$),其中119个基因表达水平上调,217个基因表达水平下调(图2A和B)。



注: A, 来曲唑造模组 vs 安慰剂对照组的差异表达基因数量柱状图; B, 来曲唑造模组 vs 安慰剂对照组的差异表达基因火山图。

Note: A, Bar chart of the number of differentially expressed genes between the letrozole model group and the placebo control group; B, Volcano plot of differentially expressed genes between the letrozole model group and the placebo control group.

图2 来曲唑和高脂饮食造模后小鼠肝脏组织中差异基因分析
Figure 2 Analysis of differentially expressed genes in liver of mice after letrozole and high-fat diet modeling

GO功能注释结果显示,上调基因主要富集在胆固醇合成代谢、甾醇合成代谢,以及继发性酒精代谢等生物学过程中(调整后 $P<0.05$,图3A);下调基因则主要富集在炎症、细胞趋化过程中(调整后 $P<0.05$,图3C)。KEGG通路富集结果显示,差异表达基因主要富集在类固醇合成、类固醇激素合成、细胞周期,以及IL-17与细胞因子等炎症反应相关通路(调整后 $P<0.05$,图3B和D)。

GSEA富集分析结果显示,与安慰剂对照组相比,模型组小鼠的肝脏中表达上调基因主要富集在胆汁酸代谢、胆固醇合成、氧化磷酸化、谷胱甘肽代谢以及类固醇激素合成和代谢过程($P<0.01$,图4),表达下调基因主要富集在炎症反应、IL6-JAK-STAT3信号通路、IFN- γ 反应通路等与慢性炎症和免疫相关的通路($P<0.001$,图4)。

2.3 来曲唑和高脂饮食诱导的PCOS模型小鼠的差异基因验证

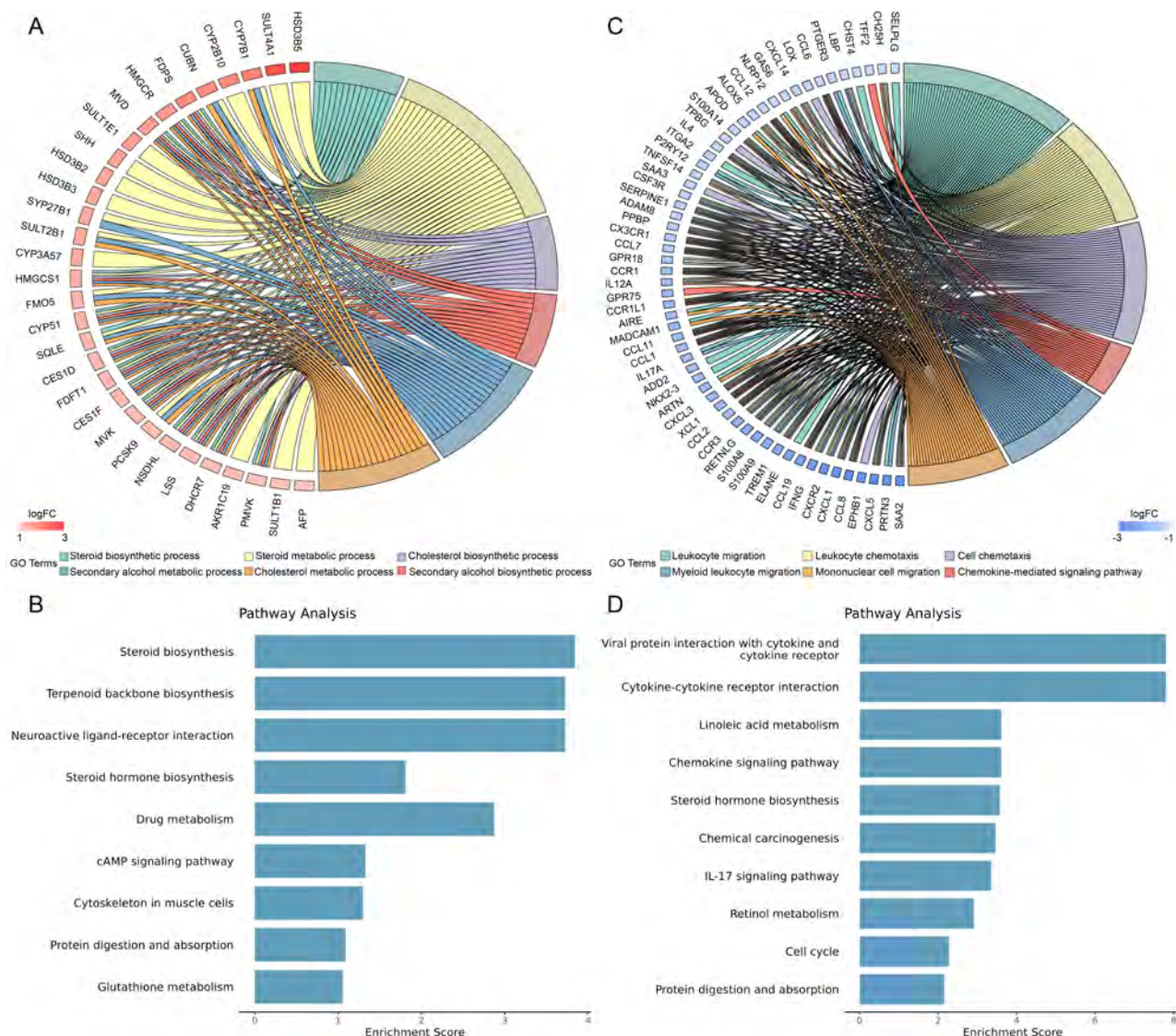
荧光定量PCR结果显示,模型组小鼠肝脏组织中HSD3B2和HMGCR基因的mRNA水平明显上调(均 $P<0.01$,图5A),IL4、CCL2和COL1A1基因的mRNA水平明显下调(均 $P<0.05$,图5B)。这一结果与转录组测序结果一致。基于IL4、CCL2与COL1A1等炎症和纤维化指标的表达式降低,进一步通过组织切片染色验证肝脏炎症和纤维化程度的改变。肝脏Masson染色和F4/80免疫组织化学染色结果显示,与安慰剂对照组相比较,模型组小鼠的肝脏纤维化和巨噬细胞浸润水平没有明显变化(图5C和D)。

3 讨论

PCOS影响育龄期女性的生理和心理健康,其发病机制与代谢和内分泌功能关系密切。肝脏作为人体重要的代谢器官,参与性激素、营养物质以及药物毒物的代谢^[13]。基于肝脏的病理状态与PCOS之间的关联,有研究者新近提出了肝脏-卵巢轴的概念;并有相关研究指出,脂肪肝变性的病理状态与高PCOS发生风险之间存在显著关联^[14]。然而肝脏功能异常在PCOS发病中的作用机制,目前仍不明确。

已有文献报告,长期连续施用来曲唑抑制芳香化酶可以诱导小鼠和大鼠出现PCOS表型^[11,15],且模拟人类高脂饮食也会诱导小鼠出现一定的生殖和代谢异常^[16]。参考既往研究的造模方式^[17-18],本研究通过手术将40 d缓释的来曲唑缓释片植入小鼠背部颈后皮下,并给予高脂饮食处理,模拟人类高脂饮食习惯的条件,更全面地复制人类PCOS患者的生殖和代谢表型,着重研究来曲唑在高脂饮食条件下的作用。实验结果显示,高脂饮食下,相比安慰剂对照组小鼠,来曲唑模型组小鼠的体重增加更显著,卵巢PCOS样表型也显著,表明小鼠PCOS模型诱导成功。

肝脏是机体重要的代谢器官,与PCOS之间存在许多潜在的关联。本研究分析PCOS小鼠模型肝脏的转录



注：A，来曲唑造模组上调表达基因的代表性GO功能注释；B，来曲唑造模组上调表达基因的代表性KEGG富集分析；C，来曲唑造模组下调表达基因的代表性GO功能注释；D，来曲唑造模组下调表达基因的代表性KEGG富集分析。

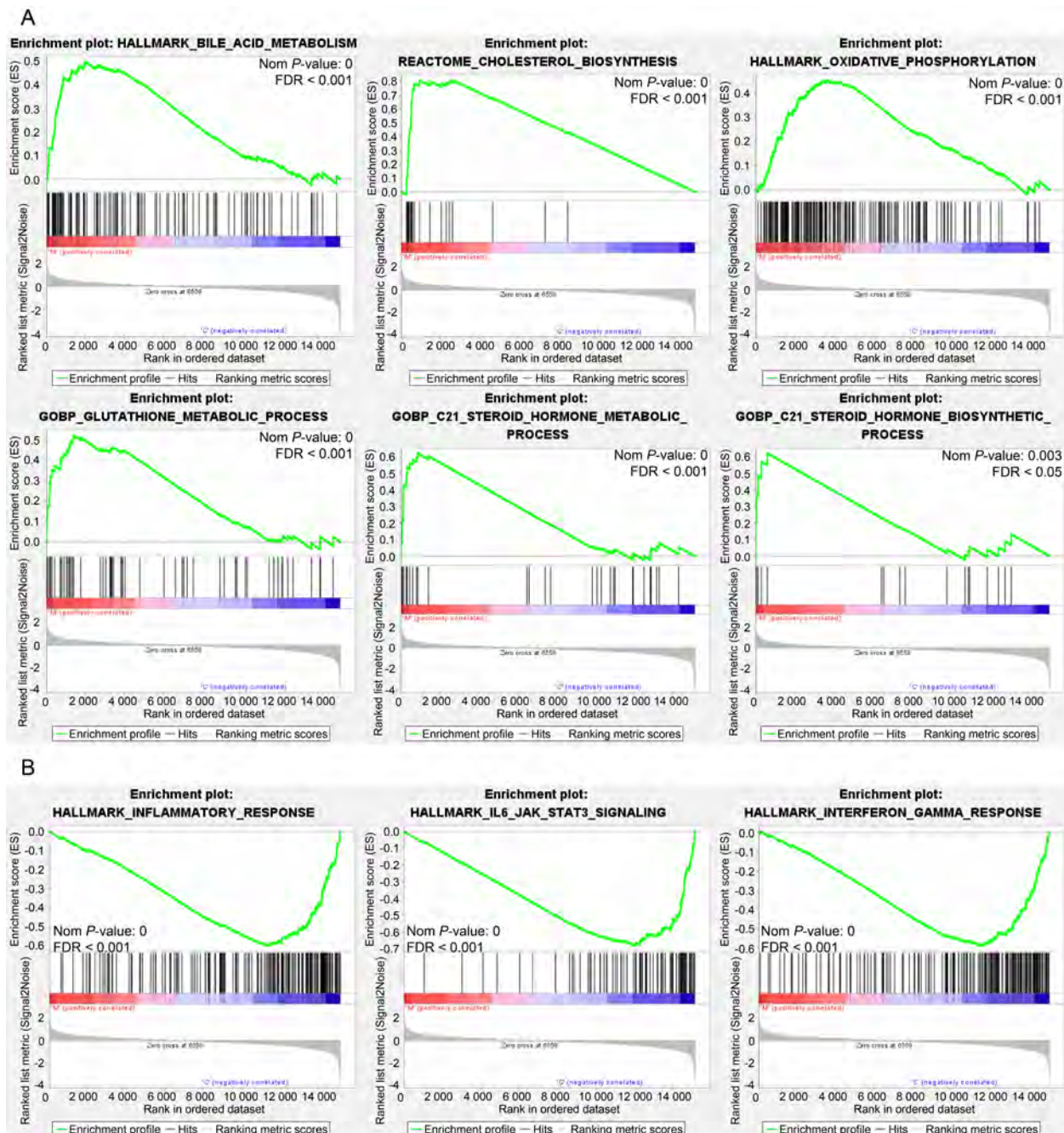
Note: A, Representative GO functional annotations of upregulated differentially expressed genes in the letrozole model group compared to the placebo control group; B, Representative KEGG enrichment analysis of upregulated differentially expressed genes in the letrozole model group compared to the placebo control group; C, Representative GO functional annotations of downregulated differentially expressed genes in the letrozole model group compared to the placebo control group; D, Representative KEGG enrichment analysis of downregulated differentially expressed genes in the letrozole model group compared to the placebo control group.

图3 来曲唑和高脂饮食造模后小鼠差异表达基因的功能注释和富集分析

Figure 3 Functional annotation and enrichment analysis of differentially expressed genes in mice after letrozole and high-fat diet modeling

组测序结果发现，来曲唑造模组小鼠肝脏表达上调的差异表达基因主要富集在类固醇合成、类固醇激素合成、胆固醇合成和代谢通路。PCOS患者常伴有血浆胆固醇水平异常^[19]，而PCOS大鼠模型的卵巢转录组中也发现了胆固醇、类固醇代谢相关基因表达失调^[20]，这些变化可能影响卵巢性激素的合成。胆固醇代谢异常在脂肪肝的发生中也起到重要作用^[21]。本研究发

现，模型组小鼠肝脏中胆固醇合成限速酶HMGCR的表达显著上调，这与既往研究结果一致，即HMGCR上调可促进饮食诱导的肥胖小鼠的脂肪组织炎症、胰岛素抵抗和肝脏脂肪变性^[22]，而这些病理变化在PCOS的发生发展中又发挥重要作用^[23]。同时，本研究还发现，肝脏参与类固醇激素合成的HSD3B2表达也显著增强。因此，肝脏可能通过调控胆固醇和类固



注：A~B，来曲唑造模组 vs 安慰剂对照组 GSEA 富集分析（A，高表达基因集；B，低表达基因集）。FDR，假发现率。

Note: A-B, GSEA enrichment analysis of genes in the letrozole model group compared to the placebo control group (A, upregulated gene sets; B, downregulated gene sets). FDR, False discovery rate.

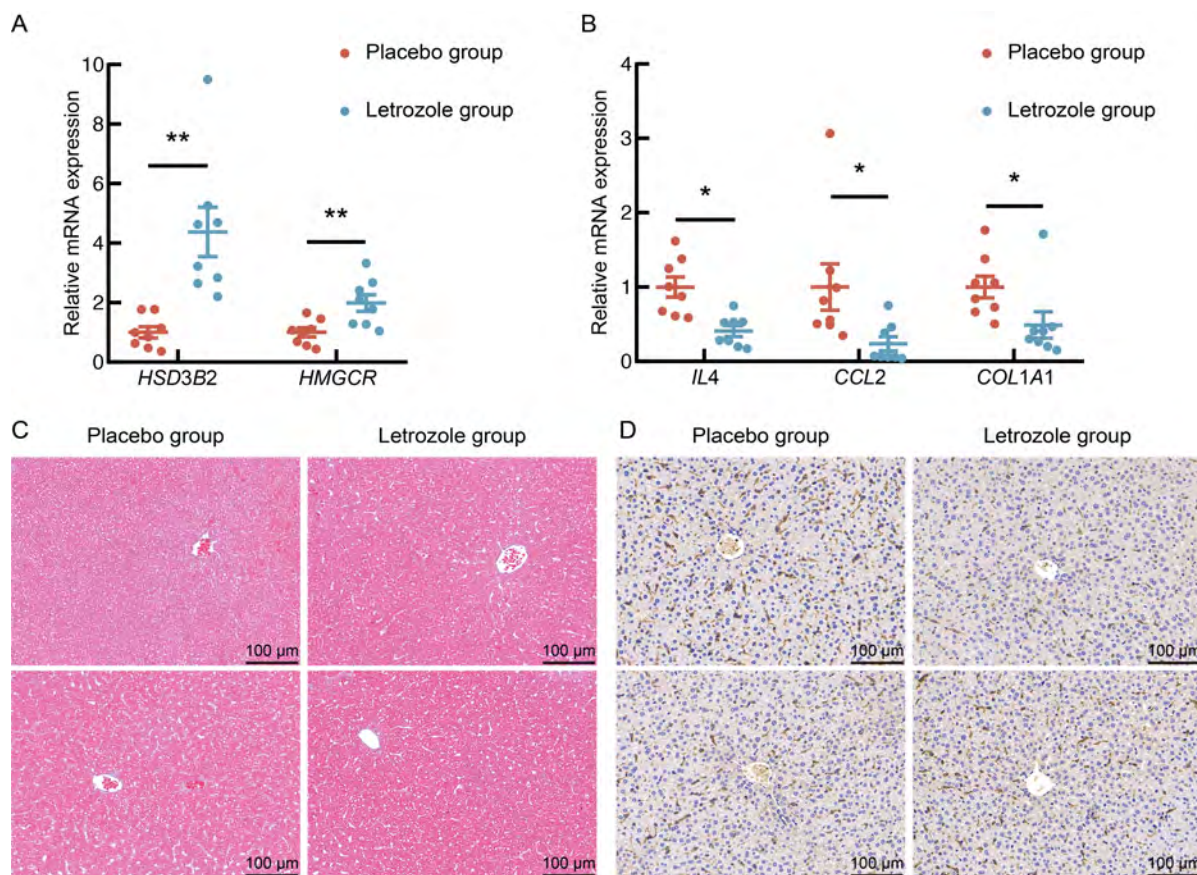
图4 来曲唑和高脂饮食造模后差异表达基因的 GSEA 富集分析

Figure 4 GSEA enrichment analysis of differentially expressed genes after letrozole and high-fat diet modeling

醇代谢，影响脂肪组织功能和糖脂代谢，进而参与 PCOS 的发病机制。

此外，对下调差异基因的分析显示，白细胞迁移、IL-17、IL6-JAK-STAT3 等炎症相关的信号通路被显著富集^[24-25]，荧光定量 PCR 结果也显示来曲唑造模组小鼠肝脏炎症及纤维化相关基因 *IL4*、*CCL2*、*COL1A1* 的

mRNA 表达水平下调。这与既往文献中双氢睾酮诱导的 PCOS 大鼠模型中肝脏 IL6 表达无显著变化、TNF α 和 IL-1 β 表达水平升高，以及 PCOS 患者存在肥胖、脂肪组织炎症、胰岛炎症和全身慢性炎症的表现存在一定差异^[26-29]。同时，本研究发现，在同样的高脂饮食喂养条件下，相较于安慰剂对照组，来曲唑造模组的



注：A，3 β -羟类固醇脱氢酶2 (*HSD3B2*) 和3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶A还原酶 (*HMGCR*) 基因的相对表达量；B，白细胞介素-4 (*IL4*)、C-C基序趋化因子配体2 (*CCL2*)、I型胶原 α 链 (*COL1A1*) 基因相对表达量；C，肝脏Masson染色 (×400)；D，肝脏F4/80免疫组织化学染色 (×400)。每组8只小鼠；与安慰剂对照组相比，* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ 。C和D图中，上图与下图分别代表两个独立的生物学重复。

Note: A, Relative expression levels of 3 beta- and steroid delta-isomerase 2 (*HSD3B2*) and 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase (*HMGCR*); B, Relative expression levels of interleukin-4 (*IL4*), C-C motif chemokine ligand 2 (*CCL2*), and collagen, type I, alpha 1 (*COL1A1*); C, Liver Masson staining (×400); D, Liver F4/80 immunohistochemistry staining (×400). Each group consisted of 8 mice. Compared with placebo group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$. In fig. C-D, the upper and lower panels show two independent biological replicates.

图5 来曲唑和高脂饮食造模后小鼠差异基因的实时定量PCR验证

Figure 5 Real-time quantitative PCR verification of differentially expressed genes in mice after letrozole and high-fat diet modeling

小鼠体重增加更为显著，但肝重比却有所下降，且肝脏中与炎症反应相关的信号通路富集也呈现下调趋势。这些结果提示，来曲唑可能通过某种机制在一定程度上影响了肝脏的炎症反应和纤维化水平。然而，肝脏相关染色结果却未表现出明显的巨噬细胞浸润和纤维化程度变化，这表明来曲唑的作用程度和具体机制仍需进一步研究。

需要说明，本研究未设置普通饮食的来曲唑组和安慰剂组，在一定程度上限制了来曲唑单独作用和高脂饮食单独作用的肝脏影响评估。未来本研究组将在机制研究时完善分组，以更全面地揭示来曲唑和高脂饮食在PCOS发病中的独立和协同作用。另外，本研究

缺少对胰岛素抵抗和血脂相关指标的检测，可能限制了对PCOS模型代谢状态的全面评估。未来将纳入这些指标，以更全面地揭示PCOS的代谢异常及其与肝脏功能的关系。

综上，本研究通过构建来曲唑结合高脂饮食诱导PCOS小鼠模型，成功模拟了PCOS的生殖系统组织学表型，并从组织形态学和转录组学水平对模型组和对照小鼠的肝脏结构和功能进行比较，且分析了肝脏在小鼠PCOS模型发病过程中的作用机制。本研究结果提示，肝脏可能是通过胆固醇和类固醇代谢改变参与PCOS的发生发展，为进一步探索PCOS的发病机制和治疗策略提供了新思路。

[医学伦理声明 Medical Ethics Statement]

本研究涉及的所有动物实验均已通过上海交通大学医学院实验动物饲养管理与使用委员会审批通过(批准编号 JUMC-2023-066-B)。所有实验过程均遵照中国实验动物相关法律法规条例要求进行。

All animal experiments involved in this study have been approved by the Institutional Animal Care & Use Committee of Shanghai Jiao Tong University School of Medicine (Approval No. JUMC-2023-066-B). All experiments were performed in accordance with the requirements of laws and regulations on laboratory animals in China.

[作者贡献 Author Contribution]

许秋雨负责研究方案策划、实验操作、数据整理和分析、论文撰写和修改;

严国锋、付丽、范文华、周晶和朱莲负责提供资源和动物实验操作;

仇淑雯负责实验结果的有效性验证;

张洁负责项目管理、监督指导、论文修订;

吴铃负责研究方案策划、获取资助、项目管理、监督指导、论文修订。

[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] Thessaloniki ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS Consensus Workshop Group. Consensus on infertility treatment related to polycystic ovary syndrome[J]. *Fertil Steril*, 2008, 89(3):505-522. DOI:10.1016/j.fertnstert.2007.09.041.
- [2] TEEDE H J, TAY C T, LAVEN J J E, et al. Recommendations from the 2023 international evidence-based guideline for the assessment and management of polycystic ovary syndrome [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2023, 108(10): 2447-2469. DOI: 10.1210/clinem/dgad463.
- [3] HOEGER K M, DOKRAS A, PILTONEN T. Update on PCOS: consequences, challenges, and guiding treatment[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2021, 106(3): e1071-e1083. DOI: 10.1210/clinem/dgaa839.
- [4] KAUFFMAN A S, THACKRAY V G, RYAN G E, et al. A novel letrozole model recapitulates both the reproductive and metabolic phenotypes of polycystic ovary syndrome in female mice[J]. *Biol Reprod*, 2015, 93(3): 69. DOI: 10.1095/biolreprod.115.131631.
- [5] BEGUM N, MANIPRIYA K, VEERESH B. Role of high-fat diet on letrozole-induced polycystic ovarian syndrome in rats[J]. *Eur J Pharmacol*, 2022, 917:174746. DOI:10.1016/j.ejphar. 2022. 174746.
- [6] VASSILATOU E, VASSILIADI D A, SALAMBASIS K, et al. Increased prevalence of polycystic ovary syndrome in premenopausal women with nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Eur J Endocrinol*, 2015, 173(6):739-747. DOI:10.1530/EJE-15-0567.
- [7] PASCHOU S A, POLYZOS S A, ANAGNOSTIS P, et al. Nonalcoholic fatty liver disease in women with polycystic ovary syndrome[J]. *Endocrine*, 2020, 67(1): 1-8. DOI: 10.1007/s12020-019-02085-7.
- [8] GIANNOULI A, STEFANAKI C, KOUSKOUTIS C, et al. Hepatokine profile in adolescents with polycystic ovary syndrome: a case-control study[J]. *J Clin Med*, 2023, 12(17): 5744. DOI:10.3390/jcm12175744.
- [9] LIU S, HU W J, HE Y R, et al. Serum Fetuin-a levels are increased and associated with insulin resistance in women with polycystic ovary syndrome[J]. *BMC Endocr Disord*, 2020, 20(1):67. DOI:10.1186/s12902-020-0538-1.
- [10] BEDNARSKA S, FRYCZAK J, SIEJKA A. Serum β -Klotho concentrations are increased in women with polycystic ovary syndrome[J]. *Cytokine*, 2020, 134: 155188. DOI: 10.1016/j.cyto. 2020.155188.
- [11] UL HAQ SHAH M Z, SHRIVASTAVA V K, MIR M A, et al. Role of diacerein on steroidogenesis and folliculogenesis related genes in ovary of letrozole-induced PCOS mice[J]. *Chem Biol Interact*, 2023, 377:110468. DOI:10.1016/j.cbi.2023.110468.
- [12] VIRTANEN N, SAARELA U, KARPALE M, et al. Roxadustat alleviates metabolic traits in letrozole-induced PCOS mice[J]. *Biochem Pharmacol*, 2024, 229: 116522. DOI: 10.1016/j.bcp. 2024.116522.
- [13] TREFTS E, GANNON M, WASSERMAN D H. The liver[J]. *Curr Biol*, 2017, 27(21): R1147-R1151. DOI:10.1016/j.cub.2017.09.019.
- [14] LIU D, GAO X, PAN X F, et al. The hepato-ovarian axis: genetic evidence for a causal association between non-alcoholic fatty liver disease and polycystic ovary syndrome[J]. *BMC Med*, 2023, 21(1):62. DOI:10.1186/s12916-023-02775-0.
- [15] WU Y X, YANG X Y, HAN B S, et al. Naringenin regulates gut microbiota and SIRT1/PGC-1 α signaling pathway in rats with letrozole-induced polycystic ovary syndrome[J]. *Biomed Pharmacother*, 2022, 153: 113286. DOI: 10.1016/j.biopha. 2022. 113286.
- [16] PIECZYŃSKA J M, PRUSZYŃSKA-OSZMAŁEK E, KOŁODZIEJSKI P A, et al. The role of a high-fat, high-fructose diet on letrozole-induced polycystic ovarian syndrome in prepubertal mice[J]. *Nutrients*, 2022, 14(12):2478. DOI:10.3390/nu14122478.
- [17] RYU K J, PARK H, HAN Y I, et al. Effects of time-restricted feeding on letrozole-induced mouse model of polycystic ovary syndrome[J]. *Sci Rep*, 2023, 13(1): 1943. DOI: 10.1038/s41598-023-28260-5.
- [18] LI Z, LIU Y, WANG Y, et al. Sodium oligomannate's amelioration of reproductive and metabolic phenotypes in a letrozole-induced PCOS-like mouse model depends on the gut microbiome[J]. *Biol Reprod*, 2024, 111(2): 361-375. DOI: 10.1093/biolre/ioae058.
- [19] BANASZEWSKA B, DULEBA A J, SPACZYŃSKI R Z, et al. Lipids in polycystic ovary syndrome: role of hyperinsulinemia and effects of metformin[J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2006, 194 (5):1266-1272. DOI:10.1016/j.ajog.2005.11.009.

- [20] SALILEW-WONDIM D, WANG Q, TESFAYE D, et al. Polycystic ovarian syndrome is accompanied by repression of gene signatures associated with biosynthesis and metabolism of steroids, cholesterol and lipids[J]. J Ovarian Res, 2015, 8: 24. DOI:10.1186/s13048-015-0151-5.
- [21] LI H, YU X H, OU X, et al. Hepatic cholesterol transport and its role in non-alcoholic fatty liver disease and atherosclerosis [J]. Prog Lipid Res, 2021, 83: 101109. DOI: 10.1016/j. plipres. 2021.101109.
- [22] TAKEI A, NAGASHIMA S, TAKEI S, et al. Myeloid HMG-CoA reductase determines adipose tissue inflammation, insulin resistance, and hepatic steatosis in diet-induced obese mice [J]. Diabetes, 2020, 69(2):158-164. DOI:10.2337/db19-0076.
- [23] SIDDIQUI S, MATEEN S, AHMAD R, et al. A brief insight into the etiology, genetics, and immunology of polycystic ovarian syndrome (PCOS)[J]. J Assist Reprod Genet, 2022, 39(11):2439-2473. DOI:10.1007/s10815-022-02625-7.
- [24] JOHNSON D E, O'KEEFE R A, GRANDIS J R. Targeting the IL-6/JAK/STAT3 signalling axis in cancer[J]. Nat Rev Clin Oncol, 2018, 15(4):234-248. DOI:10.1038/nrclinonc.2018.8.
- [25] ASHOUR D, REBS S, ARAMPATZI P, et al. An interferon gamma response signature links myocardial aging and immunosenescence[J]. Cardiovasc Res, 2023, 119(14): 2458-2468. DOI:10.1093/cvr/cvad068.
- [26] ESCOBAR-MORREALE H F, LUQUE-RAMÍREZ M, GONZÁLEZ F. Circulating inflammatory markers in polycystic ovary syndrome: a systematic review and metaanalysis[J]. Fertil Steril, 2011, 95(3): 1048-1058. e1-2. DOI: 10.1016/j. fertnstert. 2010.11.036.
- [27] PHELAN N, O'CONNOR A, KYAW TUN T, et al. Leucocytosis in women with polycystic ovary syndrome (PCOS) is incompletely explained by obesity and insulin resistance[J]. Clin Endocrinol, 2013, 78(1): 107-113. DOI: 10.1111/j. 1365-2265. 2012.04454.x.
- [28] EHSES J A, BÖNI-SCHNETZLER M, FAULENBACH M, et al. Macrophages, cytokines and beta-cell death in Type 2 diabetes[J]. Biochem Soc Trans, 2008, 36(Pt 3):340-342. DOI: 10.1042/BST0360340.
- [29] KRISHNAN A, MUTHUSAMI S, PERIYASAMY L, et al. Effect of DHT-induced hyperandrogenism on the pro-inflammatory cytokines in a rat model of polycystic ovary morphology[J]. Medicina, 2020, 56(3):100. DOI:10.3390/medicina56030100.

(收稿日期:2024-12-17 修回日期:2025-02-06)
(本文责任编辑:张俊彦)

[引用本文]

许秋雨, 严国锋, 付丽, 等. 来曲唑缓释片皮下给药构建小鼠多囊卵巢综合征模型及其肝脏转录组学分析[J]. 实验动物与比较医学, 2025, 45 (2): 119-129. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.186.

XU Q Y, YAN G F, FU L, et al. A mouse model of polycystic ovary syndrome established through subcutaneous administration of letrozole sustained-release pellets and hepatic transcriptome analysis[J]. Lab Anim Comp Med, 2025, 45(2): 119-129. DOI: 10.12300/j. issn.1674-5817.2024.186.

《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



李 健, 博士, 教授, 博士生导师。现任北京中医药大学中医学院组织胚胎学教研室主任, 主要从事中西医结合防治炎症相关疾病的机制研究。兼任教育部中西医结合学科创新团队及创新引智基地中方骨干、中国解剖学会中医形态学分会常务委员、中西医结合学会病理生理专业委员会委员、《解剖学报》编委、*Chin J Integr Med* 和 *Frontier* 等多个英文期刊专业审稿人。曾在加拿大 McMaster 大学分子病理学系从事博士后研究工作; 曾获国家留学基金委青年骨干计划资助赴美国 MSM 医学院生理学系研修。先后主持国家自然科学基金面上项目 3 项; 主持校级“解码中医”项目 1 项; 主持校级揭榜挂帅重点项目 1 项; 参与国家及省部级科研课题 10 余项。已发表核心期刊和 SCI 期刊论文 40 余篇。

异常子宫出血大鼠模型的构建与评价

连 辉¹, 姜艳玲¹, 刘 佳¹, 张玉立², 谢 伟², 薛晓鸥², 李 健¹

(1. 北京中医药大学中医学院组织胚胎教研室, 北京 100029; 2. 北京中医药大学东直门医院妇科, 北京 100700)

[摘要] **目的** 通过模拟排卵功能障碍型异常子宫出血 (abnormal uterine bleeding-ovulatory dysfunction, AUB-O) 病因, 建立异常子宫出血大鼠模型, 为异常子宫出血病理机制研究及治疗药物开发提供可靠的模型支持。**方法** 将 24 只成年 (10 周龄) 雌性 SD 大鼠适应性饲养后, 随机分为正常对照组 (6 只) 和模型组 (18 只)。正常对照组大鼠在屏障环境中正常饲养; 模型组大鼠在屏障环境中经背侧入路行双侧卵巢切除术, 休养 1 周后开始造模用药。模型组造模第 1~3 天每日每只大鼠背部皮下注射雌二醇 0.5 mg, 第 4~7 天每日皮下注射孕酮 5.0 mg; 同时于第 6 天经背侧相同手术切口向双侧子宫腔各注射 0.5 mL 大豆油, 于第 8 天行米非司酮 (10 mg/kg) 灌胃, 造模期间持续观察大鼠所处动情周期的阶段及其变化趋势。造模后 48 h 内观察并记录大鼠子宫出血情况, 米非司酮灌胃后 0、12、24、36、48 h 模型组动态收集血清和子宫组织样本, 正常对照组在 36 h 同时取材。取材后分别进行 HE 染色、血清性激素 ELISA 测定、免疫组织化学检测、TUNEL 凋亡染色、蛋白质印迹检测、转录组学测序和生物信息学分析, 对异常子宫出血大鼠模型进行综合评价。**结果** 异常子宫出血大鼠表现为子宫出血, 内膜剥脱损伤、复旧不全, 内膜炎性细胞浸润、凋亡增强, 间质、腺体和血管结构破坏。与正常对照组相比, 异常子宫出血大鼠的血清卵泡刺激素、雌二醇和促黄体生成素水平明显升高 ($P<0.05$); 子宫内血管密度明显降低 ($P<0.05$); 血管内皮生长因子在子宫内膜剥脱处表达定性观察到明显增强, 而在间质血管周围表达显著下降 ($P<0.01$); 基质金属蛋白酶-9 在内膜损伤部位表达定性观察到明显增强, 而在未剥脱间质和腺体处表达显著降低 ($P<0.01$); 子宫内间质细胞凋亡显著增强 ($P<0.01$); 成纤维细胞生长因子 2 和内皮素-1 在子宫组织中的表达水平均明显下降 ($P<0.05$)。比较异常子宫出血大鼠与正常大鼠子宫组织的转录组测序结果, 共筛选到 4 723 个差异表达基因, 其中表达上调基因为 2 191 个, 表达下调基因为 2 532 个; KEGG 富集分析显示, 差异基因显著富集在炎症、免疫凋亡、细胞信号转导、增殖分化和肌肉收缩等相关通路。**结论** 采用雌激素、孕激素和米非司酮序贯给药模拟 AUB-O 病因的方法, 可成功建立异常子宫出血大鼠模型。该模型的子宫内膜损伤与炎症和凋亡相关, 病理表现受血管收缩和内膜再生能力异常影响。该大鼠模型具有与临床非结构性病因异常子宫出血相近的病理特征, 可以作为研究病理机制和治疗方法的有效模型。

[关键词] 异常子宫出血; 动物模型; 大鼠; 蜕膜化; 复旧不全

[中图分类号] Q95-33; R-332 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2025)02-0130-17



Construction and Evaluation of a Rat Model of Abnormal Uterine Bleeding

[基金项目] 北京中医药大学 2022 年校级课题“榆栢止血颗粒对子宫异常出血干预的物质基础及药理机制探讨” (BUCM-2022-JS-FW-016); 北京中医药大学 2023 年度基础科研揭榜挂帅项目“基于胆酸盐代谢模式探究肝主疏泄的科学内涵” (2023-JYB-JBZD-036)

[第一作者] 连 辉 (1996—), 男, 硕士研究生, 研究方向: 中医药防治慢性非可控炎症。E-mail: 20210931078@bucm.edu.cn

[通信作者] 李 健 (1970—), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事中西医结合防治炎症相关疾病的机制研究。E-mail: lijian@bucm.edu.cn。ORCID: 0000-0002-8864-0621

LIAN Hui¹, JIANG Yanling¹, LIU Jia¹, ZHANG Yuli², XIE Wei², XUE Xiaoou², LI Jian¹

(1. Department of Histology and Embryology, School of Traditional Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China; 2. Department of Gynaecology, Dongzhimen Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100700, China)

Correspondence to: LI Jian (ORCID: 0000-0002-8864-0621), E-mail: lijian@bucm.edu.cn

[ABSTRACT] Objective By simulating the etiology of abnormal uterine bleeding-ovulatory dysfunction (AUB-O) and establishing a rat model of abnormal uterine bleeding (AUB), this study aims to provide an experimental platform for investigating pathological mechanisms and developing therapeutic drugs for AUB. **Methods** After acclimation, 24 adult (10-week-old) female SD rats were randomly divided into a normal control group (6 rats) and a model group (18 rats). The normal control group was housed in a barrier environment, while the model group underwent bilateral ovariectomy via dorsal approach in the same environment and rested for one week before starting to receive modeling drugs. In the model group, from Days 1 to 3 of modeling, each rat received a daily subcutaneous injection of 0.5 mg estradiol into the dorsal region. From Days 4 to 7, a daily subcutaneous injection of 5.0 mg progesterone was administered. On Day 6, rats received bilateral injections of 0.5 mL soybean oil per uterine cavity (total 1.0 mL) via the same dorsal surgical incision. On Day 8, mifepristone (10 mg/kg) was administered via oral gavage. The estrous cycle stage and its dynamic changes were continuously monitored during modeling. Uterine bleeding was recorded during the 48-hour observation period post-modeling. Serum and uterine tissue samples were collected from the model group at 0, 12, 24, 36, and 48 h after mifepristone administration, while the normal control group was sampled at 36 h. The samples were subjected to HE staining, serum sex hormone ELISA, immunohistochemistry, TUNEL apoptosis staining, Western blotting, transcriptome sequencing, and bioinformatics analysis for comprehensive evaluation of the AUB rat model. **Results** The AUB rats exhibited uterine bleeding, endometrial detachment and injury, incomplete uterine restoration, inflammatory cell infiltration in the endometrium, enhanced tissue apoptosis, and structural damage of the stroma, glands, and vasculature. Compared with the normal control group, the levels of serum follicle-stimulating hormone (FSH), estradiol, and luteinizing hormone (LH) were significantly increased in the AUB rats ($P < 0.05$). The vascular density of the endometrium was significantly reduced ($P < 0.05$). The expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) was qualitatively observed to be markedly enhanced at the site of endometrial detachment but significantly decreased around the stromal blood vessels ($P < 0.01$). Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) expression was qualitatively observed to be strongly upregulated at the site of endometrial injury but significantly reduced in the non-detached stroma and glands ($P < 0.01$). Endometrial stromal cell apoptosis was significantly enhanced ($P < 0.01$). The expression levels of fibroblast growth factor 2 (FGF2) and endothelin-1 (ET-1) in uterine tissues were significantly decreased ($P < 0.05$). After comparing the transcriptome sequencing results of uterine tissues between AUB and normal rats, a total of 4 723 differentially expressed genes were identified, including 2 191 up-regulated genes and 2 532 down-regulated genes. KEGG enrichment analysis revealed that these differentially expressed genes were significantly enriched in pathways related to inflammation, immune apoptosis, cell signal transduction, proliferation and differentiation, and muscle contraction, among others. **Conclusion** An AUB rat model can be successfully established using a sequential administration protocol of estrogen, progesterone, and mifepristone to simulate the etiology of AUB-O. In this model, endometrial injury is associated with inflammation and apoptosis, with pathological manifestations influenced by abnormal vasoconstriction and impaired endometrial regeneration. This rat model closely recapitulates pathological characteristics of non-structural AUB observed in clinical practice, making it a validated experimental platform for exploring the pathological mechanisms and therapeutic interventions of non-structural AUB.

[Key words] Abnormal uterine bleeding; Animal models; Rats; Decidualization; Incomplete restoration

异常子宫出血 (abnormal uterine bleeding, AUB) 是指与正常月经的周期频率、规律性、经期长度、经期出血量中任何 1 项不符, 源自子宫腔的异常出血, 是妇科临床常见的症状和体征^[1]。正常月经是内膜增殖、蜕膜化、炎症、缺氧、细胞凋亡、止血、血管收缩以及最后的修复和再生之间的良好平衡, 这些过程中任何一个不平衡都可能导致子宫内膜表型异常, 发生 AUB^[2]。根据国际妇产科联盟 (International Federation of Gynecology and Obstetrics, FIGO) 的 PALM-COEIN 病因分类^[3], AUB 以非结构性病因为主^[4]。但非结构性病因 AUB 的病理机制尚未完全阐明, 缺乏合适的动物模型已成为限制非结构性病因 AUB 临床前研究的一个主要问题。

目前用于研究非结构性病因 AUB 的动物模型主要有以子宫出血特征显著而被使用的大鼠不完全流产子宫出血模型^[5]、属于排卵功能障碍型 AUB (AUB-ovulatory dysfunction, AUB-O) 的单一雌激素诱导 AUB 大鼠模型^[6]、属于医源性原因型 AUB (AUB-iatrogenic causes, AUB-I) 的单一孕激素诱导 AUB 动物模型^[7]、同属于 AUB-I 分型的节育器 AUB 动物模型^[8]、属于子宫内膜疾病型 AUB (AUB-endometrial disorders, AUB-E) 的恒河猴炎性 AUB 模型^[9]等, 但现有模型存在成因不归属 AUB 临床病因、子宫无明显出血、实验动物昂贵等多种问题, 造模方案没有得到广泛认可。现有 AUB-O 临床前动物模型的诱导模式单一, 不能充分反映临床病理特点, 另外也缺少子宫内膜局部纤溶亢进等病因所致的 AUB-E 动物模型。因此, 非结构性病因 AUB 动物模型领域还存在许多空白, 需要继续研发。

本研究根据 AUB-O 的发病原因, 参照雌激素、孕激素预备-植物油诱导-孕激素撤退的“月经”造模模式^[10], 以 SD 大鼠为实验材料, 构建具有明显 AUB-O 疾病表型且重复性好的 AUB 大鼠模型, 并将该模型应用于 AUB 病理机制的研究, 以期为非结构性病因 AUB 相关研究提供模型数据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

24 只 SPF 级 10 周龄雌性 SD 大鼠, 体重为 250 ~ 270 g, 由北京维通利华实验动物技术有限公司 [SCXK (京) 2021-0006] 提供, 质量合格证号为 No.110011231109085634。所有大鼠饲养于北京中医药大学实验动物中心屏障设施环境 [SYXK (京) 2023-

0011], 饲养环境温度为 20 ~ 25 °C, 相对湿度为 (55 ± 10) %, 通风良好, 12 h 光照/12 h 黑暗交替循环, 大鼠可自由获取水和食物, 大鼠饲料由实验动物中心购自斯贝福 (北京) 生物技术有限公司, 所有器材、垫料和饲料等均在使用前进行灭菌处理。本研究所有动物实验方案通过北京中医药大学动物实验伦理委员会审查批准 (BUCM-4-2022040606-2007), 严格执行实验动物使用及照护相关的国家法规及标准。

1.2 主要试剂与仪器

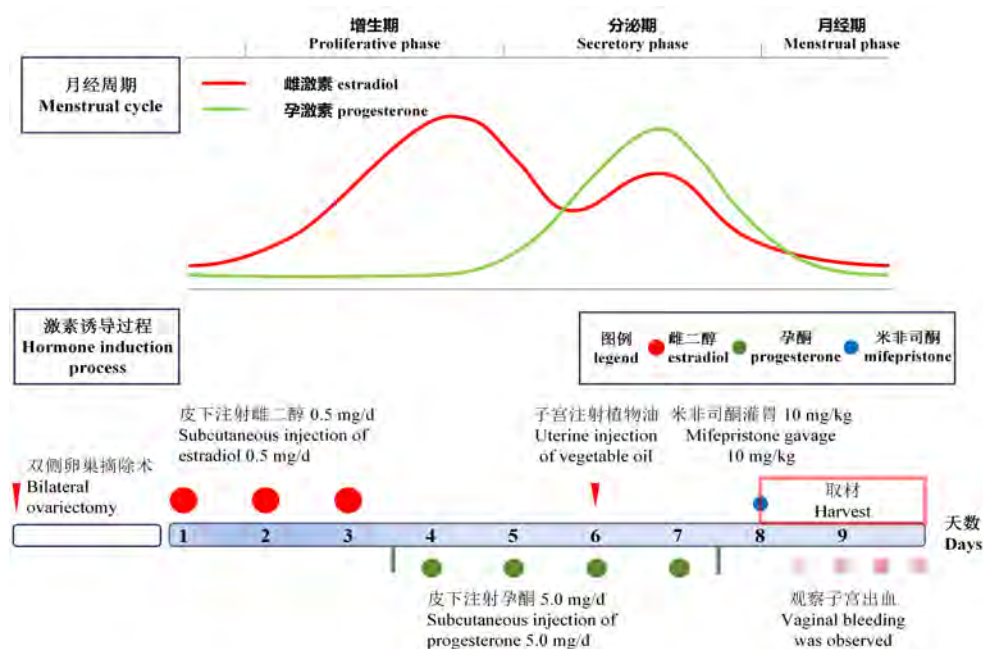
苯甲酸雌二醇注射液 (兽药字 163232511) 购自上海全宇生物科技动物药业有限公司; 黄体酮 (即孕酮) 注射液 (兽药字 120031439) 购自合肥新科信动物药业有限公司; 金龙鱼大豆油 (hp724516084440) 购自益海嘉里金龙鱼食品集团股份有限公司; 米非司酮 (M7250)、苏木精-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色试剂盒 (G1120) 和高效 RIPA 组织/细胞裂解液 (R0010) 均购自北京索莱宝科技有限公司; 低温高速离心机 (Centrifuge 5810R) 为德国 Eppendorf AG 公司产品; 组织包埋机 (HistoCore Arcadia H)、自动切片机 (RM2265) 和超分辨显微组织成像系统 (APERIO VERSA 8) 均为德国 Leica 公司产品; 大鼠卵泡刺激素 (follicle-stimulating hormone, FSH) ELISA 试剂盒 (KT3441-A)、大鼠雌二醇 (estradiol, E₂) ELISA 试剂盒 (KT3450-A)、大鼠促黄体生成素 (luteinizing hormone, LH) ELISA 试剂盒 (KT40332-A) 和大鼠孕酮 (progesterone, PROG) ELISA 试剂盒 (KT3426-A) 均购自江苏科特生物科技有限公司; 兔抗血小板-内皮细胞黏附分子-1 (platelet endothelial cell adhesion molecule-1, CD31) 多克隆抗体 (28083-1-AP)、兔抗血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 多克隆抗体 (YN5444)、兔抗成纤维细胞生长因子 2 (fibroblast growth factor 2, FGF2) 多克隆抗体 (YT5549) 和兔抗内皮素-1 (endothelin-1, ET-1) 多克隆抗体 (YT5147) 均购自美国 ImmunoWay 公司; 小鼠抗基质金属蛋白酶-9 (matrix metallo-proteinase-9, MMP-9) 单克隆抗体 (GB12132) 购自武汉赛维尔生物科技有限公司; 通用二步法检测试剂盒 (小鼠/兔增强聚合物法检测系统, PV-9000) 购自北京中杉金桥生物科技有限公司; TUNEL 细胞凋亡试剂盒 (显色法, B0068) 购自北京兰博利德商贸有限公司; 蛋白酶和磷酸酶抑制剂混合液 (P002)、BCA 蛋白定量试剂盒 (WB6501) 和蛋白上样缓冲液 (还原性, WB2001) 均购自苏州新赛美生物科技有限公司;

高通量研磨仪 (LJ-TISS-24) 购自山东蓝景电子科技有限公司; Omni-Easy™ 一步法 PAGE 凝胶快速制备试剂盒 (PG212) 购自上海雅酶生物医药科技有限公司; 10×SDS-PAGE 快速电泳液 (B2005)、10×快速转膜液 (B2006)、封闭专用脱脂奶粉 (进口分装, P1622-500) 和 Super ECL Plus 强效超敏发光液 (P1050-500) 均购自北京普利莱基因技术有限公司; 化学发光成像仪 (ChemiScope 6100) 购自上海勤翔科学仪器有限公司。戊巴比妥钠及手术用耗材均由东直门医院妇科手术室惠赠。

1.3 分组和模型建立

将 24 只雌性 SD 大鼠适应性饲养后随机分为正常对照组 (Control) 6 只和模型组 (Model) 18 只, 3 只/笼, 依次编号。正常对照组大鼠在屏障环境中正常饲养, 模型组大鼠在屏障环境中经背侧入路行双侧卵巢

切除术。术前禁食不禁水, 用 1% 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉 (35 mg/kg) 后, 消毒, 俯卧位固定; 术中注意减小手术切口, 以缩短手术时间; 术后大鼠侧卧, 保持气道通畅, 注意保暖, 预防感染。休养 1 周后开始造模用药。第 1、2、3 天每日每只大鼠背部皮下注射雌二醇 0.5 mg, 第 4、5、6、7 天每日皮下注射孕酮 5.0 mg, 即皮下序贯注射雌激素和孕激素以诱导子宫内膜增生; 同时于第 6 天经背侧相同切口行二次手术, 向双侧子宫腔各注射 0.5 mL 大豆油, 以诱导子宫内膜蜕膜化; 然后于第 8 天灌胃米非司酮 (10 mg/kg), 以模拟孕激素撤退。将灌胃米非司酮结束时刻记为孕激素撤退 0 h, 这时向大鼠阴道内置入从医用棉签上取下的干燥医用脱脂棉球 (约 80 mg), 深入阴道约 1.5 cm, 每 12 h 更换棉球并记录收集到的子宫出血情况 (图 1)。



注: 图中曲线为正常人体月经周期中雌激素和孕激素水平的变化。图中流程为制备异常子宫出血大鼠模型的方案。

Note: Curves in the figure represent the changes in estrogen and progesterone levels during the normal human menstrual cycle. The process in the figure illustrates the protocol for preparing a rat model of abnormal uterine bleeding.

图 1 月经周期内雌孕激素水平变化示意图和异常子宫出血大鼠模型制备流程图

Figure 1 Schematic diagram of estrogen and progesterone level fluctuations during the menstrual cycle and flowchart of the preparation process for a rat model of abnormal uterine bleeding

1.4 阴道脱落细胞涂片

随机选取 2 笼模型组大鼠和 2 笼正常对照组大鼠, 从开始造模用药到孕激素撤退, 每日进行阴道脱落细胞形态学观察。取医用棉签蘸取少量生理盐水, 深入大鼠阴道大约 1 cm, 顺时针轻柔转 2 圈后取出, 在载

玻片上顺时针滚动均匀铺开脱落细胞, 用无水乙醇溶液固定后, 浸入亚甲蓝溶液中染色 15 min, 去离子水漂洗 2 次, 在光学显微镜下观察并记录细胞形态。

1.5 标本采集与处理

模型组大鼠于孕激素撤退 0、12、24、36、48 h,

动态收集大鼠血清和子宫组织样本(图1)。用1%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉(40 mg/kg)后,腹主动脉采血,急性大失血法安乐死大鼠后,在大鼠子宫愈合段上方剪取双侧子宫,剪去子宫周围组织。记录子宫的颜色、大小、质地等外观变化,将子宫沿中线剪开分成两份:一份置于体积分数为4%的甲醛溶液中固定,用于组织学检查;另一份于液氮中速冻,-80℃冻存。收集的大鼠动脉血在采血管中颠倒混匀,室温静置,待血液完全凝固、血清析出后,4℃条件下3 000×g离心10 min,注射器抽取血清,用EP管分装后,冻存于-80℃冰箱备用。模型组大鼠孕激素撤退后36 h时的子宫出血特征最明显,取材6只大鼠;其余时刻各取材3只大鼠,共收集到18只模型组大鼠的血清和子宫组织样本。正常对照组6只大鼠在孕激素撤退36 h时,按上述步骤收集正常对照组大鼠的血清和子宫组织样本。

1.6 HE染色观察大鼠子宫内膜组织病理学变化

大鼠子宫组织经10%甲醛溶液固定48 h后,放入编号包埋筐,用自来水冲洗过夜。将组织依次进行梯度乙醇脱水,二甲苯透明,浸蜡,使用组织包埋机制备组织蜡块。修块后使用自动切片机进行组织切片(4 μm),切片置于42℃水浴中展平,使用多聚赖氨酸处理过的黏附载玻片捞片后甩去水分,放入烘箱37℃过夜,烘干的切片于4℃保存。将组织切片依次进行二甲苯脱蜡,梯度乙醇和去离子水复水。复水的组织切片浸入苏木精染色液进行细胞核着色10 min,自来水漂洗;浸入酸性乙醇分化液(1%)分化,自来水漂洗;浸入伊红染色液进行细胞质着色10 min,去离子水漂洗。用梯度乙醇脱水、二甲苯透明和中性树胶封固后,于通风橱中阴干。光学显微镜下观察大鼠子宫病理改变并摄片。

1.7 ELISA检测大鼠血清FSH、E₂、LH和PROG浓度

参照ELISA试剂盒说明书操作,简要步骤包括:配制梯度浓度标准品稀释液,梯度稀释因子为2,在酶标板上设空白孔、标准孔(设置重复孔)和待测样品孔;血清样品稀释,稀释因子为5。标准品稀释液和样品稀释液上样,每孔50 μL,封板37℃孵育30 min,浓缩ELISA洗涤液用去离子水稀释为标准浓度,洗涤液洗涤酶标板5次,吸水纸拍干;除空白孔外,其余各孔加入辣根过氧化物酶标记的抗FSH、E₂、LH和PROG抗体50 μL,再次封板37℃孵育30 min,洗涤液

洗涤5次后拍干;各孔先加入过氧化氢50 μL,再加入四甲基联苯胺50 μL,轻轻振荡混匀,避光37℃显色10 min,加酸性终止液50 μL终止反应;酶标仪调零后于450 nm波长处测量各孔吸光度(A值),计算标准曲线。根据稀释因子,求得大鼠血清性激素浓度。

1.8 免疫组织化学法检测子宫内膜中CD31、VEGF和MMP-9表达

将大鼠子宫组织的石蜡切片,脱蜡复水,浸入柠檬酸钠缓冲液(0.01 mol/L),微波炉加热,温度计显示缓冲液温度升高到98℃后维持温度,抗原修复15 min,室温环境下自然冷却,用PBS缓冲液(0.01 mol/L)漂洗切片3次,每次3 min;用免疫组化笔在切片组织周围画圈,在圈定的组织上加入内源性过氧化物酶阻断剂,室温孵育10 min,PBS漂洗3次;用含5%脱脂奶粉的PBS室温封闭抗原1 h,漂洗3次;分别加入目的蛋白CD31、VEGF、MMP-9的特异性抗体(体积稀释比例为1:1 000),4℃孵育过夜,漂洗3次;加入反应增强液,室温孵育20 min,漂洗3次;加入增强酶标山羊抗兔IgG聚合物或者抗小鼠酶标二抗,室温孵育20 min,漂洗3次;DAB显色,显色终止后再用苏木精对比染色细胞核,封固后于光学显微镜下观察并摄片。应用Image J图像分析软件对各组图片进行多视野图像分析。

1.9 TUNEL染色检测子宫内膜凋亡情况

将大鼠子宫组织石蜡切片,脱蜡复水后,参照TUNEL染色试剂盒说明书操作。在圈定的组织上依次加入以下试剂并避光孵育:蛋白酶K溶液20 μg/mL,室温20 min;0.3% H₂O₂溶液,室温30 min;TUNEL反应液(TdT酶和Biotin TUNEL反应液的体积比为1:49),37℃2 h;Streptavidin-HRP工作液,37℃30 min。每种试剂孵育后用PBS漂洗3次,每次3 min;DAB显色,显色中止后再用苏木精对比染色细胞核,封固后于光学显微镜下观察并摄片。应用Image J图像分析软件对各组图片进行多视野图像分析。

1.10 免疫印迹法检测子宫组织中FGF2和ET-1的表达水平

冻存的大鼠子宫组织样本按照大约1 g:10 mL的质量体积比,加RIPA细胞裂解液、1%裂解液体积的蛋白酶和磷酸酶抑制剂混合液,低温振荡研磨离心提取子宫总蛋白,再次滴加蛋白酶和磷酸酶抑制剂混合液,BCA法测定总蛋白浓度。依据蛋白浓度测定结果和统一上样蛋白浓度进行蛋白变性,吸取样品蛋白、

RIPA、上样缓冲液于EP管中, 100℃金属浴加热10 min, 离心聚拢变性蛋白, 放入-20℃冰箱中快速冷却并保存。使用凝胶快速制备试剂盒制胶, 统一体积上样, 使用快速电泳液恒压200 V电泳30 min, 使用快速转膜液恒流350 mA电转35 min, 抗原封闭后分别加入目的蛋白FGF2、ET-1的特异性抗体(体积稀释比例为1:1 000) 4℃孵育过夜, TBST洗膜3次, 每次5 min; 孵育标记二抗, 洗膜后ECL发光液显影, 曝光拍照; 膜再生液洗脱, 再次封闭后继续按步骤曝光内参蛋白 β -actin。用Image J图像分析软件测量各条带灰度值, 并进行光密度分析, 以目的蛋白与内参蛋白条带测量分析值的比值表示目的蛋白的相对表达水平。

1.11 转录组学测序分析

取正常对照组和模型组孕激素撤退36 h(简称Model-36 h)大鼠各6只, 每只大鼠均取约100 mg的冻存子宫组织, 置于干冰中, 运输至上海欧易生物科技有限公司进行转录组学测序。测序数据经过清洗获得高质量reads后, 比对到参考基因组, 计算获得counts数值, 得到样本检测的基因数目。计算基因的FPKM定量结果, 并进行主成分分析。筛选差异表达基因时, 以 q -value < 0.05 并且 $|\log_2(\text{fold change})| > 1$ 作为标准, 绘制火山图, 以展示单个基因的表达变化和显著性; 绘制差异表达基因分组聚类热图, 以展示基因表达模式的整体视图和样本间的聚类关系; 对差异表达基因进行GO功能分析和KEGG富集分析, 并根据 q -value列举出显著上调的前10个基因和显著下调的前10个基因。

1.12 统计方法

对正常对照组(Control)和模型组孕激素撤退36 h(Model-36 h)各6只大鼠的检测数据进行统计, 应用SPSS 20.0、GraphPad Prism 8软件进行统计分析和绘图, 数据以平均数 $\pm$ 标准误($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$)表示。每组数据进行正态性检验, 符合正态分布的数据采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义; 非正态分布数据则采用Wilcoxon秩和检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 AUB模型大鼠的动情周期出现变化

正常对照组大鼠的阴道脱落细胞形态呈周期性改变, 以4~6 d为一个动情周期(图2A): 动情前期时膨大呈椭圆形的有核上皮细胞占绝大多数, 偶见少量白细胞和角化上皮细胞; 动情期时绝大多数

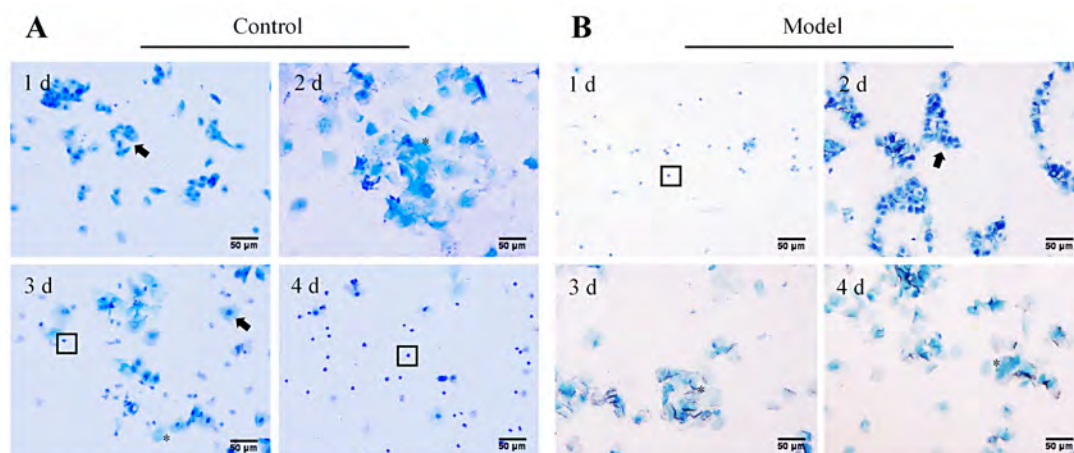
细胞为外形不规则的角化上皮细胞, 聚集在一起形成堆状, 如落叶状, 可见极少量白细胞和有核上皮细胞; 动情后期时不规则角化上皮细胞、有核上皮细胞和白细胞均可见, 且比例相当; 动情间期时细胞总数较为稀少, 以白细胞为主, 偶见一些有核上皮细胞。模型组大鼠双侧卵巢切除后, 造模用药第1天, 由于双侧卵巢切除缺乏内源性雌孕激素, 用药前阴道脱落细胞的形态全部静止于动情间期; 造模用药第2天, 随着外源性雌激素的补充, 脱落细胞形态改变呈动情前期; 第3天, 持续补充外源性雌激素, 脱落细胞形态再变为动情期; 第4天, 序贯补充外源性孕激素, 脱落细胞形态持续处于动情期, 直到孕激素撤退。结果提示, 从卵巢切除到孕激素撤退, 模型组大鼠的阴道脱落细胞形态呈非周期性改变(图2B)。

2.2 AUB模型大鼠的子宫组织出现病理学变化

正常对照组大鼠子宫外观呈白色且组织致密, 镜下子宫内膜单层柱状上皮排列紧密, 间质和腺体结构清晰、染色均匀, 子宫内膜可见少量红细胞散在分布于间质中, 血管中红细胞个数少(图3A)。模型组大鼠子宫外观偏红、肿胀, 镜下子宫内膜上皮细胞和间质细胞(蜕膜细胞)排列松散, 间质组织中出现较多红细胞, 血管中红细胞淤滞, 可见子宫出血(图3B~F): 在孕激素撤退0 h, 子宫内膜血管中聚集大量红细胞, 血管扩张(图3B); 12 h后可见内膜明显充血、炎性细胞浸润, 功能层局部出现明显的上皮间质坏死脱落和腺体结构破坏, 血管进一步扩张伴随结构破坏, 红细胞逸散到间质中(图3C); 24 h后间质组织中红细胞数量明显增加, 部分功能层脱落, 出现内膜上皮新生, 子宫腔内可见脱落的内膜碎片(图3D); 36 h后内膜功能层损伤面积最大, 大量内膜组织游离到子宫腔中, 子宫出血量达到最大(图3E); 48 h后子宫内膜功能层剥脱状态缓解, 遗留有蜕膜组织, 内膜脱落部分完成上皮新生, 遗留蜕膜组织仍可见损伤的血管和坏死的间质细胞(图3F)。

2.3 AUB模型大鼠血清性激素、子宫疾病相关蛋白表达和内膜细胞凋亡均发生变化

检测大鼠血清性激素水平的ELISA检测结果显示, 与正常对照组相比, 模型组大鼠在孕激素撤退36 h的血清中FSH、 E_2 和LH水平明显升高($P < 0.05$), PROG无明显差异($P > 0.05$, 图4A)。免疫组织化学检测结果显示, 与正常对照组相比, 模型组大鼠在



注：A，正常对照组一只代表性大鼠在一个动情周期内阴道脱落细胞的形态变化（1、2、3、4 d 分别为动情前期、动情期、动情后期和动情间期，呈周期性改变）；B，模型组一只代表性大鼠从卵巢切除、激素诱导到孕激素撤退的阴道脱落细胞形态变化（1、2、3、4 d 分别为动情间期、动情前期、动情期和动情期，呈非周期性改变）。图片中黑色箭头（➡）指向有核上皮细胞，星号（*）标记为角化上皮细胞，方框（□）内为白细胞。图中比例尺为 50 μm 。

Note: A, Morphological changes of vaginal exfoliated cells of a representative rat in the normal control group during one estrous cycle (Days 1, 2, 3, and 4 correspond to proestrus, estrus, metestrus, and diestrus, respectively, showing cyclical changes); B, Morphological changes of vaginal exfoliated cells of a representative rat in the model group from ovariectomy, hormone induction to progesterone withdrawal (Days 1, 2, 3, and 4 correspond to diestrus, proestrus, estrus, and estrus, respectively, showing a non-cyclic pattern). In figures, black arrows (➡) indicate nucleated epithelial cells, asterisks (*) mark keratinized epithelial cells, and boxes (□) denote white blood cells. In figures, the scale bar is 50 μm .

图2 异常子宫出血模型大鼠动情周期改变的阴道脱落细胞涂片检测（亚甲蓝染色，×200）

Figure 2 Detection of changes in the estrous cycle in abnormal uterine bleeding model rats using vaginal exfoliated cell smear (methylen blue staining, ×200)

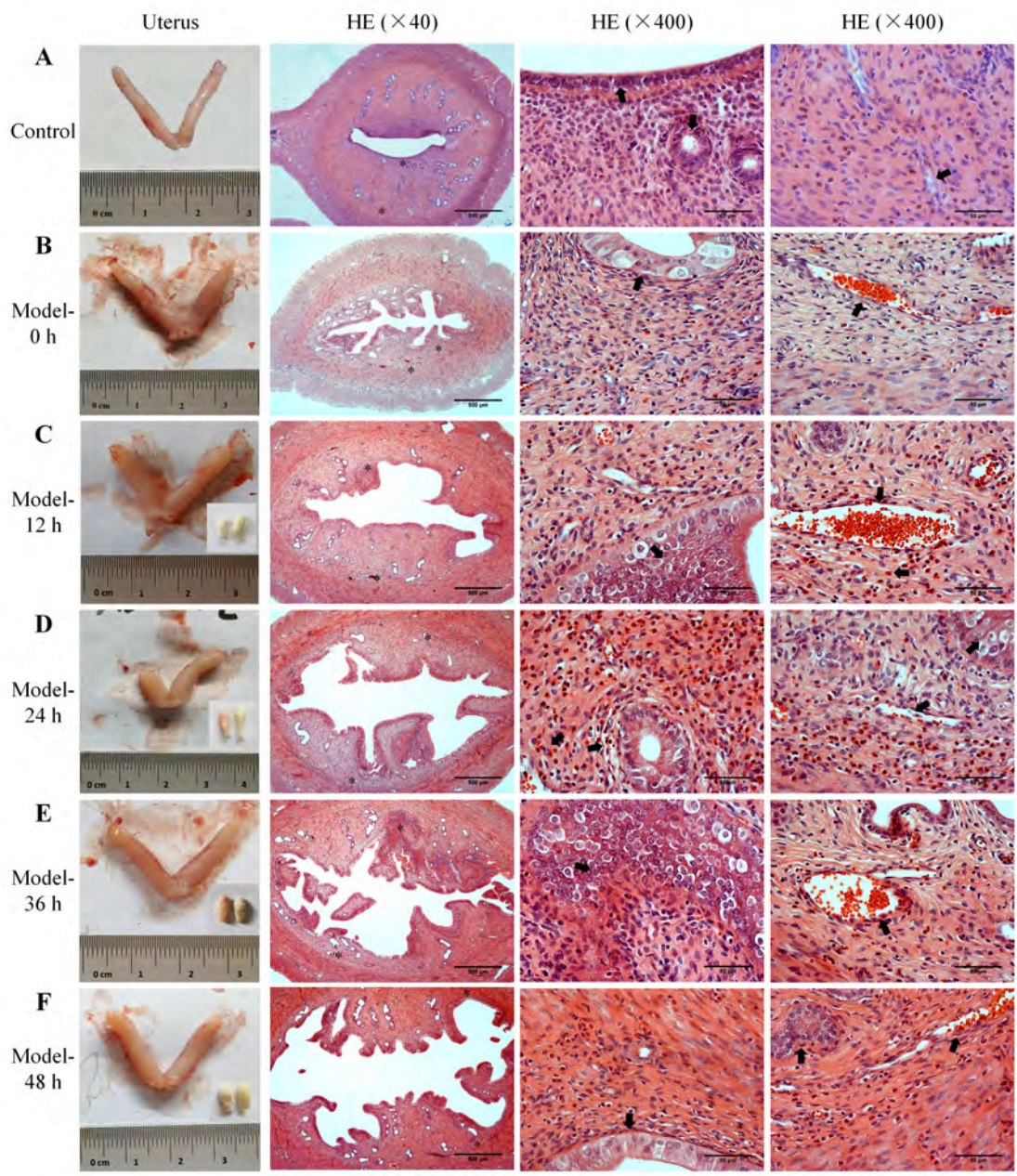
孕激素撤退 36 h 时 CD31 标记的子宫内膜血管密度明显降低 ($P < 0.05$)；VEGF 在子宫内膜剥脱处表达明显增强，而在间质血管周围表达水平显著下降 ($P < 0.01$)；MMP-9 在子宫内膜损伤部位表达明显增强，而在未剥脱间质和腺体处表达水平显著降低 ($P < 0.01$ ，图 4B)。TUNEL 染色后观察发现，与正常对照组相比，模型组大鼠在孕激素撤退 36 h 时的子宫内膜间质细胞阳性率显著增加 ($P < 0.01$ ，图 4B)。蛋白质印迹检测结果显示，与正常对照组相比，模型组大鼠在孕激素撤退 36 h 时的子宫组织中 FGF2 和 ET-1 的表达水平均明显下降 ($P < 0.05$ ，图 4C)。

2.4 AUB 模型大鼠子宫组织的基因表达谱出现变化

转录组学测序结果显示，与正常对照组相比，模型组大鼠在孕激素撤退 36 h 时子宫组织中的基因表达数量显著降低 ($P < 0.0001$ ，图 5A)。主成分分析结果显示，模型组孕激素撤退 36 h 大鼠 (M) 与正常对照组大鼠 (C) 样本的聚类距离较远，二者在基因表达模式方面存在较大差异 (图 5B)。差异表达

基因分析获得的 Venn 图和火山图显示，模型组孕激素撤退 36 h 大鼠与正常对照组大鼠之间共筛选到 4 723 个差异表达基因 (图 5C~D)，其中表达上调 (Up) 基因为 2 191 个，表达下调 (Down) 基因为 2 532 个。进一步的分组聚类热图显示，模型组孕激素撤退 36 h 大鼠子宫组织中表达上调 (Up) 基因包括 RNA 调控基因 (如 Nck1、Actn4)、分化凋亡 (如 Btc、Olfm4)、免疫 (如 Tnfrsf6、Ceacam1) 相关的基因，表达下调 (Down) 基因包括与炎症过程 (如 Il36rn、Pla2g3)、细胞黏附 (如 Ctnnd2、Frem3) 相关的基因 (图 5E)。表 1 列出了 AUB 模型大鼠与正常大鼠的差异表达基因中前 10 个上调和前 10 个下调基因的基本信息。

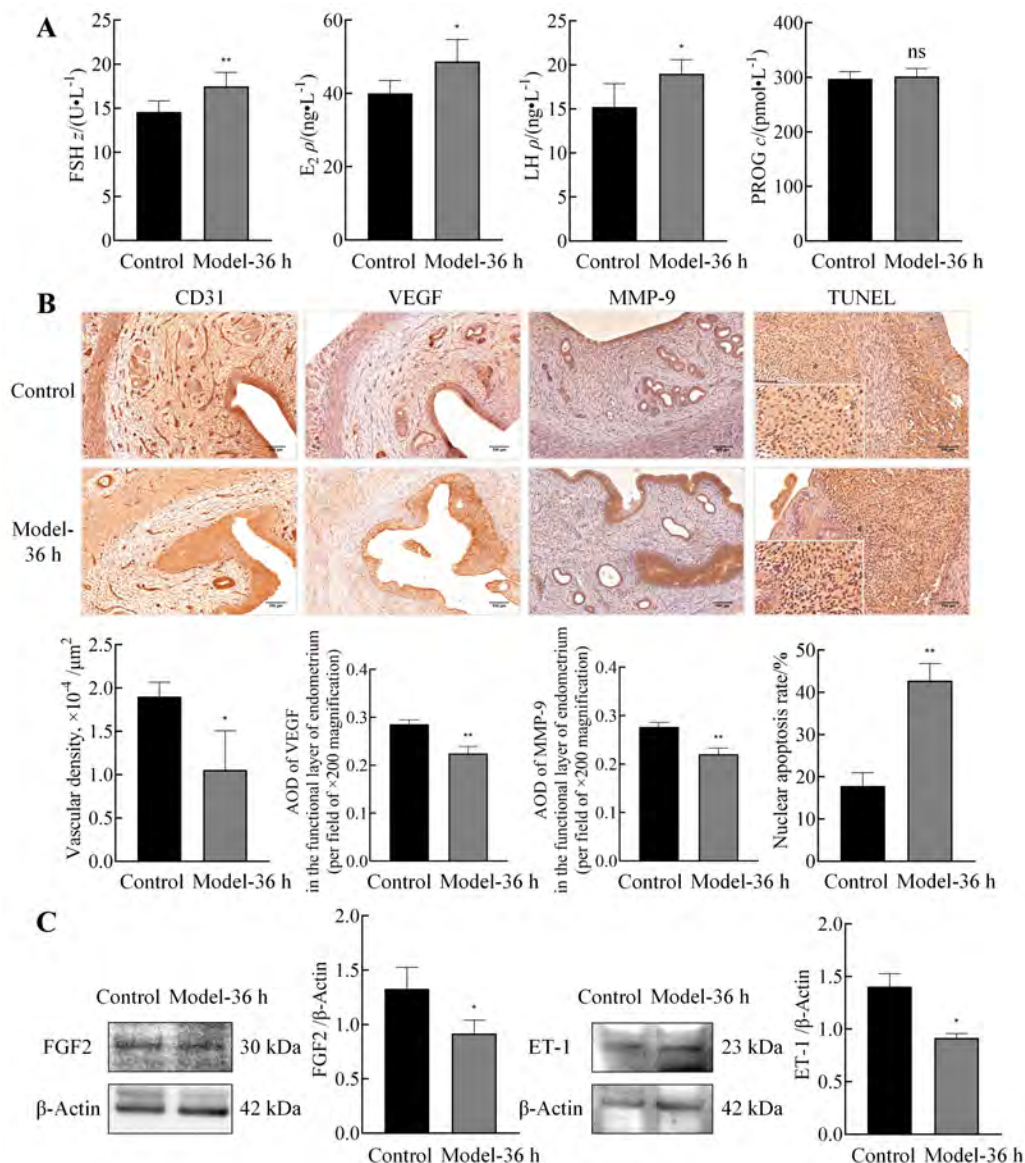
GO 功能分析结果显示，表达上调的差异表达基因与细胞黏附、细胞通信、蛋白质定位、细胞迁移、细胞外基质相互作用相关；最显著相关的生物学过程包括细胞黏附、细胞-细胞黏附、对雌二醇的反应等，还有正向调节细胞迁移、正向调节血管生成等；最显著相关的细胞组分包括细胞表面和细胞外基质；最显著的分子功能涉及碳水化合物结合、胶原蛋白



注：A，正常对照大鼠的子宫外观和子宫内膜组织HE染色图片；B~F，异常子宫出血模型大鼠孕激素撤退0、12、24、36、48 h的子宫外观和收集每12 h子宫出血的阴道棉球（右下角）、子宫内膜组织HE染色图片。HE染色的低倍镜图片中两个星号（*）分别标记为两个高倍镜观察处，黑色箭头（➡）指向内膜上皮、腺体、坏死的间质、血管和出血等结构和病理现象。HE染色图中比例尺从左到右分别为500 μm、50 μm和50 μm。

Note: A, Uterine morphology and the HE-stained images of endometrial tissue in normal control rats; B-F, The uterine morphology in AUB model rats at 0 h, 12 h, 24 h, 36 h, and 48 h after progesterone withdrawal, along with vaginal cotton balls collected for uterine bleeding assessment every 12 hours (lower right corner), and the HE-stained images of endometrial tissue at the corresponding time points. The two asterisks (*) in each low-magnification HE-stained image indicate the two areas observed under high magnification, and the black arrows (➡) point to the structures and pathological phenomena such as the endometrial epithelium, glands, necrotic stroma, blood vessels, and bleeding. In the HE-stained images, the scale bars from left to right column are 500 μm, 50 μm and 50 μm, respectively.

图3 异常子宫出血模型大鼠的子宫外观、出血情况和内膜组织病理变化
Figure 3 Uterine morphology , bleeding patterns , and histopathological changes of endometrial tissues in abnormal uterine bleeding model rats



注：A，ELISA 检测正常对照大鼠和异常子宫出血模型大鼠孕激素撤退 36 h 血清中性激素包括 FSH、 E_2 、LH 和 PROG 的水平 ($n=6$)；B，免疫组织化学染色检测两组大鼠子宫组织中血管内皮表达蛋白即血小板-内皮细胞黏分子-1 (CD31)、血管生成蛋白即血管内皮生长因子 (VEGF)、间质损伤和修复蛋白即基质金属蛋白酶-9 (MMP-9) 的表达及其结果分析 ($n=3$ ，照片图比例尺为 100 μm)，以及大鼠子宫内 TUNEL 染色结果及其阳性细胞占比统计 [$n=3$ ，低倍镜图片 (比例尺为 100 μm) 中星号 (*) 标记为高倍镜 (比例尺为 25 μm) 观察处]；C，蛋白质印迹法检测两组大鼠子宫组织中成纤维细胞生长因子 2 (FGF2) 和内皮素-1 (ET-1) 的表达及其相对量分析 ($n=3$ ，数据表示为平均值 $\pm$ 标准误；与正常对照组比较， $^{ns}P > 0.05$ ， $^*P < 0.05$ ， $^{**}P < 0.01$)。

Note: A, ELISA was used to measure serum levels of sex hormones, including FSH, E_2 , LH, and PROG, in normal control rats and the AUB model rats at 36 h after progesterone withdrawal ($n=6$). B, Immunohistochemistry was performed to assess the expression of vascular endothelial marker platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31), angiogenesis-related protein vascular endothelial growth factor (VEGF), and stromal injury/repair protein matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in uterine tissues of both groups, along with statistical analysis of the results ($n=3$; scale bars: 100 μm). Additionally, TUNEL staining of rat endometrium was conducted, and the percentage of positive cells was quantified [$n=3$; asterisks (*) in low-magnification images (scale bars: 100 μm) indicate regions selected for high-magnification observation (scale bars: 25 μm)]. C, Western blotting was employed to detect the expression of fibroblast growth factor 2 (FGF2) and endothelin-1 (ET-1) in uterine tissues of both groups, along with relative quantification ($n=3$; data presented as mean $\pm$ standard error (SE); Compared with normal control group, $^{ns}P > 0.05$, $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$).

