

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3期 (总第211期)

2025年6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/dwxy>

编辑部负责人

张俊彦

印刷

上海新开宝商务印刷有限公司

发行

上海市报刊发行局

范围: 国内公开发行

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

长春瑞滨诱导大鼠足背静脉炎模型的动态评价

姜萌, 郝淑兰, 仝立国, 仲启明, 高振飞, 王永辉, 王晞星, 吉海杰..... 251

秦皮素对碘乙酸钠诱导骨关节炎模型大鼠的软骨保护与抗炎作用

刘智伟, 杨然, 连浩, 张玉, 金立伦..... 259

利用脑立体定位技术将人源三突变APP基因导入海马区构建阿尔茨海默病大鼠模型

肖林林, 杨逸萱, 黎珊杉, 罗兰诗雨, 尹思威, 孙俊铭, 施维, 欧阳轶强, 李习艺..... 269

慢性肾脏病大鼠主动脉钙化模型的术式优化及效果评价

潘颐聪, 蒋汶洪, 胡明, 覃晓..... 279

肌萎缩侧索硬化症小鼠模型研究进展

罗莲莲, 袁艳春, 王俊岭, 时广森..... 290

疾病动物模型数字化图谱数据库平台的构建与初步应用

李会萍, 高洪彬, 温金银, 杨锦淳..... 300

动物实验技术与方法

重塑细胞间互动: 类器官共培养模型赋能疾病机制与治疗探索

谭邓旭, 马一凡, 刘可, 张延英, 师长宏..... 309

生物3D打印研究及与临床前动物模型的交叉应用展望

胡敏, 董乐轩, 高怡, 奚子芪, 沈子皓, 唐瑞阳, 栾鑫, 汤恣, 张卫东..... 318

降压物质检查结果超过质量标准规定的常见原因分析

童希洋, 阙昌田, 张峰, 赵璐, 王红平..... 331

实验动物资源开发与利用

五指山猪MHC II类分子基因鉴定与分析

刘园园, 辛文水, 晁哲, 曹宗喜, 蔡艺菲, 李强, 李凌伟, 刘光亮..... 340

实验动物肠道菌群特征分析及性别差异性的研究进展

沈黄奕, 黄宇飞, 杨云鹏 349

实验动物质量控制

2019年某实验猴养殖场食蟹猴犬瘟热暴发的诊断

王晨娟, 杨玲焰, 王立鹏, 孙雪萍, 李静文, 郭连香, 荣 荣, 时长军 360

鳞状皮屑裸小鼠木糖葡萄球菌的分离鉴定

孔志豪, 魏晓锋, 于灵芝, 冯丽萍, 朱 琦, 施国君, 王 晨 368

科普讲坛

无替代, 何谈取消

孙 强 376

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

国际医学期刊编辑委员会(ICMJE)推荐规范中有关人工智能辅助写作及审稿的具体要求 268

《实验动物与比较医学》2025年征订启事 278

《实验动物与比较医学》关于使用生成式人工智能的政策说明 339

《实验动物与比较医学》有关实验动物福利伦理内容的说明 367

广告 封二, 前插1~7, 后插1~4, 封三, 封底

期刊基本参数: CN 31-1954/Q*1981*b* 大 16*128*zh*P*¥ 30.00*2000*14*2025-06

(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 闫明霞

本期审稿专家 白 玉 陈仁金 程树军 代解杰 戴方伟 丁玉强 杜小燕 杜旭光

冯 洁 富群华 高 苒 郝智慧 邝少松 李 舸 李文德 李 垚

刘月环 刘忠华 陆益红 孟长虹 权福实 任建科 沈如凌 宋国华

王朝霞 王贵平 王 健 王爽洁 魏 强 吴宝金 肖君华 闫明霞

姚 明 于士颜 于志锋 岳秉飞 张 周 赵彦光 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 陈 毅 干明红 李文杰 刘萌萌 娄怡欣 陆佳雯 吴昊晟 姚晓琦

于秀伟 张 萍 周 培

LABORATORY ANIMAL AND COMPARATIVE MEDICINE

Bimonthly

Established in September, 1981

Volume 45, Issue 3

June 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, YAN Mingxia

CONTENTS IN BRIEF

Animal Models of Human Diseases

Dynamic Evaluation of Vinorelbine-Induced Phlebitis of Dorsalis Pedis Vein in a Rat
Model

JIANG Meng, HAO Shulan, TONG Liguo, ZHONG Qiming, GAO Zhenfei,

WANG Yonghui, WANG Xixing, JI Haijie 251

Cartilage Protection and Anti-Inflammatory Effects of Fraxetin on Monosodium

Iodoacetate-Induced Rat Model of Osteoarthritis

LIU Zhiwei, YANG Ran, LIAN Hao, ZHANG Yu, JIN Lilun 259

Establishment of a Rat Model of Alzheimer's Disease by Introducing Human Triple

Mutant APP Gene into Hippocampus via Brain Stereotactic Technology

XIAO Linlin, YANG Yixuan, LI Shanshan, LUO Lanshiyu, YIN Siwei, SUN Juming,

SHI Wei, OUYANG Yiqiang, LI Xiyi 269

Optimization of Surgical Procedure and Efficacy Evaluation of Aortic Calcification

Model in Rats with Chronic Kidney Disease

PAN Yicong, JIANG Wenhong, HU Ming, QIN Xiao 279

Advances in Mouse Models of Amyotrophic Lateral Sclerosis

LUO Lianlian, YUAN Yanchun, WANG Junling, SHI Guangsen 290

Construction and Preliminary Application of Animal Disease Model Digital Atlas

Database Platform

LI Huiping, GAO Hongbin, WEN Jinyin, YANG Jinchun 300

Animal Experimental Techniques and Methods

Reshaping Intercellular Interactions: Empowering the Exploration of Disease

Mechanisms and Therapies Using Organoid Co-Culture Models

TAN Dengxu, MA Yifan, LIU Ke, ZHANG Yanying, SHI Changhong 309

Prospects for 3D Bioprinting Research and Transdisciplinary Application to Preclinical

Animal Models

HU Min, DONG Lexuan, GAO Yi, XI Ziqi, SHEN Zihao, TANG Ruiyang,

LUAN Xin, TANG Min, ZHANG Weidong 318

Analysis of Common Causes of Out-of-Specification Results in the Test for Depressor

Substances

TONG Xiyang, QUE Changtian, ZHANG Feng, ZHAO Lu, WANG Hongping 331

Development and Utilization of Laboratory Animal Resources

Identification and Analysis of *MHCII* Genes in Wuzhishan Pigs

LIU Yuanyuan, XIN Wenshui, CHAO Zhe, CAO Zongxi, CAI Yifei, LI Qiang, LI Lingwei, LIU Guangliang 340

Research Progress on Characteristics Analysis of Gut Microbiota and Its Sex Differences in Laboratory Animals

SHEN Huangyi, HUANG Yufei, YANG Yunpeng 349

Quality Control of Laboratory Animals

Diagnosis of an Outbreak of Canine Distemper in *Cynomolgus* Monkeys in an Experimental Monkey Farm in 2019

WANG Chenjuan, YANG Lingyan, WANG Lipeng, SUN Xueping, LI Jingwen, GUO Lianxiang, RONG Rong, SHI Changjun 360

Isolation and Identification of *Staphylococcus xylosum* in Nude Mice with Squamous Skin Scurfs

KONG Zhihao, WEI Xiaofeng, YU Lingzhi, FENG Liping, ZHU Qi, SHI Guojun, WANG Chen 368

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)



王晞星, 主任医师, 二级教授, 博士生导师, 第四届国医大师, 首届全国名中医, 中国中医科学院学部委员, 第四、五、六、七批全国名老中医药专家学术经验传承指导老师, 享受国务院政府特殊津贴专家, 卫生部突出贡献中青年专家, 全国五一劳动奖章获得者, 国家临床重点专科、国家中医药管理局重点学/专科学术带头人, 国家中医药管理局中医肠疗重点研究室主任, 国家第二批中医临床基地-大肠癌研究负责人。擅长治疗肿瘤及消化系统疾病, 研发医疗机构专用药物制剂10余种, 获省部级科技进步一、二、三等奖共计5项, 出版专著5部, 授权发明专利4项, 获中药新药证书1项, 临床批件2项, 发表论文100余篇。

吉海杰, 主任药师, 医学博士, 博士后合作导师, 山西省中医药研究院和山西中医药大学硕士生导师, “三晋英才”拔尖骨干人才, 山西省学术技术带头人, 山西省科技创新青年人才团队负责人, 中国民族医药学会药理与毒理学分会和山西省实验动物学会常务委员。主要从事肿瘤放疗及生物免疫治疗相关不良反应的中药防治研究, 同时基于中医临床人用经验开展中药药效物质发现与开发研究。主持完成中国博士后科学基金1项和国家自然科学基金2项, 在研省部级课题2项。以第一作者或通信作者(含共同)身份在国内外发表论文15篇, 其中1篇获得第十九届山西省优秀学术论文一等奖; 以第一发明人授权发明专利2项。



长春瑞滨诱导大鼠足背静脉炎模型的动态评价

姜萌¹, 郝淑兰¹, 仝立国¹, 仲启明¹, 高振飞², 王永辉², 王晞星¹, 吉海杰¹

(1. 山西省中医药研究院中心实验室, 太原 030012; 2. 山西中医药大学方剂学教研室, 太原 030619)

[摘要] **目的** 动态观察经大鼠足背静脉注射长春瑞滨溶液诱导静脉炎模型的临床症状和病理变化。**方法** 28只11周龄雄性SPF级SD大鼠随机分为模型组(20只)和对照组(8只): 模型组经右后肢足背静脉单次注射0.1 mL长春瑞滨溶液(4 mg/mL), 对照组同法注射等体积生理盐水。每日观察两组大鼠的静脉炎发生情况并记录其分级, 采用排水法测量患肢体积并计算肿胀率, 双足平衡测痛仪测试患肢承重占比, 红外热像仪检测患肢皮肤温度, 连续9 d。模型组从第1天起隔日处死3只大鼠, 取从注射点至向心端1 cm处的静脉组织, 采用苏木精-伊红染色法观察静脉组织病理学改变, 用扫描电子显微镜观察血管内膜表面微观结构变化。**结果** 与对照组大鼠比较, 模型组大鼠第1天出现红肿, 至第3天肿胀率达到(81.89±15.75)% ($P<0.001$), 而后红肿逐渐缓解, 至第9天降至(15.41±0.33)% ($P<0.01$); 模型组大鼠患肢第1天出现痛觉, 至第3天明显加剧, 承重占比降低至(36.35±4.91)% ($P<0.001$), 同时患肢病灶皮肤发热, 第5天明显升高至(36.36±0.40)°C ($P<0.001$), 痛觉和发热在第9天均基本恢复至正常。模型组大鼠患肢静脉炎分级显示, 第1天Ⅱ级占75.0%; 第3天Ⅲ级、Ⅳ级各占37.5%; 第5~9天多数出现条索状静脉, 以Ⅲ级为主。患肢静脉组织从第1天的周围水肿和炎性细胞浸润, 逐渐进展为第3~9天的内膜破溃、管壁增厚, 甚至管腔狭窄; 同时静脉内膜亦从内皮细胞紧密连接破坏、血细胞粘附, 进展为内膜表面粗糙、褶皱及隆起。**结论** 经后肢足背静脉单次注射0.1 mL长春瑞滨溶液(4 mg/mL)建立的静脉炎大鼠模型在第3~5天以局部红、肿、热、痛为典型特征, 至第9天基本消退, 但仍可见条索状静脉; 随病程延长, 静脉组织出现水肿、管壁增厚及管腔狭窄, 静脉内膜破溃、表面粗糙甚至完全缺失。

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目“基于血管内皮细胞Ang/Tie2轴探讨化疗性静脉炎发生及复方藤芷膏干预机制”(81973672); 山西省基础研究计划“藤芷膏贴治疗化疗性静脉炎的机制研究”(202203021221291); 山西省科技创新人才团队专项“中药药效物质发现与开发”(202204051001032); 山西省中医药科技创新工程项目“基于国医大师验方治疗化疗后静脉炎的中药新药临床前研究”(2023); 山西省中医药重点研究室建设项目“中药药效物质研究重点研究室建设”(ZYYYJS2024005); 山西省重点实验室建设项目“山西省中医药管理局重点研究室项目-方药配伍及功用重点研究室”(zyyyjs2024023); 山西省外聘专家工作室“项耀祖血管炎性疾病研究山西工作室”(2025W62)

[第一作者] 姜萌(1998—), 女, 医学硕士, 中医师, 研究方向: 中药药效物质基础研究。E-mail: 876240961@qq.com

[通信作者] 王晞星(1959—), 男, 医学学士, 主任医师, 国医大师, 研究方向: 中医药防治肿瘤病临床与基础研究。E-mail: wangxx315@163.com。ORCID: 0000-0003-2444-7248;

吉海杰(1982—), 男, 医学博士, 主任药师, 硕士生导师, 研究方向: 中药药效物质基础研究。E-mail: jihaijie82@hotmail.com。ORCID: 0009-0006-7219-6649

[关键词] 静脉炎; 足背静脉; 长春瑞滨; 大鼠

[中图分类号] Q95-33; R-332 [文献标志码] A [文章编号] 1674-5817(2025)03-0251-08



Dynamic Evaluation of Vinorelbine-Induced Phlebitis of Dorsalis Pedis Vein in a Rat Model

JIANG Meng¹, HAO Shulan¹, TONG Ligu¹, ZHONG Qiming¹, GAO Zhenfei², WANG Yonghui², WANG Xixing¹, JI Haijie¹

(1. Department of Central Laboratory, Shanxi Province Academy of Traditional Chinese Medicine, Taiyuan 030012, China; 2. Department of Formulas of Chinese Medicine, Shanxi University of Chinese Medicine, Taiyuan 030619, China)

Correspondence to: WANG Xixing (0000-0003-2444-7248), E-mail: wangxx315@163.com;

JI Haijie (0009-0006-7219-6649), E-mail: jihaijie82@hotmail.com

[ABSTRACT] Objective To dynamically observe the clinical symptoms and pathological changes in a rat model of vinorelbine-induced phlebitis via injection into the dorsalis pedis vein. **Methods** Twenty-eight 11-week-old male SPF-grade SD rats were randomly divided into a model group ($n=20$) and a control group ($n=8$). The model group received a single injection of 0.1 mL vinorelbine solution (4 mg/mL) via the right hind limb dorsalis pedis vein, while the control group received an equal volume of normal saline via the same method. The occurrence and grading of phlebitis in both groups were observed and recorded daily. The volume of the injured limb was measured by the drainage method to calculate the swelling rate. The weight-bearing ratio of the injured limb was assessed using a bipedal balance pain meter, and the skin temperature of the injured limb was measured by infrared thermal imaging. These measurements were conducted for 9 consecutive days. Starting from day 1, three rats from the model group were euthanized every other day. A 1-cm segment of the vein extending proximally from the injection site was collected. Pathological changes in the vein tissue were examined by hematoxylin-eosin staining, and ultrastructural changes of the vascular endothelium were observed using scanning electron microscopy. **Results** Compared to the control group, the injected hindlimb of model rats showed redness and swelling on day 1, with the swelling rate peaking at $(81.89\pm 15.75)\%$ on day 3 ($P<0.001$), then gradually alleviating and decreasing to $(15.41\pm 0.33)\%$ by day 9 ($P<0.01$). Pain was observed in the affected limbs of model rats on day 1 and worsened markedly on day 3, with the weight-bearing ratio decreasing to $(36.35\pm 4.91)\%$ ($P<0.001$). Meanwhile, the skin temperature of the lesion site increased, reaching $(36.36\pm 0.40)^\circ\text{C}$ on day 5 ($P<0.001$). Both pain and fever returned to near normal levels by day 9. Phlebitis grading in the model group showed that 75.0% of rats were grade II on day 1; grade III and IV each accounted for 37.5% on day 3; from days 5 to 9, most rats exhibited cord-like veins, predominantly grade III. Venous tissue showed peripheral edema and inflammatory cell infiltration on day 1, which gradually progressed to intimal rupture, vessel wall thickening, and even lumen narrowing from day 3 to 9. The venous intima exhibited destruction of tight junctions between endothelial cells and adhesion of blood cells, progressing to roughened, wrinkled, and protruding intimal surfaces. **Conclusion** The vinorelbine-induced phlebitis of dorsal foot vein in rat model is characterized by local redness, swelling, warmth, and pain from days 3 to 5, which largely resolve by day 9, although cord-like veins can still be observed. With disease progression, venous tissue develops edema, vessel wall thickening, and lumen narrowing. The venous intima shows rupture, roughening, and in some cases, complete loss.

[Key words] Phlebitis; Dorsalis pedis vein; Vinorelbine; Rats

静脉输液是临床上常用的治疗方式之一，但输注发泡剂或强刺激性药物后患者易发生局部红肿热痛，严重者可见沿静脉走行色素沉着和静脉栓塞^[1]。长春

瑞滨作为发泡性化疗药物的代表，适用于非小细胞肺癌、乳腺癌及卵巢癌等肿瘤疾病治疗，而静脉炎是该药物在临床治疗中最常见的不良反应之一，不仅增加

患者心理负担与身体痛苦, 严重时可影响到化疗方案的实施^[2-3]。因此, 开展化疗性静脉炎相关的基础研究具有重要价值, 其中动物模型是不可或缺的研究工具。

目前, 化疗性静脉炎动物模型多经兔耳缘静脉^[4-6]和小鼠尾静脉^[7-8]注射发疱药物诱导。另外, 在大鼠尾静脉及兔耳缘静脉周围皮下注射刺激药物亦可构建化疗性静脉炎动物模型^[9]。本课题组前期经大鼠足背静脉注射3~5 mg/mL长春瑞滨溶液成功构建了静脉炎模型, 表现为局部红肿及条索状静脉, 甚至皮肤溃烂, 与以往模型比较具有操作简单及接近临床症状的特点^[10]。为进一步明确化疗性静脉炎的宏观病症和微观结构变化特点, 本研究从静脉炎分级、患肢肿胀率、患肢局部皮肤温度、患肢承重占比、血管病理学和内膜表面结构等方面多时间点动态评价长春瑞滨溶液诱导的大鼠后肢足背静脉炎模型, 以期为后续开展病理机制研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验动物及饲养环境

SPF级雄性SD大鼠28只, 11周龄, 体重为(330±10) g, 购自北京华阜康生物科技股份有限公司[SCXK(京)2019-0008], 饲养在山西中医药大学屏障环境实验室[SYXK(晋)2020-0006]。本研究方案通过山西中医药大学医学伦理委员会和山西省中医药研究院医学伦理委员会批准(AWE202312409、SZYLY2024KY-0302), 所有实验操作均符合实验动物伦理要求。

1.2 主要试剂与仪器

酒石酸长春瑞滨注射液(江苏豪森药业集团有限公司, 批号600210701); 异氟烷(山东安特牧业科技有限公司, 批号151987015); 脱毛膏[利洁时(苏州)有限公司, 批号11734]; R540IE型小动物麻醉机(深圳瑞沃德生命科技股份有限公司); PV-200型足趾容积测量仪和PH-200型双足平衡测痛仪(成都泰盟科技有限公司); 628C型红外热像仪[含AnalyzeIR分析系统, 飞础科智慧科技(上海)有限公司]; SU8100型扫描电子显微镜(日本Hitachi公司); BX61正置显微镜(日本Olympus公司); HM325型石蜡切片机(美国Thermo Fisher Scientific公司)。

1.3 大鼠足背静脉炎模型制作及评价流程

28只大鼠用脱毛膏脱去右后肢背侧毛发备皮, 次日经2%异氟烷麻醉, 橡皮筋结扎后肢踝关节上2 cm处以充分显露静脉, 医用酒精(即75%乙醇溶液)棉

球擦拭足背, 0.45 mm×1.5 mm输液针穿刺足背静脉。其中20只大鼠一次性注射0.1 mL质量浓度为4 mg/mL的长春瑞滨溶液, 作为模型组; 8只大鼠注射等体积生理盐水(即0.9% NaCl溶液), 作为对照组。注射完成后, 按压针口至无血液外漏。每日观察对照组和模型组(随机抽取8只)大鼠的活动、进食及被毛等情况, 记录静脉炎分级, 测量患肢体积, 计算肿胀率, 拍摄热像图, 记录患肢局部皮肤温度, 测量患肢承重占比, 持续9 d。同时, 分别在第1天、第3天、第5天和第7天, 从其余12只模型组大鼠中随机选取3只处死, 取从注射点至近心端1 cm处的静脉组织进行病理学观察。第9天观察结束后, 对照组和模型组8只大鼠均处死, 同法取材。

1.4 模型评价相关指标

肿胀率: 采用排水法测量患肢体积。将实验大鼠后肢放入容积测量仪装有水的烧杯中, 浸入至踝关节上2 cm处, 待示数稳定后记录水体积。计算公式: 肿胀率(%) = (造模后容积 - 造模前初始容积) / 造模前初始容积 × 100%。

患肢承重占比: 将大鼠放入双足平衡测痛仪, 倾斜测试盒使其左、右后足分别置于左、右压力传感器中央, 待动物安静后记录双足压力。计算公式: 承重占比(%) = 右后足压力 / 双足压力总和 × 100%。

皮肤温度: 将大鼠右后肢向外平展于水平桌面, 用红外热像仪于距离45 cm高度处垂直拍摄患肢从注射点至向心端5 cm的部位, 用AnalyzeIR系统自动分析病灶部位平均温度。

静脉炎分级: 每日肉眼观察大鼠患肢颜色、肿胀及皮损程度等, 参考美国护理学会2021年版《输液治疗护理实践标准静脉炎分级标准》^[11]进行评级: 无症状为0级; 穿刺点局部发红为I级; 局部红斑或水肿为II级; 红斑、水肿、条索状静脉为III级; 红斑和水肿显著, 条索状静脉形成, 伴局部溃烂或脓液流出, 记为IV级。

1.5 大鼠静脉组织病理学观察

采用CO₂安乐死法处死大鼠, 取右后肢足背(从注射点至向心端1 cm范围)静脉组织置于3%戊二醛溶液中固定4 h, 用0.1 mol/L磷酸缓冲液漂洗3次, 每次10 min; 然后放入1%锇酸溶液中固定2 h, 用0.1 mol/L磷酸缓冲液漂洗3次, 每次10 min; 经乙醇溶液梯度脱水后冷冻干燥, 经离子溅射仪镀膜制作电镜标本, 用扫描电子显微镜观察静脉血管内膜超微结构。同时留取一部分后肢静脉组织置于4%多聚甲醛溶液中

固定过夜，常规脱水，石蜡包埋，切片，苏木精-伊红染色后，光学显微镜下观察病理学变化。

1.6 统计学分析

采用SPSS 27.0软件分析实验数据。肿胀率、患肢承重占比和皮肤温度用平均数±标准差表示，采用独立样本 t 检验进行组间比较；2组间的静脉炎分级比较则采用Kruskal-Wallis H 非参数检验。以 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 足背静脉炎模型大鼠的患肢外观变化

实验期间两组大鼠状态良好，被毛平顺有光泽，饮水及进食正常。如图1A所示，对照组大鼠右后肢皮肤光滑润泽且无红肿；模型组大鼠在注射后第1天可见右后肢红肿及充血性红斑；第3天患肢肿胀进一步加剧，局部皮肤破溃及脱屑；第5天红肿减轻，脱屑减少，溃烂面积开始缩小；第7天红肿明显消退，脱屑进一步减少，溃烂处干燥结痂；第9天结痂颜色变浅，可观察到条索状静脉或串珠样静脉堵塞。

2.2 足背静脉炎模型大鼠的患肢肿胀率变化

对照组大鼠在实验期间右后肢无肿胀，而注射长春瑞滨溶液的模型组大鼠右后肢第1天即出现明显肿胀，第3天肿胀程度最严重，之后至第9天逐渐减轻。不同时间点的两组大鼠注射侧后肢肿胀率数据见表1；在同一时间点比较，模型组大鼠的患肢肿胀率均大于对照组，差异有统计学意义（ $P<0.01$ ）。

2.3 足背静脉炎模型大鼠的患肢承重占比变化

如表1所示，对照组大鼠在实验期间右后肢承重占比均约为双足总压力的50%，且无明显变化；与对

照组比较，模型组大鼠的右后肢承重占比在造模后第1天即出现明显降低（ $P<0.01$ ），第3天降至最低（ $P<0.001$ ），此后逐步上升，从第7天开始基本恢复至与对照组无显著差异（ $P>0.05$ ）。

2.4 足背静脉炎模型大鼠的患肢皮肤温度变化

采用红外热成像仪检测大鼠右后肢皮肤温度，红外成像如图1B所示，不同时间的皮肤温度数据见表1。结果显示，对照组大鼠的患肢局部皮肤温度较为一致，平均温度维持在34℃左右；而模型组大鼠在第3~5天患肢局部发热，发热范围集中于踝关节以上至后肢根部，其中第3天升至（35.17±0.81）℃，第5天达峰值为（36.36±0.40）℃，与对照组对应同一时间点相比差异均具有显著的统计学意义（ $P<0.01$ ， $P<0.001$ ），第9天基本恢复正常。

2.5 足背静脉炎模型大鼠的患肢静脉炎分级变化

实验期间每日记录两组大鼠患肢的静脉炎分级，如表2所示。对照组大鼠静脉炎分级均为0级。模型组大鼠第1天后肢红肿，II级占比为75.0%；第3天肿胀加剧，多数大鼠出现条索状静脉，且局部有溃烂或有脓液流出，III级、IV级各占37.5%；第5、7和9天则以III级为主，局部溃烂逐渐恢复，仍可见条索状静脉，至第9天II级和III级分别占37.5%和62.5%。Kruskal-Wallis H 非参数检验显示，模型组在不同时间点的患肢静脉炎分级与对照组比较均有统计学意义（ $H=34.11$ ， $P<0.05$ ）。

2.6 足背静脉炎模型大鼠的患肢静脉组织病理学变化

苏木精-伊红染色法观察大鼠右后肢足背静脉组织病理学改变，如图2A所示。对照组大鼠静脉管腔中

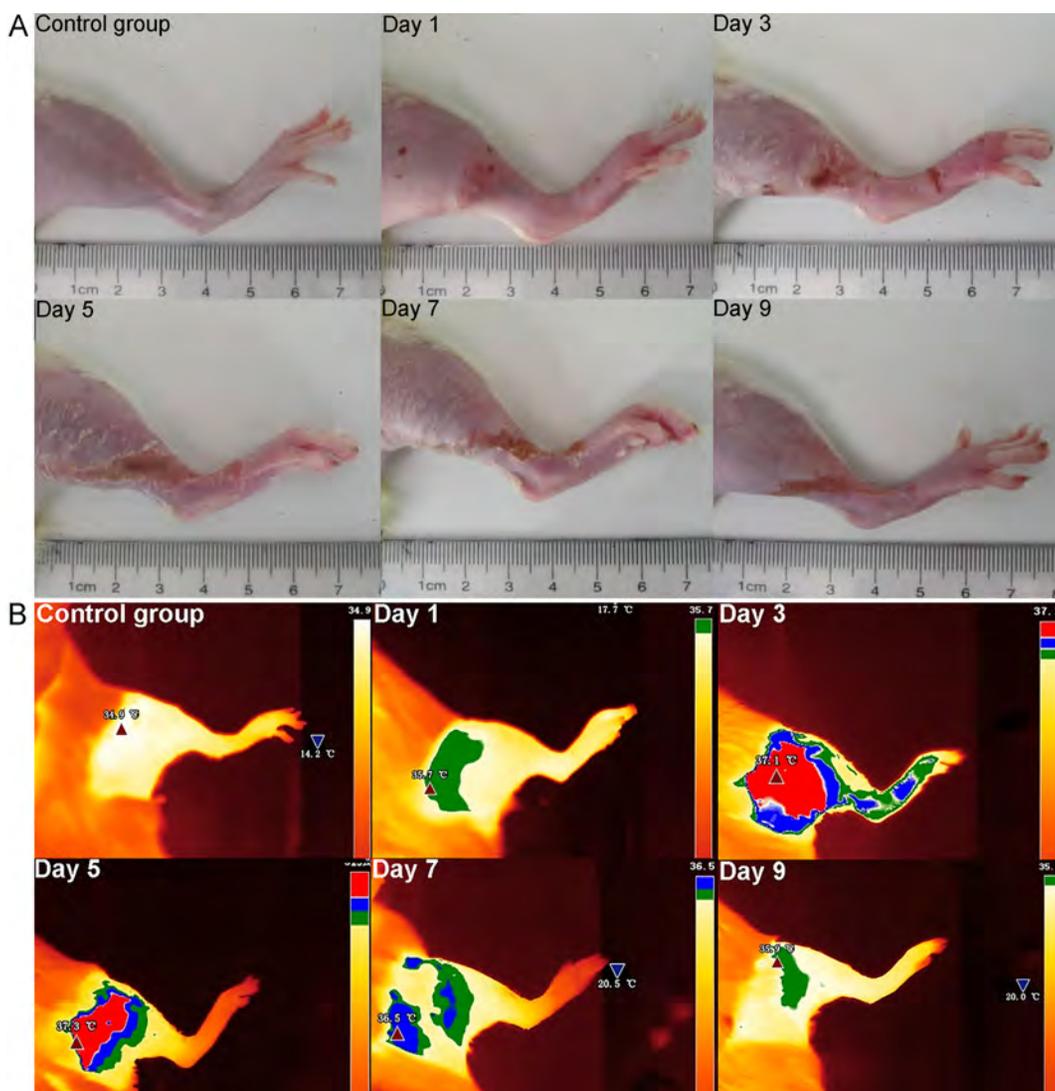
表1 足背静脉炎模型大鼠不同时间点的患肢肿胀率、承重占比和平均温度

Table 1 Swelling rate, weight-bearing ratio, and average temperature of the injured limb of phlebitis model rats at different time points

时间点 Time points	肿胀率/% Swelling rate/%		承重占比/% Proportion of weight-bearing capacity/%		平均温度/℃ Average temperature/℃	
	对照组 Control group	模型组 Model group	对照组 Control group	模型组 Model group	对照组 Control group	模型组 Model group
	($\bar{x} \pm s$)					
Day 1	0.91±0.89	25.49±7.93**	51.44±0.04	44.58±0.86**	34.35±0.58	34.75±0.68
Day 3	0.99±0.53	81.89±15.75***	49.92±1.75	36.35±4.91***	33.85±0.42	35.17±0.81**
Day 5	1.51±0.30	63.03±1.41***	49.49±0.09	44.29±0.08**	34.03±0.77	36.36±0.40***
Day 7	1.58±0.44	29.75±5.91**	49.90±1.85	47.71±0.25	35.10±0.43	35.28±0.80
Day 9	0.30±0.17	15.41±0.33**	50.86±1.49	49.67±1.19	34.40±0.44	34.88±0.63

注：每组8只大鼠（ $n=8$ ）；与对照组同一时间点比较，** $P<0.01$ ，*** $P<0.001$ 。

Note: Each group consisted of 8 rats ($n=8$); compared with the control group at the same time points, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.



注: A, 患肢外观; B, 红外热成像 (平均温度: $>35.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 且 $\leq 35.9\text{ }^{\circ}\text{C}$ 呈绿色, $>35.9\text{ }^{\circ}\text{C}$ 且 $\leq 36.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 呈蓝色, $>36.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 呈红色)。对照组大鼠于右后肢足背静脉注射0.1 mL生理盐水, 模型组大鼠于右后肢足背静脉注射0.1 mL长春瑞滨溶液(4 mg/mL), 连续观察9 d (Day 1、Day 3、Day 5、Day 7和Day 9分别指模型组第1、3、5、7和9天)。

Note: A, appearance of the injured hindlimb; B, infrared thermal imaging (average temperature: $>35.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ and $\leq 35.9\text{ }^{\circ}\text{C}$, green; $>35.9\text{ }^{\circ}\text{C}$ and $\leq 36.5\text{ }^{\circ}\text{C}$, blue; $>36.5\text{ }^{\circ}\text{C}$, red). The control group rats were injected with 0.1 mL of saline solution into the dorsal vein of the right hind limb, while the model group rats were injected with 0.1 mL of vinorelbine solution (4 mg/mL). Observation continued for 9 consecutive days. Day 1, Day 3, Day 5, Day 7, and Day 9 refer to the first, third, fifth, seventh, and ninth day after modeling, respectively.

图1 足背静脉炎模型大鼠不同时间点的患肢外观(A)和红外热成像(B)图

Figure 1 Appearances (A) and infrared thermal images (B) of the injured limbs of phlebitis model rats at different time points

空, 内皮细胞排列整齐。模型组大鼠第1天静脉周围组织轻微水肿, 有少量炎性细胞浸润; 第3天静脉周围组织明显水肿, 大量炎性细胞浸润, 内膜不规则破溃, 管壁纤维性增生变厚; 第5天内膜纤维性增生导致管壁增厚并管腔狭窄, 管腔聚集大量红细胞; 第7天静脉壁增厚, 内膜向管腔内凸起并有脱落, 同时可见血栓; 第9天静脉内膜纤维性增生严重, 占据管腔并有血栓形成。

2.7 足背静脉炎模型大鼠的患肢静脉内膜微观结构变化

扫描电子显微镜观察大鼠右后肢静脉血管内膜表面微观结构变化, 如图2B所示。对照组大鼠静脉内膜可见纵行内皮细胞长轴, 内膜完整光滑。模型组大鼠第1天静脉内皮细胞紧密连接轻微破坏, 内膜表面破损以及剥脱; 第3天内膜破溃且表面粗糙, 粘附血细胞; 第5天则基本缺失光滑表面, 可见大量隆起内皮

表2 足背静脉炎模型大鼠在不同时间点的静脉炎分级

Table 2 Grading of phlebitis model rats at different time points

组别 Groups	[n(%)]					P值 Pvalue
	0级 0 grade	I级 I grade	II级 II grade	III级 III grade	IV级 IV grade	
Control group	8 (100.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	-
Day 1	0 (0.0)	2 (25.0)	6 (75.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1.000
Day 3	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (25.0)	3 (37.5)	3 (37.5)	0.001***
Day 5	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (25.0)	4 (50.0)	2 (25.0)	0.001***
Day 7	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (37.5)	5 (62.5)	0 (0.0)	0.014*
Day 9	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (37.5)	5 (62.5)	0 (0.0)	0.014*

注：每组8只大鼠 (n=8)，与对照组比较，*P<0.05，***P<0.001。

Note: Each group consisted of 8 rats (n=8); compared with the control group, *P<0.05, ***P<0.001.

细胞；第7天静脉内膜缺失，至第9天可见不规则褶皱及隆起。

3 讨论

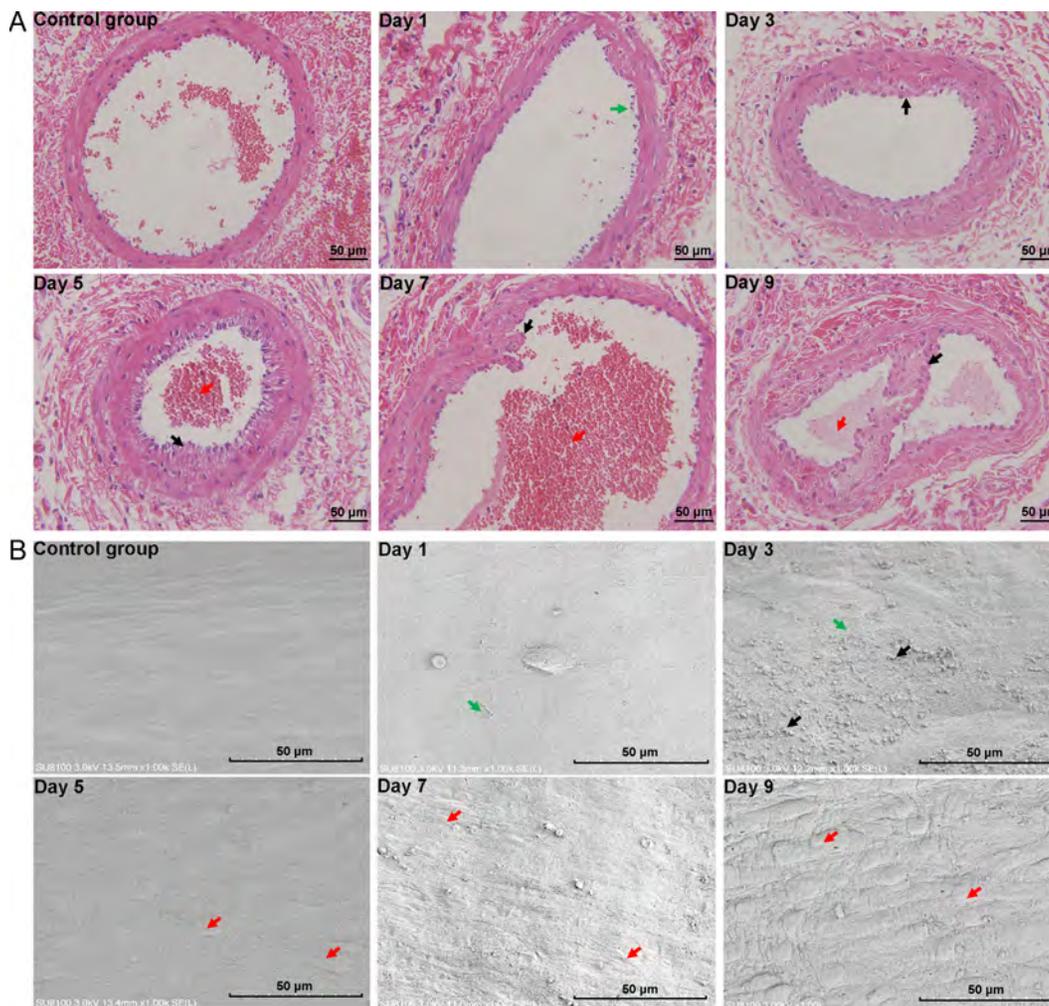
化疗性静脉炎是临床输液过程中常见的不良反应。本课题组根据多年临床经验，牵头制定了《化疗后静脉炎中医诊疗专家共识》并经中华中医药学会发布^[12]。目前，常通过兔耳缘静脉或小鼠尾静脉注射刺激性药物构建化疗性静脉炎动物模型。兔耳缘静脉表浅清晰、覆毛少，但饲养条件高、成本昂贵，实际操作中兔耳缘静脉易扩张且耳温波动幅度大；小鼠易于饲养且成本低廉，但尾巴表面覆盖环状角质鳞片且尾静脉走行较深，不利于注射。兔耳和小鼠尾巴的肌肉软组织较少，所复制的静脉炎症状与临床实际存在一定差距，此外因解剖结构复杂，获取静脉组织困难，不利于血管微观结构观察。相比之下，大鼠足背静脉沿足背表面走行，其起始于跖骨静脉且向近心端上行至踝关节后汇合于外侧隐静脉^[13]。因大鼠后肢接近人手背和前臂的解剖结构，故本课题组前期经大鼠后肢足背静脉注射长春瑞滨溶液成功构建了静脉炎模型^[14]，并初步用于课题组开发的复方藤芷凝胶贴膏剂药效学评价研究^[15]。本研究在前期研究基础上重点观察该模型在不同时间点的患肢肿胀率、局部皮肤温度和承重占比，以及静脉炎分级、血管病理学和内膜表面结构等指标，进一步明确长春瑞滨溶液诱导大鼠后肢足背静脉炎模型的局部症状和静脉组织病理学变化特点。

本研究首先观察经后肢足背静脉注射长春瑞滨溶液诱导的静脉炎模型大鼠的红肿热痛和静脉炎分级随时间的变化情况。红外热成像测温技术是一种基于红外辐射原理的非接触式测温手段，能够迅速捕捉并显

示物体表面的温度分布情况^[16]。排水法则可以测量患肢肿胀率，双足平衡仪可测试患肢痛阈值。研究结果表明，长春瑞滨溶液注射造模的第1~3天为炎症急性期，局部炎症逐步加重，患肢局部皮肤温度逐渐升高，炎症病灶部位充血，出现患肢发红或红斑，炎性渗出物导致局部肿胀，并造成机械性阻塞等，进一步的缺血或缺氧等原因引起营养障碍性皮炎和组织坏死；至第3天，静脉炎分级以III~IV级为主，肿胀率到达峰值，患肢承重占比到达最低，提示痛觉最为明显；第5天时，患肢局部皮肤温度达到最高，但红肿及痛觉逐渐消退，溃烂处结痂，皮肤出现干燥脱皮及萎缩，并可观察到静脉栓塞，至第7天红斑、发热和痛觉明显消退；第9天皮炎消失，但静脉炎分级仍以III级为主，多数呈现条索状静脉，双足承重基本平衡且局部皮肤温度与正常大鼠相比已无明显差异，但仍有肿胀。

血管内皮细胞是覆盖于血管内膜表面的单层扁平或多角形细胞，可合成和分泌多种血管生物活性物质，在调节血管张力与血流，维持纤溶凝血系统平衡，防止血小板聚集等方面具有重要作用^[17-19]。正常大鼠足背静脉内膜完整，内皮细胞紧密排列。而静脉炎模型大鼠造模后组织损伤引发炎症反应，第1天血管周围轻微水肿，内皮细胞紧密连接出现破坏；第3天水肿加重，管壁纤维性增生，血管内膜破损严重，粘附大量血细胞；第5~7天管腔可见增生凸起物，管壁增厚，血管内膜粗糙；第9天管腔内可见血栓或严重纤维性增生，内膜可见褶皱及不规则隆起。这些结果表明静脉内皮细胞急性损伤可引起血管内膜结构异常，表现为慢性期的血管栓塞及条索状改变。

总体来看，经大鼠后肢足背静脉单次注射0.1 mL质量浓度为4 mg/mL的长春瑞滨溶液诱导的静脉炎模型在第3~5天以局部红、肿、热、痛为典型特征，至



注：A为HE染色观察静脉组织病理学变化（绿色箭头指示内膜不规则破溃；黑色箭头指示内膜纤维性增生；红色箭头指示血栓）；B为电子显微镜观察静脉血管内膜微观结构（绿色箭头指示内膜破溃；黑色箭头指示血细胞粘附；红色箭头指示内皮细胞隆起）。对照组大鼠于右后肢足背静脉注射0.1 mL生理盐水，模型组大鼠于右后肢足背静脉注射0.1 mL长春瑞滨溶液（4 mg/mL），连续观察9 d（Day 1、Day 3、Day 5、Day 7和Day 9分别为造模第1、3、5、7和9天）。

Note: A, histopathological changes of vein tissue stained by hematoxylin-eosin (HE) (green arrows indicate irregular rupture of the inner membrane; black arrows indicate intimal fibrous hyperplasia; red arrows indicate thrombosis); B, microstructure of vascular intima observed by scanning electron microscopy (SEM) (green arrows indicate inner membrane rupture; black arrows indicate adhesion of blood cells; red arrows indicate elevated endothelial cells). The control group rats were injected with 0.1 mL of saline solution into the dorsal vein of the right hind limb, while the model group rats were injected with 0.1 mL of vinorelbine solution (4 mg/mL). Observation continued for 9 consecutive days. Day 1, Day 3, Day 5, Day 7, and Day 9 refer to the first, third, fifth, seventh, and ninth days after modeling, respectively.

图2 足背静脉炎模型大鼠在不同时间点的静脉组织病理学（×400）和血管内膜微观结构（×1 000）

Figure 2 Histopathology of vein tissues (×400) and microstructure of vascular intima (×1 000) in phlebitis model rats at different time points

第9天基本消退，但局部静脉呈现瘀血条索状，静脉组织管壁增厚、管腔狭窄，同时静脉内膜破损、粗糙甚至缺失，可导致血流滞缓甚至血栓形成，从而影响血液循环。本研究构建的静脉炎大鼠模型具有操作简单和性价比高的优势，尤其是症状及病理变化接近临床病程，为相关治疗药物的开发和病理生理机制研究提供了一种潜在工具。

[医学伦理声明 Medical Ethics Statement]

本研究涉及的所有动物实验方案均已通过山西中医药大学医学伦理委员会和山西省中医药研究院医学伦理委员会批准（审批号分别为AWE202312409和SZYLY2024KY-0302）。所有实验操作遵照中国实验动物相关法律法规条例要求进行。All animal experimental protocols involved in this study were approved by the Medical Ethics Committee of Shanxi University of Chinese Medicine and Medical Ethics

Committee of Shanxi Province Academy of Traditional Chinese Medicine (Approval No. AWE202312409, SZLY2024 KY-0302). All experimental operations were carried out in accordance with the requirements of the relevant laws and regulations on experimental animals in China.

[作者贡献 Author Contribution]

姜萌负责完成动物实验及论文初稿撰写；

郝淑兰负责实验监督与指导；

全立国和仲启明负责数据整理、分析及论文修改；

高振飞负责实验指标测定；

王永辉负责提供实验动物、设施及场地；

王晞星和吉海杰负责实验方案设计及论文修订。

[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] BIGDELI SHAMLOO M B, NASIRI M, MANEY M, et al. Effects of topical sesame (*Sesamum indicum*) oil on the pain severity of chemotherapy-induced phlebitis in patients with colorectal cancer: a randomized controlled trial[J]. Complement Ther Clin Pract, 2019, 35: 78-85. DOI: 10.1016/j.ctcp.2019.01.016.
- [2] GREGORY R K, SMITH I E. Vinorelbine: a clinical review[J]. Br J Cancer, 2000, 82(12):1907-1913. DOI:10.1054/bjoc.2000.1203.
- [3] 刘花, 陈延坤, 尤慧柠, 等. 长春瑞滨药动学及毒副作用研究进展[J]. 中国药房, 2022, 33(11):1403-1408. DOI: 10.6039/j.issn.1001-0408.2022.11.21.
LIU H, CHEN Y S, YOU H N, et al. Research progress on pharmacokinetics and toxicity of vinorelbine[J]. China Pharm, 2022, 33(11):1403-1408. DOI: 10.6039/j.issn.1001-0408.2022.11.21.
- [4] HUANG L, CHEN G, HU Q, et al. Construction of a rabbit model with vinorelbine administration via peripherally inserted central catheter and dynamic monitoring of changes in phlebitis and thrombosis[J]. Exp Ther Med, 2022, 23(3):212. DOI:10.3892/etm.2022.11135.
- [5] GE G F, SHI W W, YU C H, et al. Baicalein attenuates vinorelbine-induced vascular endothelial cell injury and chemotherapeutic phlebitis in rabbits[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2017, 318:23-32. DOI:10.1016/j.taap.2017.01.013.
- [6] 张咏梅, 宋凌霄, 王玲, 等. 虎杖膏预防高渗药液致兔耳缘静脉炎的实验研究[J]. 护理学杂志, 2013, 28(21):36-38. DOI: 10.3870/hlzz.2013.21.036.
ZHANG Y M, SONG L X, WANG L, et al. Experimental study on giant knotweed cream for prevention of inflammation of rabbit ear vein induced by intravenously administered hypertonic solution[J]. J Nurs Sci, 2013, 28(21):36-38. DOI: 10.3870/hlzz.2013.21.036.
- [7] LIU P, YE L C, REN Y S, et al. Chemotherapy-induced phlebitis via the GBP5/NLRP3 inflammasome axis and the therapeutic effect of aescin[J]. Br J Pharmacol, 2023, 180(8):1132-1147. DOI: 10.1111/bph.16002.
- [8] WANG Z, MA L J, WANG X B, et al. Cimetidine attenuates vinorelbine-induced phlebitis in mice by militating E-selectin expression[J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2014, 74(2):239-247. DOI:10.1007/s00280-014-2487-8.
- [9] ZHANG H Y, GONG J, ZHANG S Y, et al. N-acetylcysteine attenuates the incidence of phlebitis induced by carbomer / vinorelbine gel[J]. Heliyon, 2023, 9(11): e21235. DOI:10.1016/j.

heliyon.2023.e21235.

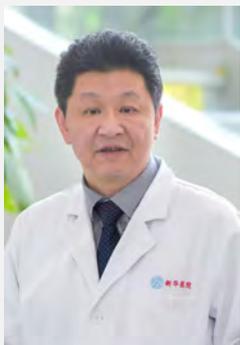
- [10] 王淑敏, 郝淑兰, 冯玛莉, 等. 长春瑞滨诱导化疗性静脉炎大鼠模型的构建和评价[J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(12):1539-1544. DOI: 10.3969/j.issn.1005-4847.2023.12.003.
WANG S M, HAO S L, FENG M L, et al. Construction and evaluation of a chemotherapeutic phlebitis rat model induced by vinorelbine via the dorsalis pedis vein[J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(12):1539-1544. DOI: 10.3969/j.issn.1005-4847.2023.12.003.
- [11] GORSKI L A, HADAWAY L, HAGLE M E, et al. Infusion therapy standards of practice, 8th edition[J]. J Infus Nurs, 2021, 44(1S Suppl 1): S1-S224. DOI:10.1097/NAN.0000000000000396.
- [12] 中华中医药学会. 化疗后静脉炎中医诊疗专家共识[EB/OL]. [2024-11-05]. <https://www.cacm.org.cn/2023/01/05/21290/>.
China Association of Chinese Medicine. Consensus of Traditional Chinese Medicine experts on diagnosis and treatment of phlebitis after chemotherapy[EB/OL]. [2024-11-05]. <https://www.cacm.org.cn/2023/01/05/21290/>.
- [13] ALWORTH L C, KELLY L M, COOPER T L, et al. Unassisted blood collection from unanesthetized rats and gerbils[J]. Lab Anim (NY), 2012, 41(6):155-156. DOI:10.1038/labon0612-155.
- [14] 郝淑兰, 王晞星, 吉海杰, 等. 一种化疗性静脉炎大鼠模型的构建方法: CN115568441A[P]. 2023-01-06.
HAO S L, WANG X X, JI H J, et al. Construction method of a rat model of chemotherapy-induced phlebitis: CN115568441A [P]. 2023-01-06.
- [15] 姜萌, 郝淑兰, 全立国, 等. 复方藤芷凝胶贴膏剂制备工艺及透皮主要成分研究[J]. 辽宁中医药大学学报, 2024, 26(9):57-63. DOI: 10.13194/j.issn.1673-842x.2024.09.011.
JIANG M, HAO S L, TONG L G, et al. Research on the preparation process and transdermal main components of Fufang Tengzhi gel plaster [J]. J Liaoning Univ Tradit Chin Med, 2024, 26(9):57-63. DOI: 10.13194/j.issn.1673-842x.2024.09.011.
- [16] KIM H, KWAK S H, BYEON J Y, et al. An experimental and clinical study of flap monitoring with an analysis of the clinical course of the flap using an infrared thermal camera [J]. Bioengineering (Basel), 2024, 11(7): 688. DOI: 10.3390/bioengineering11070688.
- [17] LEE H W, XU Y Y, HE L Q, et al. Role of venous endothelial cells in developmental and pathologic angiogenesis[J]. Circulation, 2021, 144(16): 1308-1322. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.121.054071.
- [18] TOMBOR L S, JOHN D, GLASER S F, et al. Single cell sequencing reveals endothelial plasticity with transient mesenchymal activation after myocardial infarction[J]. Nat Commun, 2021, 12(1):681. DOI:10.1038/s41467-021-20905-1.
- [19] JIANG M, ZHANG Y X, BU W J, et al. Piezo1 channel activation stimulates ATP production through enhancing mitochondrial respiration and glycolysis in vascular endothelial cells[J]. Br J Pharmacol, 2023, 180(14): 1862-1877. DOI:10.1111/bph.16050.

(收稿日期: 2024-11-06 修回日期: 2025-02-07)

(本文责任编辑: 张俊彦)

[引用本文]

- 姜萌, 郝淑兰, 全立国, 等. 长春瑞滨诱导大鼠足背静脉炎模型动态评价研究[J]. 实验动物与比较医学, 2025, 45(3): 251-258. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.163.
- JIANG M, HAO S L, TONG L G, et al. Dynamic evaluation of vinorelbine-induced phlebitis of dorsalis pedis vein in a rat model [J]. Lab Anim Comp Med, 2025, 45(3): 251-258. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.163.



金立伦, 主任医师, 硕士研究生导师, 现任上海交通大学医学院附属新华医院中医科主任, 并担任上海市中医药学会第四届综合性医院中医药工作委员会副主任委员、上海市中医药学会第二届针刀分会副主任委员及上海市中医药学会第十届骨伤科分会常务委员等职务。从事中医临床工作三十年, 擅长运用内服、外治、针刀手法等各类中医适宜技术治疗各种骨伤科疾病。作为金氏中医经方派第五代传人, 传承全国首批五百名老中医药专家、学术经验继承导师、上海名老中医金明渊的学术思想, 擅用传统经方诊治各类内科杂病, 注重中西医结合, 倡导整体治疗理念。其主持的“魏氏伤科消瘀散治疗膝关节炎基础及临床研究”获2016年上海市中医药科技三等奖, “基于活血散瘀外治法治疗膝关节炎的规范化研究及其机制探讨”获2017年上海中西医结合科学技术奖二等奖; 其整理先祖父金明渊撰写的《伤寒方历代治案》获华东地区科技出版社优秀科技图书一等奖、2013年度全国优秀古籍图书奖二等奖。发表论文40余篇。主持上海市科委等立项基金课题10余项, 获国家专利2项。

秦皮素对碘乙酸钠诱导骨关节炎模型大鼠的软骨保护与抗炎作用

刘智伟, 杨然, 连浩, 张玉, 金立伦

(上海交通大学医学院附属新华医院中医科, 上海 200092)

[摘要] **目的** 建立大鼠骨关节炎模型, 研究秦皮素对骨关节炎大鼠的抗炎作用及机制。**方法** 18只8周龄雄性SPF级SD大鼠随机分为3组: 空白组大鼠右膝关节腔注射50 μ L生理盐水并连续1周; 模型组和干预组大鼠右膝关节腔注射碘乙酸钠(monosodium iodoacetate, MIA)造模, 干预组再注射秦皮素(5 mg·kg⁻¹·d⁻¹)并连续干预1周。药物干预后4周, 采集腹主动脉血, 安乐死动物后采集膝关节软骨。采用苏木精-伊红染色、番红O-固绿染色和甲苯胺蓝染色进行膝关节软组织的组织病理学观察以及Mankin和OARSI评分, 并用micro-CT扫描系统比较分析每组膝关节的骨体积分数、骨表面积密度和骨小梁数目。采用酶联免疫吸附试验法检测各组大鼠血清中多种炎症因子[肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、白细胞介素6 (interleukin-6, IL-6)]以及软骨寡聚基质蛋白(cartilage oligomeric matrix protein, COMP)的表达。采用蛋白质印迹法测定膝关节软骨中丝裂原活化蛋白激酶p38 (mitogen-activated protein kinase p38, p38 MAPK)、磷酸化丝裂原活化蛋白激酶p38 (phosphorylation-p38 MAPK, p-p38 MAPK)、c-Jun氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)、磷酸化JNK氨基末端激酶(phosphorylation-JNK, p-JNK)的表达。**结果** 大鼠膝关节软骨切片染色显示, 模型组的关节面缺损严重, 干预组的软骨破坏相对减轻。micro-CT显示, 干预组的骨体积分数、骨表面积密度和骨小梁数目均明显高于模型组($P < 0.05$); 模型组的Mankin评分明显高于空白组($P < 0.05$), 干预组的Mankin评分明显低于模型组($P < 0.05$); 而干预组的OARSI评分明显低于模型组($P < 0.05$)。酶联免疫吸附试验结果显示, 模型组大鼠血清中TNF- α 、IL-1 β 、IL-6和COMP含量均明显高于空白组(均 $P < 0.05$), 而干预组含量明显低于模型组(均 $P < 0.05$)。蛋白质印迹结果显示, 干预组膝关节软骨组织中p-p38 MAPK和p-JNK表达水平明显低于模型组(均 $P < 0.05$), 而模型组的p-p38 MAPK和p-JNK蛋白表达水平明显高于空白组(均 $P < 0.05$)。**结论** 秦皮素药物干预可能通过p38 MAPK通路对碘乙酸钠诱导的骨关节炎模型大鼠发挥治疗作用。

[关键词] 秦皮素; 骨关节炎; 软骨; 炎症; 大鼠

[中图分类号] Q95-33; R-332 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2025)03-0259-10



Cartilage Protection and Anti-Inflammatory Effects of Fraxetin on Monosodium Iodoacetate-Induced Rat Model of Osteoarthritis

[基金项目] 上海市进一步加快中医药传承创新发展三年行动计划项目“北部区域中医骨关节病专病联盟建设”[ZY(2021-2023)-03-02-25]

[第一作者] 刘智伟(1997—),男,硕士研究生,研究方向:膝关节炎的发病机制与中药干预。E-mail:rickyliu13@163.com

[通信作者] 金立伦(1967—),男,硕士,主任医师,研究方向:膝关节炎的发病机制与中药干预。E-mail:jinlilun@xinhuamed.com.cn。ORCID: 0000-0001-9840-836X

LIU Zhiwei, YANG Ran, LIAN Hao, ZHANG Yu, JIN Lilun

(Traditional Chinese Medicine Department, Xinhua Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200092, China)

Correspondence to: JIN Lilun (ORCID: 0000-0001-9840-836X), E-mail: jinlilun@xinhuaumed.com.cn

[ABSTRACT] Objective To establish a rat model of osteoarthritis and study the anti-inflammatory effects and mechanisms of fraxetin. **Methods** Eighteen 8-week-old male SPF-grade SD rats were randomly divided into three groups: Rats in the blank group received a right articular cavity injection of 50 μL of normal saline for 1 week; the model and intervention groups were injected with monosodium iodoacetate (MIA) into the right joint cavity to induce osteoarthritis, while the intervention group subsequently received fraxetin ($5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$) for 1 week. Four weeks after drug intervention, abdominal aortic blood was collected. The animals were then euthanized, and knee joint cartilage were collected. The cartilage samples were stained with hematoxylin-eosin, safranin O-fast green, and toluidine blue for histopathological examination and scoring using the Mankin and OARSI scoring systems. The trabecular bone volume/total volume (Tb.BV/TV), trabecular bone surface density/total volume (Tb.BS/TV), and trabecular number (Tb.N) of each group were compared and analyzed using a micro-CT scanning system. The expression levels of various inflammatory factors [tumor necrosis factor α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6)], and cartilage oligomeric matrix protein (COMP) were measured using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The expression levels of mitogen-activated protein kinase p38 (p38 MAPK), phosphorylation-p38 MAPK (p-p38 MAPK), c-Jun N-terminal kinase (JNK), and phosphorylation-JNK (p-JNK) were measured by western blotting. **Results** The staining of cartilage sections of rat knee joints showed that the articular surface defects in the model group were severe, while the cartilage destruction in the intervention group was relatively reduced. Micro-CT results showed that Tb.BV/TV, Tb.BS/TV and Tb.N in the intervention group were significantly higher than those in the model group ($P < 0.05$); the Mankin score in the model group was significantly higher than that in the blank group ($P < 0.05$), the Mankin score in the intervention group was significantly lower than that in the model group ($P < 0.05$); while the OARSI score in the intervention group was significantly lower than that in the model group ($P < 0.05$). The results of the enzyme-linked immunosorbent assay showed that the serum levels of TNF- α , IL-1 β , IL-6, and COMP in the model group were significantly higher than those in the blank group (all $P < 0.05$), while those in the intervention group were significantly lower than in the model group ($P < 0.05$). Western blot results showed that the expression levels of p-p38 MAPK and p-JNK in the knee cartilage tissue were significantly lower in the intervention group than in the model group (both $P < 0.05$), and significantly higher in the model group than in the blank group (both $P < 0.05$). **Conclusion** Fraxetin may play a therapeutic role in a monosodium iodoacetate-induced rat model of osteoarthritis through the p38 MAPK pathway.

[Key words] Fraxetin; Osteoarthritis; Cartilage; Inflammation; Rats

骨关节炎 (osteoarthritis, OA) 是一种复杂的退行性关节疾病, 发病率高, 导致骨关节疼痛、僵硬和功能受限, 严重影响患者生活质量, 并增加医疗负担, 目前亟需有效的治疗药物^[1]。中医药治疗骨关节炎拥有悠久的历史, 且越来越多的证据表明中医药具有更好的治疗效果^[2]。上海魏氏伤科外治敷贴中疗效突出的经验方消瘀散具有消肿止痛、活血化瘀等功效, 其贴膏外敷联合针刀治疗膝OA效果显著, 不良反应少^[3]; 动物实验发现, 消瘀散可修复OA兔关节软骨

损伤, 降低软骨组织中基质金属蛋白酶 (matrix metallo-proteinase, MMP) 13 的表达^[4]。然而, 该方药物成分多, 有时会出现皮肤瘙痒不适等反应, 因此本课题组考虑在消瘀散精简方 (大黄、紫荆皮、三七、乳香) 基础上再加入秦皮。秦皮的有效成分之一秦皮素, 有收涩止痢、止带、明目之功效, 可用于治疗湿热泻痢、赤白带下、目赤肿痛和目生翳膜, 亦有抗炎镇痛、清热解毒的作用^[5]。本课题组在前期的体外细胞实验中通过转录组学分析发现, 秦皮素能够调控OA

大鼠膝关节滑膜组织中 *MMP12*、乌头酸脱羧酶 1 (aconitate decarboxylase 1, *Acod1*) 和 ATP6V0D2 蛋白 (ATPase H⁺ transporting lysosomal 38kDa V0 subunit D isoform 2, *Atp6v0d2*) 等基因的表达^[6], 且通过大鼠软骨细胞中的 Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4) /髓样分化因子 88 (myeloid differentiation factor 88, MyD88) /核因子 κ B (nuclear factor kappa-B, NF- κ B) 通路抑制 IL-1 β 诱导的细胞炎症^[7]。秦皮素对 OA 动物模型的作用及其机制亟待深入挖掘。

OA 的主要特征是关节软骨丢失, 导致骨关节的结构、功能和代谢状态不断变化^[8]。炎症和细胞凋亡贯穿于 OA 的整个进展过程^[9]。促炎细胞因子如肿瘤坏死因子 α (tumour necrosis factor- α , TNF- α)^[10]、白细胞介素 (interleukin, IL) -1 β ^[10] 和 IL-6^[11] 被认为是诱导细胞凋亡和破坏软骨的关键细胞因子, 在血清中的表达水平可作为 OA 的生物标志。此外, 软骨寡聚基质蛋白 (cartilage oligomeric matrix protein, COMP) 也是 OA 的血清学指标之一^[12]。同时, OA 的发展还与 Wnt/ β -catenin、NF- κ B 等信号通路有关^[13], 其中 NF- κ B 信号通路可诱导降解酶的分泌。例如, 基质金属蛋白酶类 (matrix metalloproteinases, MMPs)、整合素样金属蛋白酶与凝血酶 4/5 型抗体 (a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 4/5, ADAMTS4/5) 可导致关节软骨降解^[14]。此外, 磷酸化-丝裂原活化蛋白激酶 p38 (phosphorylated p38 mitogen-activated protein kinase, p-p38 MAPK) 抗体^[15] 和磷酸化 c-Jun 氨基末端激酶 (phosphorylated c-Jun N-terminal kinase, p-JNK) 在 OA 大鼠中表达显著升高^[16], 提示阻断 p-p38 MAPK 信号通路可能抑制 OA 软骨细胞的凋亡和相关促炎细胞因子的表达。本课题组结合以上研究结果推测, 秦皮素治疗 OA 的作用机制也可能与这些信号通路有关。因此, 本研究通过碘乙酸钠 (monosodium iodoacetate, MIA) 诱导建立 OA 动物模型, 在动物体内验证秦皮素治疗 OA 的作用机制, 从而为魏氏伤科消瘀散的改良并用于治疗 OA 提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物

8 周龄 SPF 级雄性 SD 大鼠 18 只, 体重 290~330 g, 由上海吉辉实验动物饲养有限公司 [SCXK (沪) 2022-0009] 提供, 质量合格证号为 20220009010285。

实验动物饲养于上海交通大学医学院附属新华医院实验动物屏障设施 [SYXK (沪) 2023-0048], 室温 (22 \pm 2) $^{\circ}$ C, 相对湿度 40%~60%, 12 h 明/暗循环, 且提供高压蒸汽和过滤除菌后的实验动物饮用水及钴⁶⁰辐照灭菌饲料 (由江苏省协同医药生物工程有限责任公司提供), 饲养 1 周以适应环境。动物实验方案获得上海交通大学医学院附属新华医院医学伦理委员会审查批准 (XHEC-F-2024-077)。

1.2 主要试剂与仪器

秦皮素 (F396636, 化学名称为 7,8-二羟基-6-甲氧基香豆素, 纯度 \geq 98%) 与 MIA (S104897, 纯度 \geq 99%) 购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司。蛋白酶抑制剂混合物 (P1005, 通用型, 100 \times)、RIPA 裂解液 (P0013B)、苏木精-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色试剂盒 (C0105S)、番红 O-固绿软骨染色试剂盒 (C0621S)、甲苯胺蓝染色液 (C0637) 和高灵敏 TMB 显色液 (P0206) 均购自上海碧云天生物技术有限公司。p38 MAPK 单抗 (A4771)、p-p38 MAPK 多抗 (AP1508)、JNK 多抗 (A25329)、p-JNK 多抗 (AP0105) 和 GAPDH 多抗 (AC054) 及辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗 (RM70003) 购自武汉爱博泰克生物科技有限公司; 测定 TNF- α (ab236712)、IL-1 β (ab221834)、IL-6 (ab234570)、COMP (ab11056) 的酶联免疫吸附试验 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒购自英国 Abcam 公司。

CO₂ 窒息安乐死设备为本院动物房自制; 5430R 超速离心机购自美国 LI-COR Biosciences 公司; KA-1000 台式离心机购自上海安亭科学仪器厂; SpectraMax[®] iD3 微板阅读器、BCA 试剂盒和 ChemiDoc MP 成像系统均为美国 Bio-Rad 公司产品; 活体型 micro-CT 扫描系统 (vivaCT80) 为瑞士 Scanco Medical AG 公司产品。

1.3 实验动物模型的建立与药物干预

将 18 只 SD 大鼠分为空白组、模型组和干预组, 每组 6 只。3 组大鼠用剃刀备皮且经碘伏消毒后, 腹腔注射 2% 戊巴比妥钠 (0.3 mL/100 g), 使动物深度麻醉。动物取仰卧位, 屈曲右侧膝关节, 充分暴露关节内侧, 对右膝关节进行碘伏和 95% 乙醇溶液擦拭消毒后, 于髌骨内侧进针入髌上囊, 向模型组和干预组关节腔内单次注射 50 μ L 新鲜配制的 MIA (60 mg/mL)^[7], 同时向空白组单次注射 50 μ L 生理盐水。MIA 注射后的第 3 天开始, 干预组右膝关节腔内注射 50 μ L 秦皮素 (5 mg \cdot kg⁻¹ \cdot d⁻¹, 溶于 50 μ L 生理盐水), 连续 7 d。模

型组和空白组大鼠的右膝关节腔内注射等量生理盐水,连续7 d。术后观察大鼠伤口有无渗血、红肿、化脓,并检测大鼠的生命体征,维持环境的清洁与干燥。

1.4 血液及膝关节软骨取材

药物干预结束后4周,采集各组大鼠的腹主动脉血5 mL。静置1 h后离心(4 000×g, 15 min)取血清,保存于-80 °C冰箱,待后续ELISA检测。采用CO₂窒息法安乐死大鼠,收集膝关节软骨,用4%多聚甲醛溶液浸泡固定后,一部分置于液氮中暂时保存,另一部分置于-80 °C冰箱长期保存。

1.5 膝关节软组织的组织病理学观察及评分

膝关节软骨在4%多聚甲醛溶液中浸泡固定24 h后,经脱钙液脱钙1周、石蜡包埋、切片,分别采用HE、番红O-固绿和甲苯胺蓝染色法进行骨组织病理学观察,根据试剂说明书进行操作。

采用Mankin评分标准^[5]评估软骨退变程度,从软骨结构完整性、软骨细胞、软骨基质番红染色、软骨基质甲苯胺蓝染色和潮标线完整性共5个方面进行评分。总分范围为0~14分,分值判定标准:0~1分为正常,2~6分为OA早期,7~10分为OA中期,11~14分为OA晚期。

采用国际骨关节炎研究学会(Osteoarthritis Research Society International, OARSI)半定量评分标准^[16]评估OA严重程度。评分指标及其赋分:软骨结构(0~8分)、软骨基质情况(0~6分)、软骨细胞分布及数量(0~3分)、潮线完整性(0~1分)及骨赘形成(0~3分)。合计分值越大,OA炎症程度越严重。

1.6 膝关节的micro-CT成像及微观定量分析

将在4%多聚甲醛溶液中固定24 h后的完整膝关节,用活体型micro-CT扫描系统(vivaCT80)以5 μm的空间分辨率(55 kV, 114 mA, 500 ms的积分时间)扫描胫骨,采用NRecon软件重构图片,使用CTAn软件分析3D定量参数,分析膝关节软骨骨量变化^[17]。测量软骨下骨小梁区域的相关参数:骨体积分数(trabecular bone volume/total volume, Tb.BV/TV)、骨表面积密度(trabecular bone surface density/total volume, Tb.BS/TV)、骨小梁数量(trabecular number, Tb.N)。

1.7 ELISA法检测血清炎症因子含量

按照TNF-α、IL-1β、IL-6、COMP测定用ELISA试剂盒说明,将标准品和每组大鼠血清样品(100 μL)分别加入96孔板中,室温孵育2 h。PBS清洗后加入100 μL一抗,室温孵育1 h。清洗后每孔加入100 μL

二抗,室温孵育45 min。清洗后每孔加入100 μL显色剂,室温避光孵育30 min。加入50 μL终止液终止反应。用微板阅读器检测各样品中TNF-α、IL-1β、IL-6和COMP含量,检测波长为450 nm。

1.8 蛋白提取与免疫印迹法检测

从液氮中取出各组大鼠的膝关节软骨,放入EP管,加入含20 μL蛋白酶抑制剂苯甲基磺酰氟的180 μL RIPA裂解液及钢珠,置入预冷的组织研磨器中研磨,然后在4 °C条件下离心(12 000×g)10 min后,吸出上清液。使用BCA试剂盒测定蛋白浓度。每组样本的上样量为30 μg,用10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(浓缩胶80 V,分离胶120 V 60 min)分离蛋白后,电转移到PVDF膜(300 mA, 400 V, 45 min),然后用5%牛血清白蛋白封闭溶液快速封闭。加入p38 MAPK、p-p38 MAPK、JNK、p-JNK和GAPDH(内参)一抗,4 °C孵育过夜。PBS洗膜后,加入对应的二抗,37 °C孵育1 h。使用增强化学发光法检测免疫反应条带,并使用ChemiDoc MP成像系统和Image J软件定量分析目的蛋白条带的相对表达量。

1.9 统计学分析

采用GraphPad Prism 9.0软件进行统计分析,结果数据以平均值±标准差表示。采用单因素方差分析和Tukey多重比较检验进行各组间差异分析。 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

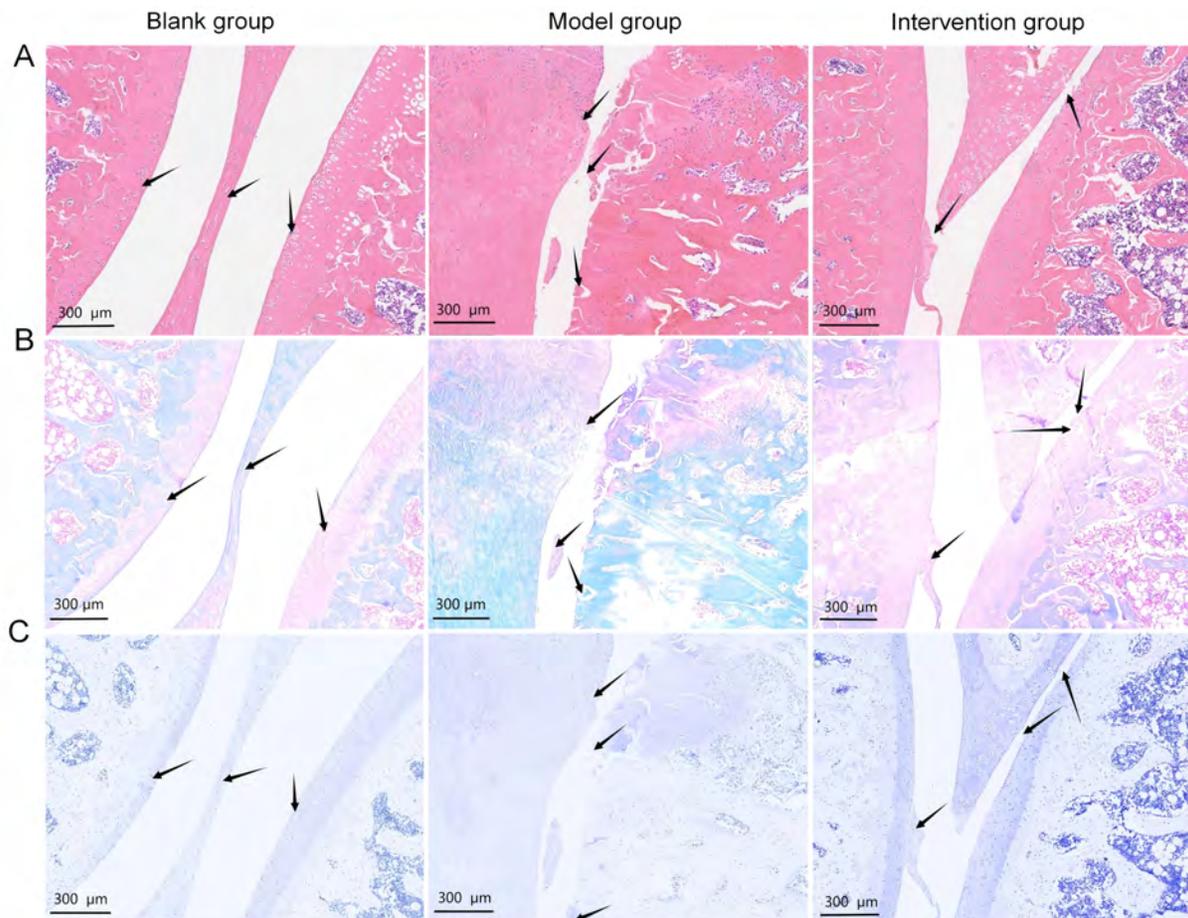
2 结果

2.1 大鼠膝关节软骨组织学染色与评分

HE(图1A)、番红O-固绿(图1B)和甲苯胺蓝(图1C)染色结果显示,与空白组相比,OA模型组大鼠的膝关节软骨出现了严重侵蚀与缺损,软骨表面不连续,可见剥脱与磨损;秦皮素干预组的软骨虽出现侵蚀与缺损,但破坏程度较模型组有明显改善。Mankin评分和OARSI评分结果见表1,统计分析显示,模型组评分均明显升高(均 $P<0.05$),而干预组评分明显低于模型组(均 $P<0.05$),差异具有统计学意义。结果提示秦皮素在一定程度上延缓了骨关节炎大鼠的膝关节破坏和磨损。

2.2 大鼠膝关节的micro-CT成像及骨小梁微观结构

各组大鼠膝关节的三维重建CT结果显示,空白组的胫骨平台表面平滑完整,模型组的胫骨平台骨质缺失严重、增生较多,干预组的骨质缺失较模型组轻



注：A、B、C分别为3组大鼠膝关节软骨组织的苏木精-伊红、番红O-固绿、甲苯胺蓝染色结果（比例尺为300 μm ，黑色箭头指向膝关节软骨表面）。空白组指先向右膝关节腔注射50 μL 生理盐水，再腔内连续7 d注射50 μL 生理盐水的大鼠；模型组指右膝关节腔内单次注射50 μL 新鲜配制的（60 mg/mL）碘乙酸钠建立膝关节炎动物模型，再连续7 d注射50 μL 生理盐水的大鼠；干预组指右膝关节腔内单次注射50 μL 新鲜配制的（60 mg/mL）碘乙酸钠后，再连续7 d每天注射5 mg/kg秦皮素（溶于50 μL 生理盐水）的大鼠。

Note: A, B, and C are the staining results of hematoxylin-eosin, safranin O-fast green, and toluidine blue in the knee cartilage tissue of three groups of rats (scale bar = 300 μm , the black arrow in the picture points to the surface of the knee cartilage). The blank group refers to rats that were first injected with 50 μL of normal saline into the right knee joint cavity, followed by intra-articular injections of 50 μL of normal saline for 7 consecutive days; the model group refers to rats that were injected with one time injection of 50 μL fresh prepared monosodium iodoacetate (60 mg/mL) in the right knee joint cavity to induce osteoarthritis, followed by injections of 50 μL of normal saline for 7 consecutive days; the intervention group refers to rats that were injected with one time injection of 50 μL fresh prepared monosodium iodoacetate (60 mg/mL) in the right knee joint cavity, followed by fraxetin injections (5 mg $\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, dissolved in 50 μL of normal saline) for 7 consecutive days.

图1 碘乙酸钠注射造模及秦皮素药物干预后大鼠膝关节软骨组织病理学变化

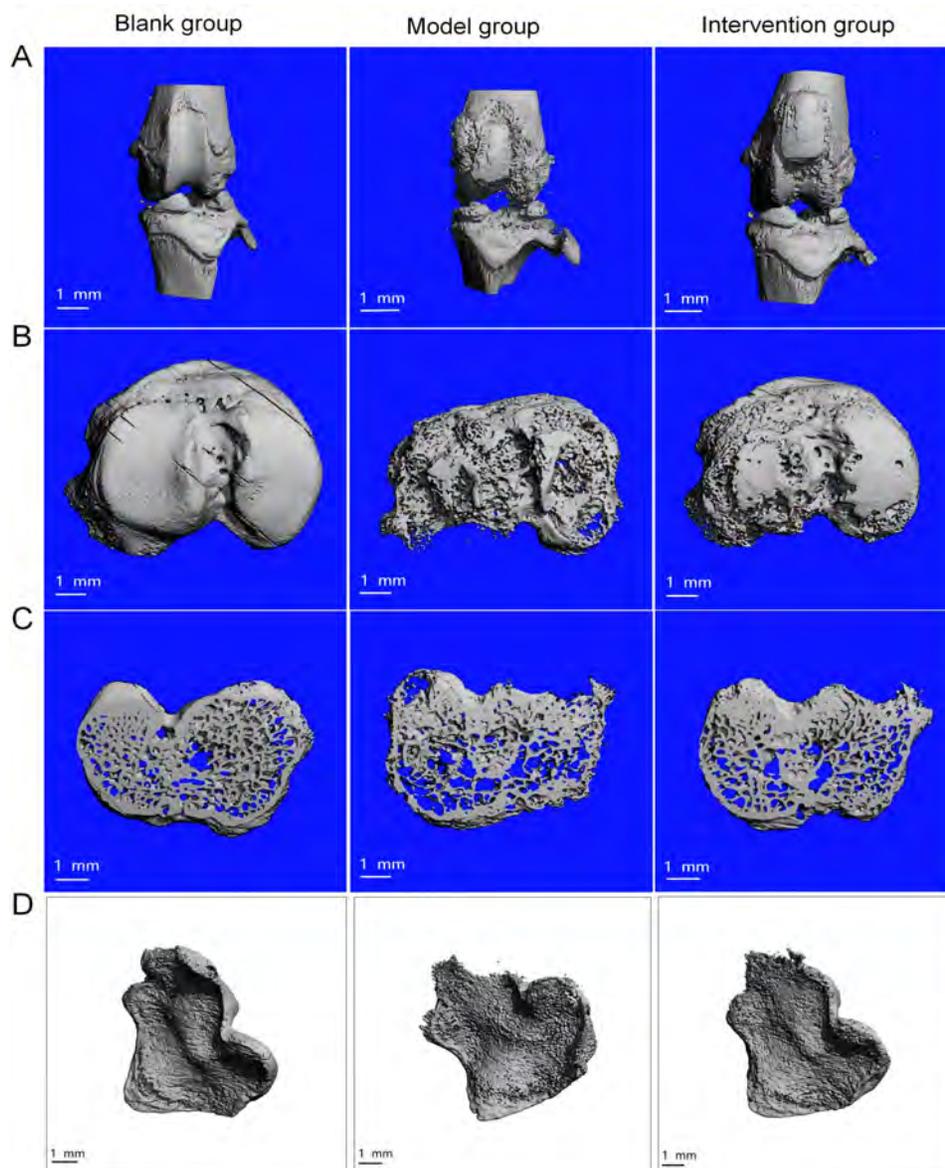
Figure 1 Histopathological changes in rat knee joint cartilage after monosodium iodoacetate injection and fraxetin intervention

（图2），说明秦皮素在一定程度上可抑制骨质增生和骨质的缺失。相关参数定量分析显示，干预组的骨体积分数、骨表面积密度以及骨小梁数目均大于模型组（ $P<0.05$ ，表1），提示秦皮素可以延缓膝关节胫骨平台骨质、骨小梁的丢失。

2.3 大鼠血清和膝关节软骨中炎症因子及其通路蛋白的表达

ELISA结果显示，模型组大鼠的血清炎症因子如

TNF- α 、IL-1 β 、IL-6和COMP的含量明显高于空白组（均 $P<0.05$ ），而干预组的血清TNF- α 、IL-1 β 、IL-6和COMP含量明显低于模型组（均 $P<0.05$ ，图3A~D）。蛋白质印迹法检测结果（图3E~G）显示，模型组大鼠膝关节软骨组织中p-p38 MAPK和p-JNK蛋白相对表达水平相对于空白组明显升高（均 $P<0.05$ ），而干预组相对模型组则明显降低（均 $P<0.05$ ）。



注：A、B、C、D分别从膝关节3D层面、胫骨平台、软骨下骨水平面以及横截面特定区域截面扫描3组大鼠膝关节，观察相关骨质情况，评价骨关节炎情况。空白组指先向右膝关节腔注射50 μL 生理盐水，再腔内连续7 d注射50 μL 生理盐水的大鼠；模型组指右膝关节腔内单次注射50 μL 新鲜配制的60 mg/mL碘乙酸钠建立膝骨关节炎动物模型，再连续7 d注射50 μL 生理盐水的大鼠；干预组指右膝关节腔内单次注射50 μL 新鲜配制的60 mg/mL碘乙酸钠后，再连续7 d每天注射5 mg/kg秦皮素（溶于50 μL 生理盐水）的大鼠。

Note: A, B, C, and D represent micro-CT images of the knee joints of three groups of rats, scanned at the levels of 3D reconstruction, the tibial platform, the subchondral bone, and specific cross-sectional regions, to assess bone structure and evaluate osteoarthritis changes. The blank group refers to rats that were first injected with 50 μL of normal saline into the right knee joint cavity, followed by intra-articular injections of 50 μL of normal saline for 7 consecutive days; the model group refers to rats that were injected with one time injection of 50 μL fresh prepared monosodium iodoacetate (60 mg/mL) in the right knee joint cavity to induce osteoarthritis, followed by injection of 50 μL of normal saline for 7 consecutive days; the intervention group refers to rats that were injected with one time injection of 50 μL fresh prepared monosodium iodoacetate (60 mg/mL) in the right knee joint cavity, followed by intra-articular injections of fraxetin (5 mg $\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, dissolved in 50 μL of normal saline) for 7 consecutive days.

图2 碘乙酸钠注射造模及秦皮素药物干预后大鼠膝关节的micro-CT成像

Figure 2 Micro-CT imaging of the rat knee joint after monosodium iodoacetate injection and fraxetin treatment

3 讨论

OA是全球范围内导致残疾和慢性疼痛的主要原因之一^[1]。随着世界人口老龄化和肥胖症发病率的升

高，人们对治疗骨关节的需求日益增加^[18-19]，这促使科研工作者不断探索治疗OA的潜在药物。传统药用植物是治疗OA的潜在药物宝库，许多植物及其提取物在

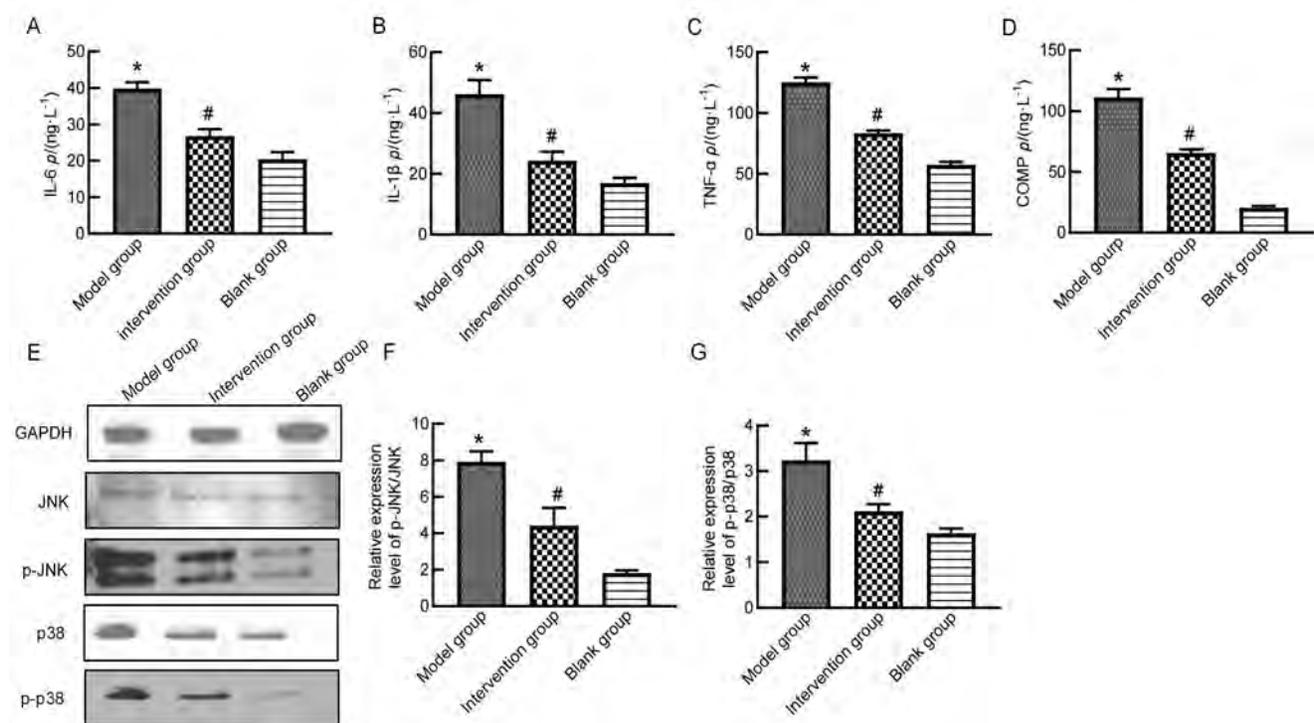
表1 不同组大鼠膝关节软骨的Mankin评分、OARSI评分、骨体积分数、骨表面积密度、骨小梁数量比较

Table 1 Comparison of Mankin score, OARSI score, Tb.BV/TV, Tb.BS/TV, and Tb.N of knee cartilage among different groups

分组 Group	动物数量 <i>n</i>	Mankin评分 Mankin score	OARSI评分 OARSI score	骨体积分数 Tb.BV/TV	骨表面积密度/(mm ² ·mm ⁻³) Tb.BS/TV	骨小梁数量/mm ⁻¹ Tb.N
空白组 Blank group	6	1.17±0.75	1.83±0.75	0.59±0.01	17.44±0.60	3.72±0.21
模型组 Model group	6	10.67±1.86*	8.00±1.41*	0.25±0.02*	13.28±0.86*	2.47±0.19*
干预组 Intervention group	6	5.67±0.82#	5.50±1.05#	0.38±0.02#	15.59±0.50#	3.29±0.14#

注：OARSI即国际骨关节炎研究学会；Tb.BV/TV为骨体积分数；Tb.BS/TV为骨表面密度；Tb.N为骨小梁数量。与空白组相比，**P*<0.05；与模型组相比，#*P*<0.05。

Note: OARSI, Osteoarthritis Research Society International; Tb.BV/TV, trabecular bone volume/total volume; Tb.BS/TV, trabecular bone surface density/total volume; Tb.N, trabecular number. Compared with the blank group, **P*<0.05; compared with the model group, #*P*<0.05.



注：A~D分别为ELISA法检测各组大鼠血清IL-6、IL-1β、TNF-α、COMP含量变化。E为蛋白质印迹法检测各组大鼠膝关节软骨组织中p38 MAPK、JNK、p-p38 MAPK、p-JNK蛋白表达。F、G为p-JNK/JNK、p-p38 MAPK/p38 MAPK蛋白表达量比值（反映JNK、p38磷酸化程度，代表通路激活程度）。空白组指先向右膝关节腔注射50 μL生理盐水，再腔内连续7 d注射50 μL生理盐水的大鼠；模型组指右膝关节腔内单次注射50 μL新鲜配制的60 mg/mL碘乙酸钠建立膝关节炎动物模型，再连续7 d注射50 μL生理盐水的大鼠；干预组指右膝关节腔内单次注射50 μL新鲜配制的60 mg/mL碘乙酸钠后，再连续7 d每天注射5 mg/kg秦皮素（溶于50 μL生理盐水）的大鼠。每组6只大鼠（*n*=6），与空白组相比，**P*<0.05；与模型组相比，#*P*<0.05。

Note: A-D, show the serum levels of IL-6, IL-1β, TNF-α, and COMP detected by ELISA. E shows the expression of p38 MAPK, JNK, p-p38 MAPK, and p-JNK proteins in knee cartilage tissues detected by Western blotting. F and G show the ratios of p-JNK/JNK and p-p38 MAPK/p38 MAPK, reflecting the phosphorylation levels of JNK and p38, which indicate the activation levels of the corresponding pathways. The blank group refers to rats that were first injected with 50 μL of normal saline into the right knee joint cavity, followed by intra-articular injections of 50 μL of normal saline for 7 consecutive days; the model group refers to rats that were injected with one time injection of 50 μL fresh prepared monosodium iodoacetate (60 mg/mL) in the right knee joint cavity to induce osteoarthritis, followed by intra-articular injections of 50 μL of normal saline for 7 consecutive days; the intervention group refers to rats that were injected with one time injection of 50 μL fresh prepared monosodium iodoacetate (60 mg/mL) in the right knee joint cavity, followed by intra-articular injections of fraxetin (5 mg·kg⁻¹·d⁻¹, dissolved in 50 μL of normal saline) for 7 consecutive days. There were 6 rats in each group (*n*=6). Compared with the blank group, **P*<0.05; compared with the model group, #*P*<0.05.

图3 秦皮素药物干预后大鼠血清和膝关节软骨组织中炎症相关蛋白的表达

Figure 3 Expression of inflammation-related proteins in rat serum and knee cartilage after fraxetin treatment

体内外都已被证明治疗 OA 有效,但其作用机制不明确,且缺乏有力的实验证据支持^[20]。已有研究表明,秦皮素通过丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPKs)通路产生抗肝纤维化作用^[21],在肠道炎症性疾病中发挥抗炎作用^[22],还可通过抑制 p38 信号通路在体内抑制破骨细胞分化和形成^[17]。本课题组前期研究了秦皮素对 OA 细胞体外模型的作用,本研究进一步探索其在 OA 大鼠模型中对软骨破坏和炎症的治疗作用及机制。

OA 大鼠的造模方法有很多,其中 MIA 注射已成为在大鼠和小鼠中模拟 OA 关节破坏的标准造模法,且该方法简便易行^[23]。本研究中造模结果显示,模型组大鼠出现软骨细胞死亡、新血管形成、软骨下骨塌陷坏死以及炎症反应,其形态学变化和软骨破坏程度与临床 OA 患者的膝关节病理变化高度相似。模型组的膝关节软骨组织学染色及评分都显示软骨破坏严重,在 CT 三维重建的基础上,模型组大鼠的胫骨平台骨质缺失严重。以上结果提示,本研究成功建立了 OA 大鼠模型。

OA 的关键特点之一是软骨下骨骨质丢失^[8]。本研究发现,模型组大鼠经秦皮素药物干预后,软骨破坏及骨质缺失程度得到了明显缓解, Mankin 和 OARSI 评分相对于模型组显著降低,提示秦皮素对大鼠膝关节软骨有保护作用;进一步分析发现,秦皮素干预组的骨体积分数、骨表面积密度以及骨小梁数目相比模型组均明显增加($P < 0.05$),提示秦皮素治疗可以减轻膝关节软骨下骨骨质丢失,但具体机制还有待进一步探索。

已知炎症因子参与软骨炎症的病理过程。慢性炎症是 OA 的诱因和疾病加重因素,常见的促炎细胞因子如 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 是 OA 病理过程中的关键介质^[11]。COMP 作为早期膝 OA 的诊断和预后生物标志物,在血清中含量与 OA 进展呈正相关^[24]。本研究结果表明,注射秦皮素后,OA 大鼠血清中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 和 COMP 表达量均明显降低,表明秦皮素可能参与调节 OA 的炎症反应。

MAPK 家族信号通路中的 p38 和 JNK 是诱导软骨细胞凋亡、基质降解和进一步软骨破坏的重要信号分子^[25]。同时,MAPK 对 TNF- α 、IL-1 或 IL-6 等的产生以及导致关节破坏发炎的下游信号通路转导起到关键的调节作用^[1,26],阻断 p38 MAPK 信号通路可抑制促炎细胞因子表达及软骨破坏。本研究结果显示,秦

皮素注射后 OA 大鼠膝关节软骨组织中 p38 MAPK 和 JNK 的磷酸化活化受到抑制,推测秦皮素对软骨的保护作用和抗炎机制可能与 p38 MAPK 通路有关。

本研究结果表明,秦皮素是治疗 OA 的潜在药物,且其作用机制可能与 p38 MAPK 通路有关。本课题组下一步将纳入西药对照,例如非甾体抗炎药、氨基葡萄糖、透明质酸等,必要时结合中药、西药联合疗法分组,对中药、西药、中西药联合治疗 OA 的临床实践开展深入研究。

【医学伦理声明 Medical Ethics Statement】

该研究涉及的动物实验方案获得上海交通大学医学院附属新华医院医学伦理委员会审查批准(批号:XHEC-F-2024-077)。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 experimental protocols involved in this study were reviewed and approved by the Medical Ethics Committee of Xinhua Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University School of Medicine (Approval No. XHEC-F-2024-077), and all experimental procedures were carried out in compliance with relevant Chinese laws, regulations and rules on laboratory animals.

【作者贡献 Author Contribution】

刘智伟负责动物实验、结果数据的统计分析及 Prism 作图、初稿写作及修改;
杨然参与动物实验及其结果分析;
连浩负责实验方案策划;
张玉负责文献检索,参与动物实验;
金立伦负责实验方案的有效性验证,以及项目资金管理和实验监督指导。

【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] GIORGINO R, ALBANO D, FUSCO S, et al. Knee osteoarthritis: epidemiology, pathogenesis, and mesenchymal stem cells: what else is new? an update[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(7):6405. DOI:10.3390/ijms24076405.
- [2] ZHAO J L, YANG W Y, LIANG G H, et al. The efficacy and safety of Jinwu Gutong capsule in the treatment of knee osteoarthritis: a meta-analysis of randomized controlled trials [J]. *J Ethnopharmacol*, 2022, 293: 115247. DOI: 10.1016/j.jep.2022.115247.
- [3] 王庆,冯文昌,庄迪,等.消瘀散贴膏联合针刀治疗膝骨关节炎的疗效及对炎症因子的影响[J]. *辽宁中医杂志*, 2020, 47(10):155-159. DOI: 10.13192/j.issn.1000-1719.2020.10.048.
WANG Q, FENG W C, ZHUANG D, et al. Clinical effect of Xiaoyusan plaster combined with acupotomy on knee osteoarthritis and its effect on inflammatory factors[J]. *Liaoning J Tradit Chin Med*, 2020, 47(10): 155-159. DOI: 10.13192/j.issn.1000-1719.2020.10.048.

- [4] 崔若琳, 王庆, 杨玲, 等. 消痰散新组方修复膝骨关节炎模型兔的软骨损伤及 MMP-13 表达[J]. 实验动物与比较医学, 2023, 43(1): 30-38. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2022.099.
CUI R L, WANG Q, YANG L, et al. Repair effects of Xiaoyusan new formula on cartilage injury and MMP-13 expression in knee osteoarthritis model rabbits[J]. Lab Anim Comp Med, 2023, 43(1):30-38. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2022.099.
- [5] 曹桂云, 宁波, 秦金淼, 等. 基于标准汤剂的秦皮(白蜡树)配方颗粒质量标准分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29(13):122-129. DOI: 10.13422/j.cnki.syfjx.20230148.
CAO G Y, NING B, QIN J M, et al. Analysis on quality standard of fraxini cortex (*Fraxinus chinensis*) dispensing granules based on standard decoction[J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2023, 29(13): 122-129. DOI: 10.13422/j. cnki. syfjx. 20230148.
- [6] 杨凌, 庄迪, 金立伦. 转录组测序筛选大鼠滑膜炎差异表达基因及秦皮素治疗靶点的体外验证[J]. 实验动物与比较医学, 2023, 43(1):11-20. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2022.100.
YANG L, ZHUANG D, JIN L L. Screening of differentially expressed genes in rat synovitis by transcriptome sequencing and *in vitro* verification of therapeutic target of fraxetin[J]. Lab Anim Comp Med, 2023, 43(1): 11-20. DOI: 10. 12300/j.issn.1674-5817.2022.100.
- [7] WANG Q, ZHUANG D, FENG W C, et al. Fraxetin inhibits interleukin-1 β -induced apoptosis, inflammation, and matrix degradation in chondrocytes and protects rat cartilage *in vivo*[J]. Saudi Pharm J, 2020, 28(12):1499-1506. DOI:10.1016/j. jsp.2020.09.016.
- [8] WU Q, YAO X B, SHAN N, et al. Platelet-rich plasma ameliorates cartilage degradation in rat models of osteoarthritis *via* the OPG/RANKL/RANK system[J]. Folia Histochem Cytobiol, 2024, 62(3): 154-164. DOI: 10.5603/fhc. 100179.
- [9] 李培金, 韩倩, 王威, 等. 姜黄素治疗骨关节炎过程中潜在的铁死亡关键基因的分析与验证[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2024, 26(9):2455-2465. DOI:10.11842/wst.20230705004.
LI P J, HAN Q, WANG W, et al. Analysis and verification of potential ferroptosis key genes in curcumin treatment of osteoarthritis[J]. World Sci Technol-Mod Tradit Chin Med Mater Med, 2024, 26(9):2455-2465. DOI:10.11842/wst. 20230705004.
- [10] XU Z X, KE T, ZHANG Y F, et al. Danshensu inhibits the IL-1 β -induced inflammatory response in chondrocytes and osteoarthritis possibly *via* suppressing NF- κ B signaling pathway[J]. Mol Med, 2021, 27(1): 80. DOI:10.1186/s10020-021- 00329-9.
- [11] KOVÁCS B, VAJDA E, NAGY E E. Regulatory effects and interactions of the Wnt and OPG-RANKL-RANK signaling at the bone-cartilage interface in osteoarthritis[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(18):4653. DOI:10.3390/ijms20184653.
- [12] ROSAS S, KWOK A, MOORE J, et al. Osteoarthritis as a systemic disease promoted prostate cancer *in vivo* and *in vitro*[J]. Int J Mol Sci, 2024, 25(11): 6014. DOI: 10.3390/ ijms25116014.
- [13] YAO Q, WU X H, TAO C, et al. Osteoarthritis: pathogenic signaling pathways and therapeutic targets[J]. Signal Transduct Target Ther, 2023, 8(1):56. DOI:10.1038/s41392-023- 01330-w.
- [14] ULIVI V, GIANNONI P, GENTILI C, et al. p38/NF- κ B-dependent expression of COX-2 during differentiation and inflammatory response of chondrocytes[J]. J Cell Biochem, 2008, 104(4): 1393-1406. DOI:10.1002/jcb.21717.
- [15] LU J S, ZHANG H B, PAN J Y, et al. Fargesin ameliorates osteoarthritis *via* macrophage reprogramming by downregulating MAPK and NF- κ B pathways[J]. Arthritis Res Ther, 2021, 23(1):142. DOI:10.1186/s13075-021-02512-z.
- [16] DING D, YAN J B, FENG G N, et al. Dihydroartemisinin attenuates osteoclast formation and bone resorption *via* inhibiting the NF- κ B, MAPK and NFATc1 signaling pathways and alleviates osteoarthritis[J]. Int J Mol Med, 2022, 49(1): 4. DOI:10.3892/ijmm.2021.5059.
- [17] LIAO J C, WEI Z X, ZHAO C, et al. Inhibition of osteoclastogenesis for periprosthetic osteolysis therapy through the suppression of p38 signaling by fraxetin[J]. Int J Mol Med, 2018, 42(3):1257-1264. DOI:10.3892/ijmm.2018.3698.
- [18] 蔡宛儒, 余芳. 髌膝联合电针治疗早期膝骨关节炎的临床研究[J]. 湖北中医药大学学报, 2024, 26(5):88-90. DOI:10.3969/j.issn. 1008-987x.2024.05.24.
CAI W R, YU F. Clinical research on hip-knee coherent electro-acupuncture in treating early knee osteoarthritis[J]. J Hubei Univ Chin Med, 2024, 26(5): 88-90. DOI: 10.3969/j. issn. 1008-987x.2024.05.24.
- [19] 任国飞, 李同林, 卞恒杰. 抗骨增生胶囊联合洛索洛芬钠治疗早期膝骨关节炎的临床研究[J]. 现代药物与临床, 2024, 39(10): 2651-2655. DOI:10.7501/j.issn.1674-5515.2024.10.034.
REN G F, LI T L, BIAN H J. Clinical study on Kanggu Zengsheng Capsules combined with loxoprofen sodium in treatment of early knee osteoarthritis[J]. Drugs Clin, 2024, 39 (10):2651-2655. DOI:10.7501/j.issn.1674-5515.2024.10.034.
- [20] 韩杰, 柴源, 章晓云, 等. 中药复方治疗不同分期膝骨关节炎的研究进展[J]. 中医正骨, 2022, 34(11): 57-61. DOI: 10.3969/j.issn. 1001-6015.2022.11.011.
HAN J, CHAI Y, ZHANG X Y, et al. Advancement of research on the treatment of different stages of knee osteoarthritis with compounds[J]. J Tradit Chin Orthop Trauma, 2022, 34(11): 57-61. DOI: 10.3969/j.issn.1001-6015.2022.11.011.
- [21] WU B, WANG R, LI S N, et al. Antifibrotic effects of Fraxetin on carbon tetrachloride-induced liver fibrosis by targeting NF- κ B/I κ B α , MAPKs and Bcl-2/Bax pathways[J]. Pharmacol Rep, 2019, 71(3):409-416. DOI:10.1016/j.pharep.2019.01.008.
- [22] WITAICENIS A, SEITO L N, DA SILVEIRA CHAGAS A, et al. Antioxidant and intestinal anti-inflammatory effects of plant-derived coumarin derivatives[J]. Phytomedicine, 2014, 21(3): 240-246. DOI:10.1016/j.phymed.2013.09.001.
- [23] DE SOUSA VALENTE J. The pharmacology of pain associated with the monoiodoacetate model of osteoarthritis[J]. Front Pharmacol, 2019, 10: 974. DOI: 10.3389/fphar.2019.00974.
- [24] MA T W, ZHANG Z H, SONG X P, et al. Combined detection of COMP and CS846 biomarkers in experimental rat osteoarthritis: a potential approach for assessment and diagnosis of osteoarthritis[J]. J Orthop Surg Res, 2018, 13(1): 230. DOI: 10.1186/s13018-018-0938-3.
- [25] CHEN J Y, ZHANG L, ZHANG H, et al. Triggering of p38 MAPK and JNK signaling is important for oleanolic acid-induced apoptosis *via* the mitochondrial death pathway in hypertrophic scar fibroblasts[J]. Phytother Res, 2014, 28(10):

1468-1478. DOI: 10.1002/ptr.5150.

- [26] LI X H, ZHANG Z L, LIANG W N, et al. Tougu Xiaotong capsules may inhibit p38 MAPK pathway-mediated inflammation: In vivo and in vitro verification[J]. J Ethnopharmacol, 2020, 249: 112390. DOI: 10.1016/j.jep. 2019. 112390.

(收稿日期:2024-11-08 修回日期:2025-02-07)

(本文责任编辑:张俊彦)

[引用本文]

刘智伟, 杨然, 连浩, 等. 秦皮素对碘乙酸钠诱导骨关节炎模型大鼠的软骨保护与抗炎作用[J]. 实验动物与比较医学, 2025, 45(3): 259-268. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.165.

LIU Z W, YANG R, LIAN H, et al. Cartilage protection and anti-inflammatory effects of fraxetin on monosodium iodoacetate-induced rat model of osteoarthritis[J]. Lab Anim and Comp Med, 2025, 45(3): 259-268. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.165.

国际医学期刊编辑委员会 (ICMJE) 推荐规范中有关人工智能辅助写作及审稿的具体要求

国际医学期刊编辑委员会 (International Committee of Medical Journal Editors, ICMJE) 每年发布一份《学术研究实施与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》(Recommendations for the Conduct, Reporting, Editing and Publication of Scholarly Work in Medical Journals) 更新版, 简称“ICMJE 推荐规范”。完整的英文原版本和中文翻译版请见 www.icmje.org。现将最新版 ICMJE 推荐规范中有关人工智能使用的相关要求摘录如下:

II.A.3. 作者之外的贡献者: 使用人工智能辅助写作应在致谢部分报告。

II.A.4. 人工智能辅助技术: 在投稿时, 期刊应要求作者披露他们是否在撰稿过程中使用了人工智能辅助技术[如大型语言模型 (LLMs)、聊天机器人或图像创建器]。使用这些技术的作者应该在投稿函和所提交稿件的适当部分酌情描述他们是如何使用的。例如, 如果人工智能用于写作辅助, 应在致谢部分描述这一点 (见 II.A.3 节)。如果人工智能用于数据收集、分析或图形生成, 作者应在方法中描述这些用法 (见 IV.A.3.d 节)。聊天机器人 (如 ChatGPT) 不应被列为作者, 因为它们不能对作品的准确性、完整性和原创性负责, 而这些责任是作者所必须承担的 (请见 II.A.1 节)。

因此, 人类应对任何提交的材料负责, 包括所使用的人工智能辅助技术。作者应该仔细审查和编辑结果, 因为人工智能可能会输出不正确、不完整或带有偏见的, 但貌似很权威的内容。作者不应将人工智能和人工智能辅助技术列为作者或共同作者, 也不应引用以人工智能为作者的内容。作者应该能够确认他们的论文中没有抄袭, 包括由人工智能生成的文本和图像。人类必须确保所有引用材料都有恰当的出处, 包括完整的引文。

II.C.2.a. 期刊保密性: 投递给期刊的稿件是特许保密通信, 是作者的私有保密财产, 过早泄露稿件的任何或全部细节都可能损害作者的利益。因此, 除作者及审稿人外, 编辑不得与任何人分享稿件的信息, 包括稿件是否被接收和送审、稿件内容、审稿进程、审稿人的意见以及稿件的最终结局。编辑应注意, 在处理稿件时使用人工智能技术可能会违反保密性。编辑应礼貌地拒绝第三方因法律程序使用稿件和审稿意见的要求, 应尽力避免提供这样的保密资料。编辑必须明确告知审稿人, 他们应该对稿件、相关材料以及其中包含的信息严格保密。审稿人指南应包括有关人工智能使用的指导。在稿件发表之前, 审稿人和编辑人员不得公开讨论作者的研究工作, 审稿人不得盗用作者的思想。审稿人不得保留稿件供其个人使用, 在提交审稿意见之后, 应当销毁稿件纸质版并删除电子版。

II.C.3. 同行审稿人: 投递给期刊的稿件是特许保密通信, 是作者的私有保密财产, 过早泄露稿件的任何或全部细节都可能损害作者的利益。因此, 审稿人应该对稿件及其中包含的信息严格保密。在稿件发表之前, 审稿人不得公开讨论作者的研究工作, 不得盗用作者的思想。审稿人不得将稿件留作私用, 在提交审稿意见之后, 应当销毁稿件副本。在审稿过程中, 审稿人若寻求实习生或同事的帮助, 应在提交给编辑的书面审稿意见中感谢他们的贡献。审稿人必须按上述规定对稿件内容保密, 不得将稿件上传到无法保证其保密性的软件或其他人工智能技术平台上。审稿人必须先征得期刊的许可, 才能使用人工智能技术来帮助审稿。审稿人应该意识到, 人工智能会输出貌似很权威的内容, 而这些内容可能是不正确、不完整或有偏见的。审稿人应及时回复审稿邀请, 在指定时间内提交评审意见。审稿意见应有建设性、诚实且礼貌。

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

IV.A.3.g.i. 参考文献总则: 不能将人工智能生成的内容作为一手来源资料进行引用。作者有责任准确引用参考文献, 并能够核实所引用的参考文献支持相关陈述。为减少参考文献引用差错, 应使用文献目录源 (如 PubMed) 或原始文献核对参考文献。作者应负责检查并确定投稿文章没有引用已撤销的文献, 除非引用的是撤稿启事。

(《实验动物与比较医学》编辑部摘录)



李习艺, 教授, 医学博士, 博士生导师, 广西医科大学公共卫生学院营养与食品卫生学系主任。兼任中国营养学会营养与保健食品分会委员、中国毒理学会生化与分子毒理专业委员会委员、中国老年学和老年医学学会抗衰老分会委员、全国学校食品安全与营养健康专家组成员、广西营养学会副理事长、广西食品安全地方标准审评委员会委员。主要研究方向为营养相关代谢性疾病的分子机制及其防治。主持国家自然科学基金5项, 省厅级科研项目4项; 发表专业论文70余篇, 参编专业书籍5部; 曾获广西科技进步奖三等奖、广西青年科技奖、广东省科学技术三等奖和深圳市创新科技奖。

欧阳轶强, 博士, 高级实验师, 硕士生导师。现任广西医科大学实验动物中心副主任, 实验动物学教研室主任。长期从事实验动物管理及科研工作, 担任《医学实验动物学》和《实验动物学》等本科、研究生教学工作。兼任中国实验动物学会小型猪专业委员会理事、广西实验动物学会常务理事。研究方向是人类疾病动物模型研发和广西特色实验动物开发。目前主要从事树鼩的基因编辑模型研发, 以及树鼩神经系统疾病模型和肿瘤疾病模型等的开发工作。主持国家自然科学基金项目1项, 广西科技平台建设项目1项, 广西自然科学基金重点项目1项; 共计发表学术论文37篇, 其中SCI论文17篇。



利用脑立体定位技术将人源三突变 APP 基因导入海马区构建阿尔茨海默病大鼠模型

肖林林^{1,2}, 杨逸萱^{1,2}, 黎珊杉^{1,2}, 罗兰诗雨^{1,2}, 尹思威^{1,2}, 孙俊铭¹, 施 维¹, 欧阳轶强¹, 李习艺³

(1. 广西医科大学实验动物中心, 南宁 530021; 2. 广西医科大学基础医学院, 南宁 530021; 3. 广西医科大学公共卫生学院, 南宁 530021)

摘要 **目的** 构建脑海马区表达人源三突变淀粉样前体蛋白 (amyloid precursor protein, APP) 的阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 大鼠模型, 为疾病机制和药物研究奠定基础。**方法** 将24只12周龄SPF级雌性SD大鼠随机分成空白对照组、空载病毒组和实验组, 每组8只; 其中, 实验组通过脑立体定位在海马区注射携带人源三突变 APP 和 NanoLuc 萤光素酶基因的腺相关病毒 (adeno-associated virus, AAV) 进行造模。采用活体成像法观察各组大鼠脑内的病毒表达情况, 新事物识别实验检测各组大鼠的认知记忆能力, 实时荧光定量 PCR 检测 APP 基因表达水平, HE 染色观察脑组织病理, 采用尼氏染色观察海马区病变情况, 用免疫组织化学检测 β -淀粉样蛋白 (amyloid β -protein, A β) 沉积情况。**结果** 活体成像显示实验组与空载病毒组大鼠脑部均检测到报告荧光。新事物识别实验发现实验组大鼠的认知记忆能力比对照组显著下降 ($P < 0.01$)。荧光定量 PCR 显示 APP 基因在实验组大鼠脑内表达水平显著增高 ($P < 0.01$)。重组 AAV 感染大鼠6个月后, 脑组织 HE 染色和尼氏染色显示, 实验组大鼠海马体 CA1 区神经元细胞和尼氏体数量减少而且排列混乱; 免疫组织化学检测实验组大鼠海马 CA1 区及锥形细胞层可以看到明显的棕褐色沉淀, 提示产生了 A β 沉积。**结论** 通过脑立体定位技术联合 AAV 转入人源三突变 APP 基因成功构建的大鼠模型可体现出典型 AD 特征, 该模型可为基于 A β 沉积的 AD 病理研究和药物治疗研究提供动物模型并奠定基础。

关键词 阿尔茨海默病; 淀粉样前体蛋白; 人源三突变基因; 脑立体定位; 大鼠模型

中图分类号 R-332; Q95-33 **文献标志码** A **文章编号** 1674-5817(2025)03-0269-10



基金项目 广西自然科学基金“组织特异性基因编辑技术制作树鼩肝癌模型的探索”(2023GXNSFDA026069)

第一作者 肖林林(1999—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 阿尔茨海默病模型。E-mail: 2721357235@qq.com

通信作者 李习艺(1974—), 女, 博士, 教授, 研究方向: 营养学, 人类疾病模型。E-mail: leeciyyee@163.com。ORCID: 0009-0006-0280-8451;

欧阳轶强(1977—), 男, 博士, 高级实验师, 研究方向: 人类疾病模型。E-mail: ouyangyiqiang@stu.gxmu.edu.cn。ORCID: 0000-0003-2277-4018

Establishment of a Rat Model of Alzheimer's Disease by Introducing Human Triple Mutant *APP* Gene into Hippocampus via Brain Stereotactic Technology

XIAO Linlin^{1,2}, YANG Yixuan^{1,2}, LI Shanshan^{1,2}, LUO Lanshiyu^{1,2}, YIN Siwei^{1,2}, SUN Juming¹, SHI Wei¹, OUYANG Yiqiang¹, LI Xiyi³

(1. Laboratory Animal Center, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China; 2. School of Basic Medical Sciences, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China; 3. School of Public Health, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China)

Correspondence to: LI Xiyi (ORCID: 0009-0006-0280-8451), E-mail: leeciye@163.com;

OUYANG Yiqiang (ORCID: 0000-0003-2277-4018), E-mail: ouyangyiqiang@stu.gxmu.edu.cn

[ABSTRACT] Objective To establish a rat model of Alzheimer's disease (AD) expressing human triple mutant amyloid precursor protein (APP) in the hippocampus, and to provide a model for the study of disease mechanisms and drug development. **Methods** Twenty-four 12-week-old SPF-grade female SD rats were randomly divided into a blank control group, a virus control group and an experimental group, with eight rats in each group; among them, the experimental group received a stereotaxic injection of adeno-associated virus (AAV) carrying the human triple mutant *APP* and NanoLuc luciferase genes into the hippocampus. *In vivo* imaging was used to observe viral expression in the brains of rats in each group, the novel object recognition test was used to assess the recognition memory of the rats in each group, real-time fluorescent quantitative PCR was used to detect the expression level of the *APP* gene, HE staining was used to examine the brain histopathology, Nissl staining was used to assess the hippocampal lesions, and immunohistochemistry was used to detect the deposition of amyloid β -protein (A β). **Results** *In vivo* imaging showed that reporter fluorescence was detected in the brains of rats in both experimental and virus control groups. Fluorescence quantitative PCR showed that the expression level of the *APP* gene was significantly increased in the brains of rats in the experimental group ($P < 0.01$). Novel object recognition test revealed that the recognition memory of rats in the experimental group was significantly reduced compared with that of the blank control group ($P < 0.01$). Six months after recombinant AAV virus infection, HE staining and Nissl staining of brain tissues showed that the number of neurons and Nissl bodies in the CA1 region of the hippocampus in the experimental group was reduced and disorganized; immunohistochemistry testing of the CA1 region of the hippocampus and the pyramidal cell layer of the experimental group revealed prominent brown deposits, indicating A β protein deposition. **Conclusion** The rat model successfully established by stereotaxic injection and AAV-mediated delivery of human triple mutant *APP* gene exhibits typical AD features, providing a valuable animal model for studying AD pathology and developing drug therapies targeting A β protein deposition.

[Key words] Alzheimer's disease; Amyloid precursor protein; human triple mutant gene; Brain stereotaxis; Rat model

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是一种神经退行性疾病^[1-3], 在全球范围内发病率及死亡率均呈上升趋势, 且发病年龄呈年轻化趋势。据《2024年中国阿尔茨海默病报告》统计, 我国的AD及其他痴呆导致死亡、患病及伤残调整生命年等相关指标均高于全球水平, 提示我国在应对AD这一公共卫生挑战上面临严峻考验^[1]。AD的病理特征包括 β -淀粉样蛋白 (amyloid β -protein, A β) 沉积、Tau蛋白过度磷

酸化形成的神经纤维缠结、神经元丢失以及突触损伤。在AD的发病机制研究中, A β 级联假说被公认是经典学说之一^[4-5], 即淀粉样前体蛋白 (amyloid precursor protein, APP) 代谢异常, 不仅导致 β 分泌酶切割途径激活, 同时改变 γ 分泌酶切割位点偏好性, 使APP剪切过程中产生更多毒性A β 沉积, 进而触发神经元损伤、突触功能障碍及脑区特异性神经元死亡。研究表明, *APP*基因突变可通过增强 β 分泌酶切割效率或促

进A β 1-42生成显著加速淀粉样斑块沉积^[6-7]。常见的APP突变类型有Swedish、London和Austrian突变^[8-9]，其是家族性AD的重要诱因^[10]。精准模拟APP异常代谢的动物模型对解析AD病理机制及药物研发至关重要。使用人源性的突变APP导入实验动物脑海马区可以构建模拟遗传突变类型的AD模型。

啮齿类实验动物小鼠常用于AD转基因模型^[11-12]。与小鼠相比，大鼠在认知、行为、大脑结构及药物代谢上更接近人类^[13-14]，且寿命长、体型大，便于操作与采样，更适合构建AD模型。近年来，基于病毒载体的基因递送技术为AD模型构建提供了新策略。腺相关病毒（adeno-associated virus, AAV）凭借其高转导效率、低免疫原性、跨血脑屏障能力及精准的脑区靶向性^[15]，成为神经科学研究中理想的基因递送工具。本研究拟通过脑立体定位注射携带人源三突变（Swedish/London/Austrian）APP基因的AAV载体，构建AD大鼠模型，以期更真实地模拟A β 异常沉积的病理进程，为深入探究AD发病机制和药物开发提供研究基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物

24只SPF级雌性SD大鼠均12周龄，体重为(250±20)g，购自广西医科大学实验动物中心[SCXK(桂)2020-0003]。动物饲养于广西医科大学实验动物中心的动物实验室屏障系统[SYXK(桂)2020-0004]，相对湿度50%~60%，温度22~24℃，大鼠可自由饮水和进食。本实验方案通过广西医科大学实验动物伦理委员会的伦理审查(编号为202404010)。所有动物实验操作遵循实验动物伦理福利3R原则。

1.2 主要试剂与仪器

重组腺相关病毒(recombinant adeno-associated virus, rAAV)-APPs1a-Nluc和rAAV-Nluc购自武汉枢密脑科学技术有限公司，均为定制产品；RNA提取试剂盒(批号S20205)、RNA反转录试剂盒(批号R31107)、实时荧光定量PCR试剂盒(批号R10101)均购自北京全式金生物技术股份有限公司；活体成像荧光素酶底物Furimazine(批号162434)购自上海陶素生物科技有限公司；即用型免疫组化SP试剂盒(批号246289710D)购自福州迈新生物技术开发有限公司；A β 蛋白抗体(批号B430350)购自美国BioLegend公司。

小动物活体成像仪购自美国PerkinElmer公司；SMART 3.0小动物行为学记录分析系统、旷场箱、大

鼠新物体识别实验玩具、双通道小动物麻醉机、大鼠脑立体定位气麻呼吸面罩和异氟烷(批号20211520)均购自深圳市瑞沃德生命科技有限公司；荧光定量PCR仪(型号QuantStudio 7 Flex)购自美国Thermo Fisher公司；石蜡包埋与切片机(型号RM2235)和生物显微镜(型号BX53)均购自德国Leica公司。

1.3 重组腺相关病毒载体的构建

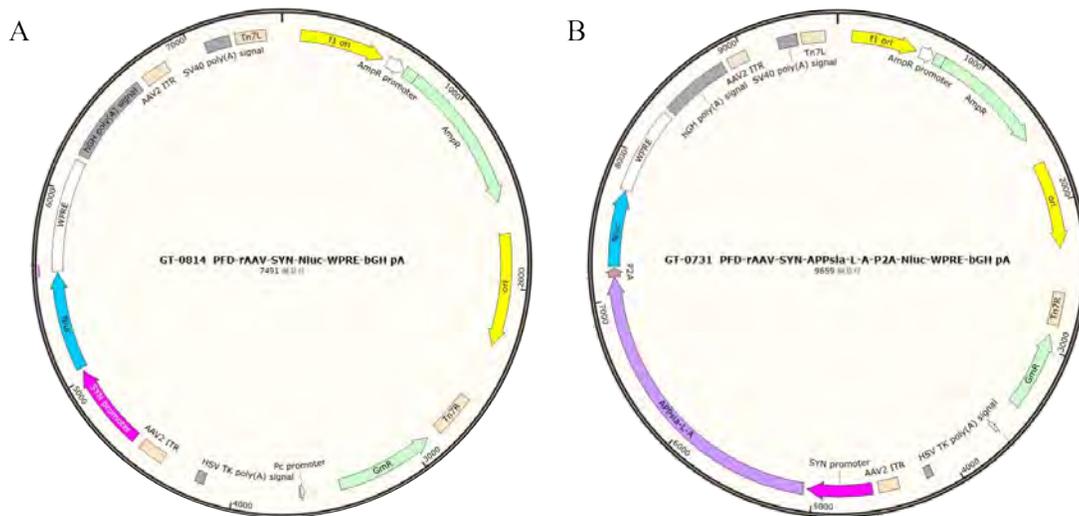
采用rAAV载体构建技术^[16]，构建携带人源三突变APP基因的rAAV载体。以携带NanoLuc荧光素酶基因的AAV质粒为骨架载体，整合AAV2血清型的反向末端重复序列(inverted terminal repeats, ITRs)作为病毒基因组复制与包装的顺式作用元件，用在辅助质粒上单独表达的AAV9血清型衣壳蛋白基因(Cap)构建病毒外壳，在NanoLuc荧光素酶基因前插入含Swedish(K670N/M671L)、London(V717I)及Austrian(T714I)三重突变的APP cDNA序列，构建实验组病毒载体质粒。空载病毒质粒不携带人源APP cDNA序列。

空载病毒以及目的病毒的载体结构如图1所示。目的载体携带人源三突变APP基因以及NanoLuc荧光素酶基因，两个基因共用一个启动子，NanoLuc荧光素酶基因位于APP基因之后，若荧光素酶基因成功表达则可推测位于前面的APP基因也成功表达对应蛋白。两者间用P2A肽隔开，使两个蛋白独立表达，以免影响蛋白后续修饰。空载病毒和目的病毒相比，除了缺少人源三突变APP基因外，其他部分皆相同。

1.4 动物分组及脑立体定位接种造模

将24只SD大鼠随机分为空白对照组(blank control group, BC)、空载病毒组(virus control group, VC)以及实验组(experimental group, Exp)，每组8只。空白对照组不做处理，空载病毒组注射AAV空载体(rAAV-Nluc)，实验组大鼠注射携带人源三突变APP基因的AAV(rAAV-APPs1a-Nluc)载体质粒。

将大鼠置于气体麻醉诱导盒内用异氟烷麻醉后，剃去大鼠头部区域毛发，用75%乙醇溶液对皮肤进行消毒，以脑立体定位气麻呼吸面罩维持麻醉，并固定于脑立体定位仪上，暴露大鼠颅骨上的前囟点和后囟点并调节仪器参数：脑立体定位注射位置为正中矢状缝左右旁开2 mm，前囟后3.3 mm，硬脑膜下进针深度3 mm，坐标(±2, -3.3, -3)。使用牙科钻钻至硬脑膜表面后，用5 μ L规格的无菌微量注射器进行病毒注射，双侧脑区各注射2 μ L 1×10^{13} vg/mL的病毒悬液。注射完成后用骨蜡填充注射孔，缝合头皮，碘伏消毒后放回笼中饲养。



注: A为空载病毒质粒结构图; B为携带人源三突变 *APP* 基因的质粒结构图。APPsla-L-A 代表人源三突变 *APP* 基因, Nluc 代表 NanoLuc 萤光素酶基因, SYN promoter 是神经元特异性启动子。

Note: A, structure of the empty viral plasmid; B, structure of the plasmid carrying the human triple mutant *APP* gene, APPsla-L-A represents the human triple mutant *APP* gene, Nluc represents the NanoLuc luciferase gene, and SYN promoter is the neuron-specific promoter.

图1 重组腺相关病毒载体结构示意图

Figure 1 Schematic diagram of recombinant adeno-associated viral vector structure

病毒注射后2周及6个月时,称量各组大鼠体重,按照每100 g体重腹腔注射5 mmol/L的萤光素酶底物Furimazine 0.23 mL,注射10~15 min后,将大鼠进行异氟烷气体麻醉,待动物失去知觉后,立刻放入活体成像仪中维持麻醉,调整参数进行生物发光拍照和记录结果。

1.5 新物体识别实验检测大鼠的认知记忆能力

注射病毒6个月后进行各组大鼠的新物体识别实验,具体操作如下:将大鼠放入旷场箱熟悉5 min,将两个完全相同的圆柱体放入旷场箱一侧靠边缘位置;将大鼠再次放入旷场箱中,让其探索10 min,记录大鼠与物体的互动情况;1 h后,将其中一个圆柱体替换为不同颜色的圆锥体,再次将大鼠放入旷场箱中,让其探索10 min,记录大鼠对新旧物体的探索时间、次数等。每次测试结束后,将大鼠放回饲养笼,清洁旷场箱以消除气味。由行为学分析系统识别动物运动轨迹,得出探索时间,然后通过计算新物体识别指数(recognition index, RI)来判断大鼠的学习记忆能力。RI时间值=探索新物体时间/(探索新物体时间+探索旧物体时间),RI距离值=探索新物体距离/(探索新物体距离+探索旧物体距离)。

1.6 荧光定量PCR检测大鼠脑海马区 *APP* 基因表达

行为学实验后,每组随机取4只大鼠,称量其体

重,按50 mg/kg的剂量腹腔注射戊巴比妥钠溶液麻醉大鼠,颈椎脱臼处死大鼠。剥离脑组织,摘取海马体,液氮速冻后置于-80 °C冰箱保存。根据人类三突变 *APP* 基因和大鼠 *APP* 基因的保守区域序列(来源于NCBI网站)设计引物,可同时扩增2种基因,上游引物为5'-ACTGACCACTCGACCAGGTC-3',下游引物为5'-GGCGTCAACCTCCACCACA-3'。内参基因 β -actin 的上游引物为5'-TGTCACCAACTGGG-ACGATA-3',下游引物为5'-GGGGTGTGAAGGTC-TCAAA-3'。按照试剂盒说明书步骤提取RNA,并逆转录,对 *APP* 基因进行实时荧光定量PCR扩增,反应程序:94 °C 30 s 预变性;94 °C 5 s,60 °C 30 s,循环扩增40次。反应结束后导出Ct值等数据,运用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算相对表达量,并进行统计学分析。同时,对实时荧光定量PCR扩增产物采用测通法测序验证。PCR引物合成及扩增产物测序均由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。

1.7 海马区脑组织病理学检测

每组取另外3只大鼠用于组织病理学检测(剩余1只为备用)。大鼠麻醉后用生理盐水灌注心脏以置换血液,再用4%多聚甲醛溶液灌注后剥离脑组织。将脑组织浸泡于4%多聚甲醛溶液固定48 h后,用梯度乙醇溶液常规脱水、二甲苯透明后浸蜡包埋,石蜡切片4 μ m。分别采用HE染色法、尼氏染色法、免疫组

织化学法检测大鼠海马区脑组织的常规组织病理特征、神经元变化以及A β 沉积情况。

HE染色:石蜡切片脱蜡后先用苏木精染色细胞核,分化后再用伊红染液染色;倾去多余染色液后快速脱水,二甲苯透明,中性树胶封固。

尼氏染色:石蜡切片脱蜡后,用尼氏染色液浸染10 min;自来水洗去多余染液,用尼氏分化液分化30 s,终止分化。显微镜下初步观察染色情况,显色清晰即可用乙醇溶液梯度脱水,二甲苯透明,中性树胶封固。

免疫组织化学染色:石蜡切片常规脱蜡,EDTA热修复后,进行内源性过氧化物酶阻断和血清封闭;加入A β 单克隆抗体4℃过夜孵育,漂洗后再加入生物素标记的山羊抗鼠/兔二抗于室温孵育30 min, DAB显色后加入苏木精对比染色细胞核;显微镜下初步观察,

染色正常则脱水封固,然后在光学显微镜下进行观察和拍照。

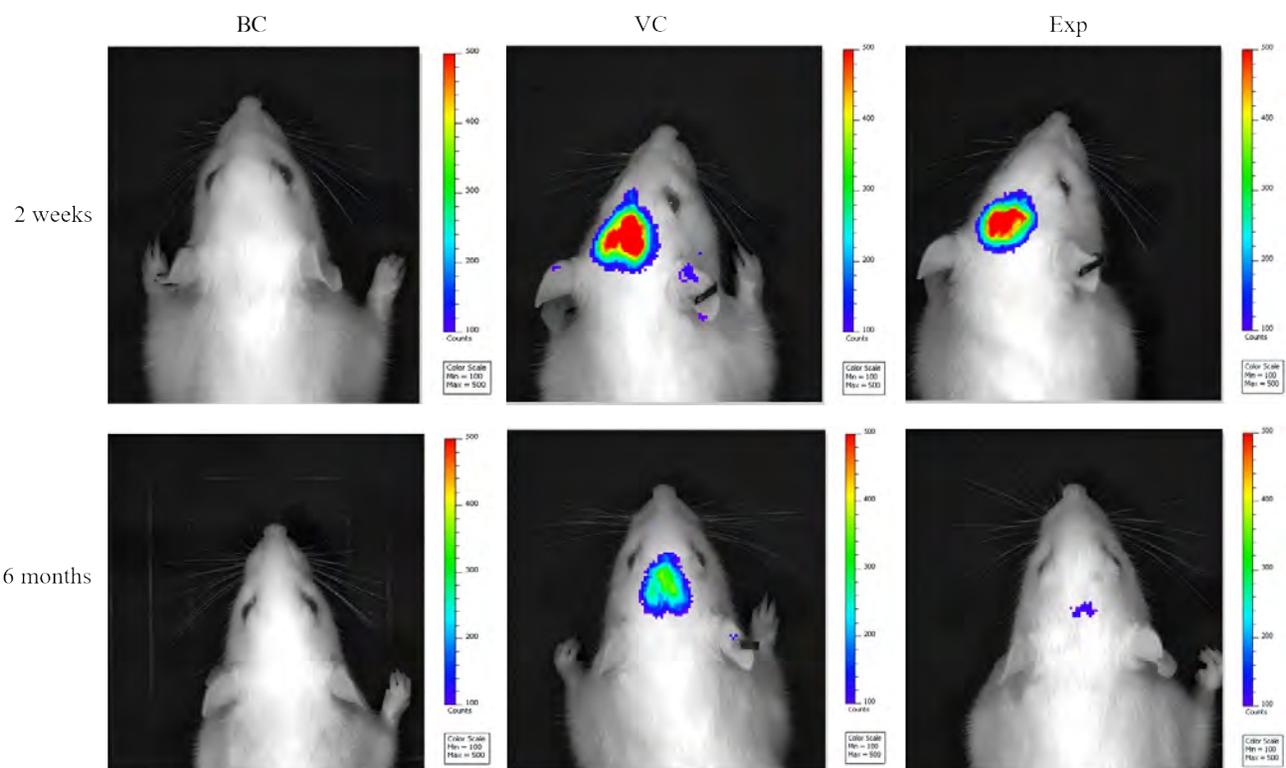
1.8 统计学分析

采用SPSS 22.0软件对各实验结果数据进行分析处理。符合正态分布且方差齐性的各组数据采用单因素方差分析,组内两两比较采用LSD-*t*检验;不符合正态分布和方差齐性要求的数据用Kruskal-Wallis检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 建模后重组AAV在大鼠脑部有效表达

建模2周后,腹腔注射萤光素酶底物Furimazine进行各组大鼠活体成像(图2),结果显示,实验组与空载病毒组大鼠头部区域可检测到荧光发光,空白对照



注: BC、VC、Exp分别为空白对照组、空载病毒组、实验组(通过脑立体定位在海马区注射携带人源三突变APP和NanoLuc萤光素酶基因的腺相关病毒)。各组大鼠腹腔注射萤光素酶底物Furimazine后10 min观察萤光素报告酶活性。2周后实验组与空载病毒组头部区域可检测到荧光发光,6个月后实验组和空载病毒组的荧光强度都减弱,但仍然可以被检测到;空白对照组未检测到荧光。

Note: BC, VC, Exp are blank control group, virus control group, and experimental group (adeno-associated virus carrying human triple mutant APP and NanoLuc luciferase genes was injected in the hippocampus by brain stereotaxic localization), respectively. The luciferase reporter activity was observed 10 min after intraperitoneal injection of the luciferase substrate Furimazine into rats in each group. 2 weeks later, fluorescent luminescence could be detected in the head area of the experimental group and the virus control group, and 6 months later, the fluorescence intensity of both the experimental group and the virus control group was weakened, but it could be detected; the fluorescence was not detected in the blank control group.

图2 注射病毒2周和6个月后大鼠活体成像情况

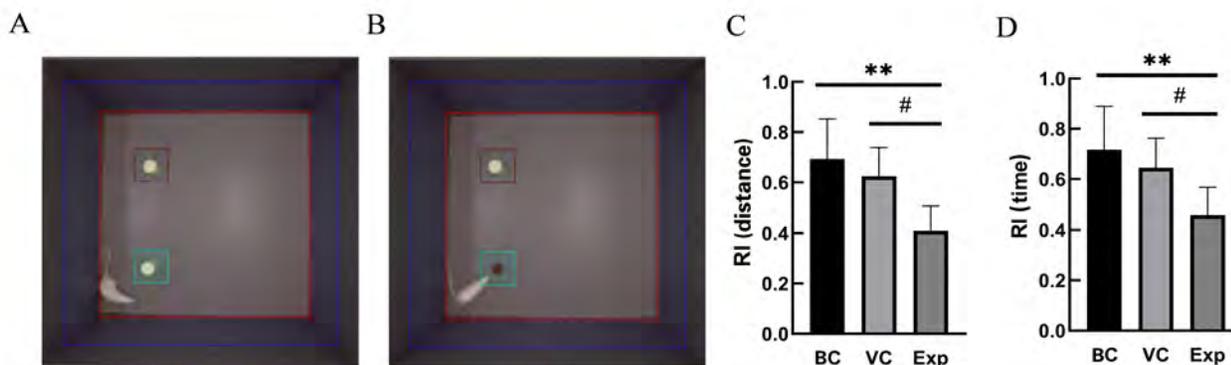
Figure 2 *In vivo* imaging of rats two weeks and six months after virus injection

组大鼠未检测到荧光；造模6个月后实验组和空载病毒组的荧光强度都减弱，但仍然可以被检测到。结果证明造模后大鼠脑部有效表达rAAV。

2.2 造模后大鼠的认知记忆能力降低

rAAV感染后，受试大鼠的新物体识别实验结果

(图3)表明，实验组的距离认知指数和时间指数均明显低于空白对照组 ($P<0.01$) 和空载体病毒组 ($P<0.05$)，而空白对照组与空载体病毒组相比差异无统计学意义 ($P>0.05$)。结果提示造模后大鼠的认知记忆能力明显下降。



注：A展示大鼠探索两个相同物体；B为更换了新物体；C为以距离为统计指标的新物体识别实验结果；D为以时间为统计指标的新物体识别实验结果。RI：新事物识别指数。BC、VC、Exp分别为空白对照组、空载体病毒组、实验组（通过脑立体定位在海马区注射携带人源三突变APP和NanoLuc荧光素酶基因的腺相关病毒），每组8只大鼠（ $n=8$ ）；与空白对照组相比，** $P<0.01$ ；与空载体病毒组相比，# $P<0.05$ 。

Note: A shows rats exploring two identical objects; B is a new object replaced; C is the result of the new object recognition experiment using distance as a statistical index; D is the result of the new object recognition experiment using time as a statistical index. RI: Recognition index. BC, VC, Exp are blank control group, virus control group and experimental group (adeno-associated virus carrying human triple mutant APP and NanoLuc luciferase genes was injected in the hippocampus by brain stereotaxic localization), respectively, 8 rats per group ($n=8$); ** $P<0.01$, compared with blank control group; # $P<0.05$, compared with virus control group.

图3 新物体识别实验检测大鼠认知记忆能力

Figure 3 Novel object recognition test to assess recognition memory of rats

2.3 造模后大鼠海马体中APP基因表达增强

造模6个月后，实时荧光定量PCR检测各组大鼠海马体中APP基因的相对表达量，结果如图4A所示。实验组APP相对表达量与空白对照组和空载病毒组相比显著增高 ($P<0.01$)，而空白对照组与空载病毒组相比差异无统计学意义 ($P>0.05$)。PCR产物测序结果与正常人源APP基因序列比对结果如图4B所示，精准定位到3个突变位点，分别为Swedish突变位点GA突变为TC，Austrian突变位点C突变为T，London突变位点G突变为A。以上突变位点的位置与rAAV载体所设计的预期突变位点完全相符。

2.4 造模后大鼠海马区组织发生明显的病理学变化

rAAV病毒感染大鼠6个月后，海马体的HE染色结果如图5A所示。实验组大鼠的海马体CA1区神经细胞缺失、皱缩、分布稀疏；空白对照组和空载病毒组CA1区神经元细胞结构完整，细胞数量正常，神经元

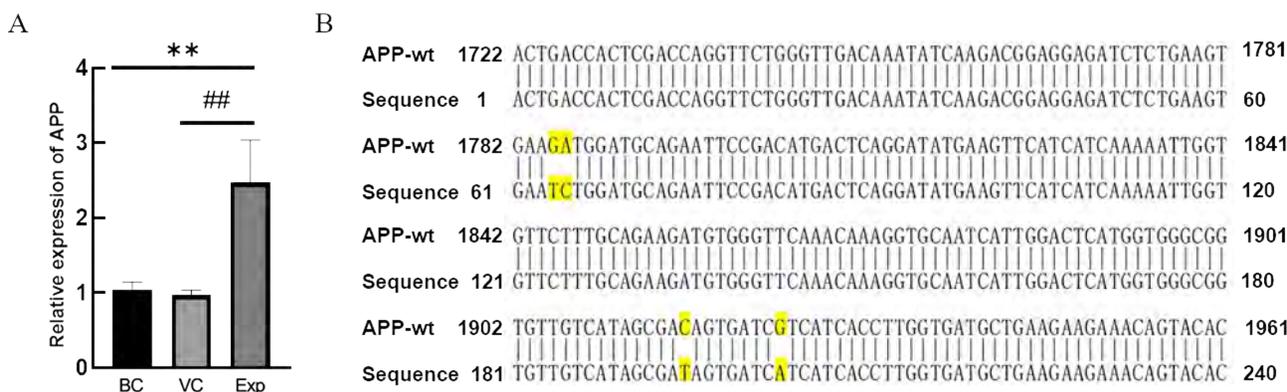
细胞排列整齐，细胞核大圆且染色清晰。

尼氏染色结果如图5B所示。实验组海马体中尼氏体数量减少，分布稀疏，染色浅淡；空白对照组和空载病毒组的海马体中尼氏体丰富，染色可见形态饱满、色深而匀、数量多而密、排列紧致。

免疫组织化学染色结果如图5C所示。实验组大鼠的海马CA1区及锥形细胞层可以看到明显的棕褐色沉淀，即产生了A β 沉积；空白对照组以及空载病毒组在海马区未看到A β 沉积现象。

3 讨论

AD作为一种复杂的神经退行性疾病，目前尚无完全治愈该疾病的方法。近20年来，全球首个获美国食品药品监督管理局批准的AD新药仑卡奈单抗，也只能通过清除大脑中的有毒A β 蛋白，延缓疾病的临床进程。该疾病不仅对患者的身心健康和生活方式造成了极大的危害，也给家庭和社会带来了沉重的负担。近



注：A，为实时荧光定量PCR检测结果 [BC、VC、Exp分别为空白对照组、空载病毒组、实验组（通过脑立体定位在海马区注射携带人源三突变 *APP* 和 NanoLuc 荧光素酶基因的腺相关病毒），每组4只大鼠（ $n=4$ ）；与空白对照组相比，** $P<0.01$ ；与空载病毒组相比，** $P<0.01$]。B为PCR产物测序比对结果，黄色高亮部分指示突变位点。

Note: A is the result of real-time fluorescence quantitative PCR. BC, VC, Exp are blank control group, virus control group and experimental group (adeno-associated virus carrying human triple mutant *APP* and NanoLuc luciferase genes was injected in the hippocampus by brain stereotaxic localization), respectively. 4 rats in each group ($n=4$); Compared with blank control group, ** $P<0.01$; Compared with virus control group, ** $P<0.01$. B is the result of real-time fluorescence quantitative PCR product sequencing comparison, and the yellow highlighted part is the indicated mutation site.

图4 大鼠海马体 *APP* 基因表达及测序结果

Figure 4 *APP* gene expression and sequencing results in rat hippocampus

年来，国内外AD患者数量与日俱增，使得该疾病研究刻不容缓，而构建良好的疾病模型对疾病的治疗研究具有至关重要的作用。

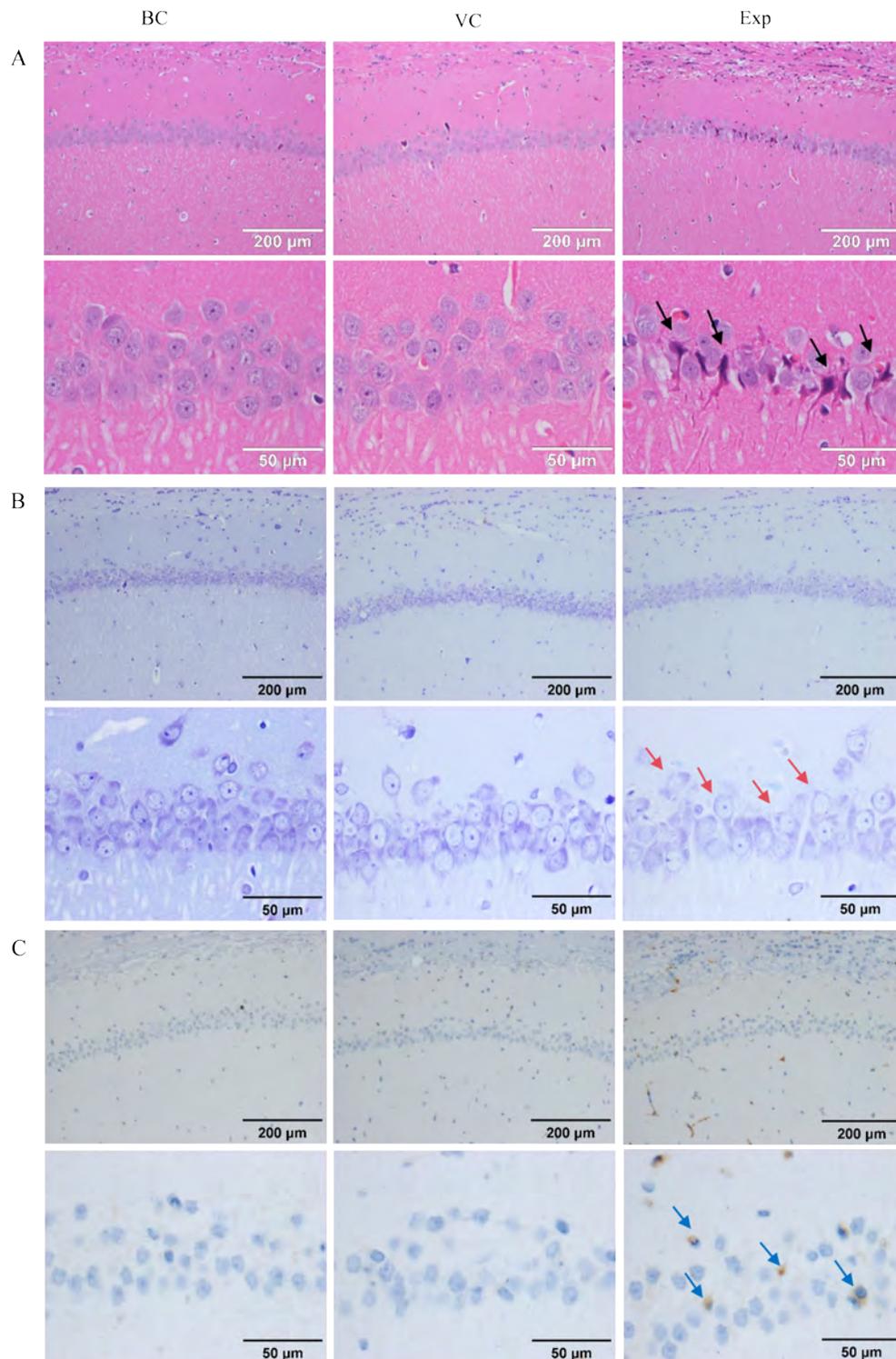
灵长类动物与人类的亲缘关系很接近，在构建人类疾病动物模型上具有天然的优势，然而受限于伦理问题和高昂的实验成本，难以作为可推广的实验动物用于研究。所以，目前的AD模型构建大多用大鼠和小鼠。相比于小鼠，大鼠具有更接近人类的神经解剖结构、行为复杂性和代谢特征。本研究在综合考虑成本、病理生理特征及其下游研究价值后，选择大鼠作为构建AD模型的实验动物。

$A\beta$ 异常沉积是AD的核心病理标志之一，其生成直接归因于 *APP* 的异常剪切^[17-18]。家族性AD患者中，约50%的病例与 *APP* 基因突变相关，尤其是Swedish、London及Austrian突变，因其对 $A\beta$ 生成的关键调控作用而被广泛关注。造模时引入人 *APP* 基因可规避物种差异，精准模拟人类AD的 $A\beta$ 沉积特征。本研究采用大脑感染携带Swedish/London/Austrian突变位点的 *APP* 基因的病毒进行造模，6个月后组织学观察结果显示，海马区神经元数量减少，形态出现萎缩，尼氏体数量减少，分布稀疏，染色浅淡，出现了明显的 $A\beta$ 沉积，此变化与人类AD患者的病理特征一致^[2]。新物体识别行为学实验发现，实验组大鼠的认知能力显著降低，

认知记忆能力衰退，有效模拟了人类AD的临床疾病特征。在现有AD大鼠模型中，也有通过转入 *APP* 基因进行造模的文献报道，例如有研究者向Tg6590大鼠转入携带Swedish突变位点的 *APP* 基因^[19-20]，但该模型出现行为认知障碍的时间需9个月甚至更长，出现 $A\beta$ 沉积的时间在15个月以上，成模时间过于漫长；而且该模型动物出现的AD病理特征比较单一，不如本研究中转入三突变 *APP* 基因的造模效果好。

目前有不少研究者通过基因编辑技术进行AD造模^[21-22]。清华大学研发的 *APP*^{NL-G-F} 转基因大鼠不仅检测出 $A\beta$ 沉积，6个月后还检测出Tau蛋白磷酸化、突触缺失等特征^[14]，较好地模拟了AD疾病特征；但12个月后才检测出神经元缺失，且胚胎显微注射技术难以避免脱靶效应，不仅限制了目的基因在特定组织功能的研究，而且可能会导致动物发生与AD无关的不良后果。例如有研究发现，Tau转基因小鼠的脊髓出现了细胞坏死，导致后肢残疾，且随着年龄增长，后肢的残疾加重，寿命只有5~6个月^[23]。

另外，还有研究者直接通过脑立体定位注射 $A\beta$ 进行造模^[24]，能在短时间内诱导局部神经炎症，但同时容易激起机体免疫反应，且不符合AD患者脑内 $A\beta$ 沉积来自长期积累的临床发病机制。而本研究通过高效转导低免疫原性的AAV在大鼠脑内持续表达 *APP* 基



注：BC、VC、Exp 分别为空白对照组、空载病毒组、实验组 [通过脑立体定位在海马区注射携带人源三突变淀粉样前体蛋白 (*APP*) 和 NanoLuc 萤光素酶基因的腺相关病毒]。黑色箭头所指区域为皱缩坏死的细胞；红色箭头所指区域为尼氏体稀疏，染色浅淡的细胞；蓝色箭头所指区域为 β -淀粉样蛋白沉积区域。

Note: BC, VC, Exp are blank control group, virus control group and experimental group (adeno-associated virus carrying human triple mutant *APP* and NanoLuc luciferase genes was injected in the hippocampus by brain stereotaxic localization), respectively. The areas indicated by black arrows are crumpled necrotic cells. The areas indicated by red arrows are cells with sparse Nissl bodies and light staining. The area indicated by blue arrow is the area of amyloid β -protein deposition.

图5 大鼠海马体组织的HE染色(A)、尼氏染色(B)和免疫组织化学染色(C)结果

Figure 5 HE staining (A), Nissl staining (B), and immunohistochemical staining (C) results of rat hippocampal region

因, 进而形成 A β 沉淀, 可以更近似地模拟 AD 的发病进程。

NanoLuc 萤光素酶作为基因标记, 与传统的萤光素酶相比, 具有体积小 (约 19 kDa)、亮度高、稳定性好的优点, 结合底物 Furimazine 后可发出强烈蓝光, 可透过头骨被活体成像仪捕捉, 实现了高灵敏度、低背景的生物发光检测^[25-26]。本研究中将三突变 APP 基因与 NanoLuc 萤光素酶基因共用一个启动子, 这种单载体共表达系统避免了多载体共转染的效率不均问题, 使得 NanoLuc 萤光素酶的发光信号可以更准确地指示 APP 基因的表达情况。

本实验采用脑立体定位仪直接注射携带 APP 基因的 AAV, 利用活体成像仪可快速高效地观察造模效果, 对动物创伤小, 检测的灵敏度高, 无需额外注射易淬灭的荧光抗体或牺牲动物获取组织样本, 显著简化了实验流程并符合动物实验伦理的 3R 原则。此设计不仅为 AD 病理机制研究提供了高效工具, 更为大型动物 (如非人灵长类) 或难以基因编辑的物种提供了造模参考, 规避了转基因动物繁育的高耗时与高成本限制。

综上, 本研究通过脑立体定位技术联合 AAV 转入人源三突变 APP 基因成功构建的大鼠 AD 模型, 可体现出典型的 AD 组织病理学和认知行为特征, 为基于 A β 沉积的 AD 病理研究及药物研发提供了动物模型基础。

[医学伦理声明 Medical Ethics Statement]

本研究涉及的所有动物实验均已通过广西医科大学实验动物伦理与使用委员会审批 (审批号: 202404010)。所有实验过程均遵照中国实验动物相关法律法规条例进行。

All animal experiments involved in this study were approved by the Ethics and Use of Laboratory Animals Committee of Guangxi Medical University (Approval number: 202404010). All experimental procedures were conducted in compliance with Chinese laws and regulations related to laboratory animals.