图 4 异常子宫出血模型大鼠的血清性激素水平、子宫血管和间质的损伤修复情况和血管收缩功能的变化

Figure 4 Changes in serum sex hormone levels, injury and repair of uterus blood vessels and stroma, and vascular contractile function of uterus in abnormal uterine bleeding model rats

结合、肝素结合等(图6A)。表达下调的差异表达基因与细胞分化、突触功能、离子运输、细胞骨架运动以及细胞外基质的组成和功能相关;最显著相关的生物学过程包括上皮到间充质转变、参与心内膜垫形成等细胞分化和组织发育,还有突触组织、兴奋性突触后电位、突触组装的正向调节等神经系统功能;最显著相关的细胞组分包括细胞表面和细胞外基质;最显著的分子功能涉及离子通道和信号转导相关的电压门控钾通道活性和谷氨酸受体活性等(图6B)。

KEGG富集分析结果显示,表达上调的差异表达基因富集于肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)信号通路、核因子 κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)信号通路和磷脂酰肌醇3激酶-蛋白激酶B(phosphoinositide 3 kinase-protein kinase B, PI3K-Akt)信号通路等,这些通路共同参与了炎症、免疫凋亡、细胞信号转导、增殖分化等生物学过程(图6C)。表达下调的差异表达基因富集于Wnt信号通路、钙离子信号转导通路和环腺苷酸(cyclic adenosine monophosphate, cAMP)信号通路等,这些通路同样参与炎症、免疫凋亡、细胞信号转导、增殖分化等生物学过程,其中钙离子信号转导通路和cAMP信号通路还参与调控肌肉收缩(图6D)。

3 讨论

AUB病因多样,病理生理学机制复杂,属于妇科临床常见病和难治病。在选择实验动物时,发生行经现象的动物可能自发或适合诱导AUB。目前发现的具有行经现象的动物有猿(*Hominoidea*)、世界猴(*Cercopithecoidea*)^[11]、非洲刺毛鼠(*Acomys cahirinus*)^[12]、黑獭蝙蝠(*Molossus ater*)^[13]和象鼩(*Elephantulus myurus*)^[14]等。自发月经的灵长类动物的子宫是与人类子宫相近,在雌激素和孕激素的作用下历经周期性变化,然而受限于伦理问题和实验成本,难以用于实验研究。其他非灵长类动物由于缺少标准化动物种系、特异性抗体等原因,也不适用于实验。常用的实验动物如小鼠、大鼠、仓鼠和兔等,它们的子宫结构和性激素变化与人类存在显著差异,因此在使用啮齿类动物进行AUB研究时需要诱导其子宫内膜发生人体子宫内膜分泌期蜕膜样改变。

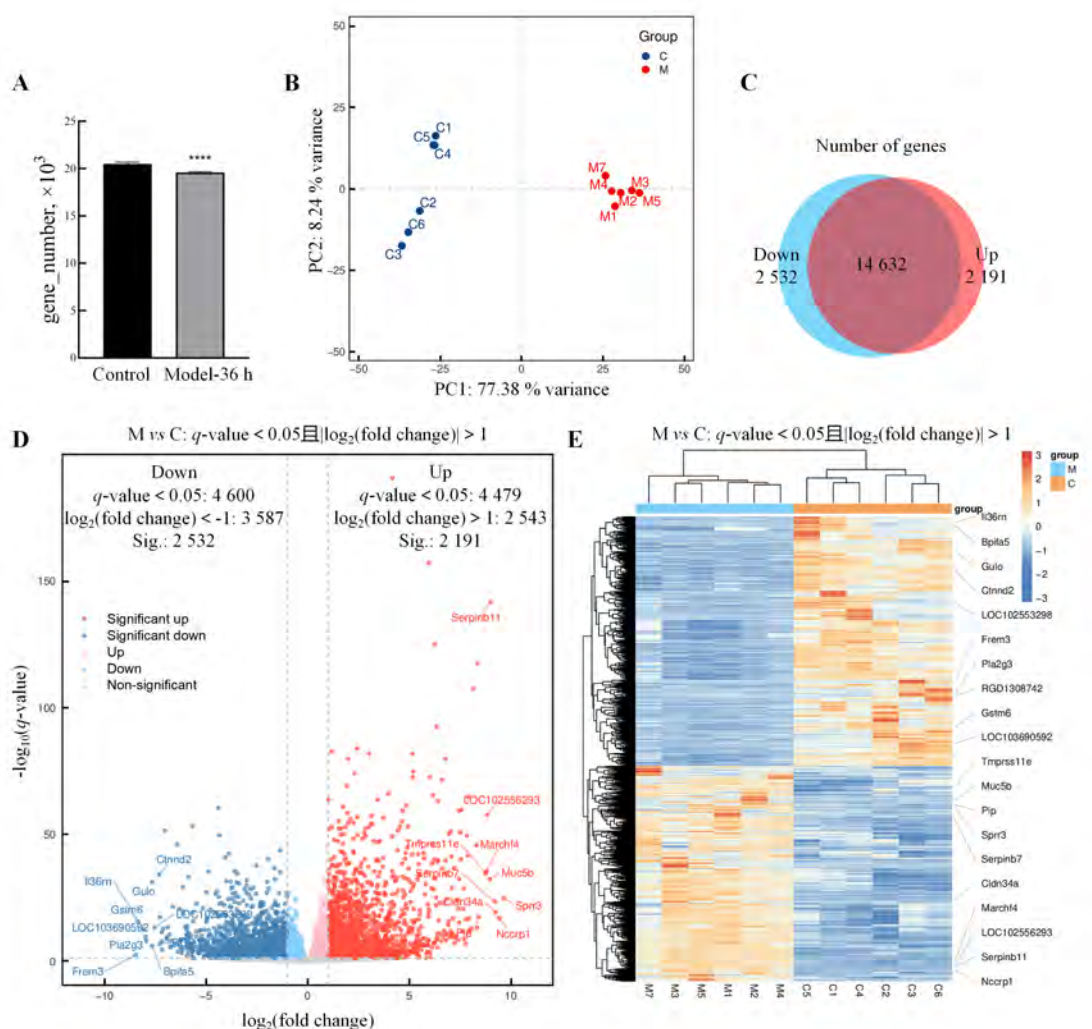
早在20世纪80年代, Finn等^[10]在激素控制下通过子宫腔注射花生油诱导小鼠子宫内膜蜕膜化的操作方法,建立了模拟月经小鼠模型。之后月经生理问题的研究大多采用小鼠作为模型动物,遵循雌激素、孕

激素预备-植物油诱导-孕激素撤退的造模模式,小鼠有了“月经”后就可以在此基础上开展非结构性病因AUB的实验探索^[15]。国内王晓东等^[16]通过对早孕大鼠进行抗早孕处理,使大鼠蜕膜化的子宫内膜损伤出血,建立大鼠不完全流产子宫出血模型。该模型的造模周期较短,子宫出血特征明显,但其抗早孕子宫出血的病因不属于AUB的临床病因分类,因此将该模型用于AUB相关研究缺少理论支持。非结构性病因AUB动物模型各有特点^[17],但目前仍缺少可观察到子宫出血、符合AUB病因分类且表现出临床AUB-O病理特征的临床前动物模型。

大鼠在操作难度和样本组织收获量方面比小鼠更具优势,而且二者的神经内分泌生殖系统相似——动情周期短、周期黄体寿命短且无功能、缺乏自发的黄体期^[18]。因此,大鼠可能同样适用雌激素、孕激素预备-植物油诱导-孕激素撤退的造模模式。本研究结合该造模模式,模拟AUB-O的发病原因,成功建立了AUB大鼠模型。该模型的雌激素和孕激素预备剂量参考了单一雌激素诱导AUB大鼠模型的促进子宫内膜异常增生的雌激素剂量,并模拟月经小鼠模型的孕激素剂量,大鼠子宫注射植物油的剂量与米非司酮药物撤退孕激素剂量则经过多次实验摸索而来,结合观察判断取材时机,使该模型更多地表现出AUB-O的病理特点。

该方法制备的大鼠模型半数可明显观察到子宫出血,可以通过子宫出血判断大鼠子宫内膜的损伤程度。本研究中根据棉球收集到的每12 h子宫出血量,选择对模型孕激素撤退36 h进行重点研究,病理检测结果也证明此时的子宫内膜损伤面积在各取材时间中最大,出血更明显,适用于后续实验研究。AUB模型大鼠表现为子宫内膜功能层剥脱、血管损伤出血、血管收缩止血和再生能力异常、间质和腺体结构破坏,伴有内膜炎性细胞浸润、间质细胞大量凋亡,同时也观察到内膜损伤并不是在子宫内膜功能层同步发生的,子宫内膜表现出复旧不全的特征。

本研究中大鼠AUB模型的特征与非结构性病因AUB-O的临床表现在多个方面趋同。已知下丘脑-垂体-卵巢(hypothalamic-pituitary-ovarian, HPO)轴功能调节或靶器官效应异常可以导致AUB-O的发生。在青春期,HPO轴激素间的反馈调节尚未成熟,大脑中枢对雌激素的正反馈作用存在缺陷,下丘脑和垂体与卵巢间尚未建立稳定的周期性调节,FSH相对峰值呈持续低水平,无促排卵性LH峰形成,卵巢虽有卵泡生



注：A，转录组学测序正常对照大鼠和异常子宫出血模型大鼠孕激素撤退36 h (Model-36 h) 样本的基因数目 (与正常对照组比较，**** $P < 0.0001$)；B，主成分分析结果；C，两组间表达基因差异的Venn图 [图中蓝色区域表示Model-36 h相比正常对照组表达显著降低 (Down) 的基因集合，红色区域表示Model-36 h相比正常对照组表达显著升高 (Up) 的基因集合]；D，差异表达基因分布火山图 (下调差异表达基因中符合差异倍数筛选条件的用蓝色表示，不符合差异倍数筛选条件的用浅蓝色表示；上调差异表达基因中符合差异倍数筛选条件的用红色表示，不符合差异倍数筛选条件的用浅红色表示；差异不显著的表达基因用灰色表示。图中标注了部分差异倍数较高的下调和上调差异表达基因)；E，差异表达基因聚类热图，图中颜色深浅代表数据点的数值高低 (根据相似性进行分组聚类，图中标注了差异倍数较高的上调和下调基因)。

Note: A, The number of genes in rat samples from the normal control rats and the AUB model rats at 36 h after progesterone withdrawal (Model-36 h) (compared with normal control group, **** $P < 0.0001$); B, Results of principal component analysis; C, Venn diagram showing the differences in expressed genes between the two groups [The blue area represents the gene set with significantly decreased expression (Down) in the Model-36 h compared to normal control group, while the red area represents the gene set with significantly increased expression (Up) in the Model-36 h compared to normal control group]; D, Volcano plot of differentially expressed genes (down-regulated differentially expressed genes meeting fold change criteria in blue, non-meeting fold change criteria in light blue; up-regulated differentially expressed genes meeting criteria in red, non-meeting criteria in light red; non-significantly expressed genes in gray. The plot labels some of the differentially expressed genes with higher fold changes, including both down-regulated and up-regulated ones); E, Differentially expressed gene clustering heatmap by group, where the intensity of color represents the value of data points (grouping and clustering are based on similarity, and genes with higher fold changes in up-regulation and down-regulation are labeled in the heatmap).

图5 异常子宫出血模型大鼠子宫组织中差异表达基因的转录组学分析

Figure 5 Transcriptomic analysis of differentially expressed genes in uterine tissue of abnormal uterine bleeding model rats

长，但卵泡发育到一定程度即发生退行性变，形成闭锁卵泡，无排卵发生，孕激素相对缺乏^[19]。在绝

经过渡期，卵巢功能不断衰退，卵泡近于耗尽，剩余卵泡往往对垂体促性腺激素的反应性低下，雌激

表1 异常子宫出血模型大鼠与正常对照大鼠子宫组织的差异表达基因中前10个上调和前10个下调基因的基本信息

Table 1 Basic information of the top 10 up-regulated and the top 10 down-regulated differentially expressed genes in uterine tissues between abnormal uterine bleeding model rats and normal control rats

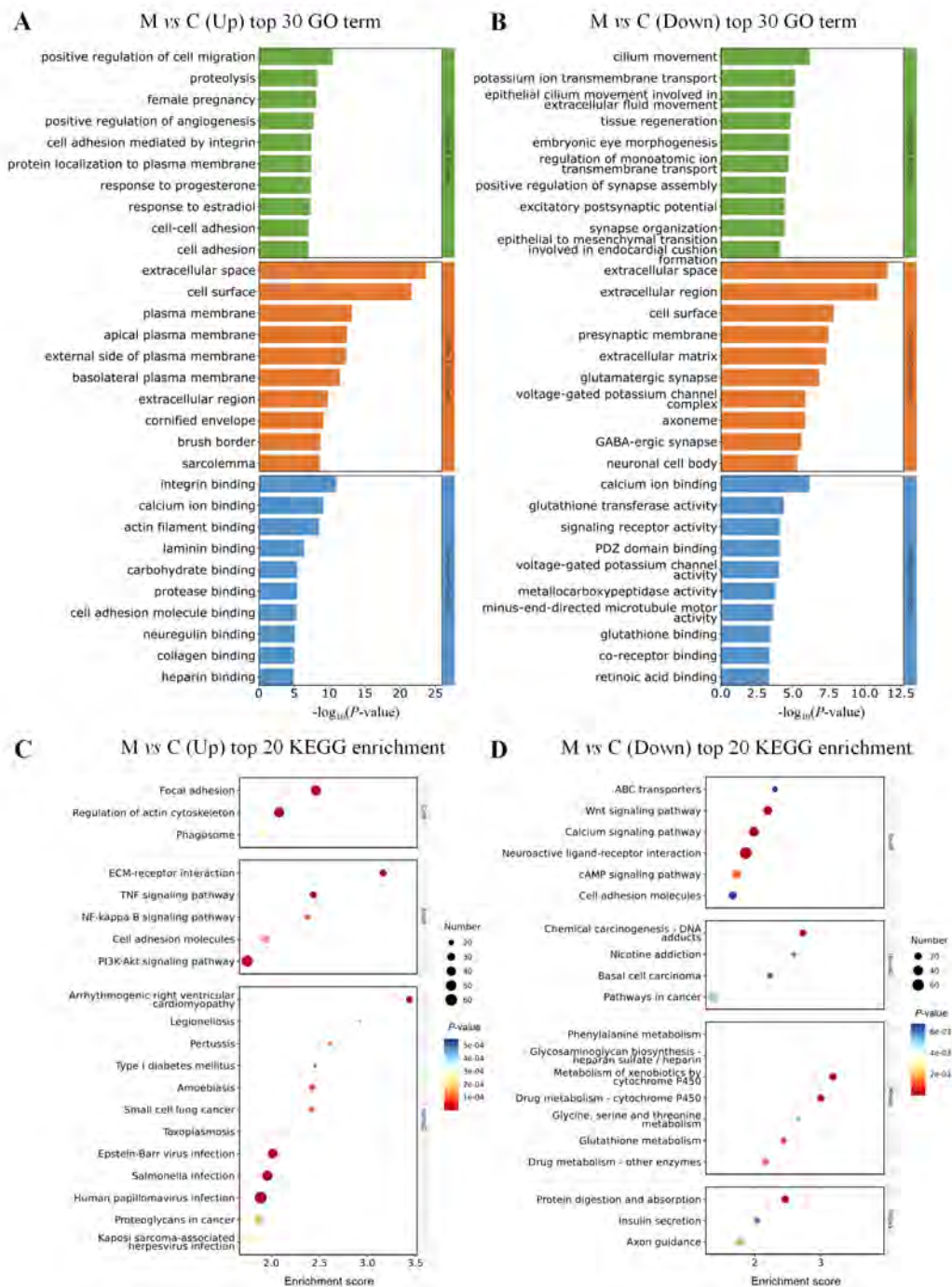
编号 No.	基因符号 Gene symbol	log ₂ 差异倍数 log ₂ (fold change)	q值 q-value	功能概述 Summary
Up-regulated genes				
1	<i>Scin</i>	4.173	4.546×10 ⁻¹⁹¹	Predicted to enable actin filament binding activity and phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate binding activity. etc.
2	<i>Btc</i>	5.961	7.347×10 ⁻¹⁵⁸	Enables epidermal growth factor receptor binding activity and growth factor activity. etc.
3	<i>Serpinb11</i>	9.021	1.630×10 ⁻¹⁴²	Predicted to enable serine-type endopeptidase inhibitor activity. etc.
4	<i>Slc16a12</i>	6.266	9.424×10 ⁻¹²⁶	Enables creatine transmembrane transporter activity. etc.
5	<i>Tprg1</i>	8.356	2.229×10 ⁻¹¹⁸	Predicted to be active in cytoplasm. etc.
6	<i>Olfm4</i>	8.147	2.346×10 ⁻¹⁰⁸	Predicted to enable cadherin binding activity and structural molecule activity. etc.
7	<i>Tnfrsf6</i>	6.344	3.099×10 ⁻⁹³	Predicted to enable several functions, including carboxylesterase activity. etc.
8	<i>Nck1</i>	2.451	1.127×10 ⁻⁸⁴	Predicted to enable several functions, including eukaryotic initiation factor eIF2 binding activity. etc.
9	<i>Actn4</i>	1.188	1.391×10 ⁻⁸³	Enables ubiquitin protein ligase binding activity. etc.
10	<i>Tmbim1</i>	3.027	1.062×10 ⁻⁸²	Predicted to enable calcium channel activity and death receptor binding activity. etc.
Down-regulated genes				
1	<i>Gstm5</i>	-4.393	3.077×10 ⁻⁶¹	Enables glutathione transferase activity and identical protein binding activity. etc.
2	<i>Armh4</i>	-5.671	4.422×10 ⁻⁵⁴	Predicted to enable TORC2 complex binding activity. etc.
3	<i>LOC102548820</i>	-7.032	2.774×10 ⁻⁵²	-
4	<i>Arg2</i>	-4.338	1.561×10 ⁻⁵⁰	Enables arginase activity and nitric-oxide synthase binding activity. etc.
5	<i>Frem2</i>	-6.413	6.963×10 ⁻⁴⁷	Predicted to be involved in anatomical structure morphogenesis and cell adhesion. etc.
6	<i>Mppe1</i>	-1.346	1.575×10 ⁻⁴⁴	Predicted to enable GPI anchor binding activity. etc.
7	<i>Lef1</i>	-3.875	3.022×10 ⁻⁴³	Predicted to enable several functions, including DNA binding activity. etc.
8	<i>Smad9</i>	-4.048	8.538×10 ⁻⁴²	Predicted to enable DNA-binding transcription factor activity, RNA polymerase II -specific. etc.
9	<i>Miga1</i>	-1.944	4.052×10 ⁻⁴¹	Predicted to enable protein heterodimerization activity and protein homodimerization activity. etc.
10	<i>Bmpr1b</i>	-2.515	1.387×10 ⁻³⁸	Predicted to enable several functions, including ATP binding activity. etc.

注：表中大鼠基因功能注释来自美国国家生物技术信息中心数据库。

Note: The rat gene function annotations listed in the table are sourced from the National Center for Biotechnology Information Database in the United States.

素和孕激素分泌量锐减，特别是孕激素水平先于雌激素下降，促性腺激素水平升高，但不形成排卵期前LH高峰，无排卵发生^[20]。本研究中，模型大鼠E₂水平受到前期外源性激素控制，后期经过较长时间的生理性回落，在子宫内膜剥脱时E₂水平对于诱导增生的内膜相对不足，同时孕激素拮抗剂的使用使孕激素效应相对不足，这与青春期和绝经过渡期的激素缺乏特征一致。此外，临床上AUB患者由于黄体萎缩不全，子宫内膜持续受孕激素刺激，无法按时脱落，导致经血淋漓不尽或大量出血。本研究中模型大鼠的血清孕激素水平与正常大鼠相当，对于需要去除蜕膜组织的大鼠，正常的血清孕激素水平相对“较高”，不利于内膜剥脱，旧的病理性内膜阻碍了新的生理性内膜的再生，结果促进了异常子宫出血的发生；病理染色可见孕激素撤退48 h后模型大鼠子宫内还存在较多量的内膜组织，模型大鼠子宫内膜复旧不全的特点也与AUB-O子

宫内膜脱落困难的临床表现^[21]一致。而在模拟月经小鼠模型中，蜕膜组织在孕激素撤退48 h内同步崩解



注：A，上调差异表达基因的GO功能分析；B，下调差异表达基因的GO功能分析；C，上调差异表达基因的KEGG富集分析；D，下调差异表达基因的KEGG富集分析。

Note: A, GO functional analysis of up-regulated differentially expressed genes; B, GO functional analysis of down-regulated differentially expressed genes; C, KEGG enrichment analysis of up-regulated differentially expressed genes; D, KEGG enrichment analysis of down-regulated differentially expressed genes.

图6 异常子宫出血模型大鼠子宫组织中差异表达基因的转录组学分析

Figure 6 Transcriptomic analysis of differentially expressed genes in uterine tissue of model rats with abnormal uterine bleeding

脱落，到48 h蜕膜组织碎片完全清除，子宫内膜恢复到蜕膜前的状态^[22]。复旧不全是本研究中大鼠模型区

别于模拟月经小鼠模型最独特的部分，模型大鼠具有更长的病程，有利于实验研究。另外，模型大鼠残存

的内膜组织可能导致大鼠表现出较长时间的疼痛症状,甚至降低大鼠受孕概率,在这些方面与AUB临床病理特征的相似性也需要后续研究的进一步检验。

月经失血过多是子宫内疾病型AUB (abnormal uterine bleeding-endometrial disorders, AUB-E) 的主要临床症状,内膜修复延迟会导致月经出血时间延长^[23]。已有研究表明,VEGF可扩张血管,增加血管通透性,诱导新生血管形成,促进子宫内膜周期性血管修复,其表达降低不利于内膜新血管的生成^[24]。FGF2能够促进创伤愈合与组织修复,加速伤口愈合过程,其表达水平降低表明组织损伤后修复能力不足^[25]。月经失血过多还与血管活性因子表达失调有关,在月经过多的患者子宫内膜中ET降低,负责其失活的中性内肽酶增加^[26]。血管收缩能力直接决定了月经的失血量^[27],ET-1通过收缩子宫内小动脉来减少月经失血^[28]。本研究中AUB大鼠模型的子宫组织中VEGF、FGF2和ET-1表达水平均明显下降,提示模型大鼠的子宫内膜损伤修复能力减弱,血管收缩止血能力受限,这是该模型关键的病理机制之一。这些实验结果与AUB-E的临床表现有许多相同之处,提示该模型可能也适用于AUB-E相关的实验研究。

AUB的发生与炎症失调相关^[29-30]。中性粒细胞流的产生及其分泌的MMP等炎性因子能促进细胞外基质的正常降解^[31]。本研究中,AUB大鼠模型的MMP-9仅在内膜损伤部位表达增强,而在未剥脱间质和腺体处表达明显降低。该模型大鼠表现的病理现象可能与其炎症反应能力不足有关,导致宫腔组织脱落不足,从而引发子宫内膜的再生和修复困难,最终发展为子宫复旧不全。

AUB的发生也与凋亡过程异常有关。细胞凋亡可能是人类月经子宫内膜中最早的组织学变化之一,细胞凋亡先于月经炎症和明显脱落,并持续到月经后的子宫内膜修复^[32]。凋亡影响着月经的进程^[33],凋亡现象可以及时持续地反映子宫内膜破坏和修复的进程及病理状态,一定程度上预测内膜的转归。本研究建立的AUB大鼠模型中,子宫内膜脱落周围的间质细胞凋亡显著增强,说明凋亡参与模型的病理过程,特别是子宫内膜的损伤过程。

为了深入探明雌激素、孕激素和米非司酮序贯使用导致大鼠AUB的病理机制,本研究应用转录组学测序的方法,检测分析了模型组和正常对照组大鼠子宫组织中差异表达基因及对应的生物学过程。结果表明,大鼠AUB可能与炎症反应、免疫反应、凋亡过程、细

胞增殖分化和肌肉收缩失衡密切相关,这与本研究中的其他实验结果可以相互验证。与表达上调基因显著相关的生物学过程提示,在AUB模型大鼠子宫组织中,与细胞间相互作用和激素信号转导相关的基因表达水平上升,细胞运动和组织重塑增强;显著相关的细胞组分提示,AUB模型大鼠子宫组织中有与细胞外环境相互作用的基因表达增强;显著相关的分子功能提示,模型大鼠子宫组织中与分子识别和细胞黏附相关的蛋白质功能被显著激活。与表达下调基因显著相关的生物学过程提示,模型大鼠子宫组织中细胞分化和组织构建能力下降,神经突触的发育和功能受到了抑制;显著相关的细胞组分提示,模型大鼠子宫组织中有与细胞结构和细胞外环境相关的基因表达水平降低,这可能影响子宫中细胞功能和细胞间通信功能,进而影响组织和器官的整体功能;显著相关的分子功能提示,模型大鼠子宫组织中离子运输和神经信号传递减少。KEGG富集分析结果提示,模型大鼠子宫组织可能具有更强的炎症反应,免疫反应和凋亡受到影响,在细胞信号转导和细胞命运的决定方面也可能发生了改变,细胞增殖和分化活性可能显著降低,钙离子信号转导的肌肉收缩、神经传导、细胞分裂分化活性减弱,由cAMP介导的细胞增殖分化与肌肉收缩功能减弱。Li等^[34]的研究也发现,用于治疗AUB的生化汤可以调节包括子宫肌层收缩、子宫内膜重建、免疫系统、血管生成和凝血系统、性激素信号转导以及抗菌活性等多方面有关子宫功能的基因表达,这表明子宫收缩、内膜重建、免疫反应等机制在AUB的发生和治疗中都起到重要作用。诚然,本研究尚缺少对转录组学测序结果的直接实验验证,尚待后续完善。

综上所述,AUB大鼠模型是大鼠子宫在经历雌激素和孕激素促进内膜增生、一定孕激素水平下经植物油诱导内膜蜕膜化^[35]、米非司酮给药模拟孕激素撤退后出现的子宫内膜损伤脱落和复旧不全的病理模型,伴有子宫出血现象。相较现有的非结构性AUB模型,本研究中AUB大鼠模型的优势是病理特征明显、造模成本低、条件可控。但需要说明,该模型尚存在一些不足。已知模型动物的子宫内膜病理变化受激素水平影响,孕激素效应的控制是模型制备成功与否的关键。本研究的模型制备采用每日注射的方式调整激素水平,每日注射激素后大鼠体内激素水平快速升高,之后缓慢下降。从整体实验过程来看,人为使模型激素水平上下波动,干扰了模型孕激素效应的控制,因此该模型可以向优化激素给药模式的方向改进,如将每日

激素给药量分多次注射,或者在大鼠体内植入硅橡胶管来缓释激素^[36],抑或使用带微调控功能的给药泵控释激素,从而提高模型制备的同质性。再者,给大鼠子宫腔注射植物油诱导蜕膜化的方式需要二次开刀手术,对实验动物的伤害较大,模型动物用于药理学实验会继续增加给药等实验步骤,造模损伤较大可能导致后续实验数据获取量不能达到预期,甚至导致实验失败。因此,可以优化诱导蜕膜化的操作方法,如在大鼠卵巢切除术时尽量减小手术切口,并将切除卵巢后的子宫残端在切口缝合时固定于皮下,二次手术依据切除术入路原位进入,方便尽快找到子宫,同时减少二次手术损伤,或采用腹腔镜注射等方法代替损伤更大的开刀手术^[37]。AUB大鼠模型制备过程中,雌激素、孕激素与米非司酮相对剂量可能决定了内膜复旧不全的发生^[38-39]。本研究中孕激素用量不足以支持增生子宫内膜充分蜕膜化,米非司酮的实验用量也不足以完全封闭孕激素效应,而临床导致AUB发生的激素紊乱模式并不单一,具体患者的激素水平和变化趋势也不尽相同,本研究使用的激素用量关系只是其中一种。因此,调整雌激素、孕激素与米非司酮的相对剂量,改变大鼠的激素模式可能会使该模型表现出更多的其他的病理特点。

另外,AUB的临床前模型动物选择也值得进一步深入探讨。相比啮齿类动物,兔作为AUB模型动物可能更有优势。仅从体内诱导蜕膜化一环来看,兔在蜕膜化发生机制上比小鼠和大鼠更接近人类,只给予雌激素和孕激素就可以成功诱导兔子子宫发生蜕膜化^[40],但本研究未在此方向深入。此外,目前唯一发现具有月经现象的啮齿动物——非洲刺毛鼠,在经过标准化种系培育后用于AUB研究领域也值得期待。

[医学伦理声明 Medical Ethics Statement]

本研究所涉及的所有动物实验方案均已通过北京中医药大学动物实验伦理委员会审查批准(BUCM-4-2022040606-2007)。所有实验操作均遵照中国实验动物相关法律法规条例要求以及北京中医药大学实验动物中心标准操作规程进行。

All animal experimental protocols involved in this study have been reviewed and approved by the Animal Experiment Ethics Committee of Beijing University of Chinese Medicine (Approval No. BUCM-4-2022040606-2007). All experimental operations comply with relevant laws and regulations on experimental animals in China and adhere to the standard operating procedures of the Experimental Animal Center of Beijing University of Chinese Medicine.

[作者贡献 Author Contribution]

连辉负责文献查阅、实验设计和实行、论文撰写及修改;姜艳玲、刘佳、张玉立、谢伟负责重复实验、论文修改;薛晓鸥、李健负责研究指导及论文修改。

[利益声明 Declaration of Interest]

所有作者均声明本文不存在利益冲突。

[数据共享 Data Sharing]

本研究中更多组学数据可见本刊官网的附件资料。

[参考文献 References]

- [1] 中华医学会妇产科学分会妇科内分泌学组. 异常子宫出血诊断与治疗指南(2022 更新版)[J]. 中华妇产科杂志, 2022, 57(7):481-490. DOI: 10.3760/cma.j.cn112141-20220421-00258. Gynecologic Endocrinology Subgroup, Chinese Society of Obstetrics and Gynecology, Chinese Medical Association. Guideline on diagnosis and treatment of abnormal uterine bleeding: 2022 revisions[J]. Chin J Obstet Gynecol, 2022, 57(7): 481-490. DOI: 10.3760/cma.j.cn112141-20220421-00258.
- [2] JAIN V, CHODANKAR R R, MAYBIN J A, et al. Uterine bleeding: how understanding endometrial physiology underpins menstrual health[J]. Nat Rev Endocrinol, 2022, 18 (5):290-308. DOI:10.1038/s41574-021-00629-4.
- [3] MUNRO M G, CRITCHLEY H O D, FRASER I S, et al. The two FIGO systems for normal and abnormal uterine bleeding symptoms and classification of causes of abnormal uterine bleeding in the reproductive years: 2018 revisions[J]. Int J Gynaecol Obstet, 2018, 143(3):393-408. DOI:10.1002/ijgo.12666.
- [4] KITAHARA Y, HIRAIKE O, ISHIKAWA H, et al. National survey of abnormal uterine bleeding according to the FIGO classification in Japan[J]. J Obstet Gynaecol Res, 2023, 49(1): 321-330. DOI:10.1111/jog.15464.
- [5] LI Q H, REN J L, YANG L, et al. Parsing the Q-markers of Baoyin Jian to treat abnormal uterine bleeding by high-throughput chinmedomics strategy[J]. Pharmaceuticals, 2023, 16(5):719. DOI:10.3390/ph16050719.
- [6] 高兰, 王侃, 贾媛, 等. 茜草不同炮制品对子宫内出血模型大鼠的影响[J]. 中医学报, 2020, 35(1):144-148. DOI: 10.16368/j.issn.1674-8999.2020.01.033. GAO L, WANG K, JIA Y, et al. Effects of different processed medicine of *Rubia cordifolia* L on endometrial hemorrhage model rats[J]. Acta Chin Med, 2020, 35(1): 144-148. DOI: 10.16368/j.issn.1674-8999.2020.01.033.
- [7] KRIKUN G, BOOTH C J, BUCHWALDER L, et al. Long-term progestin-only contraception in humans versus animal models[J]. Ann N Y Acad Sci, 2011, 1221:119-123. DOI:10.1111/j.1749-6632.2010.05930.x.
- [8] 陈钢, 薛红, 孟宪丽, 等. 柴胡止血液对家兔置Cu-IUD的实验研究[J]. 辽宁中医学院学报, 1999, 1(3):200-201. DOI: 10.13194/j.jlunivtcm.1999.03.56.cheng.035. CHEN G, XUE H, MENG X L, et al. Experimental study on the effect of Chaihu Hemostatic solution on the placement of Cu-IUD in rabbits [J]. J Liaoning Coll Tradit Chin Med, 1999, 1

- (3):200-201. DOI: 10.13194/j.jlunivtcm.1999.03.56.cheng.035.
- [9] 尤昭玲, 马红霞, 陈俊明, 等. 恒河猴子宫内膜炎性出血模型的建立[J]. 中国比较医学杂志, 2003, 13(5): 310-312. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7856.2003.05.015.
- YOU Z L, MA H X, CHEN J M, et al. Establishment of animal model with metrorrhagia induced by endometritis in experimental *Rhesus* monkey[J]. Chin J Comp Med, 2003, 13(5): 310-312. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7856.2003.05.015.
- [10] FINN C A, POPE M. Vascular and cellular changes in the decidualized endometrium of the ovariectomized mouse following cessation of hormone treatment: a possible model for menstruation[J]. J Endocrinol, 1984, 100(3): 295-300. DOI: 10.1677/joe.0.1000295.
- [11] CATALINI L, FEDDER J. Characteristics of the endometrium in menstruating species: lessons learned from the animal Kingdom[J]. Biol Reprod, 2020, 102(6):1160-1169. DOI:10.1093/biolre/ioaa029.
- [12] BELLOFIORE N, RANA S, DICKINSON H, et al. Characterization of human-like menstruation in the spiny mouse: comparative studies with the human and induced mouse model[J]. Hum Reprod, 2018, 33(9): 1715-1726. DOI: 10.1093/humrep/dey247.
- [13] RASWEILER J J 4th. Spontaneous decidual reactions and menstruation in the black mastiff bat, *Molossus ater*[J]. Am J Anat, 1991, 191(1):1-22. DOI:10.1002/aja.1001910102.
- [14] CARTER A M. Classics revisited: C. J. van der Horst on pregnancy and menstruation in elephant shrews[J]. Placenta, 2018, 67:24-30. DOI:10.1016/j.placenta.2018.05.010.
- [15] MORISON N B, ZHANG J, KAITU'U-LINO T J, et al. The long-term actions of etonogestrel and levonorgestrel on decidualized and non-decidualized endometrium in a mouse model mimic some effects of progestogen-only contraceptives in women[J]. Reproduction, 2007, 133(1): 309-321. DOI:10.1530/rep.1.01171.
- [16] 王晓东, 赵军宁, 张白嘉, 等. 药物致早孕大鼠子宫出血模型的建立[J]. 中国药理学通报, 1999, 15(2):182-184. DOI: 10.3321/j.issn:1001-1978.1999.02.025.
- WANG X D, ZHAO J N, ZHANG B J, et al. Establishment of uterine bleeding model by mifepristone and misoprostol in early-pregnancy rats[J]. Chin Pharmacol Bull, 1999, 15(2):182-184. DOI: 10.3321/j.issn: 1001-1978.1999.02.025.
- [17] TSOLOVA A O, AGUILAR R M, MAYBIN J A, et al. Pre-clinical models to study abnormal uterine bleeding (AUB) [J]. EBioMedicine, 2022, 84: 104238. DOI: 10.1016/j.ebiom. 2022. 104238.
- [18] TERKEL J. Neuroendocrine processes in the establishment of pregnancy and pseudopregnancy in rats[J]. Psychoneuroendocrinology, 1988, 13(1-2): 5-28. DOI: 10.1016/0306-4530(88) 90004-2.
- [19] 孔伶俐, 许良智. 青春期排卵障碍性异常子宫出血的诊疗策略[J]. 实用妇产科杂志, 2022, 38(10):731-733.
- KONG L L L, XU L Z. Diagnostic and therapeutic strategies for ovulatory dysfunctional uterine bleeding in adolescence [J]. J Pract Obstet Gynecol, 2022, 38(10):731-733.
- [20] 朱小明, 徐君碧, 何人可, 等. 围绝经期妇女内分泌变化及相关疾病[J]. 山东大学学报(医学版), 2019, 57(2):6-10, 15. DOI: 10.6040/j.issn.1671-7554.0.2018.1459.
- ZHU X M, XU J B, HE R K, et al. Endocrine changes in perimenopausal women and the related diseases[J]. J Shandong Univ Health Sci, 2019, 57(2):6-10, 15. DOI: 10.6040/j.issn.1671-7554.0.2018.1459.
- [21] 李升华, 何涓, 唐健, 等. 自拟加味生化汤联合安宫黄体酮治疗围绝经期排卵障碍性异常子宫出血的临床研究[J/OL]. 中华中医药学刊, 2024:1-7. (2024-08-06)[2025-01-06]. <https://link.cnki.net/urlid/21.1546.r.20240805.1120.004>.
- LI S H, HE J, TANG J, et al. Clinical study of self-made modified shenghua decoction combined with medroxy-progesterone in treatment of patients with perimenopausal abnormal uterine bleeding-ovulatory dysfunction [J/OL]. China Arch Trad Chin Med, 2024:1-7. (2024-08-06)[2025-01-06]. <https://link.cnki.net/urlid/21.1546.r.20240805.1120.004>.
- [22] BRASTED M, WHITE CA, KENNEDY TG, et al. Mimicking the events of menstruation in the murine uterus[J]. Biol Reprod, 2003, 69(4):1273-1280. DOI: 10.1095/biolreprod.103.016550.
- [23] MAYBIN J A, MURRAY A A, SAUNDERS P T K, et al. Hypoxia and hypoxia inducible factor-1 α are required for normal endometrial repair during menstruation[J]. Nat Commun, 2018, 9(1):295. DOI:10.1038/s41467-017-02375-6.
- [24] 郎建霞, 毛晓红, 徐翠萍. 排卵障碍性异常子宫出血患者神经内分泌功能及变化研究[J]. 现代实用医学, 2018, 30(10):1327-1329. DOI: 10.3969/j.issn.1671-0800.2018.10.036.
- LANG J X, MAO X H, XU C P. Research on neuroendocrine function and changes in patients with abnormal uterine bleeding-ovulatory dysfunction [J]. Mod Pract Med, 2018, 30(10):1327-1329. DOI: 10.3969/j.issn.1671-0800.2018.10.036.
- [25] 杨尚芝, 金红, 李娟, 等. 坤泰胶囊联合米非司酮治疗围绝经期异常子宫出血的疗效及对bFGF、VEGF水平的影响[J]. 现代生物医学进展, 2023, 23(17):3320, 3340-3344. DOI: 10.13241/j.cnki.pmb.2023.17.027.
- YANG S Z, JIN H, LI J, et al. Therapeutic effects of Kuntai capsule combined with mifepristone on perimenopausal abnormal uterine bleeding and its influence on bFGF and VEGF levels[J]. Prog Mod Biomed, 2023, 23(17): 3320, 3340-3344. DOI: 10.13241/j.cnki.pmb.2023.17.027.
- [26] MARSH M M, MALAKOOTI N, TAYLOR N H, et al. Endothelin and neutral endopeptidase in the endometrium of women with menorrhagia[J]. Hum Reprod, 1997, 12(9):2036-2040. DOI: 10.1093/humrep/12.9.2036.
- [27] CHODANKAR R, CRITCHLEY H O D. Biomarkers in abnormal uterine bleeding[J]. Biol Reprod, 2019, 101(6): 1155-1166. DOI: 10.1093/biolre/iy231.
- [28] SCHATZ F, GUZELOGLU-KAYISLI O, ARLIER S, et al. The role of decidual cells in uterine hemostasis, menstruation, inflammation, adverse pregnancy outcomes and abnormal uterine bleeding[J]. Hum Reprod Update, 2016, 22(4):497-515. DOI:10.1093/humupd/dmw004.
- [29] MILLING SMITH O P, JABBOUR H N, CRITCHLEY H D. Cyclooxygenase enzyme expression and E series prostaglandin receptor signalling are enhanced in heavy menstruation[J]. Hum Reprod, 2007, 22(5): 1450-1456. DOI:

- 10.1093/humrep/del503.
- [30] MALIK S, DAY K, PERRAULT I, et al. Reduced levels of VEGF-A and MMP-2 and MMP-9 activity and increased TNF-alpha in menstrual endometrium and effluent in women with menorrhagia[J]. Hum Reprod, 2006, 21(8): 2158-2166. DOI: 10.1093/humrep/del089.
- [31] CRITCHLEY H O D, MAYBIN J A, ARMSTRONG G M, et al. Physiology of the endometrium and regulation of menstruation[J]. Physiol Rev, 2020, 100(3): 1149-1179. DOI: 10.1152/physrev.00031.2019.
- [32] ARMSTRONG G M, MAYBIN J A, MURRAY A A, et al. Endometrial apoptosis and neutrophil infiltration during menstruation exhibits spatial and temporal dynamics that are recapitulated in a mouse model[J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 17416. DOI:10.1038/s41598-017-17565-x.
- [33] 于明明, 谢卓, 金华, 等. 孕酮回植通过调节内质网应激诱导的细胞自噬与凋亡阻止小鼠月经发生[J]. 遵义医学院学报, 2019, 42(3):276-281. DOI: 10.14169/j.cnki.zunyixuebao.2019.0057. YU M M, XIE Z, JIN H, et al. Progesterone replantation to prevent menstruation in mice by regulating endoplasmic reticulum stress-induced autophagy and apoptosis[J]. J Zunyi Med Univ, 2019, 42(3): 276-281. DOI: 10.14169/j.cnki.zunyixuebao.2019.0057.
- [34] LI J M, LIAO C C, HUANG H C, et al. Regulation effect and mechanism of Sheng-Hua-Tang on female reproductive system: From experimental transcriptomic analysis to clinical applications[J]. J Ethnopharmacol, 2020, 249: 112431. DOI: 10.1016/j.jep.2019.112431.
- [35] LIU T, SHI F L, YING Y, et al. Mouse model of menstruation: an indispensable tool to investigate the mechanisms of menstruation and gynaecological diseases (Review) [J]. Mol Med Rep, 2020, 22(6):4463-4474. DOI:10.3892/mmr.2020.11567.
- [36] MENNING A, WALTER A, RUDOLPH M, et al. Granulocytes and vascularization regulate uterine bleeding and tissue remodeling in a mouse menstruation model[J]. PLoS One, 2012, 7(8): e41800. DOI:10.1371/journal.pone.0041800.
- [37] PETERSE D, CLERCQ K, GOOSSENS C, et al. Optimization of endometrial decidualization in the menstruating mouse model for preclinical endometriosis research[J]. Reprod Sci, 2018, 25(11):1577-1588. DOI:10.1177/1933719118756744.
- [38] TONG M, KAYANI T, JONES D M, et al. Antiphospholipid antibodies increase endometrial stromal cell decidualization, senescence, and inflammation via toll-like receptor 4, reactive oxygen species, and p38 MAPK signaling[J]. Arthritis Rheumatol, 2022, 74(6):1001-1012. DOI:10.1002/art.42068.
- [39] XU X B, HE B, WANG J D. Menstrual-like changes in mice are provoked through the pharmacologic withdrawal of progesterone using mifepristone following induction of decidualization[J]. Hum Reprod, 2007, 22(12): 3184-3191. DOI: 10.1093/humrep/dem312.
- [40] ZOOK B C, JÄNNE O A, ABRAHAM A A, et al. The development and regression of deciduomas and other lesions caused by estrogens and progestins in rabbits[J]. Toxicol Pathol, 2001, 29(4): 411-416. DOI: 10.1080/01926230152499755.
- (收稿日期:2024-09-05 修回日期:2025-01-07)
(本文责任编辑:张俊彦)

[引用本文]

- 连辉, 姜艳玲, 刘佳, 等. 异常子宫出血大鼠模型的构建与评价[J]. 实验动物与比较医学, 2025, 45(2): 130-146. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.132.
- LIAN H, JIANG Y L, LIU J, et al. Construction and evaluation of a rat model of abnormal uterine bleeding[J]. Lab Anim Comp Med, 2025, 45(2): 130-146. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.132.

华东地区第十七届实验动物科学学术交流会在沪成功举办

2025年4月16—19日,由上海市实验动物学会主办、华东地区兄弟学会/协会协办的第十七届实验动物科学学术交流会在上海召开。大会以“共创实验动物新篇章,赋能生物医药大发展”为主题,吸引了全国800余名专家学者、企业代表及行业管理者参会。

中国实验动物学会常务副理事长秦川教授、上海市科协学会学术部(科技创新服务部)潘祺部长、上海市科委生物技术和医药处陈敦副处长、长三角实验动物创新联盟范春理事长出席会议并致辞。会议特邀中国科学院院士徐国良教授、美国The Jackson Lab专家John Sundberg及国家遗传工程小鼠资源库主任高翔教授作主旨报告,邀请日本Naomi Nakagata教授等7位国内外专家作大会报告。专家们分享了哺乳动物表观遗传、皮肤病理学、实验动物前沿技术和疾病模型研发的最新成果。

交流会共收到来自全国各地的投稿论文272篇,评选出参与专题交流的优秀论文35篇,内容涵盖比较医学研究、实验动物新技术、中医药药理药效、实验动物管理与教学、动物模型与资源等多个专题。此外,会议还设立AI制药及实验动物替代、无脊椎动物模型等特邀报告专题,举办实验动物病理专题学习班及“泓腾杯”乒乓球团体赛,并组织实验动物设施参观考察活动。

闭幕式上,大会表彰了优秀论文作者及乒乓球赛获奖团队,并完成与下一届主办方山东省实验动物学会的会旗交接。

上海市实验动物学会秘书处供稿



顾敏, 医学博士, 苏州大学附属第三医院/常州市第一人民医院口腔科副主任医师, 苏州大学及南京医科大学常州医学中心硕士生导师。中国整形美容协会牙颌颜面医疗美容分会理事, 中国解剖学会整形美容解剖学分会委员, 常州市青年科技人才协会理事、秘书长, 2023年江苏省卫健委江苏-英国国际交流支撑计划项目公派访问学者, 2020年常州市卫生健康青苗工程项目培养人才, 2022年常州市“十四五”卫生健康高层次人才培养工程拔尖人才。目前主持常州市级课题6项, 获得苏州大学教学研究成果奖2项。近5年发表学术论文31篇, 其中以第一作者及通信作者身份发表SCI论文10篇。已授权专利5项, 其中发明专利2项。参编书籍5部, 以副主编身份参编2部, 参译国际正畸学研究生教材 *Orthodontics: Current Principles and Techniques* (第6版)。参加全国性学术壁报交流20次。

基于 16S rRNA 测序的 2 型糖尿病 db/db 小鼠模型口腔菌群差异分析

潘钱家¹, 葛峻沂¹, 胡楠², 华飞³, 顾敏¹

(1. 苏州大学附属第三医院, 常州市第一人民医院口腔科, 常州 213003; 2. 苏州大学附属第三医院, 常州市第一人民医院药学部, 常州 213003; 3. 苏州大学附属第三医院, 常州市第一人民医院内分泌科, 常州 213003)

[摘要] **目的** 研究 db/db 小鼠口腔菌群的变化, 为探寻 2 型糖尿病与口腔微生态的联系提供实验基础。**方法** 选取 8 只 10 周龄雄性 db/db 小鼠为糖尿病实验组, 8 只 10 周龄雄性 db/m 小鼠为正常对照组。适应性喂养 5 d 后, 在相同饲料饲养的第 6 天和第 37 天行尾静脉采血, 测定两组小鼠的空腹血糖 (fasting blood glucose, FBG) 水平和口服葡萄糖耐量 (oral glucose tolerance test, OGTT), 以验证糖尿病模型的可靠性。在相同饲料饲养的第 15 天采集两组小鼠两侧颊黏膜、舌背与舌腹、口底黏膜、上腭硬区黏膜、上下颌牙龈的龈上区域的口腔菌群样本, 提取口腔微生物的基因组 DNA 后, 使用 GeneAmp 9700 热循环仪对其中 16S 核糖体 RNA (16S ribosomal RNA, 16S rRNA) 基因的 V3~V4 区进行扩增, 然后在 Illumina MiSeq 平台上通过双标引扩增和测序对口腔菌群结构进行评估, 然后应用 QIIME (version 1.6.0) 软件进行生物信息学分析。**结果** 实验开始后第 6 天和第 37 天的 FBG 水平和 OGTT 检测结果均显示 db/db 小鼠比 db/m 小鼠表现出明显的 2 型糖尿病症状。 α 多样性分析显示两组小鼠的口腔菌群在多样性上无显著差异 ($P > 0.05$), 而在丰富度上差异显著 ($P < 0.05$)。主坐标分析显示 db/db 小鼠的口腔菌群结构与 db/m 小鼠存在显著差异 ($P < 0.05$), 物种组成分析以及 LEfSe 分析显示 db/db 小鼠口腔菌群在门水平以变形菌门 (p-Proteobacteria) 为主的相对丰度显著上升 ($P < 0.05$), 而在属水平上变形杆菌属 (*g-Proteus*) 和肠球菌属 (*g-Enterococcus*) 的相对丰度极显著上升 ($P < 0.001$)。**结论** 2 型糖尿病 db/db 小鼠的口腔菌群结构和丰富度均较血糖正常的对照小鼠出现了显著变化。

[关键词] 2 型糖尿病; db/db 小鼠; 口腔菌群; 16S rRNA 测序

[中图分类号] Q95-33; R-332 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2025)02-0147-11



Differential Analysis of Oral Microbiota in db/db Mouse Model of Type 2 Diabetes Utilizing 16S rRNA Sequencing

PAN Qianjia¹, GE Junyi¹, HU Nan², HUA Fei³, GU Min¹

(1. Department of Stomatology, The Third Affiliated Hospital of Soochow University, The First People's Hospital of Changzhou, Changzhou 213003, China; 2. Department of Pharmacy, The Third Affiliated Hospital of Soochow

[基金项目] 2022 年常州市“十四五”卫生健康高层次人才培养工程“拔尖人才-顾敏”(KY20221388); 2023 年常州市卫健委科技项目立项项目(青年项目)“类脑仿生深度学习在口腔智齿智能化检测中的高效应用”(QN202310); 2023 年苏州大学研究生教育改革成果奖培育项目“基于循证医学 PICOS 模式的 CBL 在口腔专业研究生培养中的探索应用”(KY20231517)

[第一作者] 潘钱家 (2000—), 男, 硕士研究生, 医师, 研究方向: 口腔菌群。E-mail: 2743297453@qq.com

[通信作者] 顾敏 (1987—), 女, 博士, 副主任医师, 研究方向: 口腔菌群。E-mail: gumin106@163.com。ORCID: 0000-0001-6162-2792

University, The First People's Hospital of Changzhou, Changzhou 213003, China; 3. Department of Endocrinology, The Third Affiliated Hospital of Soochow University, The First People's Hospital of Changzhou, Changzhou 213003, China)

Correspondence to: GU Min (ORCID: 0000-0001-6162-2792), E-mail: gumin106@163.com

[ABSTRACT] Objective To investigate the changes in oral microbiota of db/db mice and provide an experimental basis for exploring the relationship between type 2 diabetes mellitus and oral microecology. **Methods** Eight 10-week-old male db/db mice were designated as the diabetes experimental group (db/db group), while eight 10-week-old male db/m mice were assigned as the normal control group (db/m group). After a 5-day adaptive feeding period, tail venous blood samples were collected on the 6th and 37th days, and fasting blood glucose (FBG) levels and oral glucose tolerance test (OGTT) were performed for both groups to verify the reliability of the diabetes model. On the 15th day of feeding with the same diet, oral microbiota samples were collected from the buccal mucosa, dorsal and ventral tongue surfaces, oral floor mucosa, hard palate mucosa, and the gingival areas of both the upper and lower jaws of the two groups. Genomic DNA from the oral microbiota was extracted, and the V3-V4 regions of the 16S ribosomal RNA (16S *rRNA*) gene were amplified using a GeneAmp 9700 thermocycler. The composition of the oral microbiota was evaluated through double-labelled amplification and sequencing on the Illumina MiSeq platform, followed by bioinformatics analysis using QIIME software (version 1.6.0). **Results** The FBG levels and OGTT results on the 6th and 37th days after the start of the experiment indicated that db/db mice exhibited more pronounced symptoms of type 2 diabetes compared to db/m mice. Alpha diversity (α diversity) analysis showed no significant difference in the diversity of oral microbiota between the two groups ($P>0.05$); however, there was a significant difference in richness ($P<0.05$). Principal coordinate analysis (PCoA) revealed differences in the oral microbiota composition between the db/db group and db/m group ($P<0.05$). Species composition analysis and LEfSe analysis demonstrated that the relative abundance of oral microbiota in db/db group mice, predominantly composed of p_Proteobacteria, increased significantly at the phylum level ($P<0.05$). At the genus level, the relative abundances of *g_Proteus* and *g_Enterococcus* showed a significant increase ($P<0.001$). **Conclusion** The composition and diversity of oral microbiota in db/db mice with type 2 diabetes mellitus significantly differed from those without the disease.

[Key words] Type 2 diabetes; db/db mouse; Oral microbiota; 16S rRNA sequencing analysis

2型糖尿病是因胰岛 β 细胞功能障碍及靶器官胰岛素抵抗导致的以持续性高血糖及长期代谢紊乱为主要病变特征的代谢综合征^[1-2],其病因复杂,包括遗传因素、肥胖和不良生活方式^[3]。2型糖尿病有许多危害,不仅会导致肥胖、动脉粥样硬化性心血管疾病、肌肉减少症,甚至会导致患肥胖相关癌症的风险增加^[4-6]。

构建动物模型可以较好地模拟糖尿病的发生发展过程,是研究糖尿病病理改变、发病机制以及潜在炎症机制的一种重要方式^[7-8]。目前已有多种不同类型的2型糖尿病啮齿类动物模型,根据模型构建的原理不同,大致可分为诱导型、自发突变型和基因工程型这3种类型^[9]。其中,诱导型动物模型以高脂饲料喂养的膳食诱导型与注射链脲佐菌素(streptozotocin,

STZ)的化学药物诱导型为主。高脂饲料喂养诱导法通过饮食引发动物体内糖脂代谢紊乱,降低胰岛素敏感性,从而出现胰岛素抵抗。不同品种品系的小鼠对高脂饮食喂养的反应存在差异,同品种品系的小鼠对高脂饮食喂养的反应也存在一定程度的不同。而且STZ诱导法由于血糖迅速升高,容易导致动物酮症酸中毒而死亡^[10]。此外,通过基因工程制造2型糖尿病动物模型也有耗时较长、对技术设备和饲养环境要求较高等缺点。相比而言,db/db小鼠是由于瘦素受体基因自发性突变而形成的自发性2型糖尿病模型,不需要额外的诱导条件,且表型稳定,能够在不同的实验环境中重复出现。db/db小鼠早期表现为脂质代谢紊乱,血糖、血脂水平显著升高,糖耐量及胰岛素耐量异常,其高血糖水平能够稳定维持,能较好地模拟人类2型

糖尿病胰岛素抵抗的病理进程,是研究2型糖尿病较为理想的模型^[11]。已有研究表明,db/m小鼠与db/db小鼠的背景品系相同,且db/m小鼠的体重和血糖一直处于相对正常的水平^[12]。故本研究选取db/m小鼠作为对照,可以更好地观察db/db小鼠和db/m小鼠在血糖方面的差异。

口腔菌群是机体微生物群的重要组成部分,通过多种机制影响着宿主口腔和全身各系统的健康^[13]。研究表明,口腔菌群与牙周炎、龋病、糖尿病、心血管疾病以及系统性疾病之间均存在一定的关系^[14-16]。也有研究证实,菌群失调相关的牙周炎与糖尿病之间存在一定的双向关系^[17-18]。据文献报告,糖尿病患者中牙周病的患病风险提高了3~4倍,其中血糖未控制的糖尿病患者的牙周病程度更重^[19-20]。因此,深入了解糖尿病与非糖尿病动物之间口腔菌群的差异,对于阐明其双向机制、维护口腔与全身健康具有重要的意义。

本研究以db/db小鼠为糖尿病研究对象,以db/m小鼠为正常对照,通过16S核糖体RNA(16S ribosomal RNA, 16S rRNA)测序技术分析db/db小鼠与正常小鼠口腔菌群的组成与差异,旨在为研究糖尿病与口腔菌群之间的关系提供实验数据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

选取8只品系为BKS.Cg-Dock7^{m+/+}Lepr^{db/m},背景为C57BLKS/J的SPF级10周龄雄性db/db小鼠(作为自发性2型糖尿病模型),以及8只10周龄雄性db/m小鼠(作为正常对照),均购自常州卡文斯实验动物有限公司[SCXK(苏)2021-0013],质量合格证编号为320730240100044946。小鼠由常州市第一人民医院[SYXK(苏)2023-0038]购买,饲养于江苏科标医学技术集团有限公司[SYXK(苏)2021-0013]提供的屏障设施。设施环境由中央空调系统自动控制,温度20~25℃,相对湿度40%~70%,换气次数为15~20次/h全新风,有12h/12h的光/暗循环。每日为动物提供足够的颗粒料和新鲜的饮用水,其中饲料为常规实验室SPF级鼠粮(主要成分为10%水、18%粗蛋白、4%粗脂肪、5%粗纤维、8%粗灰分及各类氨基酸、维生素与矿物质),由江苏科标医学技术集团有限公司提供;饲料及饮水均经过灭菌处理,饮水瓶每周通过高温高压灭菌一次。动物实验经江苏科标医学技术集团有限公司伦理委员会批准后开展,伦理批件号为

IACUC23-0126。

1.2 主要试剂及仪器

一次性无菌鼻咽用尼龙植绒拭子购自广州达佳生物科技有限公司;无菌DNA保存液购自广州市齐云生物科技有限公司(LOT:JR23753A);葡萄糖购自广州泽塔生物科技有限公司;电子分析天平(型号BT25S)为德国Sartorius公司产品;血糖仪及配套血糖试纸(型号ACCU-CHEK Active)为瑞士Roche Diagnostics GmbH公司产品;唾液DNA提取试剂盒购自上海美吉生物医药科技有限公司;JY600C电泳仪购自北京君意东方电泳设备有限公司;GeneAmp 9700热循环仪购自美国Applied Biosystems公司;AxyPrepDNA凝胶回收试剂盒(AP-MN-P-500)购自美国Axygen公司;Miseq基因测序分析仪为美国Illumina公司产品。

1.3 实验分组

参照文献[21]的方法,本实验共纳入16只小鼠,正常对照组为8只db/m小鼠,糖尿病实验组为8只db/db小鼠。两组小鼠不予其他干预,用相同的鼠笼适应性饲养后,定期给予相同的饮水与饲料,直至实验结束。

1.4 小鼠血糖检测

在获取db/db小鼠与db/m小鼠后,对小鼠进行检疫,并进行适应性喂养。小鼠经过5d的适应性喂养后,在实验正式开始时(实验第1天)首先对每一只小鼠采用耳标方式进行标记。在实验第6天与第37天对两组小鼠行尾静脉取血(采血前禁食12h,不禁水),用酒精棉球对鼠尾进行消毒并自然风干,用采血针采集尾尖血液,用血糖仪测量空腹血糖(fasting blood glucose, FBG)浓度。FBG测量全部结束后,用50%葡萄糖水溶液(将无水葡萄糖固体按2g/kg的剂量与生理盐水混合配制而成)对2组小鼠进行灌胃,每只间隔1min,并在灌胃后的0.5h、1h、1.5h、2h检测血糖浓度,进行口服葡萄糖耐量(oral glucose tolerance test, OGTT)分析^[22]。通过观察血糖浓度的变化来评估小鼠的糖代谢能力,OGTT分析2h后血糖<7.8mmol/L说明小鼠对葡萄糖的调节能力正常,而≥11.1mmol/L说明小鼠可能患有糖尿病。

1.5 口腔菌群收集

在实验开始后的第15天^[23],分别对两组小鼠进行口腔菌群的采集。抓取并固定小鼠,用长10cm的无菌小镊子撑开小鼠口腔,随后用直径2mm的一次性无菌鼻咽用尼龙植绒拭子分别收集db/m小鼠和db/db小

鼠的口腔唾液样本, 采样部位包括两侧颊黏膜、舌背与舌腹、口底黏膜、上腭硬区黏膜、上下颌牙龈的龈上区域, 每个部位用同一个拭子刮取3次, 拭子绒毛浸湿样即为采样合格。然后迅速将拭子放置在装有1 mL 无菌DNA保存液的1.5 mL离心管内, 用无菌剪刀剪掉棉签柄, 残留长度不低于离心管长度的1/2, 之后保存于-80 °C冰箱, 并在干冰保存条件下送检。

1.6 细菌基因组DNA提取和16S rRNA illumina测序

根据试剂盒说明书, 使用DNA试剂盒提取口腔微生物总DNA。使用1%琼脂糖凝胶电泳检测基因组DNA完整性。使用GeneAmp 9700热循环仪对细菌16S rRNA基因的V3~V4区进行扩增, 采用的通用引物为338F (5'-ACTCCTACGGGAGGCAG-CAG-3') 和806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3')。PCR产物使用AxyPrepDNA凝胶回收试剂盒进行纯化回收。在Illumina MiSeq平台上通过双标引扩增和测序方法对口腔菌群结构进行评估, 然后应用QIIME (version 1.6.0) 软件进行生物信息学分析: 通过主坐标分析 (principal coordinate analysis, PCoA) 揭示样本间的相似性或差异性, 通过LEfSe分析、门及属水平菌群差异分析揭示样本间的物种差异, 通过 α 多样性分析评估一个特定区域或生态系统内的物种多样性, 通过群落

柱状图分析、相对丰度热图分析对样本的群落组成进行分析。

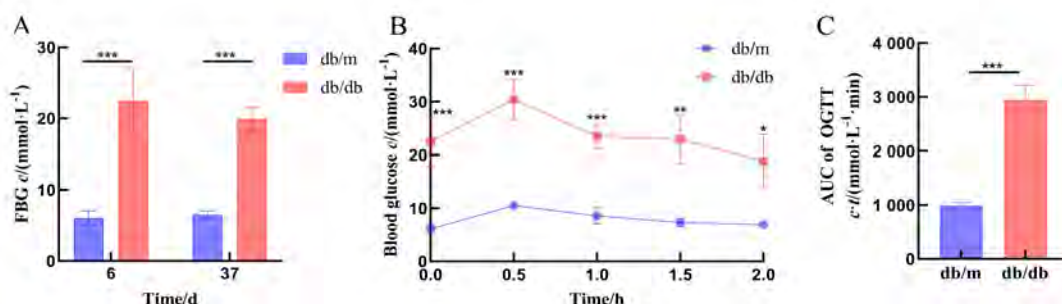
1.7 数据处理及统计分析

采用SPSS软件 (Version 26.0)、GraphPad Prism软件 (Version 9.0) 和R-studio软件 (Version 1.0) 对血糖及测序数据进行统计学分析以及可视化处理。生物信息学分析结果以平均值 $\pm$ 标准差或中位数 (四分位数) 表示, 采用独立样本 t 检验对正态分布的数据进行两组间比较, 采用Mann-Whitney U 检验对非正态分布的数据进行两组间比较。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 db/db小鼠及db/m小鼠的血糖相关指标差异

两组小鼠的FBG和OGTT测定结果表明, db/db小鼠第6天和第37天的FBG浓度都 ≥ 11.1 mmol/L (图1A), 并且第6天的OGTT ≥ 11.1 mmol/L (图1B); 而db/m小鼠的2次FBG浓度均 < 11.1 mmol/L, 且OGTT < 11.1 mmol/L; 同时db/db组小鼠的OGTT试验的曲线下面积显著高于作为正常对照组的db/m小鼠 (图1C)。结果提示, 与db/m小鼠相比, db/db小鼠是2型糖尿病小鼠。



注: A, 禁食12 h的空腹血糖 (FBG) 浓度; B, 0~2 h的口服葡萄糖耐量 (OGTT) 分析; C, OGTT试验的曲线下面积 (AUC)。db/db小鼠为糖尿病实验组; db/m小鼠为正常对照组, 每组8只。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

Note: A, The concentration of fasting blood glucose (FBG) levels after a 12-hour fasting period; B, Analysis of oral glucose tolerance test (OGTT) from 0-2 hours; C, Area under the curve (AUC) of the OGTT. Db/db mice served as the diabetic group, while db/m mice were the normal controls, $n=8$ per group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

图1 db/db小鼠及db/m小鼠的血糖相关指标差异

Figure 1 Comparison of blood glucose indices in db/db mice and db/m mice

2.2 db/db小鼠与db/m小鼠的口腔菌群差异

2.2.1 口腔微生物群的结构分析

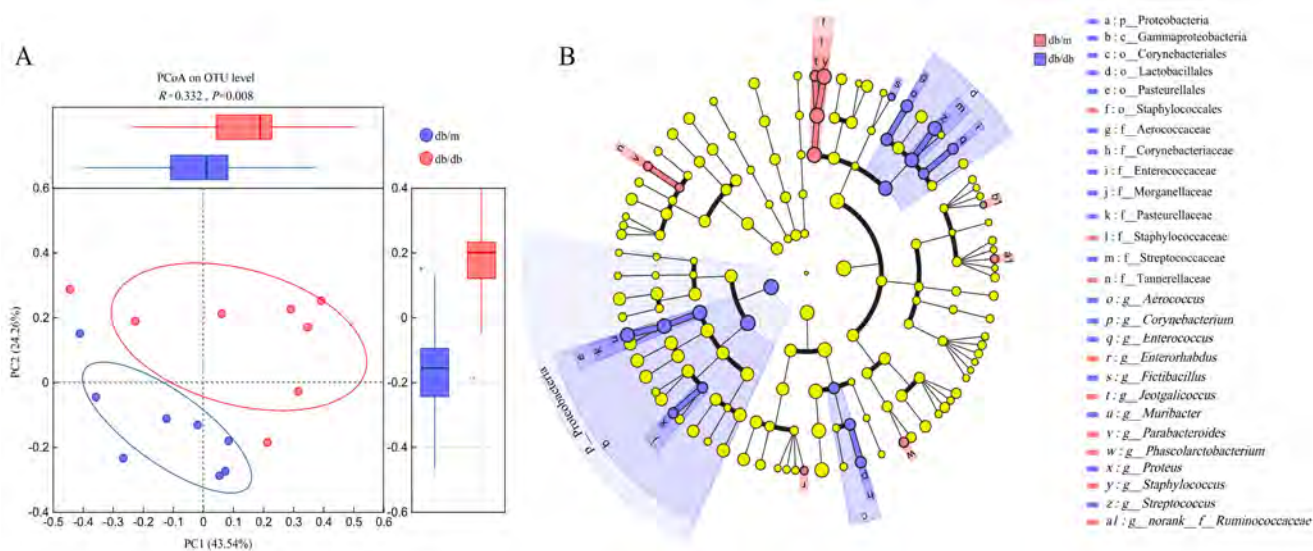
通过针对16S rRNA基因的MiSeq测序分析db/db小

鼠及db/m小鼠的口腔菌群差异, 结果从16份小鼠口腔样本中获得了2 079 122个有效读数。测序序列以97%的相似性聚类为一个种下单元 (operational taxonomic

units, OTU), 保留至少在3个样本中序列数都 ≥ 5 的OTU, 共获得123种OTU。其中db/db小鼠的OTU为 102.30 ± 8.43 , 而db/m小鼠的OTU为 77.25 ± 29.32 , 2组间OTU差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。用R语言 (Version 1) 进行统计分析和作图, PCoA分析中采用bray_curtis的距离算法, 差异检验采用双尾检验, 并用错误发现率 (false discovery rate, FDR) 法进行多重检验校正。db/db小鼠与db/m小鼠的菌落在OTU水平上表现出两组相对离散, 样本距离离散值差异显著, 群落结构发生显著变化 ($P < 0.05$), 第一主成分 (PC1) 和第二主成分 (PC2) 分别解释了43.54%和24.26%的数据变异, 结果如图2A所示。为确定两组群落组成的分类水平, 进行了从门水平到属水平的LEfSe分析 (图2B)。

在db/db小鼠中, 变形菌门 (p_Proteobacteria)、变形菌纲 (c_Gammaproteobacteria)、巴斯德氏菌目 (o_Pasteurellales)、乳杆菌目 (o_Lactobacillales)、棒

杆菌目 (o_Corynebacteriales)、摩根菌科 (f_Morganellaceae)、巴斯德杆菌科 (f_Pasteurellaceae)、气球菌科 (f_Aerococcaceae)、链球菌科 (f_Streptococcaceae)、肠球菌科 (f_Enterococcaceae)、棒状杆菌科 (f_Corynebacteriaceae)、鼠杆菌属 (*g_Muribacter*)、变形杆菌属 (*g_Proteus*)、棒状杆菌属 (*g_Corynebacterium*)、肠球菌属 (*g_Enterococcus*)、链球菌属 (*g_Streptococcus*)、气球菌属 (*g_Aerococcus*)、假芽孢杆菌属 (*g_Fictibacillus*) 富集。而db/m小鼠富集了葡萄球菌目 (o_Staphylococcales)、葡萄球菌科 (f_Staphylococcaceae)、坦纳菌科 (f_Tannerellaceae)、副拟杆菌属 (*g_Parabacteroides*)、嗜冷咸海鲜球杆菌属 (*g_Jeotgalicoccus*)、葡萄球菌属 (*g_Staphylococcus*)、颤螺旋菌科下未分类属 (*g_unclassified_f_Oscillospiraceae*)、瘤胃球菌科下未分类属 (*g_norank_f_Ruminococcaceae*)、肠杆菌属 (*g_Enterorhabdus*)、考拉杆菌属 (*g_Phascolarctobacterium*)。



注: A, db/db小鼠和db/m小鼠之间的主坐标分析; B, 基于LEfSe的支系图是从门级到属级的结果 (p表示门水平, c表示纲水平, o表示目水平, f表示科水平, g表示属水平)。db/db小鼠为糖尿病实验组; db/m小鼠为正常对照组, 每组8只。

Note: A, Principal coordinate analysis (PCoA) between db/db mice and db/m mice; B, LEfSe-derived cladogram showing taxonomic differences from phylum to genus level (p for phylum; c for class; o for order; f for family; g for genus). Db/db mice served as the diabetic model, while db/m mice were the normal controls, $n=8$ per group.

图2 db/db小鼠及db/m小鼠口腔菌群结构的PCoA分析和LEfSe分析

Figure 2 PCoA and LEfSe analysis of oral microbiota composition in db/db mice and db/m mice

2.2.2 口腔微生物群的特征

小鼠口腔微生物群的 α 多样性分析包括物种观测丰富度指数 (species observed richness index, Sobs)、香农指数 (Shannon index, Shannon)、辛普森多样性

指数 (Simpson diversity index, Simpson)、基于丰度的覆盖估计值 (abundance-based coverage estimator index, ACE)、Chao1丰富度估计量 (Chao1 richness estimator, Chao1)和测序覆盖度 (sequencing coverage, Coverage)。

α 多样性分析结果显示, db/db小鼠和db/m小鼠之间的Shannon指数、Simpson指数和Coverage指数均没有显著差异 ($P>0.05$), 而Sobs指数、Chao1指数和ACE指数具有显著差异 ($P<0.05$) (表1), 提示db/db组与db/m组在菌群的多样性上没有显著差异 ($P>0.05$), 而在菌群群落的丰富度上具有显著差异 ($P<0.05$)。

2.2.3 口腔微生物菌群在门水平上的差异

在门水平上对 db/db 组和 db/m 组小鼠口腔微生物群的相对丰度进行统计分析, 结果如图 3A~B 所示。在门水平上, 两组小鼠的口腔微生物群以厚壁菌门 (p_Firmicutes)、变形菌门 (p_Proteobacteria)、放线菌门 (p_Actinobacteriota)、拟杆菌门 (p_Bacteroidota) 为主, 相对丰度均在 1% 以上。与 db/m 小鼠相比, db/db 小鼠的口腔菌群样本中变形菌门的相对丰度显著增加 ($P<0.05$), 其余菌门的相对丰度在两组之间没有明显差异 (图 3C)。

2.2.4 口腔微生物菌群在属水平上的差异

在相对丰度热图中, 显示了小鼠口腔菌群在分类学属水平上总丰度前 50 的详细微生物群组成, 如图 4A 所示。两组小鼠的口腔微生物群在属水平上显示出较大的个体差异, 相对主要的菌属是葡萄球菌属 (*g_Staphylococcus*)、鼠杆菌属 (*g_Muribacter*)、链球菌属 (*g_Streptococcus*)、气球菌属 (*g_Aerococcus*)、棒状

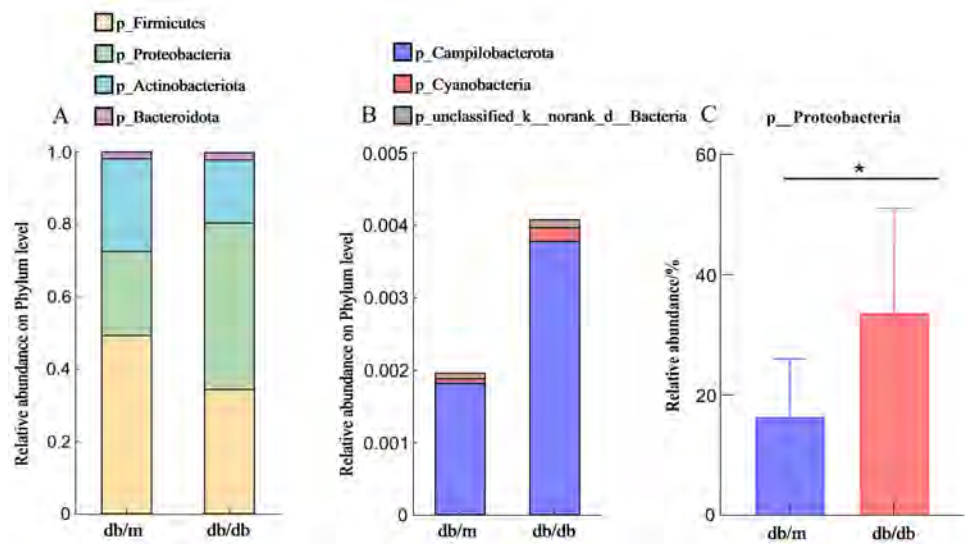
表1 db/db小鼠及db/m小鼠口腔菌群的 α 多样性分析
Table 1 Alpha (α) diversity analysis of oral microbiota in db/db mice and db/m mice

(n=8, $\bar{x}\pm s$)			
指标 Index	db/m	db/db	P value
观察物种指数	10.25±8.43	77.25±29.33	0.049*
Sobs			
香农指数*	2.40 (2.25~2.48)	2.32 (2.23~2.51)	0.529
Shannon*			
辛普森指数	0.18±0.04*	0.16±0.04	0.499
Simpson			
基于丰度的覆盖估计值	105.56±8.34	79.49±30.06	0.045*
ACE			
Chao1丰富度估计量	105.67±9.78	79.25±30.42	0.046*
Chao1			
测序覆盖度	0.999 9	1.000 0	0.458
Coverage			

注: *非正态分布数据用中位数 (四分位数) 法表示。db/db 小鼠为糖尿病实验组; db/m 小鼠为正常对照组, 每组 8 只。两组之间相比, * $P<0.05$ 。

Note: *Non-normally distributed data are presented as median (quartiles). Db/db mice served as the diabetic model, while db/m mice were the normal controls, n=8 per group. * $P<0.05$.

杆菌属 (*g_Corynebacterium*)、嗜冷咸海鲜球菌属 (*g_Jeotgalicoccus*)、肠球菌属 (*g_Enterococcus*)、变形杆菌属 (*g_Proteus*)、副拟杆菌属 (*g_Parabacteroides*)、



注: A~B, db/db组和db/m组口腔微生物在门水平上的群落组成直方图; C, 变形杆菌门的相对丰度。db/db小鼠为糖尿病实验组; db/m小鼠为正常对照组, 每组8只。* $P<0.05$ 。

Note: A-B, Phylum-level community composition of oral microbiota in db/db and db/m groups; C, Relative abundance of p_Proteobacteria. db/db mice served as the diabetic model, while db/m mice were the normal controls, n=8 per group. * $P<0.05$.

图3 db/db小鼠与db/m小鼠口腔微生物菌群在门水平上的差异

Figure 3 Comparison of oral microbiota between db/db mice and db/m mice at the phylum level

瘤胃球菌科下未分类属 (*g_norank_f_Ruminococcaceae*)、肠杆菌属 (*g_Enterorhabdus*) 和假芽孢杆菌属 (*g_Fictibacillus*)。与 db/m 小鼠相比, db/db 小鼠中, 鼠杆菌属、链球菌属、气球菌属、棒状杆菌属、肠球菌属、变形杆菌属和假芽孢杆菌属的相对丰度显著升高 ($P < 0.05$), 其中以变形杆菌属和肠球菌属的相对丰度上升最为显著 ($P < 0.001$), 而葡萄球菌属、嗜冷咸海杆菌属、副拟杆菌属、瘤胃球菌科下未分类属和肠杆菌属的相对丰度显著降低 ($P < 0.05$)。

3 讨论

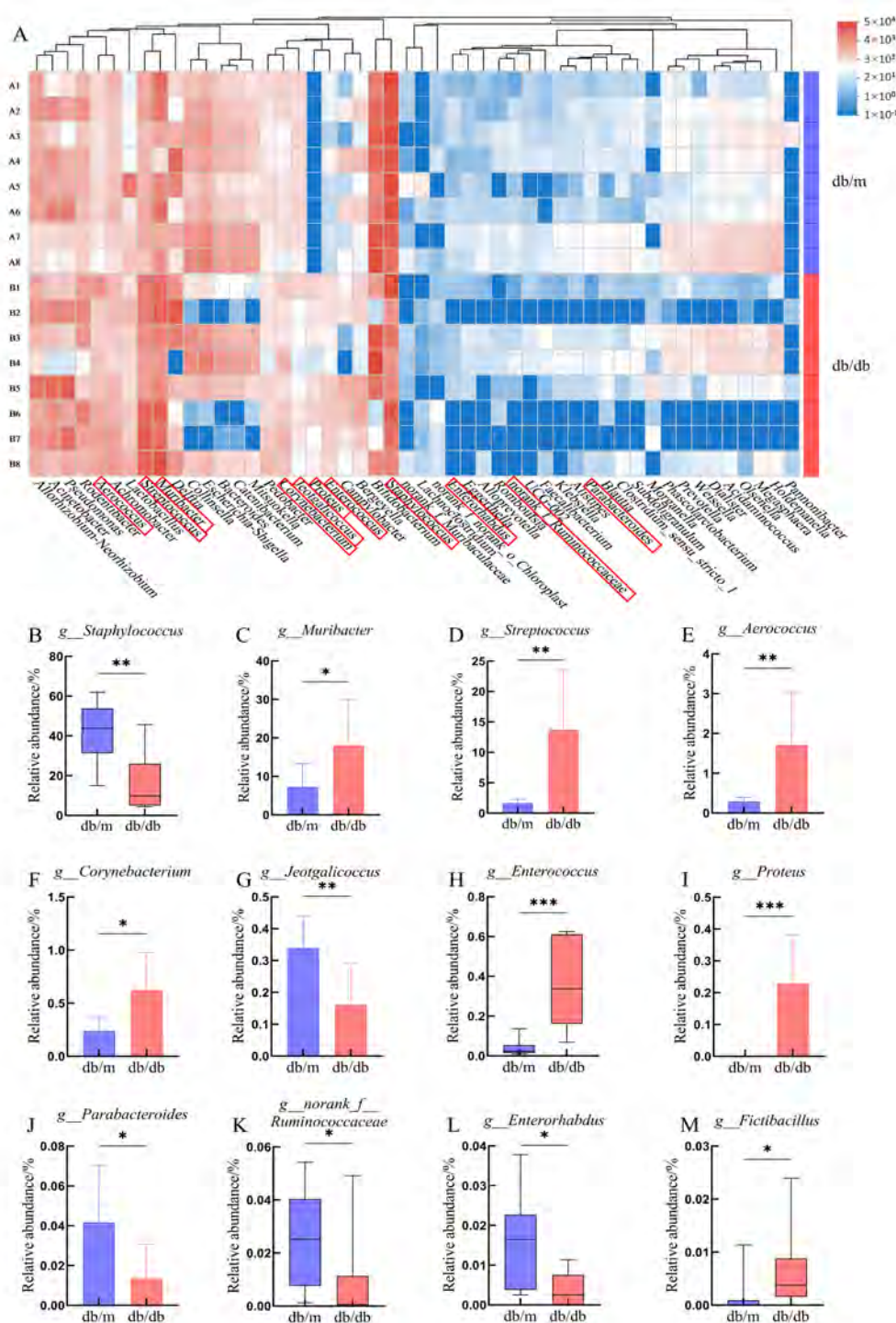
2型糖尿病是一种胰岛素抵抗或分泌不足导致的慢性疾病, 是危害老年人健康的主要慢性疾病之一, 不仅影响着患者的全身健康, 而且呈现逐渐年轻化的趋势。现有的研究表明, 2型糖尿病与心血管疾病、慢性肾病以及口腔疾病的发生发展均有着密切联系^[24-26]。口腔菌群是指以细菌为主的所有口腔微生物群体, 目前通过 16S rRNA 基因测序发现口腔菌群中大约有 700 多种微生物, 其物种多样性与复杂性仅次于肠道微生物群, 是人体第二大微生物群^[27]。口腔健康与全身健康存在着双向关系, 口腔常驻菌群的失衡会对人体全身健康造成影响, 而全身性疾病也会影响口腔健康, 从而导致口腔疾病的发生与发展^[28]。

目前, 许多学者对糖尿病与口腔菌群之间的关系已经展开过部分研究。李宗泽等^[29]通过 16S rDNA Amplicon 测序法分析了 2 型糖尿病患者与正常人群的口腔菌群, 发现两者口腔菌群的丰度及优势菌属差异无统计学意义, 糖尿病患者与正常人群的口腔菌群结构具有相似性, 说明糖尿病导致口腔疾病的发生可能并非特异致病菌所致, 而是高糖环境导致口腔微生态紊乱。程梦蓉等^[30]研究发现, 糖尿病患者较健康人群的口腔微生物数目及物种均匀度无明显差异, 但口腔致病菌 (如普雷沃氏菌、梭杆菌属、消化链球菌属) 的比例增加。Gao 等^[31]从公开数据库的 5 项研究报告中收集了 470 个样本数据, 对其综合分析后发现 2 型糖尿病患者口腔菌群中放线杆菌的数量显著增加, 但其发病机制还需进一步的临床研究。这些研究表明, 2 型糖尿病与口腔菌群的关系密切, 但其具体联系十分复杂, 仍需进一步探索。

动物模型可以较好地模拟疾病的发生发展过程。许多研究者通过构建糖尿病动物模型研究糖尿病与菌群之间的关系。赵玉兰等^[32]发现 db/db 小鼠的血糖升高, 骨强度降低, 且 db/db 小鼠与野生型小鼠的肠道菌

群多样性及特定菌群丰度存在差异, 为研究肠道菌群与糖尿病骨质疏松提供了基础。朱洪杨等^[33]通过小鼠模型研究发现, 葛根可减轻 db/db 小鼠胰岛细胞的炎症损伤, 改善胰岛素抵抗。彭川等^[34]通过 16S rRNA 技术研究蒺藜连丸对 db/db 小鼠肠道菌群的影响, 发现在蒺藜连丸饲喂后 db/db 小鼠的肠道菌群从门到属水平均发生了变化, 有益菌相对丰度增加。刘军等^[35]通过 16S rRNA 基因测序法比较分析了不同品系 1 型糖尿病小鼠的肠道菌群, 发现肠道菌群的组成及比例差异较大, 优势菌群在不同品系小鼠模型中的组成比例发生了改变。目前针对糖尿病而开展的动物模型研究结果多以肠道菌群的改变为主, 而 2 型糖尿病小鼠模型的口腔菌群改变尚待深入研究。

本研究运用 16S rRNA 测序法, 通过菌群的 α 多样性、PCoA 分析、物种组成和 LEfSe 分析探索了 db/m 对照组小鼠和 db/db 糖尿病小鼠的口腔菌群差异。结果表明, 糖尿病小鼠的口腔菌群结构与对照组小鼠存在差异, 两组小鼠的口腔菌群在多样性上无显著差异, 而在丰富度上差异显著。这表明糖尿病小鼠出现了口腔微生态的失衡, 且这种失衡在多样性上无显著差异, 说明并不是外在致病菌定植于口腔内导致的菌群紊乱; 而丰富度的差异则表明, 这种菌群结构的变化是口腔常驻菌群数量的变化所致, 这可能是糖尿病小鼠高血糖的状态改变了口腔内微生态环境导致的变化。有研究发现, 糖尿病患者牙周袋内检测出牙龈卟啉单胞菌、福赛坦氏菌、齿垢密螺旋体、伴放线聚集杆菌等牙周可疑致病菌的数量显著增加^[36], 这也提示糖尿病可能对口腔菌群的组成产生影响。也有学者发现, 伴糖尿病的牙周炎患者的龈下菌群组成不同于不伴糖尿病患者, 而降血糖治疗有利于改变并重建和谐的口腔菌群生态^[37]。口腔微生态失衡与全身健康密切相关, 有研究表明, 口腔微生态的失衡会对糖尿病小鼠的脾脏免疫产生影响^[38], 这说明全身的高血糖状态导致口腔微生态失衡, 在某种程度上能够造成人体免疫力的降低, 从而为机会致病菌提供了致病的可能性。已有文献还表明, 糖尿病状态下口腔内的可疑致病菌增多并富集, 这些可疑致病菌不仅能够通过牙周袋-血液循环途径引起系统性炎症, 进而影响胰岛素信号通路和血糖控制, 还能通过口腔-肠道途径来干扰肠道菌群的稳态, 导致系统性炎症发生和胰岛素抵抗^[39]。这些研究为探索糖尿病与口腔疾病之间的关系提供了思路。与李宗泽等^[29]的研究结果不同, 本研究发现糖尿病小鼠模型的口腔菌群与正常对照组存在着较为明显的差异, 糖



注: A, db/db和db/m组唾液微生物群中50种优势物种的相对丰度热图; B~M, 葡萄球菌属、鼠杆菌属、链球菌属、气球菌属、棒杆菌属、嗜冷咸海鲜球菌属、肠球菌属、变形杆菌属、副拟杆菌属、瘤胃球菌科下未分类属、肠杆菌属、假芽孢杆菌属水平的相对丰度。正态分布的数据由条形图表示, 非正态分布的数据用箱线图表示。db/db小鼠为糖尿病实验组; db/m小鼠为正常对照组, 每组8只。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

Note: A, Heatmap showing the relative abundance of the top 50 dominant species in the saliva microbiota (db/db vs. db/m); B-M, Relative abundance of the following genera: *g_Staphylococcus*, *g_Muribacter*, *g_Streptococcus*, *g_Aerococcus*, *g_Corynebacterium*, *g_Jeotgalicoccus*, *g_Enterococcus*, *g_Proteus*, *g_Parabacteroides*, *g_Ruminococcaceae*, *g_Enterorhabdus*, and *g_Fictibacillus*. Normally distributed data are presented as bar plots, and non-normally distributed data as box plots. Db/db mice served as the diabetic model, while db/m mice were the normal controls, $n=8$ per group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

图4 db/db小鼠及db/m小鼠的口腔微生物菌群在属水平上的差异

Figure 4 Differences in oral microbiota composition between db/db mice and db/m mice at the genus level

尿病小鼠的口腔菌群结构出现了显著变化,在门水平上显示变形菌门丰度上升,而在属水平上以变形杆菌属、链球菌属和气球菌属的相对丰度上升最为显著。其中,变形菌门已经被证实与口腔感染密切相关。这进一步说明,本实验中糖尿病状态造成的以变形菌门丰度升高为主的口腔菌群结构失衡,与口腔疾病的发生发展密切相关。由于变形菌门中的细菌在口腔中常规定植,属于机会致病菌,因此,糖尿病增加其发病机会的机制还需进一步研究。此外,需要说明,菌群分析结果的差异可能与测序方法、样本选择、操作误差等多种因素有关。

综上所述,本研究利用db/db小鼠模型研究了2型糖尿病对口腔菌群的影响,结果显示糖尿病组小鼠的口腔菌群结构在门水平上表现为变形菌门(*p*_Proteobacteria)丰度上升,而在属水平上以变形杆菌属(*g*_Proteus)、链球菌属(*g*_Streptococcus)和气球菌属(*g*_Aerococcus)的相对丰度上升最为显著,提示2型糖尿病小鼠的口腔微生态环境出现了显著变化。深入了解糖尿病与口腔菌群变化的关系,对于阐明其双向机制,促进口腔与全身健康具有重要的意义。本研究探寻db/db小鼠口腔菌群的改变,为研究糖尿病与口腔菌群的关系提供了新的参考。

[医学伦理声明 Medical Ethics Statement]

动物实验方案经江苏科标医学技术集团有限公司伦理委员会审查批准(伦理批件号为IACUC23-0126)。实验遵循GB/T 35892—2018《实验动物 福利伦理审查指南》、GB/T 27416—2014《实验动物机构质量和能力的通用要求》等标准、指南和行业技术规范及科技部《实验动物许可证管理办法》的要求。All animal experiments were approved by the Ethics Committee of Jiangsu Science Standard Medical Testing Co., Ltd. (Approval No. IACUC23-0126) and conducted in strict compliance with GB/T 35892 – 2018 Guidelines for Ethical Review of Laboratory Animal Welfare, GB/T 27416 – 2014 General Requirements for Quality and Competence of Laboratory Animal Institutions, and Measures for the Administration of Laboratory Animal Licenses (Ministry of Science and Technology, China).