[作者贡献 Author Contribution]

肖林林负责方案设计、实验操作、统计分析、论文撰写及修改; 杨逸萱、黎珊杉、罗兰诗雨和尹思威协助各项实验的实施; 孙俊铭和施维参与实验指导、论文修改; 欧阳轶强和李习艺负责课题方案设计、实验指导、资金支持, 以及论文修改。

[利益声明 Declaration of Interest]

所有作者均声明本文不存在利益冲突。

[参考文献 References]

[1] 王刚, 齐金蕾, 刘馨雅, 等. 中国阿尔茨海默病报告 2024[J]. 诊断

学理论与实践, 2024, 23(3):219-256. DOI: 10.16150/j.1671-2870.2024.03.001.

WANG G, QI J L, LIU X Y, et al. China Alzheimer report 2024[J]. J Diagn Concepts Pract, 2024, 23(3):219-256. DOI: 10.16150/j.1671-2870.2024.03.001.

- [2] SCHELTENS P, DE STROOPER B, KIVIPELTO M, et al. Alzheimer's disease[J]. Lancet, 2021, 397(10284): 1577-1590. DOI:10.1016/s0140-6736(20)32205-4.
- [3] SCHELTENS P, BLENNOW K, BRETELER M M, et al. Alzheimer's disease[J]. Lancet, 2016, 388(10043):505-517. DOI: 10.1016/s0140-6736(15)01124-1.
- [4] BREIJYEH Z, KARAMAN R. Comprehensive review on Alzheimer's disease: causes and treatment[J]. Molecules, 2020, 25(24):5789. DOI:10.3390/molecules25245789.
- [5] JUCKER M, WALKER L C. Alzheimer's disease: From immunotherapy to immunoprevention[J]. Cell, 2023, 186(20): 4260-4270. DOI:10.1016/j.cell.2023.08.021.
- [6] ZHOU B, LU J G, SIDDU A, et al. Synaptogenic effect of APP-Swedish mutation in familial Alzheimer's disease[J]. Sci Transl Med, 2022, 14(667): eabn9380. DOI: 10.1126/scitranslmed.abn9380.
- [7] KIM M, BEZPROZVANNY I. Analysis of non-amyloidogenic mutations in APP supports loss of function hypothesis of Alzheimer's disease[J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(3):2092. DOI: 10.3390/ijms24032092.
- [8] ARMBRUST F, BICKENBACH K, MARENGO L, et al. The Swedish dilemma - the almost exclusive use of APPswe-based mouse models impedes adequate evaluation of alternative β -secretases[J]. Biochim Biophys Acta Mol Cell Res, 2022, 1869(3):119164. DOI:10.1016/j.bbamcr.2021.119164.
- [9] SCHILLING S, PRADHAN A, HEESCH A, et al. Differential effects of familial Alzheimer's disease-causing mutations on amyloid precursor protein (APP) trafficking, proteolytic conversion, and synaptogenic activity[J]. Acta Neuropathol Commun, 2023, 11(1):87. DOI:10.1186/s40478-023-01577-y.
- [10] JAWORSKI T, DEWACHTER I, LECHAT B, et al. AAV-tau mediates pyramidal neurodegeneration by cell-cycle re-entry without neurofibrillary tangle formation in wild-type mice[J]. PLoS One, 2009, 4(10): e7280. DOI: 10.1371/journal.pone.0007280.
- [11] XIA D, LIANOGLU S, SANDMANN T, et al. Novel App knock-in mouse model shows key features of amyloid pathology and reveals profound metabolic dysregulation of microglia[J]. Mol Neurodegener, 2022, 17(1): 41. DOI: 10.1186/s13024-022-00547-7.
- [12] CLAYTON K, DELPECH J C, HERRON S, et al. Plaque associated microglia hyper-secrete extracellular vesicles and accelerate tau propagation in a humanized APP mouse model[J]. Mol Neurodegener, 2021, 16(1): 18. DOI: 10.1186/s13024-021-00440-9.
- [13] TESSON L, COZZI J, MÉNORET S, et al. Transgenic modifications of the rat genome[J]. Transgenic Res, 2005, 14(5):531-546. DOI:10.1007/s11248-005-5077-z.
- [14] PANG K L, JIANG R C, ZHANG W, et al. An App knock-in rat model for Alzheimer's disease exhibiting A β and tau pathologies, neuronal death and cognitive impairments[J]. Cell Res, 2022, 32(2):157-175. DOI:10.1038/s41422-021-00582-x.

- [15] PUPO A, FERNÁNDEZ A, LOW S H, et al. AAV vectors: The Rubik's cube of human gene therapy[J]. *Mol Ther*, 2022, 30(12): 3515-3541. DOI:10.1016/j.jymthe.2022.09.015.
- [16] ASCHAUER D F, KREUZ S, RUMPEL S. Analysis of transduction efficiency, tropism and axonal transport of AAV serotypes 1, 2, 5, 6, 8 and 9 in the mouse brain[J]. *PLoS One*, 2013, 8(9): e76310. DOI:10.1371/journal.pone.0076310.
- [17] ROSTAGNO A A. Pathogenesis of Alzheimer's disease[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 24(1):107. DOI:10.3390/ijms24010107.
- [18] KAYED R, LASAGNA-REEVES C A. Molecular mechanisms of amyloid oligomers toxicity[J]. *J Alzheimers Dis*, 2013, 33(Suppl 1): S67-S78. DOI:10.3233/JAD-2012-129001.
- [19] FOLKESSON R, MALKIEWICZ K, KLOSKOWSKA E, et al. A transgenic rat expressing human APP with the Swedish Alzheimer's disease mutation[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 358(3):777-782. DOI:10.1016/j.bbrc.2007.04.195.
- [20] KLOSKOWSKA E, PHAM T M, NILSSON T, et al. Cognitive impairment in the Tg6590 transgenic rat model of Alzheimer's disease[J]. *J Cell Mol Med*, 2010, 14(6B):1816-1823. DOI:10.1111/j.1582-4934.2009.00809.x.
- [21] FENG W X, ZHANG Y L, WANG Z, et al. Microglia prevent beta-amyloid plaque formation in the early stage of an Alzheimer's disease mouse model with suppression of glymphatic clearance[J]. *Alzheimers Res Ther*, 2020, 12(1):125. DOI:10.1186/s13195-020-00688-1.
- [22] LI Z Y, ZHANG Y, MENG X B, et al. A novel DPP-4 inhibitor Gramcyclin A attenuates cognitive deficits in APP/PS1/tau triple transgenic mice *via* enhancing brain GLP-1-dependent glucose uptake[J]. *Phytother Res*, 2022, 36(3):1297-1309. DOI: 10.1002/ptr.7387.
- [23] HAMPTON D W, WEBBER D J, BILICAN B, et al. Cell-mediated neuroprotection in a mouse model of human tauopathy[J]. *J Neurosci*, 2010, 30(30): 9973-9983. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0834-10.2010.
- [24] KIM H Y, LEE D K, CHUNG B R, et al. Intracerebroventricular injection of amyloid- β peptides in normal mice to acutely induce Alzheimer-like cognitive deficits[J]. *J Vis Exp*, 2016 (109):53308. DOI:10.3791/53308.
- [25] SU Y C, WALKER J R, PARK Y, et al. Novel NanoLuc substrates enable bright two-population bioluminescence imaging in animals[J]. *Nat Methods*, 2020, 17(8):852-860. DOI: 10.1038/s41592-020-0889-6.
- [26] TIAN X D, ZHANG Y Y, LI X Y, et al. A luciferase prosubstrate and a red bioluminescent calcium indicator for imaging neuronal activity in mice[J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 3967. DOI:10.1038/s41467-022-31673-x.

(收稿日期:2025-03-01 修回日期:2025-04-14)

(本文责任编辑:张俊彦)

[引用本文]

肖林林, 杨逸萱, 黎珊杉, 等. 利用脑立体定位技术将人源三突变 APP 基因导入海马区构建阿尔茨海默病大鼠模型[J]. *实验动物与比较医学*, 2025, 45(3): 269-278. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2025.030.

XIAO L L, YANG Y X, LI S S, et al. Establishment of a rat model of Alzheimer's disease by introducing human triple mutant APP gene into hippocampus via brain stereotactic technology[J]. *Lab Anim Comp Med*, 2025, 45(3): 269-278. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2025.030.

《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

慢性肾脏病大鼠主动脉钙化模型的术式优化及效果评价

潘颐聪, 蒋汶洪, 胡明, 覃晓

(广西医科大学第一附属医院血管外科, 南宁 530021)

[摘要] **目的** 通过不同的肾脏切除手术方法建立SD大鼠慢性肾脏病主动脉钙化模型, 并进行手术时间及存活时间比较和效果评价, 以探索更优化的建模方法。**方法** 根据不同手术方式分为腹腔入路先切2/3左肾后二期右全肾切除组(A组)、腹腔入路2/3左肾及右全肾同时切除组(B组)、背入路先切右全肾后二期2/3左肾切除组(C组)、背入路先切2/3左肾后二期切除右全肾组(D组)共4组, 比较腹腔入路及背入路、分期及一次性肾脏切除术的SD大鼠生存曲线确定最优的肾脏切除手术方式后, 选取24只8周龄雄性SPF级SD大鼠进行肾脏切除联合骨化三醇钙化诱导: 其中实验组12只大鼠行背入路的左侧2/3肾切除后右侧全肾切除术, 1周后腹腔注射骨化三醇溶液1 μg/kg, 以进行主动脉钙化诱导; 对照组12只大鼠行假手术后1周, 腹腔注射含1%DMSO的生理盐水250 μL/kg。腹腔注射药物3个月后, 观察各组大鼠的存活情况。麻醉状态下, 采集各组大鼠的血液样本, 测定血清磷和钙离子浓度、血清尿素氮和肌酐含量。安乐死大鼠后进行剖检, 肉眼观察残余肾脏形态, HE染色观察肾冠状切面的病理学变化。另外取各组大鼠的全主动脉, 茜素红S及von Kossa染色观察主动脉钙化程度, 实时荧光定量PCR法检测大鼠主动脉组织中平滑肌肌动蛋白相关蛋白α(smooth muscle actin-associated protein α, Sm22)、Runt相关转录因子2(Runt-related transcription factor 2, Runx2)、骨桥蛋白(osteopontin, OPN)基因表达情况, 以评价建模效果。**结果** 不同术式优化探索实验发现, 背入路先切除2/3左肾再切除右侧全肾的D组大鼠的存活率最高, 提示该术式是建立肾功能不全的慢性肾脏病模型的最佳手术方式。运用该术式联合高剂量骨化三醇注射的实验组大鼠血清钙离子浓度显著低于假手术对照组($P < 0.05$), 而血清磷离子浓度、血清肌酐及血清尿素氮含量则显著高于对照组($P < 0.05$)。肾脏HE染色可见实验组大鼠肾脏发生明显器质性改变, 其中实验组大鼠的肾小球计数比对照组明显减少($P < 0.05$), 提示肾衰竭模型成功建立。茜素红S染色可见实验组大鼠的主动脉中膜中有明显的色素沉着, von Kossa染色可见实验组大鼠的主动脉中膜层明显有硝酸银沉积, 符合肾衰竭主动脉钙化的表现。实时荧光定量PCR表明, 实验组大鼠的主动脉组织中Sm22表达水平下降($P < 0.05$), OPN和Runx2表达水平上升($P < 0.05$), 提示主动脉平滑肌细胞由平滑肌表型向骨样表型转变, 主动脉钙化模型诱导成功。**结论** 采用背入路先切除2/3左肾, 再进行右侧全肾切除, 联合高剂量骨化三醇溶液摄入的方法, 可成功建立SD大鼠慢性肾脏病主动脉钙化模型。该方案能缩短手术时间, 提高建模成功率和动物存活率。

[关键词] 血管钙化; 慢性肾脏病; 肾脏切除术; 动物模型; SD大鼠

[中图分类号] Q95-33; R-332 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2025)03-0279-11



Optimization of Surgical Procedure and Efficacy Evaluation of Aortic Calcification Model in Rats with Chronic Kidney Disease

PAN Yicong, JIANG Wenhong, HU Ming, QIN Xiao

(Department of Vascular Surgery, The First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China)

Correspondence to: JIANG Wenhong (ORCID: 0000-0001-6677-4533), E-mail: jwhongxszy@163.com

[ABSTRACT] **Objective** To establish a chronic kidney disease-associated aortic calcification model in SD

[基金项目] 广西自然科学基金项目“基于骨桥蛋白(OPN)磷酸化表观修饰探讨抗酒石酸酸性磷酸酶(ACP5)在主动脉钙化调控中的作用模式和机理”(2022GXNSFBA035502)

[第一作者] 潘颐聪(1988—),男,博士研究生,研究方向:血管钙化。E-mail: 375752640@qq.com。ORCID: 0009-0004-6758-9507

[通信作者] 蒋汶洪(1989—),男,博士研究生,主治医师,课题负责人,研究方向:外周血管疾病。E-mail: jwhongxszy@163.com。ORCID: 0000-0001-6677-4533

rats using different nephrectomy surgical methods, and to compare and evaluate surgical duration and survival time to explore a more optimized modeling method. **Methods** According to different surgical methods, the SD rats were divided into four groups: Group A: intraperitoneal resection of 2/3 of the left kidney followed by right total nephrectomy in the second stage; Group B: intraperitoneal resection of 2/3 of the left kidney and simultaneous right total nephrectomy; Group C: dorsal approach right total nephrectomy followed by resection of 2/3 of the left kidney in the second stage; Group D: dorsal approach resection of 2/3 of the left kidney followed by right total nephrectomy in the second stage. After comparing survival curves of SD rats undergoing intraperitoneal versus dorsal approaches, and staged versus single-stage nephrectomy, the optimal nephrectomy surgical method was determined. Then, twenty-four 8-week-old SPF-grade male SD rats were selected for nephrectomy combined with calcitriol-induced calcification. Experimental group (12 rats): the dorsal approach left 2/3 nephrectomy followed by right total nephrectomy, with intraperitoneal injection of 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ calcitriol administered one week later to induce aortic calcification. Control group (12 rats): the intraperitoneal injection of 250 $\mu\text{L}/\text{kg}$ physiological saline containing 1% DMSO one week after sham surgery. After intraperitoneal injection of drugs for 3 months, the survival status of rats in each group was observed. Under anesthesia, blood samples were collected from each group to measure serum phosphorus and calcium ion concentrations, as well as serum urea nitrogen and creatinine levels. After euthanizing the rats, a post-mortem examination was performed to observe the residual kidney morphology, and HE staining was used to observe the pathological changes in the coronal section of the kidney. Additionally, the entire aorta of each group was taken, and the degree of aortic calcification was observed by staining with Alizarin red S and von Kossa. Real-time fluorescence quantitative PCR was used to detect the gene expression of smooth muscle actin-associated protein alpha (*Sm22*), Runt-related transcription factor 2 (*Runx2*), and osteopontin (*OPN*) in rat aortic tissue to evaluate the effectiveness of the model. **Results** The exploratory optimization experiment of different surgical procedures found that the survival rate of group D rats, which underwent 2/3 left kidney resection followed by right whole kidney resection via the dorsal approach, was the highest, indicating that this surgical procedure was the best method for establishing a chronic kidney disease model with renal dysfunction. The experimental group rats treated with this surgical procedure combined with high-dose calcitriol injection had significantly lower serum calcium ion concentration than those in the sham-operated control group ($P < 0.05$), while serum phosphorus ion concentration, serum creatinine, and serum urea nitrogen levels were significantly higher than those of the control group ($P < 0.05$). HE staining of the kidneys showed significant organic changes in the kidneys of the experimental group rats, with a significant decrease in glomerular count compared to that of the control group ($P < 0.05$), indicating the successful establishment of a renal failure model. Alizarin red S staining showed significant pigment deposition in the aortic media of the experimental group rats, while von Kossa staining showed significant silver nitrate deposition in the aortic media of the experimental group rats, which was consistent with the manifestation of aortic calcification in renal failure. Real-time fluorescence quantitative PCR showed that the expression level of *Sm22* in the aortic tissue of the experimental group rats decreased ($P < 0.05$), while the expression levels of *OPN* and *Runx2* increased ($P < 0.05$), indicating a transition of aortic smooth muscle cells from smooth muscle phenotype to bone-like phenotype and successful induction of an aortic calcification model. **Conclusion** The method of establishing an aortic calcification model of chronic kidney disease in SD rats by first removing two-thirds of the left kidney via the dorsal approach followed by right total nephrectomy, combined with high-dose calcitriol administration, shortens the surgical time, improves the success rate of modeling, and increases the animal survival rate.

[Key words] Vascular calcification; Chronic kidney disease; Nephrectomy; Animal models; SD rats

慢性肾脏病 (chronic kidney disease, CKD) 是一个全球性的健康问题, 发病率较高, 并发症较多, 并具有高致死率及致残率的特点。随着 CKD 发展, 机体

内矿物质代谢紊乱造成的压力逐渐累积在各个器官, 其中心血管钙化是 CKD 患者的重要并发症, 也是 CKD 患者死亡的原因之一^[1-2]。因此研究血管钙化对 CKD

患者有重大意义。

建立大鼠慢性肾功能不全血管钙化模型是研究CKD的常用手段。目前建立大鼠慢性肾功能不全血管钙化模型的手段较多^[3-8]，其中肾切除联合维生素D摄入是较为经典的慢性肾功能不全主动脉钙化模型建立方法。研究发现，啮齿类动物经肾切除加上高磷饮食或高维生素D摄入后能获得较为理想的血管钙化表型，并且肾切除相较于药物诱导肾脏衰竭来说个体差异更小^[7]。另有学者研究发现，肾切除术后加用大剂量骨化三醇（一种活化的维生素D）能较好地诱导主动脉钙化^[9]，并且骨化三醇能在一定程度上改善慢性肾功能不全引起的甲状旁腺亢进症状，能提高建模期间大鼠的存活率，提示肾切除联合骨化三醇摄入是较为理想的大鼠慢性肾功能不全血管钙化模型建立方法。然而，以上方法需要对大鼠进行手术，创伤较大，甚至严重影响大鼠生存，因此需要选择合理的手术方式将大鼠的手术创伤降至最小。目前，构建该模型的手术方式多种多样，有不同的手术入路、不同的肾切除顺序^[10-13]，并且本课题组在预实验中发现不同手术方式对大鼠生存有较显著的影响。基于此，本研究先将36只SD大鼠分为不同肾脏切除术式的4组进行探索性实验，评估优化手术方式后再选取24只SD大鼠进行慢性肾功能不全建模和血管钙化诱导，然后验证模型动物的主动脉钙化效果，旨在探索大鼠CKD血管钙化模型的最优手术方案。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF级SD雄性大鼠60只，8周龄，体重（210 ± 10.8）g，购自广西医科大学动物实验中心〔SCXK（桂）2020-0003〕，质量合格证号为2024235。动物饲养于广西医科大学SPF级动物实验室〔SYXK（桂）2020-0004〕，环境温度为（23 ± 3）℃，相对湿度为（50 ± 5）%，人工照明且控制12 h明暗交替；动物可以全天自由饮水，全程常规进食。所有实验操作遵循动物福利伦理要求，并获得广西医科大学实验动物伦理委员会审查批准（批号202312005）；术后允许大鼠自由活动，自由饮食饮水。

1.2 实验设备及试剂

超低温冰箱（型号MDF-782VE）购自冰山松洋生物科技（大连）有限公司；倒置显微镜（型号CKX53）购自日本Olympus公司；全波长酶标仪（型号

Multiskan SkyHigh）购自美国Thermo Fisher Scientific公司；实时荧光定量PCR仪（型号qTOWER3G）购自德国耶拿分析仪器股份公司（AnalytikJena）；RWD动物气体麻醉机购自深圳瑞沃德生命科技股份有限公司。

血清磷浓度检测试剂盒（批号BC1655）、尿素氮（尿素）含量检测试剂盒（批号BC1535）、钙检测试剂盒（邻甲酚酞络合酮比色法，批号BC8333）和骨化三醇（批号SC8910）均购自北京索莱宝科技有限公司；肌酐（creatinine, CRE）测定试剂盒（批号C011-2-1）购自南京建成生物工程研究所；2%茜素红S染色液（批号G1038-100 mL）、von Kossa染色液（批号G1043-1）均购自武汉赛维尔生物（Servicebio）科技有限公司；HE染色液（批号G1005-500 mL）购自武汉赛维尔生物（Servicebio）科技有限公司；二甲基亚砷（dimethyl sulfoxide, DMSO）（批号D6370）购自北京博奥拓达（Biotopped）科技有限公司；异氟烷（批号2025021501）购自深圳市瑞沃德生命科技股份有限公司；卡洛芬（批号M81424-1G）购自上海迈瑞尔生化科技有限公司；细胞/组织总RNA提取试剂盒（批号RC11201）购自南京诺唯赞（Vazyme）生物科技股份有限公司；逆转录试剂盒（批号RR092A）和快速荧光定量PCR试剂盒（批号CN830A）均购自日本TaKaRa公司。

1.3 大鼠肾功能不全模型构建术式优化

1.3.1 实验分组

为探索不同手术方式的效果，将36只SD大鼠分为4个实验组：A组12只，从腹腔入路先切2/3左肾后，二期切除右全肾；B组6只，从腹腔入路2/3左肾及右全肾同时切除；C组6只，背入路先切右全肾后，二期切除2/3左肾；D组12只，背入路先切除2/3左肾，再二期切除右全肾。

1.3.2 腹腔入路肾脏切除术

在RWD动物气体麻醉机的麻醉诱导盒中使用4%异氟烷/氧气对大鼠进行麻醉诱导，再用1.5%异氟烷/氧气混合气体维持麻醉，腹部备皮并用75%乙醇溶液消毒，用组织剪剪开腹中线皮肤及腹白线，打开腹腔。2/3左肾切除：以1号外科缝线缝合腹壁作为牵引提拉腹壁，用棉签将小肠及降结肠向右侧拨开，并置入棉球挡开肠管使暴露左侧肾脏。暴露左肾下极，沿包膜钝性分离左肾下极，沿包膜继续向上钝性分离左肾上极，将左肾游离。以无损伤镊子轻持左肾上极，高温电凝刀切割左肾皮质，标记切割范围，以组织剪沿预

切线剪除肾下极,以电凝刀灼烧止血^[14];用同样方法处理左肾上极。使用同样的方法暴露右肾,以无损伤镊子轻持右侧肾脏,向上外轻轻提起暴露右侧肾蒂,以止血钳夹闭肾蒂血管组织,用组织剪剪断肾蒂,完整切除右肾。以1号外科缝合线结扎右侧肾蒂,确定无出血后,取出棉球恢复肠道位置,连续缝合腹壁,皮下注射少量1%利多卡因(<0.1 mL)用于术后止痛,随后将大鼠置于恒温电热毯上复苏。如进行分期肾切除术,则在2/3左肾切除术后1周,再按上述操作切除右侧全肾。

1.3.3 背入路肾脏切除术

按照1.3.2节方法对大鼠进行麻醉,背部备皮并用75%乙醇溶液消毒,术前可触摸肾脏大概位置,取第13肋脊点下方0.5 cm偏外侧0.5 cm做1.5~2 cm切口(位于竖脊肌外侧)。2/3左肾切除:剪开皮肤浅筋膜,暴露背阔肌,透过背阔肌可见下方黄色的肾周脂肪即为正确位置,剪开背阔肌暴露后腹腔;用左手食指于腹腔触摸肾脏并将其挤出切口,以镊子提起左侧肾下极脂肪筋膜,暴露筋膜与肾包膜解剖间隙,以中弯钳或棉签沿间隙钝性分离肾筋膜,完全暴露肾脏及肾蒂结构;以无损伤镊子轻持左肾下极,用高温电凝刀切割左侧肾皮质标记切割范围,组织剪沿预切线剪除左肾下极,以电凝刀灼烧止血;以同样方法处理左肾上极,确定无出血,肾蒂无扭曲后将左侧肾脏还纳后腹腔;连续缝合背阔肌,间断缝合皮肤,皮下注射少量(<0.1 mL)1%利多卡因用于术后止痛。1周后行右侧肾全切术:用相同的方法暴露右肾,由于右肾不方便触及,可先找到脂肪筋膜,反复提起脂肪筋膜可见到肾下极,将右肾挤出切口外侧;以镊子提起肾下极脂肪筋膜,暴露筋膜与肾包膜解剖间隙,以中弯钳或棉签沿间隙钝性分离肾筋膜,完全暴露右侧肾脏及右侧肾蒂结构;以无损伤镊子轻持右侧肾脏,以1号外科缝合线尽量远离肾门将肾蒂结扎,以剪刀剪断肾蒂将右肾完整取出;确定结扎牢固无出血后,连续缝合背阔肌,间断缝合皮肤。若先切除右侧肾则将右肾切除的顺序与左肾部分切除顺序调换,手术方式不变。皮下注射1%利多卡因(<0.1 mL),随后将大鼠置于恒温电热毯上复苏。

1.3.4 手术后实验大鼠的生存情况分析

术后大鼠不予束缚,可自由活动,正常摄食饮水。术后每日按5 mg/kg剂量皮下注射卡洛芬溶液(使用无水乙醇溶解卡洛芬粉剂配制成10 mg/mL保存液,再使

用生理盐水稀释成2.5 mg/mL溶液)一次,连续注射3 d进行术后止痛。记录各组大鼠术后生存状况,以各组大鼠存活数量及实验时间为变量,分析同一时间内各组大鼠存活数量,使用概率乘法计算不同时间点的生存概率,绘制Kaplan-Meier曲线进行生存分析,对肾切除术后60 d内各组大鼠的累积生存概率进行Log-Rank检验。

1.4 肾功能不全主动脉钙化模型构建

1.4.1 实验分组及钙化诱导

确定最优的肾脏切除手术方式后,选取24只SD大鼠进行肾脏切除及动脉钙化诱导建模。其中实验组12只大鼠,行1.3节优化的肾脏切除术后1周,使用高剂量骨化三醇溶液(先用DMSO溶解骨化三醇粉剂配制成1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 骨化三醇保存液,按0.99 mL生理盐水、5.6 μL DMSO和4.4 μL 骨化三醇保存液的比例配制成骨化三醇注射液1 mL)1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 进行腹腔注射,每3 d注射1次,共持续注射3个月进行主动脉钙化诱导。对照组12只大鼠行假手术,即暴露肾脏后还纳后腹腔,1周后腹腔注射生理盐水配制的1%DMSO溶液3个月^[7-13]。

1.4.2 建模后动物生存状态观察及安死术后取材

骨化三醇诱导主动脉钙化期间观察各组大鼠的存活情况,包括精神状态、摄食量、毛发、体重等。3个月即12周后,使用2%异氟烷/氧气混合气体麻醉各组大鼠,行下腔静脉采血用于血清生化检测,血液样本采集完成后继续放血安乐死动物。然后进行剖检,肉眼观察大鼠残余肾脏形态,取材并制成肾冠状切面的石蜡切片后进行HE染色,同时进行肾小球计数。另外取各组大鼠的全主动脉,以肾动脉为界分别采集胸主动脉及腹主动脉两部分,每部分取1/2的主动脉组织以4%多聚甲醛溶液固定,用于免疫组织化学染色,包括茜素红S染色、von Kossa染色;剩下的主动脉组织经液氮快速冷冻,48 h后置于-80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱冻存,用于实时荧光定量PCR检测。大鼠尸体包装后贮存在-20 $^{\circ}\text{C}$ 的冰柜中,待专业公司进行无害化处理。慢性肾脏病主动脉钙化模型构建实验流程如图1所示。

1.5 模型大鼠的血清生化指标测定

采用下腔静脉采血法抽取大鼠全血约2.5 mL置入干燥管或促凝管,3 000 r/min离心15 min,取上清液即为大鼠血清。分别使用血磷浓度检测试剂盒、尿素氮(尿素)含量检测试剂盒、钙检测试剂盒(邻甲酚酞络合酮比色法)和CRE测定试剂盒,按说明书步骤测定



注: 8周龄SD大鼠饲养于SPF级动物屏障设施, 常规饮食适应3 d后进行左肾2/3切除术, 术后常规饲养, 1周后进行右肾切除术。1周后每3 d给予1 µg/kg骨化三醇注射液。注射12周后进行静脉采血, 并对全主动脉及肾脏进行取材, 血清用于血生化检测, 肾脏行冠状面石蜡切片后进行HE染色, 主动脉一部分制成石蜡切片进行茜素红S染色、von Kossa染色, 一部分进行冻存用于实时荧光定量PCR检测。

Note: Eight-week-old SD rats were housed in SPF-grade animal barrier facilities and underwent left kidney two-thirds nephrectomy after three days of regular dietary adaptation. After surgery, they were routinely housed and underwent right kidney nephrectomy one week later. After one week, administer 1 µg/kg calcitriol injection every three days. After 12 weeks of injection, venous blood collection was performed, and samples were taken from the entire aorta and kidneys. Serum was used for blood biochemistry testing, and paraffin-embedded kidneys were sectioned in coronal side for HE staining. A portion of the aorta was sectioned in paraffin for Alizarin Red S staining and von Kossa staining, and a portion was frozen for real-time fluorescence quantitative PCR detection.

图1 SD大鼠慢性肾脏病主动脉钙化建模及评价实验流程图

Figure1 Flowchart of the experimental process for modeling and evaluating aortic calcification in SD rats with chronic kidney disease

所有实验大鼠的血清磷和钙离子浓度、血清尿素氮和肌酐含量。

1.6 大鼠肾脏HE染色观察

将大鼠肾脏组织沿冠状面切开固定于4%多聚甲醛溶液中, 常规石蜡包埋, 制备厚度为5 µm的肾脏冠状面组织切片。使用二甲苯浸泡切片, 脱蜡后分别使用无水乙醇、95%和75%乙醇溶液进行脱水, 使用纯水和去离子水洗涤各2次, 每次5 min。随后加入苏木精染液染色5 min, 使用1%的盐酸乙醇溶液去除多余染料, 并用氨水处理10 s使部分变蓝, 再通过流水冲洗30 s, 去离子水反复洗10 min。加入伊红染液染色2~3 min, 纯水洗3次后, 将组织切片依次置于75%、95%以及无水乙醇溶液中浸泡各3 min, 二甲苯溶液中浸泡2次各5 min。于切片上滴加中性树脂, 盖上盖玻片进行封固。光学显微镜下观察肾脏结构, 并用Image View软件辅助进行肾小球计数。

1.7 大鼠主动脉组织化学染色观察

1.7.1 茜素红S染色

将大鼠主动脉组织固定于4%多聚甲醛溶液中, 常规石蜡包埋, 制备厚度为5 µm的组织切片。使用二甲苯浸泡切片脱蜡后, 分别使用无水乙醇、95%和75%乙醇溶液进行脱水, 然后用2%茜素红S染色液浸染

20 min。再用95%乙醇溶液和无水乙醇各脱水2次, 二甲苯透明, 最后用中性树脂封固。在光学显微镜下观察主动脉中膜染色情况。

1.7.2 von Kossa染色

按照1.7.1节方法制备的大鼠主动脉组织切片, 使用二甲苯浸泡切片脱蜡后, 分别使用无水乙醇、95%和75%乙醇溶液进行脱水, 每张切片上滴加von Kossa染色液至完全覆盖组织, 同时进行紫外线照射, 30 min后用蒸馏水洗1 min。然后滴加5%硫代硫酸钠溶液至完全覆盖组织, 放置1 min后进行HE染液复染。使用95%乙醇溶液和无水乙醇各脱水2次, 二甲苯透明后用中性树脂封固^[15-16]。在光学显微镜下观察主动脉中膜染色情况。

1.7.3 染色结果的半定量数据分析

主动脉组织切片染色图像使用Windows11系统的Microsoft照片2025处理软件智能去除背景后, 使用Image J软件进行图片处理: 将图片Type设置成8 bit灰阶, 设置Enhance Contrast为0.3%。对于von Kossa染色切片, 设置Threshold为0~168可得到满意的染色面积, 0~251可得到主动脉总面积; 对于茜素红S染色, Threshold设置为0~163可得到满意的染色面积, 0~251可得到主动脉总面积。以主动脉染色面积占主动脉

总面积的百分比评估主动脉钙化程度。

1.8 大鼠主动脉组织中相关基因的荧光定量PCR检测

采用实时荧光定量PCR法测定主动脉组织中平滑肌肌动蛋白相关蛋白 α (smooth muscle actin-associated protein α , *Sm22*) 以及骨组织相关的骨桥蛋白 (osteopontin, *OPN*)、Runt 相关转录因子 2 (Runt-related transcription factor 2, *Runx2*) 表达量, 以此来反映模型建立后血管平滑肌成骨样表型转变的情况^[4]。采用 TRIzol 法提取主动脉组织中总 RNA, 酶标仪测定 RNA 浓度后于 -80°C 冰箱保存。在 250 μL 离心管中加入 RNA 1 000 μg , 用 DEPC 水定容至 14 μL , 后

加入 8 \times DNA 酶 2 μL , 置入 PCR 仪进行反应, 反应条件为 42°C 2 min, 4°C 保存, 以清除 DNA 杂质。反应完成的离心管中加入 5 \times 逆转录酶 4 μL , 置入 PCR 仪进行反应, 反应条件为 37°C 10 min, 85°C 5 s, 4°C 保存, 得到产物为 cDNA, 可在 -80°C 保存或直接用于荧光定量 PCR。实时荧光定量 PCR 体系包括 PCR 正反向引物各 0.8 μL 、SYBR Green Master Mix PCR 反应试剂 10 μL 、cDNA 模板 2 μL 、无菌无酶水 6.4 μL ; 其中 PCR 引物序列信息见表 1, 由 TaKaRa 公司设计并合成。PCR 反应流程: 95°C 预变性 30 s; 95°C 变性 5 s, 60°C 退火延伸 10 s, 共 40 个循环。PCR 扩增完成后计算 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 值, 以反映目的基因的表达水平。

表 1 PCR 引物序列信息

Table 1 Primers for real-time fluorescent quantitative PCR

目标基因名称 Target gene name	NCBI 基因序列号 NCBI reference sequence	引物序列信息 Primer sequence information	扩增片段大小/bp Amplification fragment size/bp
<i>Sm22</i> (Tagln)	NC-086026.1	F: 5'-CAGATGGAACAGGTGGCTCAA-3' R: 5'-GCCCAAAGCCATTACAGTCCTC-3'	161
<i>OPN</i> (Spp1)	NC-086032.1	F: 5'-GCCGAGGTGATAGCTTGGCTTA-3' R: 5'-TTGATAGCCTCATCGGACTCCTG-3'	145
<i>Runx2</i>	NC-086027.1	F: 5'-GGATGCCTTAGTGCCCAAATG-3' R: 5'-CACCTGTGAGGTGGCTGAA-3'	120
β -actin	NC-086030.1	F: 5'-CACCCGCGAGTACAACCTTC-3' R: 5'-CCCATACCCACCATCACACC-3'	207

注: *Sm22*, 平滑肌肌动蛋白相关蛋白 α ; *Runx2*, Runt 相关转录因子 2; *OPN*, 骨桥蛋白。

Note: *Sm22*, Smooth muscle actin-associated protein alpha; *Runx2*, Runt-related transcription factor 2; *OPN*, Osteopontin.

1.9 统计学分析

采用 SPSS 20.0 软件对实验结果数据进行统计学分析。计量资料先进行 Shapiro-Wilk 正态性检验, 符合时数据用平均数 \pm 标准差表示, 两组间比较采用独立样本 *t* 检验, 多组间比较采用秩和检验。生存分析采用 Kaplan-Meier 方法进行统计, 使用 Log-Rank 检验计算 *P* 值, 使用 R 软件 4.3.1 版本 “survival” 包进行生存分析, 使用 “survminer” 包进行生存分析可视化绘制 Kaplan-Meier 曲线。 $P < 0.05$ 提示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同手术方式构建的慢性肾功能不全模型大鼠存活情况

采用不同手术方式建立的慢性肾功能不全模型大鼠的术后 60 d 累积生存概率有明显差异 (图 2, $P < 0.05$)。其中腹腔入路 2/3 左肾及右全肾同时切除的 B 组及背入路先切右全肾后二期 2/3 左肾切除的 C 组大鼠在

术后 10 d 内出现大量死亡 (死亡率 $> 50\%$), 背入路先行 2/3 左肾切除再行右全肾切除的 D 组大鼠相较其他组的术后 60 d 累积生存概率最高 ($P < 0.05$), 因此后续采用该术式进行 CKD 建模。

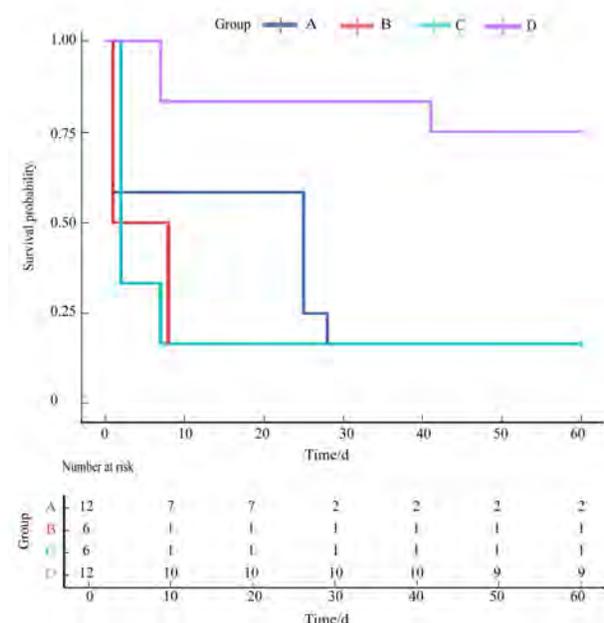
2.2 CKD 主动脉钙化建模大鼠的效果评估

2.2.1 术后大鼠生存状态及其肾脏、主动脉观测

用优化的肾脏切除术式联合高剂量骨化三醇注射法建立 CKD 主动脉钙化模型期间, 12 只实验组大鼠中分别于右肾切除后第 7、9、40 天各死亡 1 只, 总共死亡 3 只; 而 12 只对照组大鼠全部存活。实验组大鼠出现精神萎靡、摄食量减少、毛发稀疏, 以及消瘦等表现。对实验组所有存活大鼠行安乐死后剖检, 结果显示实验组大鼠残余肾脏苍白水肿, 主动脉呈现僵硬改变, 缺乏弹性, 动脉壁可触及环状钙化沉积。

2.2.2 血生化检测结果

分别取 9 只实验组大鼠及 12 只对照组大鼠的血清样本检测血生化指标, 结果数值见表 2。统计分析结果



注：横坐标表示切除两侧肾脏后第2天开始记录的时间（单位为天）。上图展示了接受不同方式手术的大鼠术后60 d累积生存率（Log-Rank 检验， $P=0.0077$ ），其中D组大鼠的存活率最高，与A、B、C组相比差异有统计学意义（ P 值分别为0.003 0、0.007 4、0.003 0），而且A、B、C组的大鼠均在术后10 d内大量死亡。

Note: The horizontal axis represents the time (in days) recorded from the second day after the removal of both kidneys. Upper of the figure shows that there is a significant difference in the cumulative survival rate of rats after 60 days of surgery using different surgical methods (log-rank test, $P=0.0077$). The survival rate of rats in group D was the highest, with statistically significant differences compared to groups A, B, and C ($P=0.0030$, $P=0.0074$, $P=0.0030$, respectively). Moreover, rats in groups A, B, and C experienced high mortality within 10 days after surgery.

图2 不同手术方式构建的慢性肾功能不全模型组大鼠的Kaplan-Meier生存曲线分析

Figure 2 Kaplan-Meier survival curve analysis of rats in chronic renal insufficiency model groups constructed using different surgical methods

显示，实验组大鼠的血清钙离子浓度显著低于对照组（ $P < 0.05$ ），而血清磷离子浓度以及肌酐和尿素氮的含量均显著高于对照组（ $P < 0.05$ ）。

2.2.3 肾脏HE染色结果

分别取9只实验组大鼠及12只对照组大鼠的肾脏，制作石蜡切片后行HE染色（图3）。实验组大鼠的肾脏冠状切面HE染色结果表明，肾皮质水肿，部分肾小球萎缩纤维化，肾小囊集合管扩张，表面肾脏受到损伤；对照组大鼠的肾皮质饱满，肾小球形态完整，肾

单位及集合管形态正常。取肾冠状切面进行肾小球计数，使用Image view软件辅助手工计数，结果如图3B所示；实验组肾小球数量 $[(67.55 \pm 19.75)$ 个]显著少于对照组 $[(398.25 \pm 114.29)$ 个， $P < 0.001$]。

2.2.4 主动脉钙化染色结果

分别取9只实验组大鼠及12只对照组大鼠的胸腹主动脉制作石蜡切片，行茜素红S染色及von Kossa染色（图4）。结果可见，实验组主动脉中膜深染，有明显的银盐及茜素红S染液沉积，可见部分细胞坏死，符合慢性肾脏疾病动脉中膜钙化的特点；对照组可见主动脉形态完整，未见染色沉积。使用Image J软件对染色面积进行相对定量分析（即每例大鼠取胸主动脉及腹主动脉染色面积占比的平均值进行对照分析），实验组的茜素红S及von Kossa染色面积占比（染色面积与该切面主动脉总面积之比）明显大于对照组（ $P < 0.05$ ），提示实验组的大鼠主动脉钙化明显。

2.2.5 主动脉组织细胞PCR结果

分别取9只实验组大鼠及12只对照组大鼠的主动脉组织，将每例大鼠胸主动脉样本及腹主动脉样本置入同一试管，共同提取总RNA后进行实时荧光定量PCR检测，结果可见实验组与对照组相比，血管平滑肌成骨样分化表型基因*OPN*及*Runx2*的表达水平明显升高（图5A、B， $P < 0.05$ ），而血管平滑肌收缩表型基因*Sm22*的表达水平明显降低（图5C， $P < 0.001$ ），提示实验组大鼠主动脉平滑肌组织由平滑肌表型向骨样表型转变。

3 讨论

SD大鼠肾切除联合骨化三醇诱导主动脉钙化是研究CDK血管钙化较为经典的动物模型^[12,15,17-18]。它不仅具有建模效率高、模型稳定、可重复性高等优点，也符合“先发生肾衰竭，后发生血管钙化”的临床过程，因此被广泛应用于CDK的血管钙化研究^[19]。

事实上已有较多学者对CDK血管钙化模型进行过评估，但大多是论证不同手术所带来的效果差异^[7,20-22]，鲜少针对手术的实施细节进行论证，也少有人对建模失败的原因进行分析。本研究对手术建模的操作细节进行了比较分析，发现不同的手术方案带来的建模效果有可能会大不相同。首先，本研究对手术入路进行对比分析。经生存分析发现，腹腔入路肾切除术较背入路手术的大鼠生存状况要差（图2）。这可能要归因于经腹入路暴露肾脏时对腹腔肠管扰动较

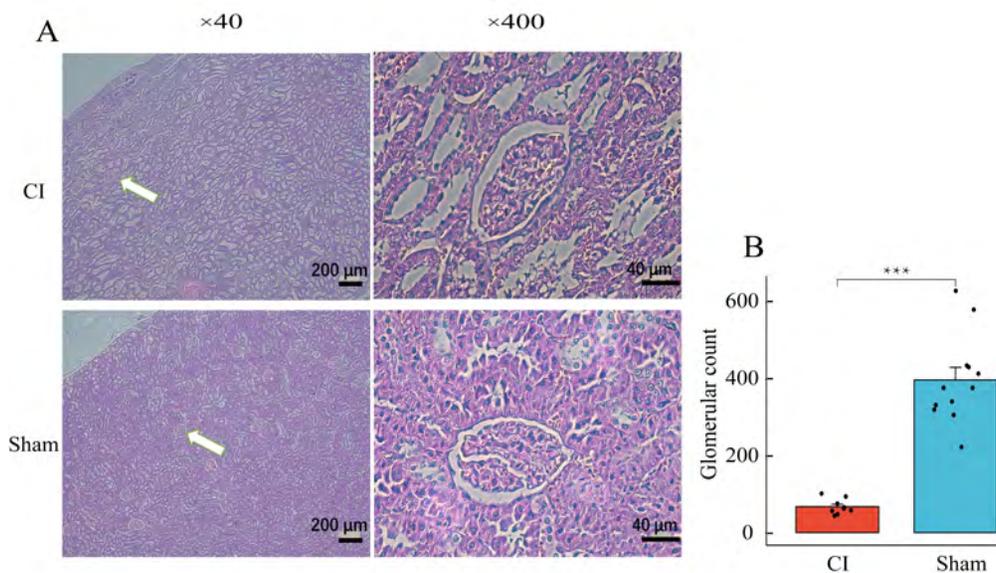
表2 实验组与对照组大鼠血清生化指标对比

Table 2 Comparison of biochemical indicators between the experimental group and the control group

生化指标	实验组 (n=9)	对照组 (n=12)	t值	P值
Biochemistry index	Experimental group	Control group	t value	P value
血清钙 c/(mmol·L ⁻¹)	1.876±0.036	1.929±0.042	3.431	0.004
Serum calcium ions				
血清磷 c/(mmol·L ⁻¹)	2.059±0.333	1.580±0.271	3.046	0.014
Serum phosphate ions				
血清肌酐 c/(μmol·L ⁻¹)	119.960±35.640	21.164±8.076	8.984	<0.000 1
Serum creatinine				
血清尿素氮 c/(mmol·L ⁻¹)	57.991±8.745	22.609±8.058	6.895	<0.000 1
Serum urea nitrogen				

注：实验组是指肾脏切除联合骨化三醇注射诱导钙化建立的慢性肾脏病主动脉钙化模型大鼠；对照组是指假手术联合含1%DMSO的生理盐水注射的大鼠。

Note: The experimental group refers to rats with chronic kidney disease-associated aortic calcification established by nephrectomy combined with calcitriol injection-induced calcification; The control group refers to rats that underwent sham surgery combined with injection of physiological saline containing 1% DMSO.



注：实验组是肾脏切除术+骨化三醇钙化诱导3个月的大鼠肾脏，对照组为假手术+DMSO注射3个月的大鼠肾脏。图中白色箭头指示肾小球。实验组 (CI组, n=9) 的肾小球数量显著少于对照组 (Sham组, n=12), ***P<0.001。

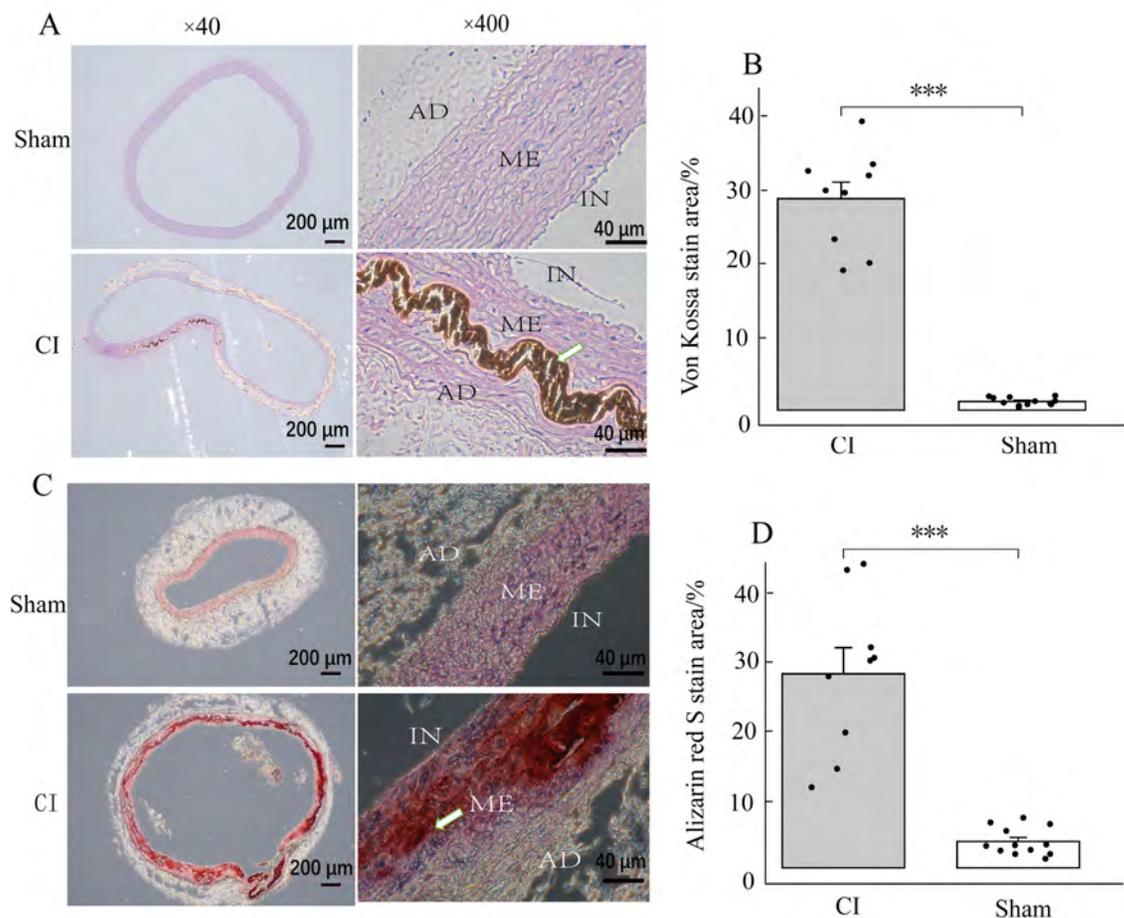
Note: The experimental group consisted of rats undergoing nephrectomy and calcitriol calcification induction for 3 months, while the control group consisted of rats undergoing sham surgery and DMSO injection for 3 months. The white arrow in the picture represents the glomerulus. The number of glomeruli in the experimental group (CI group, n=9) was significantly less than that in the control group (sham group, n=12), ***P<0.001.

图3 实验组与对照组大鼠的肾脏HE染色观察

Figure 3 HE staining observation of kidneys from rats in the experimental and control groups

大，易导致术后肠粘连发生；而且大鼠腹腔大网膜组织极不发达，炎症在腹腔易于扩散，从而影响模型大鼠的生存状况；而背入路肾切除术在定位准确的情况下仅需打开一层背阔肌即可暴露肾脏，无其他组织阻

挡，操作相对简单，对腹腔脏器几乎无干扰，大鼠生存状况较好。其次，本研究对肾脏切除时机也进行了对比分析。目前大部分学者采用的方式为分期手术^[4-7, 20-23]，但也有学者提出一期手术的可能性^[20]。



注：IN表示主动脉内膜；ME表示主动脉中膜；AD表示主动脉外膜。图A、B为von Kossa染色；图C、D为茜素红S染色。实验组（CI, $n=9$ ）的染色面积占比明显大于对照组（sham, $n=12$ ）（*** $P<0.001$ ）。白色箭头处为高倍镜下动脉中膜钙化沉积。

Note: IN represents the intima of the aorta; ME stands for the media of the aortic; AD represents the adventitia of the aorta. Figures A and B show von Kossa staining; Figures C and D show Alizarin red S staining. The proportion of stained area in the experimental group (CI, $n=9$) was significantly larger than that in the control group (sham, $n=12$) (*** $P<0.001$). The white arrow indicates arterial media calcification deposition under high magnification view.

图4 实验组和对照组大鼠的主动脉 von Kossa 染色及茜素红 S 染色观察

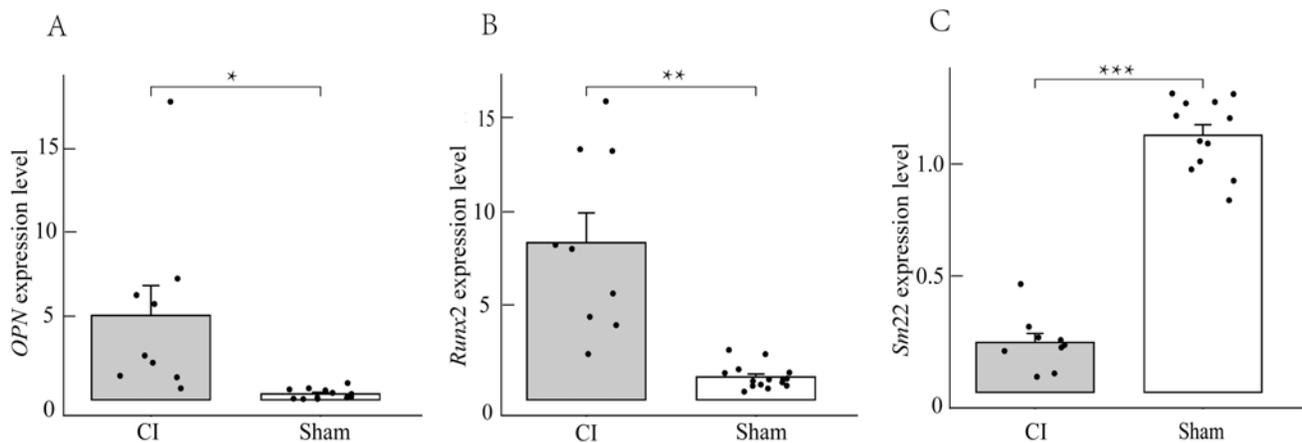
Figure 4 Observation of von Kossa and Alizarin red S staining in the aorta of rats from the experimental and control groups

本研究结果显示，先行肾脏部分切除术，间隔1周的代偿缓冲时间后再行另侧全肾切除术的效果更好。同时对双肾进行手术，或先切除单侧全肾均会导致实验大鼠短期内死亡，其原因可能是短时间切除过多肾脏组织，会导致残余肾功能没有足够时间代偿，从而导致急性肾衰竭。

骨化三醇作为活性维生素D，具有调节钙磷平衡的作用，是治疗CDK患者的常用药物；但高剂量的骨化三醇会扰乱体内钙磷平衡，加速血管钙化。使用骨化三醇作为钙化诱导剂可减少慢性肾功能不全大鼠磷酸盐异常造成的机体损伤^[22]，亦符合临床上CDK患者血管钙化的病理生理改变，但缺点是诱导时间较长。

而高嘌呤饮食诱导的大鼠CDK主动脉钙化模型虽然建模时间短^[16]，但易导致血管壁损伤^[24]，从而影响后续实验结果的准确性。有学者认为在完成手术后使用高磷高钙饮食可以增强钙化效果^[22]。但本课题组在前期实验中发现，高磷高钙饮食的大鼠在进食2周后出现食欲减退、懒于进食的情况，这可能与高磷高钙饮食影响大鼠味觉、磷酸盐负荷过高加速细胞衰老有关^[25]，增加了实验大鼠的痛苦。综合来说，单纯使用高剂量骨化三醇作为慢性肾功能不全术后血管钙化诱导剂较为理想。

需要指出，由于客观条件限制，本研究中各组大鼠数量较少；并且前期实验发现，B、C组两种手术方



注：相较于对照组（sham），实验组（CI）中反映血管平滑肌成骨样分化表型的 *OPN* 及 *Runx2* 相对表达量明显增加（ $^*P<0.05$ ， $^{**}P<0.01$ ），而反映血管平滑肌收缩表型的 *Sm22* 表达量减少（ $^{***}P<0.001$ ）。

Note: Compared with the control group (sham), the expression level of *Sm22*, which reflects the vascular smooth muscle contraction phenotype, decreased in the experimental group (CI) ($^{***}P<0.001$), while the expression levels of *OPN* and *Runx2*, which reflects the osteogenic differentiation phenotype of vascular smooth muscle, increased significantly ($^*P<0.05$, $^{**}P<0.01$).

图5 实时荧光定量PCR检测实验组和对照组大鼠的主动脉组织细胞中 *OPN*、*Runx2* 及 *Sm22* 基因表达

Figure 5 Real-time fluorescence quantitative PCR detection of *OPN*, *Runx2*, and *Sm22* gene expression in aortic tissue of rats from the experimental and control groups

式建模的大鼠死亡率较高，为了遵循动物福利原则，术式探索实验时减少了这两组大鼠的数量（分别为6只）。因此，4组实验大鼠的数量不同，得出的结果可能会具有一定的偏倚。此外，腹腔注射高剂量骨化三醇的给药方法也可能导致实验大鼠的肠粘连、肠梗阻发生，一定程度上影响模型成功率。笔者认为，在实验过程中尽可能减少腹腔刺激（如使用呼吸麻醉、药物灌胃等方式）是提高实验动物存活率的关键。

综上所述，采用背入路先切除2/3左肾再进行右侧全肾切除联合高剂量骨化三醇摄入方法建立的SD大鼠CDK主动脉钙化模型能提高模型成功率及动物存活率。

[医学伦理声明 Medical Ethics Statement]

本研究涉及的所有动物实验均已通过广西医科大学实验动物伦理委员会审查批准（批件号：202312005）。所有实验过程均遵照中国实验动物相关法律法规条例要求进行。

All animal experiments involved in this study have been approved by the Experimental Animal Ethics Committee of Guangxi Medical University (Approval Number: 202312005). All experimental processes were conducted in accordance with relevant laws, regulations, and rules on experimental animals in China.

[作者贡献 Author Contribution]

潘颐聪负责实验操作和论文撰写及修改；
蒋洪波为项目负责人，负责实验构思，辅助动物实验操作；
胡明、覃晓负责动物实验技术指导和质量监督。

[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] HUANG A R, GUO G Y, YU Y Q, et al. The roles of collagen in chronic kidney disease and vascular calcification[J]. *J Mol Med*, 2021, 99(1):75-92. DOI:10.1007/s00109-020-02014-6.
- [2] 李贵森. 2019年《中国慢性肾脏病矿物质和骨异常诊治指南》解读[J]. *诊断学理论与实践*, 2020, 19(3):229-231. DOI: 10.16150/j.1671-2870.2020.03.005.
- LI G S. Interpretation of Chinese Guideline for Diagnosis and Treatment of Chronic Kidney Disease-Mineral and Bone Disorder (2019 version)[J]. *J Diagn Concepts Pract*, 2020, 19(3):229-231. DOI: 10.16150/j.1671-2870.2020.03.005.
- [3] YE Y Z, CHEN A, LI L, et al. Repression of the antiporter SLC7A11/glutathione/glutathione peroxidase 4 axis drives ferroptosis of vascular smooth muscle cells to facilitate vascular calcification[J]. *Kidney Int*. 2022 102(6): 1259-1275. DOI:10.1016/j.kint.2022.07.034.
- [4] 柳潇雨. Shox2促进血管钙化的作用及机制研究[D]. 广州: 南方医科大学, 2023. DOI:10.27003/d.cnki.gojyu.2023.000180.
- LIU X Y. The role and mechanism of Shox2 in promoting vascular calcification[D]. Guangzhou: Southern Medical University, 2023. DOI:10.27003/d.cnki.gojyu.2023.000180.
- [5] 阙冬冬. 五羟色胺对慢性肾脏病大鼠血管钙化的作用及其机制研究[D]. 广州: 南方医科大学, 2023. DOI:10.27003/d.cnki.gojyu.2023.000170.
- QUE D D. Study on the effect and mechanism of serotonin on vascular calcification in rats with chronic kidney disease [D]. Guangzhou: Southern Medical University, 2023. DOI: 10.

- 27003/d.cnki.goju.2023.000170.
- [6] 冯丽芸. 二氢杨梅素抑制慢性肾脏病大鼠血管钙化及其机制研究[D]. 广州: 南方医科大学, 2022. DOI:10.27003/d.cnki.goju.2022.000227.
FENG L Y. Study on the inhibition of vascular calcification and its mechanism by dihydromyricetin in rats with chronic kidney disease [D]. Guangzhou: Southern Medical University, 2022. DOI:10.27003/d.cnki.goju.2022.000227.
- [7] SHOBEIRI N, ADAMS M A, HOLDEN R M. Vascular calcification in animal models of CKD: a review[J]. *Am J Nephrol*, 2010, 31(6):471-481. DOI:10.1159/000299794.
- [8] LIU Y J, GUO Y, BAO S M, et al. Bone marrow mesenchymal stem cell-derived exosomal microRNA-381-3p alleviates vascular calcification in chronic kidney disease by targeting NFAT5[J]. *Cell Death Dis*, 2022, 13(3):278. DOI:10.1038/s41419-022-04703-1.
- [9] 苏培培. 不同剂量骨化三醇对慢性肾衰竭大鼠主动脉钙化的影响[D]. 唐山: 华北理工大学, 2021. DOI:10.27108/d.cnki.ghelu.2021.000272.
SU P P. Effects of different doses of calcitriol on aortic calcification in rats with chronic renal failure [D]. Tangshan: North China University of Science and Technology, 2021. DOI: 10.27108/d.cnki.ghelu.2021.000272.
- [10] WU X J, SHEN S J, WU J Y, et al. ENPP1 ameliorates vascular calcification via inhibiting the osteogenic transformation of VSMCs and generating PPI[J]. *Open Med*, 2023, 18(1): 20230861. DOI:10.1515/med-2023-0861.
- [11] CHEN C Z, LI Y D, LU H L, et al. Curcumin attenuates vascular calcification via the exosomal miR-92b-3p/KLF4 axis[J]. *Exp Biol Med*, 2022, 247(16): 1420-1432. DOI: 10.1177/15353702221095456.
- [12] LIU X Y, CHEN A, LIANG Q C, et al. Spermidine inhibits vascular calcification in chronic kidney disease through modulation of SIRT1 signaling pathway[J]. *Aging Cell*, 2021, 20(6): e13377. DOI:10.1111/accel.13377.
- [13] ZHANG X L, LI Y N, YANG P Z, et al. Trimethylamine-N-oxide promotes vascular calcification through activation of NLRP3 (nucleotide-binding domain, leucine-rich-containing family, pyrin domain-containing-3) inflammasome and NF- κ B (nuclear factor κ B) signals[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2020, 40(3):751-765. DOI:10.1161/ATVBAHA.119.313414.
- [14] ROWE P S, MCCARTHY E M, YU A L, et al. Correction of vascular calcification and hyperphosphatemia in CKD rats treated with ASARM peptide[J]. *Kidney360*, 2022, 3(10):1683-1698. DOI:10.34067/KID.0002782022.
- [15] MA W Q, SUN X J, ZHU Y, et al. PDK4 promotes vascular calcification by interfering with autophagic activity and metabolic reprogramming[J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(11):991. DOI:10.1038/s41419-020-03162-w.
- [16] SATO H, GOTO M, NISHIMURA G, et al. Upacalcet, a positive allosteric modulator of the calcium-sensing receptor, prevents vascular calcification and bone disorder in a rat adenine-induced secondary hyperparathyroidism model [J]. *Bone*, 2023, 167:116613. DOI:10.1016/j.bone.2022.116613.
- [17] LI Z H, WU J, ZHANG X L, et al. CDC42 promotes vascular calcification in chronic kidney disease[J]. *J Pathol*, 2019, 249(4):461-471. DOI:10.1002/path.5334.
- [18] CHANG J R, GUO J, WANG Y, et al. Intermedin-1-53 attenuates vascular calcification in rats with chronic kidney disease by upregulation of α -Klotho[J]. *Kidney Int*, 2016, 89(3): 586-600. DOI:10.1016/j.kint.2015.12.029.
- [19] LEE S J, LEE I K, JEON J H. Vascular calcification-new insights into its mechanism[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(8):2685. DOI:10.3390/ijms21082685.
- [20] 张佳莉, 张岩. 急性肾损伤动物模型构建方法与研究现状[J]. *中国实验动物学报*, 2022, 30(7):955-965. DOI: 10.3969/j.issn.1005-4847.2022.07.011.
ZHANG J L, ZHANG Y. Research approaches and status of animal models for acute kidney injury[J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2022, 30(7):955-965. DOI: 10.3969/j.issn.1005-4847.2022.07.011.
- [21] 陈娟, 易香伶, 罗佳, 等. 急性肾损伤动物模型及体外模型研究进展[J]. *华西医学*, 2023, 38(5):777-783. DOI:10.7507/1002-0179.202210185.
CHEN J, YI X L, LUO J, et al. Advances in animal models and *in vitro* models of acute kidney injury[J]. *West China Med J*, 2023, 38(5):777-783. DOI:10.7507/1002-0179.202210185.
- [22] HERRMANN J, BABIC M, TÖLLE M, et al. Research models for studying vascular calcification[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(6): 2204. DOI:10.3390/ijms21062204.
- [23] BAO Y W, YUAN Y, CHEN J H, et al. Kidney disease models: tools to identify mechanisms and potential therapeutic targets[J]. *Zool Res*, 2018, 39(2): 72-86. DOI: 10.24272/j.issn.2095-8137.2017.055.
- [24] FU Y, TANG C Y, CAI J, et al. Rodent models of AKI-CKD transition[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2018, 315(4):F1098-F1106. DOI:10.1152/ajprenal.00199.2018.
- [25] HERRMANN J, GUMMI M R, XIA M D, et al. Vascular calcification in rodent models-keeping track with an extended method assortment[J]. *Biology*, 2021, 10(6):459. DOI: 10.3390/biology10060459.

(收稿日期: 2024-08-28 修回日期: 2024-12-18)

(本文责任编辑: 张俊彦)

[引用本文]

潘颐聪, 蒋汶洪, 胡明, 等. 慢性肾脏病大鼠主动脉钙化模型的术式优化及效果评价[J]. *实验动物与比较医学*, 2025, 45(3): 279-289. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.128.

PAN Y C, JIANG W H, HU M, et al. Optimization of surgical procedure and efficacy evaluation of aortic calcification model in rats with chronic kidney disease [J]. *Lab Anim Comp Med*, 2025, 45(3): 279-289. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.128.

肌萎缩侧索硬化症小鼠模型研究进展

罗莲莲¹, 袁艳春², 王俊岭², 时广森^{1,3}

(1. 遵义医科大学, 珠海 519000; 2. 中南大学湘雅医院神经内科, 长沙 410008; 3. 中科中山药物创新研究院, 中山 528400)

[摘要] 肌萎缩侧索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis, ALS) 是一种不可逆的致死性神经退行性疾病, 其发病率与人口老龄化进程呈正相关。ALS以运动神经元的渐进性丧失为特征, 导致患者肌肉无力、萎缩直至呼吸衰竭。ALS的致病机制涉及遗传和环境等多种因素, 其中遗传因素尤为重要。目前已发现多个与ALS相关的致病基因, 如铜锌超氧化物歧化酶1编码基因 (Cu/Zn superoxide dismutase, Cu/Zn *SOD1*, 又称 *SOD1*)、转录反应DNA结合蛋白43编码基因 (transactive response DNA-binding protein 43, *TDP-43*)、肉瘤融合蛋白基因 (fused in sarcoma, *FUS*)、9号染色体开放阅读框72基因 (chromosome open reading frame 72, *C9orf72*) 等, 这些基因的突变不仅见于家族性ALS中, 也在散发性ALS中被发现。基于发现的ALS风险基因, 通过多种方式建立了ALS动物模型, 如转基因模型、基因敲入或敲除模型和腺相关病毒过表达模型, 这些模型模拟了包括运动神经元丢失、泛素化包涵体形成及神经肌肉接头退变等人类ALS部分典型病理特征, 但这些模型仍存在局限性: (1) 单一基因突变模型难以全面模拟临床上散发性ALS的复杂多因子致病特征; (2) 模式动物与人类在神经退行性疾病的微环境调节机制和病变速率上存在明显差异, 这可能影响疾病表型的准确重现和药物效果的评估。为更全面地研究ALS的病理机制并推动有效药物的研发, 构建和优化ALS疾病动物模型显得尤为关键。本综述归纳常用的ALS基因突变小鼠模型, 分析各类基因修饰小鼠模型的表型和病理特征, 包括常见转基因、基因点突变敲入、基因敲除以及通过腺相关病毒载体介导的过表达小鼠模型等; 通过对比上述模型的优缺点, 进一步讨论了其在ALS病理机制研究和药物开发中的具体应用情况, 以期ALS研究的模型选择提供参考。

[关键词] 肌萎缩侧索硬化症; 神经退行性疾病; 遗传因素; 基因突变; 小鼠模型

[中图分类号] R-332; Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2025)03-0290-10



Advances in Mouse Models of Amyotrophic Lateral Sclerosis

LUO Lianlian¹, YUAN Yanchun², WANG Junling², SHI Guangsen^{1,3}

(1. Zunyi Medical University, Zhuhai 519000, China; 2. Department of Neurology, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China; 3. Zhongshan Institute for Drug Discovery, Chinese Academy of Sciences, Zhongshan 528400, China)

Correspondence to: SHI Guangsen (ORCID:0000-0002-9027-6806), E-mail: shiguangsen@zidd.ac.cn

[ABSTRACT] Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is an irreversible, fatal neurodegenerative disorder whose incidence is positively correlated with the aging population. ALS is characterized by the progressive loss of motor neurons, leading to muscle weakness, atrophy, and ultimately respiratory failure. The pathogenesis of ALS involves multiple factors, including genetic and environmental influences, with genetic factors playing a particularly significant role. To date, several causative genes have been identified in ALS, such as the Cu/Zn superoxide dismutase 1 (Cu/Zn *SOD1*, also known as *SOD1*) gene, transactive response DNA-binding protein 43 (*TDP-43*) gene, fused in sarcoma (*FUS*) gene, and chromosome open reading frame 72 (*C9orf72*). Mutations in these genes have been found not only in familial ALS but also in sporadic ALS. Based on the identified ALS risk genes, various ALS animal models have been established through multiple approaches, including transgenic models, gene knockout/knock-in models, and adeno-associated virus-mediated overexpression models. These models simulate some typical pathological

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目“Kinesins相关变异介导Cargo结合紊乱、轴突转运异常在ALS发病机制中的研究”(82171431)

[第一作者] 罗莲莲(1999—),女,硕士研究生,研究方向:ALS小鼠模型构建。E-mail: 15875683769@163.com

[通信作者] 时广森(1986—),男,博士,研究员,研究方向:神经药理学。E-mail: shiguangsen@zidd.ac.cn。ORCID: 0000-0002-9027-6806

features of human ALS, such as motor neuron loss, ubiquitinated inclusions, and neuromuscular junction degeneration. However, these models still have limitations: (1) single-gene mutation models are insufficient to fully replicate the complex multi-factorial pathogenesis of sporadic ALS; (2) significant differences in microenvironmental regulation mechanisms and the rate of neurodegeneration between model organisms and humans may affect the accurate reproduction of disease phenotypes and the reliable evaluation of drug efficacy. To better understand the pathogenesis of ALS and promote the development of effective therapies, constructing and optimizing ALS animal models is crucial. This review aims to summarize commonly used ALS gene mutation mouse models, analyze their phenotypes and pathological characteristics, including transgenic mouse models, gene knockout/knock-in mouse models, and adeno-associated virus-mediated overexpression mouse models, and further discuss their specific applications in ALS pathogenesis research and drug development by comparing the advantages and limitations of each model.

[Key words] Amyotrophic lateral sclerosis; Neurodegenerative diseases; Genetic factors; Genetic mutations; Mouse models

肌萎缩侧索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis, ALS) 是一种累及上下运动神经元 (motor neurons, MNs) 的神经退行性疾病, 其特征是大脑和脊髓中的 MNs 进行性丢失导致的运动功能逐渐丧失^[1-2]。近年来, ALS 发病率逐年增长, 全球每年发病率约为 2/100 000, 患病率约为 (6~9) /100 000^[3], 国内每年的发病率和患病率约为 (1.33~2.01) /100 000 和 (2.31~3.58) /100 000^[4], 多见于中老年 (60~79 岁) 人群^[5], 大部分患者在发病后 2~5 年内因呼吸衰竭死亡^[5]。ALS 以躯干、肢体、咽喉肌和呼吸肌的进行性肌无力萎缩为特点, 具有高致残率和致死率^[5]。

遗传、年龄、环境、自身免疫性等多种因素参与 ALS 的发病过程^[5-7], 其中遗传因素起重要作用。家族遗传性 ALS (familial ALS, fALS) 患者约占 ALS 患者的 10%, 其余 90% 则为散发性 ALS (sporadic ALS, sALS) 患者^[8]。在针对双胞胎的研究中 (该研究包含同卵双生和异卵双生, 异卵双生作为对照), 推测 ALS 的遗传度约为 0.61 (0.38~0.78)^[9]。目前已发现 40 多个 ALS 致病基因^[1], 常见的致病基因有铜锌超氧化物歧化酶 1 编码基因 (Cu/Zn superoxide dismutase, Cu/Zn SOD1, 又称 SOD1)、转录反应 DNA 结合蛋白 43 编码基因 (transactive response DNA-binding protein 43, TDP-43)、肉瘤融合蛋白基因 (fused in sarcoma, FUS)、含缬酪氨酸蛋白编码基因 (valosin-containing protein, VCP)、9 号染色体开放阅读框 72 基因 (chromosome open reading frame 72, C9orf72) 和视神经蛋白编码基因 (optineurin, OPTN), 它们约占 fALS 患者的 60%~70% 以及 sALS 患者的 10%^[10]。在中国,

对这些已知的 ALS 致病基因的研究显示, 其在 fALS 患者和 sALS 患者中的突变率分别为 55.0% 和 11.7%^[11]。遗传突变的多样性及后天致病因素的复杂性进一步增加了 ALS 发病机制研究的难度, 现有的治疗措施仅在一定程度上缓解疾病进展, 无法有效治愈该疾病。

目前, 研究者已经利用 ALS 患者中发现的相关基因突变建立了多种 ALS 小鼠模型, 这些模型根据构建方法可大致分为外源转基因、基因点突变敲入、基因敲除以及腺相关病毒 (adeno-associated virus, AAV) 过表达小鼠模型。动物模型的建立为疾病机制研究和药物研发奠定了重要的基础。本综述旨在综合介绍常用的 ALS 小鼠模型, 总结不同模型的优缺点, 为 ALS 相关基础研究和药物研发的模型选择提供参考。

1 常见转基因小鼠模型

1.1 SOD1 转基因小鼠模型

1993 年, Rosen 等^[12]发现了 ALS 的第一个致病基因 SOD1。SOD1 编码 Cu/Zn SOD1, 是一种抗超氧自由基毒性的关键抗氧化酶, 参与超氧自由基向过氧化氢的转化^[13]。突变后 SOD1 蛋白的抗氧化应激能力下降, 导致蛋白错误折叠并聚集, 从而产生细胞毒性作用, 最终引发 ALS^[13]。已知与 ALS 相关的 SOD1 突变已增加到 185 种以上, 大多为错义突变^[14]。SOD1 突变是亚洲 ALS 患者中最常见的基因突变, 约占 fALS 患者的 30.0% 和 sALS 患者的 1.5%^[15]。

1994 年, Gurney 等^[16]将人源 G93A 突变的 SOD1 插入小鼠基因组中, 获得 SOD1^{G93A} 转基因小鼠。该模型是首个 ALS 小鼠模型, 也是目前应用最为广泛的模

型^[17]。此外,其他常用的*SOD1*基因突变小鼠还包括*SOD1*^{G85R}、*SOD1*^{G37R}和*SOD1*^{H46R}等^[18]。*SOD1*^{G93A}转基因小鼠的表型受基因拷贝数影响,低拷贝数(1~2)模型表现为病程进展缓慢,发病时间在6~12个月龄,该特性使其适用于研究早期发病机制和基因功能;高拷贝数(20~25)模型表现为病程发展较快,发病时间在80~120日龄,该特性使其适用于研究疾病进展和药物筛选^[19]。不同启动子构建的转基因小鼠表型差异较大,使用Thy1启动子构建的高表达人源*SOD1*^{G93A}转基因小鼠却未表现明显的ALS表型^[20]。*SOD1*转基因小鼠,尤其是*SOD1*^{G93A}转基因小鼠,常被用于ALS潜在治疗药物的临床前研究。这些小鼠模型在美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration)批准用于ALS临床治疗的药物[如利鲁唑(Riluzole)和依达拉奉(Edaravone)]的临床前研究中,发挥了重要作用^[21-22]。*SOD1*^{G93A}转基因小鼠也被用于全球首个*SOD1*相关ALS的靶向治疗药物托夫生(Tofersen)的临床前药效评价研究^[23]。

ALS患者大脑和脊髓尸检结果常见病理性蛋白聚集,其中*SOD1*基因突变的ALS患者中,异常聚集的病理性蛋白为*SOD1*蛋白^[24],而其他基因突变的ALS患者多数表现为TDP-43蛋白的异常聚集^[25]。同样地,*SOD1*突变转基因小鼠的ALS标志是MNs中出现*SOD1*阳性、TDP-43阴性且不溶性的聚集物,突变*SOD1*蛋白因错误折叠和聚集进而导致神经毒性。目前,*SOD1*突变ALS小鼠模型主要表现为肌无力、肌肉萎缩、认知缺陷和瘫痪等特征,病理表型包括神经胶质增生,以及早期神经元空泡化、晚期脊髓前角MNs丢失、髓轴突缺失、肌肉去神经支配和神经再支配等进行性神经病理改变^[1,6,26]。

1.2 TDP-43转基因小鼠模型

TDP-43蛋白由*TDP-43*基因编码,是一种DNA和RNA结合蛋白,与神经元可塑性的调节有关,参与基因转录和mRNA处理加工、剪接和运输^[6,26]。TDP-43蛋白主要定位于细胞核,病理状态下会出现细胞质的异常定位和聚集,参与形成胞质包涵体,导致细胞核内TDP-43蛋白缺失,这是ALS的重要病理特征^[6]。研究表明,约97%的sALS患者表现出TDP-43病理特征^[27]。研究发现,在95%的ALS患者的大脑和脊髓的MNs中发现了含有过度磷酸化和泛素化的TDP-43蛋白聚集物^[25]。目前的研究已发现至少48种与ALS相关的*TDP-43*基因突变,约占fALS患者的3%和sALS患

者的1.5%^[28]。

基于已知的*TDP-43*基因突变,目前已建立了大约20个*TDP-43*转基因小鼠模型^[29],常见的突变有*TDP-43*^{A315T}、*TDP-43*^{Q331K}和*TDP-43*^{M331V}等,这些模型均可较好地模拟ALS相关表型^[30-31]。在通过Thy1启动子过表达人源野生型*TDP-43*转基因小鼠中,可发现皮质和脊髓MNs的神经退行性病变,且四肢痉挛性瘫痪表型跟*TDP-43*^{WT}的表达水平相关,纯合转基因小鼠(TAR4/4,约2倍内源性表达量)在出生后14d出现后肢异常反射,而杂合子(TAR4,约1倍内源性表达量)则在出生后14个月才出现类似表型^[32]。此外,在朊病毒蛋白(prion protein, PrP)启动子驱动下,过表达人源*TDP-43*^{WT}、*TDP-43*^{Q331K}和*TDP-43*^{M331V}转基因小鼠的表型差异显著。其中,*TDP-43*^{Q331K}转基因小鼠3月龄时出现运动缺陷症状;而*TDP-43*^{M331V}和低拷贝数*TDP-43*^{Q331K}转基因小鼠均在10月龄时才出现症状,且表现为年龄依赖性加重;*TDP-43*^{WT}转基因小鼠则未观察到明显运动缺陷症状^[31]。对于同样的基因突变,使用不同方法和启动子构建的转基因小鼠的表型也不一样。例如,人源*TDP-43*^{A315T}转基因小鼠模型,与采用细菌人工染色体(bacterial artificial chromosome, BAC)和内源性启动子构建的小鼠模型相比,在PrP启动子驱动下,雄性小鼠出现显著的肠道症状,并最终导致猝死;然而其TDP-43蛋白病理表现却不显著^[33-34]。综上,*TDP-43*转基因小鼠具有启动子依赖性、年龄依赖性、转基因拷贝数依赖性以及突变特异性的表型特征。

1.3 FUS转基因小鼠模型

*FUS*基因编码类似TDP-43的DNA/RNA结合蛋白,主要定位于细胞核,在细胞质和细胞核之间穿梭,参与核质转运、RNA代谢、DNA修复、应激反应和线粒体功能^[17,35]。从ALS患者中鉴定出60多种*FUS*突变,多数为错义突变,其中R521C突变最常见^[14]。大多数*FUS*突变聚集分布在蛋白C端的核定位信号(nuclear localization signal, NLS)区域,导致蛋白在核内定位减少并在胞质聚集,胞质聚集蛋白产生细胞毒性,同时造成核内*FUS*蛋白功能丧失^[36]。突变*FUS*蛋白错误定位并参与应激颗粒聚集,从而引发细胞内多种功能障碍和神经炎症^[37]。

*FUS*突变体在小鼠模型中表现出多种行为表型和神经病理学特征,目前已建立野生型以及多个突变型*FUS*(R521C、R521G、R521H、P525L、R514G和

Δ NLS等)转基因小鼠模型, 这些小鼠均表现出早期的 MNs 丢失、运动缺陷和轻微行为异常等 ALS 表型^[6,17]。其中, PrP 启动子-人源 *FUS*^{R521C} 转基因小鼠在 2 月龄时即可出现明显的瘫痪和肌肉萎缩。研究显示, 这些小鼠的皮层神经元有严重的树突和突触缺陷、明显的 DNA 损伤修复缺陷, 同时伴随着多种控制细胞活性、轴突引导、树突生长和突触功能的 RNA 转录本表达异常, 尤其是脑源性神经营养因子基因 (brain-derived neurotrophic factor, *Bdnf*)^[38]。利用 Cre 重组酶时空依赖性控制转基因表达, 构建 *hFUS*^{R521G/Sym1} 特异性表达的转基因小鼠。结果显示, 1 月龄小鼠即出现认知缺陷, 并观察到皮层中 MNs 的树突状分支和 MNs 树突的总面积显著减少; 到 6 月龄时, 小鼠进一步出现运动功能障碍、胶质细胞激活、线粒体异常和 FUS 蛋白胞质错误定位^[37]。

与 *TDP-43* 类似, *FUS* 的表达量也与表型高度相关^[25], 过表达人源 *FUS*^{WT} (野生型) 转基因小鼠中, 纯合子 (额外增加约 0.9 倍内源性表达量) 表现为 1 月龄发病, 2 月龄瘫痪, 3 月龄死亡, 出现严重疾病表型; 而杂合子 (额外增加约 0.4 倍内源性表达量) 小鼠则无明显表型。在纯合小鼠中, 病理检查发现 FUS 蛋白的异常聚集和 60% 的 MNs 丢失, 出现以年龄依赖性的进行性 MNs 变性^[39]。在 *FUS* ^{Δ NLS} (去除核定位序列) 转基因小鼠模型中, 小鼠于 12 周龄出现后肢反射异常。如果把 *FUS* ^{Δ NLS} 转基因小鼠进一步与过表达人源 *FUS*^{WT} (野生型) 转基因小鼠杂交, 得到的双转基因小鼠于 8 周龄表现出后肢反射异常, 提示定位缺陷型和野生型的 FUS 蛋白均具有表达量依赖的致病性^[40]。进一步研究表明, 突触稳态的紊乱是该 *FUS* 模型的主要致病因素之一^[41]。

1.4 *C9orf72* 转基因小鼠模型

C9orf72 基因非编码区域的 G₄C₂ 序列重复扩增是欧洲人群 ALS 最常见的致病突变^[42], 约占欧洲人群 fALS 患者的 33.7% 和 sALS 患者的 5.1%^[15]。正常人的该区域 G₄C₂ 重复次数为 2~30 次, 而 ALS 患者出现 30 次以上的重复扩增, 部分患者甚至达到数百至数千次重复^[43]。*C9orf72* 参与核质转运、RNA 加工、核仁的正常功能、无膜细胞器形成、翻译、泛素-蛋白酶体系统和 *TDP-43* 蛋白等的正常功能等^[44]。*C9orf72* 突变有 3 种致病机制^[45]: (1) 双向转录造成毒性 RNA 表达, 形成 RNA-蛋白聚集体; (2) 单倍体剂量不足; (3) 重复相关非 ATG (repeat-associated non-ATG, RAN)

翻译机制产生的二肽重复 (dipeptide repeat, DPR) 蛋白聚集, 进而导致功能毒性。

目前建立的 *C9orf72* 重复突变小鼠模型中, 仅有少部分能复制蛋白错误折叠和聚集表型, 且多数小鼠不能完全复刻 ALS 症状和病理表型。研究发现, 在携带 50、500 或 800 个 G₄C₂ 重复序列的 *C9orf72* 基因 BAC 转基因小鼠模型中, 重复长度的增加会导致 RNA foci 和 RNA-蛋白聚集体水平增加, 促进疾病外显率和严重程度增加, 使发病时间提前^[46]。特别是含有 500 个 G₄C₂ 重复序列的 BAC 转基因小鼠 (C9-500) 在不同研究中有不同的表型。Liu 等^[47] 的研究显示, C9-500 BAC 转基因小鼠出现后肢步态异常 (4 月龄出现)、瘫痪、生存率下降、肌肉去神经支配、MNs 丢失、焦虑样行为以及皮质和海马神经退行性病变; Nguyen 等^[48] 的研究重现了该小鼠的 ALS 样退行性表型; Mordes 等^[49] 在两个独立实验中均未再现生存率降低和运动表型; Nguyen 等^[50] 进一步分析认为, 这种差异可能受环境压力、小鼠遗传背景和处理方式, 包括研究方法、数量规模和性别差异等因素的影响。

2 基因敲入小鼠模型

在 ALS 小鼠模型中, 小鼠表型与突变蛋白的拷贝数密切相关。传统的转基因模型通常将外源基因随机插入到宿主基因组中, 可以表达高拷贝数突变蛋白。虽然这种方法比较容易观察到 ALS 表型, 但也有可能因蛋白过表达而产生非特异性表型, 比如, 野生型 *TDP-43* 过表达即可出现 ALS 样表型。相比之下, 基因突变敲入模型多利用成簇的规律性间隔的短回文重复序列 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR) 及其相关蛋白 (CRISPR-associated protein, Cas) 基因编辑技术实现精准高效的突变定点敲入, 从而建立内源表达基因的生理水平突变, 表型相对较轻, 发病时间晚, 可以更好地模拟临床疾病早期的变化与发病过程, 有助于探究疾病的发病机制、寻找早期生物标志物和治疗靶点^[51]。

近年来报告的新 ALS 致病基因常使用了 CRISPR-Cas9 基因编辑技术构建的点突变敲入小鼠模型进行研究, 如氯通道 CLIC 样 1 (chloride channel CLIC like 1, *CLCC1*)^[52] 和原钙黏蛋白 α 9 (protocadherin alpha 9, *PCDHA9*)^[53]。*CLCC1* 突变可导致 *CLCC1* 蛋白表达水平降低, 且蛋白水平与小鼠表型严重程度相关。其中, *NM2453/K298A* 双突变小鼠的 *CLCC1* 蛋白水平显著降

低, 在3月龄时即表现出严重的体重减轻、运动异常、MNs丢失和泛素阳性包涵体。上述现象提示, 内质网阴离子通道蛋白CLCC1维持的内质网离子稳态失调促进内质网应激-未折叠蛋白反应, 参与ALS的发病过程^[52]。*PCDHA9^{L700P}*纯合敲入小鼠出现小鼠运动功能异常(4月龄时开始出现, 缓慢进展)和生存率下降, 且在老年小鼠中发现肌肉萎缩、去神经支配神经肌肉接头(neuromuscular junction, NMJ)异常、脊髓MNs丢失、星形胶质细胞增生和TDP-43蛋白样病理^[53]。

常见的ALS点突变敲入小鼠模型多表现出一定的年龄依赖性和表型不明显的特征。在TDP-43基因C端缺失的敲入模型中发现, 脊髓中MNs仅出现轻度MNs损伤和突触明显缺陷^[53]。在TDP-43^{A382T}和TDP-43^{G348C}敲入模型中并未有明显的神经退行性病变、TDP-43聚集或细胞质错误定位; 然而突变MNs的突触异常和神经元活性降低, 提示突触功能障碍是ALS发病机制的早期事件^[54]。TDP-43^{Q331K}敲入小鼠的表型变化呈阶段性特征, 从约6月龄的中期表现一定程度的运动障碍, 到12月龄的晚期表现执行功能和记忆障碍, 这些表型均呈现表达量依赖性特点^[55]。其中, 纯合TDP-43^{M337V}和TDP-43^{G298S}敲入小鼠表现表达量与年龄依赖性的MNs变性和胶质增生^[56], 而杂合敲入小鼠无明显表型。此外, TDP-43^{N390D}敲入小鼠表现出年龄依赖性的运动障碍、肌肉萎缩、TDP-43错误定位、脊髓MNs丢失和胶质细胞增生等病理特征^[57]。在FUS突变的敲入小鼠中, FUS^{P525L}和FUS^{ΔEX14}小鼠显示出毒性功能的表达量依赖性增加、进行性的和年龄依赖性的MNs丢失, 但无明显运动障碍表型^[58]。

除了点突变敲入模型, 定点敲入人源突变基因构建的人源化小鼠模型也用于研究生理水平突变带来的病理改变。如通过定点敲入剪接位点突变以及部分人源FUS基因片段至小鼠FUS基因, 构建移码突变(FUS p.G466VfsX14)的人源化ALS小鼠模型(FUS Delta14)。该模型在小鼠12月龄时开始出现运动异常以及MNs丢失, 并不断进展, 病理表现出FUS细胞质异常定位^[59]。

3 基因敲除小鼠模型

基因敲除(knock-out, KO)ALS模型相对少见, 这是由于已知致病基因突变中显性突变居多, 致病机制多为毒性获得^[1,36], 基因敲除模型往往不能理想地

反映基因突变的致病机制。但是, 也有部分ALS致病基因通过功能丧失(loss of function, LOF)机制致病, 目前已知的敲除模型有SOD1、FUS、C9orf72、TDP-43、OPTN、TANK结合激酶1(tank-binding kinase 1, TBK1)和SQSTM1(p62蛋白, sequestosome 1)等^[60]。

类似C9orf72转基因小鼠模型, C9orf72-KO小鼠的表型在不同的研究中表现不一, 包括纯合和杂合敲除的小鼠。针对这一现象, 研究者进一步探究发现C9orf72基因敲除对小鼠自身免疫和存活受环境因素, 如肠道微生物群的影响^[61]。不仅如此, 在C9orf72-(G₄C₂)₆₆的小鼠模型中, 敲除C9orf72基因会加重小鼠运动障碍和生存期等主要表型^[62], 且纯合敲除比杂合敲除表现出更严重的表型^[61]。SOD1-KO小鼠仅在老年表现出MNs缺失和肌肉的过度损失。这种缺失导致特定的神经表型, 如轴突面积减少、NMJ的数量比例增加和乙酰胆碱受体复杂性降低^[63]。神经病理的研究表明, SOD1-KO小鼠表现出去神经支配肌肉纤维的轴突萌发和再神经支配在功能上受损^[64]。此外, SOD1敲除会干扰单胺能神经传递, 导致动机行为减少^[65]。

相比C9orf72和SOD1基因, 小鼠TDP-43的纯合子缺失会导致胚胎早期致死, 而杂合子缺失的老年小鼠会表现出肌肉无力和运动缺陷, 但没有明显的MNs的病理变化和肌肉萎缩^[66]。在纯合FUS-KO小鼠模型中, 小鼠通常只能存活到成年, 且没有表现出明显的ALS表型^[67]。此外, OPTN、TBK1和SQSTM1也是重要的ALS致病基因。纯合OPTN缺失或突变可能导致自噬功能障碍和TDP-43的错误定位, 从而导致MNs的神经退行性变^[68]。TBK1基因纯合缺失具有胚胎致死性, 而杂合TBK1-KO小鼠则能模拟ALS的表型^[69]。SQSTM1-KO小鼠出现神经纤维缠结、神经退行性变和行为缺陷^[70]。

4 AAV载体介导的过表达模型

AAV载体介导的过表达常用于C9orf72突变的机制研究。通过AAV载体进行脑室注射(G₄C₂)₆₆和(G₄C₂)₁₄₉的C9orf72-ALS小鼠模型有神经退行性变和行为障碍的表型, 在这些小鼠神经元中发现了正义和反义的RNA foci, 并观察到多种DPR蛋白包涵体、pTDP-43阳性包涵体及蛋白核质转运缺陷^[71]。C9orf72通过RNA翻译会产生5种不同的DPR, 包括poly(GA)、poly(GR)、poly(PA)、poly(PR)和poly(GP)^[72]。为了

研究DPR的致病性,通过AAV载体在小鼠的大脑中表达GFP-poly(GR)₁₀₀或者poly(GR)₂₀₀。结果显示,这2种poly(GR)表现出明显毒性作用,导致小鼠出现年龄依赖性的神经元丢失^[17];并在GFP-poly(GR)₂₀₀过表达小鼠中,发现TDP-43胞质异常聚集和TDP-43包涵体的形成^[73]。poly(GA)₅₀小鼠在皮层、海马体 and 大脑中表现出星形胶质细胞增多、神经元丢失以及行为缺陷^[74]。

通过不同类型启动子的AAV,在神经元和神经胶质细胞中过表达TDP-43^{WT}或TDP-43^{M337V},发现突变型TDP-43在神经元和神经胶质细胞中表现出不同程度的积累,其中在神经元中毒性更强,并表现为年龄依赖性病理^[75]。利用AAV在皮质脊髓神经元、脊髓MNs或前肢骨骼肌中过表达突变型TDP-43(R82L/K83Q、C173S/C175),均可诱导TDP-43包涵体病理,且在脊髓中表达的突变型TDP-43还诱导了脊髓MNs的大量丢失以及严重的神经源性肌肉萎缩^[76]。随着可跨血脑屏障的AAV血清型的发展,有研究通过尾静脉以及眼眶静脉注射AAV9变异型PHP.EB病毒过表达野生型TDP-43,可导致小鼠肢体运动障碍和生存期缩短^[77]。

由于转基因动物构建和繁育的周期较长和成本较高,AAV策略的潜在优势是可以快速筛选和验证候选基因突变在小鼠整体生理水平的致病性。比如,通过鞘内注射AAV-SARM1^{V184G},可诱导小鼠运动障碍(病毒注射第3周后)、外周轴突丢失和神经炎症^[78]。还有研究者在新生小鼠脑内注射AAV-CCNF^{WT}或者CCNF^{S621G},发现野生型和突变型CCNF均可导致小鼠认知行为学异常(病毒注射后3个月)和TDP-43病理改变,且突变型的认知行为异常和病理表型更为严重^[79]。不仅如此,AAV也可用于对已知ALS小鼠模型的遗传修饰,以及进行ALS疾病机制探究和基因治疗的尝试。

5 总结与展望

本文通过回顾不同类型ALS小鼠模型的病理及行为表型,总结了常用的小鼠模型的基本特征(表1)。除了构建方法的不同之外,这些特征主要来自不同基因突变导致的具体变化,进一步印证了以基因为切入点,不断建立并完善ALS疾病模型的重要意义。ALS是一种高临床异质性、多因素和多基因致病的进行性神经退行性疾病,由许多具有不同功能的基因突变引起,致病机制复杂,所以单一的小鼠模型不足以完全

概括疾病的整个轨迹,亟待更多的研究来探究其发病机制。通过比较不同ALS基因模型的表型和机制可以进一步明晰研究的方向与思路。

一般来说,转基因模型可以有效地过表达突变型或野生型蛋白。ALS转基因模型的动物往往较快速表现出明显的表型和MNs丢失,因此更适合研究疾病的终末期以及药物临床前评估^[25]。然而,转基因模型不能完全反映基因突变的特点,如高表达野生型的SOD1、TDP-43和FUS蛋白同样具有神经毒性^[1,36],并且表达的时间和水平难以控制,拷贝数的不稳定给床前药物研究带来了一定挑战^[55]。相比转基因小鼠模型,基因点突变敲入小鼠模型的蛋白表达量较低且疾病进展相对较慢,这对于避免某些蛋白的剂量依赖性毒性至关重要,有助于深入了解疾病早期症状并揭示关键的基因功能,但缓慢的表型研究会增加研究时间和成本。基因敲除实验中可能存在的遗传物质残留、表型不稳定性以及基因组复杂性问题影响实验结果的准确性。AAV可以达到时间和空间上对基因表达的控制,在未来的研究中,AAV将会更多地运用于探索ALS基因突变的致病性和致病机制,以及筛选潜在基因治疗靶点。但AAV相对载量较小,对基因大小有一定限制,同时也有表达量不太可控导致的非特异性表型等问题。

相比于小鼠模型,灵长类动物模型在模拟复杂的神经系统和病理特征方面具有更高的相似性和准确性。如Yin等^[80]通过AAV将TDP-43^{M337V}突变表达在猴脑中,成功模拟出细胞质中TDP-43聚集的病理特征,但高昂的成本和伦理问题限制了其广泛应用。因此,在短期内,小鼠模型仍旧是ALS疾病研究的主要模型。不同ALS小鼠模型的对比研究为理解疾病的发病机制和评估治疗策略提供了宝贵的信息。各类模型各有其应用特点和价值,具体应用应结合实际需求。不仅如此,考虑到ALS寡基因遗传的特点,多基因改造模型可以更好地模拟ALS的发病过程和病理特征。例如,将多个基因同时转入、利用不同的遗传方式改造鼠杂交或结合遗传改造鼠和AAV注射构建的多重基因改造模型,有望成为未来ALS小鼠模型的发展趋势。与此同时,ALS的发病还受到环境因素影响,如束缚应激、慢性外伤、运动疲劳和营养不良等。因此,建立基因编辑技术结合环境因素的小鼠模型也是未来的发展方向。

表1 常用的肌萎缩侧索硬化症小鼠模型及其表型特征

Table 1 Commonly used mouse models of amyotrophic lateral sclerosis and their phenotypic characteristics

肌萎缩侧索硬化症小鼠模型 ALS mouse model	基因 Gene	氨基酸改变 Amino acid substitution	机制 Mechanism	瘫痪 Paralysis	认知异常 Cognitive impairment	神经元丢失 Neuron loss	神经胶质增生 Gliosis	胞质包涵体 Cytoplasmic inclusion bodies	参考文献 References	
转基因小鼠模型 Transgenic mouse model	<i>hSOD1</i>	WT	-	√	-	√	√	SOD1, VAC	[81]	
	<i>hSOD1</i>	D90A	-	-	-	√	√	SOD1, VAC	[82]	
	<i>hSOD1</i>	G93A	GOF	-	√	√	-	-	[83]	
	<i>hTDP-43</i>	WT	-	√	-	√	√	TDP-43, UBI	[32]	
	<i>TDP-43</i>	A315T	GOF	-	√	-	√	TDP-43, UBI	[34]	
	<i>hTDP-43</i>	Q331K	LOF/GOF	-	-	√	√	x	[31]	
	<i>hTDP-43</i>	M337V	GOF	-	-	√	√	x	[31]	
	<i>hFUS</i>	WT	GOF	-	√	x	x	x	[84]	
	<i>hFUS</i>	R521C	GOF	-	√	-	√	x	[84]	
	<i>hFUS</i>	R521C	GOF	√	-	√	√	x	[38]	
	<i>hFUS</i>	ΔNLS	GOF	√	-	√	√	FUS	[40]	
	<i>hC9orf72</i>	[500] n	GOF	√	√	√	√	DPR, RNA foci, TDP-43	[47]	
	基因敲入小鼠模型 Knock-in mouse model	<i>hC9orf72</i>	[500] n	-	-	√	x	√	DPR, RNA foci	[85]
<i>hC9orf72</i>		[500] n	-	-	-	√	√	RNA foci	[48]	
<i>TDP-43</i>		N390D	GOF	-	-	√	√	TDP-43	[57]	
<i>TDP-43</i>		Q331K	GOF	x	√	√	-	x	[55]	
<i>FUS</i>		P517L	GOF	-	-	√	√	FUS	[86]	
<i>FUS</i>		Δ14	GOF	-	-	√	√	FUS	[86]	
<i>FUS</i>		ΔNLS	-	-	-	√	-	FUS	[87]	
<i>C9orf72</i>		(GR)400 或 (PR)400	-	-	-	√	x	DPR	[88]	
<i>CLCC1</i>		K298A	LOF	-	-	√	-	TDP-43, UBI	[52]	
<i>PCDHA9</i>		L700P	-	√	-	√	√	TDP-43	[53]	
腺相关病毒过表达小鼠模型 Adeno-associated virus-mediated overexpression mouse model		<i>TDP-43</i>	WT	-	√	-	√	-	-	[76]
		<i>TDP-43</i>	M337V	GOF	√	-	√	√	TDP-43	[75]
		<i>C9orf72</i>	[66] n	GOF	√	√	√	√	DPR, RNA foci, TDP-43	[71]
	<i>C9orf72</i>	[149] n	GOF	√	√	√	√	DPR, RNA foci, TDP-43	[71]	
	<i>C9orf72</i>	[100] n	LOF	x	√	√	√	TDP-43	[89]	
	<i>SARM1</i>	V184G	-	√	-	-	-	-	[78]	

注: *hSOD1*, 人源铜锌超氧化物歧化酶1编码基因; *hTDP-43*, 人源转录反应DNA结合蛋白43编码基因; *TDP-43*, 转录反应DNA结合蛋白43编码基因; *hFUS*, 人源肉瘤融合蛋白基因; *FUS*, 肉瘤融合蛋白基因; *hC9orf72*, 人源9号染色体开放阅读框72基因; *C9orf72*, 9号染色体开放阅读框72基因; *CLCC1*, 氯通道CLIC样1; *PCDHA9*, 原钙黏蛋白α9; *SARM1*, 无菌α和Toll/白细胞介素-1受体基序蛋白1; DPR, 二肽重复; GOF, 功能获得; LOF, 功能丧失; n, C9重复次数; NLS, 核定位序列; UBI, 泛素化; VAC, 空泡化; WT, 野生型; "-", 未描述; "√", 是; "x", 否。

Note: *hSOD1*, Human Cu/Zn superoxide dismutase 1; *hTDP-43*, Human transactive response DNA-binding protein 43; *TDP-43*, Transactive response DNA-binding protein 43; *hFUS*, Human fused in sarcoma; *FUS*, Fused in sarcoma; *hC9orf72*, Human chromosome open reading frame 72; *C9orf72*, Chromosome open reading frame 72; *CLCC1*, Chloride channel CLIC-like 1; *PCDHA9*, Protocadherin alpha 9; *SARM1*, Sterile alpha and TIR motif-containing protein 1; DPR, Dipeptide repeat; GOF, Gain of function; LOF, Loss of function; n, Number of C9 repeats; NLS, Nuclear localization signal; UBI, Ubiquitination; VAC, Vacuolation; WT, Wild type; "-", Not described; "√", Yes; "x", No.

[作者贡献 Author Contribution]

罗莲莲负责检索文献、提取文献数据和撰写文章;
袁艳春参与检索文献、提取文献数据, 修改文章;
王俊岭参与文章指导和基金支持;
时广森负责监督进度、安排人员和修订稿件。

[利益声明 Declaration of Interest]

所有作者均声明本文不存在利益冲突。

[参考文献 References]

[1] WANG H, GUAN L P, DENG M. Recent progress of the genetics of amyotrophic lateral sclerosis and challenges of

- gene therapy[J]. *Front Neurosci*, 2023, 17: 1170996. DOI: 10.3389/fnins.2023.1170996.
- [2] BROWN R H, AL-CHALABI A. Amyotrophic lateral sclerosis[J]. *N Engl J Med*, 2017, 377(2): 162-172. DOI: 10.1056/nejmra1603471.
- [3] MEAD R J, SHAN N, JOSEPH REISER H J, et al. Amyotrophic lateral sclerosis: a neurodegenerative disorder poised for successful therapeutic translation[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2023, 22(3): 185-212. DOI:10.1038/s41573-022-00612-2.
- [4] XU L, CHEN L, WANG S F, et al. Incidence and prevalence of amyotrophic lateral sclerosis in urban China: a national population-based study[J]. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2020, 91(5):520-525. DOI:10.1136/jnnp-2019-322317.
- [5] FELDMAN E L, GOUTMAN S A, PETRI S, et al. Amyotrophic lateral sclerosis[J]. *Lancet*, 2022, 400(10360):1363-1380. DOI: 10.1016/s0140-6736(22)01272-7.
- [6] ZHU L H, LI S H, LI X J, et al. Pathological insights from amyotrophic lateral sclerosis animal models: comparisons, limitations, and challenges[J]. *Transl Neurodegener*, 2023, 12(1): 46. DOI:10.1186/s40035-023-00377-7.
- [7] LI C Y, YANG T M, OU R W, et al. Genome-wide genetic links between amyotrophic lateral sclerosis and autoimmune diseases[J]. *BMC Med*, 2021, 19(1):27. DOI:10.1186/s12916-021-01903-y.
- [8] KIM G, GAUTIER O, TASSONI-TSUCHIDA E, et al. ALS genetics: gains, losses, and implications for future therapies [J]. *Neuron*, 2020, 108(5): 822-842. DOI: 10.1016/j. neuron. 2020.08.022.
- [9] AL-CHALABI A, FANG F, HANBY M F, et al. An estimate of amyotrophic lateral sclerosis heritability using twin data[J]. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2010, 81(12): 1324-1326. DOI: 10.1136/jnnp.2010.207464.
- [10] YOUNGER D S, BROWN R H Jr. Amyotrophic lateral sclerosis. [J]. *Handb Clin Neurol*, 2023, 196: 203-229. DOI:10.1016/B978-0-323-98817-9.00031-4.
- [11] WEI Q Q, CHEN X P, CHEN Y P, et al. Unique characteristics of the genetics epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis in China[J]. *Sci China Life Sci*, 2019, 62(4):517-525. DOI:10.1007/s11427-018-9453-x.
- [12] ROSEN D R, SIDDIQUE T, PATTERSON D, et al. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis[J]. *Nature*, 1993, 364(6415):59-62. DOI:10.1038/362059a0.
- [13] PEGGION C, SCALCON V, MASSIMINO M L, et al. SOD1 in ALS: Taking stock in pathogenic mechanisms and the role of glial and muscle cells[J]. *Antioxidants*, 2022, 11(4): 614. DOI: 10.3390/antiox11040614.
- [14] LI H F, WU Z Y. Genotype-phenotype correlations of amyotrophic lateral sclerosis[J]. *Transl Neurodegener*, 2016, 5: 3. DOI:10.1186/s40035-016-0050-8.
- [15] ZOU Z Y, ZHOU Z R, CHE C H, et al. Genetic epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review and meta-analysis[J]. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2017, 88(7): 540-549. DOI:10.1136/jnnp-2016-315018.
- [16] GURNEY M E, PU H, CHIU A Y, et al. Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu, Zn superoxide dismutase mutation[J]. *Science*, 1994, 264(5166): 1772-1775. DOI:10.1126/science.8209258.
- [17] TODD T W, PETRUCELLI L. Modelling amyotrophic lateral sclerosis in rodents[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2022, 23(4): 231-251. DOI:10.1038/s41583-022-00564-x.
- [18] CIURO M, SANGIORGIO M, LEANZA G, et al. A meta-analysis study of SOD1-mutant mouse models of als to analyse the determinants of disease onset and progression[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 24(1):216-232. DOI:10.3390/ijms24010216.
- [19] ACEVEDO-ARZENA A, KALMAR B, ESSA S, et al. A comprehensive assessment of the SOD1G93A low-copy transgenic mouse, which models human amyotrophic lateral sclerosis[J]. *Dis Model Mech*, 2011, 4(5):686-700. DOI:10.1242/dmm.007237.
- [20] LINO M M, SCHNEIDER C, CARONI P. Accumulation of SOD1 mutants in postnatal motoneurons does not cause motoneuron pathology or motoneuron disease[J]. *J Neurosci*, 2002, 22(12):4825-4832. DOI:10.1523/JNEUROSCI.22-12-04825.2002.
- [21] SAITOH Y, TAKAHASHI Y. Riluzole for the treatment of amyotrophic lateral sclerosis[J]. *Neurodegener Dis Manag*, 2020, 10(6):343-355. DOI:10.2217/nmt-2020-0033.
- [22] BROOKS B R, BERRY J D, CIEPIELEWSKA M, et al. Intravenous edaravone treatment in ALS and survival: an exploratory, retrospective, administrative claims analysis[J]. *EclinicalMedicine*, 2022, 52: 101590. DOI: 10.1016/j. eclinm. 2022.101590.
- [23] MCCAMPBELL A, COLE T, WEGENER A J, et al. Antisense oligonucleotides extend survival and reverse decrement in muscle response in ALS models[J]. *J Clin Invest*, 2018, 128(8): 3558-3567. DOI:10.1172/JCI99081.
- [24] MACKENZIE I R A, BIGIO E H, INCE P G, et al. Pathological TDP-43 distinguishes sporadic amyotrophic lateral sclerosis from amyotrophic lateral sclerosis with SOD1 mutations[J]. *Ann Neurol*, 2007, 61(5):427-434. DOI:10.1002/ana.21147.
- [25] DE GIORGIO F, MADURO C, FISHER E M C, et al. Transgenic and physiological mouse models give insights into different aspects of amyotrophic lateral sclerosis[J]. *Dis Model Mech*, 2019, 12(1): dmm037424. DOI:10.1242/dmm.037424.
- [26] TSAI K J, YANG C H, FANG Y H, et al. Elevated expression of TDP-43 in the forebrain of mice is sufficient to cause neurological and pathological phenotypes mimicking FTL-D-U [J]. *J Exp Med*, 2010, 207(8): 1661-1673. DOI: 10.1084/jem. 20092164.
- [27] WATANABE S, OIWA K, MURATA Y, et al. ALS-linked TDP-43^{M337V} knock-in mice exhibit splicing deregulation without neurodegeneration[J]. *Mol Brain*, 2020, 13(1): 8. DOI: 10.1186/s13041-020-0550-4.
- [28] LANZMASTER D, VEYRAT-DUREBEX C, VOUREC'H P, et al. Metabolomics: a tool to understand the impact of genetic mutations in amyotrophic lateral sclerosis[J]. *Genes*, 2020, 11(5):537. DOI:10.3390/genes11050537.
- [29] LUTZ C. Mouse models of ALS: past, present and future[J]. *Brain Res*, 2018, 1693(Pt A): 1-10. DOI: 10.1016/j. brainres. 2018.03.024.
- [30] CHAN G, VAN HUMMEL A, VAN DER HOVEN J, et al. Neurodegeneration and motor deficits in the absence of astrogliosis upon transgenic mutant TDP-43 expression in mature mice[J]. *Am J Pathol*, 2020, 190(8): 1713-1722. DOI: 10.1016/j.ajpath.2020.04.009.
- [31] ARNOLD E S, LING S C, HUELGA S C, et al. ALS-linked TDP-43 mutations produce aberrant RNA splicing and adult-onset motor neuron disease without aggregation or loss of nuclear TDP-43[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(8): E736-E745. DOI:10.1073/pnas.1222809110.
- [32] WILS H, KLEINBERGER G, JANSSENS J, et al. TDP-43 transgenic mice develop spastic paralysis and neuronal inclusions characteristic of ALS and frontotemporal lobar degeneration[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(8): 3858-3863. DOI:10.1073/pnas.0912417107.

- [33] HERDEWYN S, CIRILLO C, VAN DEN BOSCH L, et al. Prevention of intestinal obstruction reveals progressive neurodegeneration in mutant TDP-43 (A315T) mice[J]. *Mol Neurodegener*, 2014, 9:24. DOI:10.1186/1750-1326-9-24.
- [34] SWARUP V, PHANEUF D, BAREIL C, et al. Pathological hallmarks of amyotrophic lateral sclerosis/frontotemporal lobar degeneration in transgenic mice produced with TDP-43 genomic fragments[J]. *Brain*, 2011, 134(Pt 9):2610-2626. DOI: 10.1093/brain/awr159.
- [35] MEJZINI R, FLYNN L L, PITOUT I L, et al. ALS genetics, mechanisms, and therapeutics: where are we now?[J]. *Front Neurosci*, 2019, 13:1310. DOI:10.3389/fnins.2019.01310.
- [36] CHEN C, DING X F, AKRAM N, et al. Fused in sarcoma: properties, self-assembly and correlation with neurodegenerative diseases[J]. *Molecules*, 2019, 24(8): 1622. DOI:10.3390/molecules24081622.
- [37] PELAEZ M C, DESMEULES A, GELON P A, et al. Neuronal dysfunction caused by FUSR521G promotes ALS-associated phenotypes that are attenuated by NF- κ B inhibition[J]. *Acta Neuropathol Commun*, 2023, 11(1): 182. DOI: 10.1186/s40478-023-01671-1.
- [38] QIU H Y, LEE S, SHANG Y L, et al. ALS-associated mutation FUS-R521C causes DNA damage and RNA splicing defects[J]. *J Clin Invest*, 2021, 131(7): e149564. DOI:10.1172/JCI149564.
- [39] MITCHELL J C, MCGOLDRICK P, VANCE C, et al. Overexpression of human wild-type FUS causes progressive motor neuron degeneration in an age- and dose-dependent fashion[J]. *Acta Neuropathol*, 2013, 125(2): 273-288. DOI: 10.1007/s00401-012-1043-z.
- [40] SHIIHASHI G, ITO D, YAGI T, et al. Mislocated FUS is sufficient for gain-of-toxic-function amyotrophic lateral sclerosis phenotypes in mice[J]. *Brain*, 2016, 139(Pt 9):2380-2394. DOI:10.1093/brain/aww161.
- [41] SHIIHASHI G, ITO D, ARAI I, et al. Dendritic homeostasis disruption in a novel frontotemporal dementia mouse model expressing cytoplasmic fused in sarcoma[J]. *EBioMedicine*, 2017, 24:102-115. DOI:10.1016/j.ebiom.2017.09.005.
- [42] DEBRAY S, RACE V, CRABBÉ V, et al. Frequency of C9orf72 repeat expansions in amyotrophic lateral sclerosis: a Belgian cohort study[J]. *Neurobiol Aging*, 2013, 34(12): 2890. e7-2892890.e12. DOI:10.1016/j.neurobiolaging.2013.06.009.
- [43] PARAMESWARAN J, ZHANG N, BRAEMS E, et al. Antisense, but not sense, repeat expanded RNAs activate PKR/elf2 α -dependent ISR in C9ORF72 FTD/ALS[J]. *elife*, 2023, 12: e85902. DOI:10.7554/eLife.85902.
- [44] BABIĆ LEKO M, ŽUPUNSKI V, KIRINCICH J, et al. Molecular mechanisms of neurodegeneration related to C9orf72 hexanucleotide repeat expansion[J]. *Behav Neurol*, 2019, 2019:2909168. DOI:10.1155/2019/2909168.
- [45] NGUYEN H P, VAN BROECKHOVEN C, VAN DER ZEE J. ALS genes in the genomic era and their implications for FTD[J]. *Trends Genet*, 2018, 34(6): 404-423. DOI: 10.1016/j.tig. 2018. 03.001.
- [46] BECKERS J, THARKESHWAR A K, VAN DAMME P. C9orf72 ALS-FTD: recent evidence for dysregulation of the autophagy-lysosome pathway at multiple levels[J]. *Autophagy*, 2021, 17(11): 3306-3322. DOI: 10.1080/15548627. 2021.1872189.
- [47] LIU Y J, PATTAMATTA A, ZU T, et al. C9orf72 BAC mouse model with motor deficits and neurodegenerative features of ALS/FTD[J]. *Neuron*, 2016, 90(3): 521-534. DOI: 10.1016/j. neuron.2016.04.005.
- [48] NGUYEN L, MONTRASIO F, PATTAMATTA A, et al. Antibody therapy targeting RAN proteins rescues C9 ALS/FTD phenotypes in C9orf72 mouse model[J]. *Neuron*, 2020, 105(4): 645-662.e11. DOI:10.1016/j.neuron.2019.11.007.
- [49] MORDES D A, MORRISON B M, AMENT X H, et al. Absence of survival and motor deficits in 500 repeat C9ORF72 BAC mice [J]. *Neuron*, 2020, 108(4): 775-783. e4. DOI: 10.1016/j. neuron. 2020.08.009.
- [50] NGUYEN L, LABOISSONNIERE L A, GUO S, et al. Survival and motor phenotypes in FVB C9-500 ALS/FTD BAC transgenic mice reproduced by multiple labs[J]. *Neuron*, 2020, 108(4):784-796.e3. DOI:10.1016/j.neuron.2020.09.009.
- [51] RICH K A, PINO M G, YALVAC M E, et al. Impaired motor unit recovery and maintenance in a knock-in mouse model of ALS-associated Kif5a variant[J]. *Neurobiol Dis*, 2023, 182: 106148. DOI:10.1016/j.nbd.2023.106148.
- [52] GUO L, MAO Q L, HE J, et al. Disruption of ER ion homeostasis maintained by an ER anion channel CLCC1 contributes to ALS-like pathologies[J]. *Cell Res*, 2023, 33(7): 497-515. DOI:10.1038/s41422-023-00798-z.
- [53] ZHONG J, WANG C D, ZHANG D, et al. PCDHA9 as a candidate gene for amyotrophic lateral sclerosis[J]. *Nat Commun*, 2024, 15(1):2189. DOI:10.1038/s41467-024-46333-5.
- [54] LÉPINE S, NAULEAU-JAVAUDIN A, DENEULT E, et al. Homozygous ALS-linked mutations in TARDBP/TDP-43 lead to hypoactivity and synaptic abnormalities in human iPSC-derived motor neurons[J]. *iScience*, 2024, 27(3):109166. DOI: 10.1016/j.isci.2024.109166.
- [55] WHITE M A, KIM E, DUFFY A, et al. TDP-43 gains function due to perturbed autoregulation in a Tardbp knock-in mouse model of ALS-FTD[J]. *Nat Neurosci*, 2018, 21(4):552-563. DOI: 10.1038/s41593-018-0113-5.
- [56] EBSTEIN S Y, YAGUDAYEVA I, SHNEIDER N A. Mutant TDP-43 causes early-stage dose-dependent motor neuron degeneration in a TARDBP knockin mouse model of ALS[J]. *Cell Rep*, 2019, 26(2): 364-373. e4. DOI: 10.1016/j. celrep. 2018.12.045.
- [57] HUANG S L, WU L S, LEE M, et al. A robust TDP-43 knock-in mouse model of ALS[J]. *Acta Neuropathol Commun*, 2020, 8 (1):3. DOI:10.1186/s40478-020-0881-5.
- [58] KOROBEYNIKOV V A, LYASHCHENKO A K, BLANCO-REDONDO B, et al. Antisense oligonucleotide silencing of FUS expression as a therapeutic approach in amyotrophic lateral sclerosis[J]. *Nat Med*, 2022, 28(1):104-116. DOI:10.1038/ s41591-021-01615-z.
- [59] DEVOY A, KALMAR B, STEWART M, et al. Humanized mutant FUS drives progressive motor neuron degeneration without aggregation in 'FUSDelta14' knockin mice[J]. *Brain*, 2017, 140 (11):2797-2805. DOI:10.1093/brain/awx248.
- [60] DENG Z Q, LIM J, WANG Q, et al. ALS-FTLD-linked mutations of SQSTM1/p62 disrupt selective autophagy and NFE2L2/NRF2 anti-oxidative stress pathway[J]. *Autophagy*, 2020, 16(5): 917-931. DOI:10.1080/15548627.2019.1644076.
- [61] BURBERRY A, WELLS M F, LIMONE F, et al. C9orf72 suppresses systemic and neural inflammation induced by gut bacteria[J]. *Nature*, 2020, 582(7810): 89-94. DOI: 10.1038/ s41586-020-2288-7.
- [62] ZHU Q, JIANG J, GENDRON T F, et al. Reduced C9ORF72 function exacerbates gain of toxicity from ALS/FTD-causing repeat expansion in C9orf72[J]. *Nat Neurosci*, 2020, 23(5):615-624. DOI:10.1038/s41593-020-0619-5.
- [63] POLLOCK N, MACPHERSON P C, STAUNTON C A, et al. Deletion of *Sod1* in motor neurons exacerbates age-related changes in axons and neuromuscular junctions in mice[J]. *eNeuro*, 2023, 10(3): ENEURO. 0086-22.2023. DOI: 10.1523/ ENEURO.0086-22.2023.

- [64] SHEFNER J M, REAUME A G, FLOOD D G, et al. Mice lacking cytosolic copper/zinc superoxide dismutase display a distinctive motor axonopathy[J]. *Neurology*, 1999, 53(6):1239-1246. DOI:10.1212/wnl.53.6.1239.
- [65] YOSHIHARA D, FUJIWARA N, KITANAKA N, et al. The absence of the SOD1 gene causes abnormal monoaminergic neurotransmission and motivational impairment-like behavior in mice[J]. *Free Radic Res*, 2016, 50(11):1245-1256. DOI:10.1080/10715762.2016.1234048.
- [66] KRAEMER B C, SCHUCK T, WHEELER J M, et al. Loss of murine TDP-43 disrupts motor function and plays an essential role in embryogenesis[J]. *Acta Neuropathol*, 2010, 119(4):409-419. DOI:10.1007/s00401-010-0659-0.
- [67] KINO Y, WASHIZU C, KUROSAWA M, et al. FUS/TLS deficiency causes behavioral and pathological abnormalities distinct from amyotrophic lateral sclerosis[J]. *Acta Neuropathol Commun*, 2015, 3: 24. DOI: 10.1186/s40478-015-0202-6.
- [68] KURASHIGE T, KURAMOCHI M, OHSAWA R, et al. Optineurin defects cause TDP43-pathology with autophagic vacuolar formation[J]. *Neurobiol Dis*, 2021, 148: 105215. DOI: 10.1016/j.nbd.2020.105215.
- [69] GURFINKEL Y, POLAIN N, SONAR K, et al. Functional and structural consequences of TBK1 missense variants in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis[J]. *Neurobiol Dis*, 2022, 174: 105859. DOI: 10.1016/j.nbd.2022.105859.
- [70] RAMESH BABU J, LAMAR SEIBENHENER M, PENG J M, et al. Genetic inactivation of p62 leads to accumulation of hyperphosphorylated tau and neurodegeneration[J]. *J Neurochem*, 2008, 106(1): 107-120. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2008.05340.x.
- [71] CHEW J, COOK C, GENDRON T F, et al. Aberrant deposition of stress granule-resident proteins linked to C9orf72-associated TDP-43 proteinopathy[J]. *Mol Neurodegener*, 2019, 14(1):9. DOI:10.1186/s13024-019-0310-z.
- [72] GENDRON T F, BIENIEK K F, ZHANG Y J, et al. Antisense transcripts of the expanded C9ORF72 hexanucleotide repeat form nuclear RNA foci and undergo repeat-associated non-ATG translation in c9FTD/ALS[J]. *Acta Neuropathol*, 2013, 126(6): 829-844. DOI:10.1007/s00401-013-1192-8.
- [73] COOK C N, WU Y W, ODEH H M, et al. C9orf72 poly(GR) aggregation induces TDP-43 proteinopathy[J]. *Sci Transl Med*, 2020, 12(559): eabb3774. DOI: 10.1126/scitranslmed.abb3774.
- [74] ZHANG Y J, GENDRON T F, GRIMA J C, et al. C9ORF72 poly(GA) aggregates sequester and impair HR23 and nucleocytoplasmic transport proteins[J]. *Nat Neurosci*, 2016, 19(5):668-677. DOI:10.1038/nn.4272.
- [75] YAN S, WANG C E, WEI W J, et al. TDP-43 causes differential pathology in neuronal versus glial cells in the mouse brain[J]. *Hum Mol Genet*, 2014, 23(10): 2678-2693. DOI: 10.1093/hmg/DDT662.
- [76] TSUBOGUCHI S, NAKAMURA Y, ISHIHARA T, et al. TDP-43 differentially propagates to induce antero- and retrograde degeneration in the corticospinal circuits in mouse focal ALS models[J]. *Acta Neuropathol*, 2023, 146(4): 611-629. DOI: 10.1007/s00401-023-02615-8.
- [77] JACKSON K L, DAYTON R D, DEVERMAN B E, et al. Better targeting, better efficiency for wide-scale neuronal transduction with the synapsin promoter and AAV-PHP.B[J]. *Front Mol Neurosci*, 2016, 9: 116. DOI: 10.3389/fnmol.2016.00116.
- [78] JOSEPH BLOOM A, MAO X R, STRICKLAND A, et al. Constitutively active SARM1 variants that induce neuropathy are enriched in ALS patients[J]. *Mol Neurodegener*, 2022, 17(1): 1-15. DOI:10.1186/s13024-021-00511-x.
- [79] VAN HUMMEL A, SABALE M, PRZYBYLA M, et al. TDP-43 pathology and functional deficits in wild-type and ALS/FTD mutant cyclin F mouse models[J]. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 2023, 49(2): e12902. DOI:10.1111/nan.12902.
- [80] YIN P, BAI D Z, DENG F Y, et al. SQSTM1-mediated clearance of cytoplasmic mutant TARDBP/TDP-43 in the monkey brain[J]. *Autophagy*, 2022, 18(8): 1955-1968. DOI: 10.1080/15548627.2021.2013653.
- [81] GRAFFMO K S, FORSBERG K, BERGH J, et al. Expression of wild-type human superoxide dismutase-1 in mice causes amyotrophic lateral sclerosis[J]. *Hum Mol Genet*, 2013, 22(1): 51-60. DOI:10.1093/hmg/ddc399.
- [82] ANDREAS JONSSON P, GRAFFMO K S, BRÄNNSTRÖM T, et al. Motor neuron disease in mice expressing the wild type-like D90A mutant superoxide dismutase-1[J]. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2006, 65(12):1126-1136. DOI:10.1097/01.jnen.0000248545.36046.3c.
- [83] QUARTA E, BRAVI R, SCAMBI I, et al. Increased anxiety-like behavior and selective learning impairments are concomitant to loss of hippocampal interneurons in the presymptomatic SOD1(G93A) ALS mouse model[J]. *J Comp Neurol*, 2015, 523(11):1622-1638. DOI:10.1002/cne.23759.
- [84] LÓPEZ-ERAUSKIN J, TADOKORO T, BAUGHN M W, et al. ALS/FTD-linked mutation in FUS suppresses intra-axonal protein synthesis and drives disease without nuclear loss-of-function of FUS[J]. *Neuron*, 2020, 106(2): 354. DOI: 10.1016/j.neuron.2020.04.006.
- [85] PATTAMATTA A, NGUYEN L, OLAFSON H R, et al. Repeat length increases disease penetrance and severity in C9orf72 ALS/FTD BAC transgenic mice[J]. *Hum Mol Genet*, 2021, 29(24):3900-3918. DOI:10.1093/hmg/ddaa279.
- [86] KOROBEYNIKOV V A, LYASHCHENKO A K, BLANCO-REDONDO B, et al. Antisense oligonucleotide silencing of FUS expression as a therapeutic approach in amyotrophic lateral sclerosis[J]. *Nat Med*, 2022, 28(1):104-116. DOI:10.1038/s41591-021-01615-z.
- [87] PICCHIARELLI G, DEMESTRE M, ZUKO A, et al. FUS-mediated regulation of acetylcholine receptor transcription at neuromuscular junctions is compromised in amyotrophic lateral sclerosis[J]. *Nat Neurosci*, 2019, 22(11):1793-1805. DOI: 10.1038/s41593-019-0498-9.
- [88] MILIOTO C, CARCOLÉ M, GIBLIN A, et al. PolyGR and polyPR knock-in mice reveal a conserved neuroprotective extracellular matrix signature in C9orf72 ALS/FTD neurons[J]. *Nat Neurosci*, 2024, 27(4): 643-655. DOI: 10.1038/s41593-024-01589-4.
- [89] ZHANG Y J, GENDRON T F, EBBERT M T W, et al. Poly(GR) impairs protein translation and stress granule dynamics in C9orf72-associated frontotemporal dementia and amyotrophic lateral sclerosis[J]. *Nat Med*, 2018, 24(8): 1136-1142. DOI:10.1038/s41591-018-0071-1.

(收稿日期:2024-11-04 修回日期:2025-02-13)

(本文责任编辑:丁宇菁)

引用本文

罗莲莲, 袁艳春, 王俊岭, 等. 肌萎缩侧索硬化症小鼠模型研究进展[J]. *实验动物与比较医学*, 2025, 45(3): 290-299. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.161.

LUO L L, YUAN Y C, WANG J L, et al. Advances in mouse models of amyotrophic lateral sclerosis[J]. *Lab Anim Comp Med*, 2025, 45(3): 290-299. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.161.

疾病动物模型数字化图谱数据库平台的构建与初步应用

李会萍, 高洪彬, 温金银, 杨锦淳

[广东省生物技术研究院(广东省实验动物监测中心), 广州 510663]

[摘要] **目的** 国内研究机构及研究者们建立了丰富的疾病动物模型, 并在模型研发过程中积累了大量极具专业性、特色和针对性的图谱数据, 这些图谱数据具有极高的开发和应用价值。为此, 开发一个专业且完整的疾病动物模型数字化图谱数据库平台非常必要, 可实现动物模型图谱数据的开放共享, 以实现国内相关机构所持有的疾病动物模型图谱资源的整合与优化。**方法** 笔者单位基于B/S架构, 采用Java为主要开发语言, 使用Oracle数据库系统及相关辅助工具搭建疾病动物模型数字化图谱数据库。数据库平台在Linux环境下运行, 用户通过Web浏览器可访问该平台。目前该平台的数据主要来源于广东省内动物模型资源单位汇交的图谱资源。**结果** 2024年8月, 按系统疾病、动物种属、资源单位3个维度的图谱分类结构, 构建了疾病动物模型数字化图谱数据库平台。该平台可实现图谱数据的收集、管理、检索和查看等功能。截至2025年1月, 该平台已有4个资源单位汇交了动物模型图谱数据61幅, 共610个数据项。**结论** 动物模型数字化图谱数据库平台已构建并实现初步应用, 虽然平台的数据规模尚小, 但基本可以实现动物模型图谱资源数据的集成和开放共享功能。相信未来随着图谱数据的不断丰富, 该平台有望为实验动物学科发展以及比较医学研究提供重要的数据支撑, 从而推动科研资源的高效利用。

[关键词] 疾病动物模型; 图谱; 数据库

[中图分类号] Q95-33; TP391 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2025)03-0300-09



Construction and Preliminary Application of Animal Disease Model Digital Atlas Database Platform

LI Huiping, GAO Hongbin, WEN Jinyin, YANG Jinchun

[Guangdong Provincial Biotechnology Research Institute (Guangdong Provincial Laboratory Animals Monitoring Center), Guangzhou 510663, China]

Correspondence to: LI Huiping (ORCID: 0000-0003-2268-5293), E-mail: 84178102@qq.com

[ABSTRACT] **Objective** Domestic research institutions and researchers have established a wide variety of animal disease models and accumulated a wealth of specialized, distinctive, and targeted atlas data during the model development process. These atlas data are of great value for development and application. Therefore, it is necessary to develop a professional and complete digital atlas database platform for animal models, which can achieve the open sharing of animal model atlas data and the integration and optimization of atlas resources related to disease animal models held by relevant domestic institutions. **Methods** Based on the B/S architecture, the authors' institution built a digital atlas database of animal models, using Java as the main development language and Oracle database system along with related auxiliary tools. The database platform ran in a Linux environment and could be accessed by users through a web browser. At present, the data on this platform mainly came from the atlas resources submitted by animal model resource units within Guangdong Province. **Results** In August 2024, a digital atlas database platform for animal models was constructed based on the classification structure of three dimensions: systemic diseases, animal species, and resource units. This platform provided functions such

[基金项目] 广东省科技计划项目“自发性强直性脊柱炎食蟹猴模型的研究及应用平台”(2021B1212060002);广州市基础与应用基础研究项目“人类疾病动物模型资源的数据分类编码体系研究”(202102080391)

[通信作者] 李会萍(1980—),女,硕士,研究员,研究方向:实验动物信息化与科技情报。E-mail: 84178102@qq.com。ORCID: 0000-0003-2268-5293

as collection, management, retrieval, and viewing of atlas data. As of January 2025, four resource units had submitted 61 atlas data entries of animal models to the platform, totalling 610 data items. **Conclusion** The animal model digital atlas database platform has been constructed and put into preliminary use. Although the amount of data on the platform is still limited, it is capable of integrating and openly sharing animal model atlas data. It is believed that with the continuous enrichment of atlas data in the future, this platform is expected to provide important data support for the development of laboratory animal science and comparative medicine research, thereby promoting the efficient utilization of scientific research resources.

[Key words] Animal disease models; Atlas data; Database

疾病动物模型 (animal disease model) 是指根据科学研究需要, 利用实验动物建立的具有特定表现的动物实验对象和材料^[1], 如糖尿病、白血病、关节炎等动物模型。通过模拟人类的疾病、生理过程或药物反应, 动物模型能够帮助研究人员研究人类疾病机制、探索病症治疗方法、评估药物的安全性和有效性等。而动物模型资源是生命科学研究和生物医药等产业发展不可或缺的支撑条件, 是国家重要的科技战略资源^[2]。

迄今为止, 全世界已建立有价值的动物模型超过 5 000 种; 据保守估计, 中国建立的动物模型有近千种^[3-4]。2020 年全球动物模型市场规模约为 163 亿美元, 2023 年该市场规模增长至 209 亿美元^[5]。《中国实验动物资源发展研究报告 2022》的数据显示, 根据美国 Global Market Insights Inc. 最新发布的市场报告, 近年来全球仅小鼠模型的市场规模就保持 7.7% 的年复合增长率, 如果继续保持这一增长率, 该市场规模预计在 2025 年可达到 117 亿美元^[6]。可见, 国内外的科学家们借助各种实验方法和技术建立的动物模型资源数量已经很庞大, 以此可以全面评价这些模型的疾病特征、发病机制, 并与人类相关疾病进行比较研究。然而, 这些运用基因组学、表观遗传学、代谢组学、蛋白质组学等技术建立的动物模型, 能否体现人类多基因复杂系统疾病的特征还需验证研究。对此, 研究者除了构建相关的疾病动物模型外, 还需开展不同物种模型之间、动物模型与人类疾病之间的比较研究。因此, 动物模型图谱数据和临床病理图谱数据结果的系统比较研究就显得尤为重要。

目前, 国内外动物模型相关数据库主要以收集动物模型资源的基础数据为主, 或只对动物模型的系统组织图谱等进行局部性分析。例如: Aigner 等^[7]研究了动物模型系统组织病理学图谱的指导原则, 为动物模型研究结果的评估提供指导; Li 等^[8]通过肺炎模型的动物肺部免疫图谱分析了细菌性肺炎的免疫反应情

况。2020 年, 在科技部的部署下, 中国医学科学院医学实验动物研究所建立了国家动物模型资源共享信息平台, 为重大传染病疫情攻关以及生命科学研究所需的动物模型资源开发提供了重要的数据支撑。目前, 该平台收集的动物模型信息以动物模型名称、表型数据、模型评价与验证、制备方法以及动物属性等数据为主^[9]。黄红坤等^[10]、吴玥等^[11]先后建立了人类疾病动物模型资源数据库、冠状病毒感染动物模型比较转录组学数据库, 前者主要是收录动物属性、模型制备、供应单位、文献等相关信息^[10]; 后者侧重收录的是感染动物模型与人类的转录组数据^[11]。此外, 在传统书籍出版方面, 中国农业大学赵德明等^[12]拟出版《实验动物模型组织病理学图谱》; 刘江伟等^[13]出版了《急进高原环境组织病理学实验图谱》。纸质版书籍阅读性强, 如果转化为数字化图谱将有助于扩大图谱资源覆盖面, 极大提升共享效率。

总体上, 当前研究机构及研究者们建立的动物模型所产生的大量图谱极具专业性、特色性和针对性, 具有很好的开发和应用价值。但目前这些数据还处于分散保存的状态, 国内尚缺乏专业的、完整的动物模型数字化图谱数据库。因此, 笔者所在单位广东省生物技术研究院 (广东省实验动物监测中心) 充分利用已建立的国家实验动物资源库 (2010 年由科技部批准, 依托本单位成立国家实验动物数据资源中心并建立资源库), 以此为基础, 构建动物模型数字化图谱数据库平台, 通过该平台将广泛收集的动物模型图谱数据入库和共享, 从而为行业发展以及比较医学研究提供重要的数据支撑, 以期能成为业界极具研究价值的学术图谱资源库。

1 数据来源与处理

数据库通过多种渠道收集图谱数据资源: (1) 笔者单位自主研发的动物模型产生的图谱数据; (2) 国家重点研发计划课题组研究成果汇交的动物模型图谱

数据; (3) 研究机构有意愿共享的数字化图谱数据; (4) 研究者出版的动物模型图谱专著转化为数字化图谱入库; (5) 研究者个人共享的动物模型图谱数据。目前, 数据库中收录的主要是来自国家重点研发计划课题组研究成果汇交的动物模型图谱数据。

1.1 数据采集标准

对不同来源的模型图谱进行数字化转换后, 需要统一数据格式、存储标准。图谱数据的采集包括文本和图像两种数据类型, 其中文本数据用于描述图谱的基础信息、病理特征说明、资源单位等, 以txt、doc/docx、xlsx 格式上报; 图像数据主要是以可视化形式呈现模型的病理特征、染色切片等状态, 以清晰的图谱数据进行比较医学研究。因此, 图像数据的分辨率要求为300 dpi (dots per inch) 以上, 图像尺寸为600像素×400像素, 图像通过扫描仪或相机获得(须达到上述分辨率和尺寸大小), 图像文件统一转换为静态jpg、png和动态gif或以多媒体格式(目前不限定视频格式)存储入库。

1.2 数据审核环节

为了保障图谱数据质量, 设置4个数据审核环节: 资源单位管理员根据数据库平台规范填写图谱的基本信息, 完成后由平台确认; 收到平台可入库回复后, 由资源单位管理员或者系统操作人员录入详细的图谱数据, 录入完成后由资源单位管理员对数据进行审核; 随后由相关专家(目前主要是动物病理学专业老师)对数据进行二次筛选、审核; 最后由系统自动对数据的完整性、规范性进行检查。经过以上4个环节的审核后, 图谱数据最终进入数据库平台。

2 数据库平台开发方法

2.1 开发环境

数据库平台以Java语言、Oracle关系型数据库系统以及相关辅助工具开发, 整体结构采用主流的B/S(浏览器/服务器)模式搭建, 并在Linux环境下运行, 运行服务器为Web服务器, 并且能支持Tomcat服务。用户通过Web界面访问平台, 解决了传统访问方式存在的时空限制问题, 形成了统一的动物模型图谱数据查询和管理窗口, 有助于提高图谱资源的共享效率。数据库平台采用数据层、业务层、应用层的三层体系架构设计, 各层级间具有独立性, 既为平台后续扩展功能预留空间, 又有利于维护平台运行的稳定性和安全性。

2.2 关键技术

2.2.1 主要开发技术

Java是一种适用于网络的面向对象的编程语言, 简单性、分布式、安全性、独立性、可移植性、高性能等是其主要特点, 可以用于编写Web应用程序、分布式系统等^[14]。本平台系统后端开发采用了Java语言, 前端采用JavaScript(简称JS)语言, 由JS控制HTML页面的行为和交互, 并且采用B/S结构构建平台, 使用户通过Web浏览器更便捷地访问数据库平台。本研究选用Oracle(10.2.0.1.0)大型关系型数据库系统作为后台数据库, 为数据库平台运行提供了高效的数据存储和数据安全保护机制^[15]。

2.2.2 图谱分类方法

动物模型图谱数据按3个维度进行分类, 包括系统疾病、动物种属、资源单位。其中系统疾病以周光兴等^[2]的《人类疾病动物模型复制方法学》中分类体系为依据, 将动物模型的系统疾病分为心血管系统、消化系统、呼吸系统、泌尿系统、生殖系统、内分泌系统、眼耳鼻喉系统、口腔系统、骨骼系统、皮肤系统、血液系统、神经系统、感染性疾病、肿瘤、中医脏腑辨证等16个大类目, 在后续数据量扩增时可在16个大类目中再细分为181个小类目; 动物种属则依据曹一化等^[16]的《自然资源共性描述规范》中实验动物种类为依据, 将动物种属分为小鼠、大鼠、豚鼠、沙鼠、田鼠、仓鼠、实验兔、雪貂、犬、非人灵长类、实验鸡、实验猪、实验羊、实验猫等^[16-17], 当有新的动物种属时可实时扩展该分类。资源单位则根据图谱数据提供方或者研究者为单位, 便于用户检索以及图谱资源的对外共享。

2.2.3 图谱展现方式

图谱数据在网页界面的显示分为图像和文字两部分, 在图谱呈现页面上主要借助异步JavaScript、XML技术(Asynchronous JavaScript and XML, AJAX)和“CSS+DIV”技术相结合, 实现图谱数据的主图和缩略图无缝切换。用户能通过布尔逻辑的筛选条件和检索栏输入主题词的方式快速检索所需的图谱数据, 这样不仅有助于加快数据的处理速度, 还极大地提高了动物模型图谱数据资源的共享效率。

3 数据库平台设计

3.1 总体架构设计

数据库架构设计包括数据模型设计、表结构

设计、数据规范化、数据安全策略等内容。为保障数据库的稳定性、可扩展性、完整性以及安全性，数据库平台按数据层、业务层、应用层的三层体系架构进行整体布局，各层级间的相互依赖关系较低，有利于系统的维护和功能扩展。其中，数据层负责数据存储，存储提交到数据库中的丰富的图谱数据；业务层主要

实现图谱数据编码、图谱检索、数据增删处理、系统管理以及权限配置、安全配置、数据备份等功能；应用层负责向用户提供一个Web交互界面，当用户请求图谱数据时，应用层接受请求并发送至业务层，业务层处理请求，调取图谱数据并推送给用户的Web访问端。数据库平台的系统总体架构如图1所示。

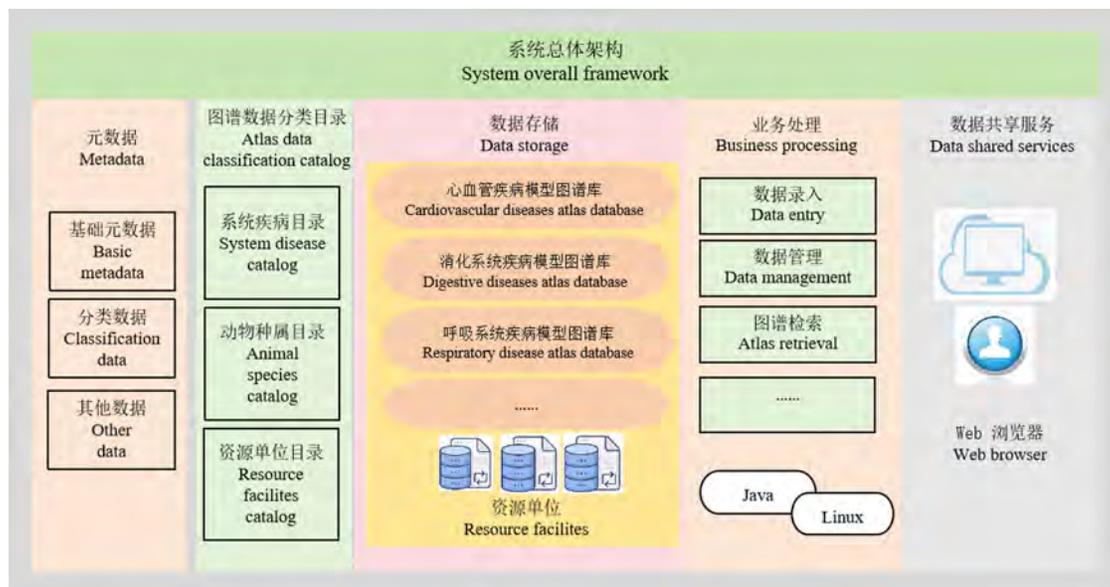


图1 动物模型数字化图谱数据库平台的系统总体架构

Figure 1 Overall system framework of animal model digital atlas database platform

3.2 图谱分类结构设计

动物模型图谱数据按系统疾病、动物种属、资源单位这3个维度分类，每个分类设置对应的数据结构、数据模型、数据描述项等。其中系统疾病包括心血管系统、消化系统、呼吸系统等16个大类名称，以及类别号、关键词、描述定义、用途说明、病理特征等数据项；动物种属包括品系名称、类别号、造模方法、性别、年龄等数据项；资源单位包括单位名称、研究者、电话、邮箱等数据项。上述数据项主要用于动物模型图谱的基本特征描述，以及模型资源单位和作者查询，便于在比较医学研究的过程中进行比对和参照。图谱分类结构中系统疾病、动物种属和资源单位的数据项如图2所示。

3.3 数据库表结构设计

数据库表结构是数据管理的核心要素，通过科学合理设计数据库表结构可以集中地存储、管理大量的图谱数据，并保障数据库的安全性，更便于维护图谱数据，提高用户请求时的执行效率。本数据库平台包括用户信息字段表、疾病模型信息字段表、资源单

位信息表和图谱数据字段表等，其中最核心的是图谱数据字段表，其数据项包括图谱编码、图谱名称、系统分类、动物分类、拍摄时间、上传时间、图谱尺寸、拍摄说明、描述、模型说明、资源单位、图谱状态等参数；其中图谱编码设置为系统自动编码生成，是图谱数据的唯一标识符。图谱数据字段表结构如表1所示。

4 平台实现

动物模型数字化图谱数据库平台部署在笔者单位已经构建好的国家实验动物资源库之下，查看地址为 <https://www.lasdr.cn/frontalphoto.do?method=animalListData>，用户可通过多种Web浏览器访问，进入“动物模型图谱”界面，可按系统疾病、动物种属、资源单位3个维度进行条件筛查，也可以直接通过检索栏功能模块以关键词快速查询图谱数据。平台首界面如图3所示。

4.1 用户及角色管理

为保障数据库平台的稳定运行和数据安全性、准

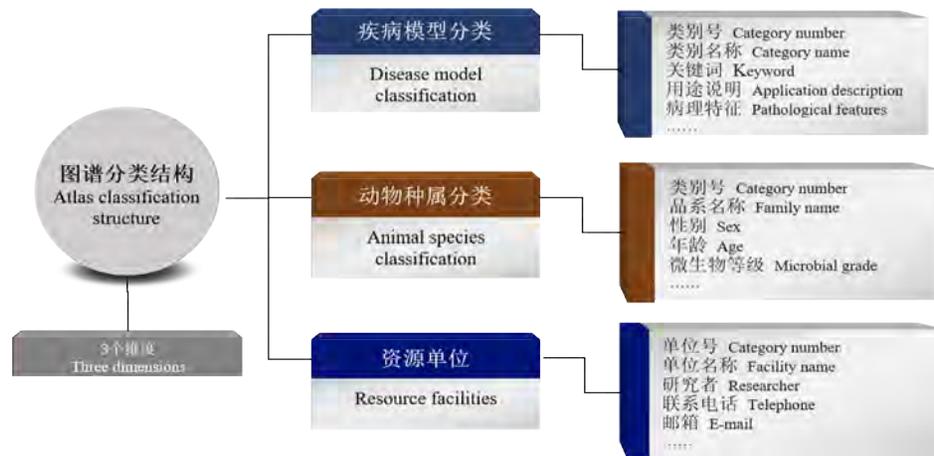


图2 动物模型数字化图谱数据库平台的数据分类结构设计

Figure 2 Data classification structure design of animal model digital atlas database platform

表1 动物模型数字化图谱数据库平台的图谱数据字段表结构

Table 1 Field table structure of the animal model digital atlas database platform

字段名 Field name	字段代码 Field code	数据类型(长度) Data type(length)	备注 Note
编码 Code	TXBM	VARCHAR2(30)	即图谱资源类别号,是唯一身份标识符
图谱名称 Atlas name	TXMC	VARCHAR2(200)	图谱资源的具体名称
系统分类 System classification	XTFL	VARCHAR2(20)	图谱所属系统疾病类型
动物分类 Animal classification	DWFL	VARCHAR2(20)	图谱涉及动物种属
文件上传 File upload	TXCFDZ	VARCHAR2(100)	图谱文件上传名称
图谱尺寸 Atlas size	SIZE	VARCHAR2(20)	图谱的统一大小
拍摄时间 Shooting time	PSSJ	DATE	图谱的拍摄时间
上传时间 Upload time	SCSJ	DATE	图谱的上传时间
拍摄说明 Shooting instructions	PSSM	CLOB(4000)	图谱制作说明
描述 Description	TXMS	CLOB(4000)	图谱描述说明
模型说明 Model description	DWSM	CLOB(4000)	动物造模说明
资源单位 Resource facility	ZYDW	VARCHAR2(20)	图谱资源的来源单位/研究者
图谱状态 Atlas Status	TXZT	NUMBER	用数字形式表示图谱是暂存,还是已发布的状态

确性, 后台系统为不同的资源单位、用户等配置不同的角色及权限, 分别设置了系统管理员、资源单位管理员、审核专家、普通用户等。系统管理员负责平台环境及安全性能配置、后台维护、数据备份、数据统计等, 并为其他角色分配相应的权限; 资源单位管理员负责该资源单位自主的图谱数据整理、采集、录入、汇交、管理等; 审核专家对资源单位管理员或研究者个人等汇交的图谱数据进行鉴定和评价, 具有监督和意见反馈权限, 审核图谱数据的可靠性、准确性和有效性; 普通用户是图谱资源的实际使用者, 通过 Web 浏览器注册成为会员后, 可免费查看或检索动物模型图谱数据资源。

4.2 数据管理

本数据库平台后台系统可实现图谱数据编码、录

入、审核、修改、删除和查看等功能(图4)。其中, 图谱编码以录入时间顺序规律动态生成, 成为图谱资源的唯一标识符; 系统管理员、资源单位管理员按照统一的图谱数据标准和数据库结构通过后台系统录入图谱数据, 包括录入图谱名称、系统分类、动物分类、拍摄时间、上传时间、图谱尺寸、拍摄说明、图谱描述、模型说明等数据项, 也可对图谱数据进行修改和删除处理; 专家通过数据审核功能查看图谱数据列表及图谱详情, 对图谱的图像和文本信息内容进行审查, 从而保证动物模型图谱资源的数据质量; 系统管理员通过数据查看功能可以快速预览图谱的可视化状态, 能查看到图谱的静态图像和缩略图及其相关描述信息, 还可以通过数据提交时的自动检查功能来确保数据填写的完整性。



图3 动物模型数字化图谱数据库平台的首页面

Figure 3 Home page of the animal model digital atlas database platform



图4 动物模型数字化图谱数据库平台的数据管理后台界面

Figure 4 Data management backend interface of animal model digital atlas database platform

4.3 数据检索

数据库平台主要通过两种检索方式让用户快速获得所需的模型图谱资源：一种方式是在首页的二级页面的检索栏中，用户输入关键词进行模糊检索，如输入动物模型名称“脊柱炎”则会呈现出图谱标题名称

中带有“脊柱炎”关键词的图谱缩略图及相应的信息；另一种方式则是通过系统疾病、动物种属、资源单位3个维度的分类筛选条件快速检索图谱数据，也可以采用布尔逻辑方法对这3个维度进行并列条件以及单一条件检索，如在首页中系统疾病分类选择“骨骼

疾病”，动物种属选择“非人灵长类”，资源单位选择“广东省生物技术研究院（广东省实验动物监测中心）”，则呈现出目前平台已有的25个“强直性脊柱炎食蟹猴模型”图谱数据，从而实现快速精确检索。

这两种方式检索后所呈现的均是图谱的缩略图，

点击缩略图后可进入详细页，用户可在线查看动物模型图谱的详细信息（图5），并且可通过鼠标移动查看图谱局部的放大图像特征。另外，数据库平台采取技术手段，对数字化后的动物模型图谱数据设置了使用权限，即只能在线阅读而不能进行复制和下载，以保证图谱数据的安全和合理使用。