[作者贡献 Author Contribution]

潘钱家负责实验方案设计、动物饲养、实验样本收集保存、实验数据分析,并撰写论文初稿;

葛峻沂参与实验动物饲养、样本收集、数据分析及验证;

胡楠参与实验方案的思路和方法设计、实验结果监督与分析;

华飞和顾敏负责对实验的设计与执行进行监督指导,提供实验资源与课题经费支持。

[利益声明 Declaration of Interest]

所有作者均声明本文无利益冲突。

[参考文献 References]

- [1] RUSSO M P, GRANDE-RATTI M F, BURGOS M A, et al. Prevalence of diabetes, epidemiological characteristics and vascular complications[J]. Arch Cardiol Mex, 2023, 93(1): 30-36. DOI:10.24875/ACM.21000410.
- [2] RUZE R, LIU T T, ZOU X, et al. Obesity and type 2 diabetes mellitus: connections in epidemiology, pathogenesis, and treatments[J]. Front Endocrinol, 2023, 14:1161521. DOI:10.3389/fendo.2023.1161521.
- [3] ZHENG Y, LEY S H, HU F B. Global aetiology and epidemiology of type 2 diabetes mellitus and its complications[J]. Nat Rev Endocrinol, 2018, 14(2): 88-98. DOI: 10.1038/nrendo.2017.151.
- [4] ZHANG Y, SONG M Y, CAO Y, et al. Incident early- and later-onset type 2 diabetes and risk of early- and later-onset cancer: prospective cohort study[J]. Diabetes Care, 2023, 46(1):120-129. DOI:10.2337/dc22-1575.
- [5] MARTAGON A J, ZUBIRÁN R, GONZÁLEZ-ARELLANES R, et al. HDL abnormalities in type 2 diabetes: Clinical implications [J]. Atherosclerosis, 2024, 394: 117213. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2023.117213.
- [6] WANG D Y, ZHANG G S, YU Y N, et al. Imaging of sarcopenia in type 2 diabetes mellitus[J]. Clin Interv Aging, 2024, 19:141-151. DOI:10.2147/CIA.S443572.
- [7] DENNIS J M, SHIELDS B M, HENLEY W E, et al. Disease progression and treatment response in data-driven subgroups of type 2 diabetes compared with models based on simple clinical features: an analysis using clinical trial data [J]. Lancet Diabetes Endocrinol, 2019, 7(6): 442-451. DOI: 10.1016/S2213-8587(19)30087-7.
- [8] EDDOUKS M, CHATTOPADHYAY D, ZEGGWAGH N A. Animal models as tools to investigate antidiabetic and anti-inflammatory plants[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2012, 2012:142087. DOI:10.1155/2012/142087.
- [9] 唐艺丹, 王鲜忠, 张姣姣. II 型糖尿病动物模型构建的研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(6):870-876. DOI: 10.3969/j.issn.1005-4847.2020.06.020.
TANG Y D, WANG X Z, ZHANG J J. Research progress in the construction of type II diabetes animal models[J]. Acta Lab Animalis Sci Sin, 2020, 28(6):870-876. DOI: 10.3969/j.issn.1005-4847.2020.06.020.
- [10] 崔淼, 朱春江, 刘向荣. 糖尿病动物模型构建的研究进展[J]. 中国实验诊断学, 2023, 27(2): 227-230. DOI: 1007-4287(2023)02-0227-04.
CUI M, ZHU C J, LIU X R. Research progress on the construction of animal model of diabetes mellitus[J]. Chin J Lab Diagn, 2023, 27(2): 227-230. DOI: 1007-4287(2023)02-0227-04.
- [11] WONG S K, CHIN K Y, SUHAIMI F H, et al. Animal models of metabolic syndrome: a review[J]. Nutr Metab, 2016, 13:65. DOI: 10.1186/s12986-016-0123-9.

- [12] 王松月, 依香叫, 李金诚, 等. 自发性2型糖尿病模型db/db小鼠生物学特性研究[J]. 中国中医基础医学杂志, 2019, 25(7):909-912. DOI: 10.19945/j.cnki.issn.1006-3250.2019.07.019.
WANG S Y, YI X J, LI J C, et al. Biological characteristics of spontaneous type 2 diabetes mellitus model db/db mice[J]. Chin J Basic Med Tradit Chin Med, 2019, 25(7):909-912. DOI: 10.19945/j.cnki.issn.1006-3250.2019.07.019.
- [13] ZHANG Y H, WANG X, LI H X, et al. Human oral microbiota and its modulation for oral health[J]. Biomed Pharmacother, 2018, 99:883-893. DOI:10.1016/j.biopha.2018.01.146.
- [14] 朱双, 汤帅, 丁刚. 口腔菌群与口腔疾病及全身性疾病关系的研究进展[J]. 中国医药导报, 2023, 20(18):35-38. DOI: 10.20047/j.issn1673-7210.2023.18.07.
ZHU S, TANG S, DING G. Research progress on the relationship between oral flora and oral diseases and systemic diseases[J]. China Med Her, 2023, 20(18):35-38. DOI: 10.20047/j.issn1673-7210.2023.18.07.
- [15] MAIER T. Oral microbiome in health and disease: maintaining a healthy, balanced ecosystem and reversing dysbiosis[J]. Microorganisms, 2023, 11(6): 1453. DOI: 10.3390/microorganisms11061453.
- [16] LU Y B, LI Z Y, PENG X. Regulatory effects of oral microbe on intestinal microbiota and the illness[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2023, 13:1093967. DOI:10.3389/fcimb.2023.1093967.
- [17] TANG B Y, YAN C X, SHEN X, et al. The bidirectional biological interplay between microbiome and viruses in periodontitis and type-2 diabetes mellitus[J]. Front Immunol, 2022, 13: 885029. DOI:10.3389/fimmu.2022.885029.
- [18] STÖHR J, BARBARESCO J, NEUENSCHWANDER M, et al. Bidirectional association between periodontal disease and diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis of cohort studies[J]. Sci Rep, 2021, 11(1): 13686. DOI: 10.1038/s41598-021-93062-6.
- [19] BARUTTA F, BELLINI S, DURAZZO M, et al. Novel insight into the mechanisms of the bidirectional relationship between diabetes and periodontitis[J]. Biomedicines, 2022, 10(1): 178. DOI:10.3390/biomedicines10010178.
- [20] SHINJO T, NISHIMURA F. The bidirectional association between diabetes and periodontitis, from basic to clinical[J]. Jpn Dent Sci Rev, 2024, 60: 15-21. DOI: 10.1016/j.jdsr. 2023. 12.002.
- [21] 杨忠良, 王健辉, 刘琳, 等. 实验性牙周炎对小鼠焦虑样行为及肠道菌群的影响[J]. 中华老年口腔医学杂志, 2023, 21(5):257-263. DOI: 10.19749/j.cn.cjgd.1672-2973.2023.05.001.
YANG Z L, WANG J H, LIU L, et al. Effects of experimental periodontitis on anxiety-like behavior and gut microbiota in mice[J]. Chin J Geriatr Dent, 2023, 21(5): 257-263. DOI: 10. 19749/j.cn.cjgd.1672-2973.2023.05.001.
- [22] 刘静, 陆洁, 裴天仙, 等. 基因缺陷型2型糖尿病模型动物db/db小鼠早期生物学特性研究[J]. 药物评价研究, 2013, 36(1):8-12. DOI: 10.7501/i.issn.1674-6376.2013.01.003.
LIU J, LU J, PEI T X, et al. Research on early biological characteristics of gene defect type 2 diabetes model db/db mice[J]. Drug Eval Res, 2013, 36(1): 8-12. DOI: 10.7501/i.issn. 1674-6376.2013.01.003.
- [23] 侯黎光, 叶宇, 苟惠清, 等. A20通过抑制自噬缓解实验性牙周炎牙槽骨吸收[J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2022, 42(4): 476-483, 587. DOI: 10.7655/NYDXBNS20220403.
HOU L G, YE Y, GOU H Q, et al. A20 alleviates alveolar bone loss in experimental periodontitis by inhibiting autophagy[J]. J Nanjing Med Univ (Nat Sci), 2022, 42(4):476-483, 587. DOI: 10. 7655/NYDXBNS20220403.
- [24] KIM K S, HONG S M, HAN K, et al. Association of non-alcoholic fatty liver disease with cardiovascular disease and all cause death in patients with type 2 diabetes mellitus: nationwide population based study[J]. BMJ, 2024, 384: e076388. DOI:10.1136/bmj-2023-076388.
- [25] SEBASTIAN S A, PADDA I, JOHAL G. Cardiovascular-kidney-metabolic (CKM) syndrome: a state-of-the-art review[J]. Curr Probl Cardiol, 2024, 49(2): 102344. DOI: 10.1016/j. cpcardiol. 2023.102344.
- [26] WANG Y Q, ZHU J K, TANG Y, et al. Association between pulp and periapical disease with type 2 diabetes: a bidirectional Mendelian randomization[J]. Int Endod J, 2024, 57(5):566-575. DOI:10.1111/iej.14034.
- [27] NADIA A, HASSAN A, MUSHRIQ A. Oral flora and functional dysbiosis of cleft lip and palate patients: a scoping review[J]. Spec Care Dent, 2023, 44(2):255-268. DOI:10.1111/scd.12872.
- [28] XU J Y, YU L, YE S R, et al. Oral microbiota-host interaction: the chief culprit of alveolar bone resorption[J]. Front Immunol, 2024, 15:1254516. DOI:10.3389/fimmu.2024.1254516.
- [29] 李宗泽, 赵泽, 张文菲, 等. 16S核糖体DNA Amplicon测序法分析2型糖尿病患者口腔微生物多样性[J]. 转化医学杂志, 2017, 6 (3):151-156. DOI: 10.3969/j.issn.2095-3097.2017.03.006.
LI Z Z, ZHAO Z, ZHANG W F, et al. Analysis of oral microbial diversity in patients with type 2 diabetes mellitus by 16S ribosome DNA Amplicon sequencing[J]. Transl Med J, 2017, 6 (3):151-156. DOI: 10.3969/j.issn.2095-3097.2017.03.006.
- [30] 程梦蓉, 秦立果, 姜大昭, 等. β -羟基丁酸对糖尿病患者口腔菌群结构和丰度的调节作用[J]. 中国科技论文, 2020, 15(12):1377-1385. DOI: 10.3969/j.issn.2095-2783.2020.12.006.
CHENG M R, QIN L G, JIANG D Z, et al. Modulatory effect of β -hydroxybutyrate on the structure and abundance of oral microbiota in diabetic populations[J]. China Sci, 2020, 15(12): 1377-1385. DOI: 10.3969/j.issn.2095-2783.2020.12.006.
- [31] GAO C, GUO Y, CHEN F. Cross-cohort microbiome analysis of salivary biomarkers in patients with type 2 diabetes mellitus [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2022, 12:816526. DOI: 10.3389/ fcimb.2022.816526.
- [32] 赵玉兰, 杨艺, 李进涛, 等. 2型糖尿病db/db小鼠骨强度和肠道内容物菌群的变化[J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(6):1-7. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.06.001.
ZHAO Y L, YANG Y, LI J T, et al. Changes of bone strength and gut microbiota in type 2 diabetic db/db mice[J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(6):1-7. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023. 06.001.
- [33] 朱洪杨, 刘烨, 李家荣, 等. 基于肠道菌群分析探讨葛根减轻T2DM db/db小鼠胰岛素抵抗的作用及机制[J]. 中国中药杂志,

2023, 48(17): 4693-4701. DOI: 10.19540/j.cnki.cjcmm.20230418.402.

ZHU H Y, LIU Y, LI J R, et al. Effect and mechanism of Puerariae Lobatae Radix in alleviating insulin resistance in T2DM db/db mice based on intestinal flora[J]. China J Chin Mater Med, 2023, 48(17): 4693-4701. DOI: 10.19540/j.cnki.cjcmm.20230418.402.

[34] 彭川, 胡学芳, 陈正涛, 等. 基于16S rRNA技术研究菱连丸对2型糖尿病db/db小鼠肠道菌群的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29(12): 63-70. DOI: 10.13422/j.cnki.syfjx.20222107.

PENG C, HU X F, CHEN Z T, et al. Effect of Loulianwan on gut microbiota in db/db mice with type 2 diabetes mellitus based on 16S rRNA sequencing technology[J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2023, 29(12): 63-70. DOI: 10.13422/j.cnki.syfjx.20222107.

[35] 刘军, 丁登峰, 高伟, 等. 应用16S rRNA基因测序比较分析不同品系1型糖尿病小鼠肠道菌群的异同[J]. 实验动物科学, 2023, 40(5):24-32. DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2023.05.005.

LIU J, DING D F, GAO W, et al. Use of 16S rRNA sequencing for comparative analysis of gut microbiome in different strains of type 1 diabetic mice[J]. Lab Anim Sci, 2023, 40(5):24-32. DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2023.05.005.

[36] AEMAIMANAN P, AMIMANAN P, TAWEECHAISUPAPONG S. Quantification of key periodontal pathogens in insulin-dependent type 2 diabetic and non-diabetic patients with generalized chronic periodontitis[J]. Anaerobe, 2013, 22: 64-68. DOI:10.1016/j.anaerobe.2013.06.010.

[37] GU M, WANG P P, XIANG S K, et al. Effects of type 2 diabetes and metformin on salivary microbiota in patients with chronic periodontitis[J]. Microb Pathog, 2021, 161(Pt B): 105277. DOI:10.1016/j.micpath.2021.105277.

[38] HE J, SHEN X, FU D, et al. Human periodontitis-associated salivary microbiome affects the immune response of diabetic mice[J]. J Oral Microbiol, 2022, 14(1): 2107814. DOI: 10.1080/20002297.2022.2107814.

[39] 李丽丽, 谢晓婷, 吴贇, 等. 牙周炎与糖尿病关联机制的研究进展[J]. 四川大学学报(医学版), 2023, 54(1):71-76. DOI: 10.12182/20230160203.

LI L L, XIE X T, WU Y, et al. Advances in research on the mechanism of association between periodontitis and diabetes mellitus[J]. J Sichuan Univ (Med Sci), 2023, 54(1):71-76. DOI: 10.12182/20230160203.

(收稿日期:2024-08-21 修回日期:2024-12-24)
(本文责任编辑:张俊彦)

[引用本文]
潘钱家, 葛峻沂, 胡楠, 等. 基于16S rRNA测序的2型糖尿病db/db小鼠模型口腔菌群差异分析[J]. 实验动物与比较医学, 2025, 45(2): 147-157. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.119.

PAN Q J, GE J Y, HU N, et al. Differential analysis of oral microbiota in db/db mouse model of type 2 diabetes utilizing 16S rRNA sequencing[J]. Lab Anim Comp Med, 2025, 45(2): 147-157. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.119.

《实验动物与比较医学》第5届(2024年)优秀审稿人获奖名单

- | | |
|-----------------------------------|--------------------------------|
| 刘月环 杭州医学院（浙江省医学科学院） | 谭 娟 华东师范大学实验动物中心 |
| 杜小燕 首都医科大学基础医学院 | 汤 静 复旦大学附属妇产科医院 |
| 潘学营 上海益诺思生物技术股份有限公司 | 谢淑武 上海实验动物研究中心 |
| 傅江南 暨南大学实验动物管理中心 | 徐汪节 上海交通大学实验动物中心 |
| 李 顺 上海市公共卫生临床中心 | 许彤辉 复旦大学实验动物中心 |
| 刘忠华 华南农业大学 | 郑和平 解放军联勤保障部队第900医院 |
| 沈如凌 上海实验动物研究中心 | 朱 焰 上海市生物医药技术研究院 |
| 郑茂恩 山东第一医科大学实验动物学院 | 何国栋 复旦大学附属中山医院 |
| 刘吉宏 上海开纯洁净室技术工程有限公司 | 刘 真 中国科学院脑科学与智能技术卓越创新中心 |
| 罗小泉 江西中医药大学实验动物科技中心 | 于志锋 上海交通大学医学院附属第九人民医院 |
| 孙德明 国家卫生健康委科学技术研究所 | 唐元家 上海交通大学医学院附属仁济医院 |
| 魏 强 中国医学科学院医学实验动物研究所 | |
| 李文德 广东省生物技术研究院（广东省实验动物监测所） | |
| 和占龙 中国医学科学院医学生物学研究所灵长类研究中心 | |

《实验动物与比较医学》编辑部

啮齿类动物药物成瘾模型的构建方法及应用进展

王碧莹^{1,2}, 鲁家铎³, 管桂影³, 陈若松³, 柴景蕊³, 刘景根⁴, 王瑜琚^{1,2,3}

[1. 烟台大学药学院, 烟台 264000; 2. 烟台新药创制山东省实验室, 中科环渤海(烟台)药物高等研究院, 烟台 264117; 3. 中国科学院上海药物研究所, 上海 200120; 4. 浙江中医药大学, 杭州 310000]

[摘要] 药物成瘾也被称为药物依赖或物质使用障碍, 是一种慢性复发性脑疾病, 其主要特征为强迫性地寻求和使用药物以及失去对用药的控制能力。长期摄入成瘾物质会导致生理和心理上的依赖, 一旦停止使用, 患者便会经历一系列强烈的不适反应, 如焦虑、失眠、恶心、呕吐等, 同时还会产生对药物的强烈渴求。药物依赖分为躯体依赖和精神依赖。躯体依赖也被称为生理依赖, 是指因反复使用成瘾性药物而导致的病理性适应状态, 其在停药后会产生严重的躯体症状, 即戒断综合征。精神依赖也被称作心理依赖, 是指使用者对成瘾性药物在心理层面的渴求, 以获取服药后的特殊快感, 并需要定期或持续使用以维持这种欣快感。成瘾机制复杂, 受到遗传、环境等多种因素的影响, 并涉及记忆、奖赏和决策等高级神经活动。目前在药物成瘾领域仍缺乏有效的治疗手段。面对复杂的成瘾问题, 实验动物研究是不可或缺的。合理运用动物行为模型来模拟人类药物成瘾的情况, 可以促进对成瘾机制和脑科学奥秘的深入探索与研究。本文以啮齿类动物为主, 介绍了与躯体依赖和精神依赖相关的多种动物实验模型, 包括躯体依赖模型、行为敏化模型、条件性位置偏爱模型、药物辨别模型和自身给药模型的构建原理、方法和流程, 同时对比各实验模型的特点, 论述相关模型在揭示成瘾机制方面的适用条件, 旨在为成瘾机制的研究和治疗手段的开发提供支持。

[关键词] 药物成瘾; 啮齿类; 动物模型; 躯体依赖; 精神依赖

[中图分类号] R-332; Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2025)02-0158-09



Establishment Methods and Application Progress of Rodent Models for Drug Addiction

WANG Biying^{1,2}, LU Jiashuo³, ZAN Guiying³, CHEN Ruosong³, CHAI Jingrui³, LIU Jinggen⁴, WANG Yujun^{1,2,3}

(1. School of Pharmacy, Yantai University, Yantai 264000, China; 2. Shandong Laboratory of Yantai Drug Discovery, Bohai Rim Advanced Research Institute for Drug Discovery, Yantai 264117, China; 3. Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200120, China; 4. Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310000, China)

Correspondence to: LIU Jinggen (ORCID: 0000-0002-2869-0029), E-mail: jgliu@simm.ac.cn;

WANG Yujun (ORCID: 0009-0001-9056-9692), E-mail: yjwang@simm.ac.cn

[ABSTRACT] Drug addiction, also referred to as drug dependence or substance use disorder, is a chronic and recurrent brain disease. Its main characteristics are compulsive drug-seeking behavior, continued use of drugs, and a loss of control over intake. Prolonged use of addictive substances can result in both physiological and psychological dependence. When usage is ceased, individuals may experience intense discomfort, including anxiety, insomnia, nausea, vomiting, and a strong craving for the substances. Drug dependence is classified into two types: physical dependence and psychological dependence. Physical dependence describes a pathological state of adaptation that results from the repeated use of addictive

[基金项目] 山东省重点研发计划“重大神经精神疾病关键机制解析及干预新策略研究”(2024CXPT029)

[第一作者] 王碧莹(2000—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 神经精神药理。E-mail: 18993138153@163.com

[通信作者] 刘景根(1958—), 男, 博士, 研究员, 博士生导师, 研究方向: 神经精神药理。E-mail: jgliu@simm.ac.cn。ORCID: 0000-0002-2869-0029;

王瑜琚(1981—), 女, 博士, 研究员, 博士生导师, 研究方向: 神经精神药理。E-mail: yjwang@simm.ac.cn。ORCID: 0009-0001-9056-9692

substances, leading to severe withdrawal syndrome upon cessation. Psychological dependence involves a mental craving for addictive substances, which is needed to experience the specific euphoria that follows consumption. Regular or continuous use is required to sustain these euphoric effects. The mechanisms of addiction are complex and influenced by genetic, environmental, and various other factors. They involve higher-level neurological activities, such as memory, reward, and decision-making. Currently, effective treatment methods for drug addiction are insufficient. Due to the complexity of drug addiction, laboratory animal research is essential. Using animal behavioral models to simulate human drug addiction can enhance our understanding of the mechanisms of addiction. This research offers a comprehensive overview of various animal experimental models that explore both physical and psychological dependence. It includes detailed descriptions of the methods and procedures used to assess physical dependence, behavioral sensitization, conditioned place preference, drug discrimination, and self-administration experiments. Additionally, the characteristics of each experimental model are compared, and the relevance of these models is discussed, aiming to provide support for the research on addiction mechanisms and the development of therapeutic methods.

[Key words] Drug addiction; Rodents; Animal model; Physical dependence; Psychological dependence

药物成瘾, 即药物依赖是一种慢性复发性脑疾病, 其核心特征是对成瘾物质的强烈和持续的渴求以及不可控的使用行为^[1-2]。常见的成瘾性药物分为麻醉类药物和精神类药物两大类: 麻醉类药物包括阿片类、可卡因类、大麻类和氯胺酮等; 精神类药物则包括镇静催眠药、抗焦虑药物(如巴比妥类和苯二氮卓类)、中枢兴奋剂(如苯丙胺类)和致幻剂(如麦角二乙胺)等^[3]。药物依赖通常可以分为躯体依赖和精神依赖, 许多依赖性药物兼具这2种依赖, 例如阿片类药物^[4-6]。然而, 少数药物如致幻剂仅表现出精神依赖而无躯体依赖。常用的躯体依赖模型涉及对实验动物施用一定剂量的药物后进行急性戒断, 以观察其躯体戒断症状, 如跳跃、咀嚼和上睑下垂等。精神依赖的常用模型包括行为敏化、条件性位置偏爱、药物辨别和自身给药实验^[7-9]。本文以啮齿类动物特别是大鼠、小鼠为主, 详细介绍躯体依赖、行为敏化、条件位置偏爱、药物辨别和自身给药这5种药物成瘾模型构建方法及其评价指标, 论述成瘾背后的神经机制。

1 药物成瘾实验动物

在药物成瘾研究中, 常用的实验动物包括大鼠、小鼠、果蝇、豚鼠、斑马鱼及灵长类动物(如猕猴), 其中以大鼠、小鼠和猴最为常见^[7]。在实验动物的饲养环境和福利待遇方面, 所有实验程序和过程必须严格遵守中国《实验动物管理条例》。所有实验动物应被饲养在屏障设施动物房中, 以确保它们拥有充足且健康的食物、饮用水, 以及清洁、舒适的生活环境。在

其生存期间(包括运输过程中), 实验动物应享有基本权利, 免受饥渴、不适、惊恐、折磨、疾病和疼痛, 并确保其自然行为得以实现, 受到良好的管理与照料。在实验动物管理方面, 必须遵循科学合理的操作技术规程, 善待实验动物并尊重其生命。实验应尽可能采取减少痛苦的方法, 避免或减少动物的应激、痛苦和伤害。所有动物实验的方法和目的都应符合人类道德伦理标准和国内标准^[10]。

2 药物成瘾动物模型的分类

2.1 躯体依赖模型

2.1.1 造模原理

躯体依赖是指药物戒断后的1~3周内出现的躯体戒断症状, 这些症状可能在停药后8 h内就会出现。具体表现包括烦躁不安以及自主神经系统紊乱症状, 如多汗、流泪、流鼻涕和肢体颤抖等。在动物模型中, 通常通过递增剂量的吗啡给药后, 以单次注射阿片受体拮抗剂纳洛酮来诱发急性戒断症状, 从而模拟实验动物的急性躯体戒断反应^[11-12]。

2.1.2 造模方法

成年小鼠(以C57BL/6小鼠为例)被分为生理盐水对照组和吗啡戒断组。吗啡戒断组小鼠每天早晚各注射1次吗啡(9:00和17:00), 持续5 d, 并逐日递增剂量, 分别为20、40、60、80、100 mg/kg。第6天早上继续给予100 mg/kg的吗啡, 4 h后注射纳洛酮(10 mg/kg)以诱发戒断症状。随后, 快速将实验动物置于一个圆柱形透明隔离笼中(直径30 cm, 高70 cm)

进行观察,记录在30 min内出现的躯体依赖指标^[13]。

躯体依赖指标包括跳跃、体重减轻、爪颤、湿狗样颤抖、身体伸展、齿颤、体颤、上睑下垂、嗅闻、竖毛、腹泻和咀嚼。其中,跳跃、爪颤、湿狗样颤抖、身体伸展和嗅闻根据发生次数记录;其余指标(体重减轻、齿颤、体颤、上睑下垂、竖毛、腹泻和咀嚼)以每5 min为一个时段记录,若观察期间出现1次或以上记为1,未出现则记为0;在30 min的观察期内,每个指标最多记录6次。对照组在相同时间点以生理盐水代替吗啡和纳洛酮注射,其他实验步骤保持不变。

2.2 动物行为敏化模型

2.2.1 造模原理

大多数精神依赖性药物,如阿片类物质(吗啡、海洛因)、苯丙胺、甲基苯丙胺和可卡因等,均能够引发实验动物的行为敏化(behavioral sensitization),表现为实验动物行为增加和兴奋性增强^[14-17]。这种现象也被称为反向耐受现象^[8],即反复给予相同剂量的精神类药物,不仅没有导致实验动物产生耐药性,反而增强了药物的效应。研究表明精神类药物(如吗啡)引起的行为敏化与腹侧被盖区(ventral tegmental area, VTA)介导的多巴胺释放增加密切相关^[18]。

2.2.2 造模方法

造模通常分为3个阶段:形成期、转换期和表达期。在实验开始前,成年小鼠(体重为18~20 g)需提前在屏障设施内饲养1周以适应环境,从而避免实验过程中出现应激反应。形成期每天为小鼠皮下注射10 mg/kg的嗎啡,持续5~7 d;转换期停药3~7 d(若需可延长停药时间),以促进敏化行为的形成;表达期给予实验动物相应的应激刺激或药物,以激发行为敏化反应。

行为敏化的动物主要表现为在狭窄空间内的活跃度增加。整个实验过程使用自发活动模型进行测试,主要观察指标为动物自发活动的增加。同时,行为敏化的动物也可能表现出刻板行为,如齿颤、爪颤、摇头或咀嚼。因此,需要从不同方面综合判断,以确认行为敏化的程度和表现。

2.3 条件性位置偏爱模型

条件性位置偏爱(conditioned place preference, CPP)模型是一种经典的动物实验模型,用于评估药物的精神依赖性^[19]。尽管该模型在临床和药理学研究中缺乏直接的人类试验数据支持,并且在造模过程中存在动物只能被动接受药物强化,无法体现主动觅药

行为的特征,同时暴露出对药物剂量变化敏感性不足的缺陷,但因其试验周期短、操作简便且成本低廉等优势,自1980年以来,该模型仍在药物滥用研究领域得到了广泛应用。CPP模型不仅用于研究成瘾机制,还可用于戒毒药物的开发,并在初步探索神经精神疾病药物的成瘾风险方面发挥重要作用^[20-21]。

2.3.1 造模原理

CPP的基本原理基于巴甫洛夫条件反射理论,通过将药物奖赏刺激与一个原本不具奖赏特性的环境条件建立关联,在经过训练后,使模型动物即使在没有药物奖赏刺激的情况下,该环境条件仍能引发其对该环境的偏好^[22-23]。实验设备通常由2~3个箱体组成,有时也会使用更多箱体的模型^[24]。每个箱体的环境特征明显不同,如灯光颜色、墙壁颜色和地板材质等,以便动物将这些不同的环境线索与药物奖赏刺激条件联系起来。

2.3.2 造模方法

CPP模型常用双箱体设备进行造模。给药途径不受限制,可根据药物特性选择不同的给药方式,如腹腔注射、静脉注射、皮下注射或灌胃,使其与人类的给药方式一致。实验分为前测、训练和测试3个阶段。在实验开始前,实验动物需在屏障设施中饲养约1周,以适应环境,减少应激反应和实验误差^[25-26]。

前测阶段:移除两箱体之间的隔板,让成年小鼠在两个箱体间自由穿梭15 min,记录其在不同箱体中的停留时间。剔除在任一箱体中停留时间少于180 s的动物,并将停留时间在450~720 s的箱体定义为动物的“非伴药箱”,另一箱体则为“伴药箱”。前测阶段根据动物种类和时间不同,通常持续1~3 d,每日1次,每次10~15 min。

训练阶段:在两箱体间放置隔板,使动物只能在指定箱体中活动。动物经皮下注射吗啡后,将其置于伴药箱内停留40~50 min;之后,动物腹腔注射生理盐水,并被置于非伴药箱内停留相同时间。伴药箱和非伴药箱的训练可在同1 d进行,但需间隔5 h以上或隔天进行。训练通常持续4~8 d。

测试阶段:在训练阶段结束后24~48 h进行测试,移除两箱体之间的隔板,将经过训练的动物不加任何处理放入试验箱内,使其在两个箱体间自由穿梭15 min,记录动物在每个箱体的停留时间。通常测试仅进行1次。

观察指标:主要为动物在伴药箱的停留时间,即

伴药箱测试时间。如果伴药箱测试时间显著增加,表明受试药物具有奖赏作用,动物对其产生依赖。在前测阶段,动物在伴药箱的停留时间为伴药箱前测时间。条件性位置偏爱值为常用评价指标,反映训练前后动物在伴药箱内停留时间的变化,其计算公式为:条件性位置偏爱值(s)=伴药箱测试时间-伴药箱前测时间。

2.4 药物辨别模型

药物辨别实验(drug discrimination experiment)是一种行为药理学实验,用于评估测试药物的主观效应是否与已知的滥用药物(即训练药物)相似。通常选择具有已知依赖性 or 滥用倾向的药物(如可卡因、甲基苯丙胺)作为训练药物进行建模,然后用不同剂量的待测药物进行替代测试,以评价待测药物是否能引发与训练药物类似的行为反应。踏板反应百分比通常指的是动物在药物辨别实验中对特定踏板(或杠杆)的按压反应比例,用于评估动物对训练药物的辨别能力以及测试药物的药理学特性。根据美国食品药品监督管理局的指导原则,如果待测药物能够完全或部分替代(即按压待测药物对应踏板的百分比为20%~80%)训练药物,则该药物可能具有滥用潜力。然而,只有当正确踏板反应百分比达到或超过60%时,才能表明待测药物与训练药物具有相似的主观效应,可能属于同类药物。

2.4.1 造模原理

该模型基于动物辨别训练药物诱导的内感受线索是否存在的能力。内感受线索是指来自身体内部的生理信号或感觉,这些信号通过神经系统传递到大脑,并影响认知、情绪和行为。此模型通过根据动物的操作反应提供强化(通常是食物或水)来评估这种辨别能力。给药后,动物需要作出一种反应;而给予安慰剂后,动物则需要作出另一种反应。一旦动物学会这种辨别后,就可通过研究2种反应方式的反应分布差异,来检测其他药物引起的内感受线索的相似性。泛化是指从已知信息或经验中提取规律,并将其应用到新的、未见过的语境或数据中的能力。当动物按压与训练药物相关的踏板(或杠杆) $\geq 80\%$ 时,认为受试物与训练药物“完全泛化”;当动物按压与训练药物相关的踏板(或杠杆) $< 20\%$ 时,则为“无泛化”;二者之间为“部分泛化”。在这些泛化测试过程中,任何一种反应都不会得到强化,以提供公正的偏好测量。

2.4.2 造模方法

食物训练:在食物训练开始之前,将成年SD大鼠禁食约18 h,以提高动物的活动探究能力,从而提高食物训练的成功率。食物训练每天进行1次,每次实验持续30 min或获取50次食物奖励后结束。训练期间,实验箱内的左右踏板均为有效,大鼠踩踏左踏板或右踏板均可获得食物奖励。训练以固定比率(fixed-ratio, FR)1(FR1)开始。实验启动后,实验箱中的踏板伸出,左右踏板上方的刺激灯亮起,房灯熄灭,此时大鼠踩1次左踏板或右踏板即可获得1次食物奖励,同时刺激灯熄灭,房灯亮起,2 s后刺激灯再亮,房灯熄灭,进入下一轮奖励。如果大鼠能在连续2 d,每天的30 min内获取50次奖励,则FR值增加1(即获取1次食物奖励所需的踏板次数增加1)。每次实验结束后,记录FR值、总奖励次数、总有效踏板次数、左踏板次数和右踏板次数。如果在FR10(动物连续鼻触10次后获得药物)的条件下,动物能在连续2 d,每天的30 min内获取50次食物奖励,则视为食物训练成功。未成功的动物可以选择继续训练或淘汰,而成功的动物可选择继续强化训练。

辨别训练:食物训练成功的大鼠进入辨别训练,用于辨别可卡因(10 mg/kg)和生理盐水注射液。训练每天进行1次,训练开始前15 min,给大鼠腹腔注射可卡因(10 mg/kg)或生理盐水注射液,每次训练30 min或获得50次食物奖励后结束。辨别训练以6 d为1个训练周期,前2 d给予生理盐水注射液,接下来的2 d给予可卡因,然后再分别给予生理盐水和可卡因。设置当给予可卡因时左踏板为正确踏板,而给予生理盐水时右踏板为正确踏板。辨别训练从FR1开始,即给予可卡因或生理盐水后,大鼠踩1次正确踏板获得1次食物奖励。若大鼠在连续6 d中有5 d总正确踏板反应百分比 $\geq 80\%$,则FR值增加1。实验中发现90%的大鼠能达到这一标准,因此FR值按1、2、4、6、10的顺序递增。当大鼠在FR10条件下,连续10 d中有8 d满足以下标准,则辨别训练视为成功:(1)第1次食物奖励前的正确踏板反应百分比 $\geq 80\%$;(2)总正确踏板反应百分比 $\geq 80\%$;(3)总奖励次数 ≥ 35 。可卡因踏板反应百分比的计算公式为(正确踏板次数/总踏板次数) $\times 100$,反应率为总踏板次数除以所用时间。

替代测试:成功完成药物辨别训练的动物进入替代测试阶段,从低剂量到高剂量(0、0.1、0.5、1.25、2.5、5、10 mg/kg)的可卡因进行替代实验。即使用生

理盐水和可卡因各进行1 d的辨别训练,在达到辨别训练成功标准后进行某一剂量可卡因的替代。替代完成后,再进行1 d可卡因和1 d生理盐水的辨别训练,训练成功后进行下一个剂量的可卡因替代,如此循环直至全部剂量替代完成。实验以大鼠获得1次食物奖励或实验时间达到30 min为结束。未达到辨别训练成功标准的动物可以选择继续训练直到达到标准,或者当替代前2 d内有超过70%的动物满足标准时,所有动物进行替代测试(未满足标准的动物仍可参加替代但不计入该剂量的统计中)。1周内最多进行2次剂量替代实验。所有药物给药均在实验开始前15 min进行腹腔注射^[27-28]。

2.5 自身给药模型

2.5.1 造模原理

自身给药(drug self-administration, DSA)技术最早可追溯到1940年,当时Spragg利用黑猩猩研究吗啡的依赖性^[14]。随着1960年代自动静脉注射技术的发展,自身给药实验得到了广泛应用。这类实验本质上是操作性条件反射(操作式条件化),旨在建立动物的操作行为与享受奖赏物质或成瘾药物快感之间的联系^[29-30],从而很好地模拟人类的自发觅药和复吸行为^[31]。自1960年代以来,自身给药模型已成为研究药物依赖的应用最广泛的动物模型之一^[32]。在这些实验中,大鼠和猴通常被用作实验对象。

2.5.2 造模手术流程

SD大鼠颈动脉插管手术:术前准备足够的无菌手术器械,确保工具始终无菌。为实验动物使用适量麻醉药和镇痛药,剃除大鼠背部和右颈部毛发并彻底消毒。在右颈部剪开约0.5 cm的纵向切口,末端接近锁骨中线,分离右颈静脉并用缝合线结扎远端。在大鼠背部肩胛骨中心皮肤剪开约2 cm切口,通过镊子将导管从背部皮下引至颈部切口处,将导管插入右颈静脉并缝合固定。缝合皮肤切口,并再次消毒。术后需连续3 d用导管注射抗生素以防感染,伤口需7 d恢复。从术后第2天起至实验结束,每天通过导管给予0.2 mL无菌肝素钠(2 mg/mL),检查导管,保持导管通畅以确保其正常使用。

2.5.3 造模实验设备

大鼠的自身给药行为训练在经典的操作式训练箱中进行。训练箱为一立方体(30 cm×30 cm×30 cm),地板由间距1 cm的金属横杆组成。右侧箱体上方设有蓝色房间灯,右侧底部有两个鼻触孔。药物通过恒速注射泵输送至箱体内部。箱体的数据采集卡通过数据

线连接至计算机控制软件。在两个鼻触孔中,左鼻触孔为有效鼻触孔,内设橙色线索灯;当动物接触该孔时,线索灯亮起持续20 s,同时蓝色房间灯熄灭20 s,且注射泵伴随线索声完成1次药物注射,此过程由软件记录。鼻触有效孔后,系统进入20 s不应期,此期间再触有效孔不会触发光声变化,也无法进行药物注射,但行为仍被记录。右鼻触孔为无效孔,触碰此孔既不会引发灯光变化,也无法获得药物注射,但行为将被软件记录。

2.5.4 造模训练模式与训练程序

自身给药实验采用颈静脉给药法^[29]。实验大鼠在屏障设施中饲养,并提前3 d进行环境适应,以减少实验过程中应激反应对结果的影响。自身给药操作主要包括鼻触和按压杠杆2种模式。鼻触模式通常包括2种训练程序:FR和累进比率(progressive-ratio, PR)。FR模式:在此模式中,鼻触次数与给药次数比率恒定。只要动物完成预定次数操作,即可获得药物^[30]。PR模式:在此模式中,操作次数随每次给药而增加。第 n 次药物注射所需鼻触次数计算公式为: $5e^{0.2n}-5$ ^[31-32],式中, e 表示自然对数的底数。

FR1程序:在训练箱中采用FR1模式进行自身给药行为训练,以建立海洛因自身给药模型^[30]。在此模型中,实验动物每次鼻触有效孔即可获得1次药物注射,且两次注射间有20 s不应期。整个训练持续12 d,前6 d每次注射剂量为100 mg/kg,后6 d减少至50 mg/kg,动物表现出显著的剂量依赖性,鼻触次数和给药次数明显增多。当药物注射次数达30次或训练时间达3 h,训练结束。在每次训练前,通过静脉给药抗生素以防感染,并检查插管通畅性,排除插管损坏的动物。每次训练结束后,通过导管给予动物0.2 mL肝素钠(2 mg/mL),防止插管堵塞。

PR程序:训练分为3个阶段。第1阶段采用FR1程序连续训练3 d,每天3 h,然后调整为FR2(动物连续鼻触2次后获得药物)程序,再次连续3 d训练,每天3 h。第2阶段使用FR5(动物连续鼻触5次后获得药物)程序训练,直至动物每日给药次数稳定3 d内波动小于10%,每次训练持续3 h。第3阶段采用PR程序训练,鼻触次数计算公式为 $NP(n)=5e^{0.2n}-5$,式中, $NP(n)$ 表示鼻触次数, n 代表实验次数, e 表示自然对数的底数,训练直至每日给药次数稳定(3 d内波动小于2次)。当动物连续1 h未获得下次药物注射,或训练时间达5 h,此时的给药次数即为断点值(break point),用以反映动物的觅药动机水平^[30-33]。

3 不同成瘾动物模型的特点及应用

躯体依赖模型主要用于评估药物是否会导致依赖性,即在长期反复用药后,突然停药是否会出现戒断症状。这类评估可以整合在重复给药毒性试验中进行,也可以单独进行。该模型的特点是实验周期短、操作简单且经济实惠。不同药理性质的药物通常会产生不同的戒断症状,通过该模型的行为学指标可以准确地反映戒断症状。

行为敏化模型反映了药物奖赏效应引起的神经系统发生一系列适应性改变后,对药物及相关刺激的反应性增强。这是一种逐渐增强并持久的行为反应过程。该模型不仅能从行为学角度提供支持,还是评估精神活性物质滥用与依赖潜力的重要工具。该模型的特点是操作简便、实验周期短,尤其是单次给药的行为敏化动物模型,实验数据的离散程度较小,结果稳定且可重复性高。与其他成瘾模型相比,行为敏化最显著的特点是其长期存在性。

CPP是评估药物精神依赖性的常用实验动物方法之一,为临床研究提供了丰富的指导性数据。在该实验中,实验动物对某一箱体的自发偏好能解释实验结果时具有关键作用。动物对药物偏好的分数代表了药物精神依赖性潜力的大小,也反映了动物对该药物成瘾的可能性。此方法多用于研究药物的奖赏效应及潜在成瘾性,同时有助于探索涉及奖赏的神经回路。这些研究结果有助于揭示药物成瘾过程中条件性刺激、环境记忆和奖赏系统间的相互作用。该模型设备简便,实验周期短,动物不受操作和运动方式的影响,不会因药物测试后干扰运动机能而影响结果,其最大优点在于既能测出药物的奖赏效应,也能检测其厌恶效应。

药物辨别模型广泛用于理解滥用药物潜在主观特性的机制,即能否导致机体辨别或区分2种或多种药物的差异感受,从而产生不同的行为反应。该模型在药理学上具有较强选择性,表现出良好的类别特异性,用于研究具有辨别刺激效应的药物在多个药理学问题上的应用,如不同给药途径的效应、剂量效应、药效持续时间、药物相似度及立体结构、结构活性关系、代谢物活性等。此外,还可用于筛选与训练药物具有相似机制的药物,或排除具有滥用潜力的药物。

自身给药模型模拟的是实验动物的寻药行为,因为该行为在该模型中是自发性的,故其被认为可以更好地模拟人类的成瘾渴求行为。通过该实验,研究者

不仅可以评估药物的精神依赖性,还能揭示其神经依赖机制,建立复吸模型,为临床戒毒提供科学依据。自身给药模型涵盖了药物成瘾的全过程,即形成阶段(偶然用药、规律用药和强迫用药)、戒断和消退阶段、复吸阶段。许多成瘾性药物均能诱导动物建立自身给药行为,模拟成瘾者主动觅药和用药行为。实验中的动物复吸行为可以很好地模拟成瘾者在长期戒断后,受条件性线索或熟悉环境诱导重新用药的情形。该模型符合以下3项:预测效度,能够预测成瘾剂量和相关特征(如渴求程度、戒断症状等);表观效度,用药及觅药行为与人类相似;结构效度,动物成瘾原因及病程进展情况与人类相似。该模型的显著特点是实验动物可通过特定的自主行为操作(如压杆或鼻触)自主获取药物。

除上述核心模型外,还有其他模型如跑道模型和颅内自刺激模型等^[34]。这些模型可从不同角度评估成瘾性药物对动物的影响。研究者可结合具体实验要求进行选择,并根据实际情况调整实验参数或使用多种动物模型,以达到客观评价的目的。

4 动物模型用于药物成瘾机制研究进展

成瘾模型揭示了成瘾行为的规律,而药物成瘾作为一种典型的成瘾形式,其机制更为复杂。多巴胺(dopamine)和成瘾密切相关。成瘾性物质通过激活中脑边缘多巴胺系统大量释放多巴胺,使大脑的奖赏机制异常活跃,从而导致人产生欲望和快感最终导致成瘾^[35]。目前公认的奖赏通路由中脑-边缘-皮质多巴胺系统构成,这一通路起始于中脑VTA的多巴胺神经元,其神经纤维通过内侧前脑束投射至伏隔核(nucleus accumbens, NAc)、海马内侧前额叶皮层(hippocampal-medial prefrontal cortex)和杏仁核(amygdala)等脑区,是调节奖赏效应的重要通道。研究表明,各类成瘾性物质都能直接或间接激活这些奖赏中枢,诱导多巴胺浓度升高,产生奖赏效应。伏隔核是产生欣快感的核心,其多巴胺浓度上升与奖赏直接相关。通过VTA到伏隔核的途径可以增加多巴胺的传递,介导药物滥用的急性奖赏效应及与奖赏相关的慢性变化^[36-38]。同时,海马与伴随欣快感的时间及环境空间记忆密切相关。此外,内侧前额叶皮层到背侧中脑导水管周围灰质(dorsal periaqueductal gray matter)的途径在强迫性用药行为中发挥重要作用^[39];杏仁核通过与纹状体核(bed nucleus of stria terminalis)的互作,参与成瘾记忆

和应激诱导的复吸,在不同药物类别的应激诱导的药物渴求中扮演重要角色^[40];外侧缰核(lateral habenula)则在药物戒断后的负性情绪中起关键作用^[41]。这些脑核团均接受来自VTA的多巴胺投射,当VTA的多巴胺神经元被激活时,这些脑区的多巴胺浓度便会上升,从而进一步形成与药物奖赏相关的关联性记忆,最终导致强迫性用药行为和成瘾的形成。

近年来新的成瘾机制和相关神经环路的发现不断揭示出成瘾行为的复杂性和多样性。这些发现强调了不同脑区和神经递质在成瘾过程中的协同作用。例如,丘脑室旁核(thalamic paraventricular nucleus)通过投射到杏仁核中央核(central nucleus of amygdala, CeA)和NAc,协调阿片类药物相关记忆的获取和维持^[42]。伏隔核核心(NAc core)与腹侧海马CA1区(ventral hippocampal CA1 region, vCA1)回路在可卡因的CPP中发挥重要作用。可卡因复吸需要CA1-伏隔核核心通路的参与,可卡因能够改变vCA1与NAc核心记忆痕迹细胞的神经可塑性,强化其间的兴奋性突触连接^[43]。该研究从全新的角度揭示了一条特殊的CA1-伏隔核核心印迹细胞神经环路,其中CA1编码不同情景相关的记忆,而伏隔核核心则储存可卡因奖赏相关的记忆。CA1印迹细胞与伏隔核核心中表达多巴胺D1型受体(D1)的印迹神经元形成特定的加强连接,这种突触后连接的加强对于记忆提取至关重要。

此外,5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)对可卡因成瘾的强迫性具有调控作用,5-HT信号通过眶额叶皮质(orbitofrontal cortex, OFC)-纹状体(corpus striatum)通路调控可卡因成瘾^[44],在这项研究中揭示了一种可卡因在大脑中特有的作用机制,这种机制的特殊性在于,除了引发所有毒品摄入都会增加的多巴胺外,还会引发5-HT的大量增加。事实上,5-HT对多巴胺引起的奖励系统的过度兴奋起着内在的制动作用。

5 总结与展望

药物成瘾作为慢性复发性的神经精神类疾病,与肿瘤、心血管等疾病不同,其发病机制和诊疗方法具有特殊性^[45]。因此,研究并建立具有高临床特征稳定可靠的动物模型,已成为探索此类疾病的关键环节。由于单一的成瘾模型只能反映成瘾过程中的某个特定阶段的特征,因此药物成瘾需要在多种模型中进行相互验证,才能全面、系统地揭示其行为药理学和神经

生物学基础。未来,完善药物成瘾的临床前动物模型不应仅限于药物强化或神经生物学适应性研究,还包括通过反复接触成瘾性药物(长时间用药)以模拟成瘾患者的强迫性用药特质,这是各类诊断体系标准所强调的关键特征。唯有多管齐下,优势互补,才能深入理解成瘾的病因和病理生理学,并提供新见解。此外,研究者应根据具体实验情况调整实验参数,以更客观地评估药物的成瘾特性。多方位的方法和研究为理解和克服成瘾行为提供了重要的科学基础。

近年来,神经影像学技术的飞速发展使在动物活体内进行无创、连续的动力学研究成为可能。这一发展使得从整体、细胞、分子乃至功能等不同层面深入研究参与成瘾的特定脑区和核团成为可能。将成瘾模型与脑影像学结合,研究者可以最大限度地模拟并观察成瘾、戒断、复吸全过程中大脑结构和功能的变化^[46],这已成为当代成瘾研究的热点之一。目前,神经影像技术常用的方法包括单光子发射计算机断层显像(single photon emission computed tomography)、正电子发射断层显像(positron emission tomography)和功能磁共振成像(functional magnetic resonance imaging)等^[47]。这些方法主要用于分析脑的解剖结构、脑内神经递质水平的变化、受体数量及其亲和力的变化,以及相应脑区的激活状态(如血流量或新陈代谢情况)。随着神经影像技术的发展和分辨率的提高,成瘾模型的脑影像研究必将在成瘾治疗方法、药物开发及机制研究中发挥更为重要的作用。

[作者贡献 Author Contribution]

王碧莹负责调查研究、提供资源、写作初稿;
鲁家铄、管桂影、陈若松、柴景蕊负责调查研究、提供资源;
刘景根负责策划方案、审核写作内容;
王瑜珺负责策划方案、获取项目资助、审改写作初稿。

[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] WISE R A, ROBBLE M A. Dopamine and addiction[J]. *Annu Rev Psychol*, 2020, 71: 79-106. DOI: 10.1146/annurev-psych-010418-103337.
- [2] American Psychiatric Association. Diagnostic and statistical manual of mental disorders, fifth edition, text revision (DSM-5-TR™) [M]. Washington DC: American Psychiatric Association Publishing, 2022.
- [3] 韩济生. 神经科学[M]. 3版. 北京:北京大学医学出版社, 2009.
HAN J S. Neuroscience[M]. 3rd ed. Beijing: Peking University

- Medical Press, 2009.
- [4] KIRK-PROVENCHER K T, HAKIMI R H, ANDEREAS K, et al. Neural response to threat and reward among young adults at risk for alcohol use disorder[J]. *Addict Biol*, 2024, 29(2): e13378. DOI:10.1111/adb.13378.
 - [5] NADAL-GRATACÓS N, PAZOS M D, PUBILL D, et al. Structure-activity relationship of synthetic cathinones: an updated review[J]. *ACS Pharmacol Transl Sci*, 2024, 7(9): 2588-2603. DOI:10.1021/acsptsci.4c00299.
 - [6] WANG S C, CHEN Y C, LEE C H, et al. Opioid addiction, genetic susceptibility, and medical treatments: a review[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(17):4294. DOI:10.3390/ijms20174294.
 - [7] SUN T H, WANG C C, LIU T Y, et al. Utility of polygenic scores across diverse diseases in a hospital cohort for predictive modeling[J]. *Nat Commun*, 2024, 15(1): 3168. DOI: 10.1038/s41467-024-47472-5.
 - [8] POHOŘALÁ V, ENKEL T, BARTSCH D, et al. Sign- and goal-tracking score does not correlate with addiction-like behavior following prolonged cocaine self-administration[J]. *Psychopharmacology*, 2021, 238(8): 2335-2346. DOI: 10.1007/s00213-021-05858-z.
 - [9] MURLANOVA K, JOUROUKHIN Y, NOVOTOTSKAYA-VLASOVA K, et al. Loss of astrocytic μ opioid receptors exacerbates aversion associated with morphine withdrawal in mice: role of mitochondrial respiration[J]. *Cells*, 2023, 12(10): 1412. DOI:10.3390/cells12101412.
 - [10] 国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 实验动物 动物实验通用要求: GB/T 35823—2018[S]. 北京: 中国标准出版社, 2018.
General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of China, Standardization Administration of China. Laboratory animals—General requirements for animal: GB/T 35823-2018[S]. Beijing: Standards press of China, 2018.
 - [11] DOWNS A M, MCELLIGOTT Z A. Noradrenergic circuits and signaling in substance use disorders[J]. *Neuropharmacology*, 2022, 208: 108997. DOI:10.1016/j.neuropharm.2022.108997.
 - [12] MONROE S C, RADKE A K. Opioid withdrawal: role in addiction and neural mechanisms[J]. *Psychopharmacology*, 2023, 240(7): 1417-1433. DOI:10.1007/s00213-023-06370-2.
 - [13] ZHANG L, KIBALY C, WANG Y J, et al. Src-dependent phosphorylation of μ -opioid receptor at Tyr³³⁶ modulates opiate withdrawal[J]. *EMBO Mol Med*, 2017, 9(11): 1521-1536. DOI:10.15252/emmm.201607324.
 - [14] SPRAGG S D S. Morphine addiction in chimpanzees[J]. *Comp Psychol Monogr*, 1940, 15:1-132.
 - [15] BALSTER R L, LUKAS S E. Review of self-administration[J]. *Drug Alcohol Depend*, 1985, 14(3-4):249-261. DOI:10.1016/0376-8716(85)90060-2.
 - [16] FATTORE L, FADDA P, ZANDA M T, et al. Analysis of opioid-seeking behavior through the intravenous self-administration reinstatement model in rats[J]. *Methods Mol Biol*, 2021, 2201:231-245. DOI:10.1007/978-1-0716-0884-5_21.
 - [17] XIAO K B, GRENNELL E, NGOY A, et al. Cannabis self-administration in the human laboratory: a scoping review of ad libitum studies[J]. *Psychopharmacology*, 2023, 240(7):1393-1415. DOI:10.1007/s00213-023-06360-4.
 - [18] ELHADJI K, DAIWILE A P, CADET J L. Modeling methamphetamine use disorder and relapse in animals: short- and long-term epigenetic, transcriptional, and biochemical consequences in the rat brain[J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 2023, 155: 105440. DOI: 10.1016/j.neubiorev.2023.105440.
 - [19] 侯媛媛, 刘志强, 张星星, 等. 条件位置偏爱实验和自身给药实验及其比较[J]. *现代生物医学进展*, 2011, 11(S2):5140-5143. DOI: 10.13241/j.cnki.pmb.2011.s2.006.
HOU Y Y, LIU Z Q, ZHANG X X, et al. The introduction and comparison of conditioned place preference and self-administration[J]. *Prog Mod Biomed*, 2011, 11(S2): 5140-5143. DOI: 10.13241/j.cnki.pmb.2011.s2.006.
 - [20] HUSTON J P, SILVA M A, TOPIC B, et al. What's conditioned in conditioned place preference? [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2013, 34(3):162-166. DOI:10.1016/j.tips.2013.01.004.
 - [21] AGOITIA A, CRUZ-SANCHEZ A, BALDERAS I, et al. The anterior *Insula* and its projection to amygdala nuclei modulate the abstinence-exacerbated expression of conditioned place preference[J]. *Psychopharmacology*, 2024, 241(3): 445-459. DOI:10.1007/s00213-023-06499-0.
 - [22] SIMKEVICH M J, CAMPBELL R R, WHITE A O. Examining cocaine conditioning place preference in mice[J]. *Bio Protoc*, 2020, 10(8): e3595. DOI:10.21769/BioProtoc.3595.
 - [23] YE J, GAO S Q, LIU Z C, et al. The HMGB1-RAGE axis in nucleus accumbens facilitates cocaine-induced conditioned place preference via modulating microglial activation[J]. *Brain Behav*, 2024, 14(3): e3457. DOI:10.1002/brb3.3457.
 - [24] HEYNS I M, FAUNCE A F, MUMBA M N, et al. Nanotechnology-enhanced naloxone and alternative treatments for opioid addiction[J]. *ACS Pharmacol Transl Sci*, 2024, 7(8):2237-2250. DOI:10.1021/acsptsci.4c00158.
 - [25] WEI Y Y, MA Y, YAO S Y, et al. Novel selective κ agonists SLL-039 and SLL-1206 produce potent antinociception with fewer sedation and aversion[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2022, 43(6): 1372-1382. DOI:10.1038/s41401-021-00761-x.
 - [26] ZHOU Y M, ZHU H W, LIU Z Y, et al. A ventral CA1 to nucleus accumbens core engram circuit mediates conditioned place preference for cocaine[J]. *Nat Neurosci*, 2019, 22(12): 1986-1999. DOI:10.1038/s41593-019-0524-y.
 - [27] VANN R E, WISE L E, VARVEL S A, et al. Route of administration influences substitution patterns in rats trained to discriminate methadone vs. vehicle[J]. *Drug Alcohol Depend*, 2009, 103(3): 124-130. DOI:10.1016/j.drugalcdep.2009.02.015.
 - [28] GAUVIN D V, MCCOMB M, CODE R, et al. Abuse liability assessment of hydrocodone under current draft regulatory guidelines[J]. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 2015, 75:118-129. DOI:10.1016/j.vascn.2015.05.003.
 - [29] CHEN Z G, WANG Y J, CHEN R S, et al. Ube2b-dependent degradation of DNMT3a relieves a transcriptional brake on opiate-induced synaptic and behavioral plasticity[J]. *Mol*

- Psychiatry, 2021, 26(4): 1162-1177. DOI: 10.1038/s41380-019-0533-y.
- [30] MCGOVERN D J, POLTER A M, PRÉVOST E D, et al. Ventral tegmental area glutamate neurons establish a mu-opioid receptor gated circuit to mesolimbic dopamine neurons and regulate opioid-seeking behavior[J]. Neuropsychopharmacology, 2023, 48(13): 1889-1900. DOI: 10.1038/s41386-023-01637-w.
- [31] CIESLIK-STARKIEWICZ A, NOWORYTA K, SOLICH J, et al. Trait sensitivity to positive feedback is a predisposing factor for several aspects of compulsive alcohol drinking in male rats: behavioural, physiological, and molecular correlates[J]. Psychopharmacology, 2024, 241(1): 33-47. DOI:10.1007/s00213-023-06460-1.
- [32] LI N, HE S, PARRISH C, et al. Differences in morphine and cocaine reinforcement under fixed and progressive ratio schedules; effects of extinction, reacquisition and schedule design[J]. Behav Pharmacol, 2003, 14(8):619-630. DOI:10.1097/00008877-200312000-00006.
- [33] JACOBS D S, HITCHCOCK L N, WILLIAMS R G, et al. Effects of a cue associated with cocaine or food reinforcers on extinction and postextinction return of behavior[J]. Behav Neurosci, 2022, 136(4): 307-317. DOI:10.1037/bne0000519.
- [34] 李佩云, 景漫毅, 吴宁, 等. 成瘾的行为学动物模型研究[J]. 中国药物滥用防治杂志, 2021, 27(2):118-124. DOI: 10.15900/j.cnki.zylf1995.2021.02.010.
- LI P Y, JING M Y, WU N, et al. Behavioral animal models of addiction[J]. Chin J Drug Abuse Prev Treat, 2021, 27(2): 118-124. DOI: 10.15900/j.cnki.zylf1995.2021.02.010.
- [35] WISE R A, ROBBLE M A. Dopamine and addiction[J]. Annu Rev Psychol, 2020, 71: 79-106. DOI: 10.1146/annurev-psych-010418-103337.
- [36] WISE R A, JORDAN C J. Dopamine, behavior, and addiction [J]. J Biomed Sci, 2021, 28(1): 83. DOI: 10.1186/s12929-021-00779-7.
- [37] MAGNARD R, CHENG Y F, ZHOU J, et al. Sequence termination cues drive habits *via* dopamine-mediated credit assignment[J]. bioRxiv, 2025: 2024.10.16.618735. DOI: 10.1101/2024.10.16.618735.
- [38] BAUER M R, MCVEY M M, BOEHM S L II. Drinking history dependent functionality of the dorsolateral striatum on gating alcohol and quinine-adulterated alcohol front-loading and binge drinking[J]. Alcohol, 2022, 105: 43-51. DOI:10.1016/j.alcohol.2022.09.005.
- [39] ZHOU Y M, YAN E H, CHENG D Q, et al. The projection from ventral CA1, not prefrontal cortex, to nucleus accumbens core mediates recent memory retrieval of cocaine-conditioned place preference[J]. Front Behav Neurosci, 2020, 14: 558074. DOI:10.3389/fnbeh.2020.558074.
- [40] GREENWALD M K, WOODCOCK E A, MOSES T E H, et al. Basal cortisol level modulates stress-induced opioid-seeking behavior[J]. Neurobiol Stress, 2024, 33:100684. DOI:10.1016/j.ynstr.2024.100684.
- [41] HU H L, CUI Y H, YANG Y. Circuits and functions of the lateral habenula in health and in disease[J]. Nat Rev Neurosci, 2020, 21(5):277-295. DOI:10.1038/s41583-020-0292-4.
- [42] KEYES P C, ADAMS E L, CHEN Z J, et al. Orchestrating opiate-associated memories in thalamic circuits[J]. Neuron, 2020, 107(6):1113-1123.e4. DOI:10.1016/j.neuron.2020.06.028.
- [43] ZHOU Y M, YAN E H, CHENG D Q, et al. The projection from ventral CA1, not prefrontal cortex, to nucleus accumbens core mediates recent memory retrieval of cocaine-conditioned place preference[J]. Front Behav Neurosci, 2020, 14: 558074. DOI:10.3389/fnbeh.2020.558074.
- [44] LI Y, SIMMLER L D, VAN ZESSEN R, et al. Synaptic mechanism underlying serotonin modulation of transition to cocaine addiction[J]. Science, 2021, 373(6560): 1252-1256. DOI: 10.1126/science.abi9086.
- [45] HOWELL L L, MURNANE K S. Nonhuman primate positron emission tomography neuroimaging in drug abuse research [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2011, 337(2): 324-334. DOI:10.1124/jpet.108.136689.
- [46] DOUGLAS BREMNER J, GAZI A H, LAMBERT T P, et al. Noninvasive vagal nerve stimulation for opioid use disorder [J]. Ann Depress Anxiety, 2023, 10(1):1117.
- [47] 郝伟, 赵敏, 李锦. 成瘾医学: 理论与实践[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2016.
- HAO W, ZHAO M, LI J. Addiction Medicine: Theory and Practice[M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2016.

(收稿日期: 2024-06-03 修回日期: 2025-02-06)
(本文责任编辑: 丁宇菁)

[引用本文]

王碧莹, 鲁家铄, 咎桂影, 等. 啮齿类动物药物成瘾模型的构建方法和应用进展[J]. 实验动物与比较医学, 2025, 45(2): 158-166. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.080.

WANG B Y, LU J S, ZAN G Y, et al. Establishment methods and application progress of rodent models for drug addiction[J]. Lab Anim Comp Med, 2025, 45(2): 158-166. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.080.

常见哮喘动物模型的建立方法与评价研究进展

罗世雄¹, 张 赛², 陈 慧²

(1. 天津中医药大学, 天津 300193; 2. 天津中医药大学第二附属医院, 天津 300250)

[摘要] 支气管哮喘(简称哮喘)是一种以气道炎症、气道高反应性和气道重塑为特征的常见的慢性呼吸系统疾病,其发病机制复杂且具有异质性,涉及遗传、免疫、环境等多种因素。目前针对哮喘的治疗手段相对有限,深入探究哮喘的发病机制、探寻有效的治疗方法以及开发新型药物已成为当务之急。因此,哮喘动物模型的建立至关重要。然而,至今仍没有一种理想的哮喘动物模型能够全面、准确地复刻人类哮喘发生与发展的所有特征。本文对近5年来哮喘动物模型建立方法的研究进展进行了系统梳理,详细综述了常见实验动物(如小鼠、大鼠、豚鼠)、常见致敏剂(包括卵清蛋白、屋尘螨、脂多糖、甲苯二异氰酸酯),以及用常见实验动物及致敏剂建立哮喘动物模型的方法,并对这些模型的优缺点和适用范围进行了客观评价。本文总结了哮喘模型的评价指标,涉及行为学、肺功能、病理学、免疫学、药效学等多个方面。难治性哮喘动物模型的建立方式虽尚未完善,但通过相关文献检索,总结了难治性哮喘动物模型造模的几种思路,旨在为相关研究提供有价值的参考。根据现有的科学技术,笔者推测未来哮喘动物模型的研究将更加聚焦于临床相关性、技术创新以及多学科融合。具体而言,未来哮喘动物模型将通过多重致敏原联合诱导并应用基因编辑等新技术,提升模型的临床相关性,实现模型的多样化与个性化,并使用生物成像、传感技术动态监测哮喘气道炎症及气道重塑等相关反应,甚至可利用芯片技术寻找动物模型替代方法,最终致力于开发出更能模拟人类哮喘复杂性和异质性的多因素复合模型。

[关键词] 哮喘; 动物模型; 评价指标; 致敏剂

[中图分类号] R-332; Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2025)02-0167-09



Research Progress in Establishment and Evaluation of Common Asthma Animal Models

LUO Shixiong¹, ZHANG Sai², CHEN Hui²

(1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China; 2. The Second Affiliated Hospital of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300250, China)

Correspondence to: CHEN Hui (ORCID:0009-0003-2757-8486), E-mail: erkechenhui@sohu.com

[ABSTRACT] Bronchial asthma (hereinafter referred to as asthma) is a common chronic respiratory disease characterized by airway inflammation, airway hyperresponsiveness, and airway remodeling. Its pathogenesis is highly complex and heterogeneous, involving multiple factors such as genetics, immunity, and environmental exposure. Currently, therapeutic options for asthma remain relatively limited, making it an urgent priority to explore its underlying mechanisms, identify effective treatment strategies, and develop new drugs. In this context, the establishment of animal models for asthma plays an irreplaceable and crucial role. However, to date, no single ideal animal model has been able to fully and accurately replicate all the features of the onset and progression of human asthma. This study systematically reviews the research progress over the past five years in the establishment methods of asthma animal models. It provides a detailed overview of commonly used experimental animals (such as mice, rats, and guinea pigs), frequently used sensitizing agents (including ovalbumin, house dust mite, lipopolysaccharide, and toluene diisocyanate), and the methods for establishing asthma models using these animals and sensitizers. This study also presents an objective evaluation of the advantages, limitations, and applicability of each model.

[基金项目] 天津市教委科研计划项目“基于EGFR/MPAK信号通路研究小青龙汤抑制哮喘气道黏液高分泌的效应及作用机制”(2022KJ177)

[第一作者] 罗世雄(1998—),女,硕士研究生,研究方向:中医儿科常见疾病。E-mail: 574761907@qq.com

[通信作者] 陈 慧(1973—),女,博士,主任医师,硕士研究生导师,研究方向:中西医结合儿科临床和基础研究。E-mail: erkechenhui@sohu.com。ORCID: 0009-0003-2757-8486

Evaluation criteria for asthma models are summarized across multiple dimensions, including behavioral assessments, pulmonary function, histopathology, immunological indicators, and pharmacodynamics. Although methods for establishing refractory asthma models remain underdeveloped, several strategies for modeling refractory asthma have been summarized through a review of relevant literature, aiming to provide useful references for related research. Based on current scientific and technological advancements, it is anticipated that future research on asthma animal models will focus more on clinical relevance, technological innovation, and multidisciplinary integration. Specifically, future models are expected to adopt multi-sensitizer induction protocols, apply cutting-edge tools such as gene editing, enhance clinical relevance and promote diversification and personalization of models. Furthermore, advanced technologies such as bioimaging and biosensing are anticipated to enable dynamic monitoring of airway inflammation and remodeling. Organ-on-a-chip platforms may also be explored as potential alternatives to traditional animal models. The ultimate goal is to develop multifactorial, composite models that better simulate the complexity and heterogeneity of human asthma.