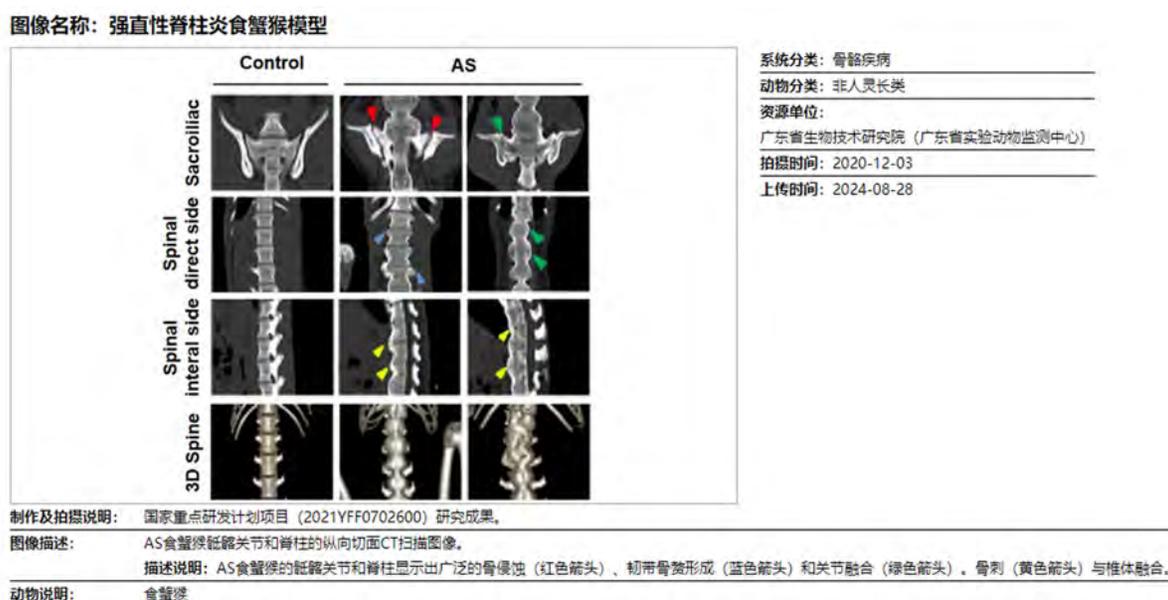


图5 动物模型数字化图谱数据库平台的图谱数据详细页面

Figure 5 Detailed page of atlas data on the animal model digital atlas database platform

4.4 入库图谱数据

动物模型数字化图谱数据库平台自2024年8月上线开通后，截至2025年1月，平台共收录国家重点研发计划项目研发单位（中山大学附属第六医院、广东药科大学、广州医科大学）以及广东省生物技

术研究院（广东省实验动物监测中心）4个资源单位汇交的图谱数据。入库的模型图谱资源有61幅，数据项有610个，涉及心血管系统、消化系统、泌尿系统、骨骼系统等4个疾病模型类别，如表2所示。

表2 动物模型数字化图谱数据库平台现有图谱数据统计

Table 2 Statistics of the existing atlas data on the animal model digital atlas database platform

模型类别 Model category	模型图谱名称 Model atlas name	数量/幅 Quantity/ piece	数据项/个 Data item/item	资源单位 Resource facility
心血管系统疾病 Cardiovascular diseases	SGTA基因敲除小鼠模型	14	140	广东药科大学
消化系统疾病 Digestive diseases	Par3L基因敲除小鼠模型	3	30	广州医科大学
	DSS诱导的长爪沙鼠溃疡性结肠炎模型	5	50	中山大学附属第六医院
	长爪沙鼠放射性直肠炎模型	4	40	中山大学附属第六医院
泌尿系统疾病 Urological diseases	APC ^{Min/+} 基因敲除小鼠肠道腺瘤模型	10	100	广东药科大学
骨骼系统疾病 Musculoskeletal disorders	强直性脊柱炎食蟹猴模型	25	250	广东省生物技术研究院(广东省实验动物监测中心)

5 总结与展望

动物模型作为生命科学、生物医药研究中极其重要的实验方法和工具,通过模拟人类疾病的发生和发展过程,能够帮助研究人员深入了解和探索疾病的发病机制,同时在药物研发、药物疗效评估以及疾病治疗策略领域提供丰富的材料和实验数据。动物模型图谱数据是动物模型中的重要组成部分,是科学家们在比较医学研究过程中的重要数据支撑。通过构建和观察动物模型图谱,对比研究临床人体疾病的组织病理、生理结构、行为模式等特征,能够为进一步深入研究疾病的发生机制、治疗方法等提供更精准、更可靠的理论依据,这是人类健康研究的重要科学手段之一。

面向国家科技创新战略的重大需求,加快各种人类疾病动物模型的资源开发和利用,对推动我国生命科学和医学药学等相关领域基础研究及科技产业的跨越式发展具有重大意义,是一项重要的战略举措^[18]。近年来,国家层面通过项目支持等方式加大了对实验动物资源及动物模型资源的研发投入,如国家重点研发计划等,地方科技相关部门也专门设立了人类疾病动物模型专项,并且相关国家重点研发计划项目的研发单位形成的模型病理图谱数据需汇交进入国家实验动物资源库,试图实现图谱数据的社会化共享。本数据库平台在此背景下得以建立,也得到了业界专家学者的大力支持和帮助。

本文重点介绍了动物模型数字化图谱数据库平台的架构、关键技术以及功能实现。目前数据库平台主要完成架构的初步设计、部分功能模块的开发,基本可实现用户管理、数据管理、数据上传、数据存储、数据审核、数据检索和可视化查看等功能。截至2025年1月,平台已入库4个资源单位的动物模型图谱61幅,共610个数据项。这些数据已在平台上线,并对外开放查阅。平台显示界面较简洁、直观,能兼容当前主流的Web浏览器进行用户访问;平台检索速度较快,对科技工作者获取疾病动物模型病理图谱,具有较好的实用性。

但目前动物模型数字化图谱数据库平台建设尚处于初步阶段,还存在诸多不足之处需改进。(1)平台功能还需不断优化。如扩展图谱的完整信息查看功能,完善动物模型图谱的缩略图和高清图查阅相关的用户权限设置,增加资源单位与用户之间的互动功能,设立动物模型图谱数据的移动端应用查阅功能等。(2)动物模型图谱数据采集规范有待完善。以往各资源单

位按照平台要求上报图谱数据,但汇交的图谱数据参差不齐,缺乏规范性,因此急需制定一套完善的动物模型图谱数据采集技术规范。(3)图谱数据来源有待拓展。目前数据库中收录的主要是来自国家重点研发计划课题组研究成果汇交的动物模型图谱数据,其次为笔者单位自主研发的动物模型图谱数据。后续需进一步通过多渠道加大平台的宣传和推广力度,积极与资源单位或研究者对接,研究动物模型图谱资源数据的有偿或无偿共享机制,并探索其实现路径;同时与更广泛的动物模型研究机构、研究者、学术期刊及图书出版机构等开展合作,以获取更全面、完整、规范的数字化图谱数据并入库整合,供广大科技工作者更加便捷地查阅国内相关机构的疾病动物模型图谱资源,从而更好地为生物医学研究提供高质量的动物模型图谱资源共享服务。

[作者贡献 Author Contribution]

李会萍负责设计论文架构、撰写和修改论文、数据库平台规划与建设;

高洪彬负责分析动物模型病理图谱数据、规范和汇交数据、数据审核、指导论文写作等相关工作;

温金银、杨锦淳参与收集论文资料、整理模型图谱数据。

[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] 夏咸柱,秦川,钱军.实验动物科学技术与产业发展战略研究[M].北京:科学出版社,2016.
XIA X Z, QIN C, QIAN J. Research on experimental animal science and technology and industrial development strategy [M]. Beijing: Science Press, 2016.
- [2] 周光兴,高诚,徐平,等.人类疾病动物模型复制方法学[M].上海:上海科学技术文献出版社,2008.
ZHOU G X, GAO C, XU P, et al. Replication methodology of animal models for human disease[M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technological Literature Press, 2008.
- [3] 李会萍,张文娟.基于数据挖掘的人类疾病动物模型资源共享平台的设计与思考[J].科技管理研究,2022,42(18):144-149. DOI: 10.3969/j.issn.1000-7695.2022.18.020.
LI H P, ZHANG W J. Design and thinking on resource sharing platform of animal models of human diseases based on data mining[J]. Sci Technol Manag Res, 2022, 42(18): 144-149. DOI: 10.3969/j.issn.1000-7695.2022.18.020.
- [4] 张连峰,崔韶.国内外实验动物模型概览[J].科技导报,2017,35(24):27-31. DOI: 10.3981/j.issn.1000-7857.2017.24.002.
ZHANG L F, CUI S. An overview of laboratory animal models at home and abroad[J]. Sci Technol Rev, 2017, 35(24): 27-31. DOI: 10.3981/j.issn.1000-7857.2017.24.002.
- [5] 周泉.2020年全球及中国动物模型(模式动物)行业发展现状及

- 竞争格局分析,行业增速较快,发展前景良好[EB/OL]. (2022-01-29) [2024-10-09]. <https://www.huaon.com/channel/trend/780941.html>.
- ZHOU Q. Analysis of the development status and competitive landscape of the global and Chinese animal model (model animal) industry in 2020: the industry is growing rapidly and has a promising future[EB/OL]. (2022-01-29) [2024-10-09]. <https://www.huaon.com/channel/trend/780941.html>.
- [6] 国家科技基础条件平台中心. 中国实验动物资源发展研究报告2022[M]. 北京: 科学出版社, 2023.
National Science and Technology Infrastructure Platform Center. Report on the research of Chinese laboratory animal resources in 2022[M]. Beijing: Science Press, 2023.
- [7] AIGNER T, COOK J L, GERWIN N, et al. Histopathology atlas of animal model systems—overview of guiding principles.[J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2010, 18: S2-S6. DOI: 10.1016/j.joca.2010.07.013.
- [8] LI N, ZHU J H, CHEN P R, et al. High-dimensional analysis reveals an immune atlas and novel neutrophil clusters in the lungs of model animals with *Actinobacillus pleuropneumoniae*-induced pneumonia[J]. *Vet Res*, 2023, 54(1):76. DOI: 10.1186/s13567-023-01207-4.
- [9] 吴玥, 薛婧, 魏强, 等. 国家动物模型资源共享信息平台的建立[J]. *中国实验动物学报*, 2022, 30(8):1080-1086. DOI: 10.3969/j.issn.1005-4847.2022.08.009.
WU Y, XUE J, WEI Q, et al. Establishment of national infrastructure for an animal model resource platform[J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2022, 30(8):1080-1086. DOI: 10.3969/j.issn.1005-4847.2022.08.009.
- [10] 黄红坤, 唐小江, 严家荣, 等. 人类疾病动物模型资源数据库的构建[J]. *实验动物科学*, 2014, 31(4):36-40. DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2014.04.010.
HUANG H K, TANG X J, YAN J R, et al. Construction of resource database for animal models of human disease[J]. *Lab Anim Sci*, 2014, 31(4):36-40. DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2014.04.010.
- [11] 吴玥, 向志光, 高苒, 等. 冠状病毒感染动物模型比较转录组学数据库的建立[J]. *中国实验动物学报*, 2022, 30(1):92-99. DOI: 10.3969/j.issn.1005-4847.2022.01.012.
WU Y, XIANG Z G, GAO R, et al. Establishment of a comparative transcriptomics database of coronavirus infected animal models[J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2022, 30(1):92-99. DOI: 10.3969/j.issn.1005-4847.2022.01.012.
- [12] 中国农业大学. 学校出版社学术著作选题入选“十四五”国家重点出版物出版规划增补项目[EB/OL]. (2024-09-04)[2024-10-09]. <https://news.cau.edu.cn/jcdt/09dc5b048ede4f55be2ab36a2892f3fa.htm>.
- [13] 刘江伟, 张东辉, 王广军, 等. 急进高原环境组织病理学实验图谱[M]. 北京: 科学出版社, 2021.
LIU W J, ZHANG D H, WANG G J, et al. Histopathological experimental atlas of rapidly entering plateau environment [M]. Beijing: Science Press, 2021.
- [14] 陈凤岩, 唐振宇, 步兆军. 基于Java和XML的异构数据库集成研究[J]. *情报杂志*, 2006, 25(7):16-17, 21. DOI: 10.3969/j.issn.1002-1965.2006.07.006.
CHEN F Y, TANG Z Y, BU Z J. Heterogeneous database integration research on Java and XML[J]. *J Inf*, 2006, 25(7):16-17, 21. DOI: 10.3969/j.issn.1002-1965.2006.07.006.
- [15] 盛丽莉. 基于Oracle数据库的数据安全监控系统设计[J]. *自动化应用*, 2024(14):254-257. DOI: 10.19769/j.zdhy.2024.14.078.
SHENG L L. Design of data security monitoring system based on oracle database[J]. *Autom Appl*, 2024(14):254-257. DOI: 10.19769/j.zdhy.2024.14.078.
- [16] 曹一化, 刘旭. 自然科技资源共性描述规范[M]. 北京: 中国科学技术出版社, 2006: 365-366.
CAO Y H, LIU X. The Generic description specification for natural science and technology resources[M]. Beijing: China Science and Technology Press, 2006: 365-366.
- [17] LI H P, ZHANG W J. A generalized classification and coding system of Human Disease Animal Model Resource data with a case study to show improving database retrieval efficiency [J]. *PLoS One*, 2023, 18(2): e0281383. DOI: 10.1371/journal.pone.0281383.
- [18] 贺争鸣. 基于能力提升的我国实验动物资源发展愿景[J]. *实验动物与比较医学*, 2021, 41(2):85-90. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2021.042.
HE Z M. Development vision of laboratory animal resources in China based on ability improvement[J]. *Lab Anim Comp Med*, 2021, 41(2):85-90. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2021.042.

(收稿日期: 2024-10-29 修回日期: 2025-02-10)
(本文责任编辑: 丁宇菁)

[引用本文]

- 李会萍, 高洪彬, 温金银, 等. 疾病动物模型数字化图谱数据库平台的构建与初步应用[J]. *实验动物与比较医学*, 2025, 45(3): 300-308. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.158.
- LI H P, GAO H B, WEN J Y, et al. Construction and preliminary application of animal disease model digital atlas database platform[J]. *Lab Anim Comp Med*, 2025, 45(3): 300-308. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.158.



师长宏, 教授, 博士生导师, 空军军医大学实验动物中心主任、陕西省实验动物质量检测中心主任、军队医学实验动物技术监督中心西北区域主任, 兼任中国实验动物学会常务理事、陕西省实验动物学会理事长、全军医学实验动物学专业委员会副主任委员、消化系肿瘤整合防治全国重点实验室PI, 培养硕士、博士20余名。主要从事人源化动物模型的创制与应用研究, 重点围绕异种器官移植用人源化猪创制和肿瘤免疫微环境调控机制开展研究。先后在 *Cancer Cell*、*Gut Microbes* 等国际期刊发表SCI论文10余篇; 主持国家“863”计划专项、国家自然科学基金资助项目、军队重点课题等20余项; 获得陕西省科技进步奖一等奖和教学成果一等奖各1项; 获“全国优秀科技工作者”、军队“育才”银奖、军队优秀人才岗位津贴, 荣立个人和集体“三等功”各1次。

重塑细胞间互动: 类器官共培养模型赋能疾病机制与治疗探索

谭邓旭^{1,2}, 马一凡¹, 刘可¹, 张延英¹, 师长宏²

(1. 甘肃中医药大学第一临床医学院, 兰州 730030; 2. 空军军医大学实验动物中心, 西安 710032)

[摘要] 类器官共培养模型 (organoid co-culture model) 作为一种重现三维微环境以研究细胞间相互作用的新型工具, 近年来在生物医学研究中展现了显著的应用潜力。该模型通过模拟体内组织的微环境, 能够为研究细胞间复杂互动提供更为精准的实验平台, 尤其在肿瘤免疫逃逸机制、药物敏感性测试、神经退行性疾病的病理特征揭示等方面具有重要价值。然而, 类器官共培养模型在标准化操作、规模化培养、伦理规范和未来发展方向等方面仍面临诸多挑战, 特别是在实验动物学领域, 如何有效地将类器官与传统实验动物模型相结合, 以及如何在不同研究需求中选择合适的模型并探索其替代潜能, 仍是当前亟待解决的问题。在伦理审批和动物实验替代方面, 类器官共培养模型提供了一种更加符合“替代、减少、优化 (replacement, reduction, refinement, 3R)”原则的实验方案, 可能成为替代传统实验动物模型的重要工具。为此, 本文回顾了该领域的最新进展与面临的关键挑战, 详细描述了类器官共培养模型的构建方法, 并阐述了其在发病机制研究和药物筛选中的应用。文章还系统比较了类器官共培养模型与传统实验动物模型的差异, 探讨了二者在具体应用场景中的选择依据。此外, 本文讨论了类器官共培养模型在实验动物替代中的潜在价值, 并展望了该技术未来的发展趋势。通过这些讨论, 本文旨在推动类器官共培养技术的创新与发展, 并为未来相关研究提供新的视角和科学依据。

[关键词] 细胞间互动; 类器官; 共培养; 实验动物

[中图分类号] R-332; Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2025)03-0309-09



Reshaping Intercellular Interactions: Empowering the Exploration of Disease Mechanisms and Therapies Using Organoid Co-Culture Models

TAN Dengxu^{1,2}, MA Yifan¹, LIU Ke¹, ZHANG Yanying¹, SHI Changhong²

(1. First School of Clinical Medical, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730030, China; 2. Laboratory Animal Center, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

Correspondence to: SHI Changhong (ORCID: 0000-0001-7490-3593), E-mail: changhong@fmmu.edu.cn;

ZHANG Yanying (ORCID: 0000-0002-2097-9207), E-mail: 1360599656@qq.com

[基金项目] 陕西省创新能力支撑计划项目“靶向MAOA促进胰腺癌免疫治疗”(2024CX-GXPT-41); 甘肃省中医药研究中心开放课题“人源化PDX模型在胰腺癌免疫治疗研究的应用”(zyzx-2020-zx22); 甘肃中医药大学研究生创新项目“肿瘤类器官与人免疫细胞共培养模型的建立及应用”

[第一作者] 谭邓旭(1991—), 男, 硕士研究生, 研究方向: 类器官模型制备及应用。E-mail: 494117685@qq.com。ORCID: 0000-0002-3685-9103

[通信作者] 师长宏(1973—), 男, 博士, 教授, 研究方向: 肿瘤模型制备及评价。E-mail: changhong@fmmu.edu.cn。ORCID: 0000-0001-7490-3593;

张延英(1964—), 男, 硕士, 教授, 研究方向: 实验动物学。E-mail: 1360599656@qq.com。ORCID: 0000-0002-2097-9207

[ABSTRACT] The organoid co-culture model, as a novel tool for recreating a three-dimensional microenvironment to study cell-cell interactions, has demonstrated significant application potential in biomedical research in recent years. By simulating the *in vivo* tissue microenvironment, this model provides a more precise experimental platform for investigating complex cellular interactions, particularly in areas such as tumor immune evasion mechanisms, drug sensitivity testing, and the pathological characterization of neurodegenerative diseases, where it has demonstrated significant value. However, the organoid co-culture model still faces several challenges in terms of standardized procedures, large-scale cultivation, ethical guidelines, and future development. In particular, in the field of laboratory animal science, how to effectively combine organoids with traditional animal models, and how to select the most appropriate model for different research needs while exploring its potential for replacement, remain pressing issues. In the context of ethical approval and the replacement of animal experiments, the organoid co-culture model offers an experimental approach that better aligns with the "3R" principle (Replacement, Reduction, Refinement), potentially becoming an important tool for replacing traditional animal models. To this end, this paper reviews the latest advances and key challenges in this field, providing a detailed description of the construction methods for organoid co-culture models and discussing their applications in disease mechanism research and drug screening. The paper also systematically compares the organoid co-culture models with traditional animal models, exploring the criteria for selecting the appropriate model for specific applications. Furthermore, this paper discusses the potential value of organoid co-culture models as alternatives to animal experiments and anticipates future development trends of this technology. Through these discussions, the paper aims to promote the innovation and development of organoid co-culture technology and provide new perspectives and scientific evidence for future research.

[Key words] Intercellular interactions; Organoids; Co-culture; Laboratory animals

在过去十多年中, 生物医学领域经历了深刻的技术变革, 其中类器官技术的崛起为器官发育、生理功能及疾病机制的研究提供了全新的实验平台^[1]。类器官是由干细胞 (stem cell, SC)^[2] 或原代组织^[3] 在三维 (three dimension, 3D) 培养和必要生长因子的条件下自我组织而成的微型功能性组织结构, 能够在体外精确模拟体内器官的关键特征^[4]。自 Sato 等^[5] 于 2009 年首次构建出小肠类器官以来, 类器官技术迅速扩展至大脑^[6]、肝脏^[7]、肺脏^[8] 和肾脏^[9] 等多个器官系统, 并推动了发育生物学、疾病模型构建及药物筛选等多个研究领域的发展^[10]。

传统的二维 (two dimension, 2D) 共培养模型虽常用于研究细胞间相互作用及微环境效应, 但由于其缺乏 3D 结构和复杂的细胞外基质, 难以准确模拟体内的生理环境^[11]。为克服这一局限, 类器官共培养模型应运而生。在 3D 环境中将类器官与免疫细胞 (immunocyte, IC)、基质细胞 (stromal cell, StC)、微生物或多体系细胞等共培养, 构建类器官共培养模型, 能够更真实地模拟体内复杂细胞间通信和信号传导网络, 更准确地反映机体生理和病理状态^[12]。该模型在肿瘤微环境研究、免疫治疗评估、感染机制解析、药物筛选和再生医学等领域均显示出巨大的应用潜力,

因此, 在生物医学研究中得以占据重要的前沿地位^[13]。

尽管类器官共培养模型在生物医学研究中取得了显著进展, 但其应用仍面临一些挑战, 包括技术标准化不足、生理特性不典型、区域化缺乏、模型复杂度高^[14], 以及伦理和监管待完善等问题^[15]。此外, 虽然类器官在替代传统动物模型方面展现出潜力, 但如何根据不同研究需求, 有效地实现类器官与动物模型的结合, 并确保二者的互补性与科学性, 仍是当前亟待解决的问题。本综述旨在为相关研究者提供全面且深入的参考, 同时聚焦类器官共培养模型对实验动物模型的挑战与促进作用, 结合伦理考量和技术优化, 进一步提出未来研究的方向, 以推动类器官共培养模型的技术进步, 并加速其在生物医学研究中的转化应用。

1 类器官共培养模型的构建

类器官共培养模型通过将类器官与 IC、StC 及微生物等进行共培养, 创建了不同细胞相互作用的创新平台 (图 1)。首先, 类器官与 IC 的共培养能够精准模拟肿瘤微环境 (tumor microenvironment, TME) 中的免疫反应, 尤其是在与 T 细胞和自然杀伤 (natural killer,

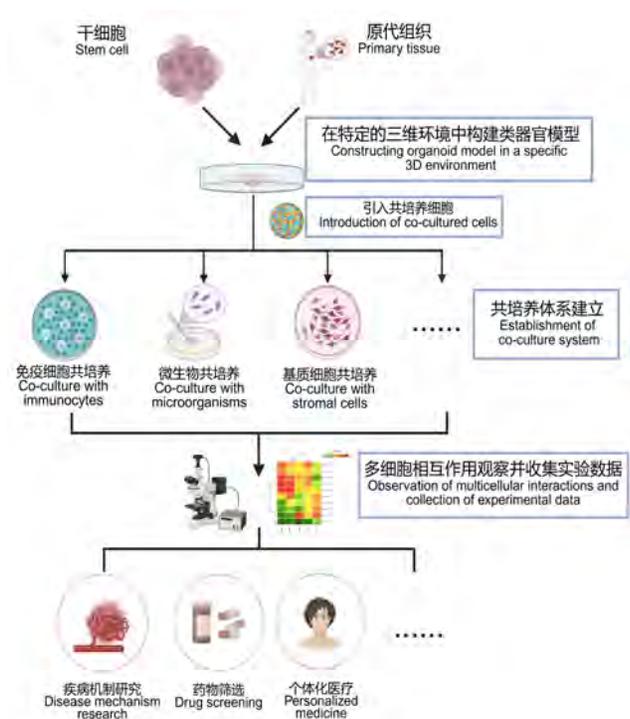


图1 类器官共培养模型的构建示意图

Figure 1 Schematic illustration of the construction of an organoid co-culture model

NK) 细胞等免疫效应细胞的相互作用中, 有助于深入解析肿瘤免疫逃逸机制, 并为个体化免疫治疗的发展奠定实验基础^[16]。StC 在类器官发育、功能维持和微环境重塑中起着关键作用, 类器官与StC 的共培养不仅通过提供生物力学支持调控类器官的生长和分化, 还能够更精确地模拟组织纤维化等病理过程^[17]。此外, 类器官与微生物的共培养模型构建了研究宿主-微生物相互作用的新平台, 通过模拟肠道屏障功能来揭示病原微生物的感染机制, 为研究炎症性肠病、感染性疾病及癌症等提供了重要的研究工具和新视角^[18]。为了进一步提升模拟复杂生理环境的能力, 研究者将微流控技术与类器官共培养模型相结合。微流控芯片不仅能够精确控制流体动力学参数和培养条件, 还可实现多种细胞类型的共培养, 从而显著提升药物筛选的效率与精确度, 为精准医疗和组织修复等开辟了新的研究方向^[19-20]。综上, 类器官与不同细胞类型及技术的深度整合, 显著拓宽了其在生物医学研究中的应用前景, 为解决肿瘤免疫逃逸、代谢紊乱及感染防御等复杂问题提供了重要的研究平台。

2 类器官共培养模型的应用

相较于传统类器官模型, 类器官共培养模型的应

用主要体现在通过构建具有细胞互作功能的体外疾病模型, 并基于此开展疾病机制研究、药物筛选、新药评价以及临床治疗预测等研究。

2.1 疾病机制研究

2.1.1 癌症

癌症研究中, 类器官共培养模型在揭示TME和免疫逃逸机制方面发挥了关键作用。通过模拟TME中细胞间的复杂相互作用, 为理解癌症的发生、转移、耐药性形成和免疫逃逸机制等提供了更接近生理状态的实验平台^[21-22]。例如, 有研究利用胰腺癌类器官与巨噬细胞共培养构建模型, 揭示了巨噬细胞C-C基序趋化因子配体5 (C-C motif chemokine ligand 5, CCL5) - 特异性蛋白1 (specificity protein 1, SP1) - 双调蛋白 (amphiregulin, AREG) 反馈环通过激活C-C趋化因子受体5 (C-C chemokine receptor type 5, CCR5) /Akt[即蛋白激酶B (protein kinase B, PKB)]/SP1/分化簇44 (cluster of differentiation 44, CD44) 通路, 赋予胰腺癌细胞干性特征, 从而促使其对吉西他滨 (gemcitabine) 耐药^[23], 该发现为理解胰腺癌耐药机制提供了新的视角。尽管当前该模型在血管模拟和动态环境再现方面仍存在一些局限, 但其在揭示癌症机制、研究肿瘤细胞相互作用中具有独特价值^[24]。

2.1.2 感染性疾病

类器官共培养模型在揭示病原体感染机制和宿主免疫反应中取得了重要进展。通过将类器官与病原体或IC共同培养, 研究者能够模拟人体感染过程, 并深入分析细胞间的相互作用^[25]。有研究将沙门菌 (*Salmonella*) 通过显微注射方法注入类器官构建共培养模型, 用于模拟肠道感染, 从而能够直接观察病原体与初级上皮细胞的相互作用, 并研究 α -防御素抗菌肽对细菌生长的影响^[26]。在病毒研究方面, 类器官模型展现了广泛的应用潜力。以严重急性呼吸综合征冠状病毒2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2) 为例, 在类器官与SARS-CoV-2的共培养模型中发现, SARS-CoV-2感染后类器官模型表现出强烈的趋化因子诱导, 这与新型冠状病毒感染患者的体内情况一致^[27], 表明类器官共培养模型可以作为一种可靠的疾病模型, 用于病毒感染研究。这一技术为新型抗病毒药物和疫苗的研发提供了有力支撑, 进而提升了感染性疾病的治疗效果。

2.1.3 神经系统疾病

在神经系统疾病的研究领域, 类器官共培养模型助力于在体外构建更加可靠的神经类器官模型, 用于

解析人类中枢神经系统发育机制、疾病进程及其转化应用等^[28]。例如,在阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)研究中,通过构建脑类器官共培养模型,揭示了神经元和星形胶质细胞中载脂蛋白E4(apolipoprotein E4, ApoE4)对微管结合蛋白病理学改变的本质,表明类器官共培养模型是作为AD研究和药物发现的一种有价值的病理模型^[29]。此外,在帕金森病(Parkinson's disease, PD)的研究中,神经元与星形胶质细胞的共培养揭示了溶酶体蛋白水解受损,导致晚期糖基化终末产物(advanced glycation end product)积累与 α -突触核蛋白(α -synuclein, α -syn)磷酸化增加,进一步由蛋白质去糖化酶功能丧失而引发早发性PD的发展^[30]。以上研究表明,类器官共培养模型为神经系统疾病的药物开发提供了新的方向。

2.2 药物筛选与治疗评估

类器官共培养模型因其能够高度模拟体内组织的3D结构和微环境,被广泛认为是预测药物反应、毒性和不良理想的工具。首先,该模型来源于患者组织,保留了个体的遗传背景和细胞特性,使其在个性化药物反应预测中展现出显著优势。其次,与传统的2D细胞培养相比较,类器官更贴近人体真实的生理状态,能够反映复杂的细胞间相互作用和动态微环境^[31],从而更精确地预测药物的疗效及毒性。

此外,类器官的多器官建模能力(如肝脏、肾脏、肠道类器官)为研究药物在不同组织间的代谢、特定细胞毒性的检测及长期不良反应的评估提供了强有力的工具。通过结合成簇规律间隔短回文重复(clustered regularly interspaced short palindromic repeat, CRISPR)基因编辑和高通量筛选技术,类器官共培养模型能够加速药物研发进程。2024年的一项研究中,研究人员开发了一种新型抗体#84.7,并与一种名为EBET的溴结构域和外末端蛋白降解剂进行偶联,利用类器官和IC、StC共培养模型,结合微流控技术实现高通量药物筛选,为预测肿瘤患者的药物治疗反应提供了高效便捷的新型平台^[32]。2021年,研究人员基于肿瘤表面抗原谱,制备了靶向MUC1的第二代CAR-T细胞,并与类器官模型进行共培养,评估CAR-T细胞疗法在膀胱癌患者中的疗效,为制定个体化免疫治疗方案提供了实验依据^[33]。在中国,利用肿瘤类器官免疫共培养模型,对齐鲁制药自主研发的新一代抗肿瘤药物IM83嵌合抗原受体T细胞注射液进行了药效评价,

并获得了国家药品监督管理局的药物临床试验许可。这种将类器官共培养技术和高通量筛选技术相结合的方法,为精准医疗中的靶向药物开发提供了强有力的工具,显著缩短了药物开发周期。此外,类器官模型在其他免疫治疗如疫苗开发和免疫检查点抑制剂(immune checkpoint inhibitors)的评估中同样表现出色,进一步推动了个体化免疫治疗的发展。

3 类器官共培养模型与实验动物模型

在生物医学研究中,模型的选择对实验结果的可靠性和可重复性至关重要。类器官共培养模型作为一种新兴工具,与传统的实验动物模型在多个关键维度上存在显著差异,这些差异不仅影响实验设计,还直接关系到研究结果的适用性和科学价值。深入理解这两种模型的特征及其优缺点,对于研究人员在实验设计和结果解释中做出合理选择至关重要。

3.1 两种模型的多维度比较

首先,在复杂性方面,类器官共培养模型因其构建过程相对简单,使研究人员能够根据实验需求选择不同细胞类型并调节其相互作用,从而实现微环境的精准控制^[34-35]。这种灵活性使得类器官能够有效模拟体内复杂的组织结构和功能。相比之下,实验动物模型具有更高的生物复杂性,能够真实反映生理状态^[36]。然而,这种复杂性也带来了显著的不可预测性,个体差异和环境变化常常降低实验结果的可重复性^[37],同时动物与人类之间的物种差异,也会使实验研究具有一定的局限性^[38]。因此,尽管类器官模型在构建灵活性方面具有明显优势,但动物模型因其更高的生物复杂性,能更全面地反映生理状态,尤其适合研究多层次的系统性疾病效应。

其次,在伦理考量方面,类器官共培养模型因不涉及活体动物而在伦理上更易被接受^[39],并符合动物福利的“替代、减少、优化(replacement, reduction, refinement, 3R)”原则,减少了对实验动物的依赖。相比之下,实验动物的使用须严格遵守动物福利伦理相关要求、法规^[40],接受严格的伦理审查,这增加了研究的复杂性,并引发社会公众对动物实验必要性的质疑。因此,开发和使用类器官模型不仅能够满足科学研究需求,而且能减少相关伦理争议的风险。此外,类器官共培养模型的实验周期显著短于动物模型,使研究人员能够在较短时间内获得实验数据,从而加速科研进程^[41]。同时,基于类器官共培养芯片和新兴的

生物技术, 研究人员可在短时间内实现高通量药物筛选。相对而言, 构建动物模型周期较长, 获取实验结果往往需要数周甚至数月, 这不仅延缓了研究的进展, 还增加了研究的成本。因此, 快速的实验反馈是类器官共培养模型的一大优势。尽管类器官模型在以上方面展现出众多优势, 但在生理相关性上依然存在不足。由于类器官缺乏完整生物体所具有的全身系统调节和复杂生物反应, 在研究系统性疾病时, 其应用受到限制。相比之下, 动物模型在生理相关性研究等方面具有不可替代的优势, 动物模型能够全面反映全身生理状态及疾病机制^[42], 为药物代谢和毒性评估等提供重要依据。因此, 尽管类器官模型在技术上具有诸多优势, 但在研究的全面性和深度上, 动物模型仍然是不可或缺的工具。

最后, 在研究范围方面和疾病建模方面, 类器官

共培养模型主要适用于细胞层面和局部组织微环境的研究, 为个体化医疗、药物筛选、再生医学和基因治疗等方向的研究提供了强有力的工具^[43]。然而, 动物模型能够综合考虑生理、行为及其在疾病中的相互作用, 是基础医学和临床研究中不可或缺的组成部分, 但是受限于物种差异问题, 动物模型的使用也存在一定的局限性。因此, 选择适当的模型对于实现不同研究目标至关重要。

总体而言, 类器官共培养模型与动物模型各有优势和局限(表1)。在复杂性、伦理考量和时间成本等方面, 类器官共培养模型表现出显著优势, 但在生理相关性和研究范围上, 动物模型仍具有不可替代的重要性。因此, 未来的研究应致力于优化类器官模型的生理相关性, 并探索其在更广泛领域的应用, 以推动新药开发和疾病研究领域的进展。

表1 类器官共培养模型与实验动物模型的多维度比较

Table 1 Multidimensional comparisons between organoid co-culture models and laboratory animal models

比较维度 Comparison dimension	类器官共培养模型 Organoid co-culture model	实验动物模型 Laboratory animal model
复杂性 Complexity	低: 可控的细胞组成和环境	高: 系统的生物复杂性
伦理问题 Ethical issues	较少: 不涉及活体动物	较多: 动物实验伦理问题
时间成本 Time cost	较短: 快速获取结果	较长: 动物的生长与繁殖
生理相关性 Physiological relevance	较低: 缺乏全身系统	高: 能反映全身生理状态
研究范围 Scope of research	细胞和局部微环境的研究	全身生理和行为的研究
疾病建模 Disease modeling	对人类特异性疾病建模具有高度准确性	受物种差异限制
药物测试 Drug testing	精确测试人类特异性的药物反应; 高通量	全身药代动力学数据

3.2 类器官共培养模型的实验动物替代价值

3.2.1 对实验动物科学的挑战与推动

类器官共培养模型通过重建人类特异性的疾病微环境, 能够显著减少实验动物的使用, 在肿瘤免疫研究和药物筛选等领域展现出显著优势。该模型在一些肿瘤免疫研究和早期药物筛选中, 可作为实验动物的补充工具, 减少所需样本量并提高实验效率。尽管类器官模型在局部机制研究中表现出不俗的优越性, 但其缺乏全身生理系统的动态调控能力, 因此在多器官交互和全身疾病反应研究中仍需依赖动物模型。这种局限性表明, 目前类器官模型无法完全取代动物模型,

而是作为重要补充, 与动物模型共同推动科学研究的进展。

3.2.2 “3R”原则的践行

类器官共培养模型因其独特的生物学优势和技术创新, 或可逐步实现对动物模型的替代, 在实践中积极响应了实验动物伦理学的“3R”原则。类器官共培养模型以其高效、精准和人源化的特点, 显著减少了实验动物的使用, 并提升了实验设计的科学性和可重复性。这些优势使得类器官模型在替代、减少和优化动物实验中表现出巨大潜力。未来, 随着人工智能和生物工程技术的结合, 类器官模型将进一步优化其生

理相关性，并可能在某些领域全面替代动物实验。总之，类器官共培养模型不仅代表了实验动物替代的未来方向，还在推动生物医学研究效率和伦理实践方面做出了重要贡献。

4 类器官共培养模型的挑战与展望

4.1 面临的挑战和解决策略

尽管类器官共培养模型在生物医学研究中展现出广泛的应用潜力，但仍面临技术和伦理方面的挑战。首先，标准化和可重复性问题限制了该模型的广泛推广。由于不同实验室之间的培养条件存在差异，实验结果的横向比较成为一大难题。为解决这一问题，需尽快建立国际统一的技术规范，包括培养液成分、基质选择和类器官形成所需的标准化操作流程。其次，利用高通量数据分析和人工智能技术，开发统一的模型表征工具，通过定量化和自动化的手段提升实验一致性。最后，在伦理层面，患者来源的肿瘤类器官 (patient-derived organoids, PDOs) 的研究还需面对隐私保护与数据共享的双重挑战。为此，需建立完善的伦理审批体系，并制定统一的行业标准，以确保患者样本的使用规范。

此外，跨学科协作不足和技术整合不力限制了类器官研究的创新潜力。该领域横跨生物学、工程学、医学和数据科学，然而不同学科间的知识壁垒和沟通障碍常常导致技术整合效率低下。未来，研究应着力于构建跨学科联合研究中心，推动不同领域研究人员之间的交流与合作。同时，通过学科交叉培训培养复合型人才，并开发一体化的多功能技术平台，将类器官共培养模型构建、功能分析与动态模拟统一于一个框架下，从而提升整体研究效率和创新水平。

4.2 未来研究方向

类器官共培养模型作为当代生物医学研究的重要工具，正逐步从基础研究走向更广泛的临床应用。未来的研究方向集中于通过技术创新提升模型的复杂性和功能性，如多器官系统的构建、高通量与自动化技术的整合 (图2)，以及加速临床转化的路径优化。

4.2.1 多器官系统构建

多器官系统的构建代表了类器官研究的重要前沿。通过在微流控芯片上集成多种类器官，研究者能够模拟多器官之间的相互作用^[44-45]，从而研究复杂疾病的病理机制及药物的多器官效应。这些“器官芯片”系统不仅能够提供体内相关的生理条件，还可通过微流

控技术精确调控器官间的代谢流与信号传递^[46]。未来，随着微制造技术和纳米技术的进一步发展，多器官系统有望成为复杂疾病研究和个体化治疗的重要平台。

4.2.2 高通量与自动化技术

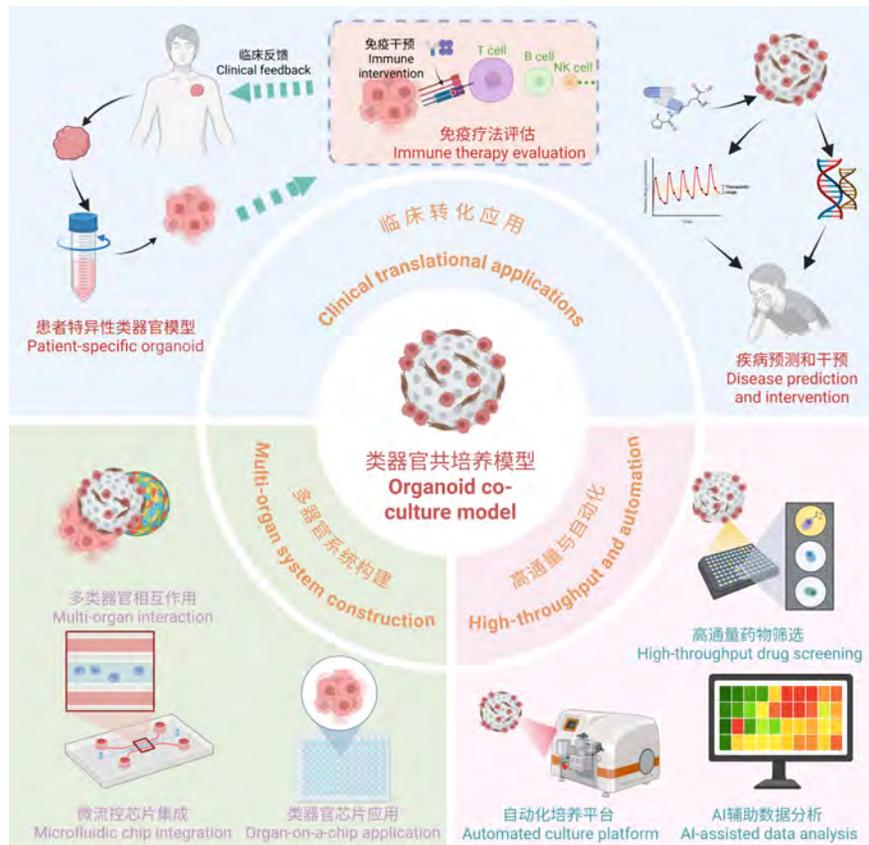
自动化培养系统与人工智能技术的结合为类器官共培养模型的发展带来了前所未有的机遇。通过集成自动化平台与先进的计算机算法，研究者能够减少人为误差，优化数据分析，并显著提升高通量药物筛选的效率和精确性。2024年的一项研究中，展示了基于深度学习的3D图像分割、单细胞表型分类和跟踪技术，从而自动获取TME中不同相互作用细胞类型的多维动态数据。这些数据不仅可用于研究肿瘤与TME中不同细胞类型的相互作用动态，还可用于研究其他组织或器官生理学和病理学中涉及的各种细胞-细胞相互作用^[47]。未来，自动化技术与人工智能的深度融合将进一步推动精准医疗和药物研发，尤其是在精准医学和靶向治疗领域。

4.2.3 实验动物学融合

类器官共培养模型与实验动物科学的融合，将成为生物医学研究的未来趋势。一方面，类器官模型可作为动物实验的前期筛选工具，显著减少实验动物使用量；另一方面，在多器官交互研究中，类器官模型可弥补动物模型在细胞和组织层面研究中的不足。通过多器官芯片技术模拟器官间的动态交互过程，再结合动物实验验证全身生理状态，可大幅提高实验数据的全面性和相关性。未来，随着人工智能和自动化技术的深度融合，类器官模型将在复杂疾病建模、药物开发和个性化医疗领域展现出更大的应用潜力，为生物医学研究的转化和创新提供有力支持。

4.2.4 临床转化

类器官共培养模型在临床应用中展现出广阔前景。通过与患者IC的共培养，研究者能够在体外预测患者对特定治疗方案的反应，并据此制定个性化治疗策略^[48]。这一过程结合了患者的分子特征、免疫微环境和药物反应数据，有助于制定更为精准的治疗方案。类器官模型已被用于肿瘤患者的药物敏感性测试，不仅优化临床治疗选择，而且在治疗耐药性肿瘤和罕见疾病方面展现出了显著优势^[16]。然而，在提高模型的临床转化效率，尤其是在模拟体内复杂环境和整合多种数据来源方面，类器官共培养模型仍然是未来研究的重点。因此，跨学科的协同创新，以及数据共享和



注：NK，自然杀伤。

Note: NK, natural killer.

图2 类器官共培养模型的未来研究方向和应用示意图

Figure 2 Schematic diagram of future research directions and applications of organoid co-culture models

技术整合，将在未来的临床应用中发挥关键作用。

5 总结

类器官共培养模型通过再现体内3D微环境并促进多细胞间相互作用，已成为生物医学研究中的核心技术之一。这些模型能够有效模拟疾病的病理过程，为肿瘤微环境、感染性疾病及神经退行性疾病等研究领域提供关键实验平台，并在精准医疗中展现出独特的应用潜力。通过与IC、StC及微生物等的共培养，类器官模型揭示了肿瘤的免疫抑制机制，并探索了病原体与宿主细胞间的复杂交互，为制定精准干预策略奠定了基础。

尽管类器官共培养模型取得了显著进展，但其在标准化、规模化和伦理规范方面仍面临挑战。培养方法的标准化对提高实验的可重复性至关重要，而规模化培养则能支持高通量药物筛选和大规模数据分析的需求。同时，随着类脑器官技术的发展，科学进步与

伦理规范之间的平衡成为亟待解决的重要议题。因此，未来的研究应着重解决这些挑战，以推动类器官共培养模型的进一步优化。

未来的研究应重点关注构建多器官系统，以重现人体复杂的生理环境，并通过建立器官间的相互作用网络，全面理解系统性疾病的发病机制。这种多器官模型能够为提出多器官综合治疗方案提供理论支持。同时，类器官共培养模型的临床前验证和转化将成为再生医学与精准医疗的研究重点，为患者提供更具针对性的治疗方案。通过克服技术和伦理挑战，该模型有望在生物医学领域释放更大的创新潜力，推动基础研究、新药研发和精准医疗的发展。

[作者贡献 Author Contribution]

谭邓旭负责检索文献、写作初稿；
马一凡参与写作初稿、提供绘图素材；
刘可负责示意图绘制；
张延英参与修订论文；
师长宏负责修订论文。

[利益声明 Declaration of Interest]

所有作者均声明本文不存在利益冲突。

[参考文献 References]

- [1] TANG X Y, WU S S, WANG D, et al. Human organoids in basic research and clinical applications[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2022, 7(1):168. DOI:10.1038/s41392-022-01024-9.
- [2] JEYA VANDANA J, MANRIQUE C, LACKO L A, et al. Human pluripotent-stem-cell-derived organoids for drug discovery and evaluation[J]. *Cell Stem Cell*, 2023, 30(5): 571-591. DOI: 10.1016/j.stem.2023.04.011.
- [3] YANG H, CHENG J H, ZHUANG H, et al. Pharmacogenomic profiling of intra-tumor heterogeneity using a large organoid biobank of liver cancer[J]. *Cancer Cell*, 2024, 42(4):535-551.e8. DOI:10.1016/j.ccell.2024.03.004.
- [4] GAO S T, SHEN J, HORNICEK F, et al. Three-dimensional (3D) culture in sarcoma research and the clinical significance[J]. *Biofabrication*, 2017, 9(3): 032003. DOI: 10.1088/1758-5090/aa7fdb.
- [5] SATO T, VRIES R G, SNIPPET H J, et al. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche[J]. *Nature*, 2009, 459(7244):262-265. DOI: 10.1038/nature07935.
- [6] EICHMÜLLER O L, KNOBLICH J A. Human cerebral organoids - a new tool for clinical neurology research[J]. *Nat Rev Neurol*, 2022, 18(11): 661-680. DOI: 10.1038/s41582-022-00723-9.
- [7] WANG S Y, WANG X, TAN Z L, et al. Human ESC-derived expandable hepatic organoids enable therapeutic liver repopulation and pathophysiological modeling of alcoholic liver injury[J]. *Cell Res*, 2019, 29(12): 1009-1026. DOI: 10.1038/s41422-019-0242-8.
- [8] LIM K, DONOVAN A P A, TANG W, et al. Organoid modeling of human fetal lung alveolar development reveals mechanisms of cell fate patterning and neonatal respiratory disease[J]. *Cell Stem Cell*, 2023, 30(1):20-37.e9. DOI:10.1016/j.stem.2022.11.013.
- [9] NISHINAKAMURA R. Advances and challenges toward developing kidney organoids for clinical applications[J]. *Cell Stem Cell*, 2023, 30(8): 1017-1027. DOI: 10.1016/j.stem.2023.07.011.
- [10] CLEVERS H. Modeling development and disease with organoids[J]. *Cell*, 2016, 165(7): 1586-1597. DOI: 10.1016/j.cell.2016.05.082.
- [11] EDMONDSON R, BROGLIE J J, ADCOCK A F, et al. Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors[J]. *Assay Drug Dev Technol*, 2014, 12(4):207-218. DOI:10.1089/adt.2014.573.
- [12] HOFER M, LUTOLF M P. Engineering organoids[J]. *Nat Rev Mater*, 2021, 6(5):402-420. DOI:10.1038/s41578-021-00279-y.
- [13] KIM J, KOO B K, KNOBLICH J A. Human organoids: model systems for human biology and medicine[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2020, 21(10):571-584. DOI:10.1038/s41580-020-0259-3.
- [14] ANDREWS M G, KRIEGSTEIN A R. Challenges of organoid research[J]. *Annu Rev Neurosci*, 2022, 45:23-39. DOI:10.1146/annurev-neuro-111020-090812.
- [15] BREDENOORD A L, CLEVERS H, KNOBLICH J A. Human tissues in a dish: the research and ethical implications of organoid technology[J]. *Science*, 2017, 355(6322): eaa9414. DOI:10.1126/science.aaf9414.
- [16] ZHOU Z Z, PANG Y, JI J Y, et al. Harnessing 3D in vitro systems to model immune responses to solid tumours: a step towards improving and creating personalized immunotherapies[J]. *Nat Rev Immunol*, 2024, 24(1):18-32. DOI: 10.1038/s41577-023-00896-4.
- [17] NEAL J T, LI X N, ZHU J J, et al. Organoid modeling of the tumor immune microenvironment[J]. *Cell*, 2018, 175(7): 1972-1988.e16. DOI:10.1016/j.cell.2018.11.021.
- [18] PUSCHHOF J, PLEGUEZUELOS-MANZANO C, MARTINEZ-SILGADO A, et al. Intestinal organoid cocultures with microbes[J]. *Nat Protoc*, 2021, 16(10):4633-4649. DOI:10.1038/s41596-021-00589-z.
- [19] ZHANG J, TAVAKOLI H, MA L, et al. Immunotherapy discovery on tumor organoid-on-a-chip platforms that recapitulate the tumor microenvironment[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2022, 187:114365. DOI:10.1016/j.addr.2022.114365.
- [20] GABBIN B, MERA VIGLIA V, ANGENENT M L, et al. Heart and kidney organoids maintain organ-specific function in a microfluidic system[J]. *Mater Today Bio*, 2023, 23:100818. DOI: 10.1016/j.mtbio.2023.100818.
- [21] TUVESON D, CLEVERS H. Cancer modeling meets human organoid technology[J]. *Science*, 2019, 364(6444): 952-955. DOI:10.1126/science.aaw6985.
- [22] ATANASOVA V S, DE JESUS CARDONA C, HEJRET V, et al. Mimicking tumor cell heterogeneity of colorectal cancer in a patient-derived organoid-fibroblast model[J]. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 2023, 15(6): 1391-1419. DOI: 10.1016/j.jcmgh.2023.02.014.
- [23] JIANG S W, DENG T W, CHENG H, et al. Macrophage-organoid co-culture model for identifying treatment strategies against macrophage-related gemcitabine resistance[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2023, 42(1): 199. DOI: 10.1186/s13046-023-02756-4.
- [24] SCHUTH S, LE BLANC S, KRIEGER T G, et al. Patient-specific modeling of stroma-mediated chemoresistance of pancreatic cancer using a three-dimensional organoid-fibroblast co-culture system[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2022, 41(1):312. DOI:10.1186/s13046-022-02519-7.
- [25] KIM M B, HWANGBO S, JANG S, et al. Bioengineered co-culture of organoids to recapitulate host-microbe interactions[J]. *Mater Today Bio*, 2022, 16:100345. DOI:10.1016/j.mtbio.2022.100345.
- [26] WILSON S S, TOCCHI A, HOLLY M K, et al. A small intestinal organoid model of non-invasive enteric pathogen-epithelial cell interactions[J]. *Mucosal Immunol*, 2015, 8(2):352-361. DOI: 10.1038/mi.2014.72.
- [27] HAN Y L, DUAN X H, YANG L L, et al. Identification of SARS-CoV-2 inhibitors using lung and colonic organoids[J]. *Nature*, 2021, 589(7841):270-275. DOI:10.1038/s41586-020-2901-9.
- [28] LI M H, GAO L X, ZHAO L, et al. Toward the next generation of vascularized human neural organoids[J]. *Med Res Rev*, 2023, 43(1):31-54. DOI:10.1002/med.21922.
- [29] HUANG S C, ZHANG Z, CAO J W, et al. Chimeric cerebral

- organoids reveal the essentials of neuronal and astrocytic APOE4 for Alzheimer's tau pathology[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2022, 7(1):176. DOI:10.1038/s41392-022-01006-x.
- [30] MORRONE PARFITT G, COCCIA E, GOLDMAN C, et al. Disruption of lysosomal proteolysis in astrocytes facilitates midbrain organoid proteostasis failure in an early-onset Parkinson's disease model[J]. *Nat Commun*, 2024, 15(1):447. DOI:10.1038/s41467-024-44732-2.
- [31] YANG R X, YU Y Y. Patient-derived organoids in translational oncology and drug screening[J]. *Cancer Lett*, 2023, 562: 216180. DOI:10.1016/j.canlet.2023.216180.
- [32] NAKAZAWA Y, MIYANO M, TSUKAMOTO S, et al. Delivery of a BET protein degrader via a CEACAM6-targeted antibody-drug conjugate inhibits tumour growth in pancreatic cancer models[J]. *Nat Commun*, 2024, 15(1):2192. DOI:10.1038/s41467-024-46167-1.
- [33] YU L, LI Z C, MEI H B, et al. Patient-derived organoids of bladder cancer recapitulate antigen expression profiles and serve as a personal evaluation model for CAR-T cells *in vitro* [J]. *Clin Transl Immunology*, 2021, 10(2): e1248. DOI: 10.1002/cti2.1248.
- [34] MU P Y, ZHOU S J, LV T, et al. Newly developed 3D *in vitro* models to study tumor-immune interaction[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2023, 42(1):81. DOI:10.1186/s13046-023-02653-w.
- [35] SONG T Y, KONG B, LIU R, et al. Bioengineering approaches for the pancreatic tumor organoids research and application [J]. *Adv Healthc Mater*, 2024, 13(1): 2300984. DOI: 10.1002/adhm.202300984.
- [36] HARTUNG T. Thoughts on limitations of animal models[J]. *Parkinsonism Relat Disord*, 2008, 14(Suppl 2): S81-S83. DOI: 10.1016/j.parkreldis.2008.04.003.
- [37] DONCHEVA N T, PALASCA O, YARANI R, et al. Human pathways in animal models: possibilities and limitations[J]. *Nucleic Acids Res*, 2021, 49(4): 1859-1871. DOI: 10.1093/nar/gkab012.
- [38] CORSINI N S, KNOBLICH J A. Human organoids: New strategies and methods for analyzing human development and disease[J]. *Cell*, 2022, 185(15): 2756-2769. DOI: 10.1016/j.cell.2022.06.051.
- [39] GRIBBEN C, GALANAKIS V, CALDERWOOD A, et al. Acquisition of epithelial plasticity in human chronic liver disease[J]. *Nature*, 2024, 630(8015): 166-173. DOI: 10.1038/s41586-024-07465-2.
- [40] VITALE S, CALAPÀ F, COLONNA F, et al. Advancements in 3D *in vitro* models for colorectal cancer[J]. *Adv Sci*, 2024, 11(32): e2405084. DOI:10.1002/advs.202405084.
- [41] JOO H, MIN S, CHO S W. Advanced lung organoids for respiratory system and pulmonary disease modeling[J]. *J Tissue Eng*, 2024, 15: 20417314241232502. DOI: 10.1177/20417314241232502.
- [42] PALLOCCA G, ROVIDA C, LEIST M. On the usefulness of animals as a model system (part I): Overview of criteria and focus on robustness[J]. *ALTEX*, 2022, 39(2): 347-353. DOI: 10.14573/altex.2203291.
- [43] ROSSI G, MANFRIN A, LUTOLF M P. Progress and potential in organoid research[J]. *Nat Rev Genet*, 2018, 19(11):671-687. DOI:10.1038/s41576-018-0051-9.
- [44] HUANG D Q, WU Z H, WANG J, et al. Biomimetic liver lobules from multi-compartmental microfluidics[J]. *Adv Sci*, 2024, 11(42): e2406573. DOI:10.1002/advs.202406573.
- [45] TAO T T, DENG P W, WANG Y Q, et al. Microengineered multi-organoid system from hiPSCs to recapitulate human liver-islet axis in normal and type 2 diabetes[J]. *Adv Sci*, 2022, 9(5): e2103495. DOI:10.1002/advs.202103495.
- [46] WANG H, NING X F, ZHAO F, et al. Human organoids-on-chips for biomedical research and applications[J]. *Theranostics*, 2024, 14(2):788-818. DOI:10.7150/thno.90492.
- [47] LIU B D, ZHU Y T, YANG Z Y, et al. Deep learning-based 3D single-cell imaging analysis pipeline enables quantification of cell-cell interaction dynamics in the tumor microenvironment [J]. *Cancer Res*, 2024, 84(4): 517-526. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-23-1100.
- [48] VENINGA V, VOEST E E. Tumor organoids: Opportunities and challenges to guide precision medicine[J]. *Cancer Cell*, 2021, 39(9):1190-1201. DOI:10.1016/j.ccell.2021.07.020.

(收稿日期:2024-11-07 修回日期:2025-02-06)

(本文责任编辑:丁宇菁)

[引用本文]

谭邓旭, 马一凡, 刘可, 等. 重塑细胞间互动: 类器官共培养模型赋能疾病机制与治疗探索[J]. *实验动物与比较医学*, 2025, 45(3): 309-317. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.164.

TAN D X, MA Y F, LIU K, et al. Reshaping intercellular interactions: empowering the exploration of disease mechanisms and therapies using organoid co-culture models[J]. *Lab Anim Comp Med*, 2025, 45(3): 309-317. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.164.



汤 恣, 博士, 上海中医药大学交叉科学研究院青年研究员, 硕士生导师。中国医药生物技术协会3D打印技术分会委员、上海市抗癌协会神经肿瘤专业委员会委员。研究方向聚焦于生物医学工程技术在药物研发与组织工程中的应用, 包括采用生物3D打印、器官芯片、类器官等体外建模技术进行体外器官、疾病模型开发, 采用人工智能辅助3D打印过程优化与药物敏感性预测。主持国家自然科学基金、上海市科委和上海市卫健委项目5项; 发表SCI论文25篇, 其中以第一作者或通信作者身份在 *Cell Research*、*Advanced Materials*、*Molecular Cancer* 等国际期刊上发表12篇论文, 而且牵头开发的3D打印肿瘤免疫微环境模型被 *Nature* 报道认为是肿瘤和发育生物学研究新工具; 参与撰写生物3D打印英文学术专著 *3D Bioprinting and Nanotechnology in Tissue Engineering and Regenerative Medicine* 和组织工程全国统编教材《组织工程》; 申请获批专利6项。

被评为2023年度上海市领军人才(海外)和2023年上海市浦东新区明珠计划“菁英人才”。

生物3D打印研究及与临床前动物模型的交叉应用展望

胡 敏¹, 董乐轩², 高 怡², 奚子芪², 沈子皓², 唐瑞阳², 栾 鑫², 汤 恣², 张卫东^{1,2,3}

(1. 上海理工大学健康科学与工程学院, 上海 200093; 2. 上海中医药大学交叉科学研究院, 上海 201203; 3. 中国人民解放军海军军医大学药学院, 上海 200433)

[摘要] 动物实验在生物医药研究中广泛用于安全性评估、毒理学分析、疗效验证以及机制探索。近年来, 由于动物实验伦理审查制度日趋严格、动物福利意识不断提升, 同时为了推动更高效、低成本的药物研发, 美国在2022年9月通过了食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)现代化法案2.0, 首次取消了新药临床前研究必须进行动物实验的联邦强制要求。2025年4月FDA进一步提出, 将在单克隆抗体等药物研发中采用人工智能计算模型、类器官毒性测试、3D微生理系统等一系列“新的替代方法”, 从而逐步取代传统的动物试验模式。在这些新兴技术中, 生物3D打印模型因其高仿生、高重现性和可规模化等特性, 逐渐成为动物模型的重要替代和补充手段。本综述系统梳理了生物3D打印技术在生物医药领域的研究与应用进展: 首先概述了生物3D打印的关键组成, 包括生物材料的选择与功能化设计、多种打印策略的原理及特点, 分析其在构建多细胞空间结构、微环境调控和细胞命运引导方面的优势; 其次, 介绍了生物3D打印模型在药物研发中的典型应用, 包括通过构建肿瘤、传染病和罕见病等疾病模型实现对药效的高通量筛选, 以及通过构建肝脏、心脏等器官特异性模型进行药物毒理学研究; 再者, 进一步探讨了生物3D打印在组织工程领域的应用范围, 涵盖骨/软骨、皮肤、血管等多种功能性组织的构建, 以及在再生替代等方面的最新进展。此外, 本文还分析了生物3D打印模型与动物模型在疾病发生发展和药物作用机制、精准医疗、药物研发以及组织再生研究等领域的互补优势, 讨论了二者交叉应用在提升建模准确性与生理相关性方面的潜力与挑战。综上, 生物3D打印作为一种新兴的体外造模与制造技术, 正逐步建立起涵盖疾病建模、药物筛选、毒性预测与组织再生的完整应用体系。

[关键词] 生物3D打印; 药物研发; 组织工程; 再生医学; 替代模型

[中图分类号] Q95-33; R-332 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2025)03-0318-13



[基金项目] 上海市进一步加快中医药传承创新发展三年行动计划项目“智慧中药交叉创新团队”[ZY(2021-2023)0401]; 上海市卫生健康委员会科研项目“基于多模态临床数据和生物3D打印的非哺乳期乳腺炎精准治疗研究”(20244Y0130)

[第一作者] 胡 敏(2000—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 生物3D打印。E-mail: 213332692@st.usst.edu.cn。ORCID: 0009-0008-4332-8555;

董乐轩(2004—), 女, 本科生, 研究方向: 生物3D打印。E-mail: 3089290965@qq.com。ORCID: 0009-0006-8863-1529;

高 怡(2004—), 女, 本科生, 研究方向: 生物3D打印。E-mail: a13701656307@163.com。ORCID: 0009-0008-6365-4075

[通信作者] 汤 恣(1992—), 女, 博士, 研究员, 硕士生导师, 研究方向: 生物3D打印在组织工程及肿瘤研究中的应用。E-mail: mit012@shutcm.edu.cn。ORCID: 0000-0002-6084-1827

Prospects for 3D Bioprinting Research and Transdisciplinary Application to Preclinical Animal Models

HU Min¹, DONG Lexuan², GAO Yi², XI Ziqi², SHEN Zihao², TANG Ruiyang², LUAN Xin², TANG Min², ZHANG Weidong^{1,2,3}

(1. School of Health Sciences & Engineering, University of Shanghai for Science & Technology, Shanghai 200093, China; 2. Institute of Interdisciplinary Integrative Medicine Research, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China; 3. School of Pharmacy, Naval Medical University, Shanghai 200433, China)

Correspondence to: TANG Min (ORCID: 0000-0002-6084-1827), E-mail: mit012@shutcm.edu.cn

[ABSTRACT] Animal experiments are widely used in biomedical research for safety assessment, toxicological analysis, efficacy evaluation, and mechanism exploration. In recent years, the ethical review system has become more stringent, and awareness of animal welfare has continuously increased. To promote more efficient and cost-effective drug research and development, the United States passed the Food and Drug Administration (FDA) Modernization Act 2.0 in September 2022, which removed the federal mandate requiring animal testing in preclinical drug research. In April 2025, the FDA further proposed to adopt a series of "new alternative methods" in the research and development of drugs such as monoclonal antibodies, which included artificial intelligence computing models, organoid toxicity tests, and 3D micro-physiological systems, thereby gradually phasing out traditional animal experiment models. Among these cutting-edge technologies, 3D bioprinting models are a significant alternative and complement to animal models, owing to their high biomimetic properties, reproducibility, and scalability. This review provides a comprehensive overview of advancements and applications of 3D bioprinting technology in the fields of biomedical and pharmaceutical research. It starts by detailing the essential elements of 3D bioprinting, including the selection and functional design of biomaterials, along with an explanation of the principles and characteristics of various printing strategies, highlighting the advantages in constructing complex multicellular spatial structures, regulating microenvironments, and guiding cell fate. It then discusses the typical applications of 3D bioprinting in drug research and development, including high-throughput screening of drug efficacy by constructing disease models such as tumors, infectious diseases, and rare diseases, as well as conducting drug toxicology research by building organ-specific models such as those of liver and heart. Additionally, the review examines the role of 3D bioprinting in tissue engineering, discussing its contributions to the construction of functional tissues such as bone, cartilage, skin, and blood vessels, as well as the latest progress in regeneration and replacement. Furthermore, this review analyzes the complementary advantages of 3D bioprinting models and animal models in the research of disease progression, drug mechanisms, precision medicine, drug development, and tissue regeneration, and discusses the potential and challenges of their integration in improving model accuracy and physiological relevance. In conclusion, as a cutting-edge in vitro modeling and manufacturing technology, 3D bioprinting is gradually establishing a comprehensive application system covering disease modeling, drug screening, toxicity prediction, and tissue regeneration.

[Key words] 3D Bioprinting; Drug development; Tissue engineering; Regenerative medicine; Alternative model

动物实验是生物医学研究和药物研发过程中举足轻重的一环，被广泛用于疾病发生发展机制探索以及药物疗效和安全性评估。然而，随着疾病机制研究不断深入、药物研发周期需要缩短、研发成本控制要求提高，以及动物实验伦理福利合规性要求日益严格，动物实验面临的挑战也越来越多。其中，最为根本的

制约因素是实验动物与人类在生物学层面存在的种属差异所导致的低相似性，这使得动物实验结果在向人类临床转化时存在显著的预测偏差，同时也是药物临床试验失败率高的原因之一。此外，随着公众对动物福利的关注度提高，动物实验的伦理合法性也引发争议^[1]。尽管实验动物福利状况的改善能提高研究结果

的可靠性^[2]，但日益严格的伦理审查制度仍让研究者在设计和实施动物实验时付出了更多时间和经济成本。

为了应对动物实验所面临的这些挑战，2022年9月美国参议院通过了食品药品监督管理局（Food and Drug Administration, FDA）现代化法案2.0，允许包括生物3D打印模型在内的其他非临床试验方法纳入药物批准流程。2025年4月，FDA发布新公告，提出将在单克隆抗体等药物研发中逐步取消动物试验，转而采用人工智能计算模型、类器官毒性测试、3D微生理系统等一系列“新的替代方法”以获得更准确、可靠且与临床试验相匹配的能够证明安全性和有效性的数据。其中，生物3D打印模型具有高仿生、高异质性和高通量等特征，不仅能够模拟真实生理环境^[3]，提高实验的准确性和可重复性，还能显著减少动物使用数量，符合伦理要求，因此成为动物实验替代方法中的典例。

相较于其他非临床模型，生物3D打印是用各种细胞和材料快速、有效、高精度地建立人体相似组织和器官，展现出能够准确模拟患者治疗反应的潜力^[3]。生物3D打印技术作为一种前沿的增材制造方法，其核心优势在于精确构建具备特定生物学功能的复杂3D组织结构，因此可用于高度仿生性的疾病建模和药理毒理器官建模，以实现高通量药物筛选和药物毒性评估，且具有对受损人体组织的有效模拟、功能性修复或替代性重构的潜在应用价值。与此同时，动物实验仍然是药物研发中的关键一环，生物3D打印与动物实验的联合应用能够将二者的优势结合，更为全面有效地模拟人体内的复杂生物学过程，从而在疾病机制、精准医疗等方面取得研究突破。本文将系统介绍生物3D打印技术，以及生物3D打印模型在药物研发与组织工程领域的研究进展，并探讨其与动物模型等其他非临床模型的交叉应用及未来前景，以期为生物医药研究和提供发展提供参考。

1 生物3D打印技术

生物3D打印是由计算机辅助设计，通过逐层沉积生物材料与活细胞，建立与人体组织或器官结构和功能相似的非临床模型的技术^[4]。目前，该技术在生物材料创新、打印工艺优化、复杂功能性人体器官生产，以及血管网络和多细胞类型组织构建等多个方面都取得了显著进展^[5]。

3D打印采用生物材料作为非临床模型中细胞生长和分化的支撑结构，对打印组织的结构和功能起重要作用。选择生物打印材料时，需重点考虑其生物相容

性、降解性、力学性能、可打印性和生物活性等因素。打印技术结合计算机辅助设计可确保模型的高精度和高可控性，实现模型尺寸、结构和细胞组成的标准化，降低了个体差异带来的影响^[6]，提升了实验结果的可重复性和可靠性。批量化生产的3D打印模型也有效减少了重复实验的时间成本。因此，生物材料和打印技术不仅是生物3D打印的核心要素，而且指引着该领域的主要发展方向。

1.1 生物材料

根据来源不同，生物材料可划分为天然生物材料与合成生物材料^[7]。天然生物材料如脱细胞外基质（decellularized extracellular matrix, dECM），具有优良的生物相容性和生物活性，在生物3D打印中广泛应用。为提升材料的结构稳定性，还可将dECM与其他材料混合，制备力学性能增强的复合材料。合成生物材料的结构明确性高，性能可控性强，但由于缺乏天然细胞外基质（extracellular matrix, ECM）成分，难以调控细胞的生物化学信号转导，进而影响细胞在材料表面的附着、增殖与分化等行为，因此通常需要对合成材料进行修饰，以优化材料与细胞的相互作用。

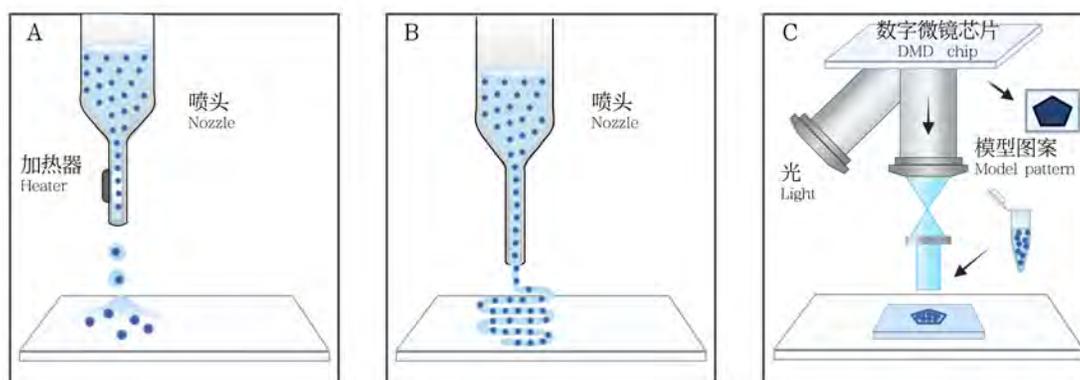
选择合适的生物材料需要考虑多种因素，包括打印技术的适配性、目标组织的特异性、所模拟生物过程的复杂性等。未来还需研发具有可调节性的生物材料，实现在力学性能、化学性质和生物学特性上的精确调控，从而准确复现目标组织的蛋白质组成和天然ECM环境，以构建适用于生物医药研究的体外组织模型。

1.2 主要打印技术

当前主流的生物3D打印技术可分为3类：喷墨式、挤出式和光固化生物3D打印^[8]。这3种打印技术的工作机制如图1所示。

1.2.1 喷墨式生物3D打印

喷墨式生物3D打印技术是传统台式喷墨打印的改良版，通过精确控制液滴的喷射以构建复杂组织结构，包括热泡、压电和电磁等多种打印方式。该技术操作流程简易，成本低，但其发展仍面临诸多挑战，包括材料限制、喷嘴堵塞、打印速度慢，以及高剪切应力造成的细胞损伤等。因此，优化喷嘴设计、墨水配方和打印技术是关键。其中，多材料多喷嘴系统的研发以及液滴控制技术的进步，为打印异质组织结构和高分辨率复杂模型提供了可能。同时，信息技术的深度融合，特别是实时反馈和监控系统的集成应用，显著提升了打印过程的稳定性和精密度。



注：A，喷墨式生物3D打印（局部加热生物墨水，并膨胀一个气泡以推动液滴从喷嘴喷出）；B，挤出式生物3D打印（逐层打印连续的细丝状生物墨水）；C，光固化生物3D打印 [利用数字微镜装置（DMD）芯片，使得紫外光或其他光源模式化投射到生物墨水上]。

Note: A, Inkjet-based 3D bioprinting, in which localized heating of the bioink inflates an air bubble to push droplets out from the nozzle; B, Extrusion-based 3D bioprinting, which prints continuous filaments of bioink layer by layer; C, Light-based 3D bioprinting, which utilizes a digital micro-mirror device (DMD) chip to project patterned UV light or other light sources onto the bioink.

图13种生物3D打印工艺类型的工作机制示意图

Figure 1 Schematic diagram of the working principles of three types of 3D bioprinting processes

1.2.2 挤出式生物3D打印

挤出式生物3D打印技术是利用机械力连续沉积细丝，构建高完整性的3D生物结构。其可以兼容广泛生物材料，并支持高细胞密度封装^[9]；然而，高剪切应力^[10]、喷嘴直径、凝胶动力学及生物墨水特性等因素则影响其分辨率和发展。因此，挤出式打印的研究进展聚焦于降低剪切应力、优化墨水性能和打印条件。

1.2.3 光固化生物3D打印

光固化生物3D打印技术根据制造工艺分为扫描式和投影式两大类型。以数字光处理（digital light processing, DLP）打印技术为例^[9]，通过数字微镜芯片和精密运动控制系统进行快速投影，可以构建毫米级分辨率的生物3D结构。该技术的低剪切应力特性有利于维持细胞活力，高分辨率又适用于构建复杂细胞结构。因此，光固化打印的研究聚焦于提高光固化打印适用性，包括材料拓展、技术融合及多生物墨水共打印。此外，人工智能（artificial intelligence, AI）引入可实时调节打印过程，并增强光固化生物3D打印在组织工程中的应用潜力。

2 生物3D打印模型的药物研发应用

尽管药物的研发投资持续增加，但根据FDA公开发表的新药批准条目，2021—2025年间新药获批数量并未显著上升^[11]。药物研发时间长、过程复杂、成本高昂，涵盖药物发现、临床前验证和临床试验等多个

阶段。当前，药物研发面临的一大挑战是非临床模型预测效力不足。据报道，约40%的新药在通过动物模型的临床前验证后，仍会在临床试验阶段遭遇失败^[12]，说明传统的药物研发方法可能存在一定局限性。此外，临床试验失败往往归因于患者个体间的异质性，这一特质难以通过传统非临床模型有效评估。因此，个性化医疗和相应的药物筛选方法逐渐成为研究热点^[13]。生物3D打印在药理学研究，尤其是药物筛选、药代动力学和药理学分析方面，具有其独特优势，因此在近年来得到快速发展。

生物3D打印模型用于药物研发的优势主要体现在两个方面：一是通过精准调控细胞与细胞、细胞与基质的组合，构建具有高仿生性的疾病模型，为药物筛选和评估提供精确平台；二是利用生物3D打印技术构建具有特定功能的器官模型，以评估药物的治疗效果及潜在毒性。

2.1 疾病模型

2.1.1 肿瘤模型

在生物3D打印肿瘤模型中，共打印内皮细胞与肿瘤细胞，以研究肿瘤侵袭、迁移和血管新生过程。成纤维细胞作为肿瘤微环境中的关键基质细胞，则常被用于研究ECM重塑。此外，免疫细胞的引入对于提高模型完整性、生理活性和临床相关性同样至关重要。

Tung等^[14]基于生物3D打印技术，构建了整合神经血管单元（neurovascular unit, NVU）的患者源性胶

质母细胞瘤 (glioblastoma, GBM) 模型, 包括微血管内皮细胞。该模型与3D单一培养物和2D单一培养物的转录组学数据的比较结果显示, 整合NVU的3D-GBM模型的糖酵解、细胞因子信号、血管生成相关基因表达上调, 表明该模型具有高度的临床相似性。药物筛选结果表明, 测试的多数化合物表现出更有效地破坏肿瘤血管系统的作用, 而非直接抑制肿瘤细胞增殖, 提示此类药物的临床效果可能主要通过阻断肿瘤血液供应来实现。

Desigaux等^[15]共打印内皮细胞、肿瘤相关成纤维细胞 (tumor-associated fibroblast, CAF) 和肿瘤细胞, 以深入研究CAF在肿瘤发生发展进程中的生物学功能。发现CAF不仅参与微血管调节, 同时对ECM的重塑也具有显著性影响。模型中富含CAF的基质区域显示出更高的杨氏模量 (又称拉伸模量), 平均测量值分别为71 kPa和27 kPa。

Tang等^[16]将巨噬细胞整合到由患者来源的GBM干细胞、星形胶质细胞和神经干细胞构成的生物3D打印GBM模型中, 观察到巨噬细胞的加入导致模型表现出恶性程度更高的间充质亚型GBM特征, 且巨噬细胞优先向M2表型极化; 这一现象与GBM中巨噬细胞的极化特征吻合。他们先前的研究表明, 高硬度的生物3D打印GBM模型在分子水平上表现出间充质亚型GBM的特征, 并对标准嵌合抗原受体 (chimeric antigen receptor, CAR)-T细胞疗法表现出耐药性; 这与在实体瘤中观察到的现象相似^[17]。在此基础上, 该团队研究发现, ECM硬度增加可显著抑制CAR-T细胞渗透和肿瘤细胞杀伤功能, 由此开发了一种创新的热诱导型CAR-T细胞疗法, 以应对高硬度ECM带来的GBM治疗挑战。随后, 该团队还进一步将CAR-T细胞整合到具有不同硬度的生物3D打印胶质瘤模型中, 以探究生物物理因素对CAR-T细胞治疗的影响^[18]。这些结果共同说明, 除了表征肿瘤细胞的免疫反应之外, 免疫细胞的引入对于用生物3D打印模型研究生物治疗或抗肿瘤药物的免疫耐受机制至关重要。

2.1.2 传染病模型

在传染病研究领域, 体外组织模型的应用尚处于起步阶段, 但生物3D打印技术已经展现出不容忽视的研究价值与应用潜力。该技术能够构建与外来物质接触的复杂组织模型, 包括皮肤、角膜和脉管模型。这些模型在微观结构和生理功能层面均显示出与天然组织的高度相似性, 在评估病原体直接感染、组织屏障

功能以及治疗效果测试方面具有重要作用。此外, 生物3D打印技术可灌注血管网络, 为研究感染细胞或病原体穿过组织屏障后在体内传播的机制提供了实验平台, 并能够模拟感染诱导的细胞因子变化过程, 以探究这一过程对循环系统的潜在影响。

Johnson等^[19]应用生物3D打印技术开发了一种神经系统芯片, 旨在研究神经系统中的病毒感染过程。该芯片上有3个腔室: (1) 包含海马神经元的中枢神经系统腔室; (2) 包含颈上神经节神经元的周围神经系统 (peripheral nervous system, PNS) 腔室; (3) 包含神经膜细胞和上皮细胞的周围神经成分腔室。为了解神经系统中的病毒感染和转运过程, 以开发各种神经系统疾病治疗方案, 研究人员使用伪狂犬病毒作为病毒检测实验对象。该病毒被改造为在发生单一病毒颗粒感染时表达原色, 在多于一个病毒颗粒感染时颜色发生改变。研究发现, 伪狂犬病毒在PNS室的轴突网络中运输, 从而感染腔室中的外周神经元细胞。而病毒颗粒在向其他区域的传播中受到了限制, 神经膜细胞和海马神经元中仅表现出单一原色, 而非预期中的多色表达。这表明尽管PNS腔室中神经元的直接感染确实导致了病毒颗粒传播到海马神经元和神经膜细胞, 但可能还存在限制细胞被多个或多次病毒感染的细胞因子。除了有助于研究神经系统中病毒感染机制和屏障外, 该神经系统芯片还为病毒学、分子生物学和神经科学分析提供了一个灵活的生理平台, 适用于分析局部扰动 (如药物、病原体、电/机械能等) 在神经系统层面的影响。

2.1.3 罕见病模型

在罕见病研究中, 鉴于其发病率低和治愈难度高, 开发精准疾病模型以解析发病机制显得尤为关键。生物3D打印模型在罕见病模型构建上具有独特优势, 能够通过整合多能干细胞、生长因子和3D培养环境实现对培养干细胞的有效分化。

Banerjee等^[20]首次应用抽吸辅助自由形态生物打印技术, 成功创建了人类戈谢病 (Gaucher disease, 一种罕见的常染色体隐性遗传病, 临床表现神经功能障碍、骨坏死和畸形、肝脾大和脾功能亢进等) 3D离体模型。这种技术不同于主流的喷墨式、挤出式和光固化生物3D打印, 是通过抽吸作用, 实现对生物墨水的挤出量和速度的精确控制及精准释放, 在进行无支架打印或需要精准定位时更具有优势。该研究将人骨髓间充质干细胞和不同严重程度戈谢病患者的外周血

单核细胞共培养, 形成球状体, 借助抽吸辅助自由形态生物打印技术, 精准吸取单个球体, 依次放置在应力凝胶中, 实现球体的相互靠近和自组装。这一过程不仅模拟了骨骼发育进展, 还实现了打印后的组织构建。这种3D打印戈谢病模型具备适应个性化医疗的潜力, 不仅有助于研究戈谢病的病理生理机制, 还适用于个性化药物筛选和开发。此外, 尽管生物3D打印技术用于退行性神经疾病建模时受到一定限制(神经细胞的高敏感性和脆弱性会导致生物墨水制作困难, 逐层打印过程中结构容易塌陷), 但在脊髓或脑样结构模型构建时展现出一定潜力。已有研究采用生物3D打印技术制备了一种水凝胶载体^[21], 以探究肌萎缩性侧索硬化症(amyotrophic lateral sclerosis, 一种以大脑皮质锥体细胞、脑干运动神经核和脊髓前角细胞同时受累为特征的运动神经元病, 俗称渐冻症)患者来源的干细胞分化过程以及电生理特征。这种用患者来源细胞制成的3D打印结构可能是用于研究肌萎缩性侧索硬化症的潜在模型。

2.2 药物毒性评估模型

2.2.1 肝脏模型

肝毒性的低预测性是导致药物在临床试验过程中失效的原因之一。例如, 2型糖尿病治疗药物Fasigliam (TAK-875) 因具有药物诱导性肝损伤(drug-induced liver injury, DILI)^[22] 而未能成功上市。但在临床前动物实验、早期人体临床试验与Ⅲ期临床试验的对比结果中, DILI的检测并不总是呈现一致性。这不仅增加了临床试验受试者潜在的肝毒性风险, 也大幅增加了药物开发流程中的经济与时间成本。因此, 开发以个性化细胞类型为基础的高效的体外肝脏模型, 已被视为一种具有潜力的解决策略。

近年来, 生物3D打印肝脏模型已经取得了重大进展。据Ali等^[23] 的调查报告, 生物打印肝脏模型在药物毒性实验中的应用占比高达41%, 这与肝脏具有的外源代谢和解毒功能, 以及药物研发对肝毒性预测的需求一致。例如, 基于原代人肝细胞、肝星状细胞和人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs) 构建的生物3D打印人肝脏模型, 用曲伐沙星(一种无法通过细胞模型评估肝毒性的药物) 处理标准2D培养物和3D打印物, 毒性检测结果表明: 即使在亚微摩尔剂量下, 3D打印物经曲伐沙星干预后对白蛋白表达的抑制作用也大于50%; 相比之下, 暴露于相同治疗条件和时间进程的标准2D培养仅在测试

的最高剂量下显示出曲伐沙星毒性, 说明3D打印肝组织在预测临床肝毒性方面具有显著优势^[24]。后续研究在肝细胞类型及打印结构上进行多样性优化, 将肝细胞来源从原代肝细胞拓展至人类诱导多能干细胞和脂肪间充质干细胞, 并设计了一个肝小叶状的三维结构, 通过在不同的水平和垂直方向上交替打印, 可促进肝细胞和肝星状细胞、HUVECs之间的旁分泌信号传导^[25-26]。2024年, Dey等^[27] 首次开发出血管化生物3D打印肝腺泡模型, 该模型采用猪dECM作为生物打印材料, 结合微流控系统, 维持细胞长期活性和功能。在静态模型和微流控模型中研究非肝毒性、肝毒性和特异性药物, 通过测定3种药物治疗后肝细胞的总DNA浓度、乳酸脱氢酶活性和细胞色素P450还原酶活性反应, 评估两种模型的差异性和生理相关性。结果显示, 微流控模型在特异性和肝毒性药物的肝毒性反应方面表现出更高的敏感性, 24 h和72 h时的半数有效浓度(median effective concentration, EC₅₀) 和细胞内乳酸脱氢酶活性均显著低于静态模型, 从而证实了人体对于不同药物的特异性反应。

2.2.2 心脏模型

药物性心脏毒性可导致心肌坏死、心肌梗死、严重致死性心律失常等心血管并发症, 从而终止药物研发进程或使已上市药物退出市场。例如, 抗组胺药特非那定通过阻断心脏钾离子通道, 导致心肌细胞动作电位时程延长, 进而显著延长QT间期(即心室除极化和复极化的时程), 增加了致死性心律失常的发生风险^[28]。鉴于药物性心脏毒性造成的严重后果, 开发具有高预测性的非临床检测模型显得尤为迫切。然而, 心脏组织具有复杂的生理功能和结构特性, 尤其是心肌细胞的成熟状态及空间有序排列对模型构建带来了巨大挑战^[29]。生物3D打印技术可为药物性心脏毒性的评估提供一种创新性的建模策略与技术解决方案。

原代人类心肌细胞在体外培养条件下增殖能力受限, 同时心肌细胞的获取又高度依赖于心脏组织活检, 这进一步限制所获得的原代心肌细胞量。因此, 为了满足构建生物3D打印心脏模型的需求, 通过诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs) 定向分化获得的心肌细胞成为生物3D打印心脏模型的主要来源。Arai等^[30] 采用人iPSCs来源的心肌细胞进行生物3D打印, 成功构建了无支架的3D心脏模型, 并通过建立能够模拟人类心脏收缩功能的分析系统, 评估药物治疗对心脏结构的潜在毒性影响。此外, 以支架为

基础的生物3D打印心脏模型在药物毒性评估研究中也极为常见。Iwanaga等^[31]采用明胶和海藻酸盐的复合物作为打印材料,制备了脱细胞支架,然后在支架上种植心肌细胞,形成了具有动态搏动能力的预组织结构;在肾上腺素负荷试验中,预组织结构搏动率的显著提升验证了心肌细胞对药物的反应性以及该3D打印心肌组织的成熟度。

为满足心脏离体模型构建对心肌组织工程化制造和实时监测集成的双重需求,生物3D打印技术和器官芯片技术的结合已成为一种解决方案。Liu等^[32]提出了一种创新性技术路线,将生物3D打印技术和静电纺丝技术有机结合,用于制造体外3D工程化心脏组织,并将其集成至微流控芯片中,构建出用于药物研究的心脏芯片内模型。该方法通过生物3D打印技术制备微米级支架框架,随后采用静电纺丝在支架表面涂覆纳米纤维网络,模拟ECM微环境,指导心肌细胞排列,促进信号传递和收缩。使用心脏毒性化疗药物多柔比星(doxorubicin, DOX)和心脏毒性保护剂得拉唑沙(dexrazoxane, DEX)对该模型进行药物性心脏毒性评估,结果表明:芯片中单DOX组的心肌细胞搏动频率在前5 h逐渐增加,6 h后随着药物暴露时间的延长而降低,但仍然显著高于2D对照组,这可能是因为3D微环境中心肌细胞更为成熟;而加入DEX 5 h后,芯片组和2D对照组的心肌细胞搏动频率略有增加;定量分析结果显示,在添加DEX的实验组中,无论是否联合使用DOX,肌动蛋白的覆盖面积均显著高于DEX未添加组。这些结果提示,DEX和DOX具有临床相关性,该心脏芯片为药物开发过程中的心脏毒性评估提供了潜在平台。

3 生物3D打印模型的组织工程应用

在组织工程研究中,生物3D打印技术以构建具有生物学功能的3D组织结构为目标,致力于实现对受损人体组织的有效模拟、功能性修复或替代性重构,其应用范围涉及骨骼、皮肤、血管等组织。尽管3D生物打印在组织工程领域中已经取得一定进展,但该技术的打印分辨率不足、细胞长期存活率受限,以及在组织功能维持、血管化以及神经整合等方面的挑战仍然是限制其进一步发展的关键因素。

3.1 生物3D打印骨/软骨

在骨治疗领域,生物3D打印技术主要采用两种策略实现骨修复与重建。一是采用高性能材料制造生物

3D打印植入物,这些植入物作为骨缺损部位的替代品,提供长期结构支持,以促进机体正常生理功能恢复^[33]。二是借助可降解材料,通过生物3D打印构建骨支架,这些支架能促进自然骨再生,并随着骨再生过程逐步降解,最终完全被健康骨组织替代^[34]。Yan等^[35]使用聚己内酯制造了一种可降解支架,能够控制释放去铁胺,促进血管生成和骨再生,适用于节段性骨缺损的治疗。尽管生物3D打印骨支架在临床上已取得一定成果,但如何进一步提高支架的力学机械性能、模拟天然骨骼的多层次结构特征,以及增强自我修复能力,仍然是当前骨组织工程领域的研究重点。

生物3D打印技术同样适用于替换受伤或退行性变化的软骨组织。材料的合理选择是决定打印软骨组织功能与修复效果的关键。其中,水凝胶是软骨打印中极具前景的材料之一,其有高度的溶胀性和多孔性,利于营养物质的传输和多类型细胞的包裹,因此得到了广泛应用。水凝胶还具有可调节性,能够优化组织修复效果。此外,负载细胞的水凝胶可提供发育信号或模拟天然软骨的微环境信号,从而维持软骨形成表型,并促进基质形成^[36]。

3.2 生物3D打印皮肤

皮肤作为人体最大的器官,约占成年人总体重的16%,具备保护、感知等多种功能。生物墨水的选择是生物3D打印皮肤模型的关键一环。甲基丙烯酰化明胶(gelatin methacryloyl, GelMA)作为当前使用最为广泛的生物墨水^[37],在经天然聚合物的添加混合后,力学性能进一步增强,可适应皮肤组织工程的应用需求。Shi等^[38]报道了一种由GelMA、胶原蛋白和酪氨酸酶制成的新型生物墨水,使用其进行皮肤治疗时,伤口愈合速度加快。Jin等^[39]开发了一种可模拟自然全层皮肤三层结构的生物3D打印模型,由GelMA和人类表皮角质构成的表皮层、成纤维细胞和人类脱细胞真皮基质构成的真皮层、由HUVECs和GelMA构成的血管网络和框架复合而成。该离体皮肤模型为细胞生长和仿生构建提供了最佳微环境。尽管生物3D打印在皮肤组织工程中展现出巨大潜力,能够克服传统治疗方法的不足,但仍面临着诸多挑战,例如需要提高打印分辨率和改善生物材料性能。

3.3 生物3D打印血管

目前,心血管疾病治疗主要依赖于支架介入和心脏搭桥手术。自体血管移植因供体有限且采集过程存在感染或二次伤害的风险,难以满足临床需求。同种

异体血管和异种血管移植则面临免疫排斥反应的技术瓶颈。因此,开发人工血管模型至关重要,而组织工程的发展使得构建新型人工血管模型成为了研究热点。生物3D打印技术作为组织工程领域的新兴技术,在调控血管支架微观结构如孔径大小、几何形态及互连性等方面具有显著优势。

然而,由于准备时间长和细胞消耗量大,以细胞和单一成分的材料作为生物墨水的生物3D打印血管模型仍存在细胞存活率过低等问题。因此,复合型材料成为优化此类模型性能的重要选择。Gold等^[40]构建了一种由GelMA、纳米硅酸盐和血管平滑肌细胞组成的人工血管模型,并在血管结构内层接种了内皮细胞;实验结果显示,这两种细胞均在人工血管模型中表现出较高的存活率。Wu等^[41]将纳米蒙脱石粉末混合明胶和海藻酸钠制成了一种新的生物墨水,该生物墨水打印的支架具有较大的断裂伸长率,接近天然乳腺组织中的动脉,还具备良好的抗蠕变性能和热稳定性;溶血试验和体外细胞培养结果表明,此血管支架的溶血率仅为3.75%,符合医学标准,且细胞毒性弱,生物相容性好。以上研究结果可为人工血管的临床转化提供有益参考。

4 生物3D打印模型与动物模型的交叉应用

将生物3D打印模型与传统非临床模型如动物模型交叉应用,能够更有效地模拟人体内的复杂生物学过程,可望在疾病机制、精准医疗、药物研发和组织再生等方面取得研究突破。

4.1 机制研究

生物3D打印模型与动物模型在机制研究中的互补性主要体现在两个方面。一方面,3D打印模型在模拟疾病微环境方面的精细度,与动物模型具有的整体化和复杂性特征相结合,可为研究者提供一个更为全面的疾病进展研究平台。另一方面,3D打印模型提供的细胞水平和微环境相关数据,与动物模型提供的生理和免疫数据相互补充,有助于揭示疾病发生发展的深层次机制。例如López-Carrasco等^[42]通过比较不同力学刚度的神经母细胞瘤体外3D打印模型,证实了在高刚度和长培养时间的3D打印模型中,肿瘤细胞表现出显著的部分染色体畸变负选择,揭示了适应性压力下染色体异常和克隆选择的机制;而且动物实验发现肿瘤连续传递中基因组变化的结果,在高刚度水凝胶培养的细胞模型中得到了验证,显示出与玻连蛋白基因敲

除小鼠模型中相似的9号染色体异常,二者结合可共同证实与刚度相关的基因型变化。

近年来,药物研发人员也正在尝试整合两种模型的优势,如利用3D打印技术构建肿瘤类器官模型开展动物药效学实验。Ren等^[43]在NSG小鼠(一种免疫缺陷程度最高的工具小鼠)的肝脏中植入表达荧光素酶的胆道癌类器官,建立原位人肿瘤异种移植模型,并验证类器官筛选出的药物效果。结果表明,胆道癌类器官模型对药物的反应及基于类器官的异种移植小鼠的治疗效果,与患者临床治疗反应具有高度一致性,如患者ICC65T的类器官对5-氟尿嘧啶敏感性较高,因此在后续的治疗中选用5-氟尿嘧啶的前体物卡培他滨作为治疗药物,而为期4至26个月的随访结果显示该患者无复发现象。该策略有效优化了药物在模拟生理环境中的评估体系,显著降低了药物研发失败率,为揭示肿瘤复杂病理过程和开发新型治疗方法提供了重要技术支撑。未来,非临床模型的协同优化将成为疾病机制研究和药物研发的重要方向,推动个性化医学的持续发展。

4.2 精准医疗

精准医疗是肿瘤治疗中的关键策略,可依据患者的个体特性、遗传信息、临床表型等构建个性化的最佳医疗方案,是未来医学发展的重要方向之一。生物3D打印模型和患者来源的肿瘤异种移植(patient-derived tumor xenograft, PDX)模型(一种通过将患者肿瘤组织移植到免疫缺陷动物体内构建的临床前研究模型)均是精准医疗的重要组成部分,但适用范围有所不同。生物3D打印模型能对直接靶向肿瘤及其微环境的药物进行快速评估,而PDX动物模型则更适用于需要经过体内代谢和涉及多器官相互作用的药物类型。

利用生物3D打印技术可对化疗、靶向治疗、免疫疗法等多种药物类型及其组合进行评估,通过精准控制药物的释放,为每位患者提供定制化的药物筛选平台,从而有效降低药物不良反应发生率,以及规避无效治疗。而在此基础上进行的细胞迁移、侵袭特性和分子机制特征的研究,则为深入理解肿瘤的发生、发展和转移提供了支持^[44]。Zhao等^[45]使用患者来源的细胞构建肺癌3D打印模型,并与2D单层细胞模型对比,发现3D打印模型对靶向药物表现出更高的敏感性,且药效反应结果具有更高的动物实验一致性。Al Shihabi等^[46]收集了126例肉瘤患者的194个样本(涵

盖了24种不同的肉瘤亚型),使用患者衍生的生物3D打印肿瘤类器官建立了一个高通量类器官筛选流程,通过该流程测试单一药物和组合治疗个体患者的药物敏感性和耐药性,为患者定制治疗方案;实验结果显示,59%的样本至少识别出一种FDA批准或美国国家综合癌症网络(National Comprehensive Cancer Network, NCCN)推荐的有效治疗方案,80.4%的样本至少对一种测试药物表现出显著反应。此外, Sun等^[47]利用生物3D打印技术构建的结直肠癌及其肝转移的患者衍生肿瘤模型,可以预测个体化疗反应;该模型能够维持原始肿瘤的生物标志物和突变谱,并保持了肿瘤异质性,从而与化疗的临床结果表现出强相关性。上述结果表明,生物3D打印模型在辅助临床个性化抗癌药物筛选方面极有应用潜力。

PDX动物模型在组织病理学、分子生物学、分子遗传学、结构复杂性、肿瘤异质性和微环境特征上保留了大部分原代肿瘤的特点^[48],因此具有较好的临床预测效果。Li等^[49]使用4名患者的肿瘤样本构建PDX

动物模型(前3例患者的长链非编码RNA LYPLAL1-DT的表达水平显著高于第4例患者);研究结果显示,LYPLAL1-DT高表达的PDX模型中,维奈托克(Venetoclax)和羟氯喹(hydroxychloroquine)显著增强了顺铂、依托泊苷或紫杉醇诱导的肿瘤细胞死亡,部分模型甚至出现肿瘤细胞消失现象。该研究结果不仅表明PDX模型在指导患者个性化用药方面具有重要价值,同时也验证了药物联合疗法的显著治疗效果,并确定了该疗法的临床适用范围。PDX模型的药物适用范围更全面,其完整的消化吸收系统使其对评估多肽类药物、口服药物和部分中药等需要代谢的药物更为适宜。用于精准医疗的常见模型对比详见表1。

近年来, AI模型也逐渐成为精准医疗的关键工具。如采用AI驱动的多组学分析技术构建的非临床模型可为晚期恶性肿瘤患者匹配临床试验^[50],接受治疗后患者的客观缓解率为29.2%,比未接受AI匹配治疗的患者总生存期延长。AI算法还能够分析患者个体的基因组数据,预测特定药物的反应,从而指导临床用药方案。

表1 精准医疗常见模型对比

Table 1 Comparison of common models in precision medicine

模型类型 Model types	2D 细胞模型 2D cell model	生物3D打印模型 3D bioprinting model	PDX 动物模型 Patient-derived xenograft animal model
实验周期 Experimental cycle	1周内	7 d	3~6个月
成本 Cost	1 000~2 000元/例	数万元/批	数十万元/批
建模成功率 Modeling success rate	高(>90%) ^[51]	高(>80%) ^[52]	低(>60%) ^[53]
临床相关性 Clinical relevance	有限	高	高
遗传信息保真度 Genetic information fidelity	有限	高	高
可重复性 Reproducibility	高	高	低
细胞种类 Cell types	有限	多样化,含有多种细胞	多样化,但受鼠源细胞影响
系统完整性 System integrity	低,仅细胞层面	中等,组织/器官层面,尚缺乏动态循环和整体性调控	高,具有完整生理环境
材料可控性 Material controllability	无	高	低
通量 Throughput	高	高	低

4.3 药物研发

在药物发现与开发流程中,体外高通量筛选至关重要。当前的高通量筛选主要是基于2D细胞培养模型,生物3D打印模型在此基础上提升了筛选的临床相关性,同时满足了筛选阶段对速度和可重复性的要求,进一步提高了药物筛选结果的验证准确性并节约了研发资源。

生物3D打印技术已经成功应用于高通量筛选,特别是在单器官的构建和筛选以及和其他技术联用方面

表现突出。Herpers等^[54]建立的结直肠癌类器官样本库,可对超过500种靶向Wnt和受体酪氨酸激酶(receptor tyrosine kinase, RTK)信号转导通路的双特异性抗体进行高通量成像筛选,发现MCLA-158(一种LGR5×EGFR双特异性抗体)可以特异性降解LGR5⁺肿瘤干细胞表面的表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR),从而杀伤肿瘤,而对正常的结肠类器官毒性很小,并在几种上皮癌类型的非临床模型中表现出治疗效果。次年,

MCLA-158 就获得了美国 FDA 的新药临床试验批准。Tebon 等^[3] 通过生物 3D 打印技术进行自动化细胞接种, 并结合高速活细胞干涉测量法 (high-speed living cell interferometry, HSLCI), 实现无创、无标记、时间分辨成像, 从而达到对多个类器官实施连续动态质量监控的目的, 最终实现对单个类器官中的药物反应量化。HSLCI 与 AI 结合后, 可进一步将类器官检测量提升至数千量级, 且患者衍生类器官可在手术 1 周内给出筛选结果, 从而指导临床用药。另外, 生物 3D 打印技术和微流体系统结合后, 能同时对 4 个芯片展开研究^[55]; 相较于传统的单次仅能研究一种药物的芯片, 增加了高通量的特性。

4.4 组织再生研究

在组织再生领域, 器官移植供体不足、免疫排斥反应难以规避以及医学伦理争议等问题长期制约着临床实践与学科发展。生物 3D 打印技术的发展为这些问题提供了新的解决策略。该技术通过模拟机体的创伤愈合和发育过程, 植入高活性生物材料负载的类器官, 调控损伤局部的微环境, 诱导内源性干细胞向缺损部位快速募集并激活其定向分化, 从而实现组织的再生与修复。

具体而言, 生物 3D 打印技术在组织再生中的应用, 主要是定向诱导干细胞分化, 并在 3D 微环境中培养类器官。这些类器官能够在体内部分行使衰竭器官的功能, 为器官移植提供了创新性替代治疗方案, 有效缓解了器官供体不足的问题。同时, 在材料学领域, 有关重组 ECM 的研究可能有助于逐步解决免疫排斥问题。利用患者来源的干细胞进行生物 3D 打印培养类器官用于自体移植, 可在提供健康的个体类器官的基础上, 保持遗传信息的稳定性, 而且避免了传统器官移植中的伦理争议。例如, Hong 等^[56] 利用 3D 打印技术制备了具有肝小叶样结构的微组织球体模型, 不仅可维持结构完整, 其中肝功能关键酶的表达水平高, 在移植后显示出良好的细胞存活率, 而且在 Matrigel 植入实验中产生了功能性血管, 免疫组化染色样本中 α -平滑肌肌动蛋白 (α -smooth muscle actin, α -SMA) 和 CD31 染色显示结构化微组织球体内部的细胞密度更高, 有血管生长的迹象, 提示该模型对于肝器官修复或代替表现出巨大潜力。

生物 3D 打印作为一种非动物性替代实验方法与动物模型的联合应用, 是组织再生治疗领域研究中不可或缺的一环。例如, Lopez 等^[57] 通过动物实验评估了

一种 3D 打印的真皮代替物, 结果显示该代替物的植入率为 91.8%, 组织学评分为 $75\% \pm 8\%$, 结构均匀, 可以作为自体分割厚度皮肤移植的代替物, 且能够避免自体移植全身麻醉和供体部位疤痕等缺点。目前, 3D 打印模型和动物实验在心脏血管^[58]、肝脏^[59]、气管^[60]、肌肉^[61]、椎间盘^[62]、肠道^[63]、毛囊^[64]等多种器官组织的再生和修复上均有联合应用, 特别是当行为学作为重要观察指标时, 动物模型能够模拟体内复杂生理环境与生物力学条件, 其提供的临床前数据是其他体外模型无法替代的。

综上所述, 生物 3D 打印技术不仅在药物研发领域得到广泛认可, 而且在再生医学领域其应用将成为未来研究的重点; 而动物实验将在生物 3D 打印技术向临床转化的过程中持续发挥重要作用。技术的交叉融合不仅为重大损伤和疾病的治疗提供了新方案, 同时为医学伦理和可持续发展提供了新视角。

5 总结与展望

生物 3D 打印技术为医药研究领域带来了巨大变革, 该技术在药物研发、组织工程等领域已取得一定进展, 体现了其模拟复杂生物系统的潜力。然而, 科研人员不能止步于此, 还需要积极探索跨学科合作的新领域。其中, 生物 3D 打印技术与 AI 的融合, 以及它与其他非临床模型尤其是动物模型之间的结合, 将成为当下研究的热点方向。

当前, AI 技术已经被证实在动物模型的创建和分析中具有关键作用。该技术可通过预测药物反应和疾病进程来减少临床前试验研究对实验动物的依赖, 并且提高研究的准确性和效率。生物 3D 打印技术作为新型非动物实验方法已获认可, 其与 AI 技术的结合应用已成为必然趋势。Ng 等^[65] 全面阐述了 AI 技术在生物 3D 打印中的多种作用, 包括微调打印参数以提高打印质量, 运用神经网络算法优化打印参数, 以及开发实时监测和纠错机制, 从而减少材料试错成本和时间成本。AI 技术的应用还能加速新型生物墨水的研发, 并借助高通量药物筛选提高预测能力, 从而在动物实验前剔除无效药物。同时, 结合患者特异性数据的 AI 技术, 能够优化生物打印组织的构建, 实现个性化和精准治疗。当然, 生物 3D 打印模型与 AI 技术的结合在目前仍面临诸多挑战。例如, 需要大量高质量的数据来提供可靠依据, 因此数据的来源和系统收集成为二者交叉应用研究面临的瓶颈之一。究其原因, 数据集质

量与AI模型的泛化能力和准确性密切相关,这使得高质量的训练数据集成为AI发挥预测能力的基石。因此,如何进行有效数据筛选和标准化是生物3D打印与AI技术的交叉应用需要攻克的关键难题。

与此同时,生物3D打印模型与其他非临床模型的应用形成了互补的紧密网络。例如,生物3D打印模型具有高度仿生、可精确模拟、便于研究细胞及分子水平的优势,但缺乏整体化和疾病动态发展的环境;而动物模型因具有完整的生物系统,在模拟疾病整体性和复杂性方面具有独特优势,但存在精细控制难度较大和伦理争议等问题。因此,二者的交叉应用即可拓宽研究维度,有助于揭示疾病机制和个体差异性。目前,这一交叉应用模式已在多种疾病机制、毒理研究、组织工程、药物研发、精准医疗等领域得到拓展。生物3D打印技术与动物模型的结合同样适用于药效测试,如在开展动物实验前可先使用生物3D打印模型排除无效药物,从而优化动物实验的前期流程。

此外,生物3D打印还可与其他非临床模型结合,例如在生物3D打印模型中引入微流控系统以实现长期培养,这是研究人员应对生物3D打印模型在模拟动态、复杂生物系统挑战方面的尝试。尽管这些技术的结合目前仍处于起步阶段,但已为生物医学研究提供了新的视角和方法。因此,从长远发展趋势来看,生物3D打印模型与其他非临床模型的交叉应用将持续推动医药事业的发展,有望在疾病机制解析、创新药物开发及个性化医疗实践等领域成为推动医药事业创新发展的核心驱动力。

[作者贡献 Author Contribution]

胡敏负责“生物3D打印技术介绍”“医药研发应用”“总结与展望”部分的写作,参与全文修改;

董乐轩负责“生物3D打印模型与动物模型的交叉应用”部分的写作,参与全文修改;

高怡负责文献搜集,参与“总结与展望”部分的写作以及全文修改;

奚子芪负责“生物3D打印模型的组织工程应用”部分的写作及修改;

沈子皓和唐瑞阳参与“引言”和“总结与展望”部分的写作;

栾鑫参与文章审阅和修改审校;

汤恣负责写作方案策划,以及全文修改和定稿;

张卫东参与文章选题构思和修改审校。

[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] AKHTAR A. The flaws and human harms of animal experimentation[J]. *Camb Q Healthc Ethics*, 2015, 24(4):407-419. DOI:10.1017/S0963180115000079.
- [2] BALCOMBE J P. Laboratory environments and rodents' behavioural needs: a review[J]. *Lab Anim*, 2006, 40(3):217-235. DOI:10.1258/002367706777611488.
- [3] TEBON P J, WANG B W, MARKOWITZ A L, et al. Drug screening at single-organoid resolution via bioprinting and interferometry[J]. *Nat Commun*, 2023, 14(1):3168. DOI:10.1038/s41467-023-38832-8.
- [4] LEVATO R, DUDARYEVA O, GARCIA MENDEZ-MIJARES C E, et al. Light-based vat-polymerization bioprinting[J]. *Nat Rev Meth Primers*, 2023, 3:47. DOI:10.1038/s43586-023-00231-0.
- [5] KANG H W, LEE S J, KO I K, et al. A 3D bioprinting system to produce human-scale tissue constructs with structural integrity[J]. *Nat Biotechnol*, 2016, 34(3):312-319. DOI:10.1038/nbt.3413.
- [6] JI S, GUVENDIREN M. Recent advances in bioink design for 3D bioprinting of tissues and organs[J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2017, 5:23. DOI:10.3389/fbioe.2017.00023.
- [7] WANG T, HAN Y, WU Z J, et al. Tissue-specific hydrogels for three-dimensional printing and potential application in peripheral nerve regeneration[J]. *Tissue Eng Part A*, 2022, 28(3-4):161-174. DOI:10.1089/ten.TEA.2021.0093.
- [8] XIANG Y, MILLER K, GUAN J A, et al. 3D bioprinting of complex tissues *in vitro*: state-of-the-art and future perspectives[J]. *Arch Toxicol*, 2022, 96(3):691-710. DOI:10.1007/s00204-021-03212-y.
- [9] TANG M, RICH J N, CHEN S C. Biomaterials and 3D bioprinting strategies to model glioblastoma and the blood-brain barrier[J]. *Adv Mater*, 2021, 33(5): e2004776. DOI:10.1002/adma.202004776.
- [10] ZHOU L Y, FU J Z, HE Y. A review of 3D printing technologies for soft polymer materials[J]. *Adv Funct Mater*, 2020, 30(28): 2000187. DOI:10.1002/adfm.202000187.
- [11] U.S. Food and Drug Administration. Novel drug approvals for 2024[EB/OL]. (2024-05-22) [2025-06-05]. <https://www.fda.gov/drugs/novel-drug-approvals-fda/novel-drug-approvals-2024>.
- [12] VAN NORMAN G A. Limitations of animal studies for predicting toxicity in clinical trials: is it time to rethink our current approach?[J]. *JACC Basic Transl Sci*, 2019, 4(7):845-854. DOI:10.1016/j.jacbs.2019.10.008.
- [13] SCHUSTER B, JUNKIN M, KASHAF S S, et al. Automated microfluidic platform for dynamic and combinatorial drug screening of tumor organoids[J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 5271. DOI:10.1038/s41467-020-19058-4.
- [14] TUNG Y T, CHEN Y C, DERR K, et al. A 3D bioprinted human neurovascular unit model of glioblastoma tumor growth[J]. *Adv Healthc Mater*, 2024, 13(15): e2302831. DOI: 10.1002/adhm.202302831.
- [15] DESIGAUX T, COMPERAT L, DUSSERRE N, et al. 3D bioprinted breast cancer model reveals stroma-mediated modulation of extracellular matrix and radiosensitivity[J]. *Bioact Mater*, 2024, 42:316-327. DOI:10.1016/j.bioactmat.2024.08.037.
- [16] TANG M, XIE Q, GIMPLE R C, et al. Three-dimensional

- bioprinted glioblastoma microenvironments model cellular dependencies and immune interactions[J]. *Cell Res*, 2020, 30(10):833-853. DOI:10.1038/s41422-020-0338-1.
- [17] TANG M, TIWARI S K, AGRAWAL K, et al. Rapid 3D bioprinting of glioblastoma model mimicking native biophysical heterogeneity[J]. *Small*, 2021, 17(15): e2006050. DOI:10.1002/sml.202006050.
- [18] TANG M, QU Y J, HE P X, et al. Heat-inducible CAR-T overcomes adverse mechanical tumor microenvironment in a 3D bioprinted glioblastoma model[J]. *Mater Today Bio*, 2024, 26:101077. DOI:10.1016/j.mtbio.2024.101077.
- [19] JOHNSON B N, LANCASTER K Z, HOGUE I B, et al. 3D printed nervous system on a chip[J]. *Lab Chip*, 2016, 16(8):1393-1400. DOI:10.1039/c5lc01270h.
- [20] BANERJEE D, IVANOVA M M, CELIK N, et al. Biofabrication of an *in-vitro* bone model for Gaucher disease[J]. *Biofabrication*, 2023, 15(4):045023. DOI:10.1088/1758-5090/acf95a.
- [21] SCARIAN E, BORDONI M, FANTINI V, et al. Patients' stem cells differentiation in a 3D environment as a promising experimental tool for the study of amyotrophic lateral sclerosis[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(10): 5344. DOI: 10.3390/ijms23105344.
- [22] ROUSSEL R, STEG P G, MOHAMMEDI K, et al. Prevention of cardiovascular disease through reduction of glycaemic exposure in type 2 diabetes: a perspective on glucose-lowering interventions[J]. *Diabetes Obes Metab*, 2018, 20(2): 238-244. DOI:10.1111/dom.13033.
- [23] ALI A S M, WU D W, BANNACH-BROWN A, et al. 3D bioprinting of liver models: a systematic scoping review of methods, bioinks, and reporting quality[J]. *Mater Today Bio*, 2024, 26:100991. DOI:10.1016/j.mtbio.2024.100991.
- [24] NGUYEN D G, FUNK J, ROBBINS J B, et al. Bioprinted 3D primary liver tissues allow assessment of organ-level response to clinical drug induced toxicity *in vitro*[J]. *PLoS One*, 2016, 11(7): e0158674. DOI:10.1371/journal.pone.0158674.
- [25] JANANI G, PRIYA S, DEY S, et al. Mimicking native liver lobule microarchitecture *in vitro* with parenchymal and non-parenchymal cells using 3D bioprinting for drug toxicity and drug screening applications[J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2022, 14(8):10167-10186. DOI:10.1021/acsami.2c00312.
- [26] HE J Y, WANG J L, PANG Y, et al. Bioprinting of a hepatic tissue model using human-induced pluripotent stem cell-derived hepatocytes for drug-induced hepatotoxicity evaluation[J]. *Int J Bioprint*, 2022, 8(3):581. DOI:10.18063/ijb.v8i3.581.
- [27] DEY S, BHAT A, JANANI G, et al. Microfluidic human physiometric liver model as a screening platform for drug induced liver injury[J]. *Biomaterials*, 2024, 310: 122627. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2024.122627.
- [28] FERRI N, SIEGL P, CORSINI A, et al. Drug attrition during pre-clinical and clinical development: understanding and managing drug-induced cardiotoxicity[J]. *Pharmacol Ther*, 2013, 138(3):470-484. DOI:10.1016/j.pharmthera.2013.03.005.
- [29] YANG K X, WANG L X, VIJAYAVENKATARAMAN S, et al. Recent applications of three-dimensional bioprinting in drug discovery and development[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2024, 214: 115456. DOI:10.1016/j.addr.2024.115456.
- [30] ARAI K, MURATA D, TAKAO S, et al. Drug response analysis for scaffold-free cardiac constructs fabricated using bio-3D printer[J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1):8972. DOI:10.1038/s41598-020-65681-y.
- [31] IWANAGA S, HAMADA Y, TSUKAMOTO Y, et al. Design and fabrication of mature engineered pre-cardiac tissue utilizing 3D bioprinting technology and enzymatically crosslinking hydrogel[J]. *Materials*, 2022, 15(22): 7928. DOI: 10.3390/ma15227928.
- [32] LIU S T, WANG Z H, CHEN X Y, et al. Multiscale anisotropic scaffold integrating 3D printing and electrospinning techniques as a heart-on-a-chip platform for evaluating drug-induced cardiotoxicity[J]. *Adv Healthc Mater*, 2023, 12(24): e2300719. DOI:10.1002/adhm.202300719.
- [33] 王梓霏, 丁雅卉, 李彦, 等. 生物3D打印在肿瘤研究及组织工程中的应用[J]. *中国癌症杂志*, 2024, 34(9):814-826. DOI: 10.19401/j.cnki.1007-3639.2024.09.002.
- WANG Z F, DING Y H, LI Y, et al. Application of 3D bioprinting in cancer research and tissue engineering[J]. *China Oncol*, 2024, 34(9): 814-826. DOI: 10.19401/j.cnki.1007-3639.2024.09.002.
- [34] BAI Y X, WANG Z J, HE X L, et al. Application of bioactive materials for osteogenic function in bone tissue engineering [J]. *Small Methods*, 2024, 8(8): e2301283. DOI: 10.1002/smt.202301283.
- [35] YAN Y F, CHEN H, ZHANG H B, et al. Vascularized 3D printed scaffolds for promoting bone regeneration[J]. *Biomaterials*, 2019, 190-191:97-110. DOI:10.1016/j.biomaterials.2018.10.033.
- [36] VEGA S L, KWON M Y, BURDICK J A. Recent advances in hydrogels for cartilage tissue engineering[J]. *Eur Cell Mater*, 2017, 33:59-75. DOI:10.22203/eCM.v033a05.
- [37] WENG T T, ZHANG W, XIA Y L, et al. 3D bioprinting for skin tissue engineering: Current status and perspectives[J]. *J Tissue Eng*, 2021, 12: 20417314211028574. DOI: 10.1177/20417314211028574.
- [38] SHI Y, XING T L, ZHANG H B, et al. Tyrosinase-doped bioink for 3D bioprinting of living skin constructs[J]. *Biomed Mater*, 2018, 13(3):035008. DOI:10.1088/1748-605X/aaa5b6.
- [39] JIN R H, CUI Y C, CHEN H J, et al. Three-dimensional bioprinting of a full-thickness functional skin model using acellular dermal matrix and gelatin methacrylamide bioink[J]. *Acta Biomater*, 2021, 131: 248-261. DOI: 10.1016/j.actbio.2021.07.012.
- [40] GOLD K A, SAHA B, RAJEEVA PANDIAN N K, et al. 3D bioprinted multicellular vascular models[J]. *Adv Healthc Mater*, 2021, 10(21): e2101141. DOI:10.1002/adhm.202101141.
- [41] WU X F, CHEN K, CHAI Q, et al. Freestanding vascular scaffolds engineered by direct 3D printing with Gt-Alg-MMT bioinks[J]. *Biomater Adv*, 2022, 133:112658. DOI:10.1016/j.msec.2022.112658.
- [42] LÓPEZ-CARRASCO A, MARTÍN-VAÑÓ S, BURGOS-PANADERO R, et al. Impact of extracellular matrix stiffness on genomic heterogeneity in MYCN-amplified neuroblastoma cell line[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2020, 39(1):226. DOI:10.1186/s13046-020-01729-1.
- [43] REN X X, HUANG M L, WENG W X, et al. Personalized drug screening in patient-derived organoids of biliary tract cancer

- and its clinical application[J]. *Cell Rep Med*, 2023, 4(11):101277. DOI:10.1016/j.xcrm.2023.101277.
- [44] LUCÀ R, ASSENZA M R, MAIULLARI F, et al. Inhibition of the mTOR pathway and reprogramming of protein synthesis by MDM4 reduce ovarian cancer metastatic properties[J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12(6):558. DOI:10.1038/s41419-021-03828-z.
- [45] ZHAO Z Y, FENG X Q, WU H J, et al. Construction of a lung cancer 3D culture model based on alginate/gelatin microbeads for drug evaluation[J]. *Transl Lung Cancer Res*, 2024, 13(10):2698-2712. DOI:10.21037/tlcr-24-490.
- [46] AL SHIHABI A, TEBON P J, NGUYEN H T L, et al. The landscape of drug sensitivity and resistance in sarcoma[J]. *Cell Stem Cell*, 2024, 31(10):1524-1542.e4. DOI:10.1016/j.stem.2024.08.010.
- [47] SUN H, SUN L J, KE X D, et al. Prediction of clinical precision chemotherapy by patient-derived 3D bioprinting models of colorectal cancer and its liver metastases[J]. *Adv Sci*, 2024, 11(2): e2304460. DOI:10.1002/advs.202304460.
- [48] PERRON U, GRASSI E, CHATZIPLI A, et al. Integrative ensemble modelling of cetuximab sensitivity in colorectal cancer patient-derived xenografts[J]. *Nat Commun*, 2024, 15(1):9139. DOI:10.1038/s41467-024-53163-y.
- [49] LI S, LV J, LI Z, et al. Overcoming multi-drug resistance in SCLC: A synergistic approach with venetoclax and hydroxychloroquine targeting the lncRNA LYPLAL1-DT/BCL2/BECN1 pathway[J]. *Mol Cance*, 2024, 23(1): 243. DOI: 10.1186/s12943-024-02145-1.
- [50] HASHIMOTO T, NAKAMURA Y, FUJISAWA T, et al. The SCRUM-MONSTAR cancer-omics ecosystem: striving for a quantum leap in precision medicine[J]. *Cancer Discov*, 2024, 14(11):2243-2261. DOI:10.1158/2159-8290.CD-24-0206.
- [51] 邹晟. 基于3D生物打印技术构建肺癌体外模型[D]. 南昌: 南昌大学, 2023. DOI: 10.27232/d.cnki.gnchu.2023.000153.
- ZOU S. A lung cancer model in vitro was constructed based on 3D bioprinting[D]. Nanchang: Nanchang University, 2023. DOI:10.27232/d.cnki.gnchu.2023.000153.
- [52] 孙航. 基于3D生物打印技术构建人源消化系统恶性肿瘤临床前模型及其临床应用研究[D]. 北京: 北京协和医学院, 2024. DOI: 10.27648/d.cnki.gzxhu.2024.000117.
- SUN H. Construction and clinical application research on human-derived preclinical models of gastrointestinal cancer based on 3D bioprinting technology[D]. Beijing: Peking Union Medical College, 2024. DOI: 10.27648/d.cnki.gzxhu.2024.000117.
- [53] 肖瑞英, 鲍伟, 祝亚平. PDX模型在妇科肿瘤中的研究进展[J]. *中国计划生育和妇产科*, 2023, 15(7):10-13. DOI:10.3969/j.issn.1674-4020.2023.07.03.
- XIAO R Y, BAO W, ZHU Y P. Research progress of PDX model in gynecological tumors[J]. *Chin J Fam Plan Gynecol*, 2023, 15(7):10-13. DOI:10.3969/j.issn.1674-4020.2023.07.03.
- [54] HERPERS B, EPPINK B, JAMES M I, et al. Functional patient-derived organoid screenings identify MCLA-158 as a therapeutic EGFR × LGR5 bispecific antibody with efficacy in epithelial tumors[J]. *Nat Cancer*, 2022, 3(4): 418-436. DOI: 10.1038/s43018-022-00359-0.
- [55] CHOI J, JUNG T Y, KIM J H, et al. Efficacy of recombinant *Bacillus Calmette-Guérin* containing dltA in *in vivo* three-dimensional bio-printed bladder cancer-on-a-chip and *ex vivo* orthotopic mouse model[J]. *Investig Clin Urol*, 2023, 64(3):296-305. DOI:10.4111/icu.20220293.
- [56] HONG G, KIM J, OH H, et al. Production of multiple cell-laden microtissue spheroids with a biomimetic hepatic-lobule-like structure[J]. *Adv Mater*, 2021, 33(36): 2102624. DOI: 10.1002/adma.202102624.
- [57] LOPEZ M A, HUTTER L, PAGIN E, et al. *In vivo* efficacy proof of concept of a large-size bioprinted dermo-epidermal substitute for permanent wound coverage[J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2023, 11:1217655. DOI:10.3389/fbioe.2023.1217655.
- [58] LIU Y, ZHANG Y F, MEI T X, et al. hESCs-derived early vascular cell spheroids for cardiac tissue vascular engineering and myocardial infarction treatment[J]. *Adv Sci*, 2022, 9(9): e2104299. DOI:10.1002/advs.202104299.
- [59] JIANG Z R, JIN B, LIANG Z, et al. Liver bioprinting within a novel support medium with functionalized spheroids, hepatic vein structures, and enhanced post-transplantation vascularization[J]. *Biomaterials*, 2024, 311:122681. DOI:10.1016/j.biomaterials.2024.122681.
- [60] SUN Y Y, HUO Y Y, RAN X Y, et al. Instant *Trachea* reconstruction using 3D-bioprinted C-shape biomimetic *Trachea* based on tissue-specific matrix hydrogels[J]. *Bioact Mater*, 2023, 32:52-65. DOI:10.1016/j.bioactmat.2023.09.011.
- [61] SUN Z W, YUE X L, LIU L, et al. Bioprinted Notch ligand to function as stem cell niche improves muscle regeneration in dystrophic muscle[J]. *Int J Bioprint*, 2023, 9(3): 711. DOI: 10.18063/ijb.711.
- [62] SUN B B, LIAN M F, HAN Y, et al. A 3D-Bioprinted dual growth factor-releasing intervertebral disc scaffold induces nucleus pulposus and annulus fibrosus reconstruction[J]. *Bioact Mater*, 2020, 6(1):179-190. DOI:10.1016/j.bioactmat.2020.06.022.
- [63] XU Z Y, HUANG J J, LIU Y, et al. Extracellular matrix bioink boosts stemness and facilitates transplantation of intestinal organoids as a biosafe Matrigel alternative[J]. *Bioeng Transl Med*, 2022, 8(1): e10327. DOI:10.1002/btm2.10327.
- [64] NANMO A, YAN L, ASABA T, et al. Bioprinting of hair follicle germs for hair regenerative medicine[J]. *Acta Biomater*, 2023, 165:50-59. DOI:10.1016/j.actbio.2022.06.021.
- [65] NG W L, GOH G L, GOH G D, et al. Progress and opportunities for machine learning in materials and processes of additive manufacturing[J]. *Adv Mater*, 2024, 36(34): e2310006. DOI: 10.1002/adma.202310006.

(收稿日期: 2024-12-30 修回日期: 2025-02-10)

(本文责任编辑: 张俊彦)

[引用本文]

胡敏, 董乐轩, 高怡, 等. 生物3D打印研究及与临床前动物模型的交叉应用展望[J]. *实验动物与比较医学*, 2025, 45(3): 318-330. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.193.

HU M, DONG L X, GAO Y, et al. Prospects for 3D bioprinting research and transdisciplinary application to preclinical animal models[J]. *Lab Anim Comp Med*, 2025, 45(3): 318-330. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.193.

降压物质检查结果超过质量标准规定的常见原因分析

童希洋, 阙昌田, 张峰, 赵璐, 王红平

[四川省药品检验研究院(四川省医疗器械检测中心, 四川养麝研究所)安全评价中心, 工业和信息化部产业技术基础公共服务平台, 国家药监局药物制剂体内外相关性技术研究重点实验室, 成都 611731]

[摘要] 根据《中华人民共和国药典》2020年版四部通则1145, 降压物质检查是通过比较组胺对照品与供试品引起麻醉猫的血压下降程度, 判定供试品中所含降压物质的限度是否符合规定的一项常见药品检验方法。当降压物质检查结果超过质量标准规定(out of specification, OOS), 可能是由药品本身质量风险引起, 也可能是源于检验过程中的错误操作。因此, 开展OOS原因分析对于确认试验结果、评价药品质量尤为重要。降压物质检查采用猫作为实验动物, 其稳定性相对于常规实验动物更差, 且手术难度大、试验流程复杂, 这些因素导致调查降压物质检查出现OOS原因的难度较大。通过查阅资料结合实际工作经验, 本文主要通过以下5方面分析降压物质检查出现OOS的原因: (1) 从标准判定、标准内容以及标准起草3个方面分析了药品标准对OOS的影响; (2) 人员资质, 包括岗前培训、试验操作是否遵循标准操作规程, 以及仪器操作的能力; (3) 猫作为降压物质检查所用实验动物, 其生理特性、遗传背景及试验过程中出现的异常状态等因素; (4) 标准品、试剂、受试物以及关键仪器多道生理信号仪; (5) 包括动物麻醉、动静脉插管手术、给药、数据处理等试验操作。本文旨在为广大药品与生物制品检验同行, 在分析药品降压物质检查过程中出现OOS的原因时, 提供一些参考思路。

[关键词] 中华人民共和国药典; 降压物质检查; 超过质量标准规定; 药品质量; 猫

[中图分类号] R-332; Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2025)03-0331-09



Analysis of Common Causes of Out-of-Specification Results in the Test for Depressor Substances

TONG Xiyang, QUE Changtian, ZHANG Feng, ZHAO Lu, WANG Hongping

[Safety Evaluation Center, Sichuan Institute for Drug Control (Sichuan Testing Center of Medical Devices, Sichuan Institute of Musk Deer Breeding); Public Service Platform for the Industrial Technology Base, the Ministry of Industry and Information Technology; National Medical Products Administration Key Laboratory for Technical Research on Drug Products In Vitro and In Vivo Correlation, Chengdu 611731, China]

Correspondence to: WANG Hongping (ORCID: 0009-0003-1207-4859), E-mail: wanghp@scidc.org.cn;

ZHAO Lu (ORCID: 0009-0006-7838-9310), E-mail: zhaol@scidc.org.cn

[ABSTRACT] According to General Chapter 1145 of Division IV in the Chinese Pharmacopoeia (2020 Edition), the test for depressor substances is a common method for drug testing. It determines whether the level of depressor substances in a test sample complies with the specified standards by comparing the extent of blood pressure reduction in anesthetized cats induced by the histamine reference substance and the test sample. If an out-of-specification (OOS) result occurs in the test for depressor substances, it may be caused by inherent quality issues of the drug or errors in the testing process. Therefore, analyzing the causes of OOS is particularly important for confirming the test results and evaluating drug quality. Cats are

[第一作者] 童希洋(1995—), 男, 硕士, 工程师, 研究方向: 药品与生物制品检验及药物非临床安全性评价。E-mail: tongxy@scidc.org.cn。ORCID: 0009-0000-5966-538X

[通信作者] 王红平(1979—), 女, 硕士, 副主任中药师, 研究方向: 药品与生物制品检验及药物非临床安全性评价。E-mail: wanghp@scidc.org.cn。ORCID: 0009-0003-1207-4859;

赵璐(1983—), 女, 硕士, 副主任药师, 研究方向: 药品与生物制品检验及药物非临床安全性评价。E-mail: zhaol@scidc.org.cn。ORCID: 0009-0006-7838-9310

used as experimental animals in the test for depressor substances. Compared with conventional laboratory animals, they are less stable, surgery procedures are more challenging, and the testing process is more complex. These factors make it more difficult to investigate the causes of OOS in this test. Based on a review of the literature and practical work experience, this article analyzes the causes of OOS in the test for depressor substances from the following five aspects: (1) an analysis of the impact of drug standards on OOS from three aspects: standard determination, standard content, and standard drafting; (2) personnel qualifications, including pre-employment training, compliance with standard operating procedures during experimental operations, and the ability to operate instruments; (3) factors related to cats, used as experimental animals in the test for depressor substances, including physiological characteristics, genetic background, and abnormal conditions during the experiment; (4) reference substances, reagents, test samples, and key instruments such as the multi-channel physiological signal instrument; (5) experimental operations including animal anesthesia, arterial and venous catheterization, drug administration, and data processing. This article aims to provide reference approaches for professionals engaged in the testing of pharmaceuticals and biological products when analyzing the causes of OOS in the test for depressor substances.

[Key words] Chinese Pharmacopoeia; Test for depressor substance; Out-of-specification; Drug quality; Cats

降压物质检查是一种检查药品中降压物质是否符合规定的常见药品检验方法^[1]。由动植物或者微生物发酵物中提取的药品,可能会混入使血管扩张而降低血压的活性物质(包括组胺、缓激肽等组胺类物质),中药中也可能含有未知或已知的降压成分,该类物质通过静脉注射进入人体后,有急性降血压作用,会引发严重心血管系统不良反应。因此,降压物质检查对控制药品质量、保障用药安全具有重大意义^[2]。目前,包括《英国药典》^[3] (*British Pharmacopoeia 2024*)和《欧洲药典》^[4] (*European Pharmacopoeia Supplement 11.5*)等也收录了该方法,其原理与《中华人民共和国药典》(简称《中国药典》)类似,但在给药剂量和判断依据等方面存在差异。

超过质量标准规定(out of specification, OOS)是指按照实验规程操作得到不符合所建立质量标准的结果^[5]。OOS分析是药品质量控制与评价的重要内容,也是实验室质量管理体系的重要组成部分。世界卫生组织(World Health Organization, WHO)以及美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)、英国药品和健康产品管理局(Medicines and Healthcare Products Regulatory Agency, MHRA)等机构均发布了OOS结果调查指南等相关文件,在对FDA指导原则解读的基础上,欧美国家加大了对实验室或者工厂中遇到特定问题的研究力度^[6]。国内专家学者也逐渐意识到OOS原因调查对试验异常结果分析的重要性,也有相关研究对OOS调查的作用与意义、调查分

析流程等进行了探讨^[7]。但国内对于OOS的重视程度仍不足,对于OOS的研究也不够全面细致,所以需要各类OOS进行梳理总结,提高对各类试验异常结果的分析能力。

当降压物质检查出现OOS,可能是药品本身质量风险引起,也可能源于检验过程中的错误操作,因此开展OOS原因调查对于确认试验结果、评价药品质量尤为重要。其中动物实验受多种因素影响,重复性不佳,降压物质检查采用猫作为实验动物,其稳定性相对于常规实验动物更差,且手术难度大、试验流程复杂,这些因素导致调查降压物质检查出现OOS的原因难度较大。本研究团队(安全评价中心)属于四川省药品检验研究院(四川省医疗器械检测中心,四川养麝研究所),本中心承担药品(含生物制品)、医疗器械、化妆品、药包材等领域的药理毒理及相关生物学试验,是中西部药检机构中首家通过国家药品监督管理局药物非临床研究质量管理规范(Good Laboratory Practice, GLP)认证的机构。本中心已承担数十个中药及化药注射剂品种的降压物质检查标准起草和提高,年完成降压物质检验超过50批次,涉及克林霉素磷酸酯注射液、复方氨基酸(18AA)注射液、中长链脂肪乳/氨基酸(16)/葡萄糖(36%)注射液等超过20个品种。结合实际工作经验和资料查阅,本文将从药品标准、人员资质、实验动物、试剂与仪器、试验操作5个方面分析这些检验工作中降压物质检查出现OOS的原因,汇总见表1。

表1 降压物质检查结果超过质量标准规定常见原因汇总表

Table 1 Summary of common causes of out-of-specification results in the test for depressor substance

类别 Category	常见问题 Common problem	原因或解决措施 Reason or countermeasure
药品标准 Drug standard	标准理解有误或不透彻	对《中华人民共和国药典》内容进行深入理解,尤其注意不符合规定结论的判定条件;关注药品标准中给药剂量及速度
	标准制定缺乏科学性或合理性	对标准起草资料进行核查,包括限值前研究、限值设定、验证等内容
人员资质 Personnel qualifications	试验人员资质不足	加强人员上岗前培训和标准操作规程培训
实验动物 Laboratory animal	猫的品种	不同品种的猫遗传背景和生理特性存在一定的差异,对对照品或药品降压反应不完全一致。可以更换动物来源、使用实验用猫进行试验
	试验过程中动物异常(呕吐、苏醒、呼吸受阻等)	动物在试验过程中出现异常情况会影响其血压,及时清理呕吐物及呼吸道分泌物;根据动物情况考虑追加麻醉剂
仪器与试剂 Instrument and reagent	对照品不满足要求	确认对照品及配制后母液储存条件是否符合要求;检查对照品溶液效力是否降低;核对对照品信息(结晶水)并确认对照品配制过程的准确性
	关键仪器不满足要求	核对生理信号采集处理系统的运行状态、日常维护与保养、性能检定是否满足试验要求、连接是否紧密有效
	试剂配制不准确	梳理试剂的基本信息;核对配制过程及剂量浓度
	供试品不符合需求	梳理供试品基本信息、确认其外观性状、调查配制过程,或重新取样复检
试验操作 Testing procedure	动物麻醉	查阅麻醉剂作用机制、毒性等基本信息;确认麻醉剂的浓度和剂量是否合理;注意动物麻醉防护,维持动物生理状态
	动脉和静脉插管手术	确认动静脉插管是否渗漏;减小创口面积、避免大量出血;避免分支血管的干扰
	给药操作	注意注射给药速度及给药间隔时间保持一致,每次注射应在前一次反应恢复稳定后再进行;避免药物之间的相互作用
	数据处理	对照品与药品拾取的初始值和结束值标准需保持一致;注意数据修约规则

1 药品标准

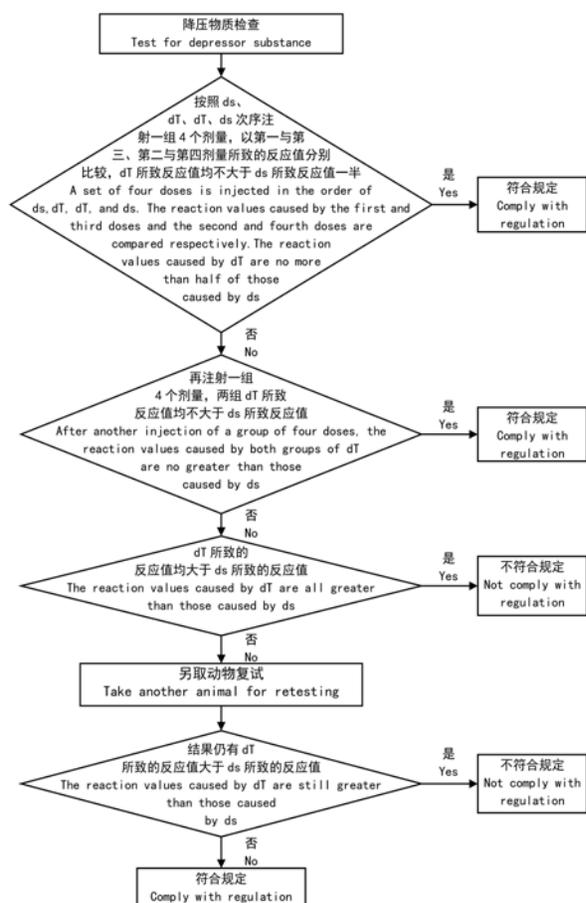
当检查结果出现OOS时,首先应对药品标准进行确认和理解,对标准理解有误或不够透彻会导致降压物质检查的结论出现偏差。

第一,对《中国药典》2020年版四部通则1145^[1]规定内容进行深入分析理解,减少人为理解偏差带来的OOS,尤其注意不符合规定结论的判断条件,具体判断流程见图1。同时,需要核实检验依据或判定依据及方法适用性,如根据《中国药典》2020年版四部通则9301,若药品属于降压药或其主治功能与降压有关,或药品可能影响猫的反应从而干扰血压监测,可选择组胺类物质检查项替代。

第二,需要关注药品标准中要求的给药剂量及速度。如某药品规定“取本品,按《中国药典》2020年版四部通则1145检查,按猫体重每1 kg缓慢注射给药1.0 mL,应符合规定。”然而,目前对于降压物质检查给药速度缺少明确的要求,“缓慢注射”缺乏明确的速度定义和依据,给药速度多由试验人员根据经验自行控制。因此,不同实验室不同试验人员对速度把握尺度不一致可能会带来试验结果的较大差异,应在标准操作规程(standard operating procedure, SOP)中对给药速度进行规定。同时,对照品和供试品需要采用相同速度进行给药,而对照品磷酸组胺引起动物降压反应为即时反应,给药速度过慢可能会引起对照品血压下降值减小,影响结果判定,且存在不同给药速度出

现不同结果的可能性。总之，药品标准中要求缓慢注射的合理性和必要性都值得商榷。

第三，需参照《中国药典》2020年版四部通则9301^[1]中规定的对药品降压物质检查标准起草资料进行核查，主要包括限值前研究是否充分、限值设定是否合理、是否对起草标准进行三批样品验证等内容，确认药品标准设置的科学性与合理性。



注：ds 指对照组给药组，dT 是指受试药物给药组。

Note: ds refers to the control group, dT refers to the test substance group.

图1 降压物质检查结果判断流程图

Figure 1 Flowchart for determining the results of the test for depressor substances

2 人员资质

因降压物质检查试验操作繁杂且难度较大，对试验人员的要求有较高的专业能力和技术水平。需要确认初检人员是否具备开展降压物质检查的能力，包括核实初检人员是否完成规定的上岗前培训、试验过程是否按照 SOP 进行以及初检人员是否具备检测该项目及仪器的操作技能。

3 实验动物

降压物质检查所用实验动物为猫。猫在分类学上属于动物界脊索动物门，哺乳纲，食肉目，猫科，猫属。猫用于动物实验的历史由来已久，早在 19 世纪末，就有科学家将猫用作生理及医药方面的研究^[8]。猫血压稳定、血管壁坚韧、心搏力强，适合用于降压物质检查。《中国药典》虽明确将猫列为实验动物，但其标准化进程在国内推进缓慢。目前尚未正式发布实验猫的国家标准，仅有河北、黑龙江、吉林、四川、山西、湖北、广东等省份制定了地方标准，但各地方标准的不统一造成实验动物的质量差异较大，可能成为降压物质检查结果偏差的主要原因。

按《中国药典》规定，降压物质检查用猫应符合：健康合格，体重 2 kg 以上；若为雌性应非妊娠期。应核实猫在饲养期间的房间环境是否符合要求，温度需保持在 20~26 °C，相对湿度为 30%~70%。猫对营养的需求较高，尤其是处于生长期的猫需要优质且足量的蛋白质。除此以外，猫还存在无法将 β-胡萝卜素转化成维生素 A 和食用未糊化的淀粉可能引起腹泻等生理特点。因此，猫粮中应含有足够蛋白质、脂肪、矿物质、维生素和碳水化合物，保证猫有足够的营养来源。若发现动物在检疫和适应环境期间出现腹泻、体重降幅超过 20%、感染猫瘟或其他传染疾病等情况，其健康状态已无法满足降压试验要求，不应纳入试验。

不同品种的猫遗传背景和生理特性存在一定的差异，对对照品或供试品降压反应不完全一致。目前用于实验的猫多选短毛猫^[9]，但这些猫大部分来源于研究所自留、流浪猫、家庭捐赠、动物收容所，所用实验猫的年龄、性别、品种无法保证一致。华北制药厂在 20 世纪 70 年代末开始培育的虎皮猫，作为中国特有的实验用猫，相对于其他来源的猫，实验用虎皮猫的繁育饲养条件更稳定、患病和携带寄生虫的概率更低、血压更稳定^[10]。但目前具有实验用虎皮猫生产许可证的企业仅有 3 家，分别为昆药集团股份有限公司、山西亚宝药业股份有限公司和华北制药股份有限公司，无法完全满足市场上实验用猫的需求。

猫在试验过程中出现的一些异常情况可能影响到试验结果。常见的有：(1) 每次试验前，应对动物进行禁食不禁水处理。若麻醉前未进行有效禁食，猫在试验过程中可能出现呕吐，引起血压值波动。试验过程中应及时清理动物呕吐物，防止呕吐物进入气管引起窒息。(2) 试验过程中动物苏醒挣扎，导致血压出

现异常波动。应根据动物状态判断是否追加适量麻醉剂,但给予麻醉剂可能会引起动物血压变化,影响结果判断。若需要追加麻醉剂,应避免试验药品给药期间,追加麻醉剂后应等待动物血压充分恢复后再进行给药,必要时再次进行灵敏度考察。(3) 动物呼吸道分泌物较多,堵塞气管,导致动物呼吸受阻,血压波动幅度增加。应及时清理分泌物,必要时可以在手术时给予适量抗胆碱药抑制呼吸道分泌黏液,保持呼吸道通畅。(4) 动物给药剂量过大,出现大、小便失禁等异常情况,且血压值大幅降低时,应立即停止试验,并根据动物状态实施安乐死或进行救治。

4 仪器与试剂

4.1 磷酸组胺对照品

判定供试品降压物质检查是否符合规定是通过比较供试品与对照品引起动物降压反应值,因此对照品也是调查降压物质检查出现OOS原因的重点方面。

降压物质检查使用到的对照品为磷酸组胺,该对照品来源于中国食品药品检定研究院(简称中检院),CAS号为51-74-1,每支20 mg,储存条件为遮光保存,并置于2~8℃的环境中。精密称取磷酸组胺对照品适量,按组胺计算,加水溶解成每1 mL中含1.0 mg的溶液,分装于适宜的容器内,于4~8℃下贮存,经验证,溶液中的组胺在保持活性、符合要求的条件下,可在3个月内使用。临用时,用0.9%氯化钠溶液稀释成所需浓度的溶液。

应确认试验中使用的对照品溶液是否存在异常,如对照品及配制后母液的储存条件是否符合要求,储存期间是否存在温度超标及长时间暴露在强光下等异常情况。检查对照品溶液在3个月内效力是否降低,每次试验灵敏度是否符合要求,引起动物血压下降值是否与之前试验有明显不同。同时,还需确认对照品配制过程的准确性,特别需注意中检院不同批次的磷酸组胺对照品可能带有结晶水导致分子量不同,进而换算系数不同。因此,试验前需要核对中检院官网提供的对应批号对照品的信息。例如,批号为150510-202214的对照品分子式为 $C_5H_9N_3 \cdot 2H_3PO_4$,相对分子质量为307.14,换算系数为0.36;而批号为150510-201313的对照品分子式为 $C_5H_9N_3 \cdot 2H_3PO_4 \cdot H_2O$,相对分子质量为325.15,换算系数为0.34。溶解稀释步骤的计算公式及计算数值也需要再次核对。除此以外,还需确认配制过程中用到的电子天平、移液器及容量瓶等是否进行了检定、校准或标化,且满足试验需求。

4.2 仪器

降压物质检查用到的主要仪器为生理信号采集处理系统。首先,需核对仪器的运行状态是否正常、是否进行日常维护与保养、确认性能是否满足试验要求等,特别需要关注所使用的生理信号采集处理系统通道及传感器是否通过校准,校准的误差范围是否满足试验要求,是否进行仪器期间核查及日常校验,尤其是出现临界值时。其次,应检查仪器本次使用运行状态、仪器最近使用运行状态是否异常。若条件允许,立即对试验仪器进行校验,确认其运行状态。也可以更换生理信号采集处理系统传感器和信号通道进行试验,以排除不同传感器和信号通道带来的影响。最后,确认仪器连接状态,尤其在试验过程中出现血压信号时断时续、血压差突然变小等情况时,需确认包括传感器与信号放大系统以及电脑与信号采集处理系统之间的连接是否稳固通畅。

4.3 试剂

降压物质检查用到的主要试剂有:灭菌注射用水、0.9%氯化钠注射液、肝素钠注射液、麻醉剂等。灭菌注射用水用于溶解对照品;0.9%氯化钠注射液用于对照品、供试品和肝素钠注射液的稀释,每次给药后需立即注射一定量的0.9%氯化钠注射液,以确保供试品或对照品溶液完全进入血液循环;肝素钠注射液用于抗凝;麻醉剂用于术前动物的麻醉。首先,梳理试验中使用到试剂的基本信息,包括试剂名称、来源、批号、生产日期、有效期、储存条件、使用方法等,确认试剂是否符合试验要求。其次,确认麻醉剂以及肝素钠注射剂的配制过程以及给药剂量是否准确合理。如肝素钠注射液的常用配制浓度为200~1 000 U/mL,注射体积通常为1 mL,若给药剂量过大,可能会影响心脏射血功能进而影响血压值;若给药剂量太少则抗凝效果不佳,可能引起血液在管路中流动性降低甚至凝结,从而导致血压差值减小或血压值降低。麻醉剂乌拉坦在配制过程中体积会有较大变化,因此必须使用容量瓶进行定容,否则会使麻醉剂浓度不准确,导致麻醉效果不佳。除此之外,麻醉剂的配制过程会涉及称量、溶解、稀释等操作,需要对溶解稀释步骤的计算公式及计算数值再次核对,并确认配制过程中使用的电子天平、移液器以及容量瓶等是否进行检定、校准或标化,并满足试验需求。另外需要注意,乌拉坦虽然是《中国药典》推荐用麻醉剂,但具有一定的致癌和致畸性,配制时应在通风橱中进行,并且重视实验操作人员的个人防护。

4.4 供试品

目前需要进行降压物质检查的品种主要包括：大输液剂〔如复方氨基酸（15）双肽（2）注射液、鱼油脂肪乳注射液等〕、化学药物注射剂（如克林霉素磷酸酯注射液、注射用盐酸表柔比星等）、原料药等。首先，应核查供试品的基本信息，至少包括供试品名称、来源、有效期、批号、规格及储存条件等，确认供试品是否在有效期内、储存条件是否合理，确保供试品信息无误。其次，核查供试品外观性状是否稳定、内外包装是否破损、三腔袋使用前是否混匀，确保供试品的稳定性；核查供试品取样量是否满足要求、供试品配制方法是否合理、配制过程中使用的电子天平、移液器以及容量瓶等是否进行检定、校准或标化，并满足试验需求；确定供试品给药剂量、体积以及浓度准确。最后，可对供试品理化性质进行检测来确认供试品质量，或重新取样复检。

5 试验操作

降压物质检查的主要操作步骤有：动物麻醉-进行颈动脉插管及股静脉插管手术-注入抗凝剂-打开检测仪器，记录血压-灵敏度检测-依次注入供试品及对照品进行检测-处理、分析数据。由于降压物质检查试验操作细节纷繁且难以回忆溯源，每次试验的操作无法完全复刻，因此，对此部分的原因分析排查难度较大。为改善此情况，可以通过完善细化SOP，加强人员上岗前培训，以确保试验人员操作的准确性及稳定性。在出现OOS后，可选择经验更加丰富的试验人员，并在操作过程进行双人复核来减少试验操作带来的干扰。

5.1 动物麻醉

《中国药典》推荐将巴比妥类作为降压物质检查用动物麻醉剂，也可以使用尿烷（乌拉坦）或异氟烷呼吸麻醉等其他麻醉剂。实验动物的麻醉效果是影响试验的因素之一，也是试验顺利进行的关键。

首先，应查阅不同麻醉剂对猫麻醉效果的资料，麻醉剂麻醉维持时间要满足试验要求，减少中间追加而导致麻醉不稳定，影响试验进程。了解麻醉剂麻醉机理或毒性及不良反应是否会引起动物血压异常，是否会与对照品或者供试品发生反应影响试验结果可靠性。如使用舒泰麻醉猫时，被麻醉猫呈熟睡状态，肌肉松弛作用好，止痛效果强，苏醒快，不抑制呼吸，不引起癫痫，但是会暂时引起动物体温下降^[11]；丙泊酚起效迅速、可控性强、作用时间短、清醒快而完全、不良反应少，是较理想的烷基酚类催眠性静脉全身麻

醉药，在临床应用广泛^[12]。乌拉坦麻醉猫常用剂量为1 g/kg，对神经传递的影响较小，且一次注射后可以维持较长时间的稳定麻醉（6~10 h），麻醉过程中对心肺系统的影响也很小，但乌拉坦为强致癌物质，还会使心电活动周期中各波时间和各间期延长，从而引起心率减慢，对血压和血糖都有一定影响^[13]；比索洛尔或美托洛尔等 β 受体阻滞剂与利多卡因、布比卡因合用后会导致后者清除率降低，多次给药会有药物蓄积的风险^[14]；吸入性麻醉药合用后易致心动过缓、血压明显降低^[15]。同时也有研究提出采用速眠新与戊巴比妥钠的复合麻醉方法，利用药物之间的相加或协同作用，不仅减少了药物的不良反应和麻醉意外，还减少了用药剂量，而且安全、高效，该复合麻醉方法是供试品降压物质检查试验中较为理想的猫麻醉方法^[16]。

其次，考虑麻醉剂的浓度和剂量是否合理，不同的麻醉剂量或浓度会明显影响动物麻醉状态，对血压值以及血压稳定性也有较大影响。目前，本中心实验室常用于猫的麻醉剂有戊巴比妥钠和尿烷，其中戊巴比妥钠的浓度为45 mg/mL、剂量约50 mg/kg，尿烷浓度为0.4 g/mL、剂量约1.0 g/kg。另外，还需注意常备一些如肾上腺素等用于麻醉过量的急救药。不同实验室选择的麻醉剂种类、浓度、剂量、给药操作等都会有一定差别，麻醉操作需要不断积累经验。

最后，麻醉防护对于维持动物正常麻醉状态也非常关键，在进行麻醉前需提前预热实验台，控制温度在35℃左右，防止试验过程中动物失温。若试验过程中手术台温度过高同样可能会导致猫提前苏醒，引起其血压波动。