[Key words] Asthma; Animal model; Evaluation criteria; Sensitizing agents

支气管哮喘（以下简称哮喘）是由多种细胞和细胞组分参与的气道慢性非特异性炎症性疾病，其临床表现是反复出现喘息、气急，可伴或不伴有胸闷和咳嗽等症状，同时存在气道高反应性以及可变的气流受限情况，且随着病程发展最终可导致气道重塑。据2024年流行病学调查显示，哮喘是全球范围内患病率最高的慢性气道疾病之一，全球约有3亿哮喘患者^[1]。2015年全国人口普查数据显示，在我国20岁及以上的人群中，哮喘患者的数量可能达到约4 570万人^[2]。

哮喘动物模型可应用于探索哮喘发病机制、评估新型治疗方法、研发新药的各个方面。因此，构建稳定可靠的哮喘动物模型显得尤为必要。理想的哮喘动物模型应当与人类哮喘的病理生理学机制以及临床变化过程高度契合。具体而言，哮喘动物模型须具备免疫球蛋白E（immunoglobulin E, IgE）介导的抗原敏感性、嗜酸性粒细胞增多、气道阻力增加、急性支气管收缩、气道慢性炎症；后期进展至气道阻塞、黏液纤毛清除率降低、黏液分泌增强、气道壁结构重塑以及平滑肌增生等病理特征^[3]。本文对近五年来国内外常见哮喘动物模型的构建方法与评价体系进行综述，系统总结了不同动物品种及品系的特点、致敏原、造模方法、评价指标的研究进展。在此基础上，对哮喘研究的未来发展方向进行展望，为深入探索哮喘的发病机制、开拓其治疗途径、研发新型治疗药物提供新的理论视角和实践思路。

1 实验动物选择

在选择实验动物时，需要综合考虑多重因素：动物经济成本、饲养条件的难易程度、造模成功率、模

型动物哮喘发病过程及特征与人类哮喘的相似度、标本采集的便捷性等。根据实验目的与要求，需选择最适宜的实验动物种类及品种品系。哮喘动物模型的构建历程历史悠久，从起源至今使用过的动物有豚鼠、小鼠、大鼠、家兔、猫、犬、猴、羊、猪和灵长类动物等。而后经过研究者们不断探索，哮喘动物模型的造模方式逐渐成熟，所使用的动物品种品系也逐渐规范化。根据相关文献检索结果显示，近五年来，最常用作哮喘动物模型建立的动物有以下3类：大鼠、小鼠、豚鼠，按动物种类和品种品系的使用频率由高到低排列，依次为BALB/c小鼠、C57BL/6小鼠、SD大鼠、Wistar大鼠、豚鼠。以下将对各类动物的优缺点进行简要阐述，其中建立哮喘动物模型的常用动物及其优缺点见表1。

1.1 小鼠

近年来，小鼠已成为构建哮喘模型最为常用的实验动物，主要归因于小鼠的免疫遗传背景相对清晰，并且其基因组与人类基因组的相似性高达90%以上^[4]。利用小鼠进行哮喘模型构建具有诸多优点，如实验成本较低，可选品系较多，造模方法较成熟，容易产生气道炎症、气道高反应性、黏液增多等典型的哮喘症状。在哮喘模型中，BALB/c和C57BL/6是两个常见的实验小鼠品系^[5]。其中，BALB/c小鼠因造模成功率最高而被广泛使用^[6-7]。近年来，随着基因敲除技术的发展，C57BL/6基因敲除小鼠在哮喘相关研究中的应用也日益增多^[8-9]。

有研究表示^[10]，在使用卵清蛋白（ovalbumin, OVA）诱导小鼠哮喘模型时，BALB/c小鼠更易出现呼吸频率减慢、点头样呼吸、抓挠行为增多、腹部痉挛

等哮喘特异性症状。而 C57BL/6 小鼠仅表现为活动减少和呼吸深快。此外, BALB/c 小鼠肺组织病理学变化、嗜酸粒细胞浸润程度, 以及血清白细胞介素-4 (interleukin-4, IL-4) 水平改变均更显著。因此, 在目前的临床研究中, 依旧是 BALB/c 小鼠使用频率更高。然而, 使用小鼠建立哮喘模型也存在若干局限性。首先, 小鼠和人类在气道和肺部的生理结构上存在诸多差别。如人类的远端气道是呼吸性支气管, 而小鼠的则是非肺泡化支气管; 人类的气管和支气管内均分布有基底细胞, 而小鼠的基底细胞仅存在于气管中; 小鼠气道平滑肌少于人类等。以上差异导致小鼠哮喘模型中, 肺部炎症的病理特征与人类哮喘存在不同^[11]。其次, 小鼠对过敏原易产生耐受性^[12], 所以在建立慢性哮喘模型时, 其成功率相对较低。综上所述, 小鼠更适合用作急性期哮喘模型的研究, 尤其在气道高反应性、气道炎症等指标的研究及药物疗效观察方面具有优势。

1.2 大鼠

除小鼠外, 大鼠也常用于建立哮喘模型, 其具有来源广泛、价格低廉、相对小鼠体型较大、饲养和繁殖操作简便、取材方便等特点。大鼠因体型相对较大和麻醉状态下展现出高稳定性的特点, 为吸入过敏原后急性哮喘发作期间各项生理指标的准确测量提供了十分有利的条件^[13], 并且麻醉后的实验操作和取材难度也相对较低。所以, 大鼠模型在研究哮喘以及其他肺部疾病方面都有重要作用。相较于其他物种, 大鼠具备独特的支气管循环的解剖学特征, 因此在蛋白质学、遗传学等方面也展现出更多优势^[14]。在诸多大鼠品种中, SD 大鼠和 Wistar 大鼠为国内外研究常用模型, 因二者都是由 IgE 介导的过敏反应, 并且可诱发与人类相似的迟发相变态反应和速发相变态反应。在实践中, 两品种大鼠各有其优势: 相较于 Wistar 大鼠, SD 大鼠 (特别是雄性大鼠) 更常被使用, 可能与其耐受性强, 且能够接受致敏原长期高浓度雾化刺激有关^[15]。然而, 在相同的实验条件下, Wistar 大鼠建造哮喘模型成功率比 SD 大鼠高^[16]。大鼠造模缺点在于其易对过敏原产生耐受性^[4], 且相关的分子生物学试剂不够齐全。

1.3 豚鼠

豚鼠作为哮喘研究的动物模型, 具有悠久的历史及经典地位, 因其肺部解剖结构、生理及药理反应与人类均高度相似^[17]。特别是在气道分支、神经生理学、肺循环系统和平滑肌分布以及肥大细胞定位和介

质分泌方面^[18]。相比其他动物, 豚鼠对 OVA 更敏感, 更易产生哮喘相关症状, 包括气道高反应性、嗜酸性粒细胞增多、发生 I 型变态反应、产生速发和迟发型哮喘反应等。所以豚鼠哮喘模型常被用于研究化学刺激因子过敏反应。此外, 豚鼠也可用于开发皮质类固醇和 β 受体激动剂等药物^[19]。然而, 与人类不同的是, 豚鼠的变态反应主要由免疫球蛋白 G (immunoglobulin G, IgG) 介导。造模后的豚鼠不会出现气道重塑现象, 且豚鼠个体间对致敏原的反应存在较大差距, 部分个体在致敏后易出现急性过敏性休克, 而有些则无明显哮喘症状, 这极大地影响了实验结果的一致性和可靠性^[20]。此外, 当前缺乏研究豚鼠炎症和免疫反应的试剂和特异性分子工具, 导致对豚鼠标本的检测工作存在一定困难。因此, 相对于大鼠和小鼠, 豚鼠在当今实验研究中使用频率相对较低。

1.4 其他动物

家兔、猫、犬、羊、猪和灵长类动物等作为哮喘动物模型的频率相对较低。其中, 家兔, 尤其是新西兰白兔因性格温顺, 在家兔中体型相对较小, 价格相对低廉, 并且可反复使用而不出现脱敏现象, 可用于自身对照研究慢性哮喘, 但其整体应用频率均较少^[21]。相比之下, 猫、犬、羊、猪和灵长类动物等动物的肺部构造及药代动力学特性与人类更加相似, 且实验检测更便捷, 适宜进行长期观察研究。然而, 此类动物普遍价格高昂、饲养管理难度较大, 且缺乏相关的免疫反应试剂及特异性分子工具, 因此在哮喘动物模型研究中应用较少。

2 致敏剂选择

可用作制备哮喘动物模型的致敏剂主要分为以下 3 类: 蛋白质类, 如 OVA、蟑螂提取物 (cockroach extract, CRA)、猪蛔虫蛋白、动物毛发和皮屑蛋白、屋尘螨 (house dust mite, HDM)、粉尘螨 (dermatophagoides farinae, DF)、昆虫毒液蛋白、花粉蛋白 (如豚草花粉、桦树花粉等所含的蛋白质成分) 等; 化学物质类, 如甲苯二异氰酸酯 (toluene diisocyanate, TDI)、二氧化硫 (SO_2)、甲醛等; 微生物及其产物类, 如脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS)、肽聚糖 (peptidoglycan, PGN)、真菌孢子和菌丝提取物 (如曲霉素、青霉素等) 等^[22]。其中, 使用频率最高的致敏剂为 OVA, 其次为 HDM。以下将对各种常见致敏剂的优缺点进行简要分析, 其中哮喘动物模型常用致敏剂的优缺点及适用范围见表 2。

表1 建立哮喘动物模型的常用动物及其优缺点

Table 1 Commonly used animals in asthma models and their advantages and disadvantages

动物种类	优点	缺点	适用范围
Animal species	Advantages	Disadvantages	Scope of application
小鼠	免疫遗传背景清晰、实验成本低、品系多、造模方法成熟、容易产生气道炎症、容易诱发气道高反应性、容易出现黏液增多等哮喘症状	和人类的气道和肺部的生理结构差异大、对过敏原易产生耐受性	急性期哮喘模型气道高反应及气道炎症等的研究及药物疗效观察
大鼠	来源广、价格低廉、体型较大、易饲养繁殖、麻醉后稳定性高、取材方便	易对过敏原产生耐受性、相关分子生物学试剂不齐全	急慢性哮喘模型气道及肺组织生理病理观察及肺功能、气道阻力测定等相关研究
豚鼠	容易被致敏、肺部解剖结构和生理药理反应与人类相似	价格较高、个体反应差距较大、缺乏相关炎症和免疫反应的试剂和特异性分子工具	研究化学刺激因子过敏反应、开发皮质类固醇和β受体激动剂等药物
Guinea pig			

2.1 卵清蛋白

OVA 获取途径便捷、成本低廉、致敏效果显著，且具有较强的免疫原性，所诱导的免疫应答与人类哮喘的免疫病理机制相似，且反应稳定可重复，因此是建立哮喘模型中最常用的致敏剂。在作为致敏剂应用时，OVA 的激发浓度范围为 1%~10%，其中，1%OVA 是最常使用的浓度。但也有研究^[3]认为，OVA 浓度为 50 μg/mL 时，其致敏效果最佳。氢氧化铝 [Al(OH)₃] 作为佐剂，能够有效增强免疫系统的抗原特异性 Th2 免疫应答^[23]。因此，目前大部分哮喘动物模型都采用 OVA 联合氢氧化铝进行致敏处理。

2.2 屋尘螨

HDM 作为一种与人类关系密切的过敏原，是诱发人类和动物哮喘的最常见因素之一^[24]。相关研究表明，HDM 诱导的哮喘小鼠的气道平滑肌增生明显，且肺泡灌洗液、肺组织和气道炎症细胞中均以嗜酸性粒细胞为主，Th2 炎症因子表达水平增高^[25]。然而，HDM 的培养和提取过程易受培养条件、提取方法等多种因素影响，导致其标准化操作存在较大难度。此外，HDM 致敏诱导周期相对较长，一般需要数周甚至数月。不同品种品系和个体的动物对 HDM 的反应也存在差异，因此，近年来在科研中，HDM 的使用频率有所下降。

2.3 脂多糖

经 LPS 致敏后，动物肺组织中内质网应激标志物的表达水平显著增加^[23]。LPS 为革兰氏阴性菌细胞壁中的成分，它可通过激活多条信号通路，高效诱导细胞因子的合成与释放，从而激发炎症反应，加重气道高反应性。因此，LPS 常被用作构建哮喘动物模型。然而，LPS 单独诱导的哮喘模型炎症持续时间有限，且不同品种品系、不同个体动物对其反应存在较大差

异，因此不常单独使用。当低浓度的 LPS 与其他过敏原联合使用时，可以增强机体的免疫反应，加重哮喘症状，从而模拟出更复杂的哮喘病理状态。

2.4 甲苯二异氰酸酯

TDI 被用于职业性哮喘 (occupational asthma, OA) 的发病机理及治疗策略的研究中。OA 通常由个体暴露于具有高反应性的二异氰酸酯类化学品引起，而 TDI 是其中最为常见的化学物质。TDI 通过与气道上皮细胞相互作用，引发气道炎症反应，并刺激细胞因子和趋化因子的产生与释放，促进气道中炎症细胞的存活和聚集，导致气道重塑、高反应性及炎症的产生^[26]。然而，TDI 具有毒性，实验过程中对其剂量控制要求严格，且价格昂贵，因此仅适用于 OA 的相关研究。

3 常见哮喘动物模型的造模方法与评价

3.1 卵清蛋白致敏哮喘模型

3.1.1 卵清蛋白致敏小鼠

每隔 7 d 对小鼠腹腔注射一定剂量的 Al(OH)₃ 及 OVA 混合液，进行 2~3 次致敏处理。激发期使用一定浓度 OVA 溶液对小鼠进行连续雾化吸入，每次持续时间约 30 min。急性期造模持续 3~7 d，慢性期则持续 2~4 周。Park 等^[27] 分别于第 1 天和第 14 天对 5~6 周龄的 BALB/c 小鼠以混合 1%Al(OH)₃ 的 OVA 溶液腹腔注射致敏。随后以 1 mg/mL 浓度的 OVA 溶液分别于第 21、22、23 天滴鼻激发，成功建立了哮喘小鼠模型。此方法建立的哮喘模型动物稳定性强，哮喘症状明显，炎症反应及气道高反应性显著，因此常用于研究哮喘发病机制及药物有效性。

3.1.2 卵清蛋白致敏大鼠

大鼠急性期模型的建立通常采用以下方法：每隔 7 d 对大鼠进行 1~2 次多点位皮下注射及腹腔注射一定

表2 哮喘动物模型常用致敏剂的优缺点及适用范围

Table 2 Advantages, disadvantages, and application scope of commonly used sensitizers in asthma animal models

致敏剂 Sensitizers	优点 Advantages	缺点 Disadvantages	适用范围 Scope of application
卵清蛋白 Ovalbumin	价格便宜,致敏效果好,给药途径多样可选	致敏浓度存在较大范围的差异	建立急性过敏性哮喘模型
屋尘螨 House dust mite	致敏后肺组织及气道炎症反应明显	个体反应差异大	建立慢性哮喘模型、嗜酸性粒细胞型哮喘模型
脂多糖 Lipopolysaccharide	可通过激活多条信号通路,高效诱导细胞因子合成与释放,激发炎症反应,加重气道高反应性	不稳定性,常作为佐剂与卵清蛋白合用	建立急性期及中性粒细胞型哮喘模型
甲苯二异氰酸酯 Toluene diisocyanate	是导致职业性哮喘的最常见的化学物质	有毒性、剂量控制要求高,成本高	职业性哮喘的发病特征及治疗的研究

剂量的OVA、灭活百日咳杆菌疫苗及Al(OH)₃混合液, 激发期则使用OVA溶液雾化吸入30 min, 连续7 d。慢性期模型的建立常采用四肢多点皮下注射及腹腔注射一定剂量的OVA与Al(OH)₃混合液2~3次, 激发期连续OVA溶液雾化吸入, 每次30 min, 持续8周。雷俊等^[28]分别于实验第1、8天, 对SPF级雄性SD大鼠腹腔注射10%OVA与Al(OH)₃混合液0.5 mL, 并同时于两侧腹股沟皮下注射上述混合液各0.25 mL, 进行3点位注射致敏; 从实验第15天起, 2%OVA雾化液雾化激发, 每次30 min, 每天1次, 持续14 d, 成功建立哮喘大鼠模型。OVA致敏大鼠哮喘模型有速发和迟发双相反应^[29], 因此可用于急性和慢性模型的建立, 常用于特异性抗原抗体反应的研究。

3.1.3 卵清蛋白致敏豚鼠

豚鼠喘模型的建立可分为以下3种: 肌内注射OVA溶液, 同时腹腔注射1次Al(OH)₃来致敏; 每隔7 d腹腔注射较高浓度的OVA及Al(OH)₃混合液2次, 激发期连续OVA溶液雾化吸入, 每次30 min, 持续7~10 d; 通过OVA溶液滴鼻致敏, 激发期再使用OVA溶液雾化吸入。丁云录等^[17]选取3周龄Hartley豚鼠(雌雄各半)作为实验对象, 于第1天对每只豚鼠腹腔注射1 mL 10%OVA溶液致敏, 第15天开始用1%OVA溶液进行雾化吸入激发, 每天1次, 连续7 d, 成功建立哮喘豚鼠模型。OVA激发后, 豚鼠会出现气道高反应性, 长期激发可出现平滑肌增生、基底膜增厚等气道重塑现象。因此, 该豚鼠哮喘模型适用于研究气道高反应及气道重塑的发生机制、影响因素及干预措施。

3.2 屋尘螨致敏哮喘模型

建立HDM致敏小鼠及大鼠哮喘模型可采用每周2~3次HDM溶液滴鼻; 或每隔7 d进行1次多点皮下注射HDM溶液; 或每隔7 d进行1次腹腔注射HDM

溶液等。体型较大的动物如豚鼠、家兔等, 则采用麻醉后气管插管将HDM溶液滴注到气管的方式建立哮喘模型。Ji等^[30]采用皮下注射50 μg HDM溶液致敏, 腹腔注射100 μg HDM溶液激发, 成功建立哮喘小鼠模型。郭妍蓉等^[31]于实验第0、14天使用100 μL混合液[含20 μg HDM, 1 mg Al(OH)₃, 溶于生理盐水]对小鼠腹腔注射致敏, 后于实验第21~58天, 每周3次HDM溶液滴鼻激发, 成功建立慢性过敏性哮喘小鼠。通过文献检索发现, 使用HDM联合Al(OH)₃腹腔注射致敏, 随后HDM滴鼻激发时, 动物哮喘症状更为严重, 且更容易出现气道重塑现象, 因此此方法常用于建立慢性哮喘动物模型。HDM致敏后, 动物肺组织及气道炎症反应明显, 常用于相关炎症因子作用机理及药物研究。然而, HDM致敏具有不稳定性, 因此, 在利用HDM建立哮喘模型时, 需要根据HDM的性质选择合适的给药方式、给药时间间隔及次数。

3.3 脂多糖致敏哮喘模型

3.3.1 脂多糖致敏小鼠

研究者常将LPS与OVA联合用于哮喘动物实验致敏。首先通过腹腔注射OVA致敏, 再利用LPS滴鼻激发, 此方案可诱导小鼠出现典型哮喘症状, 包括气道炎症反应、黏液分泌增加、气道高反应性等。另外, 也可单独使用LPS滴鼻致敏。Jonckheere等^[32]采用40 μg/mL LPS溶液对小鼠进行滴鼻致敏, 每只小鼠每天给予50 μL, 连续4 d, 成功建立了急性哮喘小鼠模型。此哮喘模型可用于哮喘发病机制探究以及药物筛选等领域。

3.3.2 脂多糖致敏大鼠

LPS致敏大鼠常采用气管内滴注或雾化吸入的方式。Liu等^[33]分别于第0、14天对6~8周龄SPF级SD大鼠腹腔注射LPS、Al(OH)₃和OVA的混合溶液, 随

后于第21~23天雾化吸入OVA激发成功建立哮喘大鼠模型。大鼠的气道结构和生理功能与人类较为相似,对LPS的免疫反应也与人类有一定相似性,此模型常用于研究哮喘病理生理过程以及评估药物对气道炎症和气道重塑的影响。

3.4 甲苯二异氰酸酯致敏哮喘模型

TDI诱导的哮喘模型常以BALB/c小鼠为实验对象。Pollaris等^[34]于实验第1、8天于小鼠耳背部涂抹一定浓度的TDI致敏,于第15天采用气管滴注法给予低浓度的TDI激发,成功建立OA小鼠模型。Pandey等^[35]使用TDI建立小鼠哮喘模型,以1%TDI滴鼻致敏,再以2.5%TDI滴鼻激发,成功建立TDI-OA型小鼠哮喘模型。TDI诱导的哮喘动物可出现呼吸急促、肺组织支气管管壁破坏、管腔增厚、炎细胞浸润等哮喘症状和病理改变。

3.5 难治性哮喘造模

难治性哮喘通常指使用推荐的最大剂量吸入治疗后,哮喘症状仍然无法得到有效控制的一类哮喘。这类患者在临床中占哮喘患者总数的5%~10%,其典型发作一般以接触变应原、运动和病毒性上呼吸道感染(如感冒)为诱因。目前,临床尚未完善关于此类哮喘模型建立的方法,但根据其发病特点,有学者提出以下造模思路可供参考,即运用常规造模方法成功建造慢性期哮喘动物模型后,给予反复的外界刺激和不规则的小剂量激素吸入,从而造成哮喘反复,症状不稳定,激素不敏感或部分抵抗的难治性哮喘模型。根据给予的外界刺激的不同,可将造模方法分为变应原反复刺激法、反复呼吸道感染造模法、减毒合胞病毒疫苗造模法、运动刺激法^[36]。即变应原(如香烟、花粉、灰尘等)被动吸入;革兰氏阴性菌、衣原体、支原体减毒疫苗等雾化吸入;减毒合胞病毒疫苗雾化吸入;特殊运动装置或悬挂法使其运动、疲劳。

文莎等^[37]在气道重塑及激素敏感型哮喘模型基础上,以OVA联合Al(OH)₃致敏,将按照2 mg/kg为标准配制的地塞米松治疗液,于雾化前30 min对小鼠行腹腔注射,每周连续2 d,中断5 d,持续9周,成功建立激素抵抗型哮喘模型(steroid-resistant asthma, SRA)小鼠,即SRA组小鼠于雾化第6周开始便表现出激素不能缓解小鼠哮喘症状。

4 哮喘动物模型的评价指标

4.1 行为学评价

哮喘动物模型常在激发后呈现不同程度的咳嗽、

呼吸急促、头面部瘙痒、挠首舔足、烦躁不安、毛发竖立、腹部抽搐等哮喘样症状;严重者可出现安静少动、行动迟缓,甚至抽搐跌倒、四肢软瘫、俯伏不动等反应。长期连续激发后可出现体重下降,毛发失去光泽等。实验室常选用激发给药后20~30 s内即出现上述任意2~3个症状的动物作为实验用鼠^[38]。

4.2 肺功能评价

造模成功的动物吸气阻力、呼气阻力均明显高于正常对照组,且其肺顺应性数值下降,提示肺组织弹性减弱、扩张和收缩能力变差。另外,哮喘模型动物用力呼气量(forced expiratory volume, FEV)、用力肺活量(forced vital capacity, FVC)等指标降低,第一秒用力呼气容积与用力肺活量比值(forced expiratory volume in 1 second/forced vital capacity, FEV1/FVC)比值减小,反映气道阻塞导致气体呼出受限。

4.3 病理学评价

在造模成功的动物模型中,肺泡灌洗液可见嗜酸性粒细胞数、淋巴细胞数有不同程度的增加;血清学检测中可见IL-4浓度不同程度的增高和IFN- γ 浓度不同程度的降低;肺组织病理切片可见支气管及血管周围大量嗜酸性粒细胞、淋巴细胞、肥大细胞等炎症细胞聚集。在重症哮喘模型及气道重塑哮喘模型中,可见气道平滑肌增厚、基底膜增厚、管腔变狭窄,气管痉挛,弹力纤维增生,黏液腺增生肥大、黏液栓形成等气道重塑的病理改变。其中,评价哮喘造模成功的最主要指标是肺组织病理形态学改变^[10]。

4.4 免疫学评价

造模成功的动物哮喘模型血清或支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)中特异性IgE抗体水平显著升高,该指标是衡量机体对过敏原产生免疫反应的重要标志。Th2细胞功能增强,会导致Th1/Th2细胞因子失衡,具体表现为IL-4、IL-5、IL-13等Th2型细胞因子分泌增加,而IFN- γ 等Th1型细胞因子分泌减少。此外,BALF中的炎症因子如组胺、白三烯、前列腺素等含量也会升高,这些炎症介质在哮喘的发病过程中起重要作用。

4.5 药效学评价

除探索哮喘发病机制外,哮喘动物模型还常被用于评测新的治疗方法、研究开发新的治疗药物。研究者常采用的给药途径包括灌胃、腹腔注射、气管内给药、静脉给药、滴鼻等方式。哮喘模型建立成功的动物,在给予哮喘治疗药物后,可观察到动物喘息频繁、呼吸困难、咳嗽等症状明显得到缓解,提示模型动物

的症状符合哮喘特征,且对治疗措施有良好的响应性。同时,通过对比模型组和未予药物干预组的肺功能、病理学、免疫学指标,结果显示模型组的各项指标均优于未予药物干预组,说明模型具有药物干预的可逆转性,进一步证明模型的有效性。

5 哮喘动物模型研究展望

哮喘作为全球患病率最高的慢性气道系统疾病之一,但临床有效的相关药物却相对匮乏。因此,建立哮喘动物模型对人类研究哮喘的发病机制和作用靶点、开发哮喘相关药物、检验哮喘相关药物及其他治疗方法具有深远影响。虽然目前可用于哮喘模型研究的动物种类繁多,但经过综合考量,目前最佳选择仍是小鼠、大鼠、豚鼠。哮喘动物模型的建立因实验动物、致敏剂剂量的选择,以及给药频率与周期的不同,使得哮喘建模各有优劣,而哮喘动物模型的优劣程度取决于能否准确且全面地模拟人类哮喘的发病机制及病情发展过程。现有哮喘动物模型的构建方法仍有诸多局限性,仅能表现哮喘某特定阶段的部分病理特征,缺乏能够完全模拟人类哮喘发生、发展的建模方法。根据文献研究进展及未来技术的发展趋势,哮喘动物模型未来有望在以下几个方面取得显著进展。

5.1 模型的临床相关性提升

未来的研究将更侧重于开发能够准确模拟人类哮喘病理生理特征的模型。通过采用多重过敏原的联合诱导,优化致敏和激发方案,结合基因编辑技术,构建更具有临床特点的哮喘模型,如老年哮喘、儿童哮喘、重症哮喘等。对于慢性炎症与气道重塑模型的构建,可通过长期暴露于低剂量过敏原,并借助高分辨率成像技术、生物传感器等先进手段,动态监测并研究慢性气道炎症和气道重塑的变化及其机制。激素抵抗模型通过长期不规则激素刺激模拟临床激素抵抗型哮喘的模型,以研究其发病机制和寻找新的治疗靶点。

5.2 新技术的应用

随着生物技术的发展,新的工具和方法将被引入哮喘动物模型的研究中。基因编辑技术,特别是CRISPR-Cas9等基因编辑工具,可以对动物基因进行精准敲除、嵌入或修饰,从而可开发出具有特定基因背景的哮喘模型,以研究基因与环境因素的交互作用。目前基因编辑动物已被运用于哮喘实验中,Khumalo等^[39]通过杂交转基因技术制备了诱导性白细胞介素4受体 α 亚基(interleukin-4 receptor α , IL-4R α)缺失小鼠,用于研究IL-4R α 缺失对哮喘免疫反应进程的

影响。单细胞测序技术可通过单细胞测序分析哮喘模型中不同细胞类型的转录组变化,揭示细胞异质性和关键细胞亚群在哮喘发病中的作用。CAR-T细胞疗法在哮喘动物模型中的应用已取得一定成果,未来将进一步研究细胞治疗技术与哮喘模型的结合,为哮喘的根治开辟新的可能。

5.3 模型的多样化与个性化

未来,哮喘动物模型将更加多样化,以满足不同的研究需求。除了常用的小鼠和大鼠等小型啮齿类动物模型外,其他大动物模型(如猪、犬、非人灵长类动物)也可能被更多地开发利用,以促进呼吸介入疗法、药物代谢动力学等领域的研究。此外,未来还将结合小动物和大动物模型的优势,从不同角度深入剖析哮喘的病理机制,并基于患者个体特征(如基因背景、过敏原暴露史)开发个性化动物模型,以期为准医学领域的研究提供支持。

5.4 伦理与替代方法的探索

随着动物实验伦理标准的不断提升,未来的研究将更加注重开发替代性实验方法。如类器官、芯片器官等体外模型技术将得到进一步发展,用于研究哮喘的细胞和分子层面的机制。同时,借助计算机模拟技术,结合动物模型所提供的实验数据,能更精准地预测哮喘的发病过程和药物疗效。

综上所述,未来哮喘动物模型的研究方向将更加注重临床相关性、技术创新和多学科融合。通过运用不同种属动物模型,进一步优化致敏剂效应及稳定性,丰富致敏剂种类,提高造模效果稳定性。此外,利用基因编辑、单细胞测序、芯片器官等前沿技术,开发出能更全面地模拟人类哮喘复杂性和异质性的多因素复合模型,有望深入揭示哮喘的发病机制,为开发创新性治疗策略提供有力支持。

[作者贡献 Author Contribution]

罗世雄负责撰写和修改文稿,借助AI工具“豆包”进行部分文字润色;

张赛负责指导论文,参与修改文稿,是基金获取者;

陈慧参与论文框架构思,核定文稿。

[利益声明 Declaration of Interest]

所有作者均声明本文不存在利益冲突。

[参考文献 References]

- [1] Global Initiative for Asthma. Summary guide for asthma management and prevention for adults, adolescents and children 6–11 years (2024): A summary guide for healthcare providers[EB/OL]. [2024-5-22]. <https://ginasthma.org/wp-content/uploads/2024/12/GINA-Summary-Guide-2024-WEB->

- WMS.pdf.
- [2] 林苏杰, 王芳, 郝月琴, 等. «支气管哮喘防治指南(2020年版)»解读[J]. 中国临床医生杂志, 2022, 50(12):1406-1408. DOI: 10.3969/j.issn.2095-8552.2022.12.006.
LIN S J, WANG F, HAO Y Q, et al. Chin J Clin, 2022, 50(12):1406-1408. DOI: 10.3969/j.issn.2095-8552.2022.12.006.
- [3] 李泳兴, 钟鸣, 王勇, 等. 常用哮喘动物模型的建立[J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(11):97-101. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7856.2020.11.016.
LI Y X, ZHONG M, WANG Y, et al. Establishment of common animal models of asthma[J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(11):97-101. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7856.2020.11.016.
- [4] 何婷, 钱佩瑶, 洪敏, 等. 诱发支气管哮喘动物模型气道重塑特征的方法和评价[J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(1):117-123. DOI: 10.3969/j.issn.1005-4847.2022.01.015.
HE T, QIAN P Y, HONG M, et al. Methods and evaluation of airway remodeling characteristics in animal models of bronchial asthma[J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(1):117-123. DOI: 10.3969/j.issn.1005-4847.2022.01.015.
- [5] YASUDA Y, NAGANO T, KOBAYASHI K, et al. Group 2 innate lymphoid cells and the house dust mite-induced asthma mouse model[J]. Cells, 2020, 9(5): 1178. DOI: 10.3390/cells9051178.
- [6] GREGORCZYK I, MAŚLANKA T. Blockade of RANKL/RANK and NF- κ B signalling pathways as novel therapeutic strategies for allergic asthma: a comparative study in a mouse model of allergic airway inflammation[J]. Eur J Pharmacol, 2020, 879:173129. DOI:10.1016/j.ejphar.2020.173129.
- [7] BRANDT E B, BOLCAS P E, RUFF B P, et al. IL33 contributes to diesel pollution-mediated increase in experimental asthma severity[J]. Allergy, 2020, 75(9):2254-2266. DOI:10.1111/all.14181.
- [8] ASAYAMA K, KOBAYASHI T, D'ALESSANDRO-GABAZZA C N, et al. Protein S protects against allergic bronchial asthma by modulating Th1/Th2 balance[J]. Allergy, 2020, 75(9):2267-2278. DOI:10.1111/all.14261.
- [9] PARK S C, KIM H, BAK Y, et al. An alternative dendritic cell-induced murine model of asthma exhibiting a robust Th2/Th17-skewed response[J]. Allergy Asthma Immunol Res, 2020, 12(3):537-555. DOI:10.4168/aa.2020.12.3.537.
- [10] 章谦男, 肖欢, 李芳冬, 等. 不同品系小鼠哮喘模型的建立与比较[J]. 广西医科大学学报, 2022, 39(2):256-261. DOI: 10.16190/j.cnki.45-1211/r.2022.02.013.
ZHANG Q N, XIAO H, LI L D, et al. Establishment and comparison of asthma models in different strains of mice[J]. J Guangxi Med Univ, 2022, 39(2):256-261. DOI: 10.16190/j.cnki.45-1211/r.2022.02.013.
- [11] KUMAR R K, FOSTER P S. Modeling allergic asthma in mice: pitfalls and opportunities[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2002, 27(3):267-272. DOI:10.1165/rcmb.F248.
- [12] FULKERSON P C, ROTHENBERG M E, HOGAN S P. Building a better mouse model: experimental models of chronic asthma[J]. Clin Exp Allergy, 2005, 35(10):1251-1253. DOI:10.1111/j.1365-2222.2005.02354.x.
- [13] GONG C X, PAN L Y, JIANG Y K, et al. Investigating the mechanism of action of Yanghe Pingchuan Granule in the treatment of bronchial asthma based on bioinformatics and experimental validation[J]. Heliyon, 2023, 9(11): e21936. DOI: 10.1016/j.heliyon.2023.e21936.
- [14] TSCHERNIG T, NEUMANN D, PICH A, et al. Experimental bronchial asthma- the strength of the species rat[J]. Curr Drug Targets, 2008, 9(6): 466-469. DOI: 10.2174/138945008784533543.
- [15] 妥海燕, 王志旺, 任远, 等. 卵清白蛋白复制哮喘动物模型的方法及评价研究进展[J]. 甘肃中医药大学学报, 2016, 33(1):71-74. DOI: 10.16841/j.issn1003-8450.2016.01.23.
TUO H Y, WANG Z W, REN Y, et al. Research progress on the method and evaluation of replicating asthma animal model with ovalbumin[J]. J Gansu Univ Chin Med, 2016, 33(1):71-74. DOI: 10.16841/j.issn1003-8450.
- [16] 欧梁, 宋莹, 李萍, 等. PCA试验中SD大鼠和Wistar大鼠对卵蛋白和牛血清白蛋白敏感性的差异[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2013, 27(增刊1):104-105.
OU L, SONG Y, LI P, et al. The difference in sensitivity of SD rats and Wistar rats to ovalbumin and bovine serum albumin in PCA experiment [J]. Chin J Pharmacol Toxicol. 2013, 27 (Suppl 1):104-105.
- [17] 丁云录, 郑明昱, 南敏伦, 等. 基于ERK信号通路探讨鹿茸大补汤颗粒对哮喘缓解期豚鼠的调控及作用机制[J]. 中国老年学杂志, 2023, 43(21): 5309-5313. DOI: 10.3969/j.issn.1005-9202.2023.21.054.
DING Y L, ZHENG M Y, NAN M L, et al. Based on ERK signal pathway, this paper discusses the regulation and mechanism of Lulong Dabutang Granule on guinea pigs with asthma in remission stage[J]. Chin J Gerontol, 2023, 43(21): 5309-5313. DOI:10.3969/j.issn.1005-9202.2023.21.054.
- [18] ADNER M, CANNING B J, MEURS H, et al. Back to the future: re-establishing guinea pig in vivo asthma models[J]. Clin Sci, 2020, 134(11):1219-1242. DOI:10.1042/CS20200394.
- [19] WOODROW J S, SHEATS M K, COOPER B, et al. Asthma: the use of animal models and their translational utility[J]. Cells, 2023, 12(7):1091. DOI:10.3390/cells12071091.
- [20] 付晓, 覃骊兰, 钟海森, 等. 过敏性哮喘中医证候模型研究进展及评价[J]. 中国中医药信息杂志, 2019, 26(8):133-136. DOI: 10.3969/j.issn.1005-5304.2019.08.029.
FU X, QIN L L, ZHONG H S, et al. Research progress and evaluation about TCM syndrome models of allergic asthma [J]. Chin J Inf Tradit Chin Med, 2019, 26(8):133-136. DOI: 10.3969/j.issn.1005-5304.2019.08.029.
- [21] 陈馨馨, 李友林. 卵蛋白致敏新西兰家兔建立支气管哮喘模型[J]. 中华中医药学刊, 2011, 29(3):473-475. DOI: 10.13193/j.archtcm.2011.03.27.chenxx.068.
CHEN X X, LI Y L. Giving New Zealand rabbits celiac injection with ovalbumin to simulate bronchial asthma model[J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2011, 29(3):473-475. DOI: 10.13193/j.archtcm.2011.03.27.chenxx.068.
- [22] CHEN R C, ZHANG Q L, CHEN S Y, et al. IL-17F, rather than IL-17A, underlies airway inflammation in a steroid-insensitive toluene diisocyanate-induced asthma model[J]. Eur Respir J, 2019, 53(4):1801510. DOI:10.1183/13993003.01510-2018.

- [23] NIALS A T, UDDIN S. Mouse models of allergic asthma: acute and chronic allergen challenge[J]. *Dis Model Mech*, 2008, 1(4-5):213-220. DOI:10.1242/dmm.000323.
- [24] 王思齐, 包凯帆, 王晓钰, 等. 抗生素呼吸给药加重小鼠过敏性哮喘模型的建立[J]. *中国比较医学杂志*, 2019, 29(8):37-43. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7856.2019.08.006.
WANG S Q, BAO K F, WANG X Y, et al. Establishment of an allergic asthma model in mice using antibiotics administered via the respiratory tract[J]. *Chin J Comp Med*, 2019, 29(8):37-43. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7856.2019.08.006.
- [25] 黄超文, 赵强, 钟莲娣, 等. 三种哮喘小鼠动物模型的对比研究[J]. *齐齐哈尔医学院学报*, 2019, 40(11):1321-1323. DOI:10.3969/j.issn.1002-1256.2019.11.001.
HUANG C W, ZHAO Q, ZHONG L D, et al. Comparative study on three animal models of asthma in mice[J]. *J Qiqihar Med Univ*, 2019, 40(11):1321-1323. DOI:10.3969/j.issn.1002-1256.2019.11.001.
- [26] 崔海燕. AKT抑制剂MK2206对TDI哮喘小鼠气道炎症和气道重塑的作用及机制研究[D]. 广州: 南方医科大学, 2020. DOI:10.27003/d.cnki.gojyu.2020.000845.
CUI H Y. Effect and mechanism of AKT inhibitor MK2206 on airway inflammation and airway remodeling in TDI asthma mice[D]. Guangzhou: Southern Medical University, 2020. DOI: 10.27003/d.cnki.gojyu.2020.000845.
- [27] PARK H J, OH E Y, PARK Y H, et al. Potential of serum soluble CD93 as a biomarker for asthma in an ovalbumin-induced asthma murine model[J]. *Biomarkers*, 2018, 23(5): 446-452. DOI:10.1080/1354750X.2018.1443510.
- [28] 雷俊, 卢丽君, 罗玲艳, 等. 吴茱萸碱对哮喘模型大鼠炎症及上皮细胞凋亡的影响及机制[J]. *中国药房*, 2024, 35(11):1351-1356. DOI: 10.6039/j.issn.1001-0408.2024.11.12.
LEI J, LU L J, LUO L Y, et al. Effects of evodiamine on inflammation and apoptosis of airway epithelial cells in asthma model rats and its mechanism[J]. *China Pharm*, 2024, 35(11):1351-1356. DOI: 10.6039/j.issn.1001-0408.2024.11.12.
- [29] 陈颖. 支气管哮喘动物实验模型的研究现状[J]. *国外医学呼吸系统分册*, 2000, 20(3):154-156. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-436X.2000.03.016.
CHEN Y. Research status of animal experimental model of bronchial asthma[J]. *Foreign Med Sci Sect Respir Syst*, 2000, 20(3):154-156. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-436X.2000.03.016.
- [30] JI Y, FAN L, WU G H, et al. Spleen aminopeptides (FUKETUO) elevate the therapeutic effect of house dust mite desensitization on allergic asthma by inducing interleukin-10 positive regulatory T cells (IL-10⁺ Tregs) expression[J]. *J Thorac Dis*, 2024, 16(9):5981-5994. DOI:10.21037/jtd-24-398.
- [31] 郭妍蓉, 严彦. 二甲双胍和孟鲁司特在急性和慢性过敏性哮喘小鼠模型中的作用[J]. *中山大学学报(医学科学版)*, 2022, 43(6): 905-915. DOI: 10.13471/j.cnki.j.sun.yat-sen.univ(med.sci).2022.0606.
GUO Y R, YAN Y. Effects of metformin and montelukast in acute and chronic allergic asthma mouse models[J]. *J Sun Yat-sen Univ (Med Sci)*, 2022, 43(6): 905-915. DOI: 10.13471/j.cnki.j.sun.yat-sen.univ(med.sci).2022.0606.
- [32] JONCKHEERE A C, SEYS S F, STEELANT B, et al. Innate lymphoid cells are required to induce airway hyperreactivity in a murine neutrophilic asthma model[J]. *Front Immunol*, 2022, 13:849155. DOI:10.3389/fimmu.2022.849155.
- [33] LIU J Q, LIU L M, SUN J, et al. Icaritin protects hippocampal neurons from endoplasmic reticulum stress and NF- κ B mediated apoptosis in fetal rat hippocampal neurons and asthma rats[J]. *Front Pharmacol*, 2020, 10:1660. DOI:10.3389/fphar.2019.01660.
- [34] POLLARIS L, DEVOS F, DE VOOHT V, et al. Toluene diisocyanate and methylene diphenyl diisocyanate: asthmatic response and cross-reactivity in a mouse model[J]. *Arch Toxicol*, 2016, 90(7): 1709-1717. DOI: 10.1007/s00204-015-1606-6.
- [35] PANDEY V, YADAV V, SINGH R, et al. β -Endorphin (an endogenous opioid) inhibits inflammation, oxidative stress and apoptosis via Nrf-2 in asthmatic murine model[J]. *Sci Rep*, 2023, 13(1):12414. DOI:10.1038/s41598-023-38366-5.
- [36] 徐世军, 张三印, 代渊. 建立难治性哮喘动物模型的思路浅析[C]//中国中西医结合学会实验医学专业委员会, 华神集团技术中心, 华神集团企业博士后科研工作站. 第六次全国中西医结合实验医学学术研讨会会议论文集, 2002:312-316.
XU S J, ZHANG S Y, DAI Y. Brief analysis of the approach to establishing a refractory asthma animal model[C]//Experimental Medicine Professional Committee of the China Society of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Huashen Group Technology Center, Huashen Group Corporate Postdoctoral Research Station. Conference proceedings of the sixth national symposium on integrated traditional Chinese and Western medicine experimental medicine, 2002:312-316.
- [37] 文莎, 余晖, 吴峰, 等. TGF- β 1/Smads 信号通路在激素抵抗型哮喘小鼠动物模型中的活化[J]. *福建医药杂志*, 2023, 45(6):129-133. DOI:10.3969/j.issn.1002-2600.2023.06.044.
WEN S, SHE H, WU F, et al. Activation of TGF- β 1/smads signal pathway in animal model of hormone resistant asthma in mice[J]. *Fujian Med J*, 2023, 45(6):129-133. DOI:10.3969/j.issn.1002-2600.2023.06.044.
- [38] KIM S R, KIM D I, KANG M R, et al. Endoplasmic reticulum stress influences bronchial asthma pathogenesis by modulating nuclear factor κ B activation[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2013, 132(6):1397-1408. DOI:10.1016/j.jaci.2013.08.041.
- [39] KHUMALO J, KIRSTEIN F, SCIBIOREK M, et al. Therapeutic and prophylactic deletion of IL-4R α -signaling ameliorates established ovalbumin induced allergic asthma[J]. *Allergy*, 2020, 75(6):1347-1360. DOI: 10.1111/all.14137.

(收稿日期: 2024-08-21 修回日期: 2025-01-25)

(本文责任编辑: 丁宇菁)

【引用本文】

罗世雄, 张赛, 陈慧. 常见哮喘动物模型的建立方法与评价研究进展[J]. *实验动物与比较医学*, 2025, 45(2): 167-175. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.120.

LUO S X, ZHANG S, CHEN H. Research progress in establishment and evaluation of common asthma animal models[J]. *Lab Anim Comp Med*, 2025, 45(2): 167-175. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.120.

基于中西医临床病证特点的重症肌无力动物模型分析

陈钰涵¹, 陈瑾玲¹, 李欣^{2,3}, 区燕华^{2,3}, 王斯¹, 陈镜伊¹, 王兴易¹, 袁嘉丽¹, 段媛媛^{2,3}, 羊忠山¹, 牛海涛^{1,2,3}

[1. 云南中医药大学云南省中西医结合慢病防治重点实验室, 昆明 650500; 2. 病毒致病及防控教育部重点实验室(暨南大学), 暨南大学基础医学与公共卫生学院, 广州 510632; 3. 广州市无菌动物与微生态转化重点实验室, 暨南大学实验动物管理中心, 广州 510632]

[摘要] 重症肌无力 (myasthenia gravis, MG) 是一种自身免疫性疾病, 主要表现为骨骼肌无力, 严重时可累及呼吸功能。目前, 西医治疗 MG 以免疫抑制剂为主, 但长期用药的不良反应显著; 而中医治疗具有多靶点干预的优势。由于 MG 的发病机制尚未完全明确, 因此建立契合中西医临床特征的动物模型对机制研究及新药开发至关重要。本文系统梳理了 MG 的中西医病因病机、诊断标准及动物模型研究进展。西医认为 MG 发病与遗传易感性、环境因素及自身抗体介导的突触后膜损伤密切相关; 中医则将其归为“痿证”, 病机为先天禀赋不足与后天失养。西医诊断需综合典型症状、疲劳试验、血清抗体检测及电生理检查; 中医诊断则以主症结合次症及舌脉辨证分型。现有动物模型以实验性自身免疫性重症肌无力 (experimental autoimmune myasthenia gravis, EAMG) 和被动转移重症肌无力 (passive transfer myasthenia gravis, PTMG) 为主。其中, 电鳗乙酰胆碱受体 (acetylcholine receptor, AChR) 诱导的 EAMG 模型与西医诊断标准吻合度较高, 但中医证候吻合度不足; 人工合成 AChR 多肽模型应用广泛, 但中医证候吻合度低; 肌肉特异性酪氨酸激酶 (muscle-specific tyrosine kinase, MuSK)、低密度脂蛋白受体相关蛋白 4 (low density lipoprotein receptor associated protein 4, LRP4) 诱导模型及转基因模型创新性强, 但临床吻合度偏低。模型评估需结合行为学、电生理及免疫指标, 而中医证候模型尚缺系统性构建。笔者认为, 未来研究需融合中医病因学造模法与西医病理机制, 构建病证结合模型, 并建立基于“以方验证”的中医证候评价体系, 结合新兴技术提升模型科学性与实用性。本文将为优化 MG 动物实验设计、推动中西医结合研究提供理论依据, 也为中药复方疗效评价及机制探索奠定基础。

[关键词] 重症肌无力; 病证结合; 诊断标准; 动物模型; 吻合度

[中图分类号] R-332; Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2025)02-0176-11



Analysis of Animal Models of Myasthenia Gravis Based on Its Clinical Characteristics in Chinese and Western Medicine

CHEN Yuhan¹, CHEN Jinling¹, LI Xin^{2,3}, OU Yanhua^{2,3}, WANG Si¹, CHEN Jingyi¹, WANG Xingyi¹, YUAN Jiali¹, DUAN Yuanyuan^{2,3}, YANG Zhongshan¹, NIU Haitao^{1,2,3}

(1. Yunnan Key Laboratory of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine for Chronic Diseases in Prevention Treatment, Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650500, China; 2. Key Laboratory of Viral Pathogenesis and Infection Prevention and Control (Jinan University), Ministry of Education, School of Medicine, Jinan University, Guangzhou 510632, China; 3. Guangzhou Key Laboratory of Germ-free Animals and Microbiota Application, Laboratory Animal Center, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

[基金项目] 科技部重点研发计划“重要消化道肿瘤、免疫疾病小鼠模型的研发与功能机制研究”(2022YFF0710701); 科技部重点研发计划“重要神经退行性疾病和免疫疾病大鼠模型的研发与功能机制研究”(2022YFF0710702); 广州市重点研发计划项目“小檗碱调节肠道微生物影响心血管病发病关系研究”(202206010157); 广州市校联合项目“广州市无菌动物与微生态转化重点实验室项目”(202201020381); 暨南大学医学联合基金“食物相关肾小球疾病致病抗原的质谱鉴定及发病机制研究”(YXJC2022004)

[第一作者] 陈钰涵 (1999—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 肠道微生态与机体免疫系统互作研究以及抗肿瘤免疫微生态研究。E-mail: chenyu22900442@163.com

[通信作者] 牛海涛 (1970—), 男, 教授, 博士生导师, 研究方向: 肠道微生态与机体免疫系统互作研究。E-mail: htniu@jnu.edu.cn。ORCID: 0000-0003-2210-2051

Correspondence to: NIU Haitao (ORCID: 0000-0003-2210-2051), E-mail: htiniu@jnu.edu.cn

[ABSTRACT] Myasthenia gravis (MG) is an autoimmune disease characterized primarily by skeletal muscle weakness and, in severe cases, respiratory involvement. Western medical treatment predominantly relies on immunosuppressants, but long-term administration often leads to notable side effects. In contrast, traditional Chinese medicine (TCM) offers the advantage of multi-target interventions. However, the pathogenesis of MG has not been fully elucidated, and the establishment of animal models that accurately reflect the clinical characteristics of both Chinese and Western medicine is essential for mechanism research and new drug development. This paper systematically reviews the etiology and pathogenesis, diagnostic criteria, and progress of animal model research for MG from both Chinese and Western medicine perspectives. In Western medicine, the pathogenesis of MG is closely related to genetic susceptibility, environmental factors, and autoantibody-mediated postsynaptic membrane damage. In TCM, MG is classified under the category of "flaccidity syndrome", attributed to congenital deficiencies and acquired malnourishment. Western diagnostic criteria involve a combination of clinical symptoms, fatigue testing, serum antibody assays, and electrophysiological evaluation. In contrast, TCM diagnosis emphasizes the integration of primary and secondary symptoms with tongue and pulse pattern differentiation. Currently available animal models mainly include experimental autoimmune myasthenia gravis (EAMG) and passive transfer myasthenia gravis (PTMG). The Torpedo acetylcholine receptor (AChR) induced EAMG model aligns well with Western diagnostic criteria, but poorly matches secondary symptoms in TCM. The synthetic AChR peptide model is widely used, but shows low conformity with TCM syndromes. Models induced by muscle-specific tyrosine kinase (MuSK), low-density lipoprotein receptor-related protein 4 (LRP4), and transgenic models demonstrate high innovation but exhibit low clinical conformity. Evaluation of these models requires integration of behavioral, electrophysiological, and immunological indicators. However, a systematic framework for modelling TCM syndromes is still lacking. Future research should integrate TCM-based etiological modelling methods with the Western pathological mechanisms to construct disease-syndrome combination models. Additionally, it is crucial to establish a TCM syndrome evaluation system based on "validation by prescription", as well as to improve the scientific rigor and practicality of animal models by the incorporation of emerging technologies. This review provides a theoretical foundation for optimizing MG animal model design, advancing the research on the combination of Chinese and Western medicine, and supporting efficacy assessment and mechanism exploration of Chinese herbal prescriptions.

[Key words] Myasthenia gravis; Disease-syndrome combination; Diagnostic criteria; Animal model; Conformity

重症肌无力 (myasthenia gravis, MG) 是一种自身免疫性疾病, 其特征是神经与肌肉接头间的信号传递受到阻碍, 导致部分甚至全身骨骼肌无力的症状。其主要临床表现为肌无力且运动后加剧, 因此该症状通常在早晨较轻, 晚上加重。眼外肌是最常见的受影响部位, 常表现为上睑下垂和复视。大多数患者最终会出现全身性肌无力, 但呼吸肌无力较为罕见且严重^[1]。根据流行病学数据分析得知, MG 的发病率和患病率在逐年升高, 且与年龄、性别、遗传以及环境等因素密切相关^[2]。西医治疗的手段主要分为非药物治疗和药物治疗, 非药物治疗主要包括血浆置换法、胸腺切除术、干细胞以及基因治疗法等新的治疗手段, 这些疗法逐渐被研究及应用; 药物治疗方面, 临床上常应用的药物包括乙酰胆碱酯酶抑制剂、糖皮质激素

和免疫抑制剂等, 均可有效缓解 MG 的症状^[3]。但长期的西药应用会造成一定的不良反应, 在一定程度上降低患者的生活质量。若从中医的角度去认识 MG, MG 病机为先天禀赋不足、后天失养, 致脾肾肝虚衰, 气血阴阳亏损, 久虚络瘀成痿; 治当补虚通络, 以健脾益气、养血生津、活血疏络为法, 遵循“治痿独取阳明”并调肝肾精血的原则^[4]。随后, 依照君臣佐使之法, 配伍中药, 施以治之。已有研究表明, 中药改善 MG 症状疗效显著, 具有多靶点、不良反应少等优势^[5]。因此, 中西医结合防治 MG 具有重要意义。

动物模型的发展对于 MG 疾病的研究具有重要意义。目前, 现代医学对 MG 的发病过程以及发病机制尚未研究清楚, 因此建立吻合临床的中西医病证结合 MG 动物模型, 对中西医防治研究至关重要。本文旨在

分析MG的中西医临床特征，并综合评估现有的MG动物模型，对比其与中西医症状的吻合度，能更好地为中西医病证结合的MG模型建立动物实验研究以及新药开发提供基础，同时也有利于更全面地认识MG疾病的本质。

1 重症肌无力的中西医病因病机

1.1 西医病因病机

目前，诱发MG的主要风险因素为遗传因素、环境因素以及性激素水平的波动，其中环境因素包括外来病原微生物的感染^[1]。尽管国内外许多学者已经对MG发病原因以及病理机制进行了深入研究，但其病因病机尚未完全明确。目前已明确的机制有2种，且都与MG相关的自身抗体有关，一种是乙酰胆碱受体（acetylcholine receptor, AChR）抗体可以激活补体，生成一种可导致突触后膜损伤的复合物^[6]，同时抗乙酰胆碱受体抗体（acetylcholine receptor antibody, AChR-Ab）可与AChR交联，加速AChR的内化以及降解，部分AChR-Ab甚至可以直接阻断AChR的结合位点^[7]；而另一种抗肌肉特异性酪氨酸激酶（muscle-specific tyrosine kinase, MuSK）抗体不会激活补体，但可以阻止MuSK和低密度脂蛋白受体相关蛋白4（low density lipoprotein receptor associated protein 4, LRP4）以及其他蛋白的相互作用，从而导致突触后膜上的AChR聚集密度减少^[8]。上述2种机制最后都会影响神经肌肉接头处的信号传递，导致肌肉收缩无力进而诱发MG。

1.2 中医病因病机

MG在中医学上无统一病名，但根据四肢肌肉痿软无力，甚至全身肌肉萎缩瘫痪等临床症状，可以将其归属于痿证、睑废、视歧、上胞下垂、暗瘕和头倾等范畴^[9]。现代医家多从痿证来论治^[10]，其病因病机

可归结为先天禀赋不足与后天失养，累及多脏腑功能失调。先天不足多责之于肾精亏虚与脾胃虚弱，因肾为先天之本，主藏精生髓；脾为后天之本，主化生气血。若肾精不足则髓海空虚，脾胃虚弱则气血生化乏源，精亏血少无以濡养筋脉肌肉，发为痿证^[11-12]。后天失养则与饮食劳倦或情志内伤密切相关，如饮食不节损伤脾胃，运化失司则水谷不化，湿浊内生，阻滞气机；久病及肝，肝失疏泄则气血运行不畅，筋脉失于濡润，渐致痿弱^[13]。此外，外感风、火、湿、燥等邪气^[14]，既可困阻脾胃，耗伤中气，亦可扰动肝肾，耗损阴精，如湿热下注劫伤肾阴，或肝郁化火灼耗精血，终致气虚不升、精亏络瘀，发为痿病。此过程需分论脏腑病机：脾胃气虚则升举无力，症见肢体下垂、乏力；肝肾阴虚则筋骨失养，症见肌肉消瘦、颤动；脉络瘀阻则血不荣筋，症见麻木僵硬，故治疗须辨证论治。

2 重症肌无力的诊断标准

2.1 西医诊断标准

西医在诊断疾病时，通常会结合实验室检查和影像学检查结果，综合考量患者的临床症状和体征，并参考患者的病史，最终进行诊断。本文参照《中国重症肌无力诊断和治疗指南（2020版）》^[15]以及《重症肌无力诊断和治疗中国专家共识》^[16]的要求，拟定MG的西医诊断标准，其中MG典型的临床特征、疲劳试验阳性以及冰敷试验阳性等临床试验结果为必备条件，若药理学、电生理、血清抗体或胸腺影像检测的任意一项检测结果为阳性或异常，即可诊断为MG。因MG还未有可供参考的模型评价新方法，因此根据临床对MG诊断的标准对表格中的指标进行赋分，其中典型临床特征以及临床试验各赋分20%，剩下的指标各赋分15%，共计100%。具体内容见表1。

表1 重症肌无力西医诊断标准

Table 1 Western medical diagnostic criteria for myasthenia gravis

序号	指标分类	临床表现
Number	Classification of indicators	Clinical manifestation
①	典型临床特征(20%)	局部或全身肌群出现波动性疲劳无力,且在休息后稍有减轻
②	临床试验(20%)	让受累肌群进行持续活动后,肌肉无力症状加重即为疲劳试验阳性;冰敷受累肌群,肌无力症状明显减轻与改善即为冰敷试验阳性
③	药理学检查(15%)	肌内注射胆碱酯酶抑制剂甲基硫酸新斯的明后,以改善最显著时的单项绝对分数计算相对评分,各单项相对评分有一项为阳性者,即为新斯的明试验阳性
④	电生理检查(15%)	采用低频重复电刺激神经干,波幅衰减10%以上为阳性;单纤维肌电图测定“颤抖”研究神经-肌肉传递功能,“颤抖”增宽或阻滞为阳性
⑤	血清学抗体检测(15%)	可以检测到AChR抗体阳性或者Titin抗体阳性,极少部分可以检测到MuSK抗体阳性或者LRP4抗体阳性
⑥	胸腺影像学检查(15%)	胸腺CT提示胸腺增生或胸腺瘤

注：AChR，乙酰胆碱受体；MuSK，肌肉特异性酪氨酸激酶；LRP4，低密度脂蛋白受体相关蛋白4。

Note: AChR, acetylcholine receptor; MuSK, muscle-specific tyrosine kinase; LRP4, low density lipoprotein receptor associated protein 4.

2.2 中医诊断标准

中医诊断标准参照2008年中华中医药学会发布的《中医内科常见病诊疗指南》^[17]（西医疾病部分）、《中医内科学》（第10版）、痿病（重症肌无力）中医诊疗方案（2018年版）以及文献[18]中关于痿病与痿证的标准来制定。MG在中医诊断中具体表现的主症为：①上胞下垂；②视歧；③四肢痿软无力；④言语謇涩；⑤咀嚼和吞咽困难；⑥严重时可出现呼吸困难。次症是依据各四肢痿软无力型来变化的，证型不同，次证不同，包括：①纳呆、少气懒言；②腰膝酸软、畏寒肢冷；③五心烦热，

自汗、盗汗；④少寐多梦；⑤面色变化，如面色萎黄或无华；⑥二便变化。凡主症具有2项或以上（上胞下垂与四肢痿软无力必备其一），次症具有2项或以上，同时舌质和脉象基本符合，即可诊断。依据中医诊断标准可以将MG的中医辨证分型分为以下8类：脾胃气虚证，脾肾两虚证，肝肾亏虚证，气血亏虚证，肺脾气虚证，湿邪困脾证，瘀血阻络证，大气下陷证。大气下陷证为急危重症在临床不太常见。以上证型分类具体内容见表2，在判断与中医临床诊断标准吻合度时，符合主症一项赋值15%，符合次症一项赋值5%，共计100%。

表2 重症肌无力中医辨证分型
Table 2 Syndrome differentiation of myasthenia gravis in traditional Chinese medicine

辨证分型	主证	次证	舌脉
Syndrome differentiation	Main syndrome	Secondary syndrome	Pulse and tongue
脾胃气虚证 Spleen and stomach qi deficiency syndrome	① 上胞下垂，视歧； ② 肢体痿软无力； ③ 言语謇涩、咀嚼和吞咽困难	① 神疲乏力；② 胸闷气短；③ 纳呆；④ 便秘或排便无力；⑤ 面色萎黄；⑥ 腕腹胀	舌淡、苔薄白、脉细弱
脾肾两虚证 Spleen and kidney deficiency syndrome	① 上胞下垂； ② 四肢倦怠无力； ③ 吞咽困难，口齿不清	偏阴虚：① 腰膝酸软；② 自汗或盗汗；③ 口干咽燥，五心烦热；④ 纳差；⑤ 小便色黄，大便干结。 偏阳虚：① 腰膝酸软，腹部冷；② 下利清谷；③ 畏寒身冷；④ 小便清长夜尿多，大便稀溏	偏阴虚：舌红，少苔，脉细数； 偏阳虚：舌质淡胖，苔淡胖，脉沉迟少力
肝肾亏虚证 Liver and kidney deficiency syndrome	① 上胞下垂、复视或斜视或视物不清； ② 肌肉萎缩	① 五心烦热，目干涩，口干咽燥；② 乏力；③ 音暗；④ 头晕、耳鸣；⑤ 腰膝酸软；⑥ 肌萎缩；⑦ 遗精或月经不调	舌红、苔薄或无苔、脉细数
气血亏虚证 Qi and blood deficiency syndrome	① 上胞下垂； ② 四肢软弱无力或全身无力，行动困难	① 面色无华；② 神疲乏力；③ 气短声低；④ 心悸；⑤ 自汗	舌淡、苔薄白、脉细弱
肺脾气虚证 Lung and spleen qi deficiency syndrome	① 上胞下垂； ② 肢体痿软无力	① 咳嗽；② 痰多；③ 易感冒；④ 自汗或盗汗	舌淡、苔白、脉细弱
瘀血阻络证 Blood-stasis obstruction syndrome	①上胞下垂、复视或斜视； ②行动不便	① 眼球活动不灵；② 畏光；③ 消瘦	舌暗淡、苔少、脉弦细
大气下陷证 Pectoral qi collapse syndrome	① 上胞下垂； ② 颈软头倾，全身无力； ③ 吞咽困难，构音困难； ④ 呼吸困难	① 喘脱；② 汗出频频；③ 咳痰无力或不能；④ 唇甲发绀；⑤ 重者不能平卧，甚至俯仰难合；⑥ 精神烦躁；⑦ 呼吸急促张口抬肩，危重期则呼吸微弱表浅；⑧ 意识障碍	舌质淡或暗，舌体胖大或有齿痕，苔薄白或少苔或黄厚腻，脉滑数或脉沉细或沉细尺弱
湿邪困脾证 Dampness traps the spleen syndrome	① 上胞下垂，眼胞肿胀； ② 肢体倦怠无力困重	① 胸膈痞闷；② 面晦纳垢；③ 纳呆便溏	舌胖大，苔白腻，舌边有齿痕，脉濡缓或滑

3 重症肌无力实验动物模型分析

3.1 实验动物选择依据

MG动物模型研究发展至今，已在大鼠、小鼠、兔

和普通猕猴等动物身上成功建立和复制。其中鼠类为MG模型中常用的研究对象^[19]。鼠类因其基因与人类同源性高、成本较低、易于饲养、易于管理、繁殖速度快和病变过程与人类MG相似等优势，经常作为MG

实验研究的模型动物。其中大鼠以Lewis大鼠为代表,该鼠种抵抗感染能力强,同时也是MG高敏感品系,成模后与人MG相似度高,发病时有急性期和缓解期之分,疾病发展进程快且表现症状严重,因此被广泛应用于建立实验性自身免疫性重症肌无力(experimental autoimmune myasthenia gravis, EAMG)的模型^[20-21]。以C57BL/6品系为代表的小鼠,该鼠也是MG高敏感鼠品系,因其具有典型的免疫系统、易于人为调控免疫条件和能够明确区分淋巴细胞的多种功能亚型等特性^[22],且造模过程中其易感性高而常被应用于MG研究中。与小鼠相比,大鼠更易出现急性反应期和更严重的肌无力症状^[23]且成模率高;而小鼠造模率相对较低,可能与神经肌肉接头处神经细胞释放大量乙酰胆碱所致的高安全系数有关^[24]。据临床病例统计,女性MG患者多于男性患者^[25],因此MG模型动物在性别选择上,多选择雌性,相较于雄性而言更易诱发MG^[26]。在年龄选择上,以鼠类为例,一般为6~8周龄^[27],基于自身免疫机制,B淋巴细胞对AChR的记忆反应可能会降低年老小鼠建立肌无力模型的成功率,因此造模时应选择适龄动物作为实验研究对象。在构建MG动物模型时常选择体重140~180 g的雌性Lewis大鼠和体重14~16 g的雌性C57BL/6小鼠。体重对自身抗体胞外有效浓度具有决定性作用^[28],而该浓度是影响突触传递效率的关键因素之一^[7]。因此,在建立MG动物模型时,应依据实验目标和具体条件,挑选合适的动物品种品系及相应年龄、体重的动物作为建模对象。

3.2 重症肌无力动物模型与临床特点的吻合度

MG动物模型通常是通过主动免疫或被动免疫法以及基因工程来建立模型。常见的模型类型主要为2大类,一类为EAMG模型,另一类则被动转移重症肌无力(passive transfer myasthenia gravis, PTMG)模型。根据其具体造模方法及原理可分为以下14类:电鳗AChR诱导的EAMG模型,人工合成AChR多肽构建EAMG模型,被动转移EAMG鼠血清中的AChR-Ab建立的PTMG模型,用MG患者血清及血清内成分建立PTMG模型,利用杂交瘤细胞株制备单克隆抗体建立PTMG模型,向实验动物脑室中注入MG患者AChR-Ab建立PTMG模型,通过MG患者胸腺组织移植建立PTMG模型,通过移植MG患者外周淋巴细胞建立PTMG模型,MuSK诱导的EAMG模型,重组人AChR建立EAMG模型^[29],采用核酸疫苗建立EAMG模型,利用转基因小鼠神经肌肉接头(neuromuscular junction,

NMJ)局部产生的 γ 干扰素(interferon- γ , IFN- γ)建立EAMG模型,利用人免疫球蛋白转基因小鼠构建EAMG模型,以及LRP4诱导的EAMG模型^[30]。其具体的造模方法、造模原理、特点、吻合度及应用情况^[31-52]如表3所示。

总体来看,每种模型都有其优势和局限性,选择哪种模型取决于研究的具体目标和可用资源。若研究的重点是模拟人类MG的发病过程和药物开发,则会选择成模率高、与人类发病症状相似度高的模型,如电鳗AChR诱导的EAMG模型;若研究重点是快速筛选且资金有限,则会选择操作简便、成本低廉的模型,如人工合成AChR多肽构建的EAMG模型。对于需要长期观察的研究,则需要选择症状维持时间较长的模型;而对于研究特定免疫反应或病理机制,就需要更特定的模型,如MuSK诱导的EAMG模型或LRP4诱导的EAMG模型。

3.3 重症肌无力模型评判指标

判断模型MG模型是否构建成功,主要从以下8方面评估:临床方面的变化,包括动物体重及肌力,精神状态、毛色、步态、日常活动、咀嚼摄食情况和呼吸频率等^[53];行为学指标,包括游泳试验、抓握试验和悬吊试验等;新斯的明试验;AChR抗体浓度及滴度检测,与正常鼠相比浓度会升高;电生理改变,低频率重复电刺激(Low-frequency repetitive electrical stimulation)、肌电图等,会出现典型的MG病理改变;病理形态学观察,骨骼肌神经肌肉接头处病理改变,例如突触前膜与后膜面积是否有改变,突触间隙是否有增宽,突触后膜褶皱是否有变化以及AChR的密度变化等;血清胆红素和尿酸的测量^[54];细胞免疫因子水平的检测,常选用转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)、IFN- γ 、白细胞介素(interleukin, IL)-1 β 、IL-2、IL-4、IL-6、IL-10和IL-17等因子作为检测指标^[27]。

4 讨论和总结

目前,建立MG动物模型的方法还在不断探索和发展中,研究者们仍在努力建立合适的动物模型为MG的发病机制以及临床治疗提供可靠研究对象。总结现有的模型建立方法有约16种,中西医吻合度各不相同,根据建立方法主要分为主动免疫法和被动免疫法。在这多种模型中,当属电鳗AChR诱导的EAMG模型最为经典。但因从电鳗身上提取AChR难度较高,该模型逐渐被人工合成AChR多肽构建的EAMG模型所取

表3 常见重症肌无力动物模型中西医临床病证特点吻合度分析

Table 3 Analysis of the conformity between common animal models of myasthenia gravis and clinical symptoms in Chinese and Western medicine

模型类型 Model types	动物 Animal	造模方法及原理 Modeling method and principle	模型优缺点 Model advantages and disadvantages	与临床病证特点的吻合度 Conformity with clinical disease characteristics
电螬AChR诱导的EAMG模型 AChR-induced EAMG model using the electric ray	Lewis大鼠	从电螬的电器官分离纯化AChR后,与含有结核分枝杆菌的弗氏完全佐剂(Freund's complete adjuvant, FCA)充分混合,在实验大鼠的足垫、腹部及背部皮下多点注射乳剂。用类似方法再行2~3次增强免疫 ^[27] 。通过提取出的AChR诱导大鼠产生自身免疫反应	优点为典型模型,成模率高,可行性强,与人类的发病进程相似度高 ^[31] ,主要适用于MG的发病机制以及药物开发方面的研究 ^[32] ; 缺点为操作复杂、制备成本高、不易推广,同时成模后在选择合适干预治疗MG的时间窗方面存在困难 ^[33-34]	符合西医的有①、②、③、④、⑤,吻合度85%; 符合中医主证的有①、③、⑤; 符合中医次证的有⑥,总体吻合度50%
人工合成AChR多肽构建的EAMG模型 Model of AChR-induced EAMG using synthetic AChR peptide	Lewis大鼠	将人工合成的肽段(一般常用肽段为 α 97~116以及 α 129~145肽段)与等量FCA充分混匀制成乳剂于大鼠手足垫多点注射,一个月后加强免疫一次 ^[35] ;通过合成多肽作为免疫原诱导大鼠产生特异性的免疫反应	优点为操作简单,方法简便,成本相对低,模型易于复制,成模率高,且该模型有利于MG发病机制和治疗药物的研究 ^[36] ; 缺点为实验周期较长、表现的肌无力症状较轻 ^[37]	符合西医:的有①、②、③、④、⑤,吻合度85%; 符合中医主症的有①、③、⑤; 符合中医次症的有⑥,总体吻合度50%
被动转移EAMG鼠血清中的AChR-Ab建立的PTMG模型 Model of PTMG by passive transfer of AChR-Ab in the serum of EAMG rats	Lewis大鼠	从EAMG大鼠血清中获得IgG,将抗体稀释于生理盐水后,注射到大鼠颈静脉中 ^[38] ,使大鼠被动获得抗AChR-Ab,获得MG的病理特征	优点为成模率高,成模速度快,适合短期快速实验; 缺点为因为需要已成模的EAMG大鼠,因此不适合首次实验。而且该模型维持肌无力的症状时间短,不适合长期实验	符合西医的有①、③、④、⑤,吻合度65%; 符合中医主症的有①、③、⑤,吻合度45%
用MG患者血清及血清内成分建立PTMG模型 Model of PTMG with serum and intraserum components from MG patients	BALB/c小鼠	收集未使用过激素治疗的AChR-Ab阳性和阴性的MG患者血液,分离血清后以每次0.8 mL注射小鼠,连续7 d,在初次注射血清后24 h后,再腹腔注射环磷酰胺300 mg/kg。通过使用该方法,使小鼠获得MG的病理特征	优点为造模时间短,制备成本低,制备方法简单,适合短期研究; 缺点为血清来源难以获得,患者存在异质性,模型结果评定以及实验标准化困难,同时血清中存在各种免疫蛋白及炎症介质,不能保证单因素影响	符合西医的有①、③、④、⑥,吻合度65%; 符合中医主症的有③、⑤; 符合中医次症的有⑤、⑥,总体吻合度40%
利用杂交瘤细胞株制备单克隆抗体建立PTMG模型 Establishment of a PTMG model using hybridoma cell lines for the preparation of monoclonal antibodies	Lewis大鼠	AChR单抗mAb35/mAbA7/mAbG10杂交瘤细胞株腹腔注射 ^[39-40] ,从而模拟MG的自身免疫反应	优点为建模时间短,发病率高,易于评估,适合进行短期研究	符合西医的有①、③、⑤,吻合度50%; 符合中医主症的有①、③、⑤,吻合度45%
向实验动物脑室中注入MG患者AChR-Ab建立PTMG模型 Establishment of a PTMG model by injection of AChR-Ab from MG patients into the brain ventricles of experimental animals	SD大鼠	收集MG患者血清提取AChR-Ab,将其注入大鼠侧脑室,隔日重复,共3次。大约2周后建立CNS损害的大鼠模型 ^[26,35] 。其原理为诱导大鼠产生类似于人类MG的神经肌肉接头传递障碍	优点为该模型的建立为阐明MG中枢神经系统损害的机制提供依据; 缺点为操作复杂且难度高,同时对实验环境与条件要求严格	符合西医的有①、③、④、⑤,吻合度65%; 符合中医主症的有③; 符合中医次症的有⑥,总体吻合度20%

续表				
模型类型 Model types	动物 Animal	造模方法及原理 Modeling method and principle	模型优缺点 Model advantages and disadvantages	与临床病症特点的吻合度 Conformity with clinical disease characteristics
通过 MG 患者胸腺组织移植建立 PTMG 模型 Establishment of a PTMG model by thymus tissue transplantation from MG patients	NOD/SCID 小鼠	将 MG 患者的完整胸腺组织移植到严重联合免疫缺陷小鼠 (NOD/SCID) 小鼠肾被膜下 ^[41-42] 。其原理主要基于胸腺在 MG 发病机制中的作用, 异常胸腺组织能产生自身反应性 T 细胞和产生 AChR-Ab 的 B 细胞, 从而导致神经肌肉接头传递障碍。因此移植 MG 患者的胸腺组织, 从而模拟 MG 的病理特征	优点为该方法为胸腺致敏机制打下基石; 缺点为胸腺细胞虽然参与了 MG 的发病过程, 但不是 MG 唯一的致病因素	符合西医的有 ①、③、④、⑥, 吻合度 65%; 符合中医主症的有 ③; 符合中医次症的有 ⑥, 总体吻合度 20%
通过移植 MG 患者外周淋巴细胞建立 PTMG 模型 Establishment of a PTMG model by transplantation of peripheral lymphocytes from MG patients	NOD/SCID 小鼠	将 MG 患者血淋巴细胞进行腹腔注入 NOD/SCID 小鼠体内 ^[43] 。移植的淋巴细胞在免疫缺陷小鼠体内植入, 并开始对宿主的神经肌肉接头产生免疫反应	优点为 CD4 ⁺ T 细胞在 MG 发病中的作用提供了依据	符合西医的有 ①、④、⑤, 吻合度 50%; 符合中医主症的有 ⑤; 符合中医次症的有 ⑥, 总体吻合度 20%
MuSK 诱导的 EAMG 模型 MuSK-induced EAMG model	C57BL/6J 小鼠或 Lewis 大鼠	以大鼠 <i>MuSK</i> 基因编码序列为模板合成小鼠 MuSK 抗原, 采取主动免疫法将小鼠 MuSK 与 FCA 混合制成抗原乳剂, 通过尾静脉或腹腔注射入小鼠体内, 28 d 后重复注射一次 ^[44] 。另一种方法则是采用被动转移法来建立模型, 将 MuSK 阳性患者血清 IgG 通过腹腔注射入实验鼠体内连续 5 d 以上, 首次注射后 24 h, 需另外注射环磷酰胺 300 mg/kg ^[45] 。类似此种方法的还有每日腹腔注射 MuSK 阳性患者血清中提纯的 IgG4 ^[46] 以及从成年小鼠肌肉克隆的 MuSK 的 cDNA 筛选一种变异亚型并将其命名为 MuSK 60, 随后将该亚型注射进大鼠腹腔 ^[47] 。免疫后的实验动物体内会产生针对 MuSK 的自身抗体, 这些抗体会攻击神经肌肉接头, 导致 AChR 簇的解体, 进而影响神经肌肉传递, 引发肌无力症状	缺点为 MuSK 抗体介导的 MG 的具体机制尚未完全明确, 动物模型还处于研究阶段, 且与 AChR 诱导的模型相比, 发病率偏低且模型不成熟	符合西医的有 ①、③、④、⑤, 吻合度 65%; 符合中医主症的有 ①、③、⑤, 总体吻合度 45%
重组人 AChR 建立 EAMG 模型 Recombinant human AChR modelling of EAMG	Lewis 大鼠	将人工合成的人 AChR α 亚基 1~210 片段通过质粒转染的方法获得融合蛋白, 并将其与等体积 FCA 制成乳剂, 于大鼠肩背足垫等处多点注射 ^[48] 。大鼠的免疫系统将识别这些含了 AChR 的免疫原性序列蛋白作为抗原, 并产生特异性的免疫反应	优点为成模率高, 免疫原充足, 操作简便, 成本低廉	符合西医的有 ①、③、⑤, 吻合度 50%; 符合中医主症的有 ①、③、⑤; 符合中医次症的有 ⑥, 总体吻合度 50%

续表				
模型类型 Model types	动物 Animal	造模方法及原理 Modeling method and principle	模型优缺点 Model advantages and disadvantages	与临床病症特点的吻合度 Conformity with clinical disease characteristics
采用核酸疫苗建立 EAMG 模型 Modelling EAMG using nucleic acid vaccines	C57BL/6J 小鼠 ^[49]	核酸疫苗通过将克隆靶抗原编码的基因或 DNA 片段加入到如质粒、噬菌体等载体中去,然后向实验动物体内注入重组后的载体,而使得机体表达靶抗原基因,从而激活机体的免疫系统,产生相应的体液和细胞免疫。可以诱导小鼠的免疫系统识别并产生针对 AChR 的抗体,从而模拟 MG 的病理过程	优点为免疫原性好,可以产生较强的持久性免疫应答; 缺点为表现出的肌无力症状不严重,操作困难,同时该造模技术方法尚在探索和完善阶段	符合西医的有①、⑤,吻合度 35%; 符合中医主症的有③,总体吻合度 15%
利用转基因小鼠神经肌肉接头局部产生的 IFN- γ 建立 EAMG 模型 Establishment of an EAMG model using locally produced IFN- γ in transgenic mice neuromuscular junction	BALB/c 小鼠	将鼠 <i>IFN-γ</i> 基因与调节性片段——鼠 <i>nAChR ϵ</i> 基因融合,构建 DNA 质粒,植入小鼠卵母细胞,使新生小鼠在神经接头处表达该基因并产生 IFN- γ ^[50] 。其原理为 IFN- γ 的过量产生可能导致局部免疫细胞的活化,如增加巨噬细胞和 T 细胞的浸润,这些免疫细胞会对神经肌肉接头造成损伤,进而影响神经信号的传递,引发 MG 的发生	优点为该模型为探索研究性模型,证明了 MG 的发病与 IFN- γ 有关,表现出的症状以及指标与人类 MG 相似度高; 缺点为典型性不足,操作复杂有难度	符合西医的有①、③、④、⑤,吻合度 65%; 符合中医主症的有①、③、⑤; 符合中医次症的有⑤、⑥,总体吻合度 55%
利用人免疫球蛋白转基因小鼠构建 EAMG 模型 Construction of an EAMG model using human immunoglobulin transgenic mice	C57BL/6J 小鼠	建立了表达人免疫球蛋白的转基因小鼠,并将由电螯电器官提纯的 AChR 与 FCA 一起,于第 0、3、5 周皮下注射该小鼠 ^[51] 。这将使小鼠产生人源性抗 AChR 抗体,模拟 MG 患者体内的免疫病理过程	优点为该模型产生的抗体均为人源性抗体,在免疫学上更接近人 MG; 缺点为成本高,操作难,模型尚未成熟	符合西医的有①、③、④、⑤,吻合度 65%; 符合中医主症的有①、③、⑤; 符合中医次症的有⑤、⑥,总体吻合度 55%
LRP4 诱导的 EAMG 模型 Model of LRP4-induced EAMG	C57BL/6 小鼠	通过单体集聚蛋白与 LRP4 相互作用形成二元复合物,协同 LRP4 诱导的 MG 模型促进四聚体形成,从而影响运动神经元末梢释放集聚蛋白诱导的 AChR 聚集 ^[52] ,影响神经信号的传递,引发肌无力症状	优点为该模型为研究探索性模型,为 LRP4 参与 MG 发病提供了依据; 缺点为成本高,模型稳定性不足	符合西医的有①、③、④,吻合度 50%; 符合中医主症的有③,总体吻合度 15%

注: AChR, 乙酰胆碱受体; EAMG, 实验性自身免疫性重症肌无力; PTMG, 被动转移重症肌无力; AChR-Ab, 抗乙酰胆碱受体抗体; MG, 重症肌无力; MuSK, 肌肉特异性酪氨酸激酶; IFN- γ , γ 干扰素; LRP4, 低密度脂蛋白受体相关蛋白 4; IgG, 免疫球蛋白 G。本文根据 MG 西医诊断标准及中医辨证分型, 根据临床的标准进行赋分, 结合文献中动物模型的一般表现及检测指标计算其吻合度, 同时将模型吻合度分为高中低三项, 临床吻合度 $\geq 70\%$ 为高, $50\% \sim 70\%$ 为中, $\leq 50\%$ 为低。

Note: AChR, acetylcholine receptor; EAMG, experimental autoimmune myasthenia gravis; PTMG, passive transfer myasthenia gravis; AChR-Ab, acetylcholine receptor-Ab; MG, myasthenia gravis; MuSK, muscle-specific tyrosine kinase; IFN- γ , interferon- γ ; LRP4, low density lipoprotein receptor associated protein 4; IgG, immunoglobulin G. In this paper, syndrome scores were assigned based on both the diagnostic criteria of Western medicine and the syndrome differentiation types of traditional Chinese medicine for MG. The conformity between animal models and clinical manifestations was assessed by combining clinical scoring standards with reported phenotypic characteristics and detection indicators in the literature. The degree of conformity was categorized into three levels-high ($\geq 70\%$), middle ($50\%-70\%$), and low ($\leq 50\%$).

代。后一种方法操作简单、成本低廉、成模率高,且西医与中医的临床吻合度也相对较高,在50%左右。其他模型,例如LRP4诱导的MG模型、利用转基因小鼠NMJ局部产生的IFN- γ 建立EAMG模型以及通过移植MG患者外周淋巴细胞构建的PTMG模型等,均属于探索性研究模型,它们为揭示MG的发病机理提供了一定的理论基础。然而,尽管这类模型具有一定的创新性,但其代表性和典型性尚不足,未来仍需对这类模型进行深入研究,以使其更加完善。从临床吻合度的角度审视,无论是中医还是西医的标准,这些模型的吻合度均不及前述典型模型。

在文献研究中注意到,关于MG的动物模型尚未发现专门针对中医病证的模型。例如针对脾肾两虚或者脾胃气虚证型专门设置的模型,大多数都是在用西医的某一类经典造模方法成模后再用中医的某种治法与方剂去干预模型动物,取得疗效后评价此方剂与治法的疗效。这一问题的存在,可能是由于构建相关病证模型时,模型的成模标准难以明确。例如,小鼠的舌脉难以观察,以及MG中医的一些症状,如纳差、盗汗和烦热等难以量化,主观性大,难以获得研究者们的一致认可。针对上述问题,在动物模型的制备过程中,应考虑中医病因学造模法、现代病因病理造模法和病证结合造模法等多种方法,以适应不同中医药研究的需求。同时建立一套相对科学的模型评判标准。目前评判动物模型的标准多建立在人的证候诊断标准基础上,对于动物缺乏可行性。故如何提高中医证候动物模型的科学性、准确性和实用性,更好地服务于中医药的研究和临床应用,仍是MG动物模型未来努力的方向。因此,需要在模型复制过程中和复制成功后观察具有特异性的、更为客观的评价指标,并充分采用以方验证、以证测药的方法。未来在MG中医病证动物模型研究方面,可采用病证结合动物模型,即将西医疾病与中医证候有机结合,以更好地体现中医整体化思维,更符合中医整体观和辩证观,是较为理想的中药药效研究动物模型。

根据MG动物模型中西医临床病证特点吻合度分析结果,西医的临床吻合度普遍比中医的吻合度高,建立科学可量化的中医病证MG动物模型是未来发展的方向之一,同时应该逐步建立和完善相关的模型评价标准。

[作者贡献 Author Contribution]

陈钰涵负责搜集文献,撰写和修改文稿;
陈瑾玲、李欣、区燕华负责提供思路和指导修改文章;
王斯、陈镜伊、王兴易、袁嘉丽、段媛媛参与修改文章;
羊忠山、牛海涛是基金获得者,负责核定文稿。

[利益声明 Declaration of Interest]

所有作者均声明本文不存在利益冲突。

[参考文献 References]

- [1] GILHUS N E, TZARTOS S, EVOLI A, et al. Myasthenia gravis[J]. Nat Rev Dis Primers, 2019, 5(1): 30. DOI: 10.1038/s41572-019-0079-y.
- [2] BUBUIOC A M, KUDEBAYEVA A, TURUSPEKOVA S, et al. The epidemiology of myasthenia gravis[J]. J Med Life, 2021, 14(1): 7-16. DOI: 10.25122/jml-2020-0145.
- [3] VANOLI F, MANTEGAZZA R. Current drug treatment of myasthenia gravis[J]. Curr Opin Neurol, 2023, 36(5): 410-415. DOI: 10.1097/WCO.0000000000001196.
- [4] 盛昭园, 陈建, 应汝炯, 等. 基于海派中医特色的重症肌无力一体化综合诊疗专家共识[J]. 上海中医药杂志, 2024, 58(S1): 41-47. DOI: 10.16305/j.1007-1334.2024.08.
SHENG Z Y, CHEN J, YING R J, et al. Integrated diagnosis and treatment expert consensus for myasthenia gravis based on characteristics of Shanghai style traditional Chinese medicine[J]. Shanghai J Tradit Chin Med, 2024, 58(S1): 41-47. DOI: 10.16305/j.1007-1334.2024.08.
- [5] LIU X M, KUANG Y Y, BIAN C R, et al. Exploring the mechanism of action of herbal compounding in the treatment of myasthenia gravis based on network pharmacology[J]. Biotechnol Genet Eng Rev, 2024, 40(2): 1164-1179. DOI: 10.1080/02648725.2023.2193048.
- [6] SANDERSON N S R. Complement and myasthenia gravis[J]. Mol Immunol, 2022, 151: 11-18. DOI: 10.1016/j.molimm.2022.08.018.
- [7] HONG Y, LIANG X, GILHUS N E. AChR antibodies show a complex interaction with human skeletal muscle cells in a transcriptomic study[J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 11230. DOI: 10.1038/s41598-020-68185-x.
- [8] SUN S S, SHEN Y H, ZHANG X, et al. The MuSK agonist antibody protects the neuromuscular junction and extends the lifespan in C9orf72-ALS mice[J]. Mol Ther, 2024, 32(7): 2176-2189. DOI: 10.1016/j.ymthe.2024.05.016.
- [9] 左瑞, 吕富荣, 王晓燕. 94例重症肌无力患者中医证型分析[J]. 新中医, 2020, 52(17): 48-50. DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2020.17.014.
ZUO R, LYU F R, WANG X Y. Analysis on Chinese medicine syndrome types of 94 cases of myasthenia gravis[J]. J New Chin Med, 2020, 52(17): 48-50. DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2020.17.014.
- [10] 刘凡, 李国年, 罗贤毅, 等. 结合“年之所加”治疗重症肌无力经验[J]. 山东中医杂志, 2024, 43(7): 760-764, 769. DOI: 10.16295/j.cnki.0257-358x.2024.07.018.
LIU F, LI G N, LUO X Y, et al. Experience in treating myasthenia gravis combined with "influence of year's circuit Qi"[J]. Shandong J Tradit Chin Med, 2024, 43(7): 760-764, 769. DOI: 10.16295/j.cnki.0257-358x.2024.07.018.
- [11] 张永德, 刘晓艳. 近十年重症肌无力的中医病因病机研究概况[J]. 长春中医药大学学报, 2019, 35(5): 995-997. DOI: 10.13463/j.cnki.cczyy.2019.05.050.
ZHANG Y D, LIU X Y. Overview of TCM etiology and pathogenesis of myasthenia gravis in recent ten years[J]. J Changchun Univ Chin Med, 2019, 35(5): 995-997. DOI: 10.13463/j.cnki.cczyy.2019.05.050.