5.2 动脉和静脉插管手术

降压物质检查试验猫手术时，需在一侧颈动脉插入连接测压计的动脉套管，管内充满适宜的抗凝剂溶液，以记录血压；在一侧股静脉内插入静脉插管，供注射药液用。

首先，确认管道是否渗漏。其中，动脉血压较高，若管道通路出现渗漏，血液会快速回流到管道甚至三通阀处，需要检查管道各个连接处是否紧密以及动脉血管结扎线是否系紧，确认出现渗漏原因后，针对性地更换动脉插管或对管路进行密封补救处理。静脉血管可以推入一定量的生理盐水，若阻力较大、有液体渗出或者注射部位有鼓包，即确认静脉插管通路有渗漏。确认静脉插管有渗漏后，应进一步分离静脉血管排查渗漏点，根据情况判断是否需要换一侧静脉血管再次插管，或是结扎血管并在近心端进行再次插管。

其次, 还应核实分离动脉血管和静脉血管操作是否影响动物状态。分离血管时需采用钝性分离, 尽量减小创口面积, 过程中避免大量出血影响动物血压。分离过程中, 还应注意血管周围散在的神经, 减少手术器械触碰, 减少对神经造成的损伤。

最后, 动脉血管和静脉血管周围常存在一些分支血管, 应确认这些血管是否会影响动物血压值以及给药准确性。动脉血管上若有较大分支血管可能会引起插管时出血, 应在进行插管前将其结扎, 阻断其与颈动脉的连接; 若血管长度允许, 尽量将动脉血管远心端结扎位置选在该分支血管之前, 减小动脉分支血管对动物血压的影响。若静脉周围存在分支血管可能会导致给药后血压反应值不准确, 可以通过结扎分支血管或者调整插管位置来减少分支血管的干扰。

5.3 给药操作

全部手术完毕后, 将测压计调节到与动物血压相当的高度 (一般为 1.3 ~ 20.0 kPa), 开启动脉夹, 待血压稳定后即可进行药液注射。首先, 给药过程中需保持注射速度一致, 降压反应是即时反应, 若无给药速度要求, 每次给药操作尽量都在 5 s 内完成。每次注射后立即注入一定量 (0.5 ~ 1.0 mL) 的 0.9% 氯化钠注射液, 确保给药剂量准确; 相邻两次注射的间隔时间应保持固定 (3 ~ 5 min), 每次注射应在前一次反应恢复稳定后再进行。此外, 注射剂量一般为 0.2 ~ 1.0 mL/kg, 样品和对照品注射体积应保持一致。同时, 受制于猫的血容量约占其体重的 5% ~ 9%, 对于体重为 4.5 kg 的猫, 其血液总量大约在 225 ~ 405 mL, 给药剂量不能过大。其次, 建议在考察不同品种供试品之前都进行灵敏度检查, 这样可以排除上一种药物对对照品灵敏度的影响。也可在试验给药结束后, 再进行一组灵敏度考察, 避免试验后期动物对对照品的灵敏度下降而出现异常值, 尤其是给药剂量较大的时候。最后, 应查询药品包括理化性质 (分子量、酸碱性、溶解性等)、药理作用及其作用机制、毒性及不良反应以及可能存在的药物相互作用等基本信息。

5.4 数据处理

试验结束后对原始数据进行处理, 比较供试品和对照品引起的降压反应值大小, 得出实验结论。不同实验室使用的采集系统型号不尽相同, 数据处理的方法与标准也存在差异, 实验室应建立符合需求的数据处理 SOP。数据处理需要注意降压反应中对照品与供试品选取的初始值和结束值标准是否一致, 初始值应统一选取在给药前血压平稳处, 结束值应选取在给药

后血压下降最低点处。其次, 需注意对照品 1/2 值计算过程中采用的数据数值修约规则。《中国药典》对数据修约主要遵循 GB/T 8170—2008《数值修约规则与极限数值的表示和判定》^[17], 采用“四舍六入五考虑”的原则。

6 讨论

药品检验机构作为国家对药品监管的重要技术支撑单位, 需要承担药品的监督检验、注册检验、强制检验、复验和委托检验等工作。药品检验机构出具的结果需准确、可靠, 这是实现有效监管的前提, 也是其规避法律风险的保障。因此, 要求药品检验机构必须建立科学合理的实验室质量管理体系。其中, 药品检验机构 OOS 调查是一种基于实验室风险的内部监控手段, 是实验室质量管理的重要实践^[18-19]。

OOS 分析和评估能力是衡量实验室质量管理水平的重要指标。对于药品检验机构而言, 通过分析 OOS, 可以排除非受试药物本身质量导致 OOS 的主要原因, 发现实验室在人员资质、仪器与受试物管理能力中可能存在缺陷, 从而提高实验室检验质量及异常问题的处理能力。药品安全性检查大多涉及动物实验, 其不确定性大、影响因素多、重现性较差, OOS 调查过程具有复杂性。降压物质检查作为药品安全性检查的重要组成部分, 目前仍存在实验动物质量不稳定、试验操作复杂、对于临界供试品的检查和判断方法欠妥等不足之处。近年也有一些研究关注采用“组胺类物质检查法”、体外离体器官试验法以及理化检测方法来替代降压物质检查法, 但是具有降压作用的物质比较复杂, 大多含量极微, 单独采用理化方法进行分析难度较大或不够全面; 而“组胺类物质检查法”测定药品中组胺类物质的限量采用的是离体器官^[20], 干扰因素较多, 特别是一些组成较为复杂的制剂。因此, 采用猫进行降压物质检查在目前仍然是药品安全性检查中不可或缺的方法。

为减少 OOS 的发生, 实验室应加强人员培训, 确保试验人员充分理解检验方法, 针对人为因素进行调整和改善, 减少人为失误; 加强对供试品、对照品及试剂的管理, 确保试验物质的可靠性和稳定性; 完善仪器校准和维护流程, 确保仪器运行状态正常; 完善管理文件, 定期对国内外药典、行业标准、SOP 进行梳理, 对易错或更新的部分, 增加举例与解释, 并在培训时重点说明; 建立实验室质量台账, 定期审核和改进实验室操作流程, 及时发现并改进存在的问题,

确保实验室操作的稳定性和准确性。定期对实验室 OOS 进行分析总结, 包括 OOS 内容、发生原因、解决措施及可能暴露的风险等。通过以上措施, 可以有效降低实验室 OOS 的发生率, 提升实验室的检测能力和质量管理体系的稳定性。一旦出现 OOS, 需要及时针对检验全过程开展全面、准确、有效的调查, 以确保检验结果准确可靠, 或者发现药品可能存在的一些安全性风险。

本文虽较为详细地阐述了降压物质检查出现不合格或异常结果等 OOS 的主要原因及解决措施, 但仍缺乏充足的试验数据支撑, 且部分内容是依据本实验室的工作经验或文献资料, 未经过多个实验室比较验证, 还需进一步确认其适用性。

[作者贡献 Author Contribution]

童希洋负责实施整个项目、通过文献检索调查国内外降压物质研究及 OOS 研究现状、撰写及修改文章;

阙昌田负责整理和分析本单位的降压物质检查试验原始数据;

张峰负责核对文章格式;

赵璐负责修订文章和提供专业知识咨询;

王红平负责策划项目。

[利益声明 Declaration of Interest]

所有作者均声明本文不存在利益冲突。

[参考文献 References]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 四部. 北京: 中国医药科技出版社, 2020:18.
National Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China[M]. Part 4. Beijing: China Medical Science Press, 2020:18.
- [2] 国家药典委员会. 中国药典分析检测技术指南 2017[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2017:625.
National Pharmacopoeia Commission. Guidance on analysis and testing technology of the Chinese pharmacopoeia 2017 [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2017:625.
- [3] The UK Medicines Commission. British pharmacopoeia 2024 [M]. London: medicines and healthcare products regulatory agency, 2024.
- [4] European Directorate for the Quality of Medicines and HealthCare. European pharmacopoeia supplement 11.5[M]. Strasbourg: European Directorate for the Quality of Medicines and Health Care (EDQM), 2024.
- [5] World Health Organization. TRS 957 - Annex 1: WHO good practices for pharmaceutical quality control laboratories[EB/OL]. (2010-09-30) [2025-02-09]. <https://www.who.int/publications/m/item/trs957-annex1>.
- [6] FDA Center for Drug Evaluation and Research. Investigating out-of-specification (OOS) test results for pharmaceutical production[EB/OL]. (2022-05-16)[2025-02-09]. <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/investigating-out-specification-oos-test-results-pharmaceutical-production-level-2-revision>.
- [7] 游赣花, 谭德讲. 探讨药品质量控制过程中 OOS 分析存在的问题[J]. 中国药事, 2015, 29(10):1041-1046. DOI: 10.16153/j.1002-7777.2015.10.009.
YOU G H, TAN D J. On problems of OOS investigations in pharmaceutical quality control[J]. Chin Pharm Aff, 2015, 29(10):1041-1046. DOI: 10.16153/j.1002-7777.2015.10.009.
- [8] 吴贤生, 黄威, 梁勇芬, 等. 实验用猫繁育与应用相关数据的检测分析[J]. 实验动物与比较医学, 2024, 44(4):428-435. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.033.
WU X S, HUANG W, LIANG Y F, et al. Analysis of breeding and application data for laboratory cats[J]. Lab Anim Comp Med, 2024, 44(4):428-435. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.033.
- [9] 陈鸿婷, 杨斐, 胡樱. 环境丰富对英国短毛猫应激相关指标的改善作用[J]. 实验动物与比较医学, 2022, 42(2): 152-158. DOI:10.12300/j.issn.1674-5817.2021.130.
CHEN H T, YANG F, HU Y. Improving effect of environmental enrichment on stress-related indicators of British-shorthair cats[J]. Lab Anim Comp Med, 2022, 42(2): 152-158. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2021.130.
- [10] 陈军, 王亮, 邱泽文, 等. 实验用猫的应用及标准化[J]. 实验动物科学, 2021, 38(6): 80-84. DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2021.06.016.
CHEN J, WANG L, QIU Z W, et al. Application and standardization of laboratory cats[J]. Lab Anim Sci, 2021, 38(6):80-84. DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2021.06.016.
- [11] 何善逢, 阳朝伟, 张浪, 等. 野生猫科动物复合麻醉的探究[J]. 广东畜牧兽医科技, 2024, 49(1):77-81. DOI: 10.19978/j.cnki.xmsy.2024.01.11.
HE S K, YANG C W, ZHANG L, et al. A research of combined anesthesia in wild felids[J]. Guangdong J Anim Vet Sci, 2024, 49(1):77-81. DOI: 10.19978/j.cnki.xmsy.2024.01.11.
- [12] YUN W J, SHIN M, JUNG S, et al. Deep reinforcement learning-based propofol infusion control for anesthesia: a feasibility study with a 3000-subject dataset[J]. Comput Biol Med, 2023, 156: 106739. DOI: 10.1016/j.compbimed.2023.106739.
- [13] 陈卫平, 周连发. 清醒猫与乌拉坦麻醉猫的心电图比较[J]. 动物学杂志, 1993, 28(2):17-23. DOI: 10.13859/j.cjz.1993.02.007.
CHEN W P, ZHOU L F. Comparison of ECG between awake cats and urethane anesthetized cats[J]. Chin J Zool, 1993, 28(2):17-23. DOI: 10.13859/j.cjz.1993.02.007.
- [14] 许幸, 吴新民. 麻醉中药物的相互作用[J]. 中国医院用药评价与分析, 2001, 1(1): 44-45. DOI: 10.14009/j.issn.1672-2124.2001.01.026.
XU X, WU X M. On the interactions between drugs during anesthesia[J]. Eval Anal Drug Use Hosp China, 2001, 1(1):44-45. DOI: 10.14009/j.issn.1672-2124.2001.01.026.
- [15] 郑敏, 李军, 吴有华, 等. 宠物手术的吸入麻醉流程及注意事项[J]. 贵州畜牧兽医, 2020, 44(5):56-58. DOI: 10.3969/j.issn.1007-1474.2020.05.018.
ZHENG M, LI J, WU Y H, et al. Inhalation anesthesia

- procedure and precautions for pet surgery[J]. Guizhou J Anim Husb Vet Med, 2020, 44(5):56-58. DOI: 10.3969/j.issn.1007-1474.2020.05.018.
- [16] 洪花, 韩诚敏, 李志满, 等. 降压物质检查中家猫的麻醉方法初探[J]. 实验动物科学, 2010, 27(5):71-73. DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2010.05.022.
- HONG H, HAN C M, LI Z M, et al. A primary study of anesthesia in domestic cats during testing of antihypertensive substances[J]. Lab Anim Sci, 2010, 27(5):71-73. DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2010.05.022.
- [17] 国家质量监督检验检疫总局, 国家标准化管理委员会. 数值修约规则与极限数值的表示和判定: GB/T 8170—2008[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.
- General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine, National Standardization administration. Rules of rounding off for numerical values & expression and judgement of limiting values: GB/T 8170-2008[S]. Beijing: Standards Press of China, 2008.
- [18] 贾瑞波, 卢丹, 李宪刚, 等. 药品检验机构不合格结果调查的实践与探讨[J]. 中国医药工业杂志, 2023, 54(11):1676-1679. DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2023.11.019.
- JIA R B, LU D, LI X G, et al. Practice and discussion of out-of-specification result investigation in institutes for drug control [J]. Chin J Pharm, 2023, 54(11):1676-1679. DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2023.11.019.
- [19] 张姮婕, 刘雅丹, 马晶, 等. 基于 WHO 疫苗国家监管体系评估等标准和指南要求对 OOS 分析工作的思考[J]. 中国食品药品监管, 2024(5):70-77. DOI 10.3969/j.issn.1673-5390.2024.05.008.
- ZHANG H J, LIU Y D, MA J, et al. Consideration on OOS analysis work based on the requirements of WHO benchmarking of the assessment of the national regulatory authority for vaccines[J]. China Food Drug Adm Mag, 2024(5):70-77. DOI 10.3969/j.issn.1673-5390.2024.05.008.
- [20] 吴畅, 李晓洁, 吴殷因, 等. 离体豚鼠回肠法应用于骨肽类注射剂中组胺类物质检测[J]. 实验动物与比较医学, 2022, 42(2):159-165. DOI:10.12300/j.issn.1674-5817.2021.082.
- WU C, LI X J, W Y N, et al. Application of isolated guinea pig ileum method for detection of histamine substances in osteopeptide injections[J]. Lab Anim Comp Med, 2022, 42(2):159-165. DOI:10.12300/j.issn.1674-5817.2021.082.

(收稿日期: 2024-10-08 修回日期: 2025-02-12)

(本文责任编辑: 丁宇菁)

【引用本文】

- 童希洋, 阙昌田, 张峰, 等. 降压物质检查结果超过质量标准规定的常见原因分析[J]. 实验动物与比较医学, 2025, 45(3): 331-339. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.143.
- TONG X Y, QUE C T, ZHANG F, et al. Analysis of common causes of out-of-specification results in the test for depressor substances [J]. Lab Anim Comp Med, 2025, 45(3): 331-339. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.143.

《实验动物与比较医学》关于使用生成式人工智能的政策说明

生成式人工智能 (generative artificial intelligence, GenAI) 是指具有文本、图片、音频、视频、数据、代码、模式等内容生成能力的模型及相关技术, 近年来正在飞速发展, 并对学术研究及出版产生影响。鉴于目前的 GenAI 技术和模型尚不成熟, 不具备专业评估能力, 且存在侵权和泄密风险, 因此为确保出版论文的原创性、真实性、准确性及透明性, 并严密防范学术不端风险, 《实验动物与比较医学》编辑部借鉴国际医学期刊编辑委员会 (ICMJE) 推荐规范以及国内兄弟期刊的相关规定, 对本刊作者投稿和同行评议审稿过程中使用 GenAI 的政策说明如下。

1. GenAI 及其产品、团队等不能列为论文作者, 署名作者必须是能够为论文内容及相关信息材料负责的自然人。

2. GenAI 生成内容不能列为参考文献进行引用。作者有责任准确引用真实的权威性原始文献, 并核实所引用文献信息及对应内容。

3. 作者不能使用 GenAI 技术改变或操纵研究过程及结果, 不能用于撰写整篇论文或其重要部分 (如方法、结果和讨论分析等), 也不能用于数据、图表和音视频生成, 否则将被视为学术不端行为。

4. 作者如果使用了 GenAI 技术辅助科研或写作 (如数据整理、语言润色、文献检索等), 则必须仔细核查相关内容, 并在“材料与方法”或文末“作者贡献声明”处详细写明其使用及核查情况, 投稿时也须如实备注声明并提交相关补充材料。

示范: [作者贡献声明] XX 作者使用 [GenAI 具体工具/平台名称及版本号] 来 [使用目的及方法, 含提示词], 生成了 [论文中哪些部分或内容]; XX 作者对 GenAI 生成内容进行专业审查把关和修改, 并对文中相关内容承担全部责任。

5. 同行评审专家、期刊编委及编辑禁止使用 GenAI 技术进行稿件审理和修改, 未经允许不得将稿件及补充材料上传到通用 GenAI 平台。所有三审三校意见必须人工生成、专业判断, 并由审者和编者负责。当审稿人质疑作者违反本规定使用 GenAI 时, 应在评审意见中如实告知编辑部。

6. 作者如违反上述 GenAI 使用规定, 将被列入本刊失信作者名单, 并直接退稿或撤稿。审稿人和编辑未经允许使用 GenAI 导致信息泄露或侵权等后果, 将被禁止参与本刊审稿和出版工作, 并承担相应责任。

本规定自发布之日起施行, 并将随着 GenAI 技术发展, 适时调整更新。

《实验动物与比较医学》编辑部



刘光亮, 博士, 研究员, 博士生导师, 中国农业科学院“青年英才计划”入选者。现任兰州兽医研究所猪禽黏膜免疫团队首席科学家、科技管理处处长、学术委员会及学位委员会委员, 兼任海南地方猪资源保护与利用创新团队带头人。同时是中国免疫学会高级会员、美国病毒学会会员、中国细胞生物学会永久会员, 中国生物化学与分子生物学学会分子免疫学分会委员、中国畜牧兽医学会兽医生物技术分会理事、兽医公共卫生学分会理事、甘肃省免疫学会感染免疫与防控专业委员会主任委员、甘肃省免疫学会青年专业委员会副主任委员。兼任科技部、北京市、河北省、江西省及甘肃省科技厅等项目评审专家, 教育部学位中心论文评审专家, 美国科学基金委博士科研奖学金项目评审专家, 国内外多家著名学术期刊特邀审稿专家。主要从事猪消化道感染与黏膜免疫学研究, 主持国家重点研发计划项目、国家自然科学基金资助项目、海南省重大科技计划等课题10余项; 在 *J Virol*、*J Immunol*、*FASEB J*、*Transboundary Emerging Dis* 等学术期刊发表研究论文50余篇, 被引用1200余次; 授权发明专利6项; 获吉林省科技进步二等奖1项(排名第二); 编著(主编)《兽医免疫学实验指导》等专业教材类图书。

五指山猪 MHC II 类分子基因鉴定与分析

刘园园^{1,2}, 辛文水², 晁哲², 曹宗喜^{1,2}, 蔡艺菲³, 李强^{1,2}, 李凌伟^{1,2}, 刘光亮^{1,2,3}

(1. 新疆农业大学动物医学学院, 乌鲁木齐 830052; 2. 海南省农业科学院畜牧兽医研究所, 海南省热带动物繁育与疫病研究重点实验室, 海口 571100; 3. 中国农业科学院兰州兽医研究所, 兰州 730046)

[摘要] **目的** 获得五指山猪主要组织相容性复合体 (major histocompatibility complex, MHC) II 类分子基因序列, 并分析其遗传信息, 探究五指山猪 MHC 的生物学功能。**方法** 采集3头成年雄性五指山猪的脾脏样本, 根据 MHC II 类分子基因序列设计引物, 采用 RT-PCR 法扩增五指山猪 MHC II 类分子基因的编码序列, 通过 Sanger 测序确定 MHC II 类分子基因序列, 利用生物信息学软件分析五指山猪 MHC II 类分子基因的理化性质、系统进化关系、保守基序和结构域, 以及染色体位置和共线性关系。**结果** 共鉴定出8个五指山猪 MHC II 类分子基因, 分别为 *SLA-DRA*、*SLA-DQA*、*SLA-DQB*、*SLA-DRB*、*SLA-DOB*、*SLA-DMB*、*SLA-DMA* 和 *SLA-DOA*。Sanger 测序后确定 MHC II 类分子基因序列, 并将序列上传至 GenBank 获得登录号, 分别为 PQ182796、PQ182797、PQ182798、PQ182799、PQ182800、PQ182801、PQ182802 和 PQ164779。系统进化树分析表明, 五指山猪6个 MHC II 类分子基因与杜洛克猪、梅山猪、大白猪和巴马猪等不同品种猪的 MHC II 类分子基因不在同一个分支上。生物信息学分析表明, MHC II 类分子大部分为疏水性蛋白, 其相对分子质量为 27 700 ~ 30 000, 归于同一亚区的基因含有相似的保守基序, 其中 *SLA-DQB*、*SLA-DRB*、*SLA-DOB* 和 *SLA-DMB* 基因编码的4个 MHC II 类分子包含 MHC II β 保守结构域, *SLA-DRA*、*SLA-DQA*、*SLA-DMA* 和 *SLA-DOA* 基因编码的4个 MHC II 类分子包含 MHC II α 保守结构域。8个 MHC II 类分子基因散在分布于五指山猪的7号染色体长臂上, 与人的3个基因之间具有共线性关系, 而与杜洛克猪的5个基因之间呈现共线性关系。**结论** 五指山猪的 MHC II 类分子基因可能具有特殊的遗传学起源。

[关键词] 五指山猪; 主要组织相容性复合体; 生物信息学; 基因序列

[中图分类号] Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2025)03-0340-09



Identification and Analysis of MHC II Genes in Wuzhishan Pigs

LIU Yuanyuan^{1,2}, XIN Wenshui², CHAO Zhe², CAO Zongxi^{1,2}, CAI Yifei³, LI Qiang^{1,2}, LI Lingwei^{1,2},

LIU Guangliang^{1,2,3}

(1. College of Veterinary Medicine, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, China; 2. Hainan Provincial Key Laboratory of Tropical Animal Breeding and Disease Research, Institute of Animal Husbandry and Veterinary

[基金项目] 海南省重大科技计划“五指山猪实验动物模式化研究”(ZDKJ2021030); 科技部重点研发计划“发育和代谢疾病猪突变品系资源库的建立”(2021YFA0805905); 国家重点研发计划课题“异种移植供体猪保障培育体系建立”(2023YFC3404302)

[第一作者] 刘园园(1996—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 预防兽医学。E-mail: 3125177841@qq.com

[通信作者] 刘光亮(1975—), 男, 博士, 研究员, 博士生导师, 研究方向: 猪消化道感染与黏膜免疫。E-mail: LiuGuangliang01@caas.cn。ORCID: 0000-0001-8185-5749

Medicine, Hainan Academy of Agricultural Sciences, Haikou 571100, China; 3. Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730046, China)

Correspondence to: LIU Guangliang (ORCID: 0000-0001-8185-5749), E-mail: LiuGuangliang01@caas. cn

[ABSTRACT] Objective To obtain the gene sequences of major histocompatibility complex (*MHC*) II genes of Wuzhishan pigs, analyze their genetic information, and explore the biological functions of their *MHC* system. **Methods** Spleen samples were collected from 3 adult male Wuzhishan pigs. Primers were designed according to *MHC* II gene sequences, and the coding sequences of Wuzhishan pig *MHC* II genes were amplified by RT-PCR. Sanger sequencing was performed to determine the full-length sequences. Bioinformatics tools were employed to analyze the physicochemical properties, phylogenetic relationships, conserved motifs, structural domains, chromosomal localization, and syntenic relationships of these genes. **Results** Eight *MHC* II genes were identified in Wuzhishan pigs, designated as *SLA-DRA*, *SLA-DQA*, *SLA-DQB*, *SLA-DRB*, *SLA-DOB*, *SLA-DMB*, *SLA-DMA* and *SLA-DOA*. The full-length sequences of these genes were determined by Sanger sequencing and subsequently deposited in GenBank under accession numbers PQ182796, PQ182797, PQ182798, PQ182799, PQ182800, PQ182801, PQ182802, and PQ164779. Phylogenetic analysis showed that the six *MHC* II genes of Wuzhishan pigs clustered separately from their counterparts in Duroc, Meishan, Large White, and Bama pigs, indicating distinct evolutionary trajectories. Bioinformatics analysis demonstrated that most *MHC* II proteins were hydrophobic, with molecular weights ranging from 27 700 to 30 000 Da. Genes within the same subregion shared conserved motifs. Specifically, four *MHC* II proteins encoded by *SLA-DQB*, *SLA-DRB*, *SLA-DOB*, and *SLA-DMB* contained the *MHC* II β conserved domain, while those encoded by the genes *SLA-DRA*, *SLA-DQA*, *SLA-DMA*, and *SLA-DOA* contained the *MHC* II α conserved domain. The eight *MHC* II genes were scattered along the long arm of chromosome 7 in the Wuzhishan pigs, exhibiting syntenic relationships with three human genes and five Duroc pig genes. **Conclusion** The *MHC* II genes of Wuzhishan pigs may possess a unique evolutionary origin.

[Key words] Wuzhishan pigs; Major histocompatibility complex; Bioinformatics; Gene sequence

猪是养殖范围最广的动物之一。猪的生理结构和解剖特征与人类存在高度相似性^[1],使其能够成为当代生物医学研究领域(尤其是移植生物学领域)的大型模式动物^[2-4]。五指山猪以其体型小、性成熟早、遗传性状稳定等优势,成为培育实验用猪的理想猪种^[5-6]。目前,五指山猪已被广泛用于糖尿病^[7]、动脉粥样硬化^[8]、过敏^[9]和异种移植^[10]等研究。1996年,冯书堂等通过对比五指山猪与人类的器官生理指标,发现五指山猪器官不仅与人类的大小相近,而且解剖生理结构也与人类相似^[11-12],提示五指山猪这一小型猪近交系是人类比较医学和器官移植用的理想素材。

猪的主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, *MHC*)也称猪白细胞抗原(swine leukocyte antigen, *SLA*),其相关基因座位于猪的7号染色体^[13],主要由3个部分组成:*MHC* I、*MHC* II和*MHC* III。*MHC* I和*MHC* III类分子的编码基因座位于7p1.1,*MHC* II类分子的编码基因座位于7q1.1^[14]。*MHC*相关基因座长度为2.4~2.7 Mb,共包

含约150个基因,其中至少有120个基因被预测具有生物学功能^[15]。*MHC* I类、*MHC* II类和*MHC* III类分子的编码基因区域跨度分别约为1.1 Mb、0.5 Mb和0.7 Mb^[16]。I类和II类区域分别包含编码*MHC* I类和II类分子的基因序列,以及多个具有不同功能的非*MHC*基因。III类区域位于I类和II类区域之间,不包含*MHC*基因,但包含关键的免疫相关基因。

MHC II类分子的主要功能包括参与外源性抗原的递呈、胸腺内CD4⁺T细胞的分化和发育、免疫应答调节、移植排斥反应和作为CD4⁺T细胞的识别分子^[17]。*MHC*参与移植后免疫耐受的形成,是引起急性及慢性移植排斥反应的关键分子,同时也是影响移植物功能状态和存活期限的最重要变量。

本研究采用反转录PCR(reverse transcription-PCR, RT-PCR)扩增五指山猪*MHC* II类分子的基因序列,并通过Sanger测序确定*MHC* II类分子的基因序列。在此基础上,利用生物信息学方法,针对五指山猪全基因组数据,系统分析了*MHC* II类分子的蛋白质理化性质、系统进化关系、保守结构域、基序(motif)

特征以及染色体位置等。本研究旨在为五指山猪免疫系统的研究提供重要的数据支撑，为深入研究五指山猪免疫应答过程中MHC的生物学功能提供基础数据，并为疫苗开发、疾病防治、新型实验动物模型的建立以及人兽共患疾病研究提供新思路。

1 材料与方法

1.1 实验动物

本研究选用的3头12月龄雄性非亲缘五指山猪来自海南省农业科学院畜牧兽医研究所[SCXK(琼)2014—0006]的国家级五指山猪保种场。所有五指山猪在饲养期间自由饮水，并饲喂自制猪饲料。实验开展前，经过全面的健康检查确认实验对象均无异常，然后采用电击后放血法安乐死动物，获取其脾脏组织。本研究方案通过海南省农业科学院畜牧兽医研究所实验动物伦理委员会审批(获批时间为2024年5月1日)，所有实验操作均在该单位实验室内进行，符合实验动物福利伦理审查要求。

1.2 主要试剂与仪器

HiScript IV 第一链 cDNA 合成试剂盒(+gDNA wiper)(R412)购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司；PrimeSTAR HS DNA 聚合酶试剂盒(R010A)购自

宝生物工程(大连)有限公司；TransZol Up Plus RNA 试剂盒(ER501)购自北京全式金生物技术股份有限公司；RePure-A(384)梯度PCR仪购自杭州柏恒科技有限公司；EPS-300电泳仪和Tanon-4600SF普通凝胶成像系统购自上海天能科技有限公司；MH15K-230904010微量高速离心机购自聘克仪器(上海)有限公司；NanoDrop ONE微量分光光度计购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司。

1.3 引物设计与合成

本研究中引物的设计是基于NCBI数据库中已公开的猪MHC II类分子的基因序列信息，通过Primer-BLAST工具进行设计，确保引物特异性和扩增效率，可扩增完整的基因编码序列(coding sequence, CDS)。具体引物序列和扩增条件见表1，由北京擎科生物科技股份有限公司合成。

1.4 MHC II类分子的基因PCR扩增与电泳鉴定

按照TransZol Up Plus RNA 试剂盒说明书步骤提取五指山猪脾脏组织的总RNA，经分光光度计检测其浓度后，将RNA产物按照HiScript IV 第一链cDNA合成试剂盒(+gDNA wiper)说明书步骤反转录成cDNA，cDNA产物置于-40℃冰箱保存。经分光光度计检测cDNA浓度后，将其与表1中的每对引物分别混合制备

表1 主要组织相容性复合体基因的PCR扩增引物信息

Table 1 Information on PCR primers for amplification of major histocompatibility complex (MHC) genes

引物名称 Primer name	引物序列(5' to 3') Primer sequence(5' to 3')	扩增片段长度/bp Amplicon size /bp	退火温度/℃ Annealing temperature/℃
SLA-DRA-F	GCTTGTATTGCTGTCCATCC	851	55
SLA-DRA-R	CAAAGTCCATTCCTGCAAG		
SLA-DQA-F	ATGGTCCCAGGCCGAGTT	768	55
SLA-DQA-R	TCACAAGGACCCCTTGGTGTC		
SLA-DQB-F	CCATTACTTCTTCGTTTGCCC	995	55
SLA-DQB-R	GAAGAAGCTTCACAGCCAGAG		
SLA-DRB-F	CACACTGCCTCTCTGTTC	886	58
SLA-DRB-R	CTCATGCTGTGAAGACGCTG		
SLA-DOB-F	CCTCATTTTCTTTTCCCCCTCC	926	55
SLA-DOB-R	GGAATCATCCAGAACATCGACC		
SLA-DMB-F	CCGCTCAGTGTGGAGAT	967	55
SLA-DMB-R	CCATACGAGACCAAATTGCC		
SLA-DMA-F	GGACCTGGGTTAGCTAGTTAG	1028	55
SLA-DMA-R	ACATGGCAGTGATGTCGTAGG		
SLA-DOA-F	GGTTAAAACACCAGAGGGCC	807	55
SLA-DOA-R	GTCTCTCTCACATCCCAGCC		

注：SLA，猪白细胞抗原，也称主要组织相容性复合体(MHC)；F，正向引物；R，反向引物。

Note: SLA refers to the swine leukocyte antigen, also named as major histocompatibility complex (MHC). F indicates the forward primer; R indicates the reverse primer.

反应体系 (含 PrimeSTAR HS DNA 聚合酶 0.5 μL 、5 \times PrimeSTAR 缓冲液 10 μL 、dNTP 混合物 4 μL 、上下游引物各 1.0 μL 、cDNA 模板 1.0 μL 、去 RNA 酶水 32.5 μL)，进行 MHC II 类分子 8 个目的基因的 PCR 扩增。PCR 程序：98 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s，55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 5 s，72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min，循环 35 次。最后，利用琼脂糖凝胶电泳对 PCR 扩增产物进行分离与鉴定。

1.5 DNA 序列测定及比对分析

将琼脂糖凝胶电泳初步鉴定后的扩增产物送至北京擎科生物科技股份有限公司进行 Sanger 测序。使用 SnapGene 软件查看测序结果，并将本次测序结果与 NCBI 数据库中已公开的猪 MHC II 类分子的基因序列，以及海南省农业科学院畜牧兽医研究所已建五指山猪数据库中的 MHC II 类分子基因进行比对。

1.6 MHC II 类分子基因的进化树分析

利用 MEGA7 Version 软件，将已鉴定的 MHC II 类分子基因的 CDS 与 NCBI 数据库上公布的智人 (*Homo sapiens*)、食蟹猴 (*Macaca fascicularis*)、牛 (*Bos taurus*)、犬 (*Canis lupus familiaris*) 和猪 (*Sus scrofa* 11.1) 的 MHC II 类分子基因进行多序列比对，并采用最大似然法构建无根系统发育进化树。

1.7 MHC II 类分子的理化性质分析

利用 SnapGene 软件和 PSIPRED 工具 (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred>) 分析 MHC II 类分子的氨基酸残基数量、相对分子质量、理论等电点和亲水性等理化性质。

1.8 MHC II 类分子的保守基序和结构域分析

利用在线工具 MEME (<https://meme-suite.org/meme/tools/meme>) 对 MHC II 类分子的基序进行分析 (参数为：最大基序数量设为 10，最佳基序宽度设为 6~50 个氨基酸残基)。利用 TBtools 可视化分析 MHC II 分子的基序。使用 Batch CD-Search 工具 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/bwrpsb/bwrpsb.cgi>) 预测保守结构域，利用 TBtools 可视化分析 MHC II 类分子的保守结构域。

1.9 MHC II 类分子基因的染色体定位和共线性分析

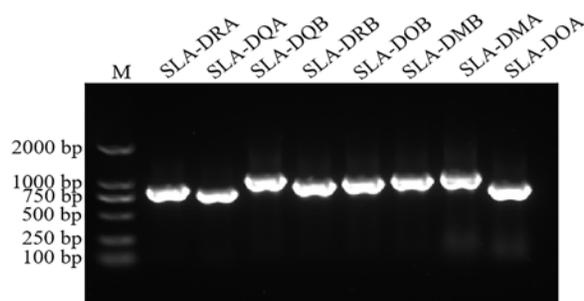
利用 TBtools 软件，从数据集中获取了五指山猪 7 号染色体的数据，基于该数据确定五指山猪 MHC II 类分子基因在染色体上的位置并进行可视化分析。使用 TBtools 软件分析五指山猪 7 号染色体与杜洛克猪 (*Sus scrofa*) 7 号染色以及智人 (*Homo sapiens*) 6 号染色体的共线性关系。

2 结果

2.1 五指山猪脾脏组织中 MHC 基因扩增成功

提取的五指山猪脾脏组织总 RNA 经微量分光光度计检测 RNA 浓度为 803 ng/ μL ，A260/A280 为 2.03。反转录获得的 cDNA 经分光光度计检测，cDNA 的浓度为 1 224.8 ng/ μL ，A260/A280 为 1.68。

以 cDNA 为模板，RT-PCR 结果显示，编码 MHC II 类分子的 *SLA-DRA*、*SLA-DQA*、*SLA-DQB*、*SLA-DRB*、*SLA-DOB*、*SLA-DMB*、*SLA-DMA* 和 *SLA-DOA* 基因扩增产物经琼脂糖凝胶电泳后，各目的条带的大小符合预期，且产物单一 (图 1)。



注：SLA，猪白细胞抗原，也称主要组织相容性复合体。M，DNA 分子量标准 2000。

Note: SLA refers to the swine leukocyte antigen [also named as major histocompatibility complex (MHC)]. M denotes the DNA molecular weight marker (2000 bp ladder).

图 1 五指山猪脾脏组织中 MHC II 类分子基因的 PCR 结果

Figure 1 PCR results of MHC II genes in spleen tissues of Wuzhishan pigs

2.2 五指山猪脾脏组织中 MHC 基因序列比对一致

将所扩增的 *SLA-DRA*、*SLA-DQA*、*SLA-DQB*、*SLA-DRB*、*SLA-DOB*、*SLA-DMB*、*SLA-DMA* 和 *SLA-DOA* 基因产物的 Sanger 测序结果与 NCBI 数据库中猪 MHC II 类分子基因的 CDS 进行比对，结果显示，所获得的片段序列与猪 MHC 基因的 CDS 结果基本一致。将其完整序列上传至 NCBI 数据库，获得 GenBank 登录号分别为 PQ182796、PQ182797、PQ182798、PQ182799、PQ182800、PQ182801、PQ182802 和 PQ164779。

2.3 五指山猪 MHC II 类分子基因的进化分支

利用 MEGA7 Version 软件在五指山猪染色体水平上共鉴定出 8 个 MHC II 类分子基因，将其与智人、食

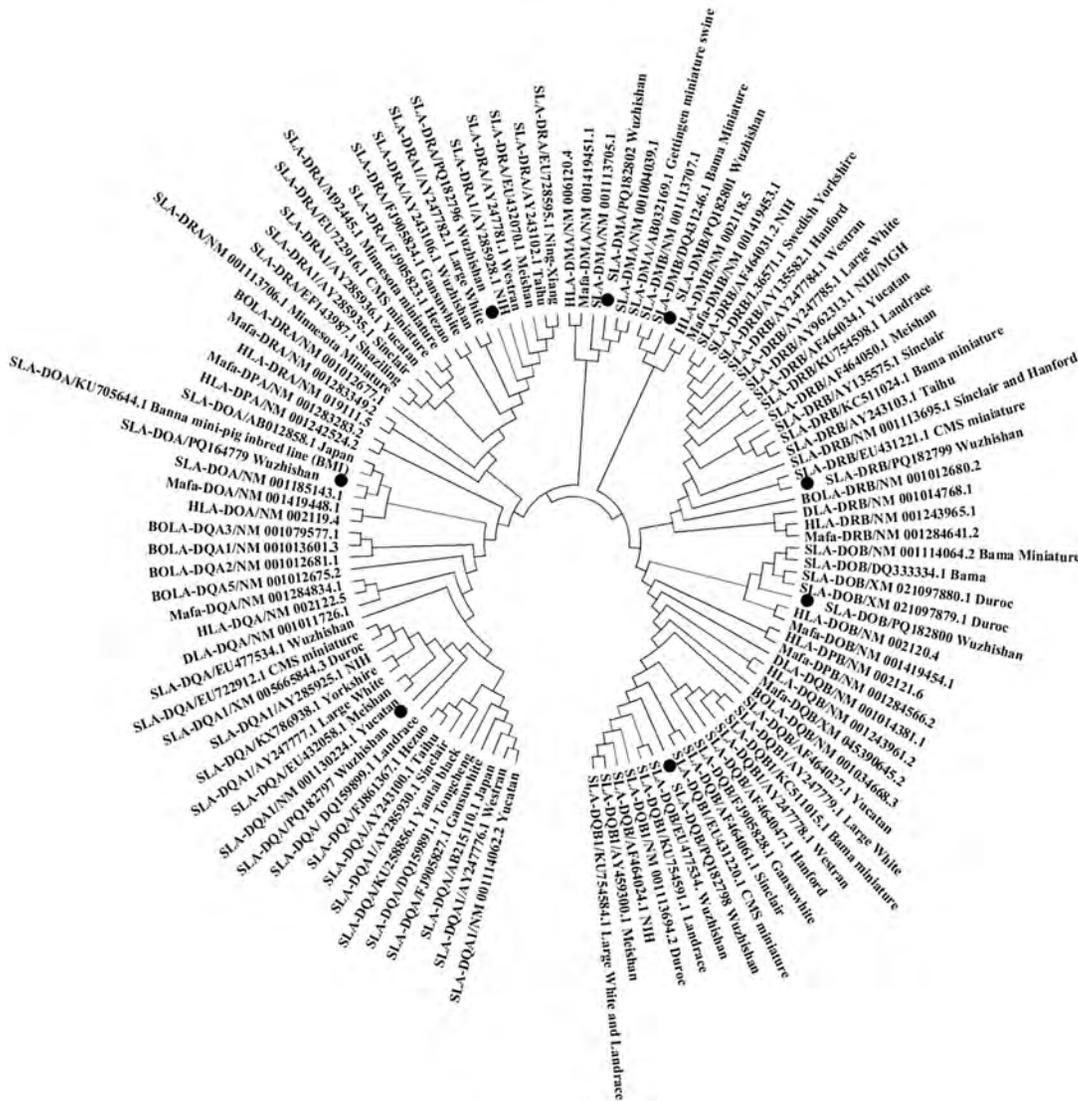
蟹猴、牛、犬和杜洛克猪的MHC II类分子基因的CDS序列进行比对, 结果表明 *SLA-DRA* (PQ182796)、*SLA-DQA* (PQ182797)、*SLA-DQB* (PQ182798)、*SLA-DOB* (PQ182800)、*SLA-DMB* (PQ182801) 和 *SLA-DMA* (PQ182802) 在猪种内单独成为一个分支; *SLA-DRB* (PQ182799) 和 *SLA-DRB/EU431221.1* CMS miniature 分属于同一支, 亲缘关系更近; *SLA-DOA* (PQ164779) 和 *SLA-DOA/NM_001185143.1* 分属于同一支, 亲缘关系更近 (图2)。结果提示, 五指山猪的6个MHC II类分子基因与杜洛克猪、梅山猪、大白猪和巴马猪等不同品种猪的MHC II类分子基因不在同一个分支上。

2.4 五指山猪 MHC II 类分子的理化性质

由表2可知, 8个基因所编码的MHC II类分子由250~272个氨基酸组成, 相对分子质量范围为27 700~30 000。大部分MHC II类分子的等电点在酸性范围内, 仅有1个成员的等电点在碱性范围内。总的亲水性平均系数 (grand average of hydropathicity, GRAVY) 有2个在负值范围内, 表明MHC II类分子大部分为疏水性蛋白。

2.5 五指山猪 MHC II 类分子的保守基序和保守结构域

MEME工具分析8个MHC II类分子的基序结果表明, 归于同一亚区的基因含有相似的保守基序



注: SLA, 猪白细胞抗原, 也称主要组织相容性复合体。

Note: SLA refers to the swine leukocyte antigen [also named as major histocompatibility complex (MHC)].

图2 五指山猪 MHC II 类分子基因的系统进化树分析

Figure 2 Phylogenetic tree analysis of MHC II genes in Wuzhishan pigs

表2 五指山猪 MHC II 类分子的理化性质分析

Table 2 Physicochemical property analysis of MHC II molecules in Wuzhishan pigs

基因 ID Gene ID	染色体定位 Chromosomal localization	氨基酸长度/aa Amino acid length/aa	相对分子质量, ×10 ³ Relative molecular mass, ×10 ³	等电点 Isoelectric point	亲水性平均系数 Grade average of hydropathicity
<i>SLA-DRA</i>	Chr07	252	28.4	5.03	0.029
<i>SLA-DQA</i>	Chr07	255	28.2	5.53	0.007
<i>SLA-DQB</i>	Chr07	261	29.5	6.97	-0.222
<i>SLA-DRB</i>	Chr07	266	30.0	8.59	-0.135
<i>SLA-DOB</i>	Chr07	264	29.8	5.32	0.024
<i>SLA-DMB</i>	Chr07	272	29.8	5.69	0.027
<i>SLA-DMA</i>	Chr07	260	28.9	4.69	0.152
<i>SLA-DOA</i>	Chr07	250	27.7	6.18	0.016

注: SLA, 猪白细胞抗原, 也称主要组织相容性复合体。

Note: SLA refers to the swine leukocyte antigen [also named as major histocompatibility complex (MHC)].

(图3A), 都包含基序1和2。其中, MHC II类分子 II b 亚区除了 *SLA-DMB* 基因 (仅有基序1和2) 外, 其余3个基因 *SLA-DQB*、*SLA-DRB* 和 *SLA-DOB* 都含有基序1、2、3、4和6, *SLA-DOB* 不含基序10; MHC II类分子的 II a 亚区除了 *SLA-DMA* 基因 (仅有基序1、2和9) 外, 其他的3个分子 *SLA-DRA*、*SLA-DQA* 和 *SLA-DOA* 都含有基序1、2、4、5、7和9, *SLA-DRA* 也不含基序10。

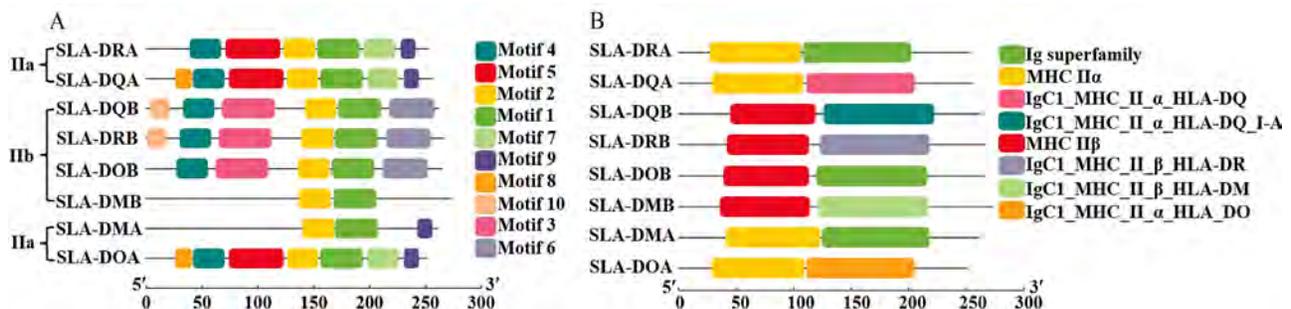
使用 Batch CD-Search 工具对保守结构域进行预测, 发现 *SLA-DQB*、*SLA-DRB*、*SLA-DOB* 和 *SLA-DMB* 这4个基因编码的 MHC II 类分子都包含 MHC II β 保守结构域; *SLA-DRA*、*SLA-DQA*、*SLA-DMA* 和 *SLA-DOA* 这4个基因编码的 MHC II 类分子都包含 MHC II α 保守结构域 (图3B)。MHC II 类分子分属于 II a 和 II b 两个亚区, 与先前文献报告的结果^[18]一致。

2.6 五指山猪 MHC II 类分子基因的染色体定位和共线性关系

通过染色体定位分析发现, 8个 MHC II 类分子基因不均匀地分布在五指山猪的7号染色体上, 具体是染色体长臂上 (7q) (图4A)。利用 TBtools 分析了 MHC II 类分子基因在不同猪种内以及与人之间的共线性关系, 结果表明, 五指山猪的8个基因与人的3个基因之间具有共线性关系, 而与杜洛克猪 (*Sus scrofa*) 的5个基因之间呈现共线性关系 (图4B)。

3 讨论

猪 MHC 于 1970 年被首次鉴定, 是一组紧密连锁、高度多态的编码移植抗原^[15,19]。MHC II 类分子基因分为 II a 和 II b 两个亚区, 分别编码 α 肽链和 β 肽链^[15]。目前, 国内关于五指山猪 MHC II 类分子基因

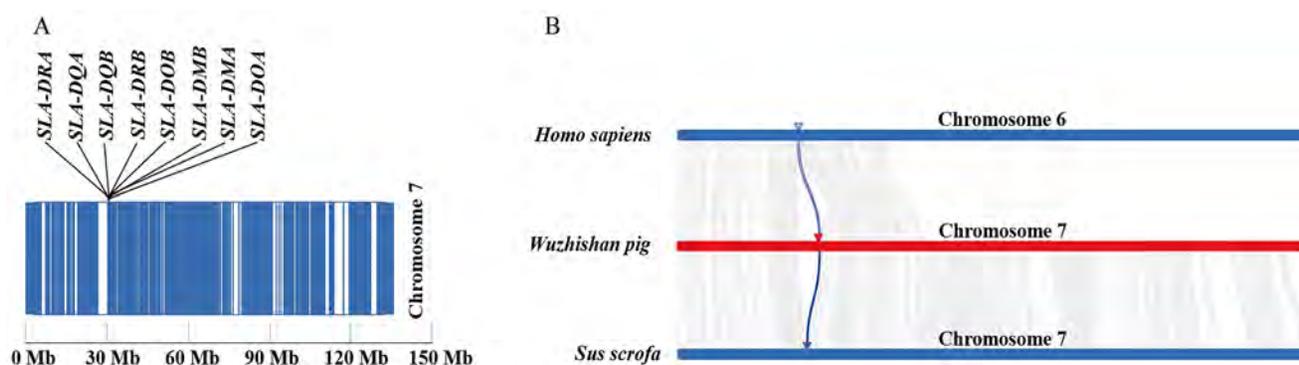


注: 不同颜色的方框代表了不同的保守基序或保守结构域; 横坐标为 MHC II 类分子的氨基酸长度。SLA, 猪白细胞抗原, 也称主要组织相容性复合体。

Note: Colored boxes represent different conserved motifs or conserved domains. The x-axis denotes the amino acid length of MHC II molecules. SLA refers to the swine leukocyte antigen [also named as major histocompatibility complex (MHC)].

图3 五指山猪 MHC II 类分子的保守基序(A)和保守结构域(B)分析

Figure 3 Analysis of conserved motifs (A) and structural domains (B) of MHC II molecules in Wuzhishan pigs



注：人类基因组组装 GRCh38.p12；杜洛克猪基因组组装 Sscrofa11.1；具有共线性的 MHC II 类分子基因为蓝色线条，具有共线性的其他基因为灰色线条。SLA，猪白细胞抗原，也称主要组织相容性复合体。

Note: The human genome assembly used is GRCh38.p12; the Duroc pig genome assembly used is Sscrofa11.1. Genes exhibiting syntenic relationships with MHC class II molecules are depicted as blue lines, while other syntenic genes are represented by gray lines. SLA refers to the swine leukocyte antigen [also named as major histocompatibility complex (MHC)].

图4 MHC II 类分子基因在五指山猪7号染色体上的分布(A)和五指山猪与人及杜洛克猪的MHC II 类分子基因共线性分析(B)
Figure 4 Chromosomal localization of MHC II genes on chromosome 7 in Wuzhishan pigs(A) and syntenic relationship analysis of MHC II genes between Wuzhishan pigs, Homo sapiens and Sus scrofa(B)

的研究大多集中在多态性较高的外显子或单个基因的克隆分析，而对五指山猪MHC II类分子基因CDS全长序列尚不清楚^[12,20-21]。

本研究对五指山猪MHC II类分子基因进行了全基因组的鉴定和较为完整的生物信息学分析，从五指山猪7号染色体数据中筛选并鉴定出8个MHC II类分子基因，其中4个属于II a亚区，4个属于II b亚区，II类基因的分类与先前文献报告的研究结果^[15,18]一致。本研究通过RT-PCR进一步验证了这些基因序列的准确性，发现五指山猪MHC II类分子基因数量与杜洛克猪(NCBI参考序列号为GCF_000003025.6)中MHC II类分子基因数量一致，即II a亚区有4个基因，II b亚区有4个基因，并且MHC II类分子大部分为疏水性蛋白。

系统进化分析结果显示，五指山猪的8个MHC II类分子基因划分为2个亚区。其中，有2个基因分别与实验用小型猪(CMS miniature pig)和NM_001185143.1(NCBI数据库中未注明其物种)的MHC II类分子基因在同一个分支上，表明他们具有很高的同源性；而另外6个MHC II类分子基因并未与杜洛克猪、梅山猪、大白猪和巴马猪等其他品种猪的MHC II类分子基因归于同一分支。在以人HLA-DRA、HLA-DQA、HLA-DQB、HLA-DOB、HLA-DMB、HLA-DMA基因作为参照的情况下，五指山猪的SLA-DRA(PQ182796)、SLA-DQA(PQ182797)、SLA-DQB

(PQ182798)、SLA-DOB(PQ182800)、SLA-DMB(PQ182801)和SLA-DMA(PQ182802)基因在遗传关系上分别位于人对应SLA基因的较远端分支，并各自独立形成一个分支。结果说明，五指山猪与其他MHC II类基因具有相对较远的遗传距离和亲缘关系，是人MHC II类分子基因的一个远系成员，进化比较缓慢。

五指山猪MHC II类分子基因的多态性和功能多样性可能与其对多种疾病的易感性和抗性有关^[19]。已有研究表明，MHC基因与猪的寄生虫病、病毒性病、细菌性疾病，以及呼吸性疾病和皮肤疾病有一定的相关性^[21-22]。未来的研究可以进一步探讨这些基因在不同疾病中的具体作用机制。此外，大量研究表明，鲸、犬、牛、马和猴等动物中都含有MHC-DRB、MHC-DQB和MHC-DQA基因，这意味着这4种基因可能在进化历程中较早出现，而MHC-DRA、MHC-DOB、MHC-DOA、MHC-DMB和MHC-DMA等基因则可能是后续为了适应日益复杂的外部环境(特别是影响动物生长发育的各种因素)而逐渐进化产生的。

对MHC II类分子基因在五指山猪和杜洛克猪间进行共线性分析表明，MHC II类分子基因和同为猪科的杜洛克猪同源基因最多，而和人类之间仅有3个同源基因。这一结果表明，MHC II类分子基因在种属间存在差异性，而在种属内具有高度保守性。研究显示，不同品种的猪有各自独特的生物多样性和遗传稳定性特征，使得不同品种猪的MHC基因表现出不同的多态

性。蛋白的理化性质分析表明,五指山猪8个MHC II类分子的相对分子质量为27 700~30 000,这一范围与猪MHC II类分子的分子量范围基本吻合,从而证实了这些分子是猪MHC II类分子的典型代表。对MHC II类分子的保守基序进行分析时发现,该蛋白的保守基序具有多样性,提示五指山猪MHC II类分子可能在功能上具有一定的多样性。

近年来,随着生物技术和基因组学的快速发展,越来越多的物种中针对MHC II类分子的研究正在逐渐深入。MHC II类分子在免疫应答过程中发挥着关键作用,尤其是在识别和递呈外源性抗原方面。然而,针对MHC II类分子基因编码区全长序列的研究仍然相对较少。本研究首次在全基因组水平上对五指山猪的MHC II类分子基因进行了系统鉴定,识别出了8个特定的MHC II类分子基因。通过RT-PCR验证了其编码序列,结合生物信息学分析获得了这些基因的理化特性。

本研究结果填补了该领域空白,为五指山猪的免疫研究提供了基础数据,为疫苗开发和疾病防治提供了新思路。与以往研究^[12,19,23]相比,本研究从全基因组视角进行系统性分析,提供了更全面的基因组信息。然而,现有研究也存在一定局限性,如样本数量有限和功能验证不足。未来的研究可以进一步探讨这些基因在免疫应答中的具体功能,并且构建疾病模型,探索基因编辑技术在提高五指山猪健康状况和生产性能中的应用。通过对MHC II类分子基因的深入研究,可以为了解人类疾病的免疫机制提供参考,促进人兽共患病的研究,推动疫苗和免疫治疗策略的开发;同时将有助于提高相关动物模型在医学研究中的应用价值,进一步推动兽医学与人类医学的交叉研究进展。

[医学伦理声明 Medical Ethics Statement]

本研究涉及的所有动物实验方案均已通过海南省农业科学院畜牧兽医研究所实验动物伦理委员会的伦理审查批准(获批时间为2024年5月1日)。所有实验操作均严格遵守中国实验动物福利伦理相关法律法规及标准。

All animal experiments involved in this study have been approved by the Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) of the Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine of Hainan Academy of Agricultural Sciences (approval date: May 1st, 2024). All experimental procedures have been carried out in strict accordance with the relevant laws, regulations and standards on animal welfare ethics in China.

[作者贡献 Author Contribution]

刘园园负责引物设计与合成、数据收集整理和统计分析,撰写初稿和修改稿件;

辛文水、晁哲和曹宗喜负责实验设计与评估;

蔡艺菲、李强和李凌伟负责样品采集和处理;

刘光亮负责获取基金资助、实验方案设计,以及稿件审阅和修订。

[利益声明 Declaration of Interest]

所有作者均声明本文不存在利益冲突。

[参考文献 References]

- [1] SWINDLE M M, MAKIN A, HERRON A J, et al. Swine as models in biomedical research and toxicology testing[J]. *Vet Pathol*, 2012, 49(2):344-356. DOI:10.1177/0300985811402846.
- [2] 兰宗宝,王修文,许惠艳. 猪器官异种移植研究进展[J]. *广西农业科学*, 2008, 39(3):380-384. DOI: 10.3969/j.issn.2095-1191.2008.03.030.
LAN Z B, WANG X W, XU H Y. Progress of porcine organs xenotransplantation[J]. *Guangxi Agric Sci*, 2008, 39(3): 380-384. DOI: 10.3969/j.issn.2095-1191.2008.03.030.
- [3] CARRIER A N, VERMA A, MOHIUDDIN M, et al. Xenotransplantation: a new era[J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 900594. DOI:10.3389/fimmu.2022.900594.
- [4] PROSSER A, HUANG W H, LIU L, et al. Dynamic changes to tissue-resident immunity after MHC-matched and MHC-mismatched solid organ transplantation[J]. *Cell Rep*, 2021, 35 (7):109141. DOI:10.1016/j.celrep.2021.109141.
- [5] 冯书堂,戴一凡,章金刚,等. 五指山小型猪近交系异种移植产业化研发进展[J]. *器官移植*, 2018, 9(6):469-473. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7445.2018.06.014.
FENG S T, DAI Y F, ZHANG J G, et al. The progress of xenograft industrialization on Wuzhishan miniature pig inbred line[J]. *Organ Transplant*, 2018, 9(6): 469-473. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7445.2018.06.014.
- [6] 晁哲,李娇伦,秦烨,等. 五指山猪 *SLA-DQA* 和 *SLA-DQB* 基因 SNP 检测及生物信息学分析[J]. *养猪*, 2017(6):57-60. DOI: 10.13257/j.cnki.21-1104/s.2017.06.018.
CHAO Z, LI J L, QIN Y, et al. Detection of single nucleotide polymorphism and bioinformatics analysis of *SLA-DQA* and *SLA-DQB* genes in Wuzhishan pig[J]. *Swine Prod*, 2017(6):57-60. DOI: 10.13257/j.cnki.21-1104/s.2017.06.018.
- [7] NIU M M, LIU Y Q, XIANG L, et al. Long-term case study of a Wuzhishan miniature pig with diabetes[J]. *Animal Model Exp Med*, 2020, 3(1):22-31. DOI:10.1002/ame2.12098.
- [8] ZHAO Y Q, XIANG L, LIU Y Q, et al. Atherosclerosis induced by a high-cholesterol and high-fat diet in the inbred strain of the Wuzhishan miniature pig[J]. *Anim Biotechnol*, 2018, 29(2): 110-118. DOI:10.1080/10495398.2017.1322974.
- [9] HUANG Q, XU H B, YU Z, et al. Inbred Chinese Wuzhishan (WZS) minipig model for soybean glycinin and beta-

- conglycinin allergy[J]. J Agric Food Chem, 2010, 58(8):5194-5198. DOI:10.1021/jf904536v.
- [10] LI X, HUANG Y, LIANG Q F, et al. Local immunosuppression in Wuzhishan pig to *Rhesus* monkey descemet's stripping automated endothelial keratoplasty: an innovative method to promote the survival of xenografts[J]. Ophthalmic Res, 2022, 65(2):196-209. DOI:10.1159/000521193.
- [11] 韦习会, 王林云, 徐银学, 等. 五指山猪白细胞抗原血清学研究[J]. 畜牧兽医学报, 1996(3): 199-206.
WEI X H, WANG L Y, XU Y X, et al. Preliminary serological study on swine lymphocyte antigen (sla) of the Wuzhishan pig [J]. Acta Vet Zootechnica Sin, 1996(3): 199-206.
- [12] 孙俊丽. 五指山猪近交系群体三个白细胞抗原基因序列和功能分析[D]. 咸阳: 西北农林科技大学, 2005.
SUN J L. Analysis of sequence and its function on three swine leucocyte antigen gene in inbreeding line of wuzhishan pig population[D]. Xianyang: Northwest Agriculture and Forestry University, 2005.
- [13] RABIN M, FRIES R, SINGER D, et al. Assignment of the porcine major histocompatibility complex to chromosome 7 by *in situ* hybridization[J]. Cytogenet Cell Genet, 1985, 39(3): 206-209. DOI:10.1159/000132136.
- [14] BARBOSA A, DEMEURE O, URIEN C, et al. A physical map of large segments of pig chromosome 7q11-q14: comparative analysis with human chromosome 6p21[J]. Mamm Genome, 2004, 15(12):982-995. DOI:10.1007/s00335-004-3008-6.
- [15] HAMMER S E, HO C S, ANDO A, et al. Importance of the major histocompatibility complex (swine leukocyte antigen) in swine health and biomedical research[J]. Annu Rev Anim Biosci, 2020, 8: 171-198. DOI: 10.1146/annurev-animal-020518-115014.
- [16] VAIMAN M, CHARDON P, ROTHSCCHILD M F. Porcine major histocompatibility complex[J]. Rev Sci Tech, 1998, 17(1): 95-107. DOI:10.20506/rst.17.1.1093.
- [17] MERKENSCHLAGER J, EKSMOND U, DANELLI L, et al. MHC class II cell-autonomously regulates self-renewal and differentiation of normal and malignant B cells[J]. Blood, 2019, 133(10):1108-1118. DOI:10.1182/blood-2018-11-885467.
- [18] CHARDON P, RENARD C, VAIMAN M. The major histocompatibility complex in swine[J]. Immunol Rev, 1999, 167:179-192. DOI:10.1111/j.1600-065x.1999.tb01391.x.
- [19] 刘丽霞. 三个猪种 SLA-DQA 和 DRA 基因分子遗传特征及其与仔猪腹泻的关联研究[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2015.
LIU L X. Molecular genetic characteristics of *SLA-DQA* and *DRA* genes and their association with piglet diarrhea in three pig breeds[D]. Lanzhou: Gansu Agricultural University, 2015.
- [20] VIRET C, JANEWAY C A Jr. MHC and T cell development[J]. Rev Immunogenet, 1999, 1(1):91-104.
- [21] 吴群, 熊平, 陈实, 等. 近交系海南五指山猪 SLA 经典 I 类和 II 类分子序列分析[J]. 现代免疫学, 2004(1):23-26. DOI: 10.3969/j.issn.1001-2478.2004.01.007.
WU Q, XIONG P, CHEN S, et al. Sequence analysis of classical swine leukocyte antigens (SLA) class I and class II molecules in inbred strain of Chinese Wuzhishan pigs[J]. Curr Immunol, 2004(1):23-26. DOI: 10.3969/j.issn.1001-2478.2004.01.007.
- [22] 常瑞刚, 舒丹, 刘丽霞. SLA-DRB 基因多态性与仔猪腹泻的关联性研究进展[J]. 甘肃畜牧兽医, 2017, 47(6):20-21. DOI: 10.15979/j.cnki.cn62-1064/s.2017.06.002.
CHANG R G, SHU D, LIU L X. Research progress on the correlation between SLA-DRB gene polymorphism and piglet diarrhea[J]. Gansu Anim Husb Vet, 2017, 47(6):20-21. DOI: 10.15979/j.cnki.cn62-1064/s.2017.06.002.
- [23] 顾茂松. 五指山小型猪 SLA-DQA 基因的 SNPs 及猪人 MHC I 类区自然杀伤细胞 KIRs 结合区氨基酸变异的比较分析[D]. 武汉: 华中农业大学, 2005.
GU M S. Single nucleotide polymorphism of *SLA-DQA* gene in wuzhishan miniature pigs and comparison of amino acids variability of NK cell KIRs binding sites between swine and human MHC class I region[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2005.

(收稿日期: 2024-09-18 修回日期: 2024-12-15)

(本文责任编辑: 张俊彦)

[引用本文]

- 刘园园, 辛文水, 晁哲, 等. 五指山猪 MHC II 类分子基因鉴定与分析[J]. 实验动物与比较医学, 2025, 45(3): 340-348. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.135.
- LIU Y Y, XIN W S, CHAO Z, et al. Identification and analysis of *MHC II* genes in Wuzhishan pigs[J]. Lab Anim Comp Med, 2025, 45(3): 340-348. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.135.

实验动物肠道菌群特征分析及性别差异性的研究进展

沈黄奕, 黄宇飞, 杨云鹏

[扬州大学兽医学院(比较医学研究院), 扬州 225009]

[摘要] 实验动物是生命科学研究的基础, 其作为人类生理、病理及疾病治疗的替代模型, 在基础研究、药物开发和转化医学中具有不可替代的作用。肠道菌群是由细菌、真菌、病毒以及单细胞生物等构成的复杂微生物类群, 其定植于宿主肠道内, 与宿主正常生理代谢功能的维持和生命健康密切相关。有研究表明, 肠道菌群组成结构的紊乱可引发肥胖、糖尿病、高血压、炎症性肠病以及阿尔茨海默病等多种疾病。因此, 针对实验动物开展肠道菌群的特征性分析不仅有助于提升实验结果的可靠性, 而且将有助于动物实验结果的转化应用。性别差异是生物学研究中的重要变量, 其对实验动物的生理功能、代谢特征及肠道菌群组成均具有显著影响。然而, 研究人员在较多生物学研究中存在明显的实验动物性别偏好性, 这极大地限制了研究结果的普适性。本文对小鼠、大鼠、豚鼠、仓鼠、兔、犬、猫、非人灵长类动物、小型猪和鸡这10种生命科学实验中常用的实验动物的肠道菌群组成结构特征进行归纳总结, 并对部分实验动物肠道菌群的性别差异进行分析。此外, 针对实验动物与人类肠道菌群的对比分析, 还为基于实验动物的比较医学研究提供了新视角。综上, 相关研究成果在加深科研人员对不同实验动物肠道菌群特征及其性别差异性认识的同时, 也将为科学研究中实验动物的选用、性别特异性疾病动物模型的构建和结果分析提供指导和借鉴。

[关键词] 肠道菌群; 实验动物; 性别差异

[中图分类号] R-332; Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2025)03-0349-11



Research Progress on Characteristics Analysis of Gut Microbiota and Its Sex Differences in Laboratory Animals

SHEN Huangyi, HUANG Yufei, YANG Yunpeng

[College of Veterinary Medicine (Institute of Comparative Medicine), Yangzhou University, Yangzhou 225009, China]

Correspondence to: YANG Yunpeng (ORCID: 0000-0001-5163-0940), E-mail: ypyang@yzu.edu.cn

[ABSTRACT] Laboratory animals serve as the cornerstone in life science research, acting as surrogate models for human physiology, pathology, and disease treatment. They play an irreplaceable role in basic research, drug development, and translational medicine. Gut microbiota, a complex microbial community comprising bacteria, fungi, viruses, and unicellular organisms, colonizes the host's intestinal tract and is closely associated with the maintenance of normal physiological metabolism and overall health. Studies have shown that dysbiosis of the gut microbiota can lead to various diseases, including obesity, diabetes, hypertension, inflammatory bowel disease, and Alzheimer's disease. Therefore, conducting characteristic analyses of the gut microbial composition of laboratory animals can not only enhance the reliability of experimental outcomes but also facilitate their translational application. Sex differences represent a critical variable in biological research, significantly influencing the physiological functions, metabolic traits, and gut microbial composition of laboratory animals. However, a pronounced sex bias has been widely observed in many biological studies, thereby limiting the generalizability of results. This study focused on

[第一作者] 沈黄奕(2003—),女,本科生,研究方向:实验动物和肠道微生物。E-mail: shenhuangyi08@163.com

[通信作者] 杨云鹏(1988—),男,博士,副研究员,硕士生导师,研究方向:实验动物模型构建及肠道微生物-宿主互作机制解析。E-mail: ypyang@yzu.edu.cn。ORCID: 0000-0001-5163-0940

ten commonly used laboratory animals in life sciences, including mice, rats, guinea pigs, hamsters, rabbits, dogs, cats, non-human primates, miniature pigs, and chickens. Their gut microbial composition was summarized and related sex-specific differences of certain species were analyzed. Furthermore, by comparing the gut microbiota of laboratory animals with that of humans, this study offers novel perspectives for comparative medical research. In summary, this study not only deepens researchers' understanding of gut microbiota characteristics and sex-dependent variations across laboratory animal species but also provides practical guidance for selecting appropriate laboratory animals, constructing sex-specific disease models, and interpreting experimental results in scientific studies.