- [12] 王宝祥, 许俊杰, 陆霞, 等. 益气托邪汤联合温针灸治疗重症肌无力临床观察[J]. 新中医, 2018, 50(10):166-169. DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2018.10.048.
WANG B X, XU J J, LU X, et al. Clinical observation on Yiqi Tuoxie Tang combined with warming needle moxibustion for myasthenia gravis[J]. J New Chin Med, 2018, 50(10):166-169. DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2018.10.048.
- [13] 曹璐璐, 王炳权, 陈朝远, 等. 李庆和教授运用化湿解毒法治疗重症肌无力经验探析[J]. 西部中医药, 2021, 34(1):34-36. DOI: 10.12174/j.issn.2096-9600.2021.01.09.
CAO L L, WANG B Q, CHEN Z Y, et al. Professor Li Qinghe's experience in treating myasthenia gravis by dampness-resolving and detoxifying method[J]. West J Tradit Chin Med, 2021, 34(1):34-36. DOI: 10.12174/j.issn.2096-9600.2021.01.09.
- [14] 张会永, 冷锦红, 谢伟峰, 等. 张静生治疗重症肌无力临证经验与用药分析[J]. 中华中医药学刊, 2020, 38(12):27-30. DOI: 10.13193/j.issn.1673-7717.2020.12.006.
ZHANG H Y, LENG J H, XIE W F, et al. Introduction of ZHANG jingsheng's academic thoughts and prescriptions of myasthenia gravis[J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2020, 38(12):27-30. DOI: 10.13193/j.issn.1673-7717.2020.12.006.
- [15] 常婷. 中国重症肌无力诊断和治疗指南(2020版)[J]. 中国神经免疫学和神经病学杂志, 2021, 28(1):1-12. DOI: 10.3969/j.issn.1006-2963.2021.01.001.
CHANG T. Chinese guidelines for the diagnosis and treatment of myasthenia gravis(2020 version) [J]. Chin J Neuroimmunol Neurol, 2021, 28(1): 1-12. DOI: 10.3969/j.issn.1006-2963.2021.01.001.
- [16] 中国免疫学会神经免疫学分会, 中华医学会神经病学分会神经免疫学组. 重症肌无力诊断和治疗中国专家共识[J]. 中国神经免疫学和神经病学杂志, 2012, 19(6):401-408. DOI: 10.3969/j.issn.1006-2963.2012.06.001.
Chinese Society of Immunology Neuroimmunology Branch, Chinese Medical Association Neurology Branch Neuroimmunology Group. Chinese expert consensus on the diagnosis and treatment of myasthenia gravis[J]. Chin J Neuroimmunol Neurol, 2012, 19(6):401-408. DOI: 10.3969/j.issn.1006-2963.2012.06.001.
- [17] 佚名. «中医内科常见病诊疗指南»发布[J]. 中华中医药杂志, 2008, 23(9):848.
Anon. Guidelines for diagnosis and treatment of common diseases in internal medicine of traditional Chinese medicine issued[J]. China J Tradit Chin Med Pharm, 2008, 23(9):848.
- [18] 李广文, 庞松, 方雪, 等. 重症肌无力中医辨证分型研究[J]. 内蒙古中医药, 2016, 35(7):86-87. DOI: 10.16040/j.cnki.cn15-1101.2016.07.086.
LI G W, PANG S, FANG X, et al. Study on dialectical differentiation of myasthenia gravis in traditional Chinese medicine[J]. Nei Mongol J Tradit Chin Med, 2016, 35(7):86-87. DOI: 10.16040/j.cnki.cn15-1101.2016.07.086.
- [19] 姚舜禹, 薛雅慧, 杜妙乔, 等. 重症肌无力的动物模型研究进展[J]. 国际神经病学神经外科学杂志, 2024, 51(1):79-85. DOI: 10.16636/j.cnki.jinn.1673-2642.2024.01.014.
YAO S Y, XUE Y H, DU M Q, et al. Advances in the research on animal models for myasthenia gravis[J]. J Int Neurol Neurosurg, 2024, 51(1): 79-85. DOI: 10.16636/j.cnki.jinn.1673-2642.2024.01.014.
- [20] JIAO W, HU F Y, LI J Q, et al. Qiangji Jianli Decoction promotes mitochondrial biogenesis in skeletal muscle of myasthenia gravis rats via AMPK/PGC-1 α signaling pathway [J]. Biomed Pharmacother, 2020, 129: 110482. DOI: 10.1016/j.biopha.2020.110482.
- [21] BORGES L S, RICHMAN D P. Muscle-specific kinase myasthenia gravis[J]. Front Immunol, 2020, 11: 707. DOI: 10.3389/fimmu.2020.00707.
- [22] CHU Y Y, HE Y H, ZHAI W Z, et al. CpG adjuvant enhances humoral and cellular immunity against OVA in different degrees in BALB/c, C57BL/6J, and C57BL/6N mice[J]. Int Immunopharmacol, 2024, 138: 112593. DOI: 10.1016/j.intimp.2024.112593.
- [23] BOGATIKOV E, LINDBLAD I, PUNGA T, et al. miR-1933-3p is upregulated in skeletal muscles of MuSK+ EAMG mice and affects Impa1 and Mrpl27[J]. Neurosci Res, 2020, 151:46-52. DOI:10.1016/j.neures.2019.02.003.
- [24] WANG K C, XIE Y Y, CHEN X X, et al. The activation of muscarinic acetylcholine receptors protects against neuroinflammation in a mouse model through attenuating microglial inflammation[J]. Int J Mol Sci, 2024, 25(19):10432. DOI:10.3390/ijms251910432.
- [25] DRESSER L, WLODARSKI R, REZANIA K, et al. Myasthenia gravis: epidemiology, pathophysiology and clinical manifestations[J]. J Clin Med, 2021, 10(11):2235. DOI:10.3390/jcm10112235.
- [26] KUSNER L L, LE PANSE R, LOSEN M, et al. Animal models of myasthenia gravis for preclinical evaluation[M]//Myasthenia gravis and related disorders. Cham: Springer International Publishing, 2018:61-70. DOI:10.1007/978-3-319-73585-6_4.
- [27] 徐添, 官磊瑶, 刘浪辉, 等. 基于数据挖掘的重症肌无力动物模型应用分析[J]. 江西中医药大学学报, 2023, 35(6):92-97.
XU T, GUAN L Y, LIU L H, et al. Application analysis of myasthenia gravis animal model based on data mining[J]. J Jiangxi Univ Chin Med, 2023, 35(6):92-97.
- [28] HUA Y, JIANG P P, DAI C Y, et al. Extracellular vesicle autoantibodies[J]. J Autoimmun, 2024, 149: 103322. DOI: 10.1016/j.jaut.2024.103322.
- [29] LAZARIDIS K, BALTATZIDI V, TRAKAS N, et al. Characterization of a reproducible rat EAMG model induced with various human acetylcholine receptor domains[J]. J Neuroimmunol, 2017, 303: 13-21. DOI: 10.1016/j.jneuroim.2016.12.011.
- [30] YU Z, ZHANG M Y, JING H Y, et al. Characterization of LRP4/agrin antibodies from a patient with myasthenia gravis[J]. Neurology, 2021, 97(10): e975-e987. DOI: 10.1212/WNL.00000000000012463.
- [31] 唐毅华, 章正祥, 李净娅, 等. 重症肌无力模型的研究进展[J]. 浙江临床医学, 2018(11):1886-1888.
TANG Y H, ZHANG Z X, LI J Y, et al. Advances in modelling myasthenia gravis[J]. Zhejiang Clin Med J, 2018(11):1886-1888.
- [32] KUSNER L L, LOSEN M, VINCENT A, et al. Guidelines for pre-clinical assessment of the acetylcholine receptor: specific passive transfer myasthenia gravis model-Recommendations for methods and experimental designs[J]. Exp Neurol, 2015, 270:3-10. DOI:10.1016/j.expneurol.2015.02.025.
- [33] CRON M A, PAYET C A, FAYET O M, et al. Decreased

- expression of miR-29 family associated with autoimmune myasthenia gravis[J]. J Neuroinflammation, 2020, 17(1): 294. DOI:10.1186/s12974-020-01958-3.
- [34] GAO X L, WEN Y J, WANG Z, et al. Rapamycin alleviates the symptoms of experimental autoimmune myasthenia gravis rats by down-regulating Th17 cell/regulatory T cell ratio[J]. Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi, 2021, 37(1):24-30.
- [35] FUCHS S, ARICHA R, REUVENI D, et al. Experimental autoimmune myasthenia gravis (EAMG): from immunochemical characterization to therapeutic approaches[J]. J Autoimmun, 2014, 54: 51-59. DOI: 10.1016/j.jaut.2014.06.003.
- [36] T THEISSEN L, SCHROETER C B, HUNTEMANN N, et al. Recombinant acetylcholine receptor immunization induces a robust model of experimental autoimmune myasthenia gravis in mice[J]. Cells, 2024, 13(6): 508. DOI: 10.3390/cells13060508.
- [37] LI X L, LI H, ZHANG M, et al. Correction to: Exosomes derived from atorvastatin-modified bone marrow dendritic cells ameliorate experimental autoimmune myasthenia gravis by up-regulated levels of IDO/Treg and partly dependent on FasL/Fas pathway[J]. J Neuroinflammation, 2019, 16(1): 119. DOI:10.1186/s12974-019-1503-7.
- [38] MANTEGAZZA R, CORDIGLIERI C, CONSONNI A, et al. Animal models of myasthenia gravis: utility and limitations[J]. Int J Gen Med, 2016, 9:53-64. DOI:10.2147/IJGM.S88552.
- [39] ALABBAD S, ALGAEED M, SIKORSKI P, et al. Monoclonal antibody-based therapies for myasthenia gravis[J]. BioDrugs, 2020, 34(5):557-566. DOI:10.1007/s40259-020-00443-w.
- [40] NORIDOMI K, WATANABE G, HANSEN M N, et al. Structural insights into the molecular mechanisms of myasthenia gravis and their therapeutic implications[J]. eLife, 2017, 6: e23043. DOI:10.7554/eLife.23043.
- [41] ITO R, TAKAHASHI T, KATANO I, et al. Current advances in humanized mouse models[J]. Cell Mol Immunol, 2012, 9(3): 208-214. DOI:10.1038/cmi.2012.2.
- [42] CHHATTA A, MIKKERS H M M, STAAL F J T. Strategies for Thymus regeneration and generating thymic organoids[J]. J Immunol Regen Med, 2021, 14: 100052. DOI: 10.1016/j.regen.2021.100052.
- [43] BRISSOT E, LABOPIN M, LABUSSIÈRE H, et al. Post-transplant cyclophosphamide versus anti-thymocyte globulin after reduced intensity peripheral blood allogeneic cell transplantation in recipients of matched sibling or 10/10 HLA matched unrelated donors: final analysis of a randomized, open-label, multicenter, phase 2 trial[J]. Blood Cancer J, 2024, 14(1):31. DOI:10.1038/s41408-024-00990-3.
- [44] PUNGA A R, LIN S, OLIVERI F, et al. Muscle-selective synaptic disassembly and reorganization in MuSK antibody positive MG mice[J]. Exp Neurol, 2011, 230(2): 207-217. DOI: 10.1016/j.expneurol.2011.04.018.
- [45] COLE R N, GHAZANFARI N, NGO S T, et al. Patient autoantibodies deplete postsynaptic muscle-specific kinase leading to disassembly of the ACh receptor scaffold and myasthenia gravis in mice[J]. J Physiol, 2010, 588(Pt17): 3217-3229. DOI:10.1113/jphysiol.2010.190298.
- [46] KLOOSTER R, PLOMP J J, HUIJBERS M G, et al. Muscle-specific kinase myasthenia gravis IgG4 autoantibodies cause severe neuromuscular junction dysfunction in mice[J]. Brain, 2012, 135(Pt 4):1081-1101. DOI:10.1093/brain/awt025.
- [47] RICHMAN D P, NISHI K, FERNS M J, et al. Animal models of antimuscle-specific kinase myasthenia[J]. Ann N Y Acad Sci, 2012, 1274:140-147. DOI:10.1111/j.1749-6632.2012.06782.x.
- [48] HOMMA M, UZAWA A, TANAKA H, et al. A novel fusion protein, Ach Receptor-fc, ameliorates myasthenia gravis by neutralizing antiacetylcholine receptor antibodies and suppressing acetylcholine receptor-reactive B cells[J]. Neurotherapeutics, 2017, 14(1): 191-198. DOI: 10.1007/s13311-016-0476-9.
- [49] NIU L X, GUO C Y, HAO Z B, et al. Potential roles of recombinant acetylcholine receptor α subunit 1-211 in immunoadsorbent and DNA immunization[J]. J Immunol Methods, 2011, 372(1-2):14-21. DOI:10.1016/j.jim.2011.04.015.
- [50] BISPO E C I, ARGANARAZ E R, NEVES F A R, et al. Immunomodulatory effect of IFN- γ licensed adipose-mesenchymal stromal cells in an *in vitro* model of inflammation generated by SARS-CoV-2 antigens[J]. Sci Rep, 2024, 14(1):24235. DOI:10.1038/s41598-024-75776-5.
- [51] STASSEN M H W, MENG F P, MELGERT E, et al. Experimental autoimmune myasthenia gravis in mice expressing human immunoglobulin loci[J]. J Neuroimmunol, 2003, 135(1-2):56-61. DOI:10.1016/s0165-5728(02)00436-8.
- [52] ULUSOY C, ÇAVUŞ F, YILMAZ V, et al. Immunization with recombinantly expressed LRP4 induces experimental autoimmune myasthenia gravis in C57BL/6 mice[J]. Immunol Invest, 2017, 46(5): 490-499. DOI: 10.1080/08820139.2017.1299754.
- [53] LOSEN M, MARTINEZ-MARTINEZ P, MOLENAAR P C, et al. Standardization of the experimental autoimmune myasthenia gravis (EAMG) model by immunization of rats with Torpedo californica acetylcholine receptors: Recommendations for methods and experimental designs[J]. Exp Neurol, 2015, 270: 18-28. DOI: 10.1016/j.expneurol.2015.03.010.
- [54] 杨俊超, 文颖娟. 重症肌无力实验动物模型的研究进展[J]. 医学综述, 2015, 21(19): 3466-3469. DOI: 10.3969/j.issn.1006-2084.2015.19.004.
- YANG J C, WEN Y J. Research progress of myasthenia gravis experimental animal models[J]. Med Recapitul, 2015, 21(19): 3466-3469. DOI: 10.3969/j.issn.1006-2084.2015.19.004.
- (收稿日期:2024-09-23 修回日期:2024-12-31)
(本文责任编辑:丁宇菁)

[引用本文]

陈钰涵, 陈瑾玲, 李欣, 等. 基于中西医临床辨证特点的重症肌无力动物模型分析[J]. 实验动物与比较医学, 2025, 45(2): 176-186. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.139.

CHEN Y H, CHEN J L, LI X, et al. Analysis of animal models of myasthenia gravis based on its clinical characteristics in Chinese and Western medicine[J]. Lab Anim Comp Med, 2025, 45(2): 176-186. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.139.

【实验动物与职业健康专题·导语】



20世纪90年代末,随着世界经济全球化与国际贸易的发展,职业健康安全逐渐引起了社会的广泛关注,并形成了一种不断完善的管理体系。1996年,英国首先发布了BS 8800《职业健康安全管理体系指南》(*Guide to Occupational Health and Safety Management Systems*),美国、日本、澳大利亚和新西兰等随后相继发布了本国的职业健康安全管理体系的指导性文件、指南或导则。我国于1999年由原国家经贸委颁布了《职业健康安全管理体系试行标准》,2020年将国际标准化组织(International Organization for Standardization)颁布的标准45001《职业健康安全管理体系 要求及使用指南》(*Occupational Health and Safety Management Systems - Requirements with Guidance for Use*)全文等同采用并转化为国家标准GB/T 45001—2020《职业健康安全管理体系 要求及使用指南》。同时,我国在《中华人民共和国职业病防治法》的基础上,还发布了一系列职业健康相关的配套规章与文件,以促进企业及相关机构依法加强落实职业健康管理要求。

与传统工业企业和现代制造企业相比较,实验动物领域具有一定的特殊性。国际实验动物评估和认可委员会(Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International,简称AAALAC International)是具有代表性的非政府组织,其认可指南中对实验动物机构的职业健康管理有明确的要求。我国于2014年发布的国家标准GB/T 27416—2014《实验动物机构 质量和能力的通用要求》对实验动物机构职业健康体系也有明确的要求。近年来,我国一般工业企业的职业健康管理和职业病防治工作已经得到了高度重视,并取得了长足发展,但实验动物行业的职业健康安全大多还处于零散的基础阶段,文件化、体系化和规范化均尚有明显不足。而随着环境、社会和公司治理(Environmental, Social and Governance, ESG)理念的提出,国际上对实验动物机构的国际合作与持续性发展又提出了更高要求。

因此,为促进实验动物机构加深对职业健康安全管理的理解,提升实验动物行业的职业健康安全管理水平,本刊特组织“实验动物职业健康安全管理专题”。本期专题共5篇文章。文章一《实验动物机构职业健康安全管理体系建设要点》,主要介绍职业健康安全管理体系的发展历史、相关的法律法规,以及实验动物机构建立职业健康安全管理体系需要关注的要点和不可忽略的问题。文章二《浅谈非人灵长类实验动物从业人员的职业健康管理措施》,从灵长类实验动物生产和使用机构从业人员面临的职业风险因素、常见的灵长类动物人兽共患病出发,详细介绍了灵长类实验动物相关的职业暴露处理方式及职业健康安全管理体系的建立及管理,旨在提高灵长类实验动物机构与从业人员的健康安全意识,加强个人防护及专业技能操作规范性,防范重大传染病风险。文章三《国内普通高校实验动物从业人员职业健康风险防控概述》梳理了高校实验动物从业人员的职业健康管理现状、常见职业健康问题,并从高校、实验动物中心、实验动物从业人员3个层面提出相应的防控措施,以提升高校实验动物从业人员职业健康管理水平。文章四《实验动物机构职业健康档案建立内容及要点》,详细介绍了实验动物机构职业健康档案的管理要求,并结合GB/T 27416—2014《实验动物机构 质量和能力的通用要求》、GBZ 188—2014《职业健康监护技术规范》及国家安全监管总局发布的《职业卫生档案管理规范》等,系统解析实验动物机构职业健康管理档案的法定构成要素;通过探讨档案信息采集标准、数据动态更新机制、多部门协同管理模型等关键环节,为构建符合法规要求且具备实操性的实验动物机构职业健康档案管理制度提供技术路径。文章五《实验动物机构建设项目职业健康防护设施“三同时”的实施要求》,是结合国家法规与行业实践,系统阐述实验动物机构建设项目中职业病防护设施“三同时”(同时设计、施工、投产)的发展历程、实施流程与管理要点,旨在通过规范预评价、设计、施工、验收等环节,依法实施实验动物项目建设,保障从业人员的职业健康安全;还介绍了职业病防护设施“三同时”过程的关键流程和规范要求,列举了一系列表格样式,方便实验动物机构借鉴。

总之,实验动物机构职业健康安全管理体系的建立能够提供有力的管理手段,有助于全面有效地提高职业健康安全管理水平,促进与国际先进管理接轨,提升实验动物机构的品质形象与运营效益。期待本期专题内容可以为我国实验动物机构的职业健康安全管理体系建设提供帮助,促进同行交流,进而推动我国实验动物机构职业健康安全管理的整体提升。

本期专题特邀编委:邵奇鸣



邵奇鸣, 博士。江苏鼎泰药物研究(集团)股份有限公司副总经理、机构动物护理和使用委员会(IACUC)主席及职业健康委员会主席。兼任全国实验动物标准化技术委员会委员、中国实验动物学会医药研发外包机构(CRO)实验动物管理工作委员会副主任委员、中国实验动物学会福利伦理委员会委员, 以及《实验动物与比较医学》特邀审稿专家、《中国实验动物学报》和《动物模型与实验医学(英文)》编委。长期从事实验动物设施、EHS(环境、健康及安全)及实验动物机构质量体系的建设和管理工作。参与国家标准、团体标准如 GB/T 39759—2021《实验动物 术语》、GB/T 43051—2023《实验动物 动物实验生物安全通用要求》、GB/T 061—2021《实验动物 安乐死技术规范》和 GB/T 062—2021《实验动物 运输管理规范》的编写与审核, 在国际国内刊物发表论文 40 余篇。

实验动物机构职业健康安全管理体系建设要点

邵奇鸣¹, 卞 勇², 施爱民³

[1. 江苏鼎泰药物研究(集团)股份有限公司, 南京 211800; 2. 南京中医药大学实验动物中心, 南京 210023; 3. 南京医科大学医药实验动物中心, 南京 211166]

[摘要] 职业健康安全管理体系作为现代企业管理制度之一, 越来越受到人们的重视。近年来, 职业健康安全管理体系在各个领域不断完善和发展, 逐渐成为企业竞争力的重要指标。目前, 国际实验动物评估和认可委员会(Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International, 简称 AAALAC International) 和中国合格评定国家认可委员会(China National Accreditation Service for Conformity Assessment, CNAS) 均对实验动物相关的职业健康管理提出了要求。而在国内实验动物行业, 由于各机构对职业健康相关的法律法规不够熟悉, 缺乏经验丰富的管理人员, 实验动物机构的职业健康安全管理体系发展相对滞后, 尚处于发展初期。本文通过总结作者在实验动物机构建立职业健康安全管理体系的实践经验, 首先介绍了国内外有关实验动物的职业健康安全法律法规、我国实验动物机构常见职业病及其危害因素, 然后从建立职业健康安全管理制度、开展职业健康安全培训、从业人员职业健康检查、职业病危害因素现场检测、落实建设项目职业病防护设施“三同时”制度、建立及维护职业健康档案、建立职业危害告知管理制度、建立职业病危害事故应急救援预案等方面指出实验动物机构进行职业健康安全管理体系建设的要点, 以供行业内作参考。

[关键词] 职业健康安全管理体系; 法律法规; 实验动物机构

[中图分类号] R136; Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2025)02-0188-09



Key Points for Establishing Occupational Health and Safety Management System in Laboratory Animal Institutions

SHAO Qiming¹, BIAN Yong², SHI Aimin³

(1. TriApex Laboratories Co., Ltd., Nanjing 211800, China; 2. Laboratory Animal Center, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China; 3. Laboratory Animal Center, Nanjing Medical University, Nanjing 211166, China)

Correspondence to: SHAO Qiming (ORCID: 0009-0000-7104-7293), E-mail: sxsqm2018@163.com

[ABSTRACT] As one of the modern enterprise management systems, the Occupational Health and Safety Management System (OHSMS) has garnered increasing attention. The OHSMS has undergone continuous refinement and expansion across various fields, emerging as a pivotal indicator of enterprise competitiveness. Currently, both the Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal

[基金项目] 南京市紫金山英才先锋计划外国人才项目“国际毒理研究中心实验动物设施职业健康环境安全管理体系建立与应用示范”

[第一作者] 邵奇鸣 (1956—), 女, 博士, 研究方向: 质量与环境安全职业健康管理, 实验动物设施管理与福利伦理。E-mail: sxsqm2018@163.com. ORCID: 0009-0000-7104-7293

Care (AAALAC) International and the China National Accreditation Service for Conformity Assessment (CNAS) require for establishing occupational health management related to laboratory animal work. However, within the domestic laboratory animal industry, development of OHSMS is relatively lagging behind due to unfamiliarity with laws and regulations and a lack of experienced management personnel. Consequently, the OHSMS in laboratory animal institutions is still in its early stage. Drawing on the authors' practical experience in establishing OHSMS in laboratory animal institutions, this article first outlines domestic and international occupational health laws, regulations, and safety management systems for laboratory animals, as well as common occupational diseases and their associated risk factors in China. Subsequently, this article highlights key elements for the construction of OHSMS in laboratory animal institutions in areas such as establishing occupational health and safety regulations, conducting training, performing occupational health examinations for staff, monitoring on-site occupational hazard factors, implementing the "three simultaneous" system for occupational disease prevention facilities in construction projects, creating and maintaining occupational health records, developing a notification management system for occupational hazards, and formulating emergency response plans for occupational disease hazard accidents. These points are intended as a reference for professionals in the industry.

[Key words] Occupational health and safety management system (OHSMS); Laws and regulations; Laboratory animal institutions

国际职业健康委员会 (International Commission on Occupational Health, ICOH) 指出, 职业健康旨在通过预防健康损害, 控制风险, 使工作适应人以及人适应工作, 促进和维护所有职业劳动者的身体、心理和社会福祉处于最高水平^[1]。职业健康是对工作场所内健康危害进行预测、识别、评估和控制的一门科学^[2]。在我国, 截至2023年末, 约7.4亿就业人员中, 有2亿多人从事接触职业病危害作业^[3]。其中, 实验动物从业人员有相当一部分会接触职业危害因素。我国高度重视劳动者的职业健康^[4], 早在2001年就颁布了《中华人民共和国职业病防治法》^[5], 随后又不断完善了职业病防治和职业健康相关的法律法规和标准体系^[6-9], 以切实保障劳动者的合法权益。

近年来, 尽管实验动物行业也逐渐重视起职业健康管理工作, 但由于一系列原因, 如缺少专业的职业健康管理人员, 对职业健康相关的法律法规不够熟悉, 职业健康主体责任不够明确, 对法律法规要求不能完全落实到位, 职业健康培训不够等, 实验动物机构的职业健康仍处于管理初期。不少实验动物机构尚未真正建立起行之有效的职业健康安全管理体系, 且大部分从业人员对职业健康知晓率较低。为了帮助实验动物机构更好、更快、更有效地建立职业健康安全管理体系, 本文通过总结笔者所在单位建立实验动物机构职业健康安全管理体系的经验, 并结合法律法规要求, 将建设职业健康安全管理体系的要点、重点进行详细阐述,

以供同行参考。

1 国内外职业健康法律法规介绍

1.1 国际职业健康安全管理体系的发展历程

职业健康安全管理体系 (Occupational Health and Safety Management System, OHSMS) 是从1980年代后期逐步兴起。英国首先于1996年颁布了BS 8800标准即《职业健康安全管理体系指南》^[10]。随后一些跨国公司和大型现代化联合企业, 为强化自己的社会关注力和控制损失, 开始建立职业健康安全管理制度。1996—1997年, 美国工业卫生协会 (American Industrial Hygiene Association, AIHA)、澳大利亚标准委员会和新西兰标准委员会、日本工业安全卫生协会 (Japan Industrial Safety and Health Association, JISHA) 与挪威船级社 (Det Norske Veritas, DNV) 相继分别制定了《职业健康安全管理体系》^[11]、《职业健康安全管理体系原则、体系和支持技术通用指南》^[12]、《职业健康安全管理体系导则》^[13] 和《职业健康安全管理体系认证标准》^[14] 等指导性文件, 有效地指导了大型企业建立并实际运用职业健康安全管理体系。1999年, 由英国标准协会牵头, DNV等13个组织共同提出职业健康安全评价系列标准 (Occupational Health and Safety Assessment Series, OHSAS) 18001《职业健康安全管理体系规范》和18002《职业健康安全管理体系——OHSAS 18001实施指南》。2018年, OHSAS 18001转化

成 ISO 45001《职业健康与安全管理体 系》^[15]，引入了更加规范的职业健康安 全管理体系及对此体系的评估系统。

1.2 国内职业健康法律法规体系的建立

随着国家对职业健康管理的重视程度提升，我国职业健康相关的法律法规体系也逐渐建立并完善。依 从国家法律法规体系，我国的职业健康安全法律法规 体系按照宪法、法律、行政法规、地方性法规及相关 标准等制定成不同的规范性文件^[16]。中国国家经济贸 易委员会借鉴了国际标准 OHSAS 18000，于 1999 年 10 月颁布了《职业安全卫生管理体系标准（试行）》。此 后中国国家质量监督检验检疫总局也发布了 GB/T 28000—2001《职业健康安全管理体 系》，包括 GB/T 28001“规范”和 GB/T 28002“指南”两个部分。在 2018 年 OHSAS 18001 转化为 ISO 45001 后，中国国家 市场监督管理总局和国家标准 化研究院等采用 ISO 45001，制定了 GB/T 45001—2020《职业健康安全管理体 系 要求及使用指南》^[17]，全面替代了 GB/T 28000 系 列标准。2024 年 3 月，我国又发布了 GB/T 45007—

2024《职业健康安全管理体 系 小型组织实施 GB/T 45001—2020 指南》^[18]，指导小型机构建立及实施职业 健康安全管理体 系。

1.3 实验动物机构常用的职业健康相关法律、规 章、标准及合规性评价

按照中国法律法规架构，我国相继出台了近百条 职业健康相关的法律法规、部门规章。这些职业健康 法律法规基本上都是通用型，适合国内所有行业及实 验动物机构。为了方便实验动物机构建立职业健康安 全管理体系，表 1 列选了部分常用且适用于中国实验 动物行业的职业健康安全法律法规，以供同行参考。

由于国家出台的职业健康法律法规通用于各行业， 所以实验动物机构在收集到相关的法律法规后要进行 合规性评价，按本机构的实际情况找出此法律法规适 用本机构的条文。每个机构可以建立自己的法律法规 合规性评价表，主要内容可包括法规及标准的名称、 文号，与本机构适应的条款，合规性的依据，评价的 时间，以及评价人等（表 2）。合规性评价建议每年做 一次，也可随时收集新增的法律法规并进行评价。

表 1 适合实验动物机构的职业健康相关法律、规章和标准范例

Table 1 Examples of occupational health laws, regulations and standards applicable to laboratory animal institutions

序号 No.	法律法规、标准 Law, regulation and standard	发布机构 Issuing authority	发布时间 Date of issue
1	中华人民共和国职业病防治法	全国人民代表大会常务委员会	2018
2	职业病分类和目录	国家卫生健康委员会等	2024
3	职业病危害因素分类目录	国家卫生和计划生育委员会	2015
4	职业健康监护技术规范	国家卫生和计划生育委员会	2014
5	国家卫生健康委办公厅关于进一步加强用人单位职业健康培训工作的通知	国家卫生健康委员会办公厅	2022
6	建设项目职业病防护设施“三同时”监督管理办法	国家安全生产监督管理总局	2017
7	工作场所职业卫生管理规定	国家卫生健康委员会	2021
8	职业健康档案管理规范	国家安全生产监督管理总局	2013
9	用人单位职业病危害告知与警示标识管理规范	国家安全生产监督管理总局	2014
10	用人单位劳动防护用品管理规范	国家安全生产监督管理总局	2018
11	用人单位职业健康监护监督管理办法	国家安全生产监督管理总局	2012
12	GBZ 2.1—2007 工作场所所有害因素职业接触限值 第 1 部分：化学因素	国家卫生健康委员会	2019
13	GBZ 2.2—2007 工作场所所有害因素职业接触限值 第 2 部分：物理因素	中华人民共和国卫生部	2007
14	GB 39800.1—2020 个体防护装备配备规范 第一部分：总则	国家市场监督管理总局	2020

2 实验动物机构常见职业病及其危害因素

2.1 职业病分类

职业病是指用人单位的劳动者在职业活动中，因 接触粉尘、放射性物质和其他有毒、有害物质等而引 起的疾病。我国将于 2025 年 8 月起最新实施的《职业

病分类和目录》^[19] 将法定职业病调整为 12 大类 135 种，包括尘肺病及其他呼吸系统疾病、职业性皮肤病、 职业性眼病、职业性耳鼻喉口腔疾病、职业性化学中 毒、物理因素所致职业病、职业性放射性疾病、职业 性传染病、职业性肿瘤、职业性肌肉骨骼疾病、职业 性精神和行为障碍、其他职业病。

表 2 实验动物机构的职业健康安全管理体系合规性评价表范例

Table 2 Example form of compliance evaluation for occupational health and safety management system in laboratory animal institutions

序号 No.	法律法规名称 Law and regulation name	实施日期 Implementation date	颁布单位 Issuing authority	适用条款 Applicable clause	符合性证据 Conformity evidence	合规性评价 Compliance evaluation	评价时间 Evaluation date	评价责任人 Evaluator
1	中华人民共和国安全生产法	2021/9/1	全国人民代表大会常委会	全文	建立健全全员安全生产责任制;按要求配备专职安全管理人员,设置安全管理机构;定期组织安全培训;“三同时”已验收通过;安全例会;应急演练	符合	2024/6/12	xxx
2	中华人民共和国职业病防治法	2019/1/1	全国人民代表大会常委会	1~7、14~15、21、23、25~26、34、36~37、39~40	配备兼职的职业健康专业人员;职业病防治工作纳入目标管理责任制;制定职业病防治计划和实施方案;建立职业健康监护档案;	符合	2024/7/18	xxx
3	建设项目职业病防护设施“三同时”监督管理办法	2017/5/1	国家安全生产监督管理总局	3~4、8~29、第六章	按照要求进行“三同时”报告编制	符合	2024/7/18	xxx
4	职业健康检查管理办法	2019/2/28	国家卫生健康委员会	9~13、15	按规定组织岗前、在岗、离岗体检,并告知员工检查结果	符合	2024/7/18	xxx
5	用人单位劳动防护用品管理规范	2018/1/15	国家安全生产监督管理总局办公厅	全文	配备个体防护装备,督促员工正确佩戴	符合	2024/7/20	xxx

注:评价责任人一栏的xxx代表评价人的姓名。

Note: The placeholder “xxx” in the column of Evaluator represents the name of the individual conducting the evaluation.

2.2 职业病危害因素

职业病危害因素是指在工作环境中存在的,对职业人群的健康、安全和作业能力可能造成不良影响的一切要素或条件的总称,包括化学、物理、生物等因素。我国将职业病危害因素分为6大类共459种^[20]。其中,粉尘52种,化学因素352种,物理因素15种,放射因素8种,生物因素5个及其他。

实验动物机构从业人员在日常工作中会接触到职业病危害因素,但并非接触职业病危害因素就会发生职业病。诊断职业病必须满足以下条件:(1)在职的工作人员;(2)必须是在从事职业活动的过程中产生;(3)必须是因接触职业危害因素而引起;(4)必须是中国职业病分类和目录所列的职业病。总之,诊断为职业病必须满足员工在工作岗位并接触法定职业病危害因素。因此,实验动物机构需要分析本机构各部门可能存在哪些职业病危害因素,列出并告知员工。表3筛选了实验动物机构可能接触到的职业病危害因素。表4则列举了实验动物机构中部分工作岗位/部门可能

接触到的职业病危害因素。

3 实验动物机构的职业健康安全管理体系建设要点

3.1 实验动物机构主要负责人职责

实验动物机构的职业健康安全管理主要负责人是担任该机构最高领导职务或具有最高管理职责的人员。根据《中华人民共和国职业病防治法》的要求,机构主要负责人对实验动物机构的职业病防治工作全面负责。其主要责任包括:依法组织本单位的职业病防治工作,建立本机构的职业健康管理部门,建立职业健康管理制度,制定本机构的职业健康监护计划并提供保障经费,建立职业健康管理档案和应急预案,组织演练,安排职业健康体检等。主要负责人需要在任职3个月内参加当地主管部门组织的职业健康培训(首次培训不少于16学时),考试后获得证书,随后每年参加继续教育(再培训每年不少于8学时)。

表3 实验动物机构可能存在的职业病危害因素

Table 3 Potential occupational hazard factors in laboratory animal institutions

职业病危害因素 Occupational hazard	种类 Type
粉尘 Dust	皮毛粉尘、其他粉尘
化学因素 Chemical factors	铅、磷等重金属及其化合物, 二氧化硫, 氨, 一氧化碳, 硫化氢, 苯, 甲苯, 二甲苯, 甲醛, 乙腈, 四氯化碳, 有机磷, 环氧乙烷, 异丙醇, 磷酸二丁基苯酯, 碳酸钙, 柴油, 甲基肼, 硫酸及三氧化硫, 二氧化氯, 乙醚, 氢氧化钠, 碳酸钠(纯碱), 臭氧, 过氧化氢, 丙酮等
物理因素 Physical factors	噪声, 高温, 激光, 低温, 微波, 紫外线, 红外线, 工频电磁场等
放射因素 Radiation factors	密封放射源产生的电离辐射(主要产生 γ 、中子等射线), 非密封放射性物质(可产生 α 、 β 、 γ 射线或中子), X射线装置(含CT机)产生的电离辐射(X射线), 加速器产生的电离辐射(可产生电子射线、X射线、质子、重离子、中子及其感生放射性等), 中子发生器产生的电离辐射(主要是中子、 γ 射线等), 未提及的可导致职业病的其他放射性因素
生物因素 Biological factors	艾滋病病毒, 布鲁氏菌, 伯氏疏螺旋体, 森林脑炎病毒, 炭疽芽孢杆菌, 未提及的可导致职业病的其他生物因素

表4 实验动物机构内职业病危害岗位及危害因素清单示例

Table 4 Example list of positions with occupational hazards and corresponding hazard factors in laboratory animal institutions

部门 Department	工种/岗位 Job/ position	职业病危害因素 Occupational hazard
供试品部 Dep. of test article	供试品配置员、分析人员	甲醇、氢氧化钠、甲基纤维素、羟甲基纤维素钠、氰及腈类化合物(乙腈)、盐酸、三氟乙酸、磷酸、二甲苯、二甲基亚砷、氢氧化钾、三氟乙酸甲酯、异丙醇、磷酸、四氢呋喃、氨等
病理部 Dep. of pathology	实验技术人员	甲醛、多聚甲醛、氢氧化钠、乙酸、乙醇、二甲苯、盐酸、甲酸、过氧化氢、丙酮、碳酸钠、石蜡、二氨基联苯胺、聚乙二醇辛基苯基醚等
遗传毒性实验室 Genotoxicity lab	实验技术人员	二甲苯、甲醇、乙醇、乙酸、盐酸、氢氧化钠、氢氧化钾、过氧化氢、二氨基联苯胺、聚乙二醇辛基苯基醚等
分析实验室 Analytical lab	实验技术人员	乙酸、盐酸、氨基联苯胺、异丙醇、丙酮、三氯甲烷、甲醇、乙腈、乙酸乙酯、二氯甲烷等
清洗间 Cleaning room	清洗人员	氨、噪声、癸甲溴铵、次氯酸钠、次氯酸、乙醇、苯扎溴铵、过氧化氢、盐酸等
解剖间 Anatomy room	实验技术人员	甲醛、乙酸、乙醇等
热力站 Heating substation	锅炉操作人员	噪声、高温等
污水处理站 Wastewater treatment station	操作人员	氢氧化钠、聚合氯化铝等

3.2 建立职业健康安全管理

良好的规章制度是建设实验动物机构职业健康安全管理体系的基本保障, 按照《工作场所职业卫生监督管理规定》^[7], 机构至少需要建立 13 项职业健康安全管理

制度。需要建立的职业健康安全管理

制度包括:

(1) 职业病危害防治责任制度;

(2) 职业病危害警示与告知制度;

(3) 职业病危害项目申报制度;

(4) 职业病防治宣传教育培训制度;

(5) 职业病防护用品管理制度;

(6) 职业病防护设施维护检修制度;

(7) 职

业病危害监测、检测和评价管理制度;

(8) 建设项目职业病防护设施“三同时”管理制度;

(9) 劳动者职业健康监护及其档案管理制度;

(10) 职业病危害事故处置与报告制度;

(11) 岗位职业健康操作规程;

(12) 职业病危害应急救援与管理制度;

(13) 法律法规、规定的其他职业病防治制度等。这 13 项管理制度是实验动物机构建立职业健康安全管理体系的最基本要求。各机构也可在此基础上, 制定更加详细的管理制度或标准操作规程, 并需要定期修改、完善。

3.3 职业健康安全培训要求

国家对职业健康培训内容及培训时长有严格的规定^[6]。机构主要负责人及职业健康管理人员按照法规要求，需参加外部培训、考试并取得合格证书；实验动物从业人员的职业健康安全培训可由机构内部自行组织及考试。表5汇总了国家卫生健康委对各层级人员的培训内容及培训时间要求。

实验动物机构可制定年度培训计划并组织实施。职业健康安全年度培训计划包括培训题目、培训时长、考试方式、培训人、被培训人（部门）、培训效果评价等。职业健康培训计划也可以与安全生产培训计划及生物安全培训计划^[21-22]合并成一份环境-健康-安全（Environment-Health-Safety, EHS）年度培训计划。培训计划需要签字生效，以保证培训计划的合规性、有效性及可监督实施。

3.4 从业人员职业健康检查

职业健康检查是法律规定的一种强制性体检。《职业健康检查管理办法》^[23]、《职业健康监护技术规范》^[24]及《用人单位职业健康监护监督管理办法》^[8]均要求机构对从业人员进行职业健康检查。体检的内容及项目是根据从业人员的工作岗位及是否接触职业病危害因素来设定的。按照规范要求，职业健康检查包括岗前、岗中、离岗前检查。

岗前检查是从业人员在从事职业病危害岗位实际工作前的检查。如果新员工入职于存在职业病危害因素的岗位，在入职前就需进行职业健康检查。这个检查对实验动物机构本身有保护作用，同时也让员工清楚了解从事该岗位可能会接触到的职业病危害因

素^[21]。如果员工有职业病禁忌证，可不安排此岗位的工作。上岗前职业病检查还包括员工从非职业病岗位转到职业病岗位工作前的职业健康体检。

岗中检查是根据职业病危害因素，定期（可以是每年一次）进行职业健康检查。需要说明的是，常规的健康体检不可以代替职业健康监护体检。同时，为避免员工重复体检，职业健康体检可以在普通健康体检的基础上，增加需要做职业病检查的项目。

离岗前检查是指在离岗前需要给接触职业病危害的员工安排体检。体检的目的是获知此员工在本单位是否患有职业病，避免日后可能产生的法律纠纷。员工离职前后90 d内所做的职业健康体检都可认为是离岗前职业健康体检。

职业健康检查不同于实验动物机构组织的年度体检。职业病体检需要在有职业病体检资质的检查机构或医院进行。如果是放射性相关的职业健康体检，还需要体检机构有放射性职业健康体检资质。职业病体检结果需经过有医学背景的人员（可以是机构内有医学背景的人员，不是必须有行医资质）评估后存入员工职业健康档案。评估也可请职业病体检机构进行。如果发现疑似职业病，需要到医疗机构进行确诊，并及时报告相关部门。

3.5 职业病危害因素现场检测

实验动物机构除了对从业人员检查外，还需对有职业病危害因素的场所进行检查。检测机构需要有相应资质。如果是职业病危害严重的单位，每年至少进行一次场所检测，每3年至少进行一次职业病危害现状评价。由于大部分实验动物机构属于职业病危害一

表5 实验动物机构的职业健康培训内容及培训时间要求
Table 5 Required content and schedule of occupational health training in laboratory animal institutions

被培训人 Trainee	培训类别 Training category	培训内容 Training content	培训时间/h Training time/h	考试、获证 Testing/ certificate
主要负责人 Responsible person	首次培训	我国职业健康形势，职业健康法律法规，职业健康管理知识，职业健康相关工作介绍及案例分析等	16	外部，考试获证
	继续培训	职业健康相关法律法规、规章，职业病危害事故应急救援，优秀案例分析，常见职业病防治违法违规案例分析，职业病传染病预防控制措施等	8	外部， 考试获证
职业健康管理人员 Occupational health manager	首次培训	职业健康相关法律法规、规章及主要职业健康标准，职业病危害因素及其防护措施，个体防护装备，职业病防护设施“三同时”职业病申报，警示和告知，职业健康档案管理等	16	外部，考试获证
	继续培训	职业健康法律法规，应急救援，工作相关疾病预防控制案例分析等	8	外部，考试获证
从业人员 Employee	岗前培训	本机构的职业健康管理制度和操作规程等	8	内部，考试
	岗中培训	按照机构实际情况定制	4	内部，考试

般单位,故每3年进行一次场所职业病危害因素检测即可。若是放射性工作场所或其他特殊的工作场所,需要按照具体要求的频率进行检测。检测报告及结果需要在机构内公示,检测结果需存入档案。

3.6 落实建设项目职业病防护设施“三同时”制度

按照《中华人民共和国职业病防治法》及《建设项目职业病防护设施“三同时”监督管理办法》^[25]的要求,任何新建、改建或扩建的实验动物机构的职业病防护设施都必须与主体工程同时设计、同时施工、同时投入生产和使用(简称“职业健康三同时”)。职业病防护设施“三同时”是被不少实验动物机构尤其是建设年代较早的实验动物机构所忽略的一个重要步骤。由于职业健康安全防护三同时是法规强制要求的,所有实验动物机构一定要高度重视,在实验动物设施项目规划前期及建设期间就需要同步开展职业病防护设施“三同时”的工作。此工作一般需请有资质的第三方机构与实验动物机构共同完成。如果前期没有做建设项目职业病防护“三同时”,则可以请有资质的第三方机构完成职业健康防护现状评价。

3.7 建立及维护职业健康档案

职业健康档案管理是实验动物机构职业健康安全管理体系的重要一环,是职业健康管理工作的基础。按照《职业卫生档案管理规范》^[24]要求,实验动物机构需要建立至少7个职业健康管理档案。职业健康管理档案包括:(1)建设项目职业卫生“三同时”档案;(2)职业卫生管理档案;(3)职业卫生宣传培训档案;(4)职业病危害因素监测与检测评价档案;(5)用人单位职业健康监护管理档案;(6)劳动者个人职业健康监护档案;(7)法律、行政法规、规章要求的其他资料文件。实验动物机构还可按照自己的实际运行情况,增加其他的职业健康管理档案。

3.8 建立职业危害告知管理制度

职业危害告知的目的是使从业人员知晓本人工作岗位或工作场所存在的职业病危害因素、机构采取的防护措施、人员及环境职业健康危害因素检测的结果等。通过告知,可以使从业人员了解所在机构目前开展职业病防治工作的进展,提高自我保护意识,提升机构的职业健康管理水平。职业病危害告知至少包括以下5种方式:合同告知、公告栏告知、警示标识告知、职业健康培训告知和职业健康检查结果告知。

实验动物机构在与从业人员签订劳动合同时,需告知从业人员所在的岗位、可能接触到的职业病危害因素及可能产生的职业病、本岗位的职业禁忌证和职

业病防护措施及待遇等,并在劳动合同中写明。如果是制式合同比较难于增加条文,机构可以采用合同附件形式告知。此合同附件也需要员工及机构共同签字并存档。

职业病危害告知卡是警示告知的一种,用来告知现场工作人员此场所存在的职业病危害因素。告知卡上列明可能造成的健康危害、防护措施、应急处理及急救电话等。实验动物机构需要在所有存在职业健康危害因素的工作场所的醒目位置张贴职业危害告知卡,并对员工进行培训。告知卡应经常检查,如果发现脱落、损坏等,需要及时修整或更换。有职业病危害因素的场所还需贴放警示标识。

公告栏公布的内容可包括职业病防治的规章制度、操作规程、职业病危害事故应急预案、工作场所职业病危害因素检测结果、典型案例等。职业病公告栏应尽量设置在门厅、入口等醒目位置。

通过培训告知员工职业病防治的法律法规、本机构的标准操作规程、职业病防护设备和个人防护用品等,可以增强实验动物从业人员的职业病防范意识,帮助他们正确使用个人防护用品。培训告知可以通过年度培训计划及实际培训来完成。

职业健康体检及职业危害因素环境检测的结果也需要告知员工。职业健康体检报告需要分发给员工,并签字留底。实验动物机构可要求职业病体检单位提供年度职业健康体检总结报告。

3.9 建立职业病危害事故应急救援预案

实验动物机构需要制定本机构的职业病危害事故应急救援预案。如果前期未制定也可以补制定。应急预案的基本内容应当包括:(1)应急救援组织机构;(2)应急队伍人员的职责;(3)应急队伍,包括现场救护、医疗、治安、消防、交通管理、通讯、供应、运输、后勤等;(4)应急救援装备、物资、药品配备;(5)事故发生后应采取的处理措施;(6)救援方式、人员防护、现场保护;(7)危险区域的隔离;(8)应急培训计划及演练;(9)本预案的启动与终止场景等。该预案可以在做职业健康防护设施“三同时”时由第三方协助制定,也可由机构自行制定。实验动物机构在预案制定后,需要对员工进行培训,并组织演练。

4 总结

实验动物机构建立、实施和维护职业健康安全管理体系,旨在保障从业人员健康安全,消除机构危险源,减少因工作导致意外伤害和职业性疾病发生的概

率^[26-27]。通过提高工作场所的健康性和安全性,改善劳动条件,增加防护,维护实验动物从业人员的合法利益。职业健康安全管理体的建立与实施,可提高实验动物机构形象,完善机构内部管理,提高从业人员的凝聚力,对创造更好的社会效益和经济效益起到极大的推动作用。

职业健康安全管理体的建设是一个长期、复杂且持续性的工作。笔者建议实验动物机构在建设职业健康安全管理体的过程中,要紧密结合本机构的实际情况,关注国家法律法规的更新,按照要求组建适合于本机构的管理团队,制定相应的管理文件及管理规程,建立适合的培训体系,做好个人防护用品的管理。实验动物机构的职业健康安全管理档案除了满足国家要求外,也需要有本机构的特点。总之,实验动物机构需结合本机构的实际与特点建立适宜的职业健康安全管理体。

[作者贡献 Author Contribution]

邵奇鸣起草论文,对论文内容整体把握,修订回复审稿意见;
卞勇对论文内容进行修订,并负责图表修改、参考文献查找和修订;
施爱民对论文内容及文字进行修订。

[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] KOPIAS J A. Multidisciplinary model of occupational health services. Medical and non-medical aspects of occupational health[J]. Int J Occup Med Environ Health, 2001,14(1):23-28.
- [2] 中华人民共和国卫生部. 职业卫生名词术语 2010[S/OL].(2010-08-01) [2025-04-13]. <http://www.nhc.gov.cn/wjw/pyl/201102/50670/files/6cd35e6dd2f244db8aae98e3eedc8f31.pdf>. Ministry of Health, People's Republic of China. Terms of occupational health, 2010[S/OL]. (2010-08-01) [2025-04-13]. <http://www.nhc.gov.cn/wjw/pyl/201102/50670/files/6cd35e6dd2f244db8aae98e3eedc8f31.pdf>.
- [3] 国家统计局. 中华人民共和国 2023 年国民经济和社会发展统计公报[R/OL]. (2024-02-29)[2025-10-09]. https://www.stats.gov.cn/sj/zxfb/202402/t20240228_1947915.html. National Bureau of Statistics of China. Statistical bulletin of the People's Republic of China on national economic and social development in 2023 [R/OL]. (2024-02-29) [2025-04-09]. https://www.stats.gov.cn/sj/zxfb/202402/t20240228_1947915.html.
- [4] 中华人民共和国国务院. 国务院关于实施健康中国行动的意见[A/OL]. (2019-07-15)[2025-04-09]. http://www.gov.cn/zhengce/content/2019-07/15/content_5409492.htm. State Council of the People's Republic of China. Opinions of the state council on the implementation of healthy China initiative [A/OL].(2019-07-15)[2025-04-09]. http://www.gov.cn/zhengce/content/2019-07/15/content_5409492.htm.
- [5] 全国人民代表大会. 中华人民共和国职业病防治法[EB/OL]. (2019-01-07) [2025-04-09]. http://www.npc.gov.cnnpc/c2/c30834/201905/t20190521_296649.html. National People's Congress of the People's Republic of China. Law of the People's Republic of China on prevention and control of occupational diseases[EB/OL]. (2019-01-07) [2025-04-09]. http://www.npc.gov.cnnpc/c2/c30834/201905/t20190521_296649.html.
- [6] 国家卫生健康委员会. 国家卫生健康委办公厅关于进一步加强用人单位职业健康培训工作的通知[A/OL]. (2022-12-31)[2025-04-09]. https://www.gov.cn/zhengce/zhengceku/2022-12/30/content_5734220.htm. National Health Commission. Notice of the General Office of the National Health Commission on further strengthening occupational health training for employers[A/OL]. (2022-12-29) [2025-04-09]. https://www.gov.cn/zhengce/zhengceku/2022-12/30/content_5734220.htm.
- [7] 国家卫生健康委员会. 工作场所职业卫生监督管理规定[A/OL]. (2020-12-31) [2025-04-09]. https://www.gov.cn/gongbao/content/2021/content_5595925.htm. National Health Commission. Regulations on the supervision and management of occupational health in the workplace [A/OL]. (2020-12-31) [2025-04-09]. https://www.gov.cn/gongbao/content/2021/content_5595925.htm.
- [8] 国家安全生产监督管理总局. 用人单位职业健康监护监督管理办法[A/OL].(2012-04-27)[2024-09-09]. https://www.moj.gov.cn/pub/sfbgw/flfggz/flfggzbmzg/201207/t20120705_145165.html. State Administration of Work Safety. Measures for the Supervision and Management of Occupational Health Surveillance by Employers [A/OL]. (2012-04-27) [2025-04-09]. https://www.moj.gov.cn/pub/sfbgw/flfggz/flfggzbmzg/201207/t20120705_145165.html.
- [9] 国家安全监管总局办公厅. 职业卫生档案管理规范[A/OL]. (2014-01-09) [2025-03-28]. http://www.mem.gov.cn/gk/gwgg/agwzfl/tz_01/201401/t20140109. General Office of the State Administration of Work Safety. Guidelines for occupational health archives management[A/OL]. (2014-01-09) [2025-03-28]. http://www.mem.gov.cn/gk/gwgg/agwzfl/tz_01/201401/t20140109.
- [10] British Standard Institute. Guide to occupational health and safety management systems, BS 8800: 1996[S]. London: British Standard Institute, 1996.
- [11] American Industrial Hygiene Association. Occupation health and safety management system, ANSI Z10: 1997[S]. Washington: American Industrial Hygiene Association, 1997.
- [12] Council of Standards Australia, Council of Standards New Zealand. Occupational health and safety management principles, systems, Specification with guidance for use. AS/ NZS 4801. 2000[S]. Sydney: Standards Australia International Ltd, 2000.
- [13] Japan Industrial Safety and Health Association. Occupational health and safety management system guidelines, JIS Q 45100: 1997 [S]. Tokyo: Japan Industrial Safety and Health Association, 1997.

- [14] Det Norske Veritas. Occupational health and safety management system certification standards[S]. Oslo: Det Norske Veritas, 1997.
- [15] International Organization for Standardization, Committee on Conformity Assessment. Occupational health and safety management systems —Requirements with guidance for use, ISO 45001, 2018[S]. Geneva: International Organization for Standardization, Committee on Conformity Assessment, 2018.
- [16] 国务院新闻办公室. 中国特色社会主义法律体系[A/OL]. (2011-10-27)[2024-12-09]. http://www.scio.gov.cn/zfbps/ndhf/2011n/202207/t20220704_130067.html.
Information Office of the State Council of the People's Republic of China. The Socialist System of Laws with Chinese Characteristics[A/OL]. (2011-10-27) [2024-12-09]. http://www.scio.gov.cn/zfbps/ndhf/2011n/202207/t20220704_130067.html.
- [17] 国家市场监督管理总局, 国家标准化管理委员会. 职业健康安全管理体系 要求及使用指南: GB/T 45001—2020[S]. 北京: 中国标准出版社, 2020.
State Administration for Market Regulation, National Standardization Administration. Occupational health and safety management systems—Requirements and guidelines for use: GB/T 45001—2020 [S]. Beijing: Standards Press of China, 2020.
- [18] 国家市场监督管理总局, 国家标准化管理委员会. 职业健康安全管理体系 小型组织实施 GB/T 45001—2020 指南: GB/T 45007—2024 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2024.
State Administration for Market Regulation, National Standardization Administration. Occupational health and safety management systems—Guidance for small organizations on implementation of GB/T 45001-2020: GB/T 45007-2024 [S]. Beijing: Standards Press of China, 2024.
- [19] 国家卫生健康委, 人力资源社会保障部, 国家疾控局, 等. 职业病分类和目录 [A/OL]. (2013-12-30)[2024-12-11][2025-04-09]. https://www.gov.cn/zhengce/zhengceku/202412/content_6992843.htm.
National Health Commission, Ministry of Human Resources and Social Security, National Administration of Disease Control and Prevention, et al. Occupation disease classification and catalogue[A/OL]. (2013-12-30) (2024-12-11) [2025-04-09]. https://www.gov.cn/zhengce/zhengceku/202412/content_6992843.htm.
- [20] 国家卫生健康委, 人力资源社会保障部, 国家安监总局, 等. 职业病危害因素分类目录[A/OL]. (2015-11-30)[2025-04-09]. https://www.gov.cn/zhengce/zhengceku/202412/content_6992843.htm.
National Health Commission, Ministry of Human Resources and Social Security, State Administration of Work Safety, et al. Classification of occupational hazards [A/OL]. (2015-11-30) [2025-04-09]. https://www.gov.cn/zhengce/zhengceku/202412/content_6992843.htm.
- [21] 陆嘉琦, 王建飞. 浅谈“员工职业健康和安全计划”在实验动物饲养管理和使用中的必要性[J]. 实验动物与比较医学, 2013, 33(5): 365-368. DOI: 10.3969/j.issn.1674-5817.2013.05.009.
- LU J Q, WANG J F. Discussion on the necessity of "Employee Occupational Health and Safety Plan" in the management and use of laboratory animals [J]. Lab Anim Comp Med, 2013, 33(5): 365-368. DOI: 10.3969/j.issn.1674-5817.2013.05.009.
- [22] 宋志刚, 刘芳, 任晓楠, 等. 实验动物从业人员环境健康安全管理体系中生物安全培训的重要性[J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(8): 7-10. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7856.2018.08.002.
SONG Z G, LIU F, REN X N, et al. Importance of biosafety training in EHS management system for laboratory animal practitioners[J]. Chin J Comp Med, 2018, 28(8): 7-10. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7856.2018.08.002.
- [23] 国家卫生健康委员会. 职业健康检查管理办法[A/OL]. (2020-12-31) [2024-09-09]. https://www.gov.cn/zhengce/2015-03/26/content_5713802.htm.
National Health Commission. Occupational health inspection regulations [A/OL]. (2020-12-31) [2025-04-09]. https://www.gov.cn/zhengce/2015-03/26/content_5713802.htm.
- [24] 国家卫生和计划生育委员会. 职业健康监护技术规范: GBZ 188—2014 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2014. https://www.gov.cn/gongbao/content/2021/content_5595925.htm.
National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China. Technical specification for occupational health monitoring: GBZ 188-2014[S]. Beijing: Standards Press of China, 2014. https://www.gov.cn/gongbao/content/2021/content_5595925.htm.
- [25] 国家安全生产监督管理总局. 建设项目职业病防护设施“三同时”监督管理办法[A/OL]. (2017-03-09)[2025-04-09]. https://www.gov.cn/gongbao/content/2017/content_5222950.htm.
State Administration of Work Safety. Measures for the "three simultaneous" supervision and administration of occupational disease prevention facilities for construction projects[A/OL]. (2017-03-09)[2025-04-09]. https://www.gov.cn/gongbao/content/2017/content_5222950.htm
- [26] 邵奇鸣, 窦木林. 实验动物设施的职业健康管理体系的建立与实施初探[J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(8): 1-6. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7856.2018.08.001.
SHAO Q M, DOU M L. The establishment and implementation of an occupational health management system for laboratory animal facilities[J]. Chin J Comp Med, 2018, 28(8): 1-6. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7856.2018.08.001.
- [27] 吕京, 田燕超. 实验动物机构职业健康安全手册[M]. 北京: 中国标准出版社, 2015: 1-178.
LÜ J, TIAN Y C. Occupational health and safety manual for experimental animal institutions[M]. Beijing: Standards Press of China, 2015: 1-178.
- (收稿日期: 2024-08-23 修回日期: 2025-01-01)
(本文责任编辑: 张俊彦)
- [引用本文]**
邵奇鸣, 卞勇, 施爱民. 实验动物机构职业健康安全管理体系建设要点[J]. 实验动物与比较医学, 2025, 45(2): 188-196. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.123.
SHAO Q M, BIAN Y, SHI A M. Key points for establishing occupational health and safety management system in laboratory animal institutions[J]. Lab Anim Com Med, 2025, 45(2): 188-196. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.123.



吕龙宝, 正高级工程师, 中国科学院昆明动物研究所实验动物中心主任, 国家非人灵长类实验动物资源库常务副主任, 中国科学院关键技术人才、云南省技术创新人才。长期从事实验动物资源(非人灵长类、树鼩、大鼠、小鼠等)、基础生物学、标准、动物福利、疾病动物模型、动物实验关键技术及树鼩实验动物化研究及管理工作。目前主持国家重点研发计划1项、省部级项目5项; 已获授权专利18项, 主编和参与国家、行业、地方、团体标准制定20项; 发表论文100余篇; 参编著作12部; 主持完成15个资质的认证/认可, 其中包括AAALAC国际认可和全国首家通过实验动物机构的中国合格评定国家认可委员会(CNAS)认可。兼任中国实验动物学会第七届理事会常务理事、CNAS实验动物机构认可评审员、中国实验灵长类养殖开发学会副会长、中国科学院实验动物工作委员会委员、中国实验动物学会实验动物标准委员会副主任委员、中国实验动物学会福利伦理专业委员会委员、云南省实验动物学会理事长、昆明市实验动物行业协会副理事长等, 同时是《中国实验动物学报》《中国比较医学杂志》《实验动物科学》《实验动物与比较医学》编委。



毛华明, 教授, 现任云南农业大学动物科学技术学院教授。兼任中国畜牧兽医学会动物营养学分会理事、云南省奶业协会会长、云南省青年联合会第八届常务委员、大理白族自治州人民政府顾问。主要从事反刍动物生产、资源保护利用、饲料加工处理技术及工艺领域的基础研究、技术研发和科技推广工作, 先后承担国家“863”、国家自然科学基金, 以及云南省自然科学基金、重大生物专项(奶业专项)和重点研发等项目。研究成果“乌骨绵羊的发现及其种质特征”获云南省自然科学一等奖(2008年, 排名第1), “云南肉羊肉牛产业化关键技术创建与集成示范”获云南省科技进步奖一等奖(2014年, 排名第2), “反刍动物饲料加工技术与工艺研究及新产品研发推广”(2008, 排名第1)和“优质牛奶配套生产技术”(2009年, 排名第1)获云南省科技进步奖二等奖。主编出版《龙陵黄山羊保护与开发》《槟榔江水牛保护与开发》等专著4部, 授权专利40余项, 发表论文300余篇, 其中以第一作者或通信作者发表SCI论文16篇。

浅谈非人灵长类实验动物从业人员的职业健康管理措施

李倩^{1,2}, 陈佳琦^{1,2,3}, 李丽红^{1,2}, 张飞燕^{1,2}, 毛华明³, 吕龙宝^{1,2}

(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. 云南农业大学动物科学技术学院, 昆明 650201)

[摘要] 非人灵长类因其与人类在遗传学和生理学上的高度相似性, 成为生命科学研究和生物医药开发的关键性实验动物, 不仅为神经系统疾病和传染病的机制研究提供理想平台, 还被广泛用于大分子药物的临床前安全性评估, 被誉为“金标准”。然而, 这种生物学相似性也导致从业人员因接触非人灵长类实验动物或其组织、体液而面临较高的人兽共患病传播风险。结合近年来国内外人兽共患病暴发情况及国家生物安全法颁布实施的背景, 本文综述了非人灵长类实验动物从业人员面临的职业风险因素(包括生物因素、化学因素、物理因素)、常见的人兽共患病及其病原体分类、传播途径、危害程度, 以及从业人员职业危害暴露的处理方式, 进而提出建立多维防控体系:

[基金项目] 国家重点研发计划项目“灵长类实验动物育种、繁育、SPF猴培育及资源保护研究”(2022YFF0710900)、“灵长类实验动物生物样本资源建设”(2022YFF0710902); 云南(昆明)院士专家工作站计划项目“贺争鸣实验动物专家工作站”(YSZJGZZ-2022063); 云南省贺争鸣专家工作站(202305AF150160)

[第一作者] 李倩(1986—), 女, 硕士, 工程师, 研究方向: 实验动物质量监测及营养管理。E-mail: liqian@mail.kiz.ac.cn。ORCID: 0009-0003-0980-6000;

陈佳琦(1987—), 女, 博士研究生, 工程师, 研究方向: 实验动物饲养管理、动物营养与饲料科学研究。E-mail: ynreddragonfly@126.com。ORCID: 0009-0004-8256-8579

[通信作者] 吕龙宝(1974—), 男, 博士研究生, 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;

毛华明(1963—), 男, 博士, 教授, 研究方向: 研究方向为反刍动物资源与营养。E-mail: 3369252661@qq.com。ORCID: 0009-0002-9029-987X

(1) 风险评估与应急处理, 即通过职业健康安全委员会 (Occupational Health and Safety Committee, OHSC) 定期识别危险源, 制定暴露后紧急处理流程; (2) 管理体系优化, 即完善设施设计、个人防护装备配置, 并强化从业人员健康监护与疫苗接种; (3) 技术培训与规范操作, 即开展非人灵长类实验动物行为学、生物安全操作等专项培训, 推广智能监控技术以减少攻击性事件等措施。本文旨在提高非人灵长类实验动物从业人员的健康安全意识, 加强人员个人防护及专业技能操作的规范性指引, 从而保障从业人员健康安全, 降低职业暴露率, 有效预防实验动物相关职业病。

[关键词] 非人灵长类动物; 职业健康; 职业暴露; 生物安全; 人兽共患病

[中图分类号] R136; Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2025)02-0197-09



Occupational Health Risk Management Measures for Personnel Handling Non-Human Primate Laboratory Animals: An Overview

LI Qian^{1,2}, CHEN Jiaqi^{1,2,3}, LI Lihong^{1,2}, ZHANG Feiyan^{1,2}, MAO Huaming³, LÜ Longbao^{1,2}

(1. Kunming Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650223, China; 2. National Resource Center for Non-Human Primates, Kunming 650223, China; 3. Faculty of Animal Science and Technology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China)

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

MAO Huaming (ORCID: 0009-0002-9029-987X), E-mail: 3369252661@qq.com

[ABSTRACT] Owing to their high genetic and physiological similarities to humans, non-human primates (NHPs) have become pivotal animal models in life sciences research and biomedical development. NHP laboratory animals are not only an ideal platform for exploring the mechanisms of neurological diseases and infectious diseases, but they are also widely used in preclinical safety evaluations of macromolecular drugs, which are considered the "gold standard". Nevertheless, this biological similarity increases the risk of zoonotic disease transmission to personnel working with NHP laboratory animals, their tissues, and body fluids. In light of recent domestic and international outbreaks of zoonotic diseases as well as the implementation of the Biosafety Law, this study examines the occupational risk factors encountered by personnel working with NHPs. This includes biological, chemical, and physical factors. This paper also covers common zoonoses, classification of the corresponding pathogens, transmission routes, risk severity levels, and protocols for post-exposure management. A multidimensional prevention and control framework is proposed, which includes the following components. (1) Risk Assessment and Emergency Response: Regularly identify hazards through an Occupational Health and Safety Committee (OHSC) and develop post-exposure emergency protocols. (2) Optimization of Management Systems: Improve facility design, optimize the allocation of personal protective equipment, and enhance health surveillance and vaccination programs. (3) Technical Training and Standardized Operations: Provide specialized training in NHP laboratory animal ethology and biosafety practices. Additionally, implement intelligent monitoring technologies to reduce the occurrence of aggressive incidents. This paper outlines measures designed to enhance health and safety awareness among personnel working with NHP laboratory animals. It emphasizes the need for strengthened guidance on the use of personal protective equipment (PPE) and the standardization of professional operational practices. The goal is to safeguard personnel health and safety, reduce occupational exposure rates, and effectively prevent occupational diseases related to laboratory animals.

[Key words] Non-human primates; Occupational health; Occupational exposure; Biosafety; Zoonosis

非人灵长类 (non-human primates, NHPs) 作为目前备受瞩目的实验动物, 在推动生命科学研究、生物技术创新、生物医药产业发展中具有重要意义。NHPs

和人类的生长发育系统存在密切联系, 例如: 黑猩猩与人类共享98.77%的蛋白编码基因^[1], 食蟹猴蛋白质编码基因与人类的相似性为98.3%^[2]。NHPs不仅是研

究神经系统和传染性疾病的理想动物模型^[3],而且作为临床前研究的“金标准”,在评估大分子候选药物的安全性、生物学活性或药理效应方面,展现出了不可替代的实验价值^[4]。

然而,正是因为NHPs在生物学和遗传学层面与人类具有高度相似性,从业人员与NHPs之间的病原生物传播风险较其他实验动物群体更大^[5]。许多自然感染NHPs的病原体可能跨物种传染给人类,一些人间传染性病原体也同样可传染给NHPs,并存在从NHPs再次传染给人类的可能。这一潜在风险意味着,与NHPs或其血液、组织有所接触的从业人员应更加关注职业健康安全,并在日常工作中严格做好个人防护及规范操作。

实验动物从业人员是指从事实验动物饲养管理、动物实验操作、技术支持、科学研究、行政管理、实验动物医疗护理、辅助作业,以及阶段性参与相关工作的各类专业人员^[6]。研究表明,直接接触实验动物的从业人员由于长期暴露在实验动物环境中,呼吸道和过敏性疾病的发生风险会明显增加^[7]。同时,人兽共患病和动物性气溶胶也可能对相关从业人员的健康构成较大威胁。此外,在动物实验操作过程中,还可能存在被动物抓伤或咬伤的风险,尤其是涉及感染性动物时,可能造成更为严重的后果。

尽管实验动物从业人员上岗前都会接受专业培训,但在实际操作中,个人防护工作落实不足或者操作不规范的问题依然普遍存在。例如,工作人员因护目镜影响视野而不愿佩戴,对动物保定技术不熟练,对职业健康安全风险的意识不足等。因此,如何保障NHPs从业人员的职业安全并减少职业危害,已成为不容忽视的问题。本文就NHPs从业人员可能存在的职业健康风险问题,结合相关法律法规、标准、认可准则以及本单位的实践经验,提出自己的见解,仅供同行探讨。

1 NHPs从业人员的职业风险因素

在与NHPs及其分泌物、排泄物直接接触的过程中,从业人员往往因为疏忽而可能暴露于多种对人体有害的物理、化学或生物因素^[8],具体包含以下3个方面。

1.1 生物因素

涉及职业健康的生物因素可划分为两大类。

第一类是传染病,包括但不限于人兽共患病。可细分为以下3种:(1)病毒类疾病,如埃博拉出血热、猴B病毒感染、黄热病、狂犬病、麻疹、猴痘等^[5];(2)病原菌类疾病,如结核病、志贺氏菌病、沙门菌

病等;(3)病原寄生虫类疾病,如弓形虫病、阿米巴原虫病等。其传播途径包括:直接接触(咬伤、抓伤等)、飞沫传播、空气传播(生物气溶胶)、食物、水和污染物以及媒介传播等^[5,8]。

第二类是过敏原。过敏是一种常见于实验动物护理或使用人员的职业性疾病^[9-10],可能对多达三分之一的动物实验人员的生活和工作产生不利影响,症状包括鼻炎、皮疹和哮喘等^[11]。NHPs主要过敏原包括毛发、排泄物、血液及组织液等。其主要传播途径是吸入,其次是皮肤接触和眼睛接触^[12-13]。空气流动性、湿度、清洁消毒等因素都能影响空气中过敏原的含量^[14]。

1.2 化学因素

在NHPs饲养和操作过程中,为保持环境洁净度而需要使用各类化学消毒剂,如乙醇、84消毒液、过氧乙酸等。在手术类实验中还会用到挥发性麻醉药(如异氟烷等),以及保存组织的化学试剂(如多聚甲醛等)。此外,实验动物饲养过程中还会产生大量的氨气等有害气体。这些化学物质的浓度达到一定水平时,会对人体的皮肤、眼睛、呼吸道及肺部组织等造成不同程度的损害;若长期暴露于此类化学物质中,人体的肝脏、神经系统及肌肉运动功能会出现紊乱,进而增加感染甚至癌变的风险。

1.3 物理因素

一是动物伤害:实验动物常因恐惧或疼痛而抓伤、扎伤、咬伤从业人员。二是物品伤害:在抬举笼具、动物、大型仪器、饲料等重物时,从业人员可能存在肌肉过度劳损、锐器伤害、摔倒等风险。三是噪声伤害:在动物饲养区、清洁区或实验操作区放置的高压灭菌器、麻醉机、B超机、监护仪、高频电刀等仪器设备会产生噪声污染,长时间在噪声环境中工作,可能会引起听力损伤、头痛、失眠等症状。此外,个人防护装备使用不当、热烧伤、低温冻伤等也是值得关注的物理风险因素。

2 NHPs从业人员常见的人兽共患病

世界卫生组织(World Health Organization, WHO)将人兽共患病(zoonosis)定义为由共同病原体引起的、能在脊椎动物与人类之间自然传播的疾病。这类疾病由人类和其他脊椎动物共有的病原体引起,且在流行病学上具有关联性。在已鉴别出的1407种人类病原体中,属于人兽共患病的病原体占比高达58%。NHPs被视为人兽共患病的潜在宿主,约25%的人类新发传染病与非人灵长类宿主动物共有^[8]。NHPs从业人

员因职业特性需频繁接触动物，存在携带人兽共患病病原体的风险。因此，提升工作人员对于NHPs实验动物相关人兽共患病问题的认知尤为重要，让其充分了解并掌握必要的预防措施，尽量减少与病原体的直接接触，从而保障其身体健康与人身安全。

2.1 NHPs 相关的人兽共患病病原体

人兽共患病病原体可通过多种途径传播，包括针

头刺伤、动物咬伤和抓伤、污染物飞溅导致的意外摄入，黏膜污染、笼子和设备的污染，甚至传染性气溶胶等。表1总结了几种与NHPs相关的病原体，这些病原体可能存在于所有灵长类动物中，引起慢性或潜伏性感染^[5,15]。

2.2 NHPs 相关的人兽共患病

由于人类和NHPs具有密切的系统发育关系，这使

表1 NHPs 相关的人兽共患病病原体
Table 1 Zoonotic pathogens associated with NHPs

病原体类型 Pathogens types	病原体名称 Pathogen names	非人灵长类动物 Non-human primates types				
		猕猴 Macaques	狒狒 Baboons	长尾猴 Guenons	松鼠猴 Squirrel monkeys	黑猩猩 Chimpanzees
病毒 Viruses	猴疱疹病毒/B病毒	√				√
	猴D型逆转录病毒	√				
	猴免疫缺陷病毒	√		√		√
	猴T细胞趋向性病毒1型	√				
	猴泡沫病毒	√	√	√		
	猴空泡病毒40	√				
	猴麻疹病毒	√				
	猴痘病毒	√	√	√		√
	黄热病毒	√	√	√	√	√
	登革病毒	√	√	√	√	√
	埃博拉病毒	√				
	甲型肝炎病毒					√
	传染性软疣病毒					√
	乙型肝炎病毒					√
细菌 Bacteria	类鼻疽伯克霍尔德菌	√				√
	弯曲杆菌属	√	√	√	√	√
	结核分枝杆菌	√	√	√	√	√
	牛分枝杆菌	√	√	√	√	√
	麻风分枝杆菌	√				√
	钩端螺旋体属	√	√	√	√	√
	沙门菌属	√	√	√	√	√
	志贺菌属	√	√	√	√	√
	假结核耶尔森菌	√	√	√	√	√
	小肠结肠炎耶尔森菌	√	√	√	√	√
后生动物寄生虫 Metazoan parasites	微小膜壳绦虫	√	√		√	√
	结节线虫属	√	√	√		√
	类圆线虫属	√	√			
	鞭虫属	√	√	√	√	√
	蠕形住肠线虫	√	√	√		
	弓形虫属					√
	疣状肠杆菌					√
原生动动物寄生虫 Protozoan parasites	结肠小袋纤毛虫	√	√	√	√	√
	隐孢子虫属	√	√	√	√	√
	溶组织内阿米巴	√	√	√	√	√
	肠贾第鞭毛虫	√	√	√	√	√
	疟原虫	√	√	√	√	√
	克氏锥虫				√	

得二者之间的人兽共患病发生风险显著增大。在饲养、生产、实验、运输等过程中，工作人员可能通过多种途径被 NHPs 及其组织所携带的病原体感染，同时 NHPs 也可能通过与患病工作人员的接触而被感染。目前，NHPs 相关的主要人兽共患病种类、病原体危害程度、传播途径以及人类感染症状详见表 2。

3 NHPs 从业人员职业危害暴露的处理方式

从业人员在接触实验动物过程中，面临多种职业危害暴露风险。张朝阳等^[39] 研究显示，67.40% 的兽

医人员发生过职业危害暴露，其中生物化学伤害占 62%，伤害性暴露占 61%，吸入性暴露占 49%，接触性暴露占 44%，器械伤害占 25%。以下是针对 NHPs 职业危害暴露的处理方式。

3.1 紧急暴露处理

NHPs 从业人员发生紧急暴露事件时，可按如下步骤进行处理。（1）皮肤暴露：首先应立即用流动清水快速冲洗伤口及周围皮肤，若遇出血状况，则需在冲洗的同时，适度挤压伤口以促进血液及潜在污染物的排出；持续冲洗伤口 15 min 以上，然后使用肥皂或聚

表 2 人兽共患病的传播途径及人员感染症状

Table 2 Transmission routes of zoonotic diseases and symptoms in infected humans

疾病名称 Disease names	病原体名称 Pathogen names	危害程度分类* Hazard classifications*	传播途径 Transmission routes	人体临床症状 Human clinical symptoms
猴 B 病毒感染 Simian B virus infection	猴疱疹病毒/B 病毒	第一类	咬伤、抓伤、黏膜暴露	伤口部位疱疹样病变、神经症状、脑炎。死亡率达 70% ~ 80% ^[16-20]
猴痘病毒感染 Monkeypox virus infection	猴痘病毒	第一类	呼吸道、直接接触 ^[21]	临床表现类似天花，但病情相对较轻，发热、全身不适及淋巴结肿大 ^[22-23]
埃博拉出血热 Ebola hemorrhagic fever	埃博拉病毒	第一类	直接接触动物分泌物或体液污染物	发热、呕吐、腹泻、出血。死亡率为 69% ~ 88% ^[24-25]
黄热病 Yellow fever	黄热病毒	第一类	蚊虫叮咬、传染性物质接触皮肤表面伤口、针头刺伤	部分呈隐性感染；发热、头痛、黄疸、出血、死亡 ^[5, 26]
猴免疫缺陷病毒感染 Simian immunodeficiency virus infection	猴免疫缺陷病毒	第二类	传染性物质接触黏膜、皮肤表面伤口、针头刺伤	已知的感染病例中未观察到临床症状 ^[5]
狂犬病 Rabies	狂犬病毒	第二类	咬伤、抓伤或舔舐	发热、疲劳、抽搐，死亡率近 100% ^[26]
麻疹 Measles	麻疹病毒	第三类	呼吸道、直接接触	发热、上呼吸道炎症、眼结膜炎、皮肤斑丘疹和颊黏膜有麻疹黏膜斑，疹退后遗留色素沉着伴糠麸样脱屑，可继发多种并发症 ^[27-30]
登革热 Dengue fever	登革病毒	第三类	蚊虫叮咬、针头刺伤	发热、皮疹、登革休克综合征、偶有死亡 ^[5]
结核病 Tuberculosis	结核分枝杆菌	第二类	呼吸道、消化道或破损的皮肤	可侵入人体全身各种器官，主要侵犯肺脏，属于慢性消耗性疾病 ^[31-36]
沙门氏菌病 Salmonellosis	沙门菌属	第三类	接触动物分泌物或粪便、黏膜接触或皮肤破损感染	胃肠炎（水样腹泻、腹痛、发热），病程 2 ~ 7 d；少数发展为败血症或局部化脓感染 ^[5]
志贺氏菌病 Shigellosis	志贺菌属	第三类	接触动物分泌物或粪便、黏膜接触或皮肤破损感染	血性腹泻、黏液脓血便、腹痛及里急后重，可伴高热（38 ~ 40 ℃） ^[5]
疟疾 Malaria	疟原虫	无	蚊虫叮咬、针头刺伤	周期性规律发作，全身发冷、发热、多汗，长期多次发作后可引起贫血和脾肿大 ^[37-38]
阿米巴痢疾 Amebic dysentery	溶组织内阿米巴	无	消化道	腹部不适、腹泻、大便有腐败腥臭味、肝脓肿等 ^[5]

注：*危害程度分类依据《人间传染的病原微生物目录》（2023 版）。
Note: *The classification of hazards is based on the List of Pathogenic Microorganisms Transmitted Among Humans (2023 edition).

维酮碘溶液擦拭伤口及周围皮肤^[40]；最后前往医疗机构，遵循医嘱进行相应疫苗的预防性接种。(2) 黏膜暴露：用洗眼器清洗污染的黏膜，持续清洗15 min以上，注意禁止用洗涤剂或防腐剂直接清洗眼睛。(3) 深度外伤：用聚维酮碘溶液浸泡消毒纱布，将纱布覆盖在伤口上，紧急送往医院治疗并遵医嘱。

3.2 暴露评估与处置

暴露后的风险评估取决于多种因素，包括暴露源的性质、暴露途径、动物种类及其潜在危险性，以及暴露人员的生理状态等。

对涉事实验动物进行评估，需要确定该实验动物的信息档案，包括其健康状况（包括体表、口腔、皮肤、黏膜的检查，以确定是否有疱疹、溃疡等病理性表征）、动物的用药情况及实验状态、动物种群的微生物学状态（包括查看既往B病毒及逆转录病毒的检测报告）等。

对人员进行评估，则包括以下几个方面：是否正确使用个人防护装备，是否遵循适当的暴露后应急处理流程，以及是否详细记录了暴露的时间、地点、严重程度、接触的体液或组织的类型等信息。此外，如果发生暴露事件的动物正处于使用免疫抑制剂等药物的研究项目，这可能会增加发生上述感染的风险，从而更容易将病原体传播给暴露人员。因此，根据涉事动物及暴露人员的检测结果，在专业医师的指导下，可对受伤人员进行相应治疗。若检测结果显示存在细菌感染，通常需要在暴露事件发生后3~5 d内使用抗生素进行治疗，直至感染症状完全消退时方可停药。另外，在感染情况较为严重，特别是存在破伤风感染风险的情况下，还需辅以破伤风抗毒素的注射治疗。

3.3 采样检测

发生职业暴露后，应当对暴露人员和涉事动物分别采集血清样本进行病毒检测。采样检测时间通常设置在暴露当天、暴露后3~6周，暴露后3个月这3个时间点，以确保能够捕捉到潜在的病毒感染变化。若涉事动物为猕猴，无论暴露人员有无临床症状，均应按感染B病毒的情况处理：受伤人员通常需口服3~5 d的阿昔洛韦、更昔洛韦和伐昔洛韦等抗病毒药物^[41]，以确保有效控制病毒感染。

4 NHPs从业人员的安全防护管理措施

4.1 职业健康安全计划

NHPs的血液、体液和细胞等被认为具有潜在危险，从业人员在接触NHPs或其组织时，存在感染风险。因此，所有涉及NHPs生产或实验的机构均应制定

相应的职业健康安全计划，并且该计划需要与国家 and 地方性法规相符。

4.1.1 危险识别

危险识别是制定和管理职业健康安全计划的重要组成部分。具体包括设施设计布局和运行机制是否合理，是否配备工程层面的安全保护设备，设施内部运行及标准操作规程是否适宜，工作场所的个人防护装备以及紧急救护物品是否合理齐备，人员是否按照规范要求执行等。

4.1.2 风险评估及预防措施

机构通常需要成立职业健康安全委员会（Occupational Health and Safety Committee, OHSC）或专项小组，定期检查本机构的职业健康安全运行情况，有效识别与评估潜在风险，并制定预防措施，以确保职业健康安全计划的切实执行，将工作场所的健康风险降至最低。一旦发生感染事件，OHSC可对暴露人员进行详尽的风险评估，并提供专业的医学治疗建议^[42]。此外，OHSC需要从预防医学的角度，对从业人员进行职业健康安全管理，包括：定期对实验动物从业人员进行健康评估；通过问卷调查的形式记录从业人员既往病史、当前使用药物、过敏史、妊娠计划、既往免疫接种及结核菌素皮试结果；在定期体检时，除常规体检项目外，增加与结核病相关的体检内容；提供必要的免疫接种服务，如麻疹疫苗、破伤风疫苗、所开展实验相关的病原体疫苗等。

4.2 职业健康管理体系

国际实验动物评估和认可管理委员会（Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International, AAALAC International）及中国合格评定国家认可委员会（China National Accreditation Service for Conformity Assessment, CNAS）对实验动物机构职业健康安全管理体系均有明确的规定^[42-43]。即实验动物机构应建立职业健康管理体系、提供必要的资源、控制相关的风险，并持续改进职业健康安全绩效。该管理体系主要包括风险评估、危险源管理及控制、行为规范、人员能力要求与培训、设施的设计保障及运行管理、设备检查与性能保证、个体防护装备、职业健康保健服务、职业健康安全信息沟通、职业健康安全绩效的监测、应急准备和响应等要求。

4.2.1 职业健康检查内容

具体包括工作人员上岗前体检、在岗期间检查、离岗前体检及应急健康检查，并建立职业健康监护档案及长效的职业健康监护评价体系。根据职业实际需求，对从业人员进行相关职业病检查，并采取接种必

要疫苗等预防性措施。在此基础上,结合从业人员所接触的职业病危害因素,对检查结果进行综合分析,及时发现职业禁忌证,以便及时得到合理防护或早期调离、早期诊断、早期治疗。

4.2.2 从业人员技术培训

兽医、饲养技术人员、研究人员、管理人员均需要持续开展专业培训^[44]。为此,需建立一套良好的兽医护理方案,实验操作人员必须具有从事该岗位相应的专业教育背景或单位相关培训,且需掌握一定的风险控制知识和技能^[45]。培训内容应包括:机构的职业健康与安全计划、人兽共患病的预防手段、防护设备使用说明、生物样本处理程序、职业暴露处理方式、NHPs行为特性、相关的标准操作程序和机构政策、安全工作实践,以及回顾处理方式和实验技术,并展示应用技术的熟练程度。通过培训,需确保从业人员严格执行各项操作规程,提高业务技能,减少因技术操作不当而引发的安全事故,重视和加强教育培训,使从业人员充分掌握防护要求及暴露后的紧急处理措施。

4.2.3 职业健康安全管理操作规程

饲养NHPs(尤其是猕猴)的机构应制定、实施和严格执行标准操作程序,最大限度降低实验人员与B病毒接触的潜在风险。此外,这些机构还需制定职业暴露紧急处理程序、工作人员健康防护规程,并定期评估和更新职业健康安全风险分析报告等。

4.3 个人防护要求

4.3.1 正确使用个人防护装备

个人防护装备能够为操作人员提供物理屏障,防止皮肤、眼睛和黏膜直接接触潜在的有害性或传染性物质,并尽量减少咬伤和划伤等身体伤害。NHPs操作人员应佩戴口罩、防护眼镜、一次性手套、专用的工作服或实验服。防护眼镜(面罩、环绕式防护眼镜或其他设备)的选择应根据工作类型、NHPs近身程度,以及工作人员视野清晰度需求来决定。此外,还需考虑实验方案、NHPs种类、所采用的技术或操作手段,以及相关制度政策等因素,进一步加强防护装备。例如,在处理猕猴实验时,佩戴双层手套是大多数机构的常规做法。

4.3.2 避免人身伤害

NHPs聪明、敏捷、强壮,在某些情况下还具有攻击性。这些特点,再加上实验过程中需要移动重型设备,或实施特定的研究方法,工作人员往往面临各种身体伤害的风险,包括被咬伤、划伤、割伤、针刺、挤压和腰背部损伤等。为避免人身伤害,工作人员应尽可能避免直接接触意识清晰的NHPs;对NHPs注射

镇静剂时,工作人员应在操作前检查并修剪其指甲;注意检查破损或有锋利边缘的笼子和设备,并将其撤出使用;堆放与搬移笼具时,应尽量使用手动或液压升降机;工作人员应穿防滑的安全鞋等。

4.4 实验操作安全工作规范

对NHPs进行实验操作的人员应遵循安全工作规范,以尽量减少伤害,降低感染人兽共患病的风险。其安全工作方式主要包括:(1)进入动物设施的操作人员应接受过与动物固有风险和危害相关的职业健康培训,并且应穿着适当的防护服;(2)在开展涉及NHPs的手术操作过程中,使用针头、注射器和其他利器时应特别小心,应尽可能使用带有可伸缩针头的注射器;如果使用了不可伸缩的针头,则不应回套针帽,而应在使用后直接放入防穿刺的利器盒中;(3)工作人员不得在饲养或使用NHPs的区域进食、饮水、吸烟、配戴或摘取隐形眼镜、化妆或服药;(4)工作人员在接触动物时,应将手和其他物品远离口、眼和鼻;(5)工作人员在离开饲养或使用NHPs的动物设施或指定工作区域前,应先脱去防护服,随后脱下防护手套并立即洗手;(6)应对接触NHPs及其体液和排泄物的表面(如治疗台)进行规范消毒,并定期评估环境质量^[46];(7)做好猴群(主要是猕猴)B病毒感染防控,需加强猴群病原微生物筛查,及时剔除B病毒阳性动物,避免猴群中出现B病毒潜伏感染个体排毒引发传播的事件,降低感染风险;(8)还需重视实验动物福利,减少动物应激,降低工作人员被抓伤和咬伤的风险。

5 总结

近年来,我国工业领域的职业健康安全逐步走向法治化、规范化的管理轨道,已构建起覆盖风险评估-过程控制-应急处置的全链条管理体系。然而,在实验动物行业领域,从业人员的职业健康防护仍存在短板,需要持续关注和研究实验动物从业人员的职业健康问题。尤其NHPs具备与人类高度相似的蛋白编码基因,其对多种人兽共患病病原体具有双向易感性,加之常见的NHPs相关人兽共患病具有较高的致死率,一旦感染,目前尚无有效治疗方法,这些均使得相关从业人员面临更大的职业健康安全风险。

因此,建议实验动物机构通过建立涵盖工程技术防护体系、风险分级管控机制、法规伦理、心理健康的多维防控体系,提高从业人员的综合素养及实验动物机构的安全管理水平,严格落实对从业人员职业健康安全问题的监督检查管理,定期开展职业体检及监

测工作, 严格做好个人防护, 以预防为主, 全面落实人员职业健康安全的防护工作, 从而有效保障从业人员的生命健康安全。

未来, 有望通过推进实验室智能监控系统, 如采用行为识别人工智能技术实时预警动物攻击行为等手段, 实现职业暴露事件发生率的大幅下降。同时随着国家监管力度的持续加强、《中华人民共和国生物安全法》配套细则落地, 以及人工智能技术在实验动物领域的逐渐应用, 我国正朝着“零感染、低压力、高福利”的实验动物研究目标稳步迈进, 将为全球生命科学研究提供新范本。

[作者贡献 Author Contribution]

李倩负责写作构思、文献检索, 并撰写稿件;

陈佳琦参与文章思路讨论、文献检索和内容修改;

李丽红和张飞燕负责内容修改和核定;

吕龙宝和毛华明负责综述框架构思及文章修改。

[利益声明 Declaration of Interest]

所有作者均声明本文不存在利益冲突。

[参考文献 References]

- [1] GAO H, HAMP T, EDE J, et al. The landscape of tolerated genetic variation in humans and primates[J]. *Science*, 2023, 380(6648):eabn8153. DOI: 10.1126/science.abn8197.
- [2] ZHANG S, XU N, FU L, et al. Integrated analysis of the complete sequence of a macaque genome[J/OL]. *Nature*, 2025(2025-02-26) [2025-03-30]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/40011769/>. DOI: 10.1038/s41586-025-08596-w.
- [3] FRIEDMAN H, ATOR N, HAIGWOOD N, et al. The critical role of nonhuman Primates in medical research[J]. *Pathog Immun*, 2017, 2(3):352-365. DOI: 10.20411/pai.v2i3.186.
- [4] ZHANG X L, PANG W, HU X T, et al. Experimental Primates and non-human primate (NHPs) 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.
- [5] OBERNIER J A. Occupational health and safety in the care and use of nonhuman primates: an ILAR report[J]. *Contemp Top Lab Anim Sci*, 2004, 43(3):64, 66, 68.
- [6] 国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 实验动物 动物实验通用要求: GB/T 35823—2018[S]. 北京: 中国标准出版社, 2018.
General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine; China National Standardization Administration. Laboratory animals-General requirements for animal experiment: GB/T 35823-2018[S]. Beijing: Standards Press of China, 2018.
- [7] FERRAZ E, ARRUDA L K, BAGATIN E, et al. Laboratory animals and respiratory allergies: the prevalence of allergies among laboratory animal workers and the need for prophylaxis[J]. *Clinics (Sao Paulo)*, 2013, 68(6): 750-759. DOI: 10.6061/clinics/2013(06)05.
- [8] BURGOS-RODRIGUEZ A G. Zoonotic diseases of Primates[J]. *Vet Clin North Am Exot Anim Pract*, 2011, 14(3):557-575. DOI: 10.1016/j.cvex.2011.05.006.
- [9] ACTON D, MCCAULEY L. Laboratory animal allergy: an occupational hazard[J]. *AAOHN J*, 2007, 55(6): 241-244. DOI: 10.1177/216507990705500604.
- [10] BUSH R K. Mechanism and epidemiology of laboratory animal allergy[J]. *ILAR J*, 2001, 42(1): 4-11. DOI: 10.1093/ilar.42.1.4.
- [11] JONES M. Laboratory animal allergy in the modern era[J]. *Curr Allergy Asthma Rep*, 2015, 15(12):73. DOI: 10.1007/s11882-015-0575-4.
- [12] MUZEMBO B A, EITOKU M, INAOKA Y, et al. Prevalence of occupational allergy in medical researchers exposed to laboratory animals[J]. *Ind Health*, 2014, 52(3): 256-261. DOI: 10.2486/indhealth.2012-0155.
- [13] ACTON D, MCCAULEY L. Laboratory animal allergy: an occupational hazard[J]. *AAOHN J*, 2007, 55(6): 241-244. DOI: 10.1177/216507990705500604.
- [14] D'OVIDIO M C, WIRZ A, ZENNARO D, et al. Biological occupational allergy: Protein microarray for the study of laboratory animal allergy (LAA)[J]. *AIMS Public Health*, 2018, 5(4):352-365. DOI: 10.3934/publichealth.2018.4.352.
- [15] 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 人间传染的病原微生物目录 [EB/OL]. (2023-08-28) [2024-10-03]. <http://www.nhc.gov.cn/qjjys/s7948/202308/b6b51d792d394fbea175e4c8094dc87e.shtml>.
National Health Commission of the People's Republic of China. List of pathogenic microorganisms transmitted among humans[EB/OL]. (2023-08-28) [2024-10-03]. <http://www.nhc.gov.cn/qjjys/s7948/202308/b6b51d792d394fbea175e4c8094dc87e.shtml>.
- [16] EBERLE R, JONES-ENGEL L. Questioning the extreme neurovirulence of monkey B virus [J]. *Adv Virol*, 2018, 2018: 5248420. DOI: 10.1155/2018/5248420.
- [17] HUFF J L, BARRY P A. B-virus (cercopithecine herpesvirus 1) infection in humans and macaques: potential for zoonotic disease[J]. *Emerg Infect Dis*, 2003, 9(2):246-250. DOI: 10.3201/eid0902.020272.
- [18] ELMORE D, EBERLE R. Monkey B virus (Cercopithecine herpesvirus 1)[J]. *Comp Med*, 2008, 58(1):11-21.
- [19] WANG W L, QI W J, LIU J Y, et al. First human infection case of monkey B virus identified in China, 2021[J]. *China CDC Wkly*, 2021, 3(29):632-633. DOI: 10.46234/ccdcw2021.154.
- [20] KRUG P W, SCHINAZI R F, HILLIARD J K. Inhibition of B virus (Macacine herpesvirus 1) by conventional and experimental antiviral compounds[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2010, 54(1):452-459. DOI: 10.1128/AAC.01435-08.
- [21] ALTINDIS M, PUCA E, SHAPO L. Diagnosis of monkeypox virus - an overview[J]. *Travel Med Infect Dis*, 2022, 50:102459. DOI: 10.1016/j.tmaid.2022.102459.
- [22] GONG Q Z, WANG C L, CHUAI X, et al. Monkeypox virus: a re-emergent threat to humans[J]. *Virol Sin*, 2022, 37(4):477-482. DOI: 10.1016/j.virs.2022.07.006.
- [23] MARTÍNEZ-FERNÁNDEZ D E, FERNÁNDEZ-QUEZADA D, CASILLAS-MUÑOZ F A G, et al. Human monkeypox: a comprehensive overview of epidemiology, pathogenesis, diagnosis, treatment, and prevention strategies[J].

- Pathogens, 2023, 12(7):947. DOI: 10.3390/pathogens12070947.
- [24] NIEMUTH N A, FALLACARA D, TRIPLETT C A, et al. Natural history of disease in monkeys exposed to Ebola virus Kikwit strain demonstrates the reliability of this non-human primate model for Ebola virus disease[J]. PLoS One, 2021, 16(7): e0252874. DOI: 10.1371/journal.pone.0252874.
- [25] LETAFATI A, SALAH ARDEKANI O, KARAMI H, et al. Ebola virus disease: a narrative review[J]. Microb Pathog, 2023, 181: 106213. DOI: 10.1016/j.micpath.2023.106213
- [26] JIANG X, FAN Z, LI S, et al. A Review on Zoonotic Pathogens Associated with Non-Human Primates: Understanding the Potential Threats to Humans[J]. Microorganisms, 2023, 11(2): 246. DOI:10.3390/microorganisms11020246.
- [27] DOGADOV D I, KYUREGYAN K K, GONCHARENKO A M, et al. Measles in non-human Primates[J]. J Med Primatol, 2023, 52 (2):135-143. DOI: 10.1111/jmp.12630.
- [28] KLASSEN-FISCHER M K, NELSON A M, NEAFIE R C, et al. The reemergence of measles[J]. Am J Clin Pathol, 2023, 159(1):81-88. DOI: 10.1093/ajcp/aqac124.
- [29] ISLAM M R, DHAR P S, RAHMAN M M. Recent measles (rubeola) outbreak: etiology, symptoms, prevention, treatment, complications, and advice for medical professionals[J]. Int J Surg, 2023, 109(2):123-125. DOI: 10.1097/JS9.0000000000000053.
- [30] MOSS W J. Measles[J]. Lancet, 2017, 390(10111): 2490-2502. DOI: 10.1016/S0140-6736(17)31463-0.
- [31] PEÑA J C, HO W Z. Non-human primate models of tuberculosis[J]. Microbiol Spectr, 2016, 4(4): 1-13. DOI: 10.1128/microbiolspec.tb2-0007-2016.
- [32] SANCHEZ C R, HIDALGO-HERMOSO E. Mycobacterium tuberculosis sensu stricto in African apes, what is its true health impact? [J]. Pathogens, 2022, 11(5): 484. DOI: 10.3390/pathogens11050484.
- [33] KOCK R, MICHEL A L, YEBOAH-MANU D, et al. Zoonotic tuberculosis - the changing landscape[J]. Int J Infect Dis, 2021, 113(Suppl 1): S68-S72. DOI: 10.1016/j.ijid.2021.02.091.
- [34] BESPIATYKH D, BESPATYKH J, MOKROUSOV I, et al. A comprehensive map of tuberculosis complex regions of difference[J]. mSphere, 2021, 6(4): e0053521. DOI: 10.1128/mSphere.00535-21.
- [35] YEE J L, PRONGAY K, VAN ROMPAY K K A, et al. Tuberculosis detection in nonhuman primates is enhanced by use of testing algorithms that include an interferon- γ release assay [J]. Am J Vet Res, 2021, 83(1): 15-22. DOI: 10.2460/ajvr.21.08.0124.
- [36] ZHOU Z J, VAN HOOIJ A, VERVENNE R, et al. Quantitative rapid test for detection and monitoring of active pulmonary tuberculosis in nonhuman primates[J]. Biology (Basel), 2021, 10(12):1260. DOI: 10.3390/biology10121260.
- [37] VOINSON M, NUNN C L, GOLDBERG A. Primate malaras as a model for cross-species parasite transmission[J]. eLife, 2022, 11: e69628. DOI: 10.7554/eLife.69628.
- [38] GALINSKI M R. Systems biology of malaria explored with nonhuman Primates[J]. Malar J, 2022, 21(1):177. DOI: 10.1186/s12936-022-04199-2.
- [39] 张朝阳, 袁玲. 兽医人员职业暴露与防护情况调查[J]. 中国动物检疫, 2016, 33(4):50-52. DOI:10.3969/j.issn.1005-944X.2016.04.017.
- ZHANG C Y, YUAN L. Survey on occupational exposure and protection of veterinary staff[J]. China Anim Health Insp, 2016, 33(4):50-52. DOI: 10.3969/j.issn.1005-944X.2016.04.017.
- [40] COHEN J I, DAVENPORT D S, STEWART J A, et al. Recommendations for prevention of and therapy for exposure to B virus (cercopithecine herpesvirus 1) [J]. Clin Infect Dis, 2002,35(10):1191-1203. DOI: 10.1086/344754.
- [41] GOODLY L J, JARRELL V L, MILLER M A, et al. Developing a comprehensive animal care occupational health and safety program at a land-grant institution[J]. J Am Assoc Lab Anim Sci, 2016, 55(1):50-57.
- [42] NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Guide for the care and use of laboratory animals[M]. 8th ed. Washington: National Academies Press, 2011. DOI: 10.17226/12910. <https://doi.org/10.17226/12910>.
- [43] 中国合格评定国家认可委员会. 2018 实验动物饲养和使用机构质量和能力认可准则: CNAS-CL06[S/OL]. (2019-02-25)[2024-10-03]. https://www.cnas.org.cn/rkgf/sysrk/jbrkzz/art/2024/art_36c19cf167d9428d966d8f8606d8e79.html.
China National Accreditation Service for Conformity Assessment. 2018 accreditation criteria for the quality and competence of laboratory animal institutions for care and using: CNAS-CL06[S/OL]. (2019-02-25) [2024-10-03]. https://www.cnas.org.cn/rkgf/sysrk/jbrkzz/art/2024/art_36c19cf167d9428d966d8f8606d8e79.html.
- [44] 宋志刚, 刘芳, 任晓楠, 等. 实验动物从业人员环境健康安全管理体系中生物安全培训的重要性[J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28 (8):7-10, 6. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7856.2018.08.002.
SONG Z G, LIU F, REN X N, et al. Importance of biosafety training in EHS management system for laboratory animal practitioners[J]. Chin J Comp Med, 2018, 28(8):7-10, 6. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7856.2018.08.002.
- [45] 国家市场监督管理总局, 国家标准化管理委员会. 实验动物 动物实验生物安全通用要求: GB/T 43051—2023[S]. 北京: 中国标准出版社, 2023.
State Administration for Market Regulation, Standardization Administration of the People's Republic of China. Laboratory animal—General requirements for biosafety in animal experiment: GB/T 43051-2023[S]. Beijing: Standards Press of China, 2023.
- [46] MAASKANT A, JANSSEN I, WOUTERS I M, et al. Assessment of indoor air quality for group-housed macaques (*Macaca spp.*)[J]. Animals, 2022, 12(14):1750. DOI: 10.3390/ani12141750.

(收稿日期: 2024-06-21 修回日期: 2024-10-12)

(本文责任编辑: 张俊彦)

【引用本文】

李倩, 陈佳琦, 李丽红, 等. 浅谈非人灵长类实验动物从业人员的职业健康管理措施[J]. 实验动物与比较医学, 2025, 45(2): 197-205. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.088.

LI Q, CHEN J Q, LI L H, et al. Occupational health risk management measures for personnel handling non-human primate laboratory animals: an overview[J]. Lab Anim Comp Med, 2025, 45(2): 197-205. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.088.

国内普通高校实验动物从业人员职业健康风险防控概述

张 倩, 邓青秀, 蔡 林

(成都中医药大学实验动物研究中心, 成都 610032)

[摘要] 随着国内实验动物行业的飞速发展, 动物实验成为高校科研成果产出和课堂教学的重要辅助手段, 实验动物从业人员队伍也日益壮大。虽然近年来国家开始重视实验动物从业人员职业健康, 并出台了相关的法规政策, 但是现阶段高校针对实验动物从业人员的职业健康风险防控还处于薄弱环节。因此, 笔者围绕高校实验动物研究中心管理规范, 通过走访、座谈以及学术交流, 对国内9家普通高校实验动物从业人员的职业健康管理及防护现状进行了深入调研, 揭示了高校实验动物从业人员面临的5大职业健康风险, 包括实验动物过敏症、人兽共患传染病、机械性损伤、化学性刺激以及心理因素, 指出当前高校普遍存在管理体系不健全、风险评估机制缺失和防护设施不足等核心问题。针对上述问题, 本研究提出了三级防控体系: 在高校层面, 需健全制度并加大经费投入; 在实验动物中心层面, 应建立动物生物安全实验室, 并强化危险源管控、应急预案演练与健康监护; 在实验动物从业人员层面, 需规范防护装备使用, 参与职业健康培训, 严格执行安全操作规程, 及时上报职业暴露事件。在多方协作的基础上, 笔者尝试分析并探讨构建国内普通高校科学、高效的职业健康保障体系的可行路径, 以期实验动物行业的可持续发展提供理论支撑与实践参考。

[关键词] 普通高校; 实验动物从业人员; 职业健康; 风险防控

[中图分类号] R136; Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2025)02-0206-08



Review on Occupational Health Risk Prevention and Control for Laboratory Animal Practitioners in Chinese General Universities

ZHANG Qian, DENG Qingxiu, CAI Lin

(Laboratory Animal Research Center, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610032, China)

Correspondence to: DENG Qingxiu (ORCID: 0009-0007-8630-6041), E-mail: 1042097157@qq.com

[ABSTRACT] With the rapid development of the laboratory animal industry in China, animal experimentation has become a crucial tool for both scientific research output and classroom teaching in universities. Correspondingly, the workforce engaged in laboratory animal work has expanded significantly. In recent years, while the Chinese government has begun to emphasize the occupational health of laboratory animal practitioners by introducing relevant laws and policies, current prevention and control efforts within universities remain insufficient. This study conducted an in-depth investigation into the occupational health management and protection of laboratory animal practitioners in nine general universities in China, focusing on the management standards within university laboratory animal research centers. The research was carried out through field visits, interviews, and academic exchanges, focusing on standardized management practices within university laboratory animal research centers. The findings highlight five major occupational health risks faced by these practitioners: laboratory animal allergy, zoonotic infectious diseases, mechanical injuries, chemical exposures, and psychological factors. Key challenges identified include underdeveloped management systems, a lack of risk assessment mechanisms, and inadequate protective facilities. To address these issues, the study proposes a three-

[第一作者] 张 倩(1998—), 女, 硕士研究生, 助理实验师, 研究方向: 实验动物质量控制。E-mail: zhangqian05171@163.com

[通信作者] 邓青秀(1975—), 女, 博士研究生, 高级实验师, 研究方向: 疾病动物模型与中药复方研究。E-mail: 1042097157@qq.com。ORCID: 0009-0007-8630-6041

tiered prevention and control framework. At the university level, institutions should establish comprehensive regulatory systems and increase funding investment. At the laboratory animal center level, biosafety laboratories should be developed, risk source management strengthened, and emergency preparedness and health monitoring enhanced. At the level of individual practitioners, appropriate use of personal protective equipment should be enforced, occupational health training should be provided, standard operating procedures should be strictly followed, and occupational exposure incidents should be reported promptly. Through multi-party collaboration, this study explores feasible paths for constructing a scientific and efficient occupational health protection system in domestic universities, aiming to provide theoretical support and practical references for the sustainable development of the laboratory animal industry in China.

[Key words] General university; Laboratory animal practitioners; Occupational health; Risk prevention

随着社会的进步与国家对生命科学教育和科研发展的重视,实验动物成为生命科学相关科研工作当中必不可少的研究对象。如今,实验动物学已逐渐发展成一门研究实验动物和动物实验的综合性学科。越来越多的国内高校着力建设实验动物中心,动物实验依托实验动物中心平台在医药类院校中得以广泛开展。实验动物从业人员作为实验动物管理、饲养、研究和实验操作等相关工作的一线人员,是实验动物科学发展和科技进步的实践者和保障者。实验动物从业人员指从事实验动物或动物实验相关工作并取得劳动报酬或经济收入的各类人员,包括科研人员、技术人员、管理人员、实验动物医师、辅助人员、阶段性从业人员^[1]。由于其工作的特殊性,这一群体面临着多样化的职业伤害风险,属于高风险职业人群。

多次职业病的暴发,促使世界各国逐渐认识到职业健康的重要性。1970年,美国通过了《职业安全与健康法案》,该法案规定了工作人员的职业安全与健康标准,要求所有单位应确保工作场所安全、提供健康的工作条件,并提前告知工作人员可能出现的职业伤害^[2]。2014年,中国发布实施的《实验动物机构质量和能力的通用要求》(GB/T 27416—2014),首次明确将实验动物从业人员的职业健康安全要求纳入实验动物机构的管理范围之内^[3]。2019年发布的国家标准《实验动物福利和人员职业健康安全检查指南》(RB/T 018—2019)进一步为相关活动提供了指导和规范,以保证相应检查活动的质量^[4]。但目前中国高校实验动物中心的管理水平存在较大差异,缺乏一套完整的职业健康管理体系,从业人员对职业危害防控意识相对薄弱。因此,如何有效避免职业性暴露,开展具有针对性的职业健康教育,提高实验动物从业人员防控意识,保障实验动物从业人员职业健康,成为亟待解决

的新课题。

全国开展实验动物相关工作的高校数量较多且分布广泛。北京、上海、浙江等地的高校在实验动物领域的研究和教学实力尤为突出。这些地区的高校通常拥有更丰富的科研资源和师资力量,能够承担更高水平的实验动物研究工作,研究主要集中在生物、医学、药学等学科领域。

本文围绕实验动物研究中心管理规范,在2019—2023年期间,笔者通过走访、座谈以及学术交流,深入调研了国内若干高等教育机构中实验动物从业人员的职业健康管理及防护现状,共计调研9家单位,包括3所综合性高校和6所医学类高校(其中3所是以中医药学科为主体的高水平中医药大学)。调研单位设施建设地址分布广泛,包括四川、重庆、云南、北京、山西、浙江、山东、湖南等地,各单位的建筑面积均在1万平方米左右,在国内高校的实验动物工作中具有一定的代表性和示范意义。根据调研结果,本文对高校实验动物从业人员职业健康管理存在的问题和常见职业健康病进行分析阐述,旨在探索出相应的防控措施,以确保高校实验动物从业人员的职业健康。

1 高校实验动物从业人员职业健康管理现状

近年来,国内大多数医药大学和综合性大学陆续建设了大规模的实验动物中心,并从实验动物生物安全和实验动物从业人员职业健康的角度出发,制定了一系列防护措施^[5]。具体措施包括:提供必要的岗位培训,如动物实验操作技能、安全操作规程、职业健康知识等;提供适当的个人防护装备,如手套、口罩、护目镜等;提供定期体检服务,主要是常规健康指标的检测;建立应急预案和紧急处置程序以应对突发事件,保障人员安全。尽管已采取上述措施,但在

实验动物从业人员职业健康管理方面, 还存在部分问题。

首先, 缺乏完整的职业健康管理体系。部分高校未能严格遵守国家法律法规, 制定符合本校实际情况的职业健康管理规章制度和标准操作流程; 在人员配置上, 未设置专职职业健康管理的岗位, 或该岗位由部门其他职位人员兼任, 这类兼职人员通常缺乏专业管理能力, 导致管理过程混乱, 职权划分不清晰。

其次, 在职业健康管理体系中, 危险源辨识、风险评估机制和相应控制措施等重要组成内容尚不完善。制定有效的计划和措施并严格执行, 可以将机构的各种安全风险, 尤其是职业健康风险, 控制在可接受的范围内。然而, 目前国内鲜有高校能够做到详细制定并严格执行一套完整、正式且结构化的程序来进行危害辨识, 并对这些风险因素进行评估。同时, 部分高校管理者对实验动物从业人员职业健康程度重视不足, 高校实验动物中心承担着学校的主要科研和教学任务, 而保证实验动物的健康和福利是增加科研产出和辅助师生教学的重要前提, 相比之下, 实验动物从业人员的职业健康问题却常被忽视。

进入高校实验动物中心的人员组成复杂且活动频繁, 尤其是在特定时间段(如实验课高峰期和毕业设计阶段), 实验人员集中开展动物实验, 对中心的人员管理和资源分配构成了巨大挑战。此外, 实验动物从业人员的自我防护亟待加强, 具体问题包括以下两个方面。一方面, 高校研究人员群体规模大、专业背景多样, 部分研究人员在入校前后未接受过实验动物学和职业健康相关培训, 生物安全意识薄弱, 实验操作和理论知识不足; 另一方面, 实验动物饲养人员学历普遍较低, 学校提供的待遇偏低, 因此招聘难度大, 且人员流动性高。这不仅影响饲养工作的稳定性, 也增加了职业健康防控培训的难度。这些问题凸显了加强实验动物从业人员培训、完善管理机制以及提升资源分配效率的必要性。

2 高校实验动物从业人员常见职业健康问题

职业健康问题主要包括实验动物过敏症、人兽共患传染病、机械性损伤、化学性刺激和心理因素等多个方面。

2.1 实验动物过敏症

过敏症是实验动物从业人员目前最普遍的职业健康问题。实验动物过敏症主要与实验动物及其相关的

过敏物质(如动物毛发、尿液、粪便、皮屑、饲料、垫料、霉菌等)有关, 这些过敏物质可导致从业人员呼吸道、皮肤和眼部产生过敏性炎症反应^[6-7]。相关研究表明, 大多数的实验动物从业人员存在过敏症状, 并且可能会发展成哮喘、鼻炎等过敏性并发症^[8-9], 特别是长期接触啮齿类动物和兔的从业人员^[10-11]。而在高校实验动物中心, 最常用的实验动物是啮齿类动物和兔。另外, 与其他机构相比, 高校实验动物从业人员中年轻的实验技术人员和科研人员(20~30岁)占比较大。从美国国家职业安全与健康研究所公布的数据来看, 与年长工作人员相比, 年轻工作人员(20~30岁)可能因为缺乏执行任务的经验和培训不足而更容易遇到职业健康和安全问题。在调研的9所高校中, 有78%的实验动物中心在新建设施或更新设备后, 逐渐采用了自动化智能化设备, 如大鼠、小鼠独立通风笼盒(individually ventilated cage, IVC), 脏垫料倾倒地, 隧道式洗笼机和动物垫料自动加料机等, 这在很大程度上降低了过敏物质对实验动物从业人员呼吸系统的刺激作用。

2.2 人兽共患传染病

人兽共患传染病是另一大职业健康问题。随着高校学科发展的延伸, 实验动物种类逐渐增多, 科研实验用动物要求较高, 各单位从具备实验动物生产许可证的生产单位购买, 基本能保证动物质量。但是教学实验中常用的实验动物不仅仅局限于小鼠、大鼠和兔, 还包括山羊、绵羊、青蛙、鸽子和鲫鱼等实验用动物, 其中大部分来源于养殖场, 检疫难度大, 动物质量难以得到保证, 极易将一些人兽共患病病原体带入动物实验室^[12]。实验动物从业人员与患有人兽共患病或携带人兽共患病病原体的实验动物接触, 甚至是接触含有病原体的动物实验室空气, 均可能导致人兽共患病的发生。常见的人兽共患病主要包括狂犬病、猴B病毒感染、汉坦病毒感染、布鲁氏菌病、沙门氏菌病、流行性出血热、弓形虫病、疥螨病和日本血吸虫病等。生物安全事件时有发生, 有调查显示, 实验动物从业人员的弓形虫感染率显著高于其他人群^[13]。2009年, 美国军方实验室1名科研人员感染兔热病^[14]; 2015年, 瑞士沃州大学医院中心实验室人员在小鼠接种过程中, 不慎被针头刺伤或被小鼠咬伤从而感染了淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒^[15]; 2011年, 东北农业大学28名师生进行羊解剖实验时感染了布鲁氏菌病^[16]; 2021年, 一名兽医在解剖病死猴时, 不慎感染了猴B

病毒后死亡^[17]。因此,高校动物中心应与具备良好信誉和实验动物生产许可证的生产单位建立合作关系,采购动物时要求生产单位提供实验动物质量合格证、检验检疫报告等必要文件。同时,动物中心质控部门也要对采购的实验动物进行二次检验检疫,确保动物符合国家相关标准。

2.3 机械性损伤

机械性损伤主要包括针刺伤、锐器伤、动物咬伤或抓伤。实验动物从业人员经常会用手术器械进行基本实验和构建实验动物模型,在实验过程中,频繁接触注射器材及其他锐利器械,如果实验器材消毒灭菌不彻底,感染病原菌的概率会极大提高。实验动物从业人员在对实验动物进行抓取和保定的过程中,极易被实验动物抓伤或咬伤,尤其在面对非人灵长类实验动物时,要提高警惕防止抓伤,同时注意猴B病毒的危害。另外,实验动物从业人员在饲养过程中经常需要搬运实验动物、笼具、饲料、垫料、饮水设备等重物,使肌肉或者关节过度负重,造成肩周炎、腰肌劳损、网球肘(即肱骨外上髁炎)等^[18-19]持续性伤害。还需注意高压清洗设备、垫料处理设备和动物噪声等对实验动物从业人员产生的听力损伤,此外,笼盒清洗设备和高压灭菌器使用中产生的热水、高温蒸汽也可能带来烫伤的风险。因此,操作人员在参加设备培训时不仅要学会设备的正确操作方法,也要掌握相关应急处理措施,例如,熟悉自动化设备急停按钮的位置。

2.4 化学性刺激

实验动物从业人员在使用化学消毒剂时,有引起咽喉炎、流涕、职业性哮喘、强致癌、致畸的风险。实验动物设施中常用的消毒剂主要包括过氧化氢、含氯消毒剂(如84消毒液)、过氧乙酸、苯扎溴铵、乙醇、次氯酸、甲醛、戊二醛等,特别是甲醛、戊二醛对人体的皮肤、眼睛、呼吸道及胃肠道具有极大的毒性和刺激性,甚至有致癌风险^[20]。在屏障环境内,为确保生物洁净度,经常通过紫外线照射对传递窗、手术室、更衣室、超净工作台、清洁走廊和污物走廊等进行消毒灭菌,如果照射时间过长,会促使环境中臭氧浓度升高,导致工作人员产生胸闷、气短、恶心等不适症状,还会刺激眼睛、黏膜和肺组织,严重时可破坏肺部表面活性物质,引起肺水肿和哮喘等^[21]。因此,紫外线照射应设置定时关闭或人员离开前手动关闭确认。此外,实验动物每日代谢产生的废气中含有大量的氨、硫化氢、甲基硫醇等有害物质,实验人员

长期吸入后会引发恶心、头痛、嗅觉灵敏度降低等症状,甚至增加罹患鼻炎、结膜炎,甚至肺水肿等疾病的风险^[22]。

2.5 心理因素

高校实验动物从业人员的心理问题相较于其他职业领域更为明显。一方面自我价值感低,在实验动物学发展初期,高校实验动物中心是一个较为边缘化的部门,经常出现自我监管和缺乏外部有效监管的情况,该部门的福利待遇相对落后,且工作内容繁重,实验动物从业人员在工作中获得的自我价值感较低。但随着动物设施自动化与智能化水平的提升,以及中心管理制度的完善,实验动物从业人员对工作的自我价值感正逐步提升。另一方面是恐惧心理,实验人员在工作过程中容易被实验动物抓伤、咬伤或者被锐器刺伤,经常担心会有感染的风险。有研究表明,年轻实验人员(20~30岁)在对实验动物进行安乐死或者实验操作时,心理压力会增大^[23-24]。近年来,有研究关注到实验动物从业人员在长期工作中不断目睹和接触动物的剧烈痛苦和创伤,这使他们在长期的情感付出中自身心理也受到损伤,这种现象被称为“同情疲劳”(compassion fatigue, CF)。CF在实验动物行业中的影响程度难以精确评估,因为实验人员可能会在其职业生涯的不同时期受到不同程度的影响。实验人员CF的症状表现多样,从抑郁、焦虑、愤世嫉俗和慢性身体疾病,到社交孤立、旷工、噩梦、药物滥用,甚至自杀倾向,均有可能出现^[25-26]。

3 高校实验动物从业人员职业健康保障措施

实验动物从业人员作为实验动物管理与科研活动的直接执行者,长期暴露于过敏原、病原微生物、机械损失、化学性刺激及心理压力等多重职业危害中,实验动物从业人员的健康安全受到严重威胁。虽然近年来国家开始重视实验动物从业人员职业健康并出台了相关的法规政策,但是现阶段国内高校针对实验动物从业人员职业健康防控还存在薄弱环节。为保障高校实验动物从业人员的职业健康安全,本文从高校、实验动物中心和实验动物从业人员3个层面提出相应的防控措施。

3.1 高校的政策支持

建立权责清晰的监管体系。权利和职责清晰划分有助于管理工作的有序开展,实验动物相关管理工作也需要层级管理体系。高校实验动物中心作为高校主要的实验动物使用部门,既要接受国家各级行政部门

的监督管理,也要接受高校其他职能机构的监督^[27]。实验动物中心直接管理的同级或上级部门,应根据各学校实验动物中心实际情况,制定相应的管理规程和制度,重点关注设施安全运行、生物安全风险防范和实验人员个人防护等方面,并督促实验动物中心日常工作根据规范安全有序开展。同时,提高对实验动物从业人员职业健康安全的关注度。

提高实验动物从业人员的福利待遇。福利待遇直接关系到实验动物从业人员的工作积极性、工作质量和人才保留。实验动物从业人员职业健康不仅包括生理健康,也包括心理健康。研究表明,大部分人员在被动物咬伤后,会出现焦虑、精神不振、恐慌害怕等情绪,适当地对人员进行心理疏导和知识培训有助于缓解心理压力^[28]。因此,高校可针对职业暴露者提供专业的心理辅导员,以持续关注并应对从业人员心理变化情况。高校校工会或后勤部应加大对实验动物从业人员的人文关怀力度,并设立职业健康津贴。教师发展中心应根据中心人员不同的职业发展需求,设立明确的晋升通道和职称评定标准,增强从业人员的成就感和满意度。

加大对实验动物中心的重视力度。研究发现,许多单位因为经费有限而导致设施设备老化严重、维保不及时、管理制度落实不到位等问题,存在大量安全隐患。实验动物从业人员在日常工作中频繁接触实验动物、注射针头、手术器械和各种消毒剂,个人防护用品是保障人员健康的最后一道防线。然而在实践中,经常会出现因个人防护用品质量差而无法有效抵御多种职业伤害风险。因此,高校亟须加大对实验动物中心的人力和物力支持,以加速改造老旧设施、强化设备安全维护、购买优质防护用具。目前,一些智能化、自动化设备应用较成熟,可极大降低实验动物从业人员的职业伤害。自动化垫料处理设备、智能动物垫料加料机 and 动物自动饮水系统等设备也逐渐在高校引进以替代部分人工饲养工作,减轻饲料、垫料、动物排泄物及机械劳损对实验动物从业人员的职业伤害^[29-30]。相较于传统的人工清洗方式,隧道式洗笼机大大提高了笼盒清洗效率,降低了清洗人员的职业伤害,机械自动化、标准化清洗已经成为实验动物行业发展的必然选择^[31]。以调研对象中的某高校为例,该实验动物研究中心建筑面积11 512 m²,配备约13 150个IVC笼盒,其中小鼠11 400笼,大鼠1 750笼;另有3 400个开放式笼盒,其中小鼠1 300笼,大鼠1 700

笼,豚鼠400笼。IVC笼盒平均一周清洗一次,开放式笼盒平均一周清洗2次。按传统的人工清洗方式,预计需21名清洗人员方可完成,且清洗过程中存在动物房清洗间工作环境较差、清洗质量不稳定、清洗人员易患实验动物过敏症等问题。因此,申购隧道式洗笼机尤为迫切。

3.2 实验动物中心部门的操作管理

建立职业健康安全管理体系。如何构建职业健康管理体系是高校管理的一大难题,邵奇鸣等^[32]构建的实验动物设施的职业健康管理体系可供参考。由机构法定代表人或者机构管理层成员担任管理职位,指定实验动物中心职业健康管理人员,专职负责实施职业健康管理相关工作,确保至少1名实验动物从业人员作为代表,参与到机构职业健康安全的事务中,以保障员工权益,并及时获取人员的实际需求。根据国家法律法规和政府相关部门的要求,建立职业健康方针及职业健康安全目标,并报请高校管理层批准。对职业健康管理体系文件进行统一管理,建立职业健康管理制度和操作规程,以指导从业人员的具体实践活动。

建立危险源辨识、风险评估和控制机制^[33]。危险源辨识、风险评估和及时采取控制措施是职业健康安全管理体系的核心内容,也是其他管理要素的重要输入信息。危险源辨识应全面考虑危险源的不同类型,根据危险源进行风险评估,再根据评价出的不同风险级别采用不同的控制原则。首先考虑消除危险源,从源头消除风险;当不能避免风险源时,应考虑用低风险的方式(如采用低毒性物质)替代高风险的方式,将风险降低至可接受水平。

建立员工职业健康预防和监护制度。对新入职员工告知其职业健康危害因素,进行医学评估,制订体检计划。每年定期进行职业病体检,做好接种人群筛选工作,在适当时候进行疫苗接种^[34]。配备专业的个人防护用品,做好使用者的培训和使用登记。对实验动物从业人员进行职业健康防护培训,中心需要提供充足的培训资源,并构造有效的安全文化氛围,有助于工作人员更早地识别和减少危害^[35-36]。培训因人而异,根据不同人员的职责、能力、文化程度及面临的不同风险,有针对性地开展教育学习。例如,针对实验动物饲养人员应学习个人防护用具的正确使用方法,加强对实验动物抓伤、咬伤、刺激性消毒剂的防护教育;针对科研人员和实验技术人员加强生物安全教育,

掌握风险应急响应措施；针对实验动物管理人员加强相关政策法规学习，及时更新管理策略；针对设施维护人员加强消防安全培训等^[37-38]。实验动物中心还应主动向全校师生和来访者告知该区域可能面临的职业健康安全风险。

加强实验动物设施建设。有研究表明，职业健康安全等级主要取决于实验动物类别、设施安全、暴露强度、持续时间和频率、个人的易感性以及特殊工作场所职业病和职业伤害的历史^[39]。其中，设施安全在人员职业健康中至关重要。相较于开放笼盒，将啮齿类动物饲养在IVC笼具中可以有效防止病原体在笼间传播，降低过敏因子水平，从而显著减少实验动物从业人员的过敏症患病率^[40]。根据动物实验教学内容，建设相应级别的动物生物安全实验室（animal biosafety level, ABSL）配备化学通风柜、生物安全柜等，防止病原微生物对师生或实验动物和环境造成危害。

3.3 实验动物从业人员的自我防护

做好个人清洁和防护。对于长期暴露于实验动物设施的工作人员，个人清洁和良好的卫生习惯可极大减少职业危害。从业人员应熟悉进出实验室个人防护装备穿脱流程，并根据实验需求，正确选择和使用个人防护装备，如实验服、护目镜、手套、口罩等，确保这些装备符合安全标准，并能有效防止接触有害物质或微生物。在需要处理有毒、有害或感染性物质时，应尽量避免直接接触，可使用适当的工具和容器，避免皮肤、眼睛或口腔接触有害物质。例如，消毒剂使用过程中具有较低的接触限值，并且根据风险评估，相关人员可能需要配备有化学药筒的呼吸器，而实验动物设施中广泛使用的N95口罩可以用于预防过敏原，但不足以防止化学品的吸入。在清洁大型动物房的地板或在下吸式工作台上工作时，使用护目镜或面罩、手套及全身性防护服，可有效防止操作中飞溅的污水污染^[33]。实验动物从业人员需不断提高自我防护意识，切勿因个人经验丰富而存在侥幸心理。

严格执行职业健康管理制度。熟悉并积极参与制定实验动物中心的职业健康安全规章制度，根据相关操作规程进行日常实践活动。每年定期进行健康检查，并针对接触职业病危险因素的不同，进行相应的职业病体检。这样，通过健康检查，可以及时发现和处理可能存在的健康问题，保障身心健康。

重视职业健康安全教育，提高防护意识。积极接受单位定期开展的生物安全培训、实验技能培训和职业健康培训等，提高安全防护意识和操作技能，了解

可能存在的职业危害和风险，学习如何正确应对突发情况。实验动物从业人员应了解动物的特性，评估实验可能带来的伤害，正确抓取动物。若发生任何事故或职业危害事件，或出现职业病相关症状，应立即依据职业暴露上报流程报告给上级管理人员，并详细记录事故的情况和处理过程。

以上建议涉及高校管理体系的完善、实验动物中心规章制度的制定与执行以及个人防护意识的加强。这些措施将有助于降低职业暴露风险，提高从业人员的工作积极性和满意度，从而促进高校实验动物工作的健康发展，为科研事业的持续、稳定发展提供重要保障。然而，要将这些建议转化为实际行动，仍需各方的共同努力和持续关注。

[作者贡献 Author Contribution]

张倩负责构思论文框架，撰写和修改文稿；
邓青秀负责指导修改文稿，核定文稿；
蔡林参与文献收集，修改文稿。

[利益声明 Declaration of Interest]

所有作者均声明本文不存在利益冲突。

[参考文献 References]

- [1] 国家市场监督管理总局, 国家标准化管理委员会. 实验动物 术语: GB/T 39759—2021[S]. 北京: 中国标准出版社, 2021.
State Administration for Market Regulation, National Standardization Administration. Laboratory animal-Terminology: GB/T 39759-2021[S]. Beijing: Standards Press of China, 2021.
- [2] HELLMUTH G A. Occupational safety and health act of 1970 [J]. Wis Med J, 1972, 71(6):14-15.
- [3] 国家质量监督检验检疫总局, 国家标准化管理委员会. 实验动物 机构和能力的通用要求: GB/T 27416—2014[S]. 北京: 中国标准出版社, 2014.
General Administration of Quality Supervision, National Standardization Administration. Laboratory animal institutions—General requirements for quality and competence: GB/T 27416-2014[S]. Beijing: Standards Press of China, 2014.
- [4] 中国国家认证认可监督管理委员会. 实验动物福利和人员职业健康安全指南: RB/T 018—2019[S]. 北京: 中国标准出版社, 2020.
National Certification and Accreditation Administration. Guide to inspection of laboratory animal welfare and personnel occupational health and safety: RB/T 018-2019[S]. Beijing: Standards Press of China, 2020.
- [5] 李松岩, 沈楠, 徐路, 等. 吉林省高校学生实验动物安全认知现状调查研究[J]. 吉林医药学院学报, 2023, 44(2):99-101. DOI: 10.13845/j.cnki.issn1673-2995.2023.02.006.
LI S Y, SHEN N, XU L, et al. Investigation on the status quo of

- experimental animal safety awareness among college students in Jilin Province[J]. J Jilin Med Univ, 2023, 44(2):99-101. DOI: 10.13845/j.cnki.issn1673-2995.2023.02.006.
- [6] 郑茂恩, 杨春红, 王可洲, 等. 实验动物职业过敏症的研究进展[J]. 实验动物与比较医学, 2019, 39(5):418-422. DOI: 10.3969/j.issn.1674-5817.2019.05.017.
- ZHENG M E, YANG C H, WANG K Z, et al. Research progress on occupational allergy of laboratory animal[J]. Lab Anim Comp Med, 2019, 39(5):418-422. DOI: 10.3969/j.issn.1674-5817.2019.05.017.
- [7] BALDELLI A, JERONIMO M, LOOSLEY B, et al. Particle matter, volatile organic compounds, and occupational allergens: correlation and sources in laboratory animal facilities[J]. SN Appl Sci, 2020, 2(10):1672. DOI:10.1007/s42452-020-03465-9.
- [8] DRAPER A, NEWMAN TAYLOR A, CULLINAN P. Estimating the incidence of occupational asthma and rhinitis from laboratory animal allergens in the UK, 1999-2000[J]. Occup Environ Med, 2003, 60(8):604-605. DOI:10.1136/oem.60.8.604.
- [9] JONES M. Laboratory animal allergy in the modern era[J]. Curr Allergy Asthma Rep, 2015, 15(12):73. DOI:10.1007/s11882-015-0575-4.
- [10] VENABLES K M, TEE R D, HAWKINS E R, et al. Laboratory animal allergy in a pharmaceutical company[J]. Br J Ind Med, 1988, 45(10):660-666. DOI:10.1136/oem.45.10.660.
- [11] AOYAMA K, UEDA A, MANDA F, et al. Allergy to laboratory animals: an epidemiological study[J]. Br J Ind Med, 1992, 49(1):41-47. DOI:10.1136/oem.49.1.41.
- [12] 王蓉, 赵四海, 白亮, 等. 医学实验动物学教学中生物安全的探讨与实践[J]. 基础医学教育, 2023, 25(12):1072-1076. DOI: 10.13754/j.issn2095-1450.2023.12.13.
- WANG R, ZHAO S H, BAI L, et al. Exploration on biosafety issues in the teaching of medical laboratory animal science [J]. Basic Med Educ, 2023, 25(12): 1072-1076. DOI: 10.13754/j.issn2095-1450.2023.12.13.
- [13] 林敏, 吴少庭, 高世同, 等. 深圳人群弓形虫感染的血清流行病学调查研究[J]. 寄生虫与医学昆虫学报, 2000, 7(3):135-139. DOI: 10.3969/j.issn.1005-0507.2000.03.002.
- LIN M, WU S T, GAO S T, et al. Study on sero-epidemiology of toxoplasmosis in human in Shenzhen[J]. Acta Parasitol Med Entomol Sin, 2000, 7(3):135-139. DOI: 10.3969/j.issn.1005-0507.2000.03.002.
- [14] 孙琳, 杨春华. 美国近年生物恐怖袭击和生物实验室事故及其政策影响[J]. 军事医学, 2017, 41(11):923-928. DOI: 10.7644/j.issn.1674-9960.2017.11.012.
- SUN L, YANG C H. United States bioterror attacks and laboratory accidents in recent years and the impact on its policy-making[J]. Mil Med Sci, 2017, 41(11): 923-928. DOI: 10.7644/j.issn.1674-9960.2017.11.012.
- [15] MOSSET P, ZURITA S, AEBISCHER O, et al. Virus de la chorioméningite lymphocytaire : cas d'exposition en laboratoire[J]. Arch Des Mal Prof De L'environnement, 2023, 84(6): 101914. DOI: 10.1016/j.admp.2023.101914.
- [16] 洛桑江白. 布鲁氏菌病在我国流行现状及防控措施[J]. 中国动物保健, 2023, 25(11): 1-2. DOI: 10.3969/j.issn.1008-4754.2023.11.001.
- LUOSANG J B. Brucellosis in China: Current epidemic status and prevention and control measures[J]. China Anim Health, 2023, 25(11):1-2. DOI: 10.3969/j.issn.1008-4754.2023.11.001.
- [17] 林惠然. 实验动物源人兽共患传染病的防控与兽医公共卫生政策[J]. 浙江畜牧兽医, 2023, 48(6):12-14.
- LIN H R. The prevention and control of zoonotic infectious diseases of laboratory animal origin and veterinary public health policy[J]. Zhejiang J Anim Sci Vet Med, 2023, 48(6): 12-14.
- [18] Occupational health and safety in the care and use of research animals[J]. ILAR J, 1997, 38(2): 89-93. DOI: 10.1093/ilar.38.2.89.
- [19] BIBAY J I, AGAPITO J. Survey on health and safety concerns of laboratory animal workers in the Philippines[J]. Philipp J Sci, 2022, 151(2):605-614. DOI:10.56899/151.02.05
- [20] 李超, 张惠, 梁洋洋, 等. 化学消毒剂在实验动物设施中的应用及职业健康防护[J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(8):11-15. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7856.2018.08.003.
- LI C, ZHANG H, LIANG Y Y, et al. The application of disinfectants and the protection of occupational health in laboratory animal facilities[J]. Chin J Comp Med, 2018, 28(8): 11-15. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7856.2018.08.003.
- [21] 翟青新, 邱春冬, 钱丽萍, 等. 紫外线和臭氧在屏障设施消毒中的应用及职业防护[J]. 实验动物科学, 2010, 27(6):39-42. DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2010.06.011.
- ZHAI Q X, QIU C D, QIAN L P, et al. Application and discussion of ultraviolet and ozone in barrier system disinfection and occupational safety[J]. Lab Anim Sci, 2010, 27(6):39-42. DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2010.06.011.
- [22] 卢静, 孟磊, 陈柏安. 实验动物设施运行中“三废”管理[J]. 实验动物科学, 2019, 36(4):77-80. DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2019.04.018.
- LU J, MENG X, CHEN B A. Discussion of the management for "three wastes" generated by laboratory animal facility[J]. Lab Anim Sci, 2019, 36(4):77-80. DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2019.04.018.
- [23] PEREIRA C R, COTRIM DE ALMEIDA J V F, CARDOSO DE OLIVEIRA I R, et al. Occupational exposure to *Brucella* spp.: A systematic review and meta-analysis[J]. PLoS Negl Trop Dis, 2020, 14(5): e0008164. DOI:10.1371/journal.pntd.0008164.
- [24] RUMPEL S, KEMPEN R, MERLE R, et al. Psychological stress and strain in laboratory animal professionals - a systematic review[J]. Lab Anim, 2023, 57(4): 396-411. DOI: 10.1177/00236772221129111.
- [25] PRESTON VAN HOOSER J, PEKOW C, NGUYEN H M, et al. Caring for the animal caregiver-occupational health, human-animal bond and compassion fatigue[J]. Front Vet Sci, 2021, 8: 731003. DOI:10.3389/fvets.2021.731003.
- [26] THURSTON S E, CHAN G, BURLINGAME L A, et al. Compassion fatigue in laboratory animal personnel during

- the COVID-19 pandemic[J]. J Am Assoc Lab Anim Sci, 2021, 60(6):646-654. DOI:10.30802/aalas-jaalas-21-000030.
- [27] 黄术兵, 姚文茜, 侯豹, 等. 高校实验动物管理工作的现状和对策研究[J]. 实验室科学, 2023, 26(6):147-150. DOI: 10.3969/j.issn.1672-4305.2023.06.035.
- HUANG S B, YAO W X, HOU B, et al. Current situation and countermeasures on the management of laboratory animals in universities[J]. Lab Sci, 2023, 26(6):147-150. DOI: 10.3969/j.issn.1672-4305.2023.06.035.
- [28] 陈小梅, 林雪玉, 洪爱治. 人性化护理服务在被动动物咬伤急诊患者中的应用效果[J]. 现代医药卫生, 2014, 30(13):2040-2042. DOI: 10.3969/j.issn.1009-5519.2014.13.062.
- CHEN X M, LIN X Y, HONG A Z. Effectiveness of humanized nursing care in emergency patients with animal bites[J]. J Mod Med Health, 2014, 30(13):2040-2042. DOI: 10.3969/j.issn.1009-5519.2014.13.062.
- [29] 梅露丹, 任艳蓉, 李卓霏, 等. 云南大学实验动物中心[J]. 实验动物与比较医学, 2024, 44(3):339-340. DOI:10.12300/j.issn.1674-5817.2024.082.
- MEI L D, REN Y R, LI Z F, et al. Experimental Animal Center of Yunnan University[J]. Lab Anim Comp Med, 2024, 44(3):339-340. DOI:10.12300/j.issn.1674-5817.2024.082.
- [30] 唐倩倩, 张秀莉, 常在. 清华大学实验动物中心小鼠自动饮水系统漏水情况统计分析[J]. 实验动物与比较医学, 2024, 44(1):85-91. DOI:10.12300/j.issn.1674-5817.2023.132.
- TANG Q Q, ZHANG X L, CHANG Z. Statistical analysis of the leakage situation in the automated watering system for mice in tsinghua university laboratory animal resources center[J]. Lab Anim Comp Med, 2024, 44(1):85-91. DOI:10.12300/j.issn.1674-5817.2023.132.
- [31] 郑琳琳, 舒加乐, 徐汪节, 等. 实验动物设施洗笼机配置调研及安装设计[J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(9):92-96. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7856.2019.09.014.
- ZHENG L L, SHU J L, XU W J, et al. Investigation of the configuration and installation of cage washers for laboratory animal facilities in China[J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(9):92-96. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7856.2019.09.014.
- [32] 邵奇鸣, 窦木林. 实验动物设施的职业健康管理体系的建立与实施初探[J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(8):1-6. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7856.2018.08.001.
- SHAO Q M, DOU M L. The establishment and implementation of an occupational health management system for laboratory animal facilities[J]. Chin J Comp Med, 2018, 28(8):1-6. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7856.2018.08.001.
- [33] MCCORMICK-ELL J, CONNELL N. Laboratory safety, biosecurity, and responsible animal use[J]. ILAR J, 2019, 60(1):24-33. DOI: 10.1093/ilar/ilz012.
- [34] Kostomitsopoulos(ν. γ. κωστομητσπουλος) N G. Laboratory animal facility management[J]. J Hellenic Vet Med Soc, 2017, 55(3):268-272. DOI:10.12681/jhvms.15116.
- [35] STEELMAN E D, ALEXANDER J L. Laboratory animal workers' attitudes and perceptions concerning occupational risk and injury[J]. J Am Assoc Lab Anim Sci, 2016, 55(4):419-425.
- [36] 许虎峰, 王磊. 实验动物从业人员面临的职业健康风险与对策[J]. 职业卫生与应急救援, 2024, 42(2):265-269. DOI: 10.16369/j.oher.issn.1007-1326.2024.02.025.
- XU H F, WANG L. Occupational health risks of laboratory animal practitioners and countermeasures[J]. Occup Health Emerg Rescue, 2024, 42(2):265-269. DOI: 10.16369/j.oher.issn.1007-1326.2024.02.025.
- [37] ANN T. Creating a world-class program through training and certification[J]. Behav Sci, 2017, 7(4):78. DOI: 10.3390/bs7040078.
- [38] HOMER L C, ALDERMAN T S, BLAIR H A, et al. Guidelines for biosafety training programs for workers assigned to BSL-3 research laboratories[J]. Biosecur Bioterror, 2013, 11(1):10-19. DOI:10.1089/bsp.2012.0038.
- [39] FEARY J, CULLINAN P. Laboratory animal allergy: a new world[J]. Curr Opin Allergy Clin Immunol, 2016, 16(2):107-112. DOI: 10.1097/ACI.0000000000000256.
- [40] FEARY J R, SCHOFIELD S J, CANIZALES J, et al. Laboratory animal allergy is preventable in modern research facilities[J]. Eur Respir J, 2019, 53(6):1900171. DOI:10.1183/13993003.00171-2019.

(收稿日期: 2024-08-26 修回日期: 2024-12-11)

(本文责任编辑: 丁宇菁)

[引用本文]

张倩, 邓青秀, 蔡林. 国内普通高校实验动物从业人员职业健康风险防控概述[J]. 实验动物与比较医学, 2025, 45(2): 206-213. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.126.

ZHANG Q, DENG Q X, CAI L. Review on occupational health risk prevention and control for laboratory animal practitioners in Chinese general universities[J]. Lab Anim Comp Med, 2025, 45(2): 206-213. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.126.

实验动物机构职业健康档案建立内容及要点

许超¹, 孙秋芳², 邵奇鸣¹

[1. 江苏鼎泰药物研究(集团)股份有限公司, 南京 211800; 2. 北京志道生物科技有限公司, 北京 100080]

[摘要] 实验动物机构建立职业健康安全管理体系中重要的一环是建立职业健康档案。此档案是保障实验动物从业人员合法权益的重要环节, 也是对实验动物机构本身的保护。依据相关法律法规, 实验动物机构有责任为从业机构及实验动物从业人员建立职业健康(也称职业卫生)监护档案并妥善保存。依据《职业卫生档案管理规范》, 实验动物机构至少要建立7个职业健康档案盒: 建设项目职业健康“三同时”档案, 职业健康管理档案, 职业健康宣传培训档案, 职业病危害因素监测与检测评价档案, 用人单位职业健康监护管理档案, 从业人员个人职业健康监护档案, 以及其他档案。在此基础上, 《工作场所职业卫生监督管理规定》又细化了职业健康档案的要求及细节, 包括: 职业病防治责任制文件; 职业卫生管理规章制度、操作规程; 工作场所职业病危害因素种类清单、岗位分布及作业人员接触情况等资料; 职业病防护设施、应急救援设施基本信息, 以及其配置、使用、维护、检修与更换等记录; 职业病防护用品配备、发放、维护与更换等记录; 职业病危害事故报告与应急处置记录等12项要求。总之, 职业健康档案包含了一系列与从业人员职业健康相关的资料和信息, 是一个综合性的档案。基于作者的实践经验, 本文简述了职业健康档案的主要类型及每个类型的基本内容及建设要点, 并对怎样建立职业健康档案进行了详细解析, 以期帮助实验动物机构顺利建立职业健康管理档案, 完善机构的职业健康安全管理体系。

[关键词] 实验动物机构; 从业人员; 职业健康; 管理档案

[中图分类号] R136; Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2025)02-0214-07



Establishment of Occupational Health Related Files in Laboratory Animal Institutions

XU Chao¹, SUN Qiufang², SHAO Qiming¹

(1. TriApex Laboratories Co., Ltd., Nanjing 211800, China; 2. LETO Laboratories Co., Ltd., Beijing 100080, China;

Correspondence to: SHAO Qiming (ORCID:0009-0000-7104-7293), E-mail: sxsqm2018@163.com

[ABSTRACT] Establishing occupational health related files is a key component of building an occupational health and safety management system in laboratory animal institutions. These files not only serve as a critical means of protecting the legitimate rights and interests of laboratory animal personnel but also provide institutional safeguards. According to relevant laws and regulations, laboratory animal institutions are responsible for establishing and properly maintaining occupational health surveillance files (also known as occupational hygiene files) for both the institution and its personnel. In accordance with the Occupational Health Archives Management Standards, laboratory animal institutions are required to maintain at least seven categories of occupational health management archive folders: the "three simultaneous" occupational health archives for construction projects; occupational health management folders; occupational health publicity and training folders; folders for monitoring and evaluating occupational disease hazard factors; employer occupational health surveillance folders; individual occupational health surveillance folders for employees; and other relevant folders. Building upon this foundation, the Regulations on the Supervision and Administration of Occupational Health in the Workplaces further specify detailed requirements for occupational health files. These include: documents outlining the responsibility system for occupational disease prevention and control; occupational hygiene

[第一作者] 许超(1990—),男,专科,研究方向:环境健康安全。E-mail: 13661848219@163.com

[通信作者] 邵奇鸣(1956—),女,博士,研究方向:环境健康安全,实验动物设施管理、质量管理。E-mail: sxsqm2018@163.com。ORCID: 0009-0000-7104-7293

management systems and standard operating procedures, lists of types of occupational disease hazard factors in workplaces, their distribution by job distribution, and records of work exposure, basic information on occupational disease prevention and emergency rescue facilities, along with records of their allocation, usage, maintenance, inspection and replacement; records concerning the provision, distribution, maintenance and replacement of personal protective equipment (PPE); and reports on occupational disease hazard incidents; and corresponding emergency response records—amounting to twelve specific requirements in total. In short, occupational health management files are a comprehensive collection of data and documentation related to workers' occupational health. Based on the author's practical experience, this paper outlines the main types of occupational health management files, their basic contents, and key points in their development. It also offers a detailed analysis of how to establish such files, aiming to support laboratory animal institutions in successfully developing occupational health management archives and improving their occupational health and safety management systems.

[Key words] Laboratory animal institutions; Employees; Occupational health; Management files

职业健康（又称职业卫生）管理体系从20世纪90年代末开始在全球范围内建立^[1-2]，中国对该管理体系也开始重视。自《中华人民共和国职业病防治法》^[3]颁布后，国内相继颁布了相关的职业健康安全管理法规、部门规章等，其中职业健康管理档案在各类法规及规章制度中均有明确要求。《中华人民共和国职业病防治法》明确要求建立、健全职业卫生档案和从业人员健康监护档案。《职业卫生档案管理规定》^[4]对机构建立职业健康档案的细节做了明确的规定及要求。《工作场所职业卫生管理规定》^[5]要求用人单位按照《用人单位职业健康监护监督管理办法》^[6]建立职业卫生（职业健康）监护档案。

建立完善的职业健康档案，既是保障实验动物机构和员工共同利益的客观需要，也是推动实验动物机构可持续发展的重要环节。该法的适用范围虽然较广泛，且在其他行业已实施多年，但在实验动物机构这一行业内，研究人员普遍对职业健康管理体系法规的要求理解不足，尤其是对职业健康管理档案的详细要求了解匮乏。不少机构未能按照国家要求建立完整的职业健康管理档案。基于国家对职业健康档案建立形式、内容的总体要求，结合实验动物机构建立职业健康管理档案的具体实践，本文介绍了职业健康档案的具体内容及要求，以期帮助实验动物机构建立卓有成效的职业健康档案管理体系。

1 职业健康档案概述

职业健康档案，是指用人单位在职业病危害防治和职业卫生管理活动中形成的，能够比较准确、完整地反映本单位职业健康工作全过程的文字、图纸、照

片、报表、音像资料、电子文档、日常管理记录等文件材料^[7]。按照《职业卫生档案管理规定》的相关要求，职业健康档案至少需要包括以下7个方面：建设项目职业健康“三同时”档案，职业健康管理档案，职业健康宣传培训档案，职业病危害因素监测与检测评价档案，用人单位职业健康监护管理档案，从业人员个人职业健康监护档案，以及法律、行政法规、规章要求的其他资料文件。

《工作场所职业卫生管理规定》对用人单位的职业健康档案做了更加细化的要求，要求的档案数量也增加到了12个，包括：职业病防治责任制文件；职业卫生管理规章制度、操作规程；工作场所职业病危害因素种类清单，岗位分布以及作业人员接触情况等资料；职业病防护设施、应急救援设施基本信息，以及其配置、使用、维护、检修与更换等记录；工作场所职业病危害因素检测、评价报告与记录；职业病防护用品配备、发放、维护与更换等记录；主要负责人、职业卫生管理人员和职业病危害严重工作岗位的从业人员等相关人员职业卫生培训资料；职业病危害事故报告与应急处置记录；从业人员职业健康检查结果汇总资料，存在职业禁忌证、职业健康损害或者职业病的从业人员处理和安置情况记录；建设项目职业病防护设施“三同时”有关资料；职业病危害项目申报等有关回执或者批复文件；其他有关职业卫生管理的资料或者文件。这些职业健康管理档案构成了国家对所有机构职业健康档案管理方面的统一规范要求。实验动物机构通过不断完善职业健康档案，确保真实、准确地记录并掌握本机构职业健康管理和防治工作的各个环节，从而完善职业健康安全管理体系。以下逐步论述

实验动物机构如何建立职业健康档案的具体步骤和方法。

2 实验动物机构职业健康档案的建立

2.1 建设项目职业健康“三同时”档案

建设项目职业病防护设施“三同时”(以下简称职业健康“三同时”),指职业病防护设施需要与机构的新建、扩建及改建类项目的主体工程同时设计、同时施工、同时投入生产和使用^[8]。职业病防护设施是指消除或降低工作场所中职业病危害因素的浓度或者强度,预防和减少职业病危害因素对从业人员健康的损害或影响,保护从业人员健康的设备、设施、装置、构(建)筑物等的总称。对于实验动物机构而言,无论是新建实验动物设施,还是对旧设施进行改建或扩建,这些工作都会涉及职业健康危害因素^[9]。因此,实施职业健康“三同时”是必需的。

实验动物机构在建设、改造的过程中,产生的职业健康“三同时”文件类型包括:项目备案证书,与第三方机构签订的职业健康“三同时”合同,建设项目职业病危害防治法律责任承诺书;职业病危害预评价报告、专家评审意见;建设项目职业病防护设施设计专篇及对专篇评审意见;职业病危害控制效果评价报告及专家评审意见;安全监管部门审核、审查、验收批文;全套竣工图纸、竣工总结;工程改建、扩建及维修、使用中变更的图纸等有关材料。不同实验动物机构可根据自身情况添加不同的档案,所有的职业健康“三同时”档案需要存档备查。

2.2 职业健康管理档案

职业健康管理档案是实验动物机构职业健康档案的关键档案之一,也是机构职业健康管理工作的重要记录。职业健康管理档案包括但不限于:实验动物机构年度职业病防治计划^[10],年度计划的内容包括工作目标、实施方案、职业病防治目标、培训计划、检查方案、个人防护用品的配置及使用指导、检测与监护计划、考核与年度总结等。管理档案还包括安全目标指标、管理方案、执行情况及考核绩效,职业病危害项目申报表,实验动物机构的职业病防治经费,实验动物机构职业病防护设施清单及维护维修记录,警示标识及职业病危害告知,紧急预案(如机构职业病危害事故应急救援预案、实验动物设施突发紧急事件应急预案)及检查记录等。

职业健康管理档案有助于实验动物机构的管理人

员及时掌握从业人员的健康状况,履行机构职业病防治职责。在职业病事件发生时,这些档案可作为明确责任归属的关键依据。同时,职业健康档案的完整性也能反映实验动物机构在职业健康管理方面的全面性和系统性。实验动物机构最好设立专门的管理部门或专人管理。对于规模较小的实验动物机构,可以采取兼职管理的方式,但建议留存管理部门成立的正式文件。

职业健康管理档案还包括机构需要建立的职业健康管理制度,这些制度至少包括13项基本制度:职业病危害防治责任制度,职业病危害警示与告知制度,职业病危害项目申报制度,职业病防治宣传教育培训制度,职业病防护设施维护检修制度,职业病防护用品管理制度,职业病危害监测及检测评价管理制度,建设项目职业卫生“三同时”管理制度,从业人员职业健康监护及其档案管理制度,职业病危害事故处置与报告制度,职业病危害应急救援与管理制度,岗位职业卫生操作规程,以及法律法规、规章规定的其他职业病防治制度。如果实验动物机构接触高致病性病原微生物或放射性危害因素,机构需增加相应的管理制度及培训,并留存培训记录。此外,实验动物机构还可按照自身的情况,增加适合机构自身的职业健康管理制度。

2.3 职业健康宣传培训档案

职业健康培训是职业健康法规对用人单位的主要要求之一。要建立培训档案,实验动物机构首先要建立本机构的培训管理制度,并在此基础上制订年度职业健康培训计划。机构须搜集并保存培训的所有文件(包括但不限于照片、视频及公众号发布的宣传内容)。培训对象范围广泛,不仅包括机构负责人、职业健康管理人员、全体从业人员,还包括学生、实习生、外包人员、承包商等。

实验动物机构的培训内容建议按照《进一步加强用人单位职业健康培训工作的通知》^[11](附件“用人单位职业健康培训大纲”)中的培训内容及培训时间执行。培训内容包括职业健康相关法律法规、规章和国家职业卫生标准;职业病危害预防和控制的基本知识,如生物安全^[12]、岗位职业病危害因素、管理制度和操作规程、人兽共患病及其安全防护、辐射危害及其防护、动物抓取及保定要求、锐器使用及废弃、消毒剂的配置及使用、洗眼器等应急设备使用及注意事项、手术及解剖过程的安全防护等。

培训中执行签到制度,并设置考核环节,以及对培训效果进行评价。实验动物机构的主要负责人及职业健康管理人员初次培训时长应不少于16学时,此后每年的继续教育应不少于8学时;此类培训一般由上级部门组织,机构主要负责人及职业健康管理人员需要经过考核并取得相应证书。从业人员上岗前培训不得少于8学时,此后每年的在岗培训不得少于4学时,从业人员的培训可由机构内部实施。所有培训记录,包括培训通知、培训课件、考试试卷、培训效果评价、培训证书等,机构均需妥善保存并定期存档。

2.4 职业病危害因素监测与检测评价档案

在实验动物设施及实验室环境中,多数岗位存在不同程度的职业病危害因素:如更换垫料过程中,可能会接触到谷物粉尘;在实验过程中,可能会使用甲醛、次氯酸钠、乙腈、二甲苯、盐酸、硫酸、消毒剂等危险化学品,清洗笼具时可能会接触噪声;操作高压灭菌器时,可能面临高温风险;接触放射源或放射性仪器设备,可能会面临放射性暴露风险;接触患有人兽共患病的动物或病原体,可能面临感染或过敏等生物性危害^[13-17]。这些潜在的职业健康风险需要由具备丰富经验的管理人员主导,邀请熟悉岗位工作流程的专业人员参与识别,具体的识别过程可依照职业健康“三同时”评价报告或职业健康现状评价报告,结合机构的实际情况来实施。

实验动物机构应定期对工作人员进行职业病检查,并对存在职业病危害因素的场所进行检测,同时建立相应的职业病危害因素监测与检测评价档案。此档案包括了实验动物机构各部门的生产工艺流程、职业病危害因素场所及检测点分布示意图,实验动物机构可能产生的职业病危害设备、材料和化学品表,从业人员接触职业病危害因素汇总表、职业病危害因素日常监测汇总表。鉴于需要有第三方机构参与检测,实验动物机构还需要收集第三方机构的资质证书、职业病危害因素检测评价合同书及评价报告。最主要的是,实验动物机构首先要识别自身存在的职业病危害因素及其存在部位,然后根据这些基础信息,建立本机构的职业病危害因素监测与检测评价档案。

列举机构大部分存在的职业危害因素等级及检测方案如下。职业病危害场所的检测根据《工作场所职业卫生管理规定》^[18]第二十条规定:职业病危害程度评价为“严重”的用人单位应当定期委托具有资质的职业卫生技术服务机构,每年至少进行一次职业病危

害因素检测;每三年至少进行一次职业病危害现状评价。职业病危害因素为一般的用人单位,应当委托具有相应资质的职业卫生技术服务机构,每三年至少进行一次职业危害因素检测。根据卫健委《关于开展职业卫生分类监督执法试点工作的通知》^[19](附件“用人单位职业病危害风险分级方法”),如果实验动物机构存在以下情况之一,则被判定为严重职业病危害场所:如已确认对人致癌的化学有害因素,放射性危害作业岗位,电离辐射(除外Ⅲ类射线装置、Ⅳ类和Ⅴ类密封源、丙级非密封源工作场所及予以豁免的实践或源)。各实验动物机构可根据本机构是否属于一般还是严重职业病危害场所来制定检测计划及频率。

2.5 职业健康监护管理档案

职业健康监护档案是为从业人员建立的,用来记录从业人员职业健康状况的重要档案。以预防职业病为目的,根据从业人员的职业接触史,定期或不定期地进行职业健康医学健康检查和收集相关资料,连续性地监测从业人员的健康状况。此过程需深入分析从业人员的健康变化与其所接触的职业病危害因素的关系,并及时地将健康检查和资料分析结果反映给机构的高层管理人员及从业人员,以便及时采取干预措施,保护从业人员健康。

职业健康监护档案的建立主要是依据《职业健康监护技术规范》^[20]来设置的,职业健康监护管理档案的主要内容如下:(1)职业健康检查机构资质证书。职业健康体检不同于普通职业体检,需要在卫健委公布的具有专业资质的机构进行,相关信息可登录各地卫健委网站查询。(2)职业健康检查结果汇总表。应列明检查日期、机构、体检种类(岗前、岗中、离岗)、应检人数(应参加体检人数)、实检人数(该日期实际参加体检人数)等。(3)检查异常情况及监护结果。一般上岗前职业健康体检若有异常,建议不录取或是调岗。在岗期间,若职业健康体检有异常,应暂时调岗并进行复查;若复查结果仍不合格,则建议调岗,但调岗前需要复查。若经过体检机构多次检查确认,岗位职业健康危害因素与病症存在明确对应关系,被明确诊断为职业病患者,应及时记录,并上报到属地上级卫生健康监督管理部门。(4)职业危害事故报告和处理情况。实验动物机构在日常生产经营过程中,如发生人员急性职业中毒等危害事故,应及时送医治疗,并立即成立事故调查组,调查组需对发生情况、人员救治和处理情况等事故经过进行记录、调

查和处理。(5) 监护档案汇总。如果确诊为职业病, 需要向上级主管部门汇报。

2.6 从业人员个人职业健康监护档案

实验动物机构应当为从业人员建立职业健康监护档案。此档案为个体档案, 需要给每一位在涉及职业病危害因素岗位工作的从业人员建立。比如, 病理实验室接触甲醛的从业人员, 锅炉房涉及噪声的从业人员, 分析实验室接触乙腈的从业人员等。实验动物从业人员个人职业健康监护档案包括了从业人员的个人基本情况、职业史、职业病危害接触史、目标疾病、健康检查的内容和周期、从业人员的劳动合同告知书(告知该个体岗位所涉及的职业危害因素、禁忌证及可能引起的危害等信息)、从业人员所在工作场所的职业危害因素监测结果(以证明工作环境安全及场所浓度符合国家要求)、历次职业健康体检情况、职业健康检查结果。如果检查出职业病, 此档案还需增加处理结果和职业病诊疗等相关个人健康资料的信息。从业人员在离开实验动物机构前, 可从实验动物机构获取加盖机构印章的个人职业健康监护档案复印件, 以确保从业人员职业健康信息的完整性与可追溯性。

实验动物机构为从业人员建立的职业健康监护档案通常包括以下内容: (1) 从业人员的基本信息, 如姓名、性别、籍贯、年龄、文化程度等。(2) 为新上岗或转岗等提供的职业健康评估依据, 需要了解从业人员的既往病史及从业经历, 从业经历需要详细到以往工作的岗位及可能接触到的职业病危害因素。(3) 职业病危害接触史, 记录从业人员在以往的工作中接触到的职业病危害因素。(4) 从业人员工作岗位的职业病危害因素监测结果, 工作场所检测的职业病危害因素可包括空气、水源、噪声、化学、物理、生物等。这些职业病危害因素的检测因岗位不同而不同, 检测的频率也因是严重职业病危害(每年一次)还是一般职业病危害(每三年一次)而不同; 放射性岗位的环境检测应每年至少进行一次, 且每三年至少进行一次职业病危害现状评价。(5) 职业健康检查结果及处理情况档案, 所有的检查结果需要经过机构有医学背景的人员评估(或请第三方检测机构进行评估)。(6) 职业病诊疗资料, 如果从业人员被诊断为职业病, 机构需要保存从业人员所有诊疗过程、治疗效果以及康复情况等资料。

2.7 法律法规中其他资料文件

实验动物机构若涉及辐射实验或高致病性病原微

生物操作, 需按照相关法律法规、规章要求执行, 并建立相应的档案。此外, 职业健康档案还需包括所有外部监管机构的检查及整改的记录, 以及客户进行的检查及提出的整改要求的记录, 所有相关文件均需留档保存。综上所述, 建立职业健康管理档案是一个长期的过程, 需要管理者重视, 将涉及的资料完整地收集、保存, 做到有据可依, 有档可查。

3 总结

职业健康档案管理的建立是实验动物机构管理和记录职业病危害因素防治过程的有效工具。全面有效的内容和完善的材料, 有助于机构系统地、动态地追踪和了解国家对于职业病防治法律法规要求, 并接受所属行政部门的监督。通过对实验动物机构工作环境的评估和监测, 可及时发现和控制职业病危害因素, 不仅能有效地减少职业病发生率, 降低从业人员的健康风险, 还能妥善解决实验动物机构与从业人员之间可能发生的法律纠纷, 减少因职业病导致的损失, 间接优化机构的运营成本。建立职业健康管理档案是一个长期的过程, 实验动物机构应以卫健委颁布的《工作场所职业卫生管理规定》等多种法规, 通过多种手段、方法来制订符合实验动物机构实际运营需求的职业健康管理体系^[21], 完善职业健康管理档案, 并不断在PDCA(计划、执行、检查、处理)循环中进行改进和完善。

[作者贡献 Author Contribution]

许超负责起草论文、修订并回复审稿意见;
孙秋芳负责查阅参考文献, 参与修订文稿;
邵奇鸣负责把握论文整体内容, 监督指导、审阅、修订文稿。

[利益声明 Declaration of Interest]

所有作者均声明本文不存在利益冲突。

[参考文献 References]

- [1] British Standard Institute. Guide to occupational health and safety management systems: BS 8800:1996[S]. 1996.
- [2] American Industrial Hygiene Association. Occupation health and safety management system: ANSI Z10:1997[S]. 1997.
- [3] 全国人民代表大会. 中华人民共和国职业病防治法[EB/OL]. (2019-01-07) [2024-09-09]. http://www.npc.gov.cn/npc/c2/c30834/201905/t20190521_296649.html. National People's Congress (NPC). Occupational Disease Prevention Law of the People's Republic of China[EB/OL]. (2019-01-07) [2024-09-09]. http://www.npc.gov.cn/npc/c2/c30834/201905/t20190521_296649.html.

- [4] 应急管理部. 国家安全生产总局办公厅关于印发职业卫生档案管理规范的通知: 安监总厅安健〔2013〕171号[A/OL]. (2014-01-09) [2025-03-28]. https://www.mem.gov.cn/gk/gwgg/201401/t20140109_241092.shtml.
Ministry of Emergency Management. Notice on the issuance of the management specifications for occupational health archives issued by the General Office of the State Administration of Work Safety (SAWS): Document No. 171 [2013] of the Occupational Health Division, General Office of SAWS[A/OL]. (2014-01-09) [2025-03-28]. https://www.mem.gov.cn/gk/gwgg/201401/t20140109_241092.shtml.
- [5] 国家卫生健康委员会. 工作场所职业卫生管理规定[EB/OL]. (2020-12-31) [2024-09-09]. <http://www.nhc.gov.cn/fzs/s3576/202101/2a5be92cd14449caaa2ea685cc44ea64.shtml>.
National Health Commission. Regulations on occupational health management in the workplace[EB/OL]. (2020-12-31) [2024-09-09]. <http://www.nhc.gov.cn/fzs/s3576/202101/2a5be92cd14449caaa2ea685cc44ea64.shtml>.
- [6] 司法部. 用人单位职业健康监护监督管理办法[EB/OL]. (2012-07-05)[2024-09-09]. https://www.moj.gov.cn/pub/sfbgw/flfggz/flfggzbmzg/201207/t20120705_145165.html.
Ministry of Justice of the People's Republic of China. Supervision and administration measures for occupational health surveillance of employing entities[EB/OL]. (2012-04-27) [2024-09-09]. https://www.moj.gov.cn/pub/sfbgw/flfggz/flfggzbmzg/201207/t20120705_145165.html.
- [7] 张丽赢. 职业卫生档案工作管理研究[J]. 兰台世界, 2018(S2): 202. DOI: 10.3969/j.issn.1006-7744.2018.z2.157.
ZHANG L Y. Study on management of occupational health archives[J]. Lantai World, 2018(S2): 202. DOI: 10.3969/j.issn.1006-7744.2018.z2.157.
- [8] 应急管理部. 建设项目职业病防护设施“三同时”监督管理办法: 国家安全生产监督管理总局令 第90号[A/OL]. (2017-03-09) [2024-09-09]. https://www.mem.gov.cn/gk/gwgg/agwzfl/zjl_01/201703/t20170312_233688.shtml.
Ministry of Emergency Management. Supervision and administration measures for the "Three Simultaneities" of occupational disease prevention facilities in construction projects (decree No. 90 of the State Administration of Work Safety)[A/OL]. (2017-03-09)[2024-09-09]. https://www.mem.gov.cn/gk/gwgg/agwzfl/zjl_01/201703/t20170312_233688.shtml.
- [9] 国家卫生计生委, 安全监管总局, 人力资源社会保障部, 等. 关于印发《职业病危害因素分类目录》的通知: 国卫疾控发〔2015〕92号[A/OL]. (2015-11-17) [2024-09-09]. <http://www.nhc.gov.cn/zyjks/zcwj2/201511/e0d7b9a7bad84f4d825ded1bbec7fddf.shtml>.
National Health and Family Planning Commission, State Administration of Work Safety, Ministry of Human Resources and Social Security, et al. Notice on issuing the Classification Catalogue of Occupational Disease Hazard Factors: 2015 No. 92[A/OL]. (2015-11-17) [2024-09-09]. <http://www.nhc.gov.cn/zyjks/zcwj2/201511/e0d7b9a7bad84f4d825ded1bbec7fddf.shtml>.
- [10] 陆嘉琦, 王建飞. 浅谈“员工职业健康和安全计划”在实验动物饲养管理和使用中的必要性[J]. 实验动物与比较医学, 2013, 33(5): 365-368. DOI: 10.3969/j.issn.1674-5817.2013.05.009.
LU J Q, WANG J F. Discussion on the necessity of "employee occupational health and safety plan" in the management and use of laboratory animals[J]. Lab Anim Comp Med, 2013, 33(5): 365-368. DOI: 10.3969/j.issn.1674-5817.2013.05.009.
- [11] 国家卫生健康委员会. 国家卫生健康委办公厅关于进一步加强用人单位职业健康培训工作的通知: 国卫办职健函〔2022〕441号[A/OL]. (2022-12-13) [2024-09-09]. <http://www.nhc.gov.cn/zyjks/s7824k/202212/921c81bc7d4c4048b6b18341ca3e8748.shtml>.
National Health Commission. Notice from the General Office of the National Health Commission on further strengthening the occupational health training for employers: 2022 No.441 [A/OL]. (2022-12-13)[2024-09-09]. <http://www.nhc.gov.cn/zyjks/s7824k/202212/921c81bc7d4c4048b6b18341ca3e8748.shtml>.
- [12] 宋志刚, 刘芳, 任晓楠, 等. 实验动物从业人员环境健康安全管理体系中生物安全培训的重要性[J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(8):7-10, 6. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7856.2018.08.002.
SONG Z G, LIU F, REN X N, et al. Importance of biosafety training in EHS management system for laboratory animal practitioners[J]. Chin J Comp Med, 2018, 28(8):7-10, 6. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7856.2018.08.002.
- [13] 许虎峰, 王磊. 实验动物从业人员面临的职业健康风险与对策[J]. 职业卫生与应急救援, 2024, 42(2):265-269. DOI: 10.16369/j.oher.issn.1007-1326.2024.02.025.
XU H F, WANG L. Occupational health risks of laboratory animal practitioners and countermeasures[J]. Occup Health Emerg Rescue, 2024, 42(2):265-269. DOI: 10.16369/j.oher.issn.1007-1326.2024.02.025.
- [14] 马春峰, 郭振东, 汤文庭. 动物生物安全实验室常见生物危害及控制措施[J]. 畜牧与兽医, 2019, 51(9):119-124. DOI: CNKI:SUN:XMYS.0.2019-09-027.
MA C F, GUO Z D, TANG W T. Biohazards in and control measures for the animal biosafety laboratory[J]. Anim Husb Vet Med, 2019, 51(9): 119-124. DOI: CNKI: SUN: XMYS. 0.2019-09-027.
- [15] 郑茂恩, 杨春红, 王可洲, 等. 实验动物职业过敏症的研究进展[J]. 实验动物与比较医学, 2019, 39(5):418-422. DOI: 10.3969/j.issn.1674-5817.2019.05.017.
ZHENG M E, YANG C H, WANG K Z, et al. Research progress on occupational allergy of laboratory animal[J]. Lab Anim Comp Med, 2019, 39(5):418-422. DOI: 10.3969/j.issn.1674-5817.2019.05.017.
- [16] 李超, 张惠, 梁洋洋, 等. 化学消毒剂在实验动物设施中的应用及职业健康防护[J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(8):11-15. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7856.2018.08.003.
LI C, ZHANG H, LIANG Y, et al. The application of disinfectants and the protection of occupational health in laboratory animal facilities[J]. Chin J Comp Med, 2018, 28(8): 11-15. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7856.2018.08.003.
- [17] NICHOLSON P J, MAYHO G V, ROOMES D, et al. Health surveillance of workers exposed to laboratory animal allergens[J]. Occup Med, 2010, 60(8): 591-597. DOI: 10.1093/

occmed/kq150.

- [18] 国家卫生健康委员会. 工作场所职业卫生管理规定[EB/OL]. (2020-12-31) [2024-09-09]. <http://www.nhc.gov.cn/fzs/s3576/202101/2a5be92cd14449caaa2ea685cc44ea64.shtml>.

National Health Commission. Regulations on occupational health management in workplaces[EB/OL]. (2020-12-31) [2024-09-09]. <http://www.nhc.gov.cn/fzs/s3576/202101/2a5be92cd14449caaa2ea685cc44ea64.shtml>.

- [19] 国家卫生健康委员会. 关于开展职业卫生分类监督执法试点工作的通知: 国疾控综监督二函〔2022〕50号[A/OL]. (2022-09-20) [2024-09-09]. <http://www.nhc.gov.cn/cms-search/xxgk/getManuscriptXxgk.htm?id=267477987c104a7ab74f51cbf9472f15>.

National Health Commission. Notice on the pilot work of classified supervision and law enforcement in occupational health: 2022 No. 50[A/OL]. (2022-09-20) [2024-09-09]. <http://www.nhc.gov.cn/cms-search/xxgk/getManuscriptXxgk.htm?id=267477987c104a7ab74f51cbf9472f15>.

- [20] 国家卫生和计划生育委员会. 职业健康监护技术规范: GBZ 188—2014[S/OL]. [2024-09-09]. <http://www.nhc.gov.cn/ewebeditor/uploadfile/2014/06/20140610113111925.PDF>.

National Health and Family Planning Commission. Technical specifications for occupational health surveillance: GBZ 188-2014[S/OL]. [2024-09-09]. <http://www.nhc.gov.cn/ewebeditor/uploadfile/2014/06/20140610113111925.PDF>.

- [21] 邵奇鸣, 窦木林. 实验动物设施的职业健康管理体系的建立与实施初探[J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(8):1-6. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7856.2018.08.001.

SHAO Q M, DOU M L. The establishment and implementation of an occupational health management system for laboratory animal facilities[J]. Chin J Comp Med, 2018, 28(8):1-6. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7856.2018.08.001.

(收稿日期: 2024-08-26 修回日期: 2024-12-20)

(本文责任编辑: 丁宇菁)

[引用本文]

许超, 孙秋芳, 邵奇鸣. 实验动物机构职业健康档案建立内容及要点[J]. 实验动物与比较医学, 2025, 45(2): 214-220. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.125.

XU C, SUN Q F, SHAO Q M. Establishment of occupational health related files in laboratory animal institutions[J]. Lab Anim Comp Med, 2025, 45(2): 214-220. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.125.

上海实验动物科普志愿者服务队征集“实验动物百问百答”

为促进社会公众准确了解并科学认知实验动物科学, 发扬志愿者精神, 弘扬科学家精神, 倡导科学方法, 恪守科学道德, 普及科学知识, 传播科学思想, 2017年6月, 上海实验动物研究中心党总支领导成立了上海实验动物科普志愿者服务队(Shanghai Laboratory Animal Popularization Volunteer Service Team, SLAP)(“上海志愿者网”团体ID: 92332603)。这是目前上海唯一一支, 也是国内少数专门针对实验动物科学的专业化科普志愿服务团队之一。

多年来, SLAP积极履行社会责任, 坚持“两面向三走进”(即面向全国、面向全市, 走进社区、走进校区、走进展区), 主动参与新时代文明实践工作, 并为上海市妇联、上海市科技团工委等提供面向公众的公益科普配送服务, 取得了良好的社会效应。同时, SLAP以“专业化”“可持续”为能力建设目标, 在“解密生命科学——走近伟大的实验动物科学”“科学背后的无名英雄——实验动物的驯化史”等多个上海市级和浦东新区科普专项的支持下, 不断丰富科普课程、探索服务模式、拓展服务路径, 积累了诸多多元化、高质量的科普成果。其中, 《鼠鼠我啊 怎么就成实验动物了呢》等科普视频以深入浅出的阐释和极具亲和力的生动语言, 在“哔哩哔哩”平台上一经发布即获得破百万的点击量, 取得了广泛的科学普及成效。SLAP先后荣获“上海市志愿服务先进集体”“长三角优秀科技志愿服务组织”“上海市大众科学传播优秀科技志愿服务项目”“上海科普教育创新奖提名奖”“上海市优秀科普微视频”“浦东新区科普课件大赛优秀奖”等诸多荣誉。

为进一步深化公众对实验动物知识的理解与掌握, SLAP联合《实验动物与比较医学》编辑部面向社会广泛征集实验动物相关问题(及其答案)。优秀问答内容将被收录于《实验动物百问百答》科普手册, 并有机会获得一定奖励。诚挚期待全国实验动物行业内的专家、学者、从业者以及科普爱好者积极参与(扫码填写), 分享专业知识与宝贵经验, 共同为实验动物领域的知识传播与交流合作贡献力量。感谢您的支持!



《实验动物与比较医学》编辑部

实验动物机构建设项目职业健康防护设施“三同时”的实施要求

蔡梦诗¹, 苏 醒¹, 邵奇鸣²

[1. 百奥赛图(北京)医药科技股份有限公司, 北京 102609; 2. 江苏鼎泰药物研究(集团)股份有限公司, 南京 211800]

[摘要] 职业健康是一门致力于识别、评估、预测和控制工作场所内的职业性有害因素以及这些因素对健康潜在影响的科学。其核心目标是通过有效的预防措施和保护机制, 保障劳动者的安全, 降低职业性有害因素给健康带来的风险, 从而促进从业人员在职业活动中的身体健康、心理健康, 并增进其社会福利。建设项目职业健康防护设施“三同时”(以下简称职业健康“三同时”)即建设项目的职业病防护设施应与主体工程同时设计、同时建设、同时投入生产和使用。职业健康“三同时”实施的过程包括了职业病危害预评价、职业健康防护设施的设计, 确保其符合职业病防治的要求。在建设项目的施工阶段, 职业健康防护设施必须与主体工程同时施工, 确保设施的完整性和有效性。最后, 由建设单位组织对职业病危害控制效果进行评价及职业健康防护设施验收, 以保障员工的职业健康。实施建设项目职业健康防护“三同时”是国家的强制性规定, 如违规将会面临罚款、强制性停工等后果。然而, 对于一些实验动物机构而言, 如何实施建设项目职业健康防护设施“三同时”, 仍然是个难点。本文通过介绍职业健康“三同时”的发展历程、实验动物机构履行建设项目职业健康“三同时”的意义及具体实施步骤, 旨在为实验动物机构完成职业健康“三同时”提供有效的信息和具体的实施方法。

[关键词] 实验动物机构; 职业健康“三同时”; 职业健康安全

[中图分类号] R136; Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2025)02-0221-08



Implementation of "Three Simultaneities" for Occupational Health Protection Facilities in Laboratory Animal Institution Construction Project

CAI Mengshi¹, SU Xing¹, SHAO Qiming²

[1. Biocytogen Pharmaceuticals (Beijing) Co., Ltd., Beijing 102609, China; 2. TriApex Laboratories Co., Ltd., Nanjing 211800, China]

Correspondence to: SHAO Qiming (ORCID: 0009-0000-7104-7293), E-mail: sxsqm2018@163.com

[ABSTRACT] Occupational health is a discipline dedicated to the identification, assessment, prediction, and control of occupational hazards in the workplace and their potential impacts on health. Its core objective is to ensure the safety of workers through targeted preventive strategies and protective mechanisms, thereby minimizing health risks caused by occupational hazards and promoting physical health, mental well-being, and overall social welfare in the workplace. The "three simultaneities" of occupational health protection facilities in construction projects (hereinafter referred to as "three simultaneities") refers to the principle that occupational disease prevention facilities must be designed, constructed, and put into operation simultaneously with the main project. The implementation of "three simultaneities" involves several stages: a preliminary assessment of occupational disease risks, the design of occupational disease protection facilities in accordance with relevant standards, and ensuring these facilities are constructed in parallel with the primary engineering project to maintain integrity and effectiveness. During the construction phase, occupational disease prevention facilities must be

[第一作者] 蔡梦诗(1989—), 女, 本科, 研究方向: 质量与环境健康安全。E-mail: mengshi.cai@bbctg.com.cn。ORCID: 0009-0006-3880-1657

[通信作者] 邵奇鸣(1956—), 女, 博士, 研究方向: 环境健康安全(EHS), 实验动物设施管理。E-mail: sxsqm2018@163.com。ORCID: 0009-0000-7104-7293

constructed simultaneously with the main project to ensure their integrity and effectiveness. Upon project completion, the construction unit is responsible for evaluating the control effects of occupational disease hazards and conducting the acceptance of occupational disease prevention facilities to ensure the occupational health of employees. The implementation of the "three simultaneities" for occupational disease protection facilities in construction projects is a mandatory national regulation, and non-compliance may result in legal penalties such as fines and forced suspension of work. However, for some laboratory animal institutions, the implementation of the "three simultaneities" remains a challenge. This paper aims to provide practical guidance and feasible implementation strategies for such institutions by introducing the development history of the "three simultaneities" in occupational health, explaining its relevance and necessity in the context of laboratory animal facilities, and outlining step-by-step procedures for compliance and implementation.

[Key words] Laboratory animal institutions; Occupational health "three simultaneities"; Occupational health and safety

自《中华人民共和国职业病防治法》^[1] 出台以来,国内相继发布了一系列职业健康配套措施。2017年原国家安全生产监督管理总局(现应急管理部)发布的第90号令《建设项目职业病防护设施“三同时”监督管理办法》^[2] 是中国企业建立职业健康安全管理体系的一个最基本、最重要的环节。职业健康安全管理体系在国内外已经成为企业发展的有力推动工具。国内已实施的一系列管理措施和政策,旨在降低职业危害的发生率。本文将深入介绍实验动物机构建设项目职业病防护设施“三同时”的实施方法。本文通过系统梳理“三同时”制度的发展历程,详细阐述该制度在实验动物机构中的实施意义和主要工作内容,旨在为实验动物机构提供全面、具体且具有可操作性的指导,助力其有效落实“三同时”制度。这不仅提高职业健康管理水平,还能保障从业人员的身体健康和生命安全,从而推动实验动物行业的健康、可持续发展。

1 建设项目职业健康“三同时”的发展历程

建设项目职业健康防护设施“三同时”(以下简称职业健康“三同时”)即建设项目的职业病防护设施应与主体工程同时设计、同时建设、同时投入生产和使用。纵观中国职业健康“三同时”的发展,可追溯到新中国成立初期。当时,职业病防治工作受到苏联模式的影响,建立起各级防疫机构,规范了防疫管理制度,完善了卫生监督制度,加强了防疫教育,但还缺少职业健康标准。1956年发布的《工业企业设计暂行卫生标准》强调新建和改建工业企业必须关注卫生设施的设计。随着“文化大革命”爆发,职业健康相关工作几乎停滞。改革开放后,职业健康工作全面恢复。1987年《中华人民共和国尘肺病防治条例》^[3] 的

出台首次通过法律形式确立“三同时”的基本要求,推动职业健康工作的进一步发展。卫生部等多部门共同发布的《工业企业设计卫生标准》(GBZ 1—2010)^[4] 明确规定新建、改建企业的职业病防护设施必须与主体工程同时设计、施工和投产。2001年《中华人民共和国职业病防治法》第一次将职业健康“三同时”列入法规,极大地推动了“三同时”制度的全面法治化。欧美国家将职业健康安全列入实验动物行业的从业要求中^[5],《实验动物饲养管理和使用指南》^[6-7] 明确要求全面的动物饲养管理和使用计划必须包含从业人员的职业健康与安全计划(Occupational Health and Safety Program, OHSP)。这一要求反映出在实验动物的管理与操作过程中,职业健康不仅是法律规定的义务,更是保障科学研究质量与实验动物福利伦理的重要环节。2014年发布的《实验动物机构 质量和能力的通用要求》(GB/T 27416—2014)^[8],首次将实验动物从业人员的职业健康安全要求纳入实验动物机构的管理范围。2017年《建设项目职业病防护设施“三同时”监督管理办法》(国家安全生产监督管理总局令第90号)要求各机构从源头上控制职业病,保证从业人员的职业健康,促进机构的可持续发展。不断修订的职业健康法律法规和技术标准使得职业病防护的“三同时”制度得到了持续优化和完善。经过多年的发展,建设项目职业健康“三同时”制度已经从早期的技术要求演变为法律强制性条款,成为中国职业病防治工作中不可或缺的重要组成部分。

2 实验动物机构履行建设项目职业健康“三同时”的意义

职业健康“三同时”的实施对于实验动物机构和

社会的重要意义主要体现在法律责任、经济效益和人员健康3个方面。首先,在法律责任方面,职业健康“三同时”是法规要求,若实验动物机构不执行相关要求,可能会面临罚款、停工整顿和责任人追责等一系列的法律后果,只有切实落实实施,实验动物机构才可以避免由此带来的法律责任;其次,在经济效益方面,实验动物机构在项目建设初期全面考虑职业病防护的要求,将职业健康及职业病预防工作前置,可以减少因后期改建和设备更新造成的高昂费用,从而降低因职业病造成的法律风险和减少保险费用,提高机构整体盈利能力,减少成本支出;最后,在人员健康保障方面,职业健康“三同时”的实施可有效预防职业病的发生,保护实验动物机构从业人员的身心健康,增强从业人员的安全感与归属感,提升工作积极性和忠诚度。

综合来看,职业健康防护“三同时”的实施不仅能确保实验动物机构履行法律义务,还能实现经济收益和员工权益保障的同步提升,对实验动物机构的可持续发展有着积极的影响^[9-12]。

3 实验动物机构实施建设项目职业健康“三同时”的主要内容

实验动物机构在设施建设开始前,就需要根据国

家卫生健康委等颁发的《职业病分类和目录》^[13]及《职业病危害因素分类目录》^[14]来判定此建设项目是否存在职业病危害因素及可能引发的职业病,然后根据《工作场所职业卫生监督管理规定》^[15]第十四条规定:新建、改建、扩建的工程建设项目和技术改造、技术引进项目可能产生职业病危害的,建设单位应当按照国家相关建设项目职业病防护设施“三同时”监督管理的规定执行。依据这些规定,寻找有资质、有经验的第三方机构来共同完成职业健康“三同时”要求的职业病危害预评价、职业病防护设施设计、职业病危害控制效果评价。

3.1 职业病危害预评价

职业病危害预评价分准备、评价、报告编制3个步骤进行。首先,评价机构人员根据法律法规,要求实验动物机构提供必需的资料。例如,实验动物设施建设项目的概况,工艺流程和设备布局,主要使用的原辅料,重要的仪器设备,公辅工程,岗位设置及人员数量,各部门或工艺可能产生的职业病危害因素及其对工作场所、从业人员健康影响与危害程度,三废处理流程及工艺,危险化学品清单(包括最大存储量及存储位置),工作制度,实验动物饲养/使用量等。表1~5列出了实验动物机构需要提供给评价机构进行预评价的基本资料范例。

表1 公用辅助工程示范列表
Table 1 Example list of public auxiliary works

工程类别 Project category	工程名称 Project name	扩建前 Before expansion	扩建项目 Expansion project	扩建后 After expansion	备注 Note
公用工程 Public infrastructures	给水	xx 吨/年	xx 吨/年	xx 吨/年	拟建项目依托现有给水管网
	排水	xx 吨/年	xx 吨/年	xx 吨/年	拟建项目依托现有排水管网
	供电	xx 万千瓦时/年	xx 万千瓦时/年	xx 万千瓦时/年	拟建项目依托现有供电管网
储运工程 Storage and transportation infrastructures	危化品暂存间	位于某房间面积 50 m ²	不新增	同原设计	xx

注: xx 为具体数值。
Note: xx denotes a specific numerical value.

评价机构根据实验动物机构提供的文件(工艺流程、设施总平面布置、岗位设置、人员数量、设备等),初步识别实验动物机构的工艺过程(动物采购、使用到处理的全过程),动物设施环境及设施建设期可能存在的职业病危害因素及其来源、特点与分布,对

建设项目可能产生的职业病危害因素、危害程度、健康影响、防护措施等进行预测及卫生学评价。

预评价阶段还需要与已经完成职业健康安全“三同时”或已经投入使用的同类实验动物机构进行比较。预评价报告初稿完成后,实验动物机构需组织职业健

表2 建设项目主要原辅料示范列表

Table 2 Example list of primary raw and auxiliary materials for construction project

序号 Number	名称 Name	规格 Specification	年用量 Annual consumption	使用位置 Location of use
1	肿瘤细胞系	1 mL/冻存管	xx 支冻存管	xx 号楼 xx 房间
2	Tunel 试剂盒	100 片/盒	xx 盒	xx 号楼 xx 房间
3	小鼠繁殖饲料	10 kg/包	xx 包	动物设施
4	垫料(玉米芯)	50 kg/袋	xx 袋	动物设施
5	75% 乙醇	500 mL/瓶	xx 瓶	易制爆品暂存间
6	二甲苯	500 mL/瓶	xx 瓶	危化品暂存间

注：xx 为具体数值。
Note: xx denotes a specific numerical value.

表3 工艺过程中主要职业病危害因素示范列表

Table 3 Example list of major occupational hazard factors in working process

序号 Number	评价区域 Assessment area	职业病危害因素 Occupational hazards	工作场所 Workplace
1	病理部	甲醛、二甲苯等	解剖间
2	动物中心	75% 乙醇、次氯酸钠等	洗消间

康专家对预评价报告进行评审，按照评审意见对报告进行整改及修订，并将最终完成的报告在机构内部进行公示。公示完成后，向上级主管部门提交材料进行备案登记。提交的材料需遵循各省市区的具体要求，主要包括以下7项：预评价工作过程报告；评审意见书；建设项目批准文件；预评价报告；预评价委托书；

编制机构的法律承诺书；实验动物机构对评价报告的意见汇总等。在获得备案批文后，再进行职业健康防护设施设计。

3.2 职业健康防护设施设计

职业健康“三同时”的设计专篇包括对职业病防护设施的设计。内容包括建筑设计、职业病防护设计、辅助设施设计、应急设施设计及管控措施等^[9]。其中，辅助用室及卫生设施的设置情况（女工室、卫生间等）是应该加强关注的。

设计专篇的基本资料需要包括本项目基本情况、工艺流程、项目概述、平面图、原辅料、仪器设备等与预评价类似的基本内容。对可能涉及的饲养、使用及实验过程等进行描述，以发现所有工艺中可能涉及的职业健康危害因素。

表4 职业病危害防护设施示范列表

Table 4 Example list of occupational hazard prevention facilities

序号 Number	评价区域 Assessment area	职业病危害防护设施 Occupational hazard prevention facilities	防护设施的功能分析 Functional analysis of protective facilities
1	病理部实验室	生物安全柜	实验室
2	动物中心操作间	生物安全柜	部分操作间
3	动物中心清洗间	降噪墙面	清洗间

表5 个人防护用品示范列表

Table 5 Example list of personal protective equipment

序号 Number	个人防护用品种类 Type of personal protective equipment	标准/相关产品型号(范例) Standard / Relevant model (Sample)	使用部门/岗位 Department / position of use
1	一次性口罩	按照《一次性使用医用口罩》(YY/T 0969-2013)标准	动物中心、病理部
2	防护眼镜	3M 10436、霍尼韦尔 R-01680 等	病理、分析
3	耳塞	3M 1100、霍尼韦尔 S300L	动物中心
4	防烫手套	安百利 ABL-S528 防水防烫耐高温手套	动物中心洗消前室

实验动物机构可能涉及的工艺流程包括6项：实验动物采购、使用、废弃流程；实验动物饲养流程；药效实验流程或安全性评价实验流程，包括动物适应期、给药、动物观察、指标的测定、解剖或安乐死流程；病理流程；分析实验流程；其他涉及的流程。

设计专篇需按照工艺流程对实验动物机构可能存在的职业病危害因素进行识别。使用玉米芯垫料，在进行垫料脱包、添加垫料或换笼时，饲养人员接触到的谷物粉尘；清洁消毒过程中使用的消毒剂^[16]；接触动物时，接触到的皮毛粉尘（微量）；

试剂配制过程中，可能会接触到的盐酸、氢氧化钠溶液等；病理工作涉及的甲醛、氢氧化钠、乙酸、乙醇、丙酮等；分析工作涉及的二甲苯、乙腈等；动物设施的工程维护过程中，人员会接触到的噪声；污水处理过程中，人员会接触到的氢氧化钠等。这些都是实验动物机构存在的职业健康危害因素。此外，在动物饲养、清洁消毒、试剂配制、实验动物样本处理等过程中也存在着相应的职业健康危害因素。表6举例说明施工期间可能出现的职业病危害因素，表7举例说明实验动物机构不同工作场所职业病危害因素。

表6 施工建设期主要职业病危害因素(范例)

Table 6 Major occupational hazards during construction (as an example)

主体工程	子工程	可能存在的职业病危害因素
Main project	Sub project	Potential occupational hazards
建筑设备工程	建筑给排水	噪声、粉尘(水泥尘为主), 露天高温, 劳动过程中强制体位
Building equipment engineering	建筑电气工程	噪声、粉尘(水泥尘为主), 露天高温, 劳动过程中强制体位
	通风与空调工程	噪声、粉尘(水泥尘为主), 露天高温, 劳动过程中强制体位
生产设备安装工程	机械设备安装	噪声、粉尘、化学毒物(二氧化锰、氮氧化物、一氧化碳、臭氧等), 露天高温, 劳动过程中强制体位、职业紧张等
Production equipment installation engineering		

建设项目还需要与同类机构做比较，对可能发生职业病的危险程度进行分析及预测。实验动物生产企业需与另外一家规模类似且已完成职业健康安全“三同时”的实验动物生产企业作比较。同时，需与同类机构所建立的职业健康管理制度进行对比，以评估本实验动物机构已建立的职业健康安全管理体制是否完善^[17-22]。此外，也可将实验动物机构职业健康管理制度与国家要求的政策制度进行对比寻找差异。

职业健康“三同时”设计专篇完成后，实验动物机构同样需要组织职业健康专家对专篇进行评审，并对专家提出的问题进行整改。在机构内公示一周后，实验动物机构向上级主管部门提交材料进行备案登记。主要材料包括以下7项：建设项目职业病防护设施设计审查申请书，建设项目立项审批文件，建设项目职业病防护设施设计单位资质，建设项目职业病防护设施设计专篇，建设单位和职业健康专家对职业病防护设施设计专篇的评审意见，建设项目职业病危害预评价报告审核的批复文件，职业病防护设施设计专篇法律责任承诺书等。获得备案回执后，进行开工建设。

3.3 控制效果评价与验收

实验动物设施建设完成后，设施运行30~180 d内实验动物机构须完成职业健康“三同时”的验收工作。

验收可分为准备、评审、整改及信息公示4个阶段。

验收准备：实验动物机构与第三方机构一起制定评审（验收）方案，明确验收各阶段的任务及分工，并将验收方案提交主管部门。机构需组织进行职业健康危害因素的检测，安排专家评审会议。

验收评审：实验动物机构负责介绍项目及防护设施的基本情况与管控措施。评审组依据标准逐项评审并进行现场核查，形成验收意见。

整改：实验动物机构根据评审意见进行整改并形成书面整改报告。

信息公示：实验动物机构通过机构内部公告栏或网站公示职业病危害评价和防护设施验收的相关信息，以便从业人员和行政部门查询。公示完毕，获得主管部门的批复，表明职业健康“三同时”验收工作结束。职业卫生“三同时”具体工作流程见参考文献[23]。

4 总结

建设项目职业病防护设施“三同时”工作是从源头上预防、控制和消除建设项目可能产生的职业病危害的根本措施，也是贯彻落实国家职业病预防的方针“预防为主、防治结合”的主要工作之一，是保障从业人员健康权益的有效手段。职业健康安全“三同时”

表7 实验动物机构不同工作场所的主要职业病危害因素(范例)

Table 7 Major occupational hazards in different workplaces of laboratory animal institutions (as an example)

设计单元 Design unit	设计子单元 Design subunit		岗位 Position	主要作业内容 Main tasks	定员/位 Number of employees/ positions	设备 Equipment	职业病危害因素 Occupational hazards	接触途径 Exposure route	接触时间 Exposure time
动物饲养及实验单元 Animal housing and experiment unit	饲养间	饲养	动物饲养员	动物饲养	xx	笼具	动物皮毛粉尘、动物病原微生物、噪声	皮肤、呼吸道、眼、听觉器官	每班累计 xx h
	实验间	给药	技术员	给药	xx	注射器等	药物	皮肤、呼吸道、眼	间断作业，每班累计 xx h
		采血、检测	兽医、技术员	血常规、尿常规等检测	xx	全血、尿液自动分析仪	/	/	间断作业，每班累计 xx h
		麻醉、安乐死	兽医、技术员	麻醉剂、麻醉设备	xx	注射器、麻醉机	麻药	皮肤、呼吸道、眼	间断作业，每班累计 xx h
	废液间	环境消毒	技术员	危废存储、转运	xx	/	盐酸、甲醛、乙醇、丙酮、二甲苯、甲醇、乙腈	皮肤、呼吸道、眼	每班xx次，每次xx min
公辅单元 Public auxiliary unit	供电单元	变电所、配电室/配电间	设备管理员	变配电装置巡检	xx	变配电装置	工频电场	皮肤	每班 x x 次，每次累计xx h
	清洗单元	笼具清洗	动物饲养员	笼具清洗	xx	超声波清洗机	动物皮毛粉尘、动物病原微生物、噪声、消毒剂	皮肤、呼吸道、眼、听觉器官	间断作业，每班累计 xx h
	污水处理单元	污水处理站	设备管理员	污水处理系统巡检	xx	污水处理设备	噪声	听觉器官	每班xx次，每次xx min
	制水单元	纯水制备系统	设备管理员	纯水制备系统巡检	xx	纯水制备系统	噪声	听觉器官	每班 xx 次，每次xx min

注：xx为具体数字（因机构不同，此数值不同，故使用xx代替）；/表示没有。
Note: xx denotes a specific number (which varies depending on the institution , hence it is replaced by xx) ; / Indicates none.

是《中华人民共和国职业病防治法》和《建设项目职业病防护设施“三同时”监督管理办法》（国家安全生产监督管理总局令第90号）的要求。如不执行，安全监管部门会给予警告、责令限期改正，对逾期不改正机构处以十万元以上五十万元以下的罚款，甚至关停建设项目。

具体实施中需要注意国家规定的两个时间点。如果在2017年5月1日前已经正式投产运行，但尚未开展建设项目职业病防护设施“三同时”的实验动物机构，可以完成工作场所职业病危害因素检测并进行现状评价；2017年5月1日以后，尚未竣工验收的建设项目需要按照要求进行职业病危害预评价、职业病防护设施设计和职业病危害控制效果评价。在此过程中实验动物机构需要与有资质的第三方合作，聘请有经验

的职业健康专家对职业健康安全“三同时”进行审核，并对专家提出的问题进行整改。完成后通过公告栏或机构网站公布职业健康安全“三同时”信息，并向安全监管部门提交验收方案及评价报告。

实验动物机构在设施进行新建或大改造时，实施职业健康安全“三同时”，并建立机构的职业健康安全“三同时”制度。这从遵循法规、保障实验动物从业人员的健康和促进行业可持续发展三个层面，有效地推动了实验动物机构优化生产工艺和加强职业健康安全管理，可有效降低职业健康安全事故的发生率，减少因事故导致的经济损失或生产中断。在制度实施过程中，机构和从业人员需深入学习职业健康知识，强化防护意识，主动采取防护措施，形成良好的职业健康安全文化氛围。从根本上保障实验动物行业的健康发

展,提高机构及从业人员的健康安全意识,减少对人体和环境的危害,有助于树立良好的企业形象,吸引更多资金和人才,为提升实验动物行业整体的社会认可度、促进行业可持续发展筑牢了坚实根基。此外,职业健康“三同时”制度与国际标准接轨,满足国际标准 ISO 45001 以及国际实验动物评估和认可委员会 (Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International, 简称 AAALAC International)、加拿大实验动物管理委员会 (Canadian Council on Animal Care, CCAC) 和欧洲实验动物科学联合会 (Federation of European Laboratory Animal Science Associations, FELASA) 等组织的职业健康体系要求。有利于中国实验动物机构参与国际交流与合作,提升国际竞争力,促进实验动物行业在全球范围内的协同发展。

[作者贡献 Author Contribution]

蔡梦诗负责起草论文、回复审稿意见;
苏醒负责审稿、制作表格,参与回复审稿意见;
邵奇鸣负责对论文内容整体把握和修改文章。

[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] 国家法律法规数据库. 中华人民共和国职业病防治法[DB/OL]. (2018-12-29) [2024-09-11]. <https://flk.npc.gov.cn/detail2.html?ZmY4MDgwODE2ZjEzNWY0NjAxNmYyMTJlYTYTE3Zjg%3D>. The National People's Congress of the People's Republic of China. Law of the People's Republic of China on the prevention and control of occupational diseases[DB/OL]. (2018-12-29) [2024-09-11]. <https://flk.npc.gov.cn/detail2.html?ZmY4MDgwODE2ZjEzNWY0NjAxNmYyMTJlYTYTE3Zjg%3D>.
- [2] 应急管理部. 建设项目职业病防护设施“三同时”监督管理办法: 国家安全生产监督管理总局令 第90号[A/OL]. (2017-03-09) [2024-09-11]. https://www.mem.gov.cn/gk/gwgg/agwzlf/zjl_01/201703/t20170312_233688.shtml. Ministry of Emergency Management of the People's Republic of China. Supervision and administration measures for the "Three Simultaneities" of occupational disease prevention facilities in construction projects (decree No. 90 of the State Administration of Work Safety)[A/OL]. (2017-03-09) [2024-09-11]. https://www.mem.gov.cn/gk/gwgg/agwzlf/zjl_01/201703/t20170312_233688.shtml.
- [3] 国家法律法规数据库. 中华人民共和国尘肺病防治条例[DB/OL]. (1987-12-03) [2024-09-11]. <https://flk.npc.gov.cn/detail2.html?ZmY4MDgwODE2ZjNjYmlzYzAxNmYyMTUzYmM3NzlyNDA%3D>. State Council of the People's Republic of China. Regulations of the People's Republic of China on the prevention and control of pneumoconiosis[DB/OL]. (1987-12-03) [2024-09-11]. <https://flk.npc.gov.cn/detail2.html?ZmY4MDgwODE2ZjNjYmlzYzAxNmYyMTUzYmM3NzlyNDA%3D>.
- [4] 中华人民共和国卫生部. 工业企业设计卫生标准: GBZ 1—2010[S/OL]. [2024-09-11]. <http://www.nhc.gov.cn/ewebeditor/uploadfile/2014/11/20141114162610618.pdf>. Ministry of Health of the People's Republic of China. Hygienic standards for the design of industrial enterprises: GBZ 1-2010[S/OL]. [2024-09-11]. <http://www.nhc.gov.cn/ewebeditor/uploadfile/2014/11/20141114162610618.pdf>.
- [5] Committee on Occupational Safety and Health in Research Animal Facilities, Institute of Laboratory Animal Resources, Commission on Life Sciences, National Research Council. Occupational health and safety in the care and use of research animals[M/OL]. [2024-09-11]. https://campus.und.edu/safety/_files/docs/occupational-health-and-safety.pdf.
- [6] National Research Council. Guide for the care and use of laboratory animals[M]. 8th ed. Washington, D. C.: National Academies Press, 2011.
- [7] 陆嘉琦, 王建飞. 浅谈“员工职业健康和安全计划”在实验动物饲养管理和使用中的必要性[J]. 实验动物与比较医学, 2013, 33(5): 365-368. LU J Q, WANG J F. Discussion on the necessity of "Employee Occupational Health and Safety Plan" in the management and use of laboratory animals[J]. Lab Anim Comp Med, 2013, 33(5):365-368.
- [8] 国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 实验动物机构质量和能力的通用要求: GB/T 27416—2014[S]. 北京: 中国标准出版社, 2014. General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China; National Standardization Administration. Laboratory animal institutions—General requirements for quality and competence: GB/T 27416-2014[S]. Beijing: Standards Press of China, 2014.
- [9] 许虎峰, 王磊. 实验动物从业人员面临的职业健康风险与对策[J]. 职业卫生与应急救援, 2024, 42(2):265-269. DOI:10.16369/j.oher.issn.1007-1326.2024.02.025. XU H F, WANG L. Occupational health risks of laboratory animal practitioners and countermeasures[J]. Occup Health Emerg Rescue, 2024, 42(2):265-269. DOI: 10.16369/j.oher.issn.1007-1326.2024.02.025.
- [10] 李军延, 赵金鹏, 郝书荣, 等. 实验动物设施的职业卫生问题及管理[J]. 中国卫生工程学, 2006, 5(3):164-166. DOI:10.3969/j.issn.1671-4199.2006.03.024. LI J Y, ZHAO J P, HAO S R, et al. Occupational health problems and management of experimental animal facilities[J]. Chin J Public Health Eng, 2006, 5(3):164-166. DOI:10.3969/j.issn.1671-4199.2006.03.024.
- [11] 邵奇鸣, 窦木林. 实验动物设施的职业健康管理体系的建立与实施初探[J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(8):1-6. DOI:10.3969/j.issn.1671-7856.2018.08.001. SHAO Q M, DOU M L. The establishment and implementation of an occupational health management

- system for laboratory animal facilities[J]. Chin J Comp Med, 2018, 28(8):1-6. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7856.2018.08.001.
- [12] 李莉, 赵善民, 崔淑芳. 高等院校实验动物管理中面临的问题及对策[J]. 实验动物与比较医学, 2018, 38(1):65-68. DOI:10.3969/j.issn.1674-5817.2018.01.014.
- LI L, ZHAO S M, CUI S F. Problems and countermeasures in the management of laboratory animals in colleges and universities[J]. Lab Anim Comp Med, 2018, 38(1):65-68. DOI:10.3969/j.issn.1674-5817.2018.01.014.
- [13] 国家卫生健康委, 人力资源社会保障部, 国家疾控局, 等. 关于印发《职业病分类和目录》的通知: 国卫职健发〔2024〕39号[A/OL]. (2024-12-11) [2025-02-11]. https://www.gov.cn/zhengce/zhengceku/202412/content_6992843.htm.
- National Health Commission, Ministry of Human Resources and Social Security, National Disease Control and Prevention Administration, et al. Notice on issuing the Classification and Catalog of Occupational Diseases: 2024 No.39[A/OL]. (2024-12-11) [2025-02-11]. https://www.gov.cn/zhengce/zhengceku/202412/content_6992843.htm.
- [14] 国家卫生计生委, 安全监管总局, 人力资源社会保障部, 等. 关于印发《职业病危害因素分类目录》的通知: 国卫疾控发〔2015〕92号[A/OL]. (2015-11-17) [2024-09-09]. <http://www.nhc.gov.cn/zyjks/zcwj2/201511/e0d7b9a7bad84f4d825ded1bbec7fddf.shtml>.
- National Health and Family Planning Commission, State Administration of Work Safety, Ministry of Human Resources and Social Security, et al. Notice on issuing the Classification Catalogue of Occupational Disease hazard factors: 2015 No. 92[A/OL]. (2015-11-17) [2024-09-09]. <http://www.nhc.gov.cn/zyjks/zcwj2/201511/e0d7b9a7bad84f4d825ded1bbec7fddf.shtml>.
- [15] 国家卫生健康委员会. 工作场所职业卫生管理规定[EB/OL]. (2020-12-31) [2024-09-11]. <http://www.nhc.gov.cn/fzs/s3576/202101/2a5be92cd14449caaa2ea685cc44ea64.shtml>.
- National Health Commission. Regulations on the supervision and management of occupational health in the workplace [EB/OL]. (2020-12-31) [2024-09-11]. <http://www.nhc.gov.cn/fzs/s3576/202101/2a5be92cd14449caaa2ea685cc44ea64.shtml>.
- [16] 李超, 张惠, 梁洋洋, 等. 化学消毒剂在实验动物设施中的应用及职业健康防护[J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(8):11-15. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7856.2018.08.003.
- LI C, ZHANG H, LIANG Y Y, et al. The application of disinfectants and the protection of occupational health in laboratory animal facilities[J]. Chin J Comp Med, 2018, 28(8): 11-15. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7856.2018.08.003.
- [17] 柳小兵, 张超, 雷佳, 等. 完善职业卫生管理体系的对策分析[J]. 科学与信息化, 2021(14):136.
- LIU X B, ZHANG C, LEI J, et al. Strategies for optimizing occupational health management systems[J]. Sci Inf Technol, 2021(14):136.
- [18] 宋志刚, 刘芳, 任晓楠, 等. 实验动物从业人员环境健康安全管理培训中生物安全培训的重要性[J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(8):7-10,6. DOI:10.3969/j.issn.1671-7856.2018.08.002.
- SONG Z G, LIU F, REN X N, et al. Importance of biosafety training in EHS management system for laboratory animal practitioners[J]. Chin J Comp Med, 2018, 28(8):7-10,6. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7856.2018.08.002.
- [19] 吕京, 田燕超. 实验动物机构职业健康安全手册[M]. 北京: 中国标准出版社, 2015:1-178.
- LÜ J, TIAN Y C. Occupational health and safety manual for experimental animal institutions[M]. Beijing: Standards Press of China, 2015:1-178.
- [20] 应急管理部. 关于印发职业卫生档案管理规范的通知: 安监总厅安健〔2013〕171号[A/OL]. (2013-12-31) [2024-09-11]. https://www.mem.gov.cn/gk/gwgg/agwzfl/gfxwj/2013/201401/t20140109_242982.shtml.
- Ministry of Emergency Management of the People's Republic of China. Notice on issuing the regulations for the management of occupational health archives: 2013 No.171[A/OL]. (2013-12-31) [2024-09-11]. https://www.mem.gov.cn/gk/gwgg/agwzfl/gfxwj/2013/201401/t20140109_242982.shtml.
- [21] 应急管理部. 用人单位职业健康监护监督管理办法: 国家安全生产监督管理总局令 第49号[A/OL]. (2012-04-27) [2024-09-11]. https://www.mem.gov.cn/gk/gwgg/agwzfl/zjl_01/201204/t20120427_233754.shtml.
- Ministry of Emergency Management of the People's Republic of China. Supervision and administration measures for occupational health surveillance of employers (decree of the State Administration of Work Safety No.49)[A/OL]. (2012-04-27) [2024-09-11]. https://www.mem.gov.cn/gk/gwgg/agwzfl/zjl_01/201204/t20120427_233754.shtml.
- [22] 朱秋鸿. 职业健康标准体系建设的挑战与展望[J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2024, 42(2):81-83. DOI: 10.3760/cma.j.cn121094-20231110-00108.
- ZHU Q H. Challenges and prospects for the construction of occupational health standard system[J]. Chin J Ind Hyg Occup Dis, 2024, 42(2): 81-83. DOI: 10.3760/cma.j.cn121094-20231110-00108.
- [23] 河间市卫生健康局. 建设项目职业病防护设施“三同时”工作流程图[EB/OL]. (2022-08-19) [2024-07-16]. <http://hejian.gov.cn/hejian/ADD06562/202209/dc92b044b8144ec2b55937dcd36947b5.shtml>.
- Hejian Municipal Health Commission. Workflow diagram for occupational hazard control facilities in construction projects: "three simultaneities" implementation[EB/OL]. (2022-08-19) [2024-07-16]. <http://hejian.gov.cn/hejian/ADD06562/202209/dc92b044b8144ec2b55937dcd36947b5.shtml>.
- (收稿日期: 2024-08-27 修回日期: 2025-02-07)
(本文责任编辑: 丁宇菁)
- [引用本文]**
蔡梦诗, 苏醒, 邵奇鸣. 实验动物机构建设项目职业健康防护设施“三同时”的实施要求[J]. 实验动物与比较医学, 2025, 45(2): 221-228. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.127.
- CAI M S, SU X, SHAO Q M. Implementation of "three simultaneities" for occupational health prevention facilities in laboratory animal institution construction project[J]. Lab Anim Comp Med, 2025, 45(2): 221-228. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.127.



代解杰,北京协和医学院/中国医学科学院医学生物学研究所课题组长,二级教授,博士生导师。现兼任中国实验动物学会第二届监事会监事,中国实验动物学会实验动物资源鉴定与评价工作委员会以及屏障医学专业委员会副主任委员,中国实验动物学会标准化委员会委员,云南省实验动物学会副理事长,《中国实验动物学报》和《实验动物与比较医学》副主编。从事实验动物学、病原生物学等相关研究与管理40年,先后主持国家科技支撑计划、国家自然科学基金、云南省自然科学基金,以及WHO、美国和日本等国际合作项目数十项。作为云南省树鼩标准化研究与人类疾病树鼩模型创建创新团队负责人,率先攻克了树鼩繁殖关键技术,建立了中国最大的树鼩种质资源基地,为中国实验动物新品种的研发提供了重要的经验和示范。先后获云南省科技进步奖一等奖2项、二等奖1项、三等奖4项,云南省自然科学奖二等奖1项,中国实验动物学会科学技术奖一等奖3项;被评为全国优秀科技工作者、云南省中青年学术技术带头人、云南省有突出贡献的优秀专业技术人员。组织制定了云南省地方标准5项,中国实验动物学会团体标准6项;发表学术论文100余篇,其中SCI论文40余篇;获国家发明专利授权19项,出版著作多部。



陆彩霞,医学博士,北京协和医学院/中国医学科学院硕士生导师、昆明医科大学硕士生导师,云南省中青年学术和技术带头人,昆明市树鼩细胞资源库及病毒性动物模型研究创新团队带头人,云南省卫生健康委医学学科带头人。主要从事实验动物相关工作,主要研究方向为实验动物新品种的培育与开发,以及人类疾病动物模型构建。主持和参加国家级和省级项目多项,作为技术骨干完成的研究成果先后获得2012年云南省科学技术进步奖一等奖(排名第八)、2014年中国实验动物学会科学技术奖一等奖(排名第四)、2018年云南省科学技术进步奖二等奖(排名第七)和2021年云南省科学技术进步奖二等奖(排名第二),并曾获2022年度中国实验动物学会青年科学家奖。发表论文20余篇,参与制定2项云南省地方标准,获国家专利16项,参编专著3部。现任《实验动物与比较医学》和《实验动物科学》编委,《中国实验动物学报》和《中国比较医学杂志》通信编委,全国研究生教育评估监测专家库成员,国家自然科学基金委网络评议人。

登革病毒对树鼩不同组织来源细胞的易感性及感染特性研究

刘欣¹, 杞梦迪¹, 王文广¹, 罕园园¹, 陆美丽^{1,2}, 李娜¹, 代解杰¹, 陆彩霞¹

(1. 北京协和医学院/中国医学科学院医学生物学研究所, 昆明 650118; 2. 云南大学生命科学学院, 昆明 650500)

[摘要] **目的** 探究登革病毒(dengue virus, DENV)对树鼩不同组织来源细胞的易感性及感染特征,为扩充DENV的树鼩易感细胞库提供依据。**方法** 将DENV以感染复数(multiplicity of infection, MOI)为0.02的剂量分别接种于树鼩皮肤成纤维细胞(tree shrew skin fibroblasts, TSFs)、原代树鼩肾上皮细胞(primary tree shrew renal epithelial cells, pTRECs)、树鼩主动脉内皮细胞(tree shrew aortic endothelial cells, TAECs)、树鼩主动脉平滑肌细胞(tree shrew aortic smooth muscle cells, TSMCs)、树鼩肝细胞(tree shrew hepatocytes, THs)、树鼩角膜基质细胞(tree shrew corneal stromal cells, TCSCs)、树鼩脑微血管内皮细胞(tree shrew brain microvascular endothelial cells, TBMECs)及树鼩视网膜微血管内皮细胞(tree shrew retinal microvascular endothelial cells, TRMECs),用常规培养DENV的C6/36、Vero、A549及BHK-21细胞系作为阳性对照。在感染病毒后6 d内,每12 h用倒置显微镜观察各种细胞的病变效应,用实时荧光定量PCR检测细胞培养物中病毒核酸载量,绘制病毒增殖曲线,用噬斑实验检测病毒滴度。**结果** 除TRMECs外,DENV对7种树鼩细胞均易感。随着感

[基金项目] 云南省科技计划项目“云南省眼科疾病防治研究重点实验室”(2017DG008);昆明市科技创新团队“树鼩细胞资源库建立及病毒性动物模型研究创新团队”(2019-1-R-24483)

[第一作者] 刘欣(1999—),女,硕士研究生,研究方向:人类疾病动物模型建立及机制研究。E-mail:livxin@student.pumc.edu.cn

[通信作者] 代解杰(1961—),男,研究员,博士生导师,研究方向:人类疾病动物模型建立与比较医学。E-mail:djj@imbcams.com.cn。ORCID: 0000-0002-4242-9089;

陆彩霞(1979—),女,博士,主任技师,硕士生导师,研究方向:人类疾病动物模型建立。E-mail:lcx@imbcams.com.cn。ORCID: 0000-0001-7186-7451

染时间的延长, 7种树鼩细胞均出现变圆、脱落、坏死及裂解等明显的病变效应。在pTREC_s、TBMEC_s、TASMC_s、TAEC_s和TH_s这5种树鼩细胞的培养裂解物中检测到的病毒核酸载量与4种阳性对照细胞接近, 大于 4×10^7 拷贝/ μ L。以上5种树鼩细胞均能产生感染性子代病毒, 其中3种树鼩细胞TAEC_s (3.13×10^5 PFU/mL)、TH_s (2.03×10^5 PFU/mL)、pTREC_s (1.58×10^5 PFU/mL) 中的DENV滴度较接近阳性对照细胞C6/36 (3.85×10^5 PFU/mL), 且能更早收获病毒。**结论** DENV对树鼩多种组织来源的细胞易感, 且病毒增殖速度快于常见其他物种来源的传代细胞系, 其中TAEC_s、TH_s和pTREC_s尤其适于DENV增殖培养。同时, 这些细胞可能参与DENV在树鼩体内的感染。

[关键词] 树鼩细胞; 登革病毒; 细胞病变效应; 病毒增殖曲线; 病毒感染

[中图分类号] Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2025)02-0229-10



Study on Susceptibility and Infection Characteristics of Dengue Virus in Cells Sourced from Different Tissues of Tree Shrews

LIU Xin¹, QI Mengdi¹, WANG Wenguang¹, HAN Yuanyuan¹, LU Meili^{1,2}, LI Na¹, DAI Jiejie¹, LU Caixia¹

(1. Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Kunming 650118, China; 2. School of Life Sciences, Yunnan University, Kunming 650500, China)

Correspondence to: DAI Jiejie (ORCID: 0000-0002-4242-9089), E-mail: dj@imbcams.com.cn;

LU Caixia (ORCID: 0000-0001-7186-7451), E-mail: lcx@imbcams.com.cn

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the susceptibility and infection characteristics of dengue virus (DENV) in cells derived from diverse tissues of tree shrews and to provide a basis for expanding the repertoire of DENV-permissive cell models in this species. **Methods** DENV was inoculated at a multiplicity of infection (MOI) of 0.02 into tree shrew skin fibroblasts (TSFs), primary tree shrew renal epithelial cells (pTREC_s), tree shrew aortic endothelial cells (TAEC_s), tree shrew aortic smooth muscle cells (TASMC_s), tree shrew hepatocytes (TH_s), tree shrew corneal stromal cells (TCSC_s), tree shrew brain microvascular endothelial cells (TBMEC_s), and tree shrew retinal microvascular endothelial cells (TRMEC_s). C6/36, Vero, A549, and BHK-21 cells (commonly used for DENV propagation) were used as positive controls. Over 6 days post-infection, cellular cytopathic effects were monitored at 12-hour intervals using an inverted microscope, viral RNA loads in cell lysates were quantified by real-time fluorescent quantitative PCR to generate proliferation curves, and viral titers were determined by plaque assay. **Results** Seven types of tree shrew cells, except TRMEC_s, were susceptible to DENV. Prolonged infection induced pronounced cytopathic effects, including cell rounding, detachment, necrosis, and lysis, across all susceptible cells. The viral RNA loads detected in lysates of pTREC_s, TBMEC_s, TASMC_s, TAEC_s and TH_s, approached those of positive controls ($\geq 4 \times 10^7$ copies/ μ L). Infectious progeny viruses were produced by these five cell types, with three (TAEC_s, 3.13×10^5 PFU/mL; TH_s, 2.03×10^5 PFU/mL; pTREC_s, 1.58×10^5 PFU/mL) exhibiting titers comparable to C6/36 (3.85×10^5 PFU/mL) and earlier viral harvests. **Conclusion** DENV exhibits broad susceptibility to tree shrew cells of multiple tissue origins, with proliferation rates surpassing those of conventional cell lines sourced from other species. TAEC_s, TH_s, and pTREC_s are particularly suitable for large-scale DENV proliferation, suggesting their potential involvement in in vivo infection.

[Key words] Tree shrew cells; Dengue virus; Cytopathic effect; Viral proliferation curves; Viral infection

登革病毒 (dengue virus, DENV) 是黄病毒科、黄病毒属的一种单股正链RNA病毒, 主要有4种血清型, 均可通过伊蚊 (埃及伊蚊和白纹伊蚊) 叮咬传播给人类, 并在人类和蚊子之间循环, 部分非人灵长类动物作为储存宿主也可参与传播^[1]。近几十年来, DENV

感染所引起的一系列疾病的发生率激增, 从2000年的50.54万例增加到2024年报告的超760万例 (截至2024年4月30日), 给全球公共卫生系统造成了重大疾病负担^[2], 但目前尚无有效的疫苗和药物^[3]。由于缺乏与人类感染DENV相似的动物模型, 严重阻碍了其疾病

机制、疫苗与药物的研究开发工作^[4-5]。

目前用于DENV体外研究的细胞模型有非洲绿猴肾细胞Vero、叙利亚仓鼠肾细胞BHK-21、幼蚊细胞C6/36、人非小细胞肺癌细胞A549及人脐静脉内皮细胞HUVEC等，它们对DENV有较高的敏感性^[6-8]。然而，DENV在C6/36细胞中的复制动力学及细胞免疫应答特征可能与人体生理反应有所不同^[9]；DENV在Vero、BHK-21细胞中连续传代会出现毒力减弱的情况^[8-10]。此外，Vero细胞存在I型干扰素（type I interferons, IFN-I）分泌缺陷^[11]，该细胞用于DENV机制研究可能导致结果出现偏差。由于常用细胞系存在一定不足，需要筛选更多易感细胞系，为不同的研究目的提供更多选择。已有研究结果证实，从树鼯不同组织分离的多种细胞可用于病毒感染研究。例如，Zhao等^[12]证实，原代树鼯肝细胞易受丙型肝炎病毒感染；Zhang等^[13]发现，树鼯肾、肺、肝、皮肤和主动脉的原代细胞易受寨卡病毒感染，并诱导原代皮肤和原代胸主动脉细胞产生先天性抗病毒反应；Kayesh等^[14]发现，树鼯肺成纤维细胞对4种血清型的DENV都具有易感性；丁相荣等^[15]发现，DENV在树鼯角膜基质细胞（tree shrew corneal stromal cells, TCSCs）上出现病变的时间早于Vero细胞。以上研究表明，树鼯细胞在DENV相关研究中具有较大潜力。然而，树鼯细胞系对DENV的易感性及感染特征数据十分匮乏。

本研究选择DENV入侵的主要靶器官（皮肤、血管、肝、肾等）^[16-17]来源的树鼯细胞和本实验室已开展研究的TCSCs^[15]为研究对象，并以常规培养用细胞系C6/36、Vero和BHK-21为阳性对照，探究8种树鼯细胞对DENV的易感性及感染特性，以期扩充DENV的易感细胞库，同时为后续体内实验提供参考。

1 材料与方法

1.1 细胞与病毒株

8种树鼯细胞系包括树鼯主动脉内皮细胞（tree shrew aortic endothelial cells, TAECs）、树鼯主动脉平滑肌细胞（tree shrew aortic smooth muscle cells, TASCs）、树鼯肝细胞（tree shrew hepatocytes, THs）、原代树鼯肾上皮细胞（primary tree shrew renal epithelial cells, pTREC）、树鼯皮肤成纤维细胞（tree shrew skin fibroblasts, TSFs）、TCSCs、树鼯脑微血管内皮细胞（tree shrew brain microvascular endothelial cells, TBMECs）、树鼯视网膜微血管内皮细胞（tree shrew retinal microvascular endothelial cells, TRMECs），

均由本实验室分离鉴定，稳定传代后保存。

4种阳性对照细胞系包括C6/36细胞（由中国医学科学院医学生物学研究所孙强明研究员惠赠，并由本实验室稳定传代后保存），以及A549细胞、Vero细胞和BHK-21细胞（均为本实验室传代保存）。

DENV II型43株（GenBank: AF204178），由清华大学程功实验室惠赠，由本实验室经C6/36扩增后保存。

1.2 主要试剂与仪器

DMEM/F-12（1:1）培养基（VivaCell, C3130-0500）和PBS（VivaCell, C3580-0500）为上海逍鹏生物科技有限公司产品；RPMI 1640培养基（C11875500 BT）、青霉素-链霉素溶液（Gibco, 15140-122）和胰蛋白酶（Gibco, 25200-056）为美国Thermo Fisher Scientific公司产品；胎牛血清（CellBox, CF-01P-02）为长沙赛尔博克斯生物科技有限公司产品；QIAamp®病毒RNA小提试剂盒（52906）为德国Qiagen公司产品；One Step Prime Script™ RT-PCR试剂盒（RR064A）为日本TaKaRa公司产品；低熔点琼脂糖（Biosharp, BS384）和结晶紫染色液（Solarbio, G1062）为北京杰兰柯科技有限公司产品；引物和探针由生工生物工程（上海）股份有限公司合成。

35 mm细胞培养皿（706001）为无锡耐思生命科技股份有限公司产品；细胞计数仪（TC20）为美国Thermo Fisher Scientific公司产品；定时定量PCR仪（BFX-950）为美国Bio-Rad公司产品；生物安全柜（1287）和恒温培养箱（CO2T/C）为美国FORMA公司产品；倒置荧光相差显微成像系统（ECLIPSE Ti-S）为日本Nikon公司产品。

1.3 实验室生物安全条件

依据《人间传染的病原微生物目录》（国卫科教发〔2023〕24号）和《病原微生物实验室生物安全管理条例》（2018年3月19日修订版），DENV体外研究所需生物安全实验室等级为BSL-2。本研究在中国医学科学院医学生物学研究所药物安全评价中心病原微生物安全实验室开展，实验室的生物安全备案证号为2024SW0025。

1.4 细胞培养及病毒接种

所有细胞复苏后接种于T25培养瓶。C6/36细胞使用RPMI 1640完全培养基（含10%胎牛血清、1%青霉素-链霉素），于5% CO₂、28℃培养箱培养；其他细胞使用DMEM/F-12（1:1）完全培养基（含10%胎牛血清、1%青霉素-链霉素），于5% CO₂、37℃培养。当细

胞生长至80%~90%时,接种于多个35 mm直径的细胞培养皿,过夜培养12 h以上。细胞汇合度约为60%~70%时,计数。弃去原培养液,用PBS洗一次。感染组加入500 μ L维持液(含2%胎牛血清、1%青霉素-链霉素的培养基),以感染复数(multiplicity of infection, MOI)为0.02的剂量分别将病毒液接种于感染组培养皿中,孵育2 h;所有树鼯细胞和阳性对照细胞设置未感染的阴性对照组,仅加入等体积维持液。弃去培养液, PBS洗一次,加入2 mL维持液(含2%胎牛血清、1%青霉素-链霉素的培养基),继续培养。

1.5 细胞病变观察

每隔12 h在倒置显微镜下观察感染组和对照组的细胞形态,拍照并记录细胞病变效应(cytopathic effect, CPE);同时取4份感染组培养皿,封口后移入-80 $^{\circ}$ C冰箱冻存。各组均观察至病变终点($\geq 95\%$ CPE)或未感染细胞老化死亡。未见CPE记为“-”;疑似CPE记为“ $\pm$ ”;0%~25% CPE记为“+”;26%~50% CPE记为“++”;51%~75% CPE记为“+++”;76%~100% CPE记为“++++”。

1.6 病毒增殖检测

将冻存的细胞培养皿于-80 $^{\circ}$ C冻融两次,使细胞充分裂解。将培养皿内所有液体,连同细胞碎片,一同移入离心管后,1 200 $\times$ g、4 $^{\circ}$ C离心10 min,收集上清液。用QIAamp[®]病毒RNA小提试剂盒提取病毒基因组RNA。用One Step Prime Script[™] RT-PCR试剂盒进行实时荧光定量PCR,检测病毒核酸载量。DENV C基因引物设计参考文献[18],正向引物(DENV-F)序列为:5'-AATTAGAGAGCAGATCTCTGATGAA-3',反向引物(DENV-R)序列为5'-AGCATTCCTCAAGTG-AGAATCTCTTTGT-3';探针(Probe)序列为5'-FAM-CTGTTGTACAGTCGACACGCGTTTCTC-BHQ1-3'。反应体系包括2 $\times$ 一步式RT-PCR反应液Ⅲ 10 μ L, TaKaRa Ex Taq HS聚合酶(5 U/ μ L)、PrimeScript RT酶混合液Ⅱ、正反向引物(10 μ mol/L)和探针各0.4 μ L, RNase Free ddH₂O 7 μ L,总RNA 1 μ L,反应条件:42 $^{\circ}$ C 5 min, 95 $^{\circ}$ C 10 s; 95 $^{\circ}$ C 5 s, 55 $^{\circ}$ C 20 s,循环40次。分别以感染后小时数(hours post infection, hpi)和起始模板量对数值(log₁₀ copies/ μ L)的平均值,绘制不同树鼯细胞中的病毒增殖曲线,并与阳性对照细胞进行比较。

1.7 病毒滴度测定

当细胞病变程度达到75%~80%时(即CPE刚达到最大),病毒的复制和释放达到相对较高的水平,此

时是收获病毒的适宜时间。根据1.6节中获得的病毒核酸载量检测结果,选择载量最高的前5种细胞用于DENV的培养。在各培养细胞病变达到75%~80%时收获病毒液,并采用噬斑实验测定不同细胞的病毒感染性滴度。步骤如下:用维持液(含2%胎牛血清、1%青霉素-链霉素的培养基)10倍梯度稀释病毒液(10^{-1} ~ 10^{-5}),接种于长成单层的Vero细胞,每个梯度接种2孔,对照孔加入不含病毒的维持液,置于细胞培养箱中孵育2 h;弃去孵育液, PBS洗涤;将2%低熔点琼脂糖和培养基(含4%胎牛血清、2%青霉素-链霉素)按1:1混合,待温度降至37 $^{\circ}$ C左右时将混合液覆盖于细胞孔上,继续培养7 d。待形成噬斑后,加入4%甲醛溶液固定1 h,用流水轻轻洗去覆盖物和甲醛,加入结晶紫染液后于室温孵育30 min,用水冲洗并晾干,计数噬斑形成单位(plaque forming unit, PFU)。根据公式计算滴度:病毒滴度(PFU/mL)=平均噬斑形成单位 $\times$ 稀释倍数/每孔接种体积(mL)。

1.8 数据统计分析

采用GraphPad Prism 8软件进行统计分析和制图。实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,对数据进行正态性检验,符合正态分布的两组间比较采用 t 检验,多组比较采用方差分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 DENV感染后7种树鼯细胞发生显著病变

在DENV接种后观察的6 d(144 h)内,所有细胞均出现光学显微镜下可分辨的细胞病变,出现CPE的时间见表1。TSFs产生可分辨病变的时间最早,为感染后24 h;4种树鼯细胞TAECs、TASMCs、THs、pTREC_s以及C6/36均于感染36 h出现病变;TCSC_s以及2种常用细胞BHK-21、A549于感染48 h出现病变;TBMECs和Vero于感染60 h出现病变;而树鼯细胞TRMECs的病变始终不明显。

5种树鼯细胞TAECs、TASMCs、THs、pTREC_s和TSFs于感染72~84 h时病变达到最大,早于阳性对照细胞BHK-21(96 h)、A549(132 h)、C6/36(144 h)和Vero(144 h);2种树鼯细胞TCSC_s和TBMECs于108 h时病变程度达到最大,早于阳性对照细胞A549、C6/36和Vero。

2.2 DENV感染后7种树鼯细胞形态变化

在倒置显微镜下,树鼯细胞TAECs、TASMCs、pTREC_s及TBMECs呈梭形或多角形,具有相似的CPE特征(图1);在病变中期(51%~75% CPE),部分细

表1 登革病毒感染不同细胞后的细胞病变效应变化

Table 1 Changes of cytopathic effect (CPE) in different cell types after dengue virus (DENV) infection

细胞 Cell	接种后时间/h Time post-infection/h											
	12	24	36	48	60	72	84	96	108	120	132	144
TAECs	-	-	+	++	+++	++++	++++	++++				
TASMCs	-	-	+	++	+++	++++	++++	++++				
THs	-	-	+	+	++	+++	++++	++++				
pTRECs	-	±	+	++	+++	++++	++++	++++				
TSFs	±	+	++	+++	+++	++++	++++	++++				
TCSCs	-	-	±	+	+	++	+++	+++	++++	++++		
TBMECs	-	-	-	±	+	++	+++	+++	++++	++++		
TRMECs	-	-	-	±	±	+	+	+	+	+		
Vero	-	-	-	±	+	+	+	+	++	++	+++	++++
BHK-21	-	-	-	+	++	+++	+++	++++	++++	++++	++++	
A549	-	-	±	+	+	++	++	+++	+++	+++	++++	++++
C6/36	-	-	+	+	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	++++

注：TSFs，树鼯皮肤成纤维细胞；pTRECs，原代树鼯肾上皮细胞；TAECs，树鼯主动脉内皮细胞；TASMCs，树鼯主动脉平滑肌细胞；THs 树鼯肝细胞；TCSCs，树鼯角膜基质细胞；TBMECs，树鼯脑微血管内皮细胞；TRMECs，树鼯视网膜微血管内皮细胞；C6/36、Vero、A549 及 BHK-21 细胞系作为阳性对照。未见 CPE 记为“-”；疑似 CPE 记为“±”；0%~25% CPE 记为“+”；26%~50% CPE 记为“++”；51%~75% CPE 记为“+++”；76%~100% CPE 记为“++++”。

Note: TSFs, tree shrew skin fibroblasts; pTRECs, primary tree shrew renal epithelial cells; TAECs, tree shrew aortic endothelial cells; TASMCs, tree shrew aortic smooth muscle cells; THs, tree shrew hepatocytes; TCSCs, tree shrew corneal stromal cells; TBMECs, tree shrew brain microvascular endothelial cells; TRMECs, tree shrew retinal microvascular endothelial cells; The C6/36, Vero, A549 and BHK-21 were used as positive control cells. CPE was graded as: -, no observable CPE; ±, suspected CPE; +, 0–25% CPE; ++, 26%–50% CPE; +++, 51%–75% CPE; +++, 76%–100% CPE.

胞变圆、脱落，导致胞间隙增大，细胞呈拉丝状，此后细胞快速大量脱落；在病变晚期（76%~100% CPE），少量仍贴壁的细胞呈细长梭形或不规则形，边缘粗糙、颗粒增多；TBMECs 同时出现空泡化，最后全部脱落。而另外4种树鼯细胞的CPE不明显：THs呈圆形或多边形，发生病变的细胞变圆、脱落，可见细胞碎片，最终细胞碎片和死细胞黏附在底部残留的细胞骨架上；TSFs呈梭形，病变细胞快速裂解，呈剧烈拉丝状，虽然未感染TSFs也出现了拉丝状，但感染组明显更加严重；TCSCs呈梭形至多角形，病变细胞裂解或变圆脱落，平皿底部残留细胞骨架。TRMECs被感染后出现拉丝状，但未感染的TRMECs也出现拉丝，虽然感染组相较于未感染对照组产生更多细胞脱落和拉丝现象，但对比不明显。

依照各种细胞的特点，DENV引起树鼯细胞发生的CPE类型可分为：①细胞变圆、脱落（见于本实验中所有细胞）；②细胞伸长、拉丝（见于TAECs、TASMCs、pTRECs、TBMECs和TSFs）；③细胞空泡化（见于TBMECs）；④细胞碎裂（见于THs和TCSCs）。以上结果表明，7种树鼯细胞感染DENV后产生了不同程度的CPE。

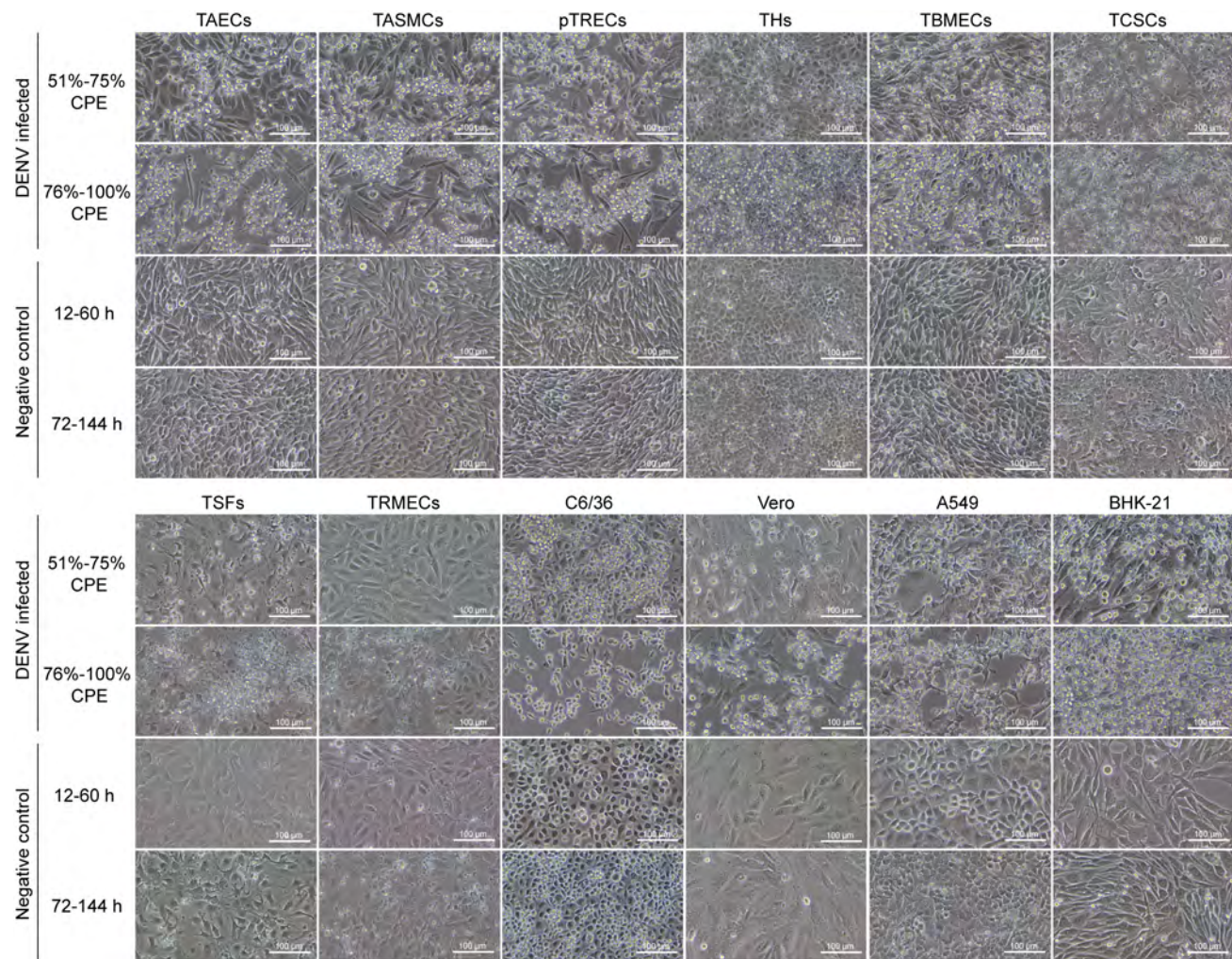
2.3 DENV感染后不同树鼯细胞的病毒载量

感染DENV后，每12 h采用实时荧光定量PCR法检测各种细胞培养物中的病毒载量，共4次。由图2可知，除TRMECs外，其他7种树鼯细胞对DENV均易感，而且在感染DENV后病毒载量呈先升后降的趋势，达到峰值后病毒载量水平能维持一段时间。

各种细胞感染后病毒载量达到峰值的时间见表2，树鼯细胞中pTRECs的病毒载量最高（ 9.18×10^7 拷贝/ μL ），最接近阳性对照细胞C6/36和Vero的病毒载量，其次为TBMECs（ 7.43×10^7 拷贝/ μL ）、TASMCs（ 7.27×10^7 拷贝/ μL ）、TAECs（ 6.87×10^7 拷贝/ μL ）和THs（ 4.08×10^7 拷贝/ μL ），这5种树鼯细胞的病毒拷贝数均高于 4×10^7 拷贝/ μL ，处于阳性对照细胞峰值载量最高值（Vero）和最低值（A549）之间。

2.4 不同树鼯细胞的DENV滴度

检测病毒感染性的噬斑实验结果见图3，噬斑区为不染色区域，斑块较大、轮廓较清晰，可用于噬斑计数。选择 10^{-4} 和 10^{-5} 这2个病毒液稀释度，每个稀释度设2个重复孔，即共4个孔进行计数，然后计算病毒滴度。5种树鼯细胞均可产生感染性子代病毒，其中TAECs中增殖的DENV滴度最高[$(3.13 \pm 0.61) \times 10^5$ PFU/



注：TAECs为树鼩主动脉内皮细胞；TSMCs为树鼩主动脉平滑肌细胞；pTREC为原代树鼩肾上皮细胞；THs为树鼩肝细胞；TBMECs为树鼩脑微血管内皮细胞；TCSCs为树鼩角膜基质细胞；TSFs为树鼩皮肤成纤维细胞；TRMECs为树鼩视网膜微血管内皮细胞；C6/36、Vero、A549及BHK-21作为阳性对照细胞。

Note: TAECs, tree shrew aortic endothelial cells; TSMCs, tree shrew aortic smooth muscle cells; pTREC, primary tree shrew renal epithelial cells; THs, tree shrew hepatocytes; TBMECs, tree shrew brain microvascular endothelial cells; TCSCs, tree shrew corneal stromal cells; TSFs, tree shrew skin fibroblasts; TRMECs, tree shrew retinal microvascular endothelial cells; The C6/36, Vero, A549 and BHK-21 cells were employed as positive controls.

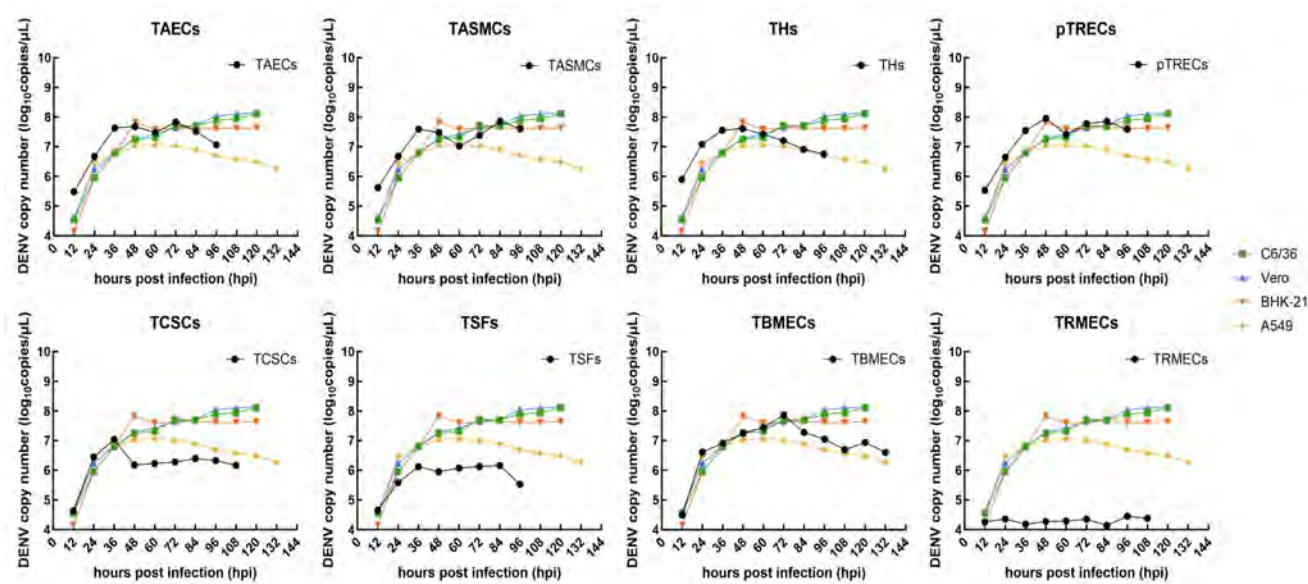
图1 倒置显微镜下不同来源的树鼩细胞和阳性对照细胞感染登革病毒前后的形态学变化(×200)
Figure 1 Morphological changes in tree shrew cells of different tissues and positive control cells before and after dengue virus (DENV) infection under inverted microscope (×200)

mL], 接近于阳性对照细胞 C6/36 [$(3.85\pm1.95)\times10^5$ PFU/mL]; 其次为 THs [$(2.03\pm0.68)\times10^5$ PFU/mL]、pTREC [$(1.58\pm0.66)\times10^5$ PFU/mL], 与阳性对照细胞 C6/36 相比明显降低 ($P<0.05$); TSMCs 中 DENV 滴度为 [$(1.03\pm0.05)\times10^5$ PFU/mL], TBMECs 中 DENV 滴度为 [$(0.29\pm0.14)\times10^5$ PFU/mL], 均显著低于阳性对照细胞 ($P<0.01$)。

3 讨论

已知 DENV 感染伊蚊后, 首先在肠道中进行复制,

进而被转运到唾液腺。在伊蚊叮咬人的过程中, 病毒通过唾液被接种到皮肤的真皮层(少量释放入血), 被皮下组织的单核细胞吞噬, 传播至单核-巨噬细胞系统, 病毒增殖后进入血液, 引起病毒血症; 随后病毒在组织的网状内皮系统和淋巴组织中增殖, 再次入血引起病毒血症^[19]。DENV 可通过多种途径引起复杂多样的临床症状。研究表明, DENV 与抗体形成的免疫复合物以及病毒 NS1 蛋白介导可引起血管通透性增加和凝血系统障碍, 从而导致多种组织器官的血浆渗漏、出血; 重症登革热可导致休克、肝损伤、肾损伤、神



注：TAECS，树鼩主动脉内皮细胞；TASMCS，树鼩主动脉平滑肌细胞；THs树鼩肝细胞；pTRECcs，原代树鼩肾上皮细胞；TSFs，树鼩皮肤成纤维细胞；TCSCcs，树鼩角膜基质细胞；TBMECS，树鼩脑微血管内皮细胞；TRMECS，树鼩视网膜微血管内皮细胞；C6/36、Vero、A549及BHK-21作为阳性对照细胞。

Note: TAECS, tree shrew aortic endothelial cells; TASMCS, tree shrew aortic smooth muscle cells; THs, tree shrew hepatocytes; pTRECcs, primary tree shrew renal epithelial cells; TSFs, tree shrew skin fibroblasts; TCSCcs, tree shrew corneal stromal cells; TBMECS, tree shrew brain microvascular endothelial cells; TRMECS, tree shrew retinal microvascular endothelial cells; The C6/36, Vero, A549 and BHK-21 cells were employed as positive controls.

图2 实时荧光定量PCR检测感染不同来源的树鼩细胞后登革病毒的增殖曲线
Figure 2 Viral proliferation curves of tree shrew cells of different tissues after dengue virus (DENV) infection via real-time fluorescent quatitative PCR

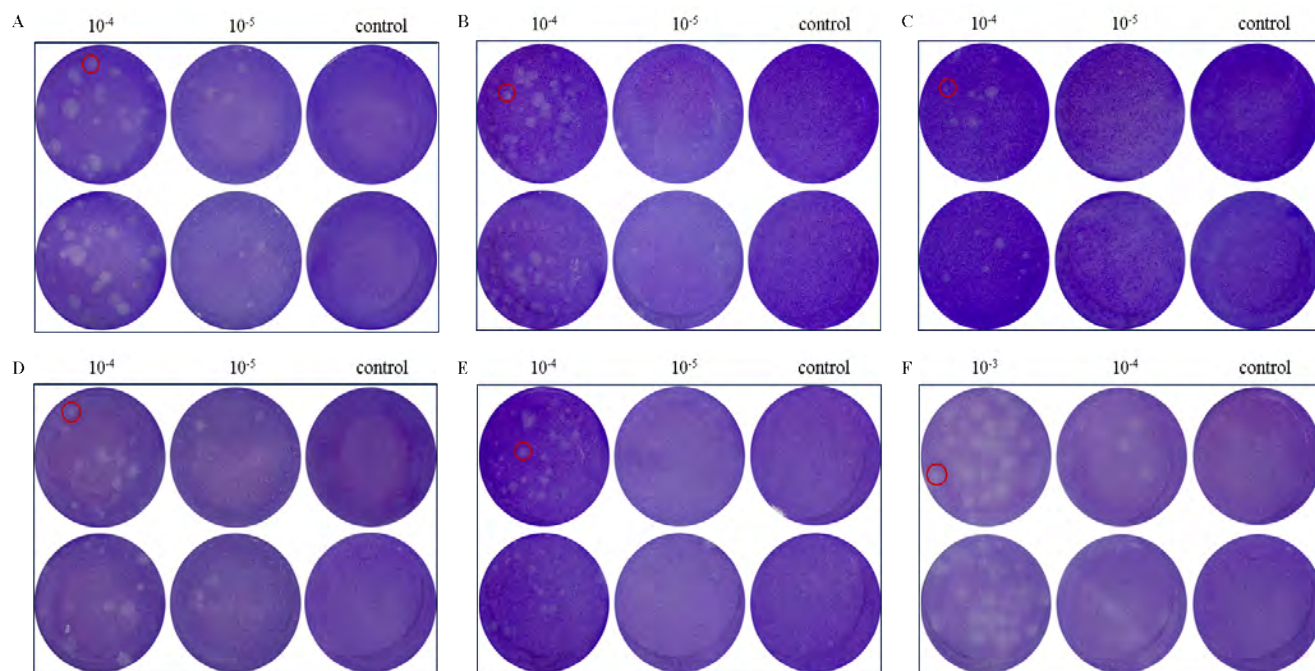
表2 各种细胞感染后病毒载量峰值及达到峰值的时间
Table 2 Peak viral load and time-to-peak in different cell types after dengue virus (DENV) infection

细胞 Cell	病毒载量峰值/(拷贝·μL ⁻¹) Peak viral load/ (copies·μL ⁻¹)	时间/h Time/ h
pTRECcs	(9.18±0.21)×10 ⁷	48
TBMECS	(7.43±0.75)×10 ⁷	72
TASMCS	(7.27±0.43)×10 ⁷	84
TAECS	(6.87±0.30)×10 ⁷	72
THs	(4.08±0.02)×10 ⁷	48
TCSCcs	(1.11±0.05)×10 ⁷	36
TSFs	(1.50±0.05)×10 ⁶	84
Vero	(1.39±0.22)×10 ⁸	120
C6/36	(1.28±0.21)×10 ⁸	120
BHK-21	(6.73±0.13)×10 ⁷	48
A549	(1.13±0.05)×10 ⁷	60

经系统并发症、眼病、横纹肌溶解等多个器官系统受累^[16,20]。然而，重症登革热的具体机制至今未完全阐明。现有研究认为，多种因素如细胞因子风暴、抗体依赖性增强效应、病毒变异等均参与了DENV的致病过程^[21-22]。

DENV感染易感细胞后引起细胞病变是构成感染的直接标志，同时细胞内的信号转导途径发生变化，从而导致了可从组织学、免疫组织化学、分子水平等各种方法检测的感染表征^[23]。这些表征是理解病毒与细胞互作机制的基础，也是体内实验的重要参考。据文献报告，常用于DENV体外研究的非洲绿猴肾细胞Vero对多种病毒易感是因为干扰素基因表达缺陷^[24]，虽然其获得了广谱病毒易感性，也可能由于无IFN-Ⅰ的环境而忽略了病毒在与宿主免疫系统互作时的某些关键适应机制，或放大了药物的有效性，因此限制了该细胞在某些病毒感染机制研究中的应用。另外两种常用的幼蚊细胞C6/36和叙利亚仓鼠肾细胞BHK-21因物种亲缘关系与人较远，在机制研究中不具有明显优势。因此，需要在与人类亲缘关系近的物种中寻找合适的细胞，以帮助研究者理解DENV感染、致病机制和跨物种传播风险。

细胞基质是病毒增殖的基础，其质量直接影响后续产品的质量和安全性。世界卫生组织（WHO）和我国家药品监督管理局对生产人用疫苗和其他生物制



注：A，C6/36细胞中DENV增殖所形成的斑块；B，TAECs中DENV增殖所形成的斑块；C，TSMCs中DENV增殖所形成的斑块；D，THs中DENV增殖所形成的斑块；E，pTREC中DENV增殖所形成的斑块；F，TBMECs中DENV增殖所形成的斑块。C6/36细胞作为阳性对照；红圈指示噬斑； 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 表示病毒液稀释倍数；control表示未感染病毒的对照孔。

Note: A, Plaques formed by DENV proliferating in C6/36 (positive control); B, Plaques formed in tree shrew aortic endothelial cells (TAECs); C, Plaques formed tree shrew aortic smooth muscle cells (TSMCs); D, Plaques formed in tree shrew hepatocytes (THs); E, Plaques formed by DENV proliferating in primary tree shrew renal epithelial cells (pTREC); F, Plaques in primary tree shrew brain microvascular endothelial cells (TBMECs). The C6/36 cells were employed as the positive control. Red circles demarcate individual plaques. Viral dilutions are indicated as 10^{-3} , 10^{-4} , and 10^{-5} . The "control" denotes uninfected wells, serving as a negative reference.

图3 噬斑实验测定不同树鼯细胞中登革病毒的病毒滴度

Figure 3 Quantification of dengue virus (DENV) titer in tree shrew cells of different tissues via plaque assay

品的细胞基质有着明确的要求^[11]。建立新的细胞基质是一项复杂的工作，目前认可并广泛使用的只有少数几种细胞，其中使用最多的Vero细胞被WHO推荐为可靠和安全的疫苗生产首选细胞系^[25-26]。然而，有研究表明，Vero细胞传代次数超过150代次时，可能具有潜在致癌风险和遗传不稳定性^[27]。由于现有细胞系尚不能满足所有标准需求，因此有必要评估和对比不同细胞系以开发新的细胞基质。

树鼯与人类遗传相似性高，是值得研究的对象之一。本研究发现多种树鼯细胞在体外感染DENV后可出现明显的CPE，在这些树鼯细胞上观察到的细胞病变现象也出现在感染DENV的人源细胞上。皮肤是DENV的重要靶器官，大多数皮肤损害在早期出现，表现为全身皮肤出现充血性皮疹或点状出血疹^[28]。体外感染的TSFs容许DENV的复制，在人源真皮成纤维细胞上也观察到了一致的结果^[29]，表明成纤维细胞可能是与DENV互作的细胞之一。

已报告的重症登革热患者中常伴有肝肾损伤，这

是导致死亡或长期影响的因素之一，可能由多种机制共同作用而引发^[30]。感染DENV后THs和pTREC表现出明显而快速的CPE，THs早期细胞脱落速度慢，晚期脱落明显加快，在人源肝细胞株HepG2和Hep3B细胞中也能观察到这一现象^[31]，提示可能存在相同的细胞死亡途径。

树鼯不同血管来源的内皮细胞TAECs、TBMECs、TRMECs感染DENV后表现各异，表明不同来源的内皮细胞可能由于存在异质性而对DENV具有不同易感性。登革热患者和尸检报告中大动脉相关的病变较罕见^[32]，然而主动脉来源的TAECs在3个血管内皮细胞中对病毒的容许性最高，病变最快；主动脉另一细胞成分TSMCs也显示高度敏感性，也有研究报告了人源脐动脉平滑肌细胞对DENV的容许性^[33]，提示需关注DENV感染患者主动脉的隐匿风险。TBMECs感染DENV后发生明显CPE，类似地，人BMECs感染DENV-3也引起病变^[34]，共同提示脑微血管内皮可能作为病毒入侵神经系统的途径。

DENV 感染可引起多种眼部症状, 包括视网膜出血、黄斑水肿和血管炎等^[35-36]。本研究中, TCSCs 感染 DENV 后引起该细胞病变和较高水平病毒复制, 提示病毒可能在体内直接感染角膜组织, 从而引起病变; DENV 在 TCSCs 中产生细胞病变的速度早于 Vero 细胞, 这与丁相荣等^[15]的研究结果一致。然而, 本研究发现, DENV 在 TRMECs 上似乎没有复制, 细胞病变水平也相对较低, 但病毒增殖情况也可能受细胞状态等多种因素的影响, 因此还需进一步探索。

综上, 本研究选择的 8 种树鼩细胞中, 有 7 种细胞 (TAECs、TASMCs、THs、pTRECcs、TSFs、TCSCs 和 TBMECs) 发生了可明确辨别的 CPE, 表现出差异的敏感性和不尽相同的病变特征, 且与相应的人源细胞和病例报告在某些方面相符合。同样地, 病毒增殖的分子水平检测结果也提示这 7 种树鼩细胞能够支持 DENV 复制和感染, 而且病毒拷贝数随感染时间而升高; 其中 5 种树鼩细胞 pTRECcs、TBMECs、TASMCs、TAECs 和 THs 与阳性对照细胞相当, 均能产生感染性子代病毒; 3 种树鼩细胞 TAECs、THs、pTRECcs 与阳性对照细胞 C6/36 的子代病毒滴度相当。本研究结果表明, 树鼩细胞具有作为 DENV 感染机制研究和抗病毒药物开发工具的潜力, 它们可能也是 DENV 在树鼩体内的感染位点。值得注意的是, 相较于常用的 Vero 和 BHK-21 细胞, 树鼩细胞生长速度更快, 对病毒感染更敏感, DENV 感染树鼩细胞后更早达到 75%~80% CPE (尤其是 TAECs、pTRECcs、THs), 且产生的病毒载量和滴度噬斑数达到了常用细胞系水平, 因此在病毒制备时能够兼顾病毒产量和生产效率。

综上所述, 本研究选择的 7 种树鼩细胞对 DENV 均具有易感性, 其中 pTRECcs、TAECs、THs 是发展为 DENV 病毒培养工具的潜力细胞。同时本研究提示, 这些树鼩细胞来源的体内组织器官可能是 DENV 感染的致病部位, 建议研究人员在整体动物造模时应关注这些组织器官。

[作者贡献 Author Contribution]

刘欣负责实验方法设计、结果可视化和初稿写作;
杞梦迪、王文广负责提供资源, 参与有效验证或监督指导;
罕园园负责监督指导、写作审编;
陆美丽、李娜参与有效验证或研究项目管理;
代解杰负责研究方案策划、方法设计、监督指导和论文修订;
陆彩霞负责获取项目资助和管理, 以及实验监督指导。

[利益声明 Declaration of Interest]

所有作者均声明本文不存在利益冲突。

[参考文献 References]

- [1] STABELL A C, MEYERSON N R, GULLBERG R C, et al. Dengue viruses cleave STING in humans but not in nonhuman primates, their presumed natural reservoir[J]. *eLife*, 2018, 7: e31919. DOI:10.7554/eLife.31919.
- [2] World Health Organization. Dengue-Global situation [EB/OL]. (2024-05-30) [2024-09-27]. <https://www.who.int/emergencies/disease-outbreak-news/item/2024-DON518>.
- [3] WILDER-SMITH A. Dengue vaccine development: challenges and prospects[J]. *Curr Opin Infect Dis*, 2022, 35(5): 390-396. DOI:10.1097/QCO.0000000000000871.
- [4] MALAVIGE G N, OGG G S. Molecular mechanisms in the pathogenesis of dengue infections[J]. *Trends Mol Med*, 2024, 30(5):484-498. DOI:10.1016/j.molmed.2024.03.006.
- [5] KAYESH M E H, TSUKIYAMA-KOHARA K. Mammalian animal models for dengue virus infection: a recent overview[J]. *Arch Virol*, 2022, 167(1):31-44. DOI:10.1007/s00705-021-05298-2.
- [6] CHIU H C, HANNEMANN H, HEESOM K J, et al. High-throughput quantitative proteomic analysis of dengue virus type 2 infected A549 cells[J]. *PLoS One*, 2014, 9(3): e93305. DOI:10.1371/journal.pone.0093305.
- [7] RIVERA J A, RENGIFO A C, SARMIENTO L, et al. Nuclei ultrastructural changes of C6/36 cells infected with virus dengue type 2[J]. *Biomedica*, 2018, 38(0):135-143. DOI:10.7705/biomedica.v38i0.3997.
- [8] 杨佳佳, 姜黎明, 罗佳, 等. 登革病毒感染 C6/36、Vero、BHK-21 和 THP-1 细胞 CPE 的比较及病毒检测[J]. *中国生物制品学杂志*, 2017, 30(4):362-365, 371. DOI: 10.13200/j.cnki.cjb.001705.
YANG J J, JIANG L M, LUO J, et al. CPE caused by dengue virus in C6/36, Vero, BHK-21 and THP 1 cells and virus test[J]. *Chin J Biol*, 2017, 30(4):362-365, 371. DOI: 10.13200/j.cnki.cjb.001705.
- [9] 林垚, 洪珊, 王晓丹, 等. III 型登革病毒在 C6/36 及 Vero 细胞中复制对其毒力的影响[J]. *中国生物制品学杂志*, 2019, 32(10):1070-1073, 1079. DOI: 10.13200/j.cnki.cjb.002826.
LIN Y, HONG S, WANG X D, et al. Effect of replication of dengue virus type III in C6/36 and Vero cells on virulence[J]. *Chin J Biol*, 2019, 32(10):1070-1073, 1079. DOI: 10.13200/j.cnki.cjb.002826.
- [10] LEE H C, YEN Y T, CHEN W Y, et al. Dengue type 4 live-attenuated vaccine viruses passaged in vero cells affect genetic stability and dengue-induced hemorrhaging in mice [J]. *PLoS One*, 2011, 6(10): e25800. DOI: 10.1371/journal.pone.0025800.
- [11] EMENY J M, MORGAN M J. Regulation of the interferon system: evidence that vero cells have a genetic defect in interferon production[J]. *J Gen Virol*, 1979, 43(1):247-252. DOI: 10.1099/0022-1317-43-1-247.
- [12] ZHAO X P, TANG Z Y, KLUMPP B, et al. Primary hepatocytes of Tupaia belangeri as a potential model for hepatitis C virus infection[J]. *J Clin Invest*, 2002, 109(2): 221-232. DOI:10.1172/JCI13011.
- [13] ZHANG L, SHEN Z L, FENG Y, et al. Infectivity of Zika virus on primary cells support tree shrew as animal model[J]. *Emerg Microbes Infect*, 2019, 8(1): 232-241. DOI: 10.1080/22221751.2018.1559707.
- [14] KAYESH M E H, KITAB B, SANADA T, et al. Susceptibility and

- initial immune response of *Tupaia belangeri* cells to dengue virus infection[J]. Infect Genet Evol, 2017, 51: 203-210. DOI: 10.1016/j.meegid.2017.04.003.
- [15] 丁相荣, 陈柳, 霍姝沛, 等. 树鼩角膜基质永生化细胞系的构建及其在病毒感染性方面的研究[J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(5): 610-619. DOI: 10.3969/j.issn.1005-4847.2024.05.008.
DING X R, CHEN L, HUO S R, et al. Construction of immortalized tree shrew corneal stromal cell line and investigation of viral infectivity[J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(5):610-619. DOI: 10.3969/j.issn.1005-4847.2024.05.008.
- [16] GUZMAN M G, GUBLER D J, IZQUIERDO A, et al. Dengue infection[J]. Nat Rev Dis Primers, 2016, 2:16055. DOI:10.1038/nrdp.2016.55.
- [17] HUIITS R, ANGELO K M, AMATYA B, et al. Clinical characteristics and outcomes among travelers with severe dengue: a GeoSentinel analysis[J]. Ann Intern Med, 2023, 176 (7):940-948. DOI:10.7326/M23-0721.
- [18] 孙爱娟. 登革1型病毒和登革2型病毒在C6/36细胞及白纹伊蚊体内共感染的研究[D]. 合肥: 安徽医科大学, 2018.
SUN A J. Research on co-infection of DENV-1 and DENV-2 in C6/36 cells and Aedes albopictus[D]. Hefei: Anhui Medical University, 2018.
- [19] HARAPAN H, MICHIE A, SASMONO R T, et al. Dengue: a minireview[J]. Viruses, 2020, 12(8): E829. DOI: 10.3390/v12080829.
- [20] 国家卫生健康委办公厅, 国家中医药局综合司. 关于印发麻疹等传染病诊疗方案(2024年版)的通知[EB/OL]. (2024-07-19)[2024-10-14]. https://www.gov.cn/zhengce/zhengceku/202407/content_6965110.htm.
General Office of the National Health Commission, Comprehensive Department of the National Administration of Traditional Chinese Medicine. Notice on issuing the diagnosis and treatment protocols for measles and other infectious diseases (2024 edition) [EB/OL]. (2024-07-19) [2024-10-14]. https://www.gov.cn/zhengce/zhengceku/202407/content_6965110.htm.
- [21] PANG X J, ZHANG R D, CHENG G. Progress towards understanding the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever[J]. Virol Sin, 2017, 32(1): 16-22. DOI: 10.1007/s12250-016-3855-9.
- [22] SHARP T M, ANDERSON K B, KATZELNICK L C, et al. Knowledge gaps in the epidemiology of severe dengue impede vaccine evaluation[J]. Lancet Infect Dis, 2022, 22(2): e42-e51. DOI:10.1016/S1473-3099(20)30871-9.
- [23] VIJAYAKRISHNAN S, JIU Y M, HARRIS J R. Virus infected cells (subcellular biochemistry book 106)[M]. Berlin: Springer, 2023:197-210.
- [24] KNEZEVIC I, STACEY G, PETRICCIANI J, et al. Evaluation of cell substrates for the production of biologicals: Revision of WHO recommendations. Report of the WHO Study Group on Cell Substrates for the Production of Biologicals, 22-23 April 2009, Bethesda, USA[J]. Biologicals, 2010, 38(1): 162-169. DOI: 10.1016/j.biologicals.2009.08.019.
- [25] 程尧, 程小玲, 申瓊琳, 等. 人用疫苗生产用细胞基质使用现状及研究进展[J]. 国际生物制品学杂志, 2023, 46(5):235-239. DOI: 10.3760/cma.j.cn311962-20221108-00078.
CHENG Y, CHENG X L, SHEN A L, et al. Current status and research progress of cell substrate for human vaccine production[J]. Int J Biol, 2023, 46(5): 235-239. DOI: 10.3760/cma.j.cn311962-20221108-00078.
- [26] AUBRIT F, PERUGI F, LÉON A, et al. Cell substrates for the production of viral vaccines[J]. Vaccine, 2015, 33(44): 5905-5912. DOI:10.1016/j.vaccine.2015.06.110.
- [27] 李爱灵, 王红燕, 张月兰, 等. Vero细胞传代过程中致瘤性的检测[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2011, 31(5):456-461. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-5101.2011.05.017.
LI A L, WANG H Y, ZHANG Y L, et al. Experimental investigation on tumorigenicity of Vero cell in the process of passage[J]. Chin J Microbiol Immunol, 2011, 31(5): 456-461. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-5101.2011.05.017.
- [28] BELOUKAS A. Dengue: Another viral infection with mucocutaneous manifestations[J]. J Eur Acad Dermatol Venereol, 2024, 38(1):15-16. DOI:10.1111/jdv.19589.
- [29] WEI K C, WEI W J, LIU Y S, et al. Assessment of prolonged dengue virus infection in dermal fibroblasts and hair-follicle dermal papilla cells[J]. Viruses, 2020, 12(3): 267. DOI:10.3390/v12030267.
- [30] PAGLIARI C, QUARESMA J S, DOS-SANTOS W C, et al. Mechanisms of programmed cell death associated to severe dengue in human renal lesions[J]. Microb Pathog, 2024, 194: 106794. DOI:10.1016/j.micpath.2024.106794.
- [31] THONGTAN T, PANYIM S, SMITH D R. Apoptosis in dengue virus infected liver cell lines HepG2 and Hep3B[J]. J Med Virol, 2004, 72(3):436-444. DOI:10.1002/jmv.20004.
- [32] DIELIS A W, SHADID S. A 66-year old woman with large vessel vasculitis after a dengue virus infection[J]. Brit J Diab Vasc Dis, 2013, 13(1):56-57. DOI:10.1177/1474651412475099.
- [33] ARIAS-ARIAS J L, VEGA-AGUILAR F, CORRALES-AGUILAR E, et al. Dengue virus infection of primary human smooth muscle cells[J]. Am J Trop Med Hyg, 2018, 99(6): 1451-1457. DOI:10.4269/ajtmh.18-0175.
- [34] 周旋. 登革3型病毒感染人脑微血管内皮细胞的机制研究[D]. 广州: 南方医科大学, 2014.
ZHOU X. Mechanism study of dengue virus type 3 infecting the human brain microvascular endothelial cells[D]. Guangzhou: Southern Medical University, 2014.
- [35] LUCENA-NETO F D, FALCÃO L F M, MORAES E C D S, et al. Dengue fever ophthalmic manifestations: a review and update[J]. Rev Med Virol, 2023, 33(2): e2422. DOI: 10.1002/rmv.2422.
- [36] NG A W, TEOH S C. Dengue eye disease[J]. Surv Ophthalmol, 2015, 60(2):106-114. DOI:10.1016/j.survophthal.2014.07.003.
- (收稿日期: 2024-12-03 修回日期: 2025-02-09)
(本文责任编辑: 张俊彦)
- [引用本文]**
刘欣, 杞梦迪, 王文广, 等. 登革病毒对树鼩不同组织来源细胞的易感性及感染特性研究[J]. 实验动物与比较医学, 2025, 45(2): 229-238. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.178.
LIU X, QI M D, WANG W G, et al. Study in susceptibility and infection characteristics of dengue virus in cells sourced from different tissues of tree shrews[J]. Lab Anim Comp Med, 2025, 45 (2): 229-238. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.178.



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



闵凡贵,研究员,国家执业兽医师。广东省生物技术研究院(广东省实验动物监测中心)监测二室部长,兼任本机构的IACUC主席和生物安全委员会副主任,以及佛山大学研究生兼职导师。同时受聘为CNAS兽医领域和实验动物机构认可领域评审员、广东省和广州市科技评审专家,入选CNKI知网评审专家库。长期致力于实验动物质量标准化、动物疾病模型构建及动物疾病快速诊断等研究工作,并聚焦于非人灵长类动物病原感染与免疫机制研究。先后主持完成省部级科技计划项目7项,起草实验动物质量控制和检测技术相关标准20余项,获得广东省科技进步二等奖1项、中国实验动物学会科技奖励二等奖和三等奖各1项、广东省五一劳动集体奖1项、广东省实验动物管理工作优秀团队奖1项,以第一作者或通信作者身份发表论文40多篇。

感染性动物实验的福利与伦理特殊要求

闵凡贵¹, 富宏坤², 刘永刚³, 刘香梅⁴, 刘忠华⁵, 李 焱⁶, 陶雨风²

(1. 广东省生物技术研究院, 广东省实验动物监测中心, 广州 510663; 2. 中国合格评定国家认可委员会, 北京 100062; 3. 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所, 哈尔滨 150001; 4. 广州质量监督检测研究院, 广州 511400; 5. 华南农业大学实验动物中心, 广州 510640; 6. 上海交通大学医学院实验动物科学部, 上海 200025)

[摘要] 感染性动物疾病模型是研究传染病传播方式、发病机制及抗感染药物不可或缺的重要工具。在感染性动物疾病模型制备及应用过程中不可避免会遇到动物疼痛、痛苦等违背动物福利伦理的情况。因涉及生物安全管理, 多数感染性动物实验仍以动物的死亡为实验终点, 这对动物福利与伦理的保障工作提出了极高的要求。针对感染性动物实验的福利与伦理指导原则或规范亟待建立。本文以实验动物福利与伦理的基本原则为依据, 探讨感染性动物实验中福利与伦理的特殊性, 强调感染性动物实验应充分考量研究计划的科学研究目的、人员职业健康安全和动物福利伦理三者之间的平衡。本文还通过文献研究以及与常规实验动物福利伦理要求的对比分析, 从人员要求、实验动物选择标准、生存环境管理及设施设备、特殊照料和兽医护理、人道终点等方面提出感染性动物实验对福利伦理的特殊要求。笔者认为, 开展感染性动物实验的人员应接受有效的生物安全培训, 机构应赋予实验动物使用与管理委员会(Institutional Animal Care and Use Committee, IACUC)、兽医和兽医技术人员足够权限, 以保障人员与动物福利伦理; 实验动物的选择需充分考虑研究目的、福利、伦理及生物安全等要求, 实验动物易感性和体型大小是高等级生物安全实验室重点关注的内容; 明确人道终点是感染性动物实验不可或缺的福利伦理要素, 环境丰富化和特殊护理是实现动物福利伦理必要的保障。本文内容可为相关工作提供参考。

[关键词] 感染性动物实验; 福利; 伦理; 人道终点

[中图分类号] Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2025)02-0239-08



Special Welfare and Ethical Requirements for Infectious Animal Experiments

[基金项目] 国家重点研发计划重点专项“实验动物共性关键质量评价技术标准研究”(2022YFF0711000)

[第一作者] 闵凡贵(1980—),男,硕士研究生,研究员,研究方向:实验动物科学。E-mail: minfangui@aliyun.com。ORCID: 0000-0002-8202-625X

[通信作者] 陶雨风(1970—),女,博士,高级工程师,研究方向:分子免疫学。E-mail: taoyf@cnas.org.cn。ORCID: 0000-0003-1925-1048

MIN Fangui¹, FU Hongkun², LIU Yonggang³, LIU Xiangmei⁴, LIU Zhonghua⁵, LI Yao⁶, TAO Yufeng²

(1. Guangdong Provincial Laboratory Animals Monitoring Center, Guangdong Provincial Biotechnology Research Institute, Guangzhou 510663, China; 2. China National Accreditation Service for Conformity Assessment, Beijing 100062, China; 3. Harbin Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150001, China; 4. Guangzhou Quality Supervision and Testing Institute, Guangzhou 511400, China; 5. Laboratory Animal Center of South China Agricultural University, Guangzhou 510640, China; 6. Department of Laboratory Animal Science, School of Medicine, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200025, China)

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

[ABSTRACT] Infectious disease animal models serve as indispensable tools for understanding the transmission patterns, pathogenesis, and anti-infective medicine. During the preparation and application of infectious animal disease models, situations inevitably arise that violate animal welfare and ethics, such as animal pain, suffering, and distress. Considering the biosafety factors, animal mortality is still used as the experimental endpoint in most experiments on infectious animals, which poses extremely high requirements for animal welfare and ethics. It is imperative to establish guiding principles or norms for the welfare and ethics of infectious animal experiments. Based on the fundamental principles of the welfare and ethics of experimental animals, this paper explores the special welfare and ethical requirements in infectious animal experiments. It emphasizes that infectious animal experiments should fully consider the balance among the scientific objectives of the research plan, animal welfare and ethics, and occupational health and safety of personnel. Based on literature research and comparative analysis of the welfare and ethical requirements of conventional animal experiments, special welfare and ethics requirements for infectious animal experiments are proposed, including personnel requirements, experimental animal selection standards, living environment management and equipment, special care and veterinary care, and humane endpoints. Personnel are required to undergo effective biosafety training, and sufficient authority should be granted to the Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC), veterinarians, and veterinary technicians to ensure the implementation of animal welfare and ethics practices. The selection of laboratory animals should fully consider the requirements of research objectives, welfare, ethics, and biosafety, with the susceptibility and body size of laboratory animals being the key concerns in high-level biosafety laboratories. It is also clarified that the humane endpoint is an indispensable element of welfare and ethics in infectious animal experiments. Environmental enrichment and special care are necessary guarantees for achieving animal welfare and ethics. Therefore, this study can serve as a reference for relevant work.

[Key words] Infectious animal experiment; Welfare; Ethics; Humane endpoints

随着实验动物科学的快速发展,实验动物福利与伦理理念已深入生物医学科技工作者心中。实验动物“五大自由”(5 freedoms)和“替代、减少、优化”(Replacement, Reduction, Refinement, 3Rs)原则及其内涵被充分解读并用于指导动物实验活动,基于此的研究成果被广泛认可。

作为研究传染病传播方式、发病机制及抗感染药物等方面的关键环节,感染性动物疾病模型受到高度重视。为获得最理想的动物疾病模型,不同种属的实验动物被用于模型筛查研究中^[1]。在感染性动物疾病模型的制备及应用过程中,要求动物饲养在负压屏障环境中,在接种病原体发病后,不可避免地会产生疼痛等不适症状。虽然这种不适可以通过镇痛药物来缓

解,但在部分实验过程中,动物接受治疗或镇痛等操作会影响实验关键数据的获取,并且通常以动物的死亡(通常采用安乐死)作为科学(实验)终点,这些情况均与常规实验动物福利和伦理理念相违背^[2]。同时,与常规动物实验相比,感染性动物实验除需要考量和平衡感染性动物实验科学研究目的、动物福利伦理需求外,还应考虑生物安全防护要求^[3],针对感染性动物实验福利与伦理的管理工作更加困难、复杂。因此,亟须建立动物福利伦理特殊要求的指导原则或规范。

1 感染性动物实验范围

动物实验是指利用实验动物或其他动物开展的科学研究、教学、检定以及其他实验,包括动物体内实

验、使用动物离体器官或组织开展体外实验,以及使用动物源类器官开展的相关实验。利用感染性材料开展的动物实验统称为感染性动物实验。感染性材料包括病原生物以及某些存在潜在生物危害的生物材料^[4],通常不包括益生菌及相关产品。

2 感染性动物实验的特殊考量

同常规动物实验一样,感染性动物实验需要考虑科研目的与动物福利伦理之间的平衡关系。感染性实验中使用的感染源以及在感染实验过程中产生的气溶胶及其他废弃物不仅可能会导致实验场所污染,还可能对操作人员造成潜在生物危害。因而,人员福利及职业健康也是感染性动物实验需要考量的重要因素^[3]。病原生物危害等级越高,对生物安全和职业健康安全提出的要求就越高。因此,若在科学研究目的、人员职业健康、动物福利伦理之间实现平衡,则该动物实验方案具备可行性(图1)。当实验设计不能实现科学研究目的,或实验使用的感染源在实验过程中缺乏有效的灭活途径和人员防护措施,或无法提供实现动物福利的方案时,感染性动物实验研究计划不宜被批准实施。



图1 感染性动物实验需考量的三要素

Figure 1 Three factors to consider in infectious animal experiments

2.1 科学研究目的考量

在拟定感染性动物实验研究计划前,首先需要明确研究目的,如开展病原发病机制研究、确定病原毒力、研究宿主易感性或病原耐药性等,以便于确认科学终点;其次,需要系统查阅文献资料,充实研究基础,做到立论依据充足;最后,还应充分了解选择的不同种属动物是否有配套试剂和专用检测设备,如单抗、检测试剂、限定在生物安全实验室范围内专用的Micro-CT等。如实验条件尚未成熟,则不宜开展相关动物实验^[4]。

2.2 人员职业健康考量

应制定详细的感染性动物实验风险评估报告。风险评估报告应涵盖感染源的相关生物学特性、生物危害等级要求、预防与治疗措施、实验活动风险,以及管理规范、生物安全等级达标的动物设施、相配套的生物安全设备和个体防护要求等内容,据此来评估机构所具备的现有条件及项目组成员的能力,以确认该机构是否胜任项目的开展;还应考虑到特殊人群(免疫力异常者、妊娠期女性等)不宜参与感染性动物实验。

2.3 动物福利伦理考量

由于感染实验设施的特殊性和感染引起的损伤等因素,动物会出现与“五大自由”不符的状态,甚至在实验中常以自然死亡为科学终点。为了达成科学研究目的,动物又必须承受这些痛苦和不适,因此在制定感染性动物实验方案时,要充分应用“3Rs”原则。当该动物实验不能采用体外实验或其他方法替代时,应充分考虑并满足动物福利伦理的要求。对于为获得科学研究目的无法缓解动物痛苦或以自然死亡为终点的实验,同时要制定合适的纳入和排除机制^[5],确保在动物福利受到影响的时候,能够采取有效的方式开展“人道干预终点”^[6]。Felgenhauer等^[7]在开展流感相关研究中很好地利用了人道干预终点,在动物体重减少超过30%,且出现严重呼吸困难、濒死时,及时对动物实施了安乐死。此外,还需探讨如何通过优化实验流程,或通过体外模拟和预实验,减少体内实验所需的动物数量。只有充分考量“3Rs”原则,将其进一步应用到实际方案设计中,才能够将感染性动物实验对动物福利的负面影响降至最低。

3 实验动物福利与伦理通用要求

实验动物福利的核心是保障动物的健康和快乐状态,是对动物权利的尊重^[8];实验动物伦理的核心是对动物的人道主义关怀,确认动物在道德层面的应有地位^[9]。2006年,科技部首次颁布了中国关于实验动物福利伦理的文件《关于善待实验动物的指导性意见》^[10]。这份文件具有行政指令性,为后期陆续制定的关于实验动物福利伦理管理的国家、行业及地方标准奠定了坚实的基础^[11]。世界范围内,动物福利“五大自由”和实验动物“3Rs”原则已被广泛认同。

3.1 五大自由

“五大自由”即不受饥渴的自由(生理福利)、生

活舒适的自由（环境福利）、不受痛苦伤害和疾病折磨的自由（卫生福利）、表达天性的自由（行为福利）、无恐惧和悲伤的自由（心理福利）。其基本出发点是让动物在健康和快乐（well-being）的状态下生存，或在无痛苦的状态下快速死亡，在极端保护动物与极端利用动物之间找到平衡点。

3.2 “3Rs”原则

“3Rs”原则在获得了广泛认可的同时，也在不断发展。近年来，在“3Rs”基础上诞生了第四个“R”，目前对此尚未形成统一认识，多归结为对无结果实验动物使用计划的“拒绝（refusal, R）”或对实现实验动物价值及保障动物实验科学性的“责任（responsibility, R）”。无论是“3Rs”或“4Rs”，都是为了在不损害科学利益的前提下，最大程度地减少对实验动物的伤害。如何在感染性动物实验过程中利用“3Rs”原则指导实验，是目前从事感染性动物实验的科研人员面临的主要问题。由于感染性实验会给动物造成不可避免的痛苦和不适，因此，科研人员需充分考虑采用体外实验（细胞、类器官）等“替代”方法来实现“科学研究目的”。“减少”即减少动物用量，需要通过预实验或其他实验结果的推理，科学地计算出能达到“科学研究目的”前提的最少动物用量。在计算过程中，还应考虑到因感染性实验中动物死亡带来的“减员”现象等因素，这些因素的推理和计算都需要充分研判预实验的结果。“优化”即提升现有的实验条件或技术方法，在缓解动物福利压力的同时，能够实现动物实验结果的高效产出。在结合“3Rs”原则规范实验设计、实施、报告等整个动物实验研究过程方面，建议使用 ARRIVE 2.0 指南以及该指南所涉及的 Experimental Design Assistant (EDA) 实验设计平台 (<https://eda.nc3rs.org.uk/>)^[12]。

4 感染性动物实验的特殊福利伦理要求

研究表明，要确保动物福利体系的一致性，不同的动物福利会影响感染性动物实验结果^[4,13]。因此，实验过程中动物福利伦理的实施与评估尤为重要，需特殊考量与福利伦理相关的因素^[14]。与常规动物实验相比，感染性动物实验在人员、实验动物、生存环境、饲养管理和人道终点等方面提出了更高的要求（表1）。

4.1 人员要求

从事感染性动物实验的人员除了对专业素质、科学理念、技术操作等因素提出较高要求外，还应接受

全面的职业健康和生物安全培训，熟悉实验动物福利的评估要求，清楚实验活动中的风险及应采用的防护措施。此外，应配置专职兽医。兽医应参与制定研究方案及实验活动的全过程，并能对涉及动物福利的情况作出准确预判。管理层赋予实验动物使用与管理委员会（Institutional Animal Care and Use Committee, IACUC）、兽医和兽医技术人员权限处理有特殊福利与伦理需求的动物，如采取安乐死措施。在感染性动物实验开展过程中，IACUC、兽医以及机构负责人之间的沟通显得格外重要。机构应对感染性动物实验提供足够的资源进行支持，以确保实验顺利、安全地实施，避免发生生物安全事件。同时，IACUC应充分对感染性动物实验的研究计划进行科学判断，讨论其必要性和科学性，在以能够解释科学问题为目标的基础上批准相关研究计划。兽医人员需对即将开展和已经开展的感染性动物实验行使监督权利，若出现与动物福利相违背的事件，应第一时间与研究小组进行沟通，并处置动物，以确保动物福利的有效落实。

4.2 实验动物选择标准

4.2.1 依据研究目的

单一的动物疾病模型很难同时模拟人类疾病临床症状、疾病进展、病理生理变化及免疫学反应等疾病特征，深入研究一种疾病往往要建立多个种属的动物模型。因此，研究重点不同，选择的动物模型也不同。首先要根据研究目的去选择实验动物，如研究流感的免疫机制可以选择小鼠，而建立高度模拟人类流感症状的理想流感动物模型，则要选择雪貂和非人灵长类动物^[15-16]。

4.2.2 依据福利、伦理及生物安全要求

由于涉及生物安全管理，感染性动物实验在动物选择方面要求更加严格，首选条件是动物的易感性。首先，应选择易感动物，且等级越高、标准化程度越高越好，如选择无菌动物或悉生动物可以更好地获得预期结果。在确保能达到研究目的的前提下，优先选择进化程度较低的动物^[17]。其次，选用的动物数量必须符合统计学要求，尽量做到数量最少化。此外，由于同一种实验动物存在个体差异，还应高度重视个体的选择：（1）年龄。一般均选用成年动物来进行实验，但是对于病毒分离相关研究则优先选择幼龄期动物。（2）性别。在实验研究中，应根据多方面因素来选择动物的性别，如应考虑雌激素的保护作用、雄性动物的不相容性等因素。（3）生理状态。选用状态良好的实验动物，不宜采用处于妊娠、哺乳期的雌性动物。

表1 常规动物实验和感染性动物实验福利要求比较

Table 1 Comparison of welfare requirements for conventional animal experiments and infectious animal experiments

福利因素 Welfare factors	常规动物实验 Conventional animal experiments	感染性动物实验 Infectious animal experiments	
		ABSL-2 实验室 ABSL-2 laboratory	ABSL-3/4 实验室 ABSL-3/4 laboratory
人员 Personnel	具备实验动物从业人员上岗资质或经过专业培训	除满足实验动物从业人员基本需求外,还应接受生物安全相关培训并通过考核	除满足 ABSL-2 实验室人员要求外,必要时,实验开展前留存本底血清
实验动物 Laboratory animal	遵循“3Rs”原则	除满足“3Rs”原则外,动物易感性是核心要求,关注动物体型大小	除满足“3Rs”原则外,动物易感性是核心要求,动物体型越小、数量越少越好
生存环境 Living environment	普通环境、屏障环境(正压),笼器具空间尺寸满足《实验动物 环境及设施》(GB 14925—2023)要求	负压屏障环境,笼器具空间尺寸满足《实验动物 环境及设施》(GB 14925—2023)要求	负压屏障环境,使用生物安全型笼具,笼器具空间尺寸满足《实验动物 环境及设施》(GB 14925—2023)要求
社会化管理 Social management	动物以群居为主	啮齿类动物群居为主,大动物单笼饲养为主	啮齿类动物群居为主,大动物单笼饲养
采食与饮水 Food and water	自由采食和饮水	必要时辅助饮食和特殊照顾	必要时辅助饮食和特殊照顾
交叉污染控制 Cross contamination control	同一实验间可以多项目兼容	采取有效的隔离措施,同一实验间可以多项目兼容,但应按病原特性分类管理	同一实验间只能从事一种病原感染实验
兽医护理 Veterinary care	正常兽医护理	特殊兽医护理	特殊兽医护理
人道终点 Humane endpoint	必要时设置人道终点	出于生物安全风险控制要求,必须设置人道终点	必须设置人道终点
实验终点 Experimental endpoint	动物可以存活和重复利用	动物死亡	动物死亡

4.2.3 依据其他因素

在建立感染性疾病动物模型过程中,实验病原种类不同、病原接种途径不同、采集的样本量不一致,都会影响到实验动物种属和体型大小的选择。因此,应充分考虑各种可能的因素,尽量降低实验动物不适合的风险。对于新型的模式动物,还应充分考虑是否有特异性的试剂与耗材。

4.3 生存环境管理及设施设备

感染性动物实验应在负压屏障环境设施内开展,同时设施符合生物安全实验室的相关标准要求^[18]。实验动物笼器具应无毒无害,表面光滑无倒刺;饲养空间和饲养方式满足动物需求。由于动物生存微环境为负压,与生产繁育设施差异大,新进动物的适应性饲养观察时间(检疫)可能会延长,基础生理生化指标稳定需要更长的周期。

环境丰富化是保障动物福利的重要途径,但是动物感染病原后,通常会出现活动减少甚至嗜睡的症状。在这种情况下,环境丰富措施不宜过度,以免影响动物的活动。啮齿类动物感染后通常伴有体温的损失,非人灵长类动物的体温则会升高。面对这种情况,应

当采取必要的措施维持实验动物的体温相对稳定^[19]。

此外,群居环境可以充分实现动物社会化,减少不必要的伤害;还能避免攻击性压力诱导的炎症细胞活动,上述效应使得实验动物社会化群体管理受到广泛重视。但是,实验动物仍存在“弱肉强食”的自然属性,例如群居动物会以体弱或濒死的动物为食。因此,在实验动物疾病快速进展阶段,应增加观察实验动物的频次,及时隔离体弱动物,或必要时单独饲养动物。非人灵长类和犬等大型实验动物通常需要单笼饲养,对动物实验的开展提出极高福利要求,需要研究者充分平衡动物福利与研究目的^[20],除了提供包括玩具、镜子在内的福利措施外,尽量在感染前延长训练时间,让动物具备更好的自理能力后再进行感染性实验^[21-23]。

在交叉污染控制方面,感染性动物实验室有很高的要求。尽管 ABSL-2 实验室在采取有效的隔离措施时,同一实验间可以兼容多个项目,但仍建议按病原的特性进行分类管理,例如消化道传播的病原和空气传播的病原应相对分开。ABSL-3/4 实验室则应严格按照实验室认可适用范围和审批要求,执行单房间单病

原管理。

4.4 特殊照料和兽医护理

对于行动困难、食欲低下及其他需要特殊关照的动物，应当采取必要的特殊照料或辅助饮食的措施，采取的措施应获得本机构IACUC和项目负责人的批准。这类措施应有助于满足动物的基本生理和心理需求，包括提高环境温度、改变食物性状、提供高营养和适口性强的食物、优化垫料或做巢材料等。

动物感染疾病后的疾病进展、反复保定和损伤性采样等都会加重动物的痛苦和伤害。因此，实验设计中应充分考虑药物干预或特殊医学护理的必要性。药物治疗或特殊兽医护理对实验结果的影响应该有文献、预实验结果或其他技术资料的支持，否则不能简单地因为“可能会影响实验结果”而拒绝采取减少疼痛和痛苦的兽医护理措施。例如，吗啡能加速沙门菌感染小鼠模型的疾病进展，并增强沙门氏菌在小鼠中的传播性，影响小鼠存活率和平均生存时间，在沙门菌感染动物疾病模型研究中需慎用^[24]；而布洛芬可以有效缓解小鼠疼痛而不影响弓形虫感染的疾病进展，值得在弓形虫体内感染研究中推广^[25]；药效学评价中增加治疗或药物干预更能模拟人类患者的疾病进展^[4]。

是否采取特殊兽医护理需要充分考虑以下5项因素：干预措施对病程进展是否有影响，感染导致的脱水、无法正常采食等对潜在治疗方法或慢性病是否有影响，采取药物干预或支持性护理的动物感染模型可能更好地模拟现实中患者的体况，动物所经历的预期疼痛或痛苦程度是否会显著改变其免疫反应，动物感染模型承受的痛苦和伤害在人类疾病患者身上基本不会发生。

4.5 人道终点

人道终点是人为采取措施减轻、最小化或终止实验动物的疼痛或痛苦的时机，通常早于实验终点；人道终点不是单纯的安乐死，也包括为了减轻或缓解动物的疼痛或痛苦而实施的有效措施，如治疗手段或终止实验操作，通过人道终点的实验动物仍然可以存活。加拿大实验动物管理委员会针对人道终点确立并制定了《动物科学终点、人道干预点和累积终点确定指南》^[6,26-27]，该指南对动物实验的科学终点、人道干预点、累积终点的确定、实施和监督进行了阐述和分析，具有很好的借鉴作用。

感染性动物实验的疾病进展会给动物带来持续的福利问题。因此，每个实验方案均应建立针对特定病原感染的人道终点评价体系。通常不同病原对应的人道终点不同，不能一概而论。感染性动物实验人道终点的评价

体系主要基于动物的状态和行为，包括但不限于以下5项指标^[2,4,28]：(1) 体重变化。表现为体重快速下降（如下降10%~20%）、动物完全不摄食或摄食明显减少、未监测到体重变化但出现恶病质等情形。(2) 体温变化。体温显著降低，通常低于34℃^[29]，触之冰冷。(3) 体征变化。全身性脱毛或被毛粗乱，持续性倦怠伴随蜷缩、弓背、目光呆滞、嗜睡或持续躺卧等。(4) 生理指标。动物在感染过程中，机体功能和代谢发生不可逆的损伤，严重影响动物健康的情形，如炎症因子风暴的诱发。(5) 异常行为。包括活动性下降、警觉性下降、刻板行为、自残、焦躁不安等。

5 感染性动物实验福利与伦理的实施管理

由于感染性动物实验涉及生物安全管理，所有动物实验方案均应先提交机构生物安全委员会进行审查，通过审查后再提交IACUC进行福利与伦理审查。

动物福利与伦理工作应进行闭环管理。动物实验活动开始之前，确定好动物福利伦理措施；动物实验活动开展过程中做好日常监督；动物实验活动实施完成后，应审查福利与伦理措施的有效性；IACUC与兽医应全程参加动物福利与伦理的管理工作^[30]。

研究人员提交的感染性动物实验方案应有平衡科研目的与动物福利伦理的说明；明确潜在的动物福利伦理问题及必要的干预措施；提供实验终点和人道终点，尽可能避免以动物死亡作为实验终点^[3]。研究人员、兽医师、护理人员和IACUC应熟悉人道终点评价体系，并能客观地评价人道终点。

当生物安全风险控制与动物福利伦理要求相冲突时，应遵循“风险优先与最小伤害平衡原则”。在法定框架下，生物安全是国家安全的重要组成部分，强调的是防范和应对生物风险，保障人民生命健康和国家安全。因此，研究人员首先需要严格执行《生物安全法》关于病原体管理和实验室生物安全的规定，同时遵守《科技伦理审查办法（试行）》（国科发监〔2023〕167号）对实验动物使用的伦理审查要求，通过优化实验设计、改进操作流程等方式，将动物福利损害降至最低，例如采用“仁慈终点”操作及时终止动物痛苦。在IACUC进行福利与伦理审查时，需重点关注研究的必要性和研究人员是否明确了感染性动物实验中两者的平衡点。生物安全和动物福利伦理并不是完全对立的概念，通过科学管理和伦理审查，既能有效保障实验动物的使用符合科学研究的需要，又能确保实验动物在使用过程中不受虐待和被过度使用。

6 总结和展望

实验动物是“活的度量衡”，是生命科学研究中的“人类替难者”，有权利享受福利保障和伦理关怀。动物福利和伦理不是极端的动物保护，它代表的是科学研究与动物福利伦理之间的利益平衡。动物福利应贯穿于实验动物的饲养管理、运输、检验检疫、实验设计、实验操作等各个环节^[31-32]。

感染性动物实验不可避免地会导致动物持续产生疼痛、痛苦和悲伤，这对动物福利和伦理提出了极高的要求。如何有效平衡科研目的与动物福利伦理及生物安全的关系，是研究人员需要深入设计规划、IACUC 审查与监督的核心内容。感染性动物实验中的人道终点至关重要，需充分利用“科学终点”、“人道干预终点”以及“累计终点”来确保动物的福利的实施：将动物生存率作为病原致病性研究、评价疫苗或药物的关键指标，动物死亡仅作为实验终点；目前已建立人道终点指标的感染性实验，如流感病毒研究，不得以实验动物自然死亡为评价指标；对于目前仍然以动物自然死亡作为科学终点的研究，应该思考如何减轻动物痛苦，或在动物濒死时立即终止实验的情况下如何达到研究目的。因此，动物实验相关人员均应接受人道终点评价体系培训，客观地评价人道终点。

实验动物福利落实在人，包括科研人员、IACUC 成员、兽医、实验操作人员及饲养人员。各个环节的人员都应秉承科学精神，心怀仁义道德，对实验动物负责，善待实验动物生命，维护实验动物福利伦理。实验动物的福利问题关系到科学结果的准确性、科学家在公众心目中的形象，也影响到公众对科学研究的认可度，在多领域全方位践行实验动物福利可助力于我国科技大国形象和科技创新能力的提升。

[作者贡献 Author Contribution]

闵凡贵负责收集资料、写作初稿和整理数据；
富宏坤参与策划方案、收集资料和修订文章；
刘永刚参与策划方案、审查和修订文章；
刘香梅、刘忠华和李垚参与收集资料和修订文章；
陶雨风负责策划方案、审查和修订文章。

[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] 魏强. 感染性疾病动物模型标准化应用问题探讨[J]. 实验动物与比较医学, 2010, 30(6):397-400. DOI: 10.3969/j.issn.1674-5817.2010.06.001.
WEI Q. Discussion on standardized application of animal models of infectious diseases[J]. Lab Anim Comp Med, 2010,

- 30(6):397-400. DOI: 10.3969/j.issn.1674-5817.2010.06.001.
[2] OLFERT E D, GODSON D L. Humane endpoints for infectious disease animal models[J]. ILAR J, 2000, 41(2): 99-104. DOI: 10.1093/ilar.41.2.99.
[3] KLAGES C. IACUC and veterinary considerations for review of ABSL3 and ABSL4 research protocols[J]. ILAR J, 2022, 61(1): 3-9. DOI: 10.1093/ilar/ilab009.
[4] COLBY L A, QUENEE L E, ZITZOW L A. Considerations for infectious disease research studies using animals[J]. Comp Med, 2017, 67(3):222-231.
[5] 张俊彦, 刘晓宇, 李垚, 等. 动物实验研究报告的国际指南 ARRIVE 2.0 介绍及期刊实施计划[J]. 实验动物与比较医学, 2023, 43(1):86-94. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2023.014.
ZHANG J Y, LIU X Y, LI Y, et al. Introduction to the international guide for animal research reporting ARRIVE 2.0, and its implementation plan in the journal[J]. Lab Anim Comp Med, 2023, 43(1): 86-94. DOI: 10.12300/j. issn. 1674-5817. 2023.014.
[6] 李夏莹, 韦玉生, 田永路, 等. 2022 版加拿大动物人道终点指南解析[J]. 实验动物与比较医学, 2022, 42(6):566-571. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2022.077.
LI X Y, WEI Y S, TIAN Y L, et al. A brief interpretation of CCAC guide on humane endpoints of animals: 2022 edition[J]. Lab Anim Comp Med, 2022, 42(6): 566-571. DOI: 10.12300/j. issn. 1674-5817.2022.077.
[7] FELGENHAUER J L, BRUNE J E, LONG M E, et al. Evaluation of nutritional gel supplementation in C57BL/6J mice infected with mouse-adapted influenza A/PR/8/34 virus[J]. Comp Med, 2020, 70(6): 471-486. DOI: 10.30802/AALAS-CM-20-990138.
[8] BROWNING H. Assessing measures of animal welfare[J]. Biol Philos, 2022, 37(4):36. DOI: 10.1007/s10539-022-09862-1.
[9] 吴瑶瑶, 李晓衡, 吴端生. 善待实验动物的伦理学原则浅析[J]. 现代交际, 2011(4):20-21. DOI: CNKI:SUN:XKJJ.0.2011-04-011.
WU Y Y, LI X H, WU D S. Analysis on ethical principles of treating experimental animals well[J]. Mod Commun, 2011(4): 20-21. DOI: CNKI:SUN:XKJJ.0.2011-04-011.
[10] 科学技术部. 关于发布《关于善待实验动物的指导性意见》的通知: 国科发财字〔2006〕398 号[A/OL]. [2024-05-11]. https://most.gov.cn/xxgk/xinxifenlei/fdzdgknr/fgzc/gfxwj/gfxwj2010before/201712/t20171222_137025.html.
Ministry of Science and Technology. Guidance on the care of laboratory animals: (2006) No. 398 [A/OL]. [2024-05-11]. https://most.gov.cn/xxgk/xinxifenlei/fdzdgknr/fgzc/gfxwj/gfxwj2010before/201712/t20171222_137025.html.
[11] 宗阿南, 郑志红, 史晓萍, 等. 探讨《关于善待实验动物的指导性意见》饲养、应用、运输及相关方面的措施[J]. 实验动物科学, 2008, 25(2): 63-64, 67. DOI: 10.3969/j. issn. 1006-6179.2008. 02.020.
ZONG A N, ZHENG Z H, SHI X P, et al. To explore the feeding, application, transportation and related measures of Guiding Opinions on Treating Experimental Animals Well[J]. Lab Anim Sci, 2008, 25(2):63-64, 67. DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2008. 02.020.
[12] 王剑, 卢今, 马政文, 等. 《动物研究: 体内实验报告》即 ARRIVE 2.0 指南的解释和阐述(一)[J]. 实验动物与比较医学, 2023, 43(2):213-

224. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2023.043.
WANG J, LU J, MA Z W, et al. Explanation and elaboration for the ARRIVE guidelines 2.0-reporting animal research and *in vivo* experiments (I) [J]. Lab Anim Comp Med, 2023, 43(2):213-224. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2023.043.
- [13] 弓彦. 在动物实验基本操作过程中提高实验动物福利[J]. 畜牧与兽医, 2015, 47(8):134-137. DOI: CNKI:SUN:XMYS.0.2015-08-037.
GONG Y. Improve the welfare of experimental animals in the basic operation process of animal experiments [J]. Anim husb vet med. 2015, 47(8):134-137. DOI: CNKI:SUN:XMYS.0.2015-08-037.
- [14] DÜPJAN S, DAWKINS M S. Animal welfare and resistance to disease: interaction of affective states and the immune system[J]. Front Vet Sci, 2022, 9: 929805. DOI: 10.3389/fvets.2022.929805.
- [15] ASANUMA H, FUJIIHASHI K, MIYAKOSHI T, et al. Long- and short-time immunological memory in different strains of mice given nasally an adjuvant-combined nasal influenza vaccine[J]. Vaccine, 2007, 25(39-40):6975-6980. DOI: 10.1016/j.vaccine.2007.06.060.
- [16] BELSER J A, TUMPEY T M. H5N1 pathogenesis studies in mammalian models[J]. Virus Res, 2013, 178(1): 168-185. DOI: 10.1016/j.virusres.2013.02.003.
- [17] KENDALL L V, OWINY J R, DOHM E D, et al. Replacement, refinement, and reduction in animal studies with biohazardous agents[J]. ILAR J, 2018, 59(2): 177-194. DOI: 10.1093/ilar/ily021.
- [18] 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.
National Administration for Market Regulation, National Standardization Administration. Laboratory animal — Environment and housing facilities: GB 14925-2023[S]. Beijing: Standards Press of China, 2023.
- [19] 鲜巧阳, 王勇, 黄智翔, 等. 非人灵长类动物感染性实验中的福利问题[J]. 实验动物与比较医学, 2016, 36(4): 314-316. DOI: 10.3969/j.issn.1674-5817.2016.04.014.
XIAN Q Y, WANG Y, HUANG Z X, et al. Welfare problems in infectious experiments of non-human primates[J]. Lab Anim Comp Med, 2016, 36(4):314-316. DOI: 10.3969/j.issn.1674-5817.2016.04.014.
- [20] ZHOU Q. Balancing the welfare: the use of non-human Primates in research[J]. Trends Genet, 2014, 30(11): 476-478. DOI: 10.1016/j.tig.2014.09.005.
- [21] LAULE G E, BLOOMSMITH M A, SCHAPIRO S J. The use of positive reinforcement training techniques to enhance the care, management, and welfare of Primates in the laboratory [J]. J Appl Anim Welf Sci, 2003, 6(3): 163-173. DOI: 10.1207/S15327604JAWS0603_02.
- [22] Schapiro S J, Coleman K, Akinyi M, et al. Nonhuman primate welfare in the research environment[M]//Laboratory Animal Welfare. Amsterdam: Elsevier, 2014:197-212. DOI:10.1016/b978-0-12-385103-1.00013-0.
- [23] BENNETT B T, ABEE C R, HENRICKSON R. Nonhuman primates in biomedical research: biology and management [M]. San Diego: Academic Press, 2011: 187-188.
- [24] MACFARLANE A S, PENG X, MEISLER J J Jr, et al. Morphine increases susceptibility to oral *Salmonella typhimurium* infection[J]. J Infect Dis, 2000, 181(4):1350-1358. DOI: 10.1086/315403.
- [25] LINDSAY D S, KAUR T, MITCHELL S M, et al. Buprenorphine does not affect acute murine toxoplasmosis and is recommended as an analgesic in *Toxoplasma gondii* studies in mice[J]. J Parasitol, 2005, 91(6):1488-1490. DOI: 10.1645/GE-732R.1.
- [26] Canadian Council on Animal Care. CCAC guidelines: Animal welfare assessment[M/OL]. Ottawa ON: CCAC, 2021. [2023-10-23]. https://ccac.ca/Documents/Standards/Guidelines/CCAC_guidelines-Animal_welfare_assessment.pdf.
- [27] 国家认证认可监督管理委员会. 动物实验人道终点评审指南: RB/T 173—2018[S/OL]. [2024-05-11]. <https://www.cmu.edu.cn/sydw/info/1044/1212.htm>.
National Certification and Accreditation Administration. Guideline of assessment for humane endpoints in animal experiment: RB/T 173-2018[S]. [2024-05-11]. <https://www.cmu.edu.cn/sydw/info/1044/1212.htm>.
- [28] HERRMANN K, FLECKNELL P. The application of humane endpoints and humane killing methods in animal research proposals: a retrospective review[J]. Altern Lab Anim, 2018, 46(6):317-333. DOI: 10.1177/026119291804600606.
- [29] SOOTHILL J S, MORTON D B, AHMAD A. The HD50 (hypothermia-inducing dose 50): an alternative to the LD50 for measurement of bacterial virulence[J]. Int J Exp Pathol, 1992, 73(1):95-98.
- [30] 闵凡贵, 张钰, 李文德, 等. IACUC在AAALAC体系中的作用与运行实践[J]. 实验动物科学, 2017, 34(6):49-54. DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2017.06.011.
MIN F G, ZHANG Y, LI W D, et al. Roles of IACUC in AAALAC management system and our operating practices[J]. Lab Anim Sci, 2017, 34(6):49-54. DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2017.06.011.
- [31] 王贵平, 周正宇. 关于我国实验动物福利伦理的思考及建议[J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(5):683-689. DOI: 10.3969/j.issn.1005-4847.2023.05.016.
WANG G P, ZHOU Z Y. Reflections and suggestions on the ethics and welfare of laboratory animals in China[J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(5): 683-689. DOI: 10.3969/j.issn.1005-4847.2023.05.016.
- [32] 刘丽艳, 张宏馨, 边佳悦, 等. 实验动物福利伦理审查发现问题之思考[J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(9):63-68. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.09.008.
LIU L Y, ZHANG H X, BIAN J Y, et al. Reflection of the problems found in the ethical review of experimental animal welfare[J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(9):63-68. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.09.008.
- (收稿日期: 2024-08-22 修回日期: 2024-10-15)
(本文责任编辑: 丁宇菁)
- [引用本文]**
闵凡贵, 富宏坤, 刘永刚, 等. 感染性动物实验的福利与伦理特殊要求 [J]. 实验动物与比较医学, 2025, 45(2): 239-246. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.122.
MIN F G, FU H K, LIU Y G, et al. Special welfare and ethical requirements for infectious animal experiments[J]. Lab Anim Comp Med, 2025, 45(2): 239-246. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.122.



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。

动物实验中性别“歧视”的危害与反思

孙 强

(中国科学院脑科学与智能技术卓越创新中心, 上海 200031)



[中国分类号] Q95-33 [文献标志码] B [文章编号] 1674-5817(2025)02-0247-04

本栏目在开始阶段曾和大家讨论过“为什么要开展动物实验”^[1]以及“如果动物实验不严谨”会有什么严重后果^[2]。这一期我们将进一步探讨影响动物实验严谨性的性别“歧视”问题及对策。

在生物医学研究发展进程中,“男性(雄性)主导”曾是一条不成文的“传统”。而在动物实验中,研究者也常常偏好使用雄性动物。乍看之下,选用雄性动物似乎有诸多“便利”,例如可以省去追踪雌激素变化的繁琐步骤,也可避免雌性动物因雌激素周期性变化带来的实验数据波动。然而,不容忽视的是,不同性别的个体间在生理结构、激素水平、免疫机制,乃至疾病发生和发展上存在显著差异。若仅从单一性别(雄性)个体中获取数据,再将研究结果“广而推之”,直接应用到另一种性别(雌性)群体,可能会给后者带来更高的安全风险与健康隐患。本文将从心血管、免疫等方面的最新生物医学研究出发,为读者揭示动物实验中“性别歧视”的现状与危害,并探讨为何“男(雄)女(雌)有别”这一问题值得我们高度重视。

1 生物医学研究中的“她”缺席

1.1 “单一性别”研究传统的历史与成因

回顾近现代医学史,女性群体在很多临床研究中,并未受到应有的重视。历史上,女性常被认为是医学

和生物医学研究的“小人物”而被排除在外——药物临床试验通常只招募男性志愿者。即使是在21世纪的今天,临床研究中女性的参与比例也低于男性。不仅如此,作为生物医学研究的临床前工作——动物实验通常也将使用雄性动物设置为默认选项。研究显示,在2011—2012年发表的1200余篇神经科学论文中,仅有42%注明了所用动物的性别,其中仅24%真正纳入了雌性动物^[3]。而在这些纳入了雌性动物的研究论文中,真正将雌性和雄性数据分开统计的屈指可数^[4]。这样的“单一性别”研究传统不仅存在于神经科学领域,在其他领域也普遍存在。加州大学伯克利分校的研究人员曾对2009年出版的34种生物医学期刊文献进行抽样分析,其中涵盖神经生物学、免疫学、生殖生物学等10个学科,结果显示,只有28%的实验同时使用了雌性和雄性动物^[4]。神经生物学和药理学两个主要学科的“雄性偏好”尤其明显,研究中雄性和雌性占比分别达5.5:1和5:1^[5]。

那么,为什么会产生这种现象呢?一方面,部分研究者担心雌性动物的激素周期会带来更多的数据“噪声”,增加实验复杂度^[6];另一方面,若将雌性和雄性分组研究,往往需要更大的样本量、更多的经费以及更长的实验周期^[7]。因此,基于种种考虑,不少研究团队在实验设计之初就选择了“只用雄性”这条“捷径”。然而,从科学的严谨性和对人类健康的全面

考量来看,这条“捷径”或许并不能节省时间和成本——因为忽视性别差异导致的数据偏差,很可能在后期研发或临床试验阶段造成更多的失败和资源浪费^[8]。

1.2 动物实验中的“两性别”政策与现状

针对动物实验中的“性别歧视”现象,加拿大卫生部早在2010年就要求其资助的项目在实验设计阶段必须考虑性别因素^[9]。此后,美国国立卫生研究院(National Institutes of Health, NIH)也于2014年出台正式规定,要求科研项目应当尽量纳入“两性别”的实验动物,若仅使用单一性别,则需说明科学理由^[10]。这些政策的实施效果又如何呢?

十年后的2020年,美国西北大学医学院的Woitowich等^[5]发表了关于动物实验性别歧视问题的新一轮统计分析。通过对2009年和2019年发表的文献进行追踪分析,研究发现,同时使用雄性和雌性实验动物的论文占比在2009年为28%,到2019年增长为49%^[5];其中神经科学和免疫学领域的研究论文中“两性别”使用率提升最为显著,分别从29%和16%上升至63%和46%^[5]。尽管这一结果看似令人欣慰,但进一步分析却发现,在2019年发表的论文中,将雌性和雄性数据分开统计分析的比例反而低于2009年^[5]。这表明许多研究虽然在实验设计上纳入了雄性和雌性,但并未将性别视为一个潜在影响实验结果的重要变量进行深入研究。从整体来看,这种“在场却不受重视”的情况依旧未得到根本性改善。

目前,除北美地区出台了相对明确的要求外,欧盟、日本和中国等国家或国际组织还没有出台完善的强制性政策来约束科研项目必须将性别因素纳入考量。由此可见,动物实验中的“性别歧视”仍然是一个世界范围内尚未彻底解决的问题。

2 动物实验中性别因素的重要性

2.1 “男女有别”并非小误差

2.1.1 不同性别的心血管差异

心血管疾病是全球死亡率位居首位的疾病。女性绝经前的高水平雌激素在一定程度上能保护其心脏,使得绝经前女性的心脏病发病率显著低于同年龄段男性。但在绝经后,女性雌激素水平下降,心脏病发病率急剧上升;至50岁后,女性的患病率与男性相当,甚至在某些情况下更高^[11]。在小鼠心脏病实验模型中,雄性小鼠与雌性小鼠的心脏结构和细胞组成也存

在明显差异:雌性小鼠间充质细胞的数量大约是雄性小鼠的1.6倍,而雄性小鼠髓样细胞、粒细胞和B细胞的占比更高^[12]。如果通过切除性腺来消除激素影响,雄性小鼠和雌性小鼠的心脏细胞构成会逐步变得相似;再次补充雌激素或雄激素后,之前的差异又会重新出现^[12]。由此可见,性激素水平对于心脏结构及功能的调控极为关键。在此背景下,如果仅使用雄性动物构建模型来研究心脏疾病,其结论对雌性个体乃至女性患者的适用性可能会大幅削弱。

2.1.2 不同性别的免疫差异

男性和女性对外来病原和自身抗原的免疫反应非常不同。一般情况下,女性的体液免疫和细胞免疫都相对更强。研究发现,女性乙肝病毒携带者的病毒载量往往低于男性;人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)急性感染的女性血液中病毒载量比男性低约40%;面对各种疫苗,女性往往也能产生更好的免疫应答^[13]。反之,“免疫更强”也为女性增加了患自身免疫性疾病的风险,比如系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus, SLE)、干燥综合征(Sjögren syndrome, SS)等疾病的女性患者明显高于男性^[14]。有意思的是,NZB/WF1小鼠模型在系统性红斑狼疮的病理特征上与人类具有相似性——雌性小鼠的发病率和死亡率都远高于雄性小鼠^[15]。若只是使用雄性小鼠去研究SLE,就永远无法看清真实的两性世界中SLE的严重程度,也无法为患病率更高的女性患者提供更有效的干预措施。

2.2 “雌性缺失”对女性健康的隐形风险

在基础研究和药物研制阶段仅以雄性动物的实验数据为依据,很可能导致研究结果在面对女性激素水平、基因表达和代谢途径等特殊变化时出现效果误差。统计数据显示,女性的药物不良反应率大约是男性的1.5~1.7倍^[16]。这种差异一方面源于男性和女性的药物代谢通路可能存在不同,另一方面则因为多数药物的早期测试主要依赖雄性动物或人类男性受试者,缺乏针对女性人群的药物适应性研究。例如,美国最受欢迎的安眠药安比恩(Ambien,通用名为唑吡坦)在女性体内的代谢速度较慢,使得女性在服用后第二天早上体内药物浓度仍然较高,进而影响驾驶等需要高度警觉的活动^[17]。此药物反应上的性别差异促使美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)在2013年调整了女性的推荐剂量,将女性推荐剂量减半以降低不良反应风险^[18]。此外,低剂量的阿

司匹林在预防男性群体发生心肌梗死方面有疗效，而在女性群体中则更多地起到预防脑卒中的作用^[19-20]。

这些案例无疑凸显了药物研发和临床试验中性别因素的重要性，提示未来的医药研究和药物开发需要更加重视性别差异。在新药研发过程中，非常有必要从动物研究的最初阶段就将性别差异纳入考量；同时对现有药物也应该进行不同性别的回顾性研究，以完善研究结论，提高两性别治疗效果的一致性和安全性。

3 科研中“性别平衡”难以实现的原因及解决对策

3.1 原因

如前所述，在科学研究发展历史中，性别差异往往会被有意或无意地忽视。即便在部分科研人员对疏忽性别因素会造成严重后果有所认识的今天，科学研究中的性别平衡也难以实现。究其原因，除研究人员对于雌性动物性周期和研究成本的考量外，对性别差异的认识不足也是一个重要因素。许多研究者对于性别如何影响实验结果的具体情况缺乏深入理解，有时甚至认为只要实验结果看起来可行就足够了。这种思维方式可能导致研究结果无法广泛适用于不同性别。

此外，相关政策和审稿制度的不严格也助长了这一现象。尽管加拿大卫生部和美国NIH已经要求在研究申请和资助阶段考虑性别因素，但在更多的国家和地区，类似的要求尚未成为标准或纳入科研审批制度。即便主流期刊在投稿指南中提出了性别因素的相关建议，但往往缺乏强制约束力，导致许多研究人员仍未能充分考虑“性别平衡”的重要性。

综上，科研中对性别差异的忽视既来自资源和认知的匮乏，也受到现行政策和审批制度的制约。面对这种情况，科学界需要加强对性别因素的重视教育、制定严格的支持政策和完善学术审稿标准，以推动科学研究中的“性别平衡”，确保研究结果的普遍适用性和科学严谨性。

3.2 对策

在生物医学研究中，性别因素的忽视不仅是一个研究设计上的缺陷问题，也关系到科研质量和成果的适用性。对此，可以从以下几个方面着手来解决这个问题。

首先，科研资助机构应该完善审批与监管流程，借鉴加拿大卫生部和美国NIH的经验，强制要求在项目申报阶段明确说明是否考虑性别因素以及如何设计实验来分析不同性别的数据，这可以从源头上保证科

研资金的合理使用，并促进研究质量的提升。

其次，学术期刊和学术团体应加强对提交稿件的质量审核，确保研究者在方法学部分详细注明动物的性别分配，并检查是否进行了性别分组分析。对于未充分考虑性别差异或未能提供忽视性别差异的理由的研究论文，应要求作者补充相关数据或在讨论部分明确指出研究的局限性。

再次，高校和科研院所应在教育环节强调动物性别差异的科学性，通过系统化课程和专题讲座帮助研究人员深入理解性别如何影响生理和遗传表现，以及这些差异对实验结果可能产生的影响，尤其是依赖单一性别动物实验获得的医药制品曾在实际应用中带来怎样的不良后果。通过理论教育和实践教训警示，达到从思想上消除科研中忽视“性别平衡”的根本性问题。

最后，通过多中心合作和大数据共享的方式，排除饲料差异、微生物组差异及饲养密度差异等环境因素的干扰，让性别因素的影响得以被更充分、准确地提炼和显示。如国际小鼠表型分析联盟（International Mouse Phenotyping Consortium, IMPC）曾对4万多只基因敲除小鼠的表型数据进行大规模汇总，并在不同实验中心进行重复验证，找出了许多表型在雄性小鼠和雌性小鼠之间的差异^[21]。对大规模数据的多中心合作研究和分析，可以帮助科研人员更准确地识别和理解性别因素对研究结果的影响。这种合作不仅能减少单一环境的局限性和偏差，还能通过广泛整合数据库资源，加深我们对不同疾病模型用于不同性别群体研究适宜性的理解，进而推动个性化医疗的发展。

通过这些措施的实施，可以逐步提高科研领域对性别差异的认识和重视，从而提升研究结果的适用性和科学性。这不仅是学术界的责任，也是科研人员向社会公众承诺的一部分，以确保科研成果能够公正地惠及每一个人。

4 结语

研究人员开展动物实验的初衷都是为了人类健康，但如果在实验过程中只用雄性动物，那么我们更精准地表述或许应该是“为了男性健康”。事实证明，无论是心血管疾病、感染性疾病，还是代谢疾病或自身免疫性疾病，都存在显著的性别差异。对这些差异视而不见，不仅与科学精神相悖，更会对女性乃至整体人群带来潜在危险。重视性别差异显然有助于提高研究的准确性。而且通过雌性和雄对比，我们可以识别更多潜在的生理机制与调控靶点，避免得出“半吊子”

结论。同时,重视性别差异还有助于加快新药研发进程。在动物实验阶段即实施雌性和雄性分组,并依据实验结果及时调整后续临床试验,能够有效降低临床阶段遭遇不良反应的突发风险。从宏观角度看,在实验动物分组中纳入不同性别,前期看似增加了投入,但长远来看,不同性别的纳入能够有效减少因性别差异导致的实验数据偏差、结论局限性,从而避免重复实验与资源浪费。最后,从动物实验伦理角度考量,在“3Rs”原则(替代、减少、优化)的指导下,重视不同性别动物的使用是真正优化实验设计、避免无谓的动物牺牲、使研究结论实现社会价值最大化的保障。

需要强调的是:动物实验中的“性别歧视”,并非只是一种道德或社会议题,而是实实在在影响科学严谨性和公众健康的关键因素。随着研究逐步深入,我们对生理、免疫和遗传机制的认识越发细化,对性别变量的忽视只会让结论更加片面,甚至可能产生误导。让“她(雌)”在科研实验中得到与“他(雄)”同样的重视,不仅是对科学客观性的尊重,更是对所有女性乃至所有人健康的守护。换句话说,只有真正做到男性和女性平等、雄性和雌性并重,我们才能在未来的医学与生物学研究中跨出更稳健、更全面的一步。

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. 为什么要开展动物实验[J]. 实验动物与比较医学, 2024, 44(1): 121-126. DOI:10.12300/j.issn.1674-5817.2023.177.
- [2] 孙强. 如果动物实验不严谨[J]. 实验动物与比较医学, 2024, 44(2): 234-237. DOI:10.12300/j.issn.1674-5817.2024.039.
- [3] CLAYTON J A, COLLINS F S. Policy: NIH to balance sex in cell and animal studies[J]. *Nature*, 2014, 509(7500): 282-283. DOI: 10.1038/509282a.
- [4] BEERY A K, ZUCKER I. Sex bias in neuroscience and biomedical research[J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 2011, 35(3): 565-572. DOI:10.1016/j.neubiorev.2010.07.002.
- [5] WOITOWICH N C, BEERY A, WOODRUFF T. A 10-year follow-up study of sex inclusion in the biological sciences[J]. *eLife*, 2020, 9: e56344. DOI:10.7554/eLife.56344.
- [6] PRENDERGAST B J, ONISHI K G, ZUCKER I. Female mice liberated for inclusion in neuroscience and biomedical research[J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 2014, 40:1-5. DOI:10.1016/j.neubiorev.2014.01.001.
- [7] BEERY A K. Inclusion of females does not increase variability in rodent research studies[J]. *Curr Opin Behav Sci*, 2018, 23: 143-149. DOI:10.1016/j.cobeha.2018.06.016.
- [8] COLLINS F S, TABAK L A. Policy: NIH plans to enhance reproducibility[J]. *Nature*, 2014, 505(7485): 612-613. DOI: 10.1038/505612a.
- [9] HEALTH-CANADA. Health portfolio sex - and gender-based analysis plus policy: advancing equity, diversity and inclusion [EB/OL]. (2023-01-27)[2025-02-25]. <https://www.canada.ca/en/health-canada/corporate/transparency/health-portfolio-sex-gender-based-analysis-policy.html>.
- [10] National Institutes of Health. Consideration of sex as a biological variable in NIH-funded research[EB/OL]. (2015-06-19) [2025-02-25]. <https://grants.nih.gov/grants/guide/notice-files/NOT-OD-15-102.html>.
- [11] Cleveland Clinic. Early warning signs of a heart attack[EB/OL]. (2024-09-16) [2025-02-25]. <https://health.clevelandclinic.org/early-signs-of-a-heart-attack>.
- [12] SKELLY D A, SQUIERS G T, MCLELLAN M A, et al. Single-cell transcriptional profiling reveals cellular diversity and intercommunication in the mouse heart[J]. *Cell Rep*, 2018, 22(3):600-610. DOI:10.1016/j.celrep.2017.12.072.
- [13] KLEIN S L, FLANAGAN K L. Sex differences in immune responses[J]. *Nat Rev Immunol*, 2016, 16(10): 626-638. DOI: 10.1038/nri.2016.90.
- [14] FAIRWEATHER D, ROSE N R. Women and autoimmune diseases[J]. *Emerg Infect Dis*, 2004, 10(11): 2005-2011. DOI: 10.3201/eid1011.040367.
- [15] DUBOIS E L, HOROWITZ R E, DEMOPOULOS H B, et al. NZB/NZW mice as a model of systemic lupus erythematosus[J]. *JAMA*, 1966, 195(4): 285-289. DOI: 10.1001/jama. 1966. 03100040091025.
- [16] HENDRIKSEN L C, VAN DER LINDEN P D, LAGRO-JANSSEN A L M, et al. Sex differences associated with adverse drug reactions resulting in hospital admissions[J]. *Biol Sex Differ*, 2021, 12(1):34. DOI:10.1186/s13293-021-00377-0.
- [17] ZHAO H, DIMARCO M, ICHIKAWA K, et al. Making a 'sex-difference fact': ambient dosing at the interface of policy, regulation, women's health, and biology[J]. *Soc Stud Sci*, 2023, 53(4):475-494. DOI:10.1177/03063127231168371.
- [18] Food and Drug Administration. FDA Drug Safety Communication: FDA approves new label changes and dosing for zolpidem products and a recommendation to avoid driving the day after using Ambien CR[EB/OL]. (2013-05-14) [2025-02-25]. <https://www.fda.gov/drugs/drug-safety-and-availability/fda-drug-safety-communication-fda-approves-new-label-changes-and-dosing-zolpidem-products-and>.
- [19] RIDKER P N, COOK N R, LEE I M. A randomized trial of low-dose aspirin in the primary prevention of cardiovascular disease in women[J]. *J Vasc Surg*, 2005, 42(1):179. DOI:10.1016/j.jvs.2005.04.009.
- [20] ROSANO G M C, LEWIS B, AGEWALL S, et al. Gender differences in the effect of cardiovascular drugs: a position document of the Working Group on Pharmacology and Drug Therapy of the ESC[J]. *Eur Heart J*, 2015, 36(40): 2677-2680. DOI:10.1093/eurheartj/ehv161.
- [21] KARP N A, MASON J, BEAUDET A L, et al. Prevalence of sexual dimorphism in mammalian phenotypic traits[J]. *Nat Commun*, 2017, 8:15475. DOI:10.1038/ncomms15475.

(收稿日期:2025-02-24 修回日期:2025-04-23)

(本文责任编辑:丁宇菁)

[引用本文]

孙强. 动物实验中性别“歧视”的危害与反思[J]. 实验动物与比较医学, 2025, 45(2): 247-250. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2025.025.