[Key words] Gut microbiota; Laboratory animals; Sex difference

肠道菌群是定植在宿主肠道中数量众多的微生物类群, 主要包括细菌、真菌、病毒以及其他单细胞生物等。研究表明, 肠道微生物与结肠炎、非酒精性脂肪肝、尿毒症、动脉粥样硬化、神经退行性疾病以及肿瘤等疾病的发生、发展进程密切相关^[1-6]。随着肠道微生物与宿主生理代谢关系的解析, 肠道微生物作为影响宿主健康的关键因子受到越来越多研究者的广泛关注。

生命科学研究中常用的实验动物包括: 小鼠、大鼠、豚鼠、仓鼠、兔、犬、猫、非人灵长类、小型猪和鸡等。近些年, 科研人员开展了一系列肠道菌群测序工作, 已较为清楚地了解了上述实验动物的肠道菌群特征。其中, 性别差异是影响实验动物肠道菌群组成结构的重要因素。然而, 在当前的实验动物相关科学研究中, 部分科研工作者对实验动物肠道菌群特征及性别差异的重视程度仍较为欠缺。因此, 本文聚焦生命科学实验中常用的实验动物, 对其肠道微生物的组成结构特征及性别差异性进行归纳总结。在此基础上, 本文对比分析了不同实验动物间及实验动物与人类之间肠道微生物的差异, 从肠道微生物角度深化了研究人员对实验动物在比较医学研究中应用的认识。最终, 本文将加深科研人员对不同实验动物肠道菌群特征的认识, 并从肠道菌群和性别差异的角度, 为科学实验中实验动物的选用和结果分析提供新思路。

1 实验动物研究中存在性别偏好

加州大学伯克利分校的 Beery 和 Zucker 于 2011 年在 *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 上针对生物医学研究中所使用实验动物的性别发表了一篇统计分析文章^[7]。该研究结果显示, 在 2009 年发表的 34 种生物医学期刊中, 涉及神经生物学、免疫学、生殖生物学等十个学科的论文中, 只有 28% 的动物实验同时使

用雌性和雄性实验动物开展研究, 余下的较多动物实验都偏好于使用雄性动物。近些年, 虽然科研人员发表的论文中包含 2 种性别的动物实验的比例有所上升, 但学术界对于实验动物性别差异的重视程度仍需加强, 部分科研人员仍未重视实验动物的性别差异。因此, 在实验动物学课程中强化实验动物性别差异对科学研究的重要性是十分必要的。

研究表明, 雌性和雄性动物不仅在生理和心理上存在着显著差异, 其肠道微生物的组成结构也具有明显差异。因此, 性别因素也成为影响动物肠道微生物的十大因素之一^[8]。鉴于此, 本文针对不同实验动物肠道微生物的特征及性别差异性进行归纳总结。

2 实验动物肠道菌群特征及其性别差异性对比分析

2.1 常用实验动物的肠道菌群特征

2.1.1 小鼠肠道微生物特征

小鼠作为用量最大, 应用最广泛的哺乳类实验动物, 在神经科学、遗传学和营养学等科学研究中发挥了重要作用。鉴于小鼠作为实验动物的重要性, 黄树武等^[9]对 KM、C57BL/6J、BALB/c 和 NIH 的 4 个品种 SPF 级小鼠开展了肠道微生物组测序分析, 结果显示, 上述 4 个品种小鼠的肠道微生物在门水平主要分布于拟杆菌门 (Bacteroidetes)、厚壁菌门 (Firmicutes)、变形菌门 (Proteobacteria)、酸杆菌门 (Acidobacteria) 和疣微菌门 (Verrucomicrobia)。其中, 隶属于拟杆菌门、厚壁菌门和变形菌门的微生物占总肠道微生物的 90% 以上。在属水平, 小鼠肠道微生物主要分布于未分类的 *Muribaculaceae* 属、毛螺菌属 (*Lachnospira*)、另枝菌属 (*Alistipes*)、拟普雷沃氏菌属 (*Paraprevotella*)、拟杆菌属 (*Bacteroides*)、*Muribaculum* 属和乳杆菌属 (*Lactobacillus*)。进一步针对 NIH 小鼠不同肠道部位的

肠道微生物分析结果显示, 其肠道微生物在十二指肠、空肠和回肠部位的含量相对较少, 这些微生物主要隶属于乳杆菌属和未分类的 *Muribaculaceae* 属。小鼠盲肠和结肠中的肠道微生物数量较多, 主要分布于未分类 *Muribaculaceae* 属、乳杆菌属、螺杆菌属 (*Helicobacter*)、*Muribaculum* 属、拟普雷沃氏菌属、杜氏杆菌属 (*Duganella*)、*Lachnospiraceae_NK4A136_group* 和另枝菌属。小鼠直肠中的肠道微生物主要以螺杆菌属为主。Liang 等^[10] 针对 C57BL/6J 小鼠肠道微生物的昼夜节律波动特征进行分析, 发现其肠道微生物中拟杆菌门微生物的相对丰度和绝对丰度均呈现明显的昼夜节律性波动。与之不同的是, 小鼠肠道中隶属于厚壁菌门微生物的相对丰度呈现明显的昼夜节律性波动, 而其绝对丰度则丧失节律性。Chen 等^[11] 通过解析不同年龄段 C57BL/6J 小鼠肠道微生物的组成结构, 发现老年小鼠 (20~22 月龄) 肠道微生物的丰富度和多样性均高于年轻小鼠 (2~3 月龄)。在门水平, 年轻小鼠中拟杆菌门和变形菌门微生物的丰度高于老年小鼠, 而未鉴定的细菌门和脱硫弧菌门 (*Desulfobacterota*) 微生物的丰度低于老年小鼠; 在属水平, 年轻小鼠中乳杆菌属微生物丰度高于老年小鼠, 而 *Lachnospiraceae_NK4A136*、苏黎世杆菌属 (*Turicibacter*) 和另枝菌属微生物丰度低于老年小鼠^[11]。

在小鼠肠道微生物的性别差异上, Wu 等^[12] 通过聚焦不同性别的 KM 小鼠, 对其肠腔内容物和黏液层中肠道微生物的特征进行分析, 结果显示 KM 小鼠黏液层肠道微生物的丰富度和多样性均明显高于肠腔内容物中的肠道微生物。在门水平, 雄性小鼠肠腔内容物和黏液中厚壁菌门微生物丰度高于雌性小鼠, 而拟杆菌门微生物丰度则低于雌性小鼠。在属水平, 雌性小鼠肠腔内容物和黏液层不可培养的 *Muribaculaceae* 和苏黎世杆菌属的丰度高于雄性小鼠; 雄性小鼠黏液层中双歧杆菌属 (*Bifidobacterium*)、链球菌属 (*Streptococcus*) 和肠球菌属 (*Enterococcus*) 微生物的丰度高于雌性小鼠, 而副萨特氏菌属 (*Parasutterella*) 和粪杆菌属 (*Faecalibacterium*) 微生物的丰度低于雌性小鼠^[12]。针对 IL-10 敲除的肠炎模型小鼠的肠道微生物分析结果显示, 雌性小鼠中理研菌科 (*Rikenellaceae*) 和嗜黏蛋白阿克曼氏菌 (*Akkermansia muciniphila*) 的丰度高于雄性小鼠^[13]。此外, 研究人员通过对 C57BL/6J 和 BALB/c 这 2 个品种的雌性小鼠和雄性小鼠进行肠道微生物组成结构分析, 发现上述

2 个品种小鼠肠道微生物存在明显的性别差异。其中, C57BL/6J 雌性小鼠肠道微生物中狄氏拟杆菌 (*Bacteroides distasonis*)、艰难梭菌 (*Clostridium difficile*)、柔嫩梭菌 (*Clostridium leptum*)、产气荚膜梭菌 (*Clostridium perfringens*)、共生梭菌 (*Clostridium symbiosum*)、肠球菌属、嗜酸乳杆菌 (*Lactobacillus acidophilus*)、植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) 以及苏黎世杆菌属的丰度高于雄性小鼠, 而 C57BL/6J 雌性小鼠中埃格特氏菌属 (*Eggerthella*) 的丰度高于雌性小鼠; BALB/c 雌性小鼠肠道微生物中双歧杆菌属的丰度高于雄性小鼠, 而 BALB/c 雄性小鼠中奇异菌属 (*Atopobium*)、*Coprobacillus cateniformis*、埃格特氏菌属、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、中间链球菌 (*Streptococcus intermedius*)、未分类的 II 型梭菌以及未分类的柔膜菌 (*Helotiales*) 丰度高于雌性小鼠^[14]。研究人员针对不同性别的 *Apc^{Min/+}* 肠癌小鼠模型进行肠道微生物分析, 结果显示雄性肠癌小鼠中嗜黏蛋白阿克曼氏菌、*Romboutsia ilealis*、厚壁菌门细菌 ASF500、*Fretibacterium fastidiosum*、约氏乳杆菌 (*Lactobacillus johnsonii*) 和 *Alistipes inops* 的丰度明显增加, 而雌性肠癌小鼠中发酵乳杆菌 (*Lactobacillus fermentum*)、古氏副拟杆菌 (*Parabacteroides goldsteinii*)、台湾乳杆菌 (*Lactobacillus taiwanensis*) 和甲基戊糖梭菌 (*Clostridium methylpentosum*) 的丰度降低^[15]。除此之外, 由性别差异引发的肠道微生物组成结构的改变, 在其他疾病动物模型中也有报告。例如, 由高脂饮食引发的代谢综合征模型^[16-17]、肥胖症相关的大肠癌小鼠模型^[18] 和由外科手术引发的败血症小鼠模型^[19] 等。

2.1.2 大鼠肠道微生物特征

与小鼠相比, 大鼠在生理特征和行为等方面更加接近人类, 其拥有相对较大的身体和器官尺寸便于多次采样, 或进行体内电生理学、神经外科和神经影像学程序操作。因此, 相对于小鼠, 大鼠在毒理学、畸形学、内分泌学、肿瘤学、神经病学、实验老年学、心血管系统、牙科和实验寄生虫学等领域具有更广泛的应用。基于此, 研究人员对大鼠的肠道微生物特征也开展了一系列研究。其中, 黄树武等^[9] 聚焦分析 Wistar 大鼠在不同生长时期 (1、3、7、12、24、56、111 周龄) 的肠道微生物特征, 发现大鼠肠道微生物多分布于厚壁菌门、变形菌门、拟杆菌门、放线菌门和酸杆菌门 (*Acidobacteria*), 这些菌门在大鼠总肠道微

生物中的占比分别为28%、21%、13%、10%和8%。针对不同生长时期大鼠的肠道微生物分析结果显示,幼年大鼠(1周龄和3周龄)肠道微生物中拟杆菌门微生物的丰度明显高于厚壁菌门微生物^[20]。随着年龄的增长,大鼠肠道微生物中厚壁菌门微生物的丰度逐渐增加,拟杆菌门微生物的丰度逐渐下降,二者的丰度在成年大鼠(12周龄)肠道中趋于稳定^[20]。此外,螺旋体门的肠道微生物丰度随大鼠年龄的增长呈现出与拟杆菌门类似的变化趋势^[20]; Duan等^[21]针对SD(Sprague-Dawley)大鼠空肠和粪便样本中肠道微生物特征进行分析,结果显示大鼠空肠中肠道微生物多分布于*Rothia*属、链球菌属、乳杆菌属、异杆菌属(*Alcaligenes*)、布劳特菌属(*Blautia*)和双歧杆菌属,粪便中肠道微生物多分布于普雷沃氏菌属(*Prevotella*)、未分类的假单胞菌科(*Pseudomonadaceae*)、乳杆菌属、未分类的瘤胃菌科(*Ruminococcaceae*)、未分类的毛螺菌科和拟杆菌属。

针对SD大鼠肠道微生物性别差异性的分析结果显示,雄性大鼠空肠部位肠道微生物的丰度和多样性均高于雌性大鼠,而二者粪便样本中肠道微生物的丰度和多样性则无明显的性别差异^[21];在肠道微生物丰度上,雄性大鼠空肠部位毛螺菌科、紫单胞菌科、厌氧棍菌属(*Anaerorhabdus*)、布劳特菌属和棒状杆菌属(*Corynebacterium*)微生物丰度高于雌性大鼠,而罗斯氏菌属(*Roseburia*)和*Rothia*属微生物丰度则低于雌性大鼠;雄性大鼠粪便样本中*Lachnospiraceae_incerae_sedis*属丰度高于雌性大鼠,而脱硫弧菌科、拟普雷沃氏菌属、*Eluslmicrobium*属和螺杆菌属微生物丰度则低于雌性大鼠^[21]。

2.1.3 豚鼠肠道微生物特征

豚鼠又称天竺鼠、荷兰猪,其性情温顺,对组胺和结核菌敏感。基于此,研究人员常利用豚鼠来构建哮喘、组胺过敏和结核病等模型,借此研究平喘药、抗组胺药以及抗结核药的作用。近年来,研究人员针对豚鼠肠道微生物开展了较多研究。其中, Hildebrand等^[22]研究结果显示,豚鼠肠道微生物中隶属于厚壁菌门、拟杆菌门和变形菌门的微生物相对丰度分别为28.8%、14.6%和4.9%。Frias等^[23]通过研究禁食对3种豚鼠[安迪纳(Andina)、因蒂(Inti)和秘鲁(Peru)]盲肠微生物的影响,发现禁食可提升安迪纳和因蒂豚鼠盲肠微生物的丰度,降低秘鲁豚鼠盲肠微生物的丰度。其中,安迪纳豚鼠禁食后,其盲肠中富

集*Flizemoplasmatales*、*Gastranaerophiales*、螺杆菌属、*WCHB1-41*、*UCG-010*、消化球菌属(*Peptococcus*)、*UCG-004*以及*Mailhella*属微生物;因蒂豚鼠禁食后,其盲肠中瘤胃球菌属微生物丰度显著增加;秘鲁豚鼠禁食后,其盲肠中*Prevotellaceae* *UCG-004*、*WCHB1-41*、*Monoglobus*、*Eluslmicrobium*、拟杆菌属、*UCG-009*、*Frisingicoccus*和*Lachnospiraceae* *ND3007* group属微生物丰度增加^[23]。Al等^[24]开展了饮食类型对豚鼠肠道微生物影响的研究,结果显示对新生豚鼠饲喂高糖、高脂饮食可明显改变其肠道微生物组成结构,在高糖、高脂饮食饲喂豚鼠的肠道微生物组成结构中,巴恩斯氏菌属(*Barnesiella*)、甲烷短杆菌属(*Methanobrevibacter*)以及颤螺旋菌属(*Oscillospira*)的丰度明显降低,而丁酸弧菌属(*Butyrivibrio*)和*Bacteroides* spp.属的丰度增加。Wu等^[25]分析了形觉剥夺性近视豚鼠肠道的微生物特征,结果显示形觉剥夺性近视豚鼠的肠道微生物丰度低于对照组,而其肠道微生物多样性则无明显变化。在肠道微生物丰度上,形觉剥夺性近视豚鼠中 α -变形菌纲、红螺菌目(*Rhodospirillales*)、紫单胞菌科、罗斯氏菌属、丁酸弧菌属、副拟杆菌属、副普雷沃氏菌属以及狄氏副拟杆菌的丰度低于对照组,而瘤胃球菌属以及隶属于该属的白色瘤胃球菌的丰度则高于对照组^[25]。

2.1.4 仓鼠肠道微生物特征

目前,科学研究中常用的仓鼠品种包括叙利亚仓鼠(Syrian hamster)、中国仓鼠(Chinese hamster)和欧洲黑腹仓鼠(European hamster)。其中,叙利亚仓鼠在科学研究中被广泛使用,占有仓鼠使用量的90%。Sylvia等^[26]通过分析叙利亚仓鼠肠道微生物组成结构,发现其肠道微生物多分布于厚壁菌门和拟杆菌门,其中厚壁菌门微生物的丰度高于拟杆菌门。在科水平,叙利亚仓鼠肠道微生物主要分布于瘤胃球菌科、颤螺旋菌科、毛螺菌科和*Clostridia*_UCG-014^[27];在属水平,叙利亚仓鼠肠道微生物主要分布于瘤胃球菌属、*Lachnospiraceae*_NK4A136_group、*Lachnospiraceae*_UCG-001和*Eubacterium_siraeum_group*^[27]。Fan等^[28]利用16S rRNA扩增子测序对中国仓鼠的肠道微生物进行分析,结果显示其肠道微生物可以分为2个明显的类群,并且2个类群肠道微生物的丰富度和多样性存在明显差异。其中,乳杆菌属、螺旋体属以及*Pygmaibacter*属微生物富集于一个类群,而苏黎世杆菌属和瘤胃梭菌属微生物富集于另一个类群。Sylvia等^[26]针对不同

性别的西伯利亚仓鼠开展肠道微生物特征分析,发现在门水平雌性仓鼠肠道中拟杆菌门微生物相对丰度高于雄性,而蓝细菌门微生物相对丰度则低于雄性。

2.1.5 兔肠道微生物特征

实验兔常用于皮肤刺激试验、热原试验、致畸试验、毒性试验、人工受孕试验、计划生育研究、免疫学研究、心血管疾病研究、微生物学研究、眼科学研究、口腔科学研究和制造诊断血清等研究领域。在兔肠道微生物研究方面,杨睿等^[29]通过对29、45、60日龄的家兔进行肠道微生物特征分析,结果显示家兔肠道微生物的丰富度随着日龄的增长逐渐增加,而肠道微生物的多样性没有显著变化。在门水平上,家兔肠道微生物主要分布于厚壁菌门、变形菌门、拟杆菌门、疣微菌门(Verrucomicrobia)和放线菌门,其中拟杆菌门微生物的丰度随着家兔日龄的增加逐渐升高,变形菌门微生物的丰度先升后降,而疣微菌门微生物的丰度先降后升;在属水平,家兔肠道微生物主要隶属于阿克曼菌属(*Akkermansia*)、埃希菌属-志贺菌属(*Escherichia-Shigella*)、布劳特菌属、拟杆菌属、丁酸弧菌属、不动杆菌属(*Acinetobacter*)和瘤胃球菌属,其中随着家兔日龄的增加,隶属于阿克曼菌属和拟杆菌属的微生物丰度呈现先降后增的趋势;隶属于不动杆菌属的微生物丰度呈现降低的趋势;隶属于丛毛单胞菌属的微生物丰度呈现先增后降的趋势;隶属于未分类的紫单胞菌科的微生物丰度则持续增加。Fu等^[30]通过分析不同生长时期(0、10、60日龄)天府黑兔的肠道微生物,结果显示60日龄天府黑兔肠道微生物的多样性明显高于0、10日龄天府黑兔,并且不同日龄天府黑兔的肠道微生物组成存在明显差异。在门水平,随着天府黑兔日龄的增加,其肠道微生物中变形菌门微生物的丰度逐渐降低,而厚壁菌门和拟杆菌门微生物的丰度则逐渐增加;在属水平,*Ralstonia*属微生物仅富集于0日龄的天府黑兔,拟杆菌属、副拟杆菌属、*Clostridium sensu stricto* 1和*Epulopiscium*仅富集于10日龄的天府黑兔,而阿克曼菌属的微生物则同时富集于10、60日龄的天府黑兔^[30]。Abdel-Kafy等^[31]利用16S rRNA扩增子测序对Native Middle-Egypt Breed (NM)和Giant Flanders (GF)兔的空肠和盲肠微生物进行分析,结果显示,NM兔盲肠中肠球菌属和埃希菌属-志贺菌属微生物丰度低于空肠,而*uncultured Clostridiales vadinBB60 group*、*Lachnospiraceae NK4A136 group*、瘤胃梭菌属5和另枝菌属微生物的丰

度则高于空肠;GF兔盲肠中芽孢杆菌属、乳杆菌属、*Christensenellaceae R-7 group*、*Ruminococcaceae NK4A214 group*、*Ruminococcaceae UCG-013*、*Ruminococcaceae UCG-014*、瘤胃球菌属2、罕见小球菌属(*Subdoligranulum*)、候选单胞生糖菌属(*Candidatus Saccharimonas*)和阿克曼菌属微生物丰度高于空肠,而肠球菌属、八叠球菌属(*Sarcina*)、未培养的真杆菌科、杜氏杆菌属(*Dubosiella*)和埃希菌属-志贺菌属微生物丰度低于空肠。对比分析NM和GF兔肠道微生物发现,在空肠中*Christensenellaceae R-7 group*和*uncultured Eubacteriaceae*属微生物富集于GF兔,而拟杆菌属微生物富集于NM兔;在盲肠中*Ruminococcaceae UCG-014*属微生物富集于GF兔,而瘤胃梭菌属5微生物富集于NM兔^[31]。Li等^[32]分析饲养温度和湿度对伊拉兔肠道微生物的影响,结果显示,低温度和低湿度饲养组兔肠道中布劳特氏菌属微生物丰度增加;而高温度和高湿度饲养可以增加兔肠道中*Lachnospiraceae NK4A136*属微生物的丰度,并降低微生物间的相互作用。

2.1.6 犬肠道微生物特征

犬具有鼻灵敏、智力发达、易驯养、环境适应力强、记忆力强和情感丰富等特点,因此常被用于基础医学实验、临床实验、慢性实验、药理学和毒理学实验等研究。为了对比不同犬肠道微生物的差异性,You等^[33]分析96份来源于格力犬(Greyhound)、达克斯猎犬(Dachshund)、马尔济斯犬(Maltese)、比熊犬(Bichon)、约克夏梗犬(Yorkshire Terrier)、吉娃娃犬(Chihuahua)、博美犬(Pomeranian)、贵宾犬(Poodle)和斗牛犬(Bulldog)的犬粪便样本的肠道微生物,结果显示上述粪便样本中肠道微生物多分布于厚壁菌门(44.8%)、拟杆菌门(27.7%)、梭杆菌门(14.2%)、变形菌门(8.8%)和放线菌门(3.4%)。在属水平,犬肠道微生物中相对丰度由高到低的前10个属分别为:梭杆菌属(11.0%)、*Mediterranea*(7.8%)、拟杆菌属(7.5%)、普雷沃氏菌属(4.6%)、乳杆菌属(3.5%)、布劳特菌属(3.3%)、罗姆布茨菌属(*Romboutsia*)(3.1%)、萨特氏菌属(*Sutterella*)(2.5%)、*Peptacetobacter*(2.2%)和粪杆菌属(2.1%);在种水平,犬肠道中优势菌株为*Fusobacterium perfoeten*、*Mediterranea massiliensis*、粪便普雷沃氏菌和*Romboutsia timonensis*^[33]。Fernández-Pinteño等^[34]通过对不同品种来源的犬按年龄段划分为幼年犬(小于2

年)、成年犬(2~7年)和老年犬(7年以上)后,对其肠道微生物开展特征性分析,结果显示不同年龄段犬肠道微生物的丰富度和多样性无明显差别。在肠道微生物组成结构上,相较于幼年和成年犬,老年犬肠道中拟杆菌门、假单胞菌门、瘤胃球菌科、韦荣氏球菌科(Veillonellaceae)、普雷沃氏菌科、琥珀酸弧菌科(Succinivibrionaceae)和粪杆菌属来源的微生物丰度增加^[34]。Hu等^[35]通过对比分析昆明犬、德国牧羊犬和比利时马里诺斯犬的肠道微生物特征,发现这3种犬的肠道微生物隶属于10个门、15个纲、35个目、60个科、146个属,其中在门水平3种犬的肠道微生物主要分布于厚壁菌门(57.44%)、梭杆菌门(28.86%)和拟杆菌门(7.63%);在属水平,上述3种犬的肠道微生物多分布于消化链球菌属(21.08%)、梭杆菌属(18.50%)、乳杆菌属(12.37%)和鲸杆菌属(*Cetobacterium*)(10.29%)。差异性微生物分析结果显示:梭杆菌属微生物富集于德国牧羊犬和比利时马里诺斯犬,*Peptoclostridium*属微生物富集于比利时马里诺斯犬,乳杆菌属微生物富集于昆明犬。此外,比利时马里诺斯犬肠道中梭杆菌属、消化链球菌属、拟杆菌属和鲸杆菌属微生物的丰度高于德国牧羊犬,而乳杆菌属、鲸杆菌属和*Romboutsia*属微生物丰度低于昆明犬^[35]。Rojas等^[36]通过对286只饲养于北美的家犬进行16S rRNA全长测序,结果显示在种水平有23种菌株[汉森氏布氏菌(*Blautia hansenii*)、活泼瘤胃球菌(*Ruminococcus gnavus*)、*Faecalimonas umbilicata*、unclassified *Blautia*、unclassified *Fusobacterium*、肠道柯林斯菌(*Collinsella intestinalis*)、单形巨单胞菌(*Megamonas funiformis*)、unclassified *Fusobacterium*、*Peptacetobacter hiranonis*、*Blautia marasmi*、unclassified *Lachnoclostridium*、*Blautia caecimuris*、产气荚膜梭菌(*Clostridium perfringens*)、unclassified *Romboutsia*、*Blautia glucerasea*、*Turicibacter sanguinis*、*Romboutsia ilealis*、unclassified *Bacteroides*、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、*Holdemanella biformis*、*Allobaculum stercoricanis*、粪便普雷沃氏菌(*Prevotella copri*)和*Streptococcus lutetiensis*]构成北美家犬肠道的核心微生物群,它们占犬肠道微生物的比例高达75%。

2.1.7 猫肠道微生物特征

猫具有诱导性排卵、平衡感和反射功能发达、呕吐反射灵敏、心搏力强、血压恒定、药物反应灵敏和对吗啡表现为中枢兴奋等特点。针对猫的肠道微生物研究结果显示,拟杆菌门和厚壁菌门是猫肠道微生物

的主要门类,其中拟杆菌门微生物的相对丰度远高于厚壁菌门^[37]。猫肠道微生物中隶属于拟杆菌门、厚壁菌门和放线菌门的肠道微生物在粪便样本中的检出率为100%,而隶属于梭杆菌门和螺旋体门的肠道微生物在所有样本中均未检测到。在属水平,猫肠道微生物多分布于普雷沃氏菌属(66.7%)、拟杆菌属(7.8%)、柯林斯菌属(*Collinsella*)(4.0%)、布劳特菌属(3.6%)、巨球形菌属(*Megasphaera*)(3.6%)和双歧杆菌属(1.7%)^[37]。Kilburn-Kappeler等^[38]通过研究饮食对猫肠道微生物的影响,发现与饲喂正常饮食的对照组相比,在饮食中添加玉米发酵蛋白可以影响猫肠道微生物的组成结构。其中,饲喂添加玉米发酵蛋白饮食的猫肠道微生物中,隶属于氨基酸球菌属(*Acidaminococcus*)、双歧杆菌属、巨单胞菌属(*Megamonas*)、罕见小球菌属和链球菌属的微生物丰度降低,而隶属于阿里松氏菌属(*Allisonella*)、*Catenibacterium*、戴阿利斯特杆菌属(*Dialister*)、丹毒杆菌属(*Erysipelatoclostridium*)、霍尔曼氏菌属(*Holdemanella*)、*Peptoclostridium*和莫雷梭菌(*Solobacterium*)的微生物丰度增加。Drut等^[39]研究结果显示,与健康猫相比,患有炎症性肠病的猫肠道中双歧杆菌属和拟杆菌属微生物丰度降低,而脱硫弧菌属微生物丰度增加;患有肠道T细胞淋巴瘤的猫肠道中梭杆菌属微生物的丰度增加。

2.1.8 非人灵长类动物肠道微生物特征

非人灵长类实验动物在生理、解剖、行为和生物医学特性上更接近于人类,是医学和生命科学研究中的高级实验动物。目前,科学研究中常用的非人灵长类实验动物包括食蟹猴(*Macaca fascicularis*)和恒河猴(*Macaca mulatta*)。中国科学院脑科学与智能技术卓越创新中心“非人灵长类研究平台”孙强课题组将雌性食蟹猴按年龄分为仔猴(小于3月)、青年猴(2~5年)、成年猴(7~10年)和中年猴(12~15年)后对其生长和发育成熟过程中肠道微生物的变化规律开展研究^[40]。结果显示,仔猴的肠道微生物组成结构与青年猴、成年猴和中年猴存在明显不同。青年猴、成年猴和中年猴肠道微生物的丰富度和多样性维持在相对稳定的水平并且明显高于仔猴。在属水平上,仔猴体内含有大量未鉴定的普雷沃氏菌属和双歧杆菌属的微生物,而较多链球菌属和未鉴定的瘤胃球菌属的微生物则在青年猴、成年猴和中年猴体内富集。重要的是,仔猴肠道微生物的功能与青年猴、成年猴和中

年猴也存在较大差异。此外,该课题组针对食蟹猴不同肠段(回肠、盲肠和结肠)的肠道细菌和真菌^[41]的组成结构开展分析,结果显示肠道细菌和真菌的丰富度和多样性自回肠至结肠逐渐增加;回肠部位肠道细菌和真菌的组成结构与结肠明显不同,其中肠道细菌中隶属于拟杆菌纲和螺旋体纲的微生物在盲肠和结肠部位显著富集,而隶属于放线菌纲和蓝细菌纲的微生物则富集于回肠;肠道真菌中隶属于曲霉属和节担菌属的微生物富集于结肠,而镰刀菌属的微生物则富集于盲肠。相应地,回肠中肠道细菌和真菌的功能也与盲肠和结肠存在明显差异。针对雄性食蟹猴肠道微生物昼夜节律性波动分析结果显示,肠道细菌中厚壁菌门、拟杆菌门、普雷沃氏菌属、*norank_f_Eubacterium_coprostanoligenes_group*、消化球菌属、未分类的普雷沃氏菌属、未培养的消化球菌属和*unclassified_g_norank_f_Eubacterium_coprostanoligenes_group*的丰度呈现明显的昼夜节律性波动,其中隶属于厚壁菌门的微生物丰度于时间点ZT12(光照周期的第12h)降至最低,而隶属于拟杆菌门的微生物丰度于该时间点升至最高^[42]。与肠道细菌组不同的是,肠道真菌组分析结果显示雄性食蟹猴肠道中除了曲霉属真菌呈现微弱的昼夜节律性波动外,大部分真菌丰度无明显的昼夜节律变化^[42]。

针对非人灵长类实验动物不同性别肠道微生物差异性的研究结果显示,雌性恒河猴肠道微生物的 α -多样性明显高于雄性。其中,隶属于变形菌门、柔壁菌门、蓝细菌门以及疣微菌门的微生物,在雌性恒河猴肠道中的相对丰度明显高于雄性^[43]。

2.1.9 小型猪肠道微生物特征

中国小型猪种类资源丰富,其中具有明确的遗传背景和遗传稳定性的小型猪品种包括:西藏小型猪、版纳小型猪、巴马小型猪、五指山小型猪、剑白小型猪和蕨麻小型猪。田威龙等^[44]对广西巴马小型猪的肠道微生物开展分析,结果显示肠道微生物在门水平多分布于厚壁菌门、拟杆菌门和螺旋体门,且隶属于上述3个门的微生物占总肠道微生物的比例超过95%。在属水平,广西巴马小型猪的优势菌属为*Clostridium_sensu_stricto_1*、密螺旋体菌属(*Treponema*)、乳杆菌属、土孢杆菌属(*Terrisporobacter*)、*norank_f_Muribaculaceae*和未分类的毛螺菌科。沈利叶等^[45]通过对五指山小型猪开展肠道微生物分析,结果显示其肠道微生物在门水平的分布与巴马小型猪类似,主要集中于厚壁菌

门、拟杆菌门和螺旋体门。在属水平,五指山小型猪肠道微生物多分布于普雷沃氏菌属、瘤胃球菌属、粪球菌属、考拉杆菌属(*Phascolarctobacterium*)和埃希氏菌属。Jiang等^[46]通过对4个年龄段(7、28、56、180日龄)的西藏小型猪开展肠道微生物特征性分析,结果显示在门水平拟杆菌门和螺旋体门微生物的丰度随着猪日龄的增加而增加,而厚壁菌门、变形菌门和疣微菌门微生物的丰度则随着猪日龄的增加而降低;在属水平,普雷沃氏菌属和密螺旋体属微生物丰度随猪日龄的增加而增加,拟杆菌属、艾克曼菌属和*Dorea*属微生物的丰度则随着猪日龄的增加而降低。Yosi等^[47]针对母猪产后及新生仔猪的盲肠微生物特征进行分析,结果显示,母猪产后27d内肠道细菌中乳杆菌属和HT002属微生物丰度增加,而链球菌属、UCG-005、*Rikenellaceae RC9 gut group*以及拟杆菌属微生物丰度降低;肠道真菌中哈萨克斯坦酵母属(*Kazachstania*)、地霉属(*Geotrichum*)和毛霉属(*Mucor*)微生物的丰度逐渐增加,而*Tausonia*和*Fungi genus Incertae sedis*属微生物的丰度则逐渐降低。新生仔猪(3~35d)盲肠微生物分析结果显示,其肠道细菌中乳杆菌属、普雷沃氏菌属和弯曲杆菌属微生物丰度逐渐增加,而梭杆菌属、拟杆菌属和埃希菌属-志贺菌属微生物丰度逐渐降低;肠道真菌中*Fungi genus Incertae sedis*属微生物的丰度先增加后降低,而哈萨克斯坦酵母属微生物的丰度则先降低后增加^[47]。

针对猪肠道微生物影响因素的分析结果显示,饲喂方式、生长周期和性别因素是影响其肠道微生物组成结构的重要因素。性别因素单独对猪肠道微生物改变的贡献为0.81%^[48]。其中,隶属于梭杆菌科的微生物在雄性猪肠道中明显富集。

2.1.10 鸡肠道微生物特征

鸡常被用于疫苗生产、药物评价、传染病、激素代谢、营养学以及高脂血症和动脉粥样硬化的研究领域。Yang等^[49]对白来航鸡肠道微生物组成结构特征进行分析,结果显示其肠道微生物主要隶属于拟杆菌门和厚壁菌门,并且拟杆菌门肠道微生物的相对丰度高于厚壁菌门。在科水平,白来航鸡肠道微生物多分布于拟杆菌科、瘤胃球菌科、普雷沃氏菌科、紫单胞菌科、韦荣氏球菌科(*Veillonellaceae*)、帕拉普氏菌科(*Paraprevotellaceae*)、乳杆菌科和丹毒丝菌科;在属水平,拟杆菌属微生物丰度在白来航鸡肠道微生物中占据绝对优势,紧邻其后的为颤螺旋菌属、普雷沃

氏菌属、粪杆菌属、副拟杆菌属、考拉杆菌属和乳杆菌属^[49]。研究人员针对海兰褐鸡产蛋早期和产蛋峰值期的肠道微生物开展研究,结果显示处于不同产蛋期的海兰褐鸡肠道微生物多分布于厚壁菌门、拟杆菌门、变形菌门和梭杆菌门^[50]。此外,相较于产蛋早期的海兰褐鸡,处于产蛋峰值期鸡的拟杆菌门微生物丰度降低,而梭杆菌门微生物丰度明显增加^[50]。在属水平,产蛋峰值期海兰褐鸡肠道微生物中乳杆菌属和梭杆菌属微生物的丰度明显高于处于产蛋早期的海兰褐鸡,而拟杆菌属微生物则表现出相反的趋势^[50]。Wang等^[51]针对耳垂颜色为黑色、蓝色和绿色的江山乌骨鸡开展肠道微生物的特征性分析,结果显示与黑色和蓝色耳垂的乌骨鸡相比,绿耳垂鸡肠道中螺旋体属和未分类的乳杆菌目丰度降低,而肠球菌属、未分类的毛螺菌科和 *norank_f_norank_o_RF39* 的丰度增加; *Mucispirillum* 属微生物特异性富集于蓝耳垂的乌骨鸡肠道,而埃希菌属-志贺菌属微生物特异性富集于黑耳垂的乌骨鸡肠道。Wang等^[52]通过对比西藏鸡和 Arbor Acres 肉鸡(AA肉鸡)的盲肠微生物,发现西藏鸡的肠道微生物丰度和多样性均显著高于AA肉鸡。在门水平,西藏鸡肠道中拟杆菌门、脱铁杆菌门、Deferrisomatota、脱硫弧菌门、广古菌门(Euryarchaeota)、Modulibacteria和Patescibacteria的丰度高于AA肉鸡,而盐厌氧菌门(Chloroflexota)、Aenigmarchaeota和Synergistota丰度低于AA肉鸡;在属水平,相较于AA肉鸡, *Actinospica*、*Caenimonas*、粪球菌属、*Hamadaea*以及 *Hellea* 特异性富集于西藏鸡盲肠中^[52]。

2.2 不同实验动物间肠道微生物的对比分析

研究人员除了研究特定实验动物的肠道微生物特征外,也通过对比分析报告了不同实验动物间肠道微生物的差异性。其中, Böswald等^[53]对比分析叙利亚仓鼠与C57BL/6J小鼠的肠道微生物,发现二者在不同肠道部位存在明显的微生物差异。其中,仓鼠回肠中特异性富集乳杆菌科的微生物,而小鼠回肠以Muribaculaceae微生物为主;在盲肠和结肠部位,小鼠特异性富集Muribaculaceae的微生物,而仓鼠富集乳杆菌科和韦荣球菌科微生物。Crowley等^[54]通过对豚鼠和兔的肠道微生物进行对比分析,发现在门水平,豚鼠中拟杆菌门微生物的丰度远高于兔,而厚壁菌门微生物则呈现相反的趋势。此外,研究结果显示将食蟹猴、巴马小型猪、比格犬和C57BL/6J小鼠来源的肠道

微生物定植于无菌小鼠肠道后可有效缓解其结肠炎的疾病表型^[55],这表明虽然不同实验动物的肠道微生物存在差异性,但其在宿主健康的维持上发挥类似的作用。

3 实验动物与人类肠道微生物的对比分析

鉴于实验动物常被用来构建人类疾病相关的动物模型,而人类与实验动物间肠道微生物的差异性可能对实验结果产生影响,因此本文也对不同实验动物与人类肠道微生物的差异性进行了归纳汇总。其中, Hildebrand等^[22]通过对比豚鼠和人类的肠道微生物,发现人类的肠道微生物丰度低于豚鼠,其中在门水平人类肠道中厚壁菌门、拟杆菌门、放线菌门和异常球菌-栖热菌门微生物的丰度高于豚鼠,而变形菌门、广古菌门、螺旋菌门、绿菌门(Chlorophyta)、疣微菌门、蓝菌门(Cyanobacteria)、梭杆菌门、酸杆菌门、衣原体门(Chlamydiae)、软壁菌门(Tenericutes)、热袍菌门(Thermotogae)、脱铁杆菌门(Deferribacteres)、纤维杆菌门(Fibrobacteres)、互养菌门(Synergistetes)和绿弯菌门(Chloroflexi)微生物的丰度低于豚鼠;在属水平,豚鼠肠道中具备黏蛋白降解能力的艾克曼菌属和可产甲烷的甲烷短杆菌属微生物的丰度远高于人类。Bai等^[56]通过对比分析人类、鸡和猪的肠道微生物,发现三者肠道中厚壁菌门微生物的丰度基本一致,而人类肠道中放线菌门微生物的丰度高于鸡和猪;在属水平,鸡肠道中乳杆菌属微生物的丰度远高于人类和猪,而人类肠道中双歧杆菌属微生物的丰度高于鸡和猪。Beretta等^[57]对比分析人类和犬的肠道微生物,发现在门水平幼年和成年犬肠道中厚壁菌门微生物的丰度均高于人类,而幼年人类肠道中放线菌门微生物的丰度高于幼年犬。Ito等^[58]对比分析同居状态下的犬和人类的肠道微生物,发现人类肠道中厌氧棒状菌属(*Anaerorhabdus*)、罕见小球菌属、*Dorea*、*Fusicatenibacter*和 *Eubacterium_hallii_group* 属微生物的丰度远高于犬,而 *Peptoclostridium* 属微生物的丰度远低于犬。虽然犬和人类的肠道微生物间存在较大差异,但随着同居时间的延长,二者部分肠道微生物(活泼瘤胃球菌、普雷沃氏菌属9、布劳特氏菌属、*Erysipelactoclostridium*、粪杆菌属、梭杆菌属、链球菌属和萨特氏菌属)会发生水平转移,并且这些在人类和犬肠道微生物中共存的微生物均具有较高的丰度^[58]。此外, Du等^[59]通过对

比分析养猫和不养猫女性的肠道微生物,发现养猫女性肠道中产碱杆菌科和巴斯德氏菌科微生物的丰度显著降低,而肠杆菌科和假单胞杆菌科微生物的丰度明显增加,这进一步表明,伴侣动物(猫和犬)可能通过肠道微生物的水平转移对人类的健康产生一定影响。

4 总结与展望

肠道微生物与宿主较多生理代谢活动间存在交互,与宿主健康密切相关。近些年,随着肠道微生物在不同疾病发生、发展中的作用机制的阐明及其在不同疾病治疗中的应用,肠道微生物受到越来越多研究人员的关注,已成为生命科学研究领域的热点。基于此,本文聚焦生命科学研究中常用的实验动物,一方面对其肠道微生物的组成结构特征进行了汇总整理,该部分内容不仅能加深实验动物从业人员对不同实验动物肠道微生物特征的认识,也能使其在日常工作和科研中充分考虑肠道微生物对动物健康或实验结果的影响;另一方面,鉴于科学研究中普遍存在实验动物选取的性别偏好性,而性别是影响肠道微生物组成结构的重要因素,其可以使得特定疾病的治疗呈现性别二态性。因此,本文汇总整理了不同实验动物肠道微生物的性别差异,希望这部分内容能引起广大科研人员对实验动物性别差异的重视,进而结合自己的研究目的在实验动物选取、实验设计、实验结果分析等方面开展性别差异性分析。

比较医学是实验动物学领域的重要研究内容,因此本文通过对比实验动物与人类的肠道微生物特征差异,发现不同实验动物与人类在肠道微生物组成结构上既存在共性也具有明显的差异性,这提示研究者利用实验动物模型模拟或研究人类疾病时,需要充分考虑二者间的肠道微生物差异,尤其是明显影响肠道微生物组成结构的实验类型,以便获得更加准确、可靠的实验结果或结论。

综上,本文不仅可以加深科研人员对不同实验动物肠道菌群特征的认识,而且从肠道菌群和性别差异的角度,为科研人员在科学实验中的实验动物选用和结果分析提供新思路。

[作者贡献 Author Contribution]

沈黄奕负责检索文献及初稿写作;

黄宇飞负责全文校对;

杨云鹏负责项目管理及论文修订。

[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] IKEDA E, YAMAGUCHI M, KAWABATA S. Gut microbiota-mediated alleviation of dextran sulfate sodium-induced colitis in mice[J]. *Gastro Hep Adv*, 2024, 3(4): 461-470. DOI: 10.1016/j.gastha.2024.01.016.
- [2] MOHAMMADHASANI K, VAHEDI FARD M, MOTTAGHI MOGHADDAM SHAHRI A, et al. Polyphenols improve non-alcoholic fatty liver disease via gut microbiota: a comprehensive review[J]. *Food Sci Nutr*, 2024, 12(8): 5341-5356. DOI:10.1002/fsn3.4178.
- [3] ZHAO J Q, ZHAO C Y, XUN T R, et al. Huang Gan formula alleviates systemic inflammation and uremia in adenine-induced chronic kidney disease rats may associate with modification of gut microbiota and colonic microenvironment[J]. *Drug Des Devel Ther*, 2024, 18: 13-28. DOI:10.2147/DDDT.S421446.
- [4] FEI S F, HOU C, JIA F. Effects of salidroside on atherosclerosis: potential contribution of gut microbiota[J]. *Front Pharmacol*, 2024, 15:1400981. DOI:10.3389/fphar. 2024. 1400981.
- [5] POURAHMAD R, SALEKI K, ZARE GHOLINEJAD M, et al. Exploring the effect of gut microbiome on Alzheimer's disease[J]. *Biochem Biophys Rep*, 2024, 39: 101776. DOI: 10.1016/j.bbrep.2024.101776.
- [6] LI Y Z, ZHANG R Z, FU C B, et al. Intratumoral microbiome promotes liver metastasis and dampens adjuvant imatinib treatment in gastrointestinal stromal tumor[J]. *Cancer Lett*, 2024, 601:217149. DOI:10.1016/j.canlet.2024.217149.
- [7] 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.
- [8] FALONY G, JOOSSENS M, VIEIRA-SILVA S, et al. Population-level analysis of gut microbiome variation[J]. *Science*, 2016, 352(6285):560-564. DOI:10.1126/science.aad3503.
- [9] 黄树武, 闵凡贵, 王静, 等. 常用小鼠、大鼠肠道菌群比较研究[J]. *中国实验动物学报*, 2021, 29(6):777-784. DOI:10.3969/j.issn. 1005-4847.2021.06.009.
- [9] HUANG S W, MIN F G, WANG J, et al. Comparative study of intestinal flora in common mice and rats[J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2021, 29(6):777-784. DOI:10.3969/j.issn.1005-4847.2021. 06.009.
- [10] LIANG X, BUSHMAN F D, FITZGERALD G A. Rhythmicity of the intestinal microbiota is regulated by gender and the host circadian clock[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112(33): 10479-10484. DOI:10.1073/pnas.1501305112.
- [11] CHEN S H, WANG C B, ZOU X, et al. Multi-omics insights implicate the remodeling of the intestinal structure and microbiome in aging[J]. *Front Genet*, 2024, 15:1450064. DOI: 10.3389/fgene.2024.1450064.
- [12] WU Y, PENG X X, LI X Y, et al. Sex hormones influence the intestinal microbiota composition in mice[J]. *Front Microbiol*, 2022, 13:964847. DOI:10.3389/fmicb.2022.964847.
- [13] MAITE C B, ROY M, EMILIE V. The effect of sex-specific

- differences on IL-10^{-/-} mouse colitis phenotype and microbiota[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(12):10364. DOI:10.3390/ijms241210364.
- [14] ELDERMAN M, HUGENHOLTZ F, BELZER C, et al. Sex and strain dependent differences in mucosal immunology and microbiota composition in mice[J]. *Biol Sex Differ*, 2018, 9(1): 26. DOI:10.1186/s13293-018-0186-6.
- [15] WANG L, TU Y X, CHEN L, et al. Male-biased gut microbiome and metabolites aggravate colorectal cancer development [J]. *Adv Sci*, 2023, 10(25): e2206238. DOI: 10.1002/adv.202206238.
- [16] ZHU Q, QI N, SHEN L, et al. Sexual dimorphism in lipid metabolism and gut microbiota in mice fed a high-fat diet[J]. *Nutrients*, 2023, 15(9):2175. DOI:10.3390/nu15092175.
- [17] SHI Y, WEI L, XING L, et al. Sex difference is a determinant of gut microbes and their metabolites SCFAs/MCFAs in high fat diet fed rats[J]. *Curr Microbiol*, 2022, 79(11):347. DOI:10.1007/s00284-022-03025-x.
- [18] CHANG Y M, KANG Y R, LEE Y G, et al. Sex differences in colonic gene expression and fecal microbiota composition in a mouse model of obesity-associated colorectal cancer[J]. *Sci Rep*, 2024, 14(1):3576. DOI:10.1038/s41598-024-53861-z.
- [19] EFRON P A, DARDEN D B, LI E C, et al. Sex differences associate with late microbiome alterations after murine surgical sepsis[J]. *J Trauma Acute Care Surg*, 2022, 93(2):137-146. DOI:10.1097/TA.0000000000003599.
- [20] CHEN T L, YOU Y J, XIE G X, et al. Strategy for an association study of the intestinal microbiome and brain metabolome across the lifespan of rats[J]. *Anal Chem*, 2018, 90(4): 2475-2483. DOI:10.1021/acs.analchem.7b02859.
- [21] DUAN X Q, XIE X, ZHU C, et al. Sex difference of effect of *Sophora flavescens* on gut microbiota in rats[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2022, 2022:4552904. DOI:10.1155/2022/4552904.
- [22] HILDEBRAND F, EBERSBACH T, NIELSEN H B, et al. A comparative analysis of the intestinal metagenomes present in guinea pigs (*Cavia porcellus*) and humans (*Homo sapiens*) [J]. *BMC Genomics*, 2012, 13:514. DOI:10.1186/1471-2164-13-514.
- [23] FRIAS H, MURGA VALDERRAMA N L, FLORES DURAND G J, et al. Comparative analysis of fasting effects on the cecum microbiome in three guinea pig breeds: Andina, Inti, and Peru [J]. *Front Microbiol*, 2023, 14: 1283738. DOI: 10.3389/fmicb.2023.1283738.
- [24] AL K, SARR O, DUNLOP K, et al. Impact of birth weight and postnatal diet on the gut microbiota of young adult guinea pigs[J]. *PeerJ*, 2017, 5: e2840. DOI:10.7717/peerj.2840.
- [25] WU Y J, FAN H, FENG Y L, et al. Unveiling the gut microbiota and metabolite profiles in guinea pigs with form deprivation myopia through 16S rRNA gene sequencing and untargeted metabolomics[J]. *Heliyon*, 2024, 10(9): e30491. DOI: 10.1016/j.heliyon.2024.e30491.
- [26] SYLVIA K E, JEWELL C P, RENDON N M, et al. Sex-specific modulation of the gut microbiome and behavior in Siberian hamsters[J]. *Brain Behav Immun*, 2017, 60:51-62. DOI:10.1016/j.bbi.2016.10.023.
- [27] SENCIO V, MACHELART A, ROBIL C, et al. Alteration of the gut microbiota following SARS-CoV-2 infection correlates with disease severity in hamsters[J]. *Gut Microbes*, 2022, 14(1): 2018900. DOI:10.1080/19490976.2021.2018900.
- [28] FAN C, ZHENG Y J, XUE H L, et al. Different gut microbial types were found in captive striped hamsters[J]. *PeerJ*, 2023, 11: e16365. DOI:10.7717/peerj.16365.
- [29] 杨睿, 黎春秀, 付利芝, 等. 不同日龄家兔肠道微生物群落结构 [J]. *中国兽医学报*, 2017, 37(9):1693-1698. DOI: 10.16303/j.cnki.1005-4545.2017.09.10.
- YANG R, LI C X, FU L Z, et al. Intestinal microbial community structure changes and analysis in the growth of weaning young rabbits[J]. *Chin J Vet Sci*, 2017, 37(9):1693-1698. DOI: 10.16303/j.cnki.1005-4545.2017.09.10.
- [30] FU C, MA Y, XIA S Q, et al. Study on changes in gut microbiota and microbiability in rabbits at different developmental stages[J]. *Animals*, 2024, 14(12): 1741. DOI: 10.3390/ani14121741.
- [31] ABDEL-KAFY E M, KAMEL K I, SEVERGNINI M, et al. Diversity and co-occurrence pattern analysis of cecal and jejunal microbiota in two rabbit breeds[J]. *Animals*, 2023, 13(14):2294. DOI:10.3390/ani13142294.
- [32] LI K Y, ABDELSATTAR M M, GU M M, et al. The effects of temperature and humidity index on growth performance, colon microbiota, and serum metabolome of *Lra* rabbits[J]. *Animals*, 2023, 13(12):1971. DOI:10.3390/ani13121971.
- [33] YOU I, KIM M J. Comparison of gut microbiota of 96 healthy dogs by individual traits: breed, age, and body condition score [J]. *Animals*, 2021, 11(8):2432. DOI:10.3390/ani11082432.
- [34] FERNÁNDEZ-PINTEÑO A, PILLA R, MANTECA X, et al. Age-associated changes in intestinal health biomarkers in dogs [J]. *Front Vet Sci*, 2023, 10: 1213287. DOI: 10.3389/fvets.2023.1213287.
- [35] HU Q M, CHENG L G, CAO X T, et al. Comparative analysis of gut microbiota of Chinese Kunming dog, German Shepherd dog, and Belgian Malinois dog[J]. *J Vet Sci*, 2024, 25(6): e85. DOI:10.4142/jvs.24181.
- [36] ROJAS C A, PARK B, SCARSELLA E, et al. Species-level characterization of the core microbiome in healthy dogs using full-length 16S rRNA gene sequencing[J]. *Front Vet Sci*, 2024, 11:1405470. DOI:10.3389/fvets.2024.1405470.
- [37] LANGON X. Validation of method for faecal sampling in cats and dogs for faecal microbiome analysis[J]. *BMC Vet Res*, 2023, 19(1):274. DOI:10.1186/s12917-023-03842-7.
- [38] KILBURN-KAPPELER L R, DOERKSEN T, LU A, et al. Evaluation of corn fermented protein on the fecal microbiome of cats[J]. *J Anim Sci*, 2024, 102: skae268. DOI: 10.1093/jas/skae268.
- [39] DRUT A, MKAOUAR H, KRIAA A, et al. Gut microbiota in cats with inflammatory bowel disease and low-grade intestinal T-cell lymphoma[J]. *Front Microbiol*, 2024, 15: 1346639. DOI: 10.3389/fmicb.2024.1346639.
- [40] YANG Y P, LU Y, YU P J, et al. Characterization of gut

- microbial alterations in cynomolgus macaques during growth and maturation[J]. *Zool Res*, 2022, 43(2):176-179. DOI: 10.24272/j.issn.2095-8137.2021.304.
- [41] YANG Y P, XU N, YAO L L, et al. Characterizing bacterial and fungal communities along the longitudinal axis of the intestine in *Cynomolgus* monkeys[J]. *Microbiol Spectr*, 2023, 11(6): e0199623. DOI:10.1128/spectrum.01996-23.
- [42] YANG Y P, YU M L, LU Y, et al. Characterizing the rhythmic oscillations of gut bacterial and fungal communities and their rhythmic interactions in male *Cynomolgus* monkeys[J]. *Microbiol Spectr*, 2024, 12(11): e0072224. DOI: 10.1128/spectrum.00722-24.
- [43] LI Y H, CHEN T, LI Y B, et al. Gut microbiota are associated with sex and age of host: Evidence from semi-provisioned *Rhesus* macaques in southwest Guangxi, China[J]. *Ecol Evol*, 2021, 11(12):8096-8122. DOI:10.1002/ece3.7643.
- [44] 田威龙, 司景磊, 刘笑笑, 等. 高脂高糖饮食对小型猪肠道微生物的影响[J]. *畜牧兽医学报*, 2022, 53(4):1143-1153. DOI: 10.11843/j.issn.0366-6964.2022.04.014.
TIAN W L, SI J L, LIU X X, et al. Effects of high-fat and high-sugar diet on intestinal microbiota in mini-pigs[J]. *Acta Vet Zootechnica Sin*, 2022, 53(4): 1143-1153. DOI: 10.11843/j.issn.0366-6964.2022.04.014.
- [45] 沈利叶, 潘永明, 徐雁云, 等. 高脂高糖饮食诱导五指山小型猪动脉粥样硬化模型肠道菌群的变化[J]. *中国实验动物学报*, 2022, 30(3):299-308. DOI: 10.3969/j.issn.1005-4847.2022.03.001.
SHEN L Y, PAN Y M, XU Y Y, et al. Changes in intestinal flora in a Wuzhishan minipig atherosclerosis model induced by high-fat and high-sugar diet[J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2022, 30(3):299-308. DOI: 10.3969/j.issn.1005-4847.2022.03.001.
- [46] JIANG X, CHEN B Z, GU D S, et al. Gut microbial compositions in four age groups of Tibetan minipigs[J]. *Pol J Microbiol*, 2018, 67(3):383-388. DOI:10.21307/pjm-2018-038.
- [47] YOSI F, LERCH F, VÖTTERL J C, et al. Lactation-related dynamics of bacterial and fungal microbiomes in feces of sows and gut colonization in suckling and newly weaned piglets[J]. *J Anim Sci*, 2024, 102: skae321. DOI: 10.1093/jas/skae321.
- [48] WANG C, WEI S Y, CHEN N N, et al. Characteristics of gut microbiota in pigs with different breeds, growth periods and genders[J]. *Microb Biotechnol*, 2022, 15(3): 793-804. DOI: 10.1111/1751-7915.13755.
- [49] YANG X, TAI Y R, MA Y H, et al. Cecum microbiome and metabolism characteristics of Silky Fowl and White Leghorn chicken in late laying stages[J]. *Front Microbiol*, 2022, 13: 984654. DOI:10.3389/fmicb.2022.984654.
- [50] WANG X Y, MENG J X, REN W X, et al. Amplicon-based metagenomic association analysis of gut microbiota in relation to egg-laying period and breeds of hens[J]. *BMC Microbiol*, 2023, 23(1):138. DOI:10.1186/s12866-023-02857-2.
- [51] WANG Z J, LI S R, DING X Y, et al. Study on the differences in fecal metabolites and microbial diversity of Jiangshan black-bone chickens with different earlobe colors[J]. *Animals*, 2024, 14(21):3060. DOI:10.3390/ani14213060.
- [52] WANG Y, YUAN Z J. Gut microbiota in two chickens' breeds: Characteristics and dynamic changes[J]. *Microb Pathog*, 2024, 197:107101. DOI:10.1016/j.micpath.2024.107101.
- [53] BÖSWALD L F, POPPER B, MATZEK D, et al. Characterization of the gastrointestinal microbiome of the Syrian Hamster (*Mesocricetus auratus*) and comparison to data from mice[J]. *FEBS Open Bio*, 2024, 14(10): 1701-1717. DOI: 10.1002/2211-5463.13869.
- [54] CROWLEY E J, KING J M, WILKINSON T, et al. Comparison of the microbial population in rabbits and guinea pigs by next generation sequencing[J]. *PLoS One*, 2017, 12(2): e0165779. DOI:10.1371/journal.pone.0165779.
- [55] YANG Y P, ZHANG Z Y, WANG Y Q, et al. Colonization of microbiota derived from *Macaca fascicularis*, Bama miniature pigs, beagle dogs, and C57BL/6J mice alleviates DSS-induced colitis in germ-free mice[J]. *Microbiol Spectr*, 2024, 12(8): e0038824. DOI:10.1128/spectrum.00388-24.
- [56] BAI X, ZHONG H, CUI X, et al. Metagenomic profiling uncovers microbiota and antibiotic resistance patterns across human, chicken, pig fecal, and soil environments[J]. *Sci Total Environ*, 2024, 947: 174734. DOI:10.1016/j.scitotenv.2024.174734.
- [57] BERETTA S, APPARICIO M, TONIOLLO G H, et al. The importance of the intestinal microbiota in humans and dogs in the neonatal period[J]. *Anim Reprod*, 2023, 20(3): e20230082. DOI:10.1590/1984-3143-AR2023-0082.
- [58] ITO Y, NAGASAWA M, KOYAMA K, et al. Comparative analysis based on shared amplicon sequence variants reveals that cohabitation influences gut microbiota sharing between humans and dogs[J]. *Front Vet Sci*, 2024, 11:1417461. DOI:10.3389/fvets.2024.1417461.
- [59] DU G K, HUANG H R, ZHU Q W, et al. Effects of cat ownership on the gut microbiota of owners[J]. *PLoS One*, 2021, 16(6): e0253133. DOI:10.1371/journal.pone.0253133.

(收稿日期:2024-08-23 修回日期:2024-12-16)

(本文责任编辑:丁宇菁)

[引用本文]

沈黄奕, 黄宇飞, 杨云鹏. 实验动物肠道菌群特征分析及性别差异性的研究进展[J]. *实验动物与比较医学*, 2025, 45(3): 349-359. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.124.

SHEN H Y, HUANG Y F, YANG Y P. Research progress on characteristics analysis of gut microbiota and its sex differences in laboratory animals[J]. *Lab Anim Comp Med*, 2025, 45(3): 349-359. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.124.

2019年某实验猴养殖场食蟹猴犬瘟热暴发的诊断

王晨娟¹, 杨玲焰², 王立鹏¹, 孙雪萍¹, 李静文¹, 郭连香¹, 荣 荣², 时长军¹

(1. 苏州西山生物技术有限公司, 苏州 215123; 2. 西交利物浦大学理学院生物科学系, 苏州 215123)

[摘要] **目的** 报告2019年某实验猴养殖场中食蟹猴群暴发犬瘟热病毒的诊断情况。**方法** 针对2019年底中国华南地区某实验猴养殖场送检的21只患病食蟹猴(出现面部红疹、皮屑、流鼻涕和腹泻等症状)的血清、皮肤红疹拭子和1只病死猴的抗凝全血、肝、肺、皮肤组织,共46份样品,采用实时荧光定量PCR法检测犬瘟热病毒基因片段,采用免疫组织化学染色法检测肺组织中犬瘟热病毒核蛋白表达。将病死猴的皮肤组织研磨过筛,取滤液接种于单层MDCK细胞系中培养分离病毒,将分离的病毒进行全基因组测序鉴定,采用Clustal Omega工具对亚洲不同犬瘟热病毒分离株进行比对和同源性分析,构建遗传发育树,并对其进行遗传进化分析。**结果** 经临床追溯,患病的食蟹猴出现了与麻疹病毒感染食蟹猴类似的临床症状,剖检病死猴可见肺部有红色病变,大肠黏膜有明显出血。实时荧光定量PCR检测患病猴血清、皮肤红疹拭子及病死猴各组织样本中的犬瘟热病毒核酸结果均呈阳性,由标准曲线公式计算出皮肤组织中的病毒载量最高;免疫组织化学染色病死猴的肺组织显示犬瘟热病毒核蛋白聚集在肺泡上皮细胞、肺支气管和细支气管处;从病死猴皮肤组织中分离出1株犬瘟热病毒株,遗传进化分析表明其与越南犬中发现的亚洲1型CDV/dog/HCM/33/140816株亲缘关系最近,基因相似度达到98.86%。**结论** 综合临床症状、核酸检测、病毒蛋白免疫组织化学法及全基因组测序分析结果,诊断该猴场的食蟹猴感染了犬瘟热病毒,建议将犬瘟热病毒纳入饲养猴群的监测项目之一。本研究还为进一步分析犬瘟热病毒的分子生物学特性提供了基础。

[关键词] 犬瘟热病毒; 食蟹猴; 非人灵长类; 遗传进化

[中图分类号] Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2025)03-0360-08



Diagnosis of an Outbreak of Canine Distemper in Cynomolgus Monkeys in an Experimental Monkey Farm in 2019

WANG Chenjuan¹, YANG Lingyan², WANG Lipeng¹, SUN Xueping¹, LI Jingwen¹, GUO Lianxiang¹, RONG Rong², SHI Changjun¹

(1. Suzhou Xishan Biotechnology Inc., Suzhou 215123, China; 2. Department of Biological Sciences, School of Science, Xi'an Jiaotong-Liverpool University, Suzhou 215123, China)

Correspondence to: RONG Rong (ORCID: 0000-0002-7641-7684), E-mail: Rong.Rong@xjtlu.edu.cn;

SHI Changjun (ORCID: 0009-0000-9970-9930), E-mail: changjun.shi@vrl.net

[ABSTRACT] Objective To report the diagnosis of a canine distemper virus outbreak among a colony of cynomolgus monkeys at an experimental monkey farm in 2019. **Methods** A total of 46 samples were collected from 21 diseased cynomolgus monkeys (exhibiting symptoms such as facial rash, skin scurf, runny nose, and diarrhea) and from one deceased monkey at an experimental monkey breeding farm in South China in late 2019, including serum, skin rash swabs, and anticoagulated whole blood, liver, lung, and skin tissues were submitted for testing. All submitted samples were tested for canine distemper virus gene fragments using real-time quantitative PCR, while immunohistochemical staining was performed to detect canine distemper virus nucleoprotein in lung tissues. The skin tissue of the deceased monkey was ground and sieved. The filtrate was inoculated into a monolayer MDCK cell line for virus isolation. Then, whole-

[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”子课题“猴病原检测新方法建立和高品质种群培育”(2022YFF0710903);2021年江苏省重点研发计划(社会发展)项目“灵长类实验动物重大疾病监测技术应用研发”(BE2021668)

[第一作者] 王晨娟(1987—),女,硕士,助理研究员,研究方向:实验动物质量检测。E-mail:chenjuan.wang@vrlasia.cn

[通信作者] 荣 荣(1967—),女,博士,副教授,研究方向:病毒感染性疾病的机制及控制。E-mail:Rong.Rong@xjtlu.edu.cn。ORCID: 0000-0002-7641-7684;

时长军(1962—),男,博士,高级工程师,研究方向:实验动物疫病学。E-mail:changjun.shi@vrl.net。ORCID: 0009-0000-9970-9930

genome sequencing was performed to identify the isolated virus. The Clustal Omega tool was used to align and analyze the homology of different Asian canine distemper virus isolates. A phylogenetic tree was constructed, followed by genetic evolutionary analysis. **Results** Clinical retrospective analysis revealed that the diseased cynomolgus monkeys exhibited symptoms similar to those observed in cynomolgus monkeys infected with measles virus. Necropsy findings showed red lesions in the lungs and significant hemorrhage in the colonic mucosa. Real-time quantitative PCR detected canine distemper virus nucleic acid in the serum, skin rash swabs of the infected monkeys, and various tissue samples of the deceased monkey, all of which tested positive. Calculation based on the standard curve formula indicated the viral load was highest in the skin tissue. Immunohistochemical staining of the deceased monkey's lung tissue demonstrated aggregation of CDV nucleoprotein in alveolar epithelial cells, bronchi, and bronchioles. A CDV strain was isolated from the skin tissue of the deceased monkey. Phylogenetic analysis indicated that this strain shares the closest relationship (98.86%) with the Asian-1 type canine distemper virus strain CDV/dog/HCM/33/140816, previously identified in dogs in Vietnam. **Conclusion** Based on comprehensive analysis of clinical symptoms, nucleic acid detection, viral protein immunohistochemistry, and whole-genome sequencing results, the diagnosis confirms that the cynomolgus monkeys in this facility are infected with canine distemper virus. It is recommended to include canine distemper virus as a routine surveillance target in captive monkey populations. Additionally, this study provides a foundation for further research on the molecular biological characteristics of canine distemper virus.

[Key words] Canine distemper virus; Cynomolgus monkey; Nonhuman primates; Phylogenetic analysis

犬瘟热 (canine distemper, CD) 是一种危害幼犬, 具有高度传染性的病毒性疾病; 其发病率高且致死速度快, 可通过直接接触或飞沫传播, 是一种在世界范围内分布广泛的疾病。该病是由犬瘟热病毒 (canine distemper virus, CDV) 感染导致。CDV 属于副黏病毒科 (paramyxoviridae) 麻疹病毒属 (morbillivirus), 为 RNA 病毒。副黏病毒科还包含一系列高致病性的病毒, 如麻疹病毒 (measles virus, MeV) 和牛瘟病毒 (rinderpest virus, RPV)。与具有宿主特异性的 MeV 和 RPV 相比, CDV 具有更显著的遗传多样性, 其宿主范围很广, 近些年更是突破了物种屏障^[1-3]。有研究显示, CDV 可以感染至少 6 个目、20 多个科的哺乳动物, 包括家畜种群, 以及自由或圈养的野生动物界的多个物种^[4-9]。CDV 的主要宿主是犬和水貂, 患病及带病毒的动物为主要传染源, 主要通过动物的体液 (鼻涕、唾液、尿液等) 和粪便向外排毒。该病毒的组织侵蚀性非常广泛, 有报道在患病动物的肝、肺、肾、淋巴结、脾、脑等器官组织中均可检测到病毒^[10-11]。

除犬科、浣熊科、熊科、鼬科、猫科外, 非人灵长类动物对 CDV 也敏感^[12-15]。最早感染非人灵长类动物的病例是 1989 年由 Yoshikawa 等^[13] 在自然感染犬瘟热病毒的日本猕猴中发现。近年来, CDV 在非人灵长类动物中的感染时有报道, 且非人灵长类动物感染后有 2%~60% 的致死率^[10]。2006 年, 在我国广西发生过

恒河猴的感染^[11]。笔者所在单位苏州西山生物技术有限公司 (下文简称本单位) 在 2019 年底接收了一批来自华南一猴场疑似 CDV 感染的食蟹猴样本。本研究通过对患病动物临床表现症状追溯、分子生物学检测及所分离病毒的亲缘关系分析, 确诊该猴场的食蟹猴感染了 CDV; 同时结合本单位多年来针对非人灵长类动物 CDV 的检测数据以及该猴场的隔离检测数据, 探讨了 CDV 的诊断及控制措施, 以期开展 CDV 研究工作的同行提供技术参考。

1 材料与方法

1.1 临床送检样本

来自华南地区某实验猴养殖场的 21 只患病食蟹猴的血清、皮肤红疹拭子样本, 以及 1 只病死食蟹猴的 EDTA 抗凝全血、破溃皮肤、肺和肝脏组织, 共 46 份样本, 通过冷链运输, 于 2019 年底送至本单位。随后本单位在 2019 年底及次年 1 月对送检样本进行鉴定诊断。

1.2 主要试剂及仪器

DNA/RNA 共提取试剂盒 (DP422) 购自天根生化科技 (北京) 有限公司; 随机引物由苏州金唯智生物科技有限公司合成; 逆转录酶 (2641A) 购自日本 TaKaRa 公司; 小鼠抗 CDV 单抗 (MA1-82327) 购自美国 Thermo Fisher 公司; 免疫显色试剂 (IHC-BD03-1)

和DAB染色液(1904001)均购自广州安必平医药科技股份有限公司;病毒研究用MDCK细胞系购自北京北纳创联生物技术研究院;DMEM维持培养基(SH30243.01)购自美国HyClone公司。PCR仪(ABI 7500)购自美国Thermo Fisher公司;显微镜(BX43F)购自日本Olympus公司。

1.3 RNA提取及实时荧光定量PCR反应

取21只患病猴血清、红疹拭子及1只病死猴的全血、皮肤、肺和肝脏组织,用DNA/RNA共提取试剂盒提取RNA,严格按照试剂盒说明书进行操作。提取的RNA用60 μ L无RNA酶水洗脱,并用随机引物和逆转录酶逆转录为cDNA。逆转录反应体系共20 μ L,含RNA模板9 μ L、100 μ mol/L随机引物1 μ L、5 \times M-MLV Buffer 4 μ L、200 U/ μ L逆转录酶0.5 μ L、40 U/ μ L逆转录酶抑制剂0.5 μ L、2.5 mmol/L dNTP 4 μ L和RNase-Free ddH₂O 1 μ L。逆转录反应程序:42 $^{\circ}$ C 10 min,95 $^{\circ}$ C 2 min。实时荧光定量PCR采用针对CDV核蛋白基因设计的引物^[16]:CDV-83F(5'-AGCTA-GTTTCATCTTAACTATCAAATT-3')和CDV-83R(5'-TTAACTCTCCAGAAAACATCATGC-3')。引物由苏州金唯智生物技术有限公司合成。实时荧光定量PCR反应体系共20 μ L,其中含5 μ L样本cDNA模板(同时设置空白对照和阳性质粒对照)、10 μ mol/L上下游引物各0.2 μ L、2 \times SYBR Premix 10 μ L和ROX(50 \times)0.4 μ L。在PCR仪中95 $^{\circ}$ C预变性30 s,95 $^{\circ}$ C变性5 s,60 $^{\circ}$ C退火延伸31 s(采集信号),进行40个循环,绘制溶解曲线。测得各样本循环阈值(cycle threshold, Ct),根据标准曲线公式计算样本中的病毒载量(拷贝数/ μ L)。

1.4 免疫组织化学法检测

病死猴的肺组织制成冰冻切片,并于室温干燥约40 min,然后浸泡在冷丙酮中20 min,取出后室温干燥40 min,用PBS洗涤3次,每次1 min。实验组和空白对照组分别滴加体积稀释比例为1:50的抗CDV单抗和PBS,两组同时进行以下操作:室温孵育60 min,然后用PBS洗涤3次,每次1 min;再滴加体积比3%的过氧化氢,室温孵育10 min,而后再次PBS洗涤3次,每次1 min;滴加辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的二抗,室温孵育20 min,然后用PBS洗涤3次,每次1 min;滴加DAB显色剂染色3~10 min,流水冲洗10 min,去除切片上多余的水分,将切片依次浸入95%乙醇溶液、无水乙醇、环保透明剂中各2次,每次1 min,最后封固,镜检。

1.5 皮肤组织中病毒分离

将病死猴皮肤置于适量无菌生理盐水中,用无菌剪刀剪碎后研磨。研磨后的样本过筛,收集滤液并用PBS稀释至2 mL。随后以4 000 \times g离心5 min,获得上清液,通过0.22 μ m滤膜过滤。取500 μ L组织滤液接种于培养的单层MDCK细胞系中作为实验组,未接种组织滤液单层MDCK细胞系作为空白对照组,两组同时进行以下操作:37 $^{\circ}$ C吸附1 h后,用PBS清洗细胞1次,再加入含2%胎牛血清的DMEM维持培养基,在37 $^{\circ}$ C、5% CO₂条件下培养。此后每天观察细胞,直到出现细胞病变效应(cytopathic effect, CPE)。实验组在第8天时收集分离到的病毒,进行CDV特异性PCR验证,方法同1.3节。

1.6 病毒分离株的测序及遗传进化分析

取表现有细胞病变效应的MDCK细胞培养液,3 000 \times g离心5 min,取上清液20 μ L加入5 mL聚乙二醇6000混匀,4 $^{\circ}$ C存放24 h,10 000 \times g离心20 min,取沉淀用DPBS重悬。重悬液送上海探普生物科技有限公司进行全基因组测序。用NovaSeq 6000(Illumina)测序仪测序,用SPAdes v3.13.0工具对病毒基因组进行组装,并将整个开放阅读框序列存入美国国家生物技术信息中心管理的GenBank中。采用Clustal Omega工具对不同CDV分离株进行多序列比对和核苷酸百分比同源性计算,用Seaview 5.02^[17]和PhyML v3.1^[18]算法构建遗传发育树,并对其遗传进化分析。

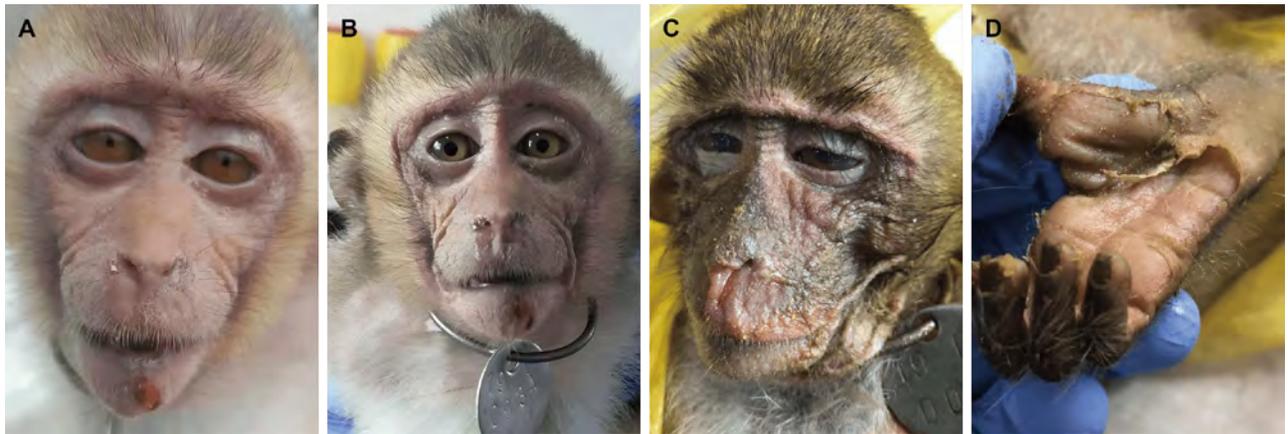
2 结果

2.1 病毒感染食蟹猴的临床症状及剖检情况

经临床追溯,该批食蟹猴在2019年6月由越南购入猴场约半年后,部分动物开始出现面部皮疹(图1A)、红疹,随后出现流鼻涕(图1B),部分动物伴有腹泻。这些症状与同属于副黏病毒科麻疹病毒属的麻疹病毒感染食蟹猴的症状相似。部分病猴后期出现脓皮症(图1C),足部皮肤增厚并破溃(图1D),这一症状也是CDV感染食蟹猴的典型临床特征之一。解剖病死猴后,发现其肺部呈红色病变,大肠黏膜有明显出血,推测严重的肺炎可能是该病猴死亡的主要原因。另外,该实验猴养殖场同期共有26只食蟹猴出现上述症状,其中8只死亡;本次送检样本正是来自其中的21只患病猴和1只病死猴。

2.2 患病猴与病死猴送检样本中均检测出CDV核蛋白基因片段

使用CDV特异性引物对21只患病猴和1只病死猴



注：A，面部有皮屑；B，流鼻涕；C，脓皮症；D，足部皮肤增厚并破溃。

Note: A, Facial skin scurf; B, Runny nose; C, Pyoderma; D, Thickening and ulceration of foot skin.

图1 患病食蟹猴的临床体征

Figure 1 Clinical symptoms of the infected cynomolgus monkeys

的送检样本进行实时荧光定量PCR检测，结果显示，在21只患病猴血清、红疹拭子样本及1只病死猴的全血、皮肤、肺和肝脏组织中均成功扩增出CDV的核蛋白基因片段，即PCR结果全为阳性，其中1只病死猴全血、皮肤、肺和肝脏组织的Ct值分别为36.4、16.1、17.7和24.9，病毒载量分别为1.4拷贝/ μL 、 4.8×10^5 拷贝/ μL 、 1.7×10^5 拷贝/ μL 和 2.0×10^3 拷贝/ μL ，说明病死

猴皮肤中的病毒载量最高。

2.3 病死猴肺组织中检测出CDV核蛋白

使用针对CDV核蛋白的抗体对病死猴的肺组织进行免疫组织化学染色，结果显示在肺泡上皮细胞、支气管和细支气管处均出现棕褐色的特异性染色反应（图2），提示病死猴的肺组织中有明显的CDV感染。



注：大量CDV核蛋白抗原聚集于肺泡上皮细胞（A）、支气管和细支气管（B），红色箭头指示CDV核蛋白抗原的特异性染色（棕褐色）。空白对照组肺组织未见阳性表达（C）。

Note: A large amount of CDV nucleoprotein antigen aggregated in the alveolar epithelial cells (A), bronchi and bronchioles (B). The red arrow indicates the specific staining (brown color) of the CDV nucleoprotein antigen. No positive expression in lung tissue of blank control group (C).

图2 免疫组织化学染色法检测病死猴肺组织切片中病毒蛋白表达(DAB染色, $\times 100$)

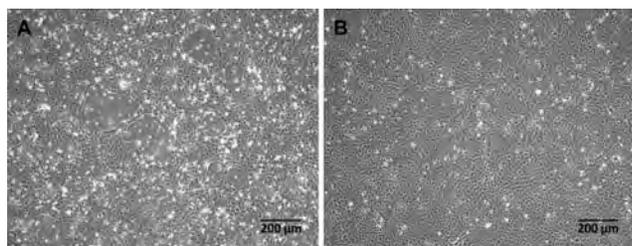
Figure 2 Detection of viral protein expression in lung tissue sections of the deceased monkey by immunohistochemical staining (DAB staining, $\times 100$)

2.4 病死猴皮肤组织中分离出CDV

病死猴的皮肤组织经研磨、过滤等处理后接种于培养的单层MDCK细胞，在接种后第4天出现疑似病毒感染后的细胞病变效应，第8天出现明显的细胞病

变效应（图3A），表现为细胞重叠，部分细胞形态变为圆形，细胞质内颗粒增多，部分细胞坏死脱落。经CDV特异性PCR验证为阳性后，收集分离到的病毒，并命名为CDV/CYN/SUZ/2020株。未接种的MDCK细胞

没有出现细胞病变效应 (图3B)。



注: A, 接种 MDCK 细胞后第 8 天出现细胞病变效应 (×40); B, 正常 MDCK 细胞第 8 天未出现细胞病变效应 (×40)。

Note: A, Cytopathic effect observed in MDCK cells on the 8th day after inoculation (×40); B, Normal MDCK cells without cytopathic effect on the 8th day (×40).

图3 病死猴皮肤组织滤液接种 MDCK 细胞后的病毒感染细胞病变效应表现

Figure 3 Observation of cytopathic effect after inoculation of MDCK cells with skin tissue filtrate from the deceased monkey

2.5 CDV 分离株测序及遗传进化分析显示其是野生型病毒株

病毒株 CDV/CYN/SUZ/2020 分离自病死猴的皮肤

组织, 全基因组长度为 15.67 kb。其完整核苷酸序列存入 GenBank 中, 登录号为 MT325867。该分离株的全长开放阅读框核苷酸序列是亚洲地区具有代表性的 CDV 株之一。将其核苷酸序列与亚洲地区常见的病毒株进行比对, 结果 (表 1) 显示: 新分离的 CDV/CYN/SUZ/2020 株与在越南发现的 CDV/dog/HCM/33/140816 株^[19] 的同源性最高, 为 98.86%; 与中国发现的水貂 ZC1310M 株也有 98.44% 的一致性, 但与水貂 CDV 3 株 (疫苗株) 的匹配度较低 (92.14%), 表明此次新发现的食蟹猴 CDV 株并非来源于疫苗株, 而是野生型病毒株。另外, 与其他实验猴中分离的 CDV 病毒株相比, CDV/CYN/SUZ/2020 株与 BJ-01 株^[2] 和 CYN07-dV 株^[10] 有 97.05% 的相似性, 与 MKY-KM08 株^[2] 的相似度为 96.93%。

在系统发育分析中, 虽然新鉴定的 CDV/CYN/SUZ/2020 株属于亚洲 1 型遗传谱系 (图 4), 但它与 2006 年广西犬瘟热恒河猴中分离的 CDV 株以及 2008 年北京犬瘟热恒河猴病例中发现的病毒株均不相同, 与 2008 年日本食蟹猴感染病例中的病毒株也不相同。

表 1 病死猴皮肤组织中分离的 CDV 株全长开放阅读框核苷酸序列与亚洲常见 CDV 株的一致性(相似度)比对

Table 1 Sequence identity (similarity) comparison between the full-length open reading frame nucleotide sequence of the CDV strain isolated from the skin tissue of the deceased monkey and prevalent Asian CDV strains

病毒株 Strains	CDV/CYN/ SUZ/2020	CDV/dog/ HCM/33/ 140816	ZC1310M	CYN07-dV	BJ-01	MKY- KM08	CDV1_TH/ 2014	MCL-18- Li-1/1	007Lm	CDV3
CDV/CYN/SUZ/2020	100.00	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CDV/dog/HCM/33/140816	98.86	100.00	-	-	-	-	-	-	-	-
ZC1310M	98.44	98.73	100.00	-	-	-	-	-	-	-
CYN07-dV	97.05	97.31	97.70	100.00	-	-	-	-	-	-
BJ-01	97.05	97.30	97.69	99.92	100.00	-	-	-	-	-
MKY-KM08	96.93	97.18	97.56	99.64	99.64	100.00	-	-	-	-
CDV1_TH/2014	94.28	94.54	94.84	94.62	94.61	94.57	100.00	-	-	-
MCL-18-Li-1/1	93.54	93.78	94.11	93.87	93.87	93.82	94.06	100.00	-	-
007Lm	93.93	94.25	94.57	94.53	94.51	94.46	94.57	93.95	100.00	-
CDV3	92.14	92.37	92.68	92.43	92.42	92.43	92.34	91.96	92.76	100.00

3 讨论

有历史文献记载表明, CDV 在 1760 年通过犬类传入欧洲某地, 并引发了广泛流行, 感染后的动物死亡率很高, 最终传播到欧洲的其他地区^[20-21]。CDV 和 MeV 均属于麻疹病毒属, 具有相同的基因组结构, 并有高度相似的核苷酸和氨基酸序列。有研究表明,

CDV 可能曾感染过人类, 与一种人类神经性疾病——多发性硬化症 (multiple sclerosis, MS) 存在某种关联^[3]。基于 CDV 和 MeV 在分子层面上的相关性, 科学家们可以用 CDV 来研究麻疹的发病机制, 并且开发疫苗和抗病毒疗法。尽管 CDV 具有宿主特异性, 主要感染犬科动物, 但它仍对包括非人灵长类在内的多种动物构成威胁。目前, 国内外已有多起 CDV 感染非人灵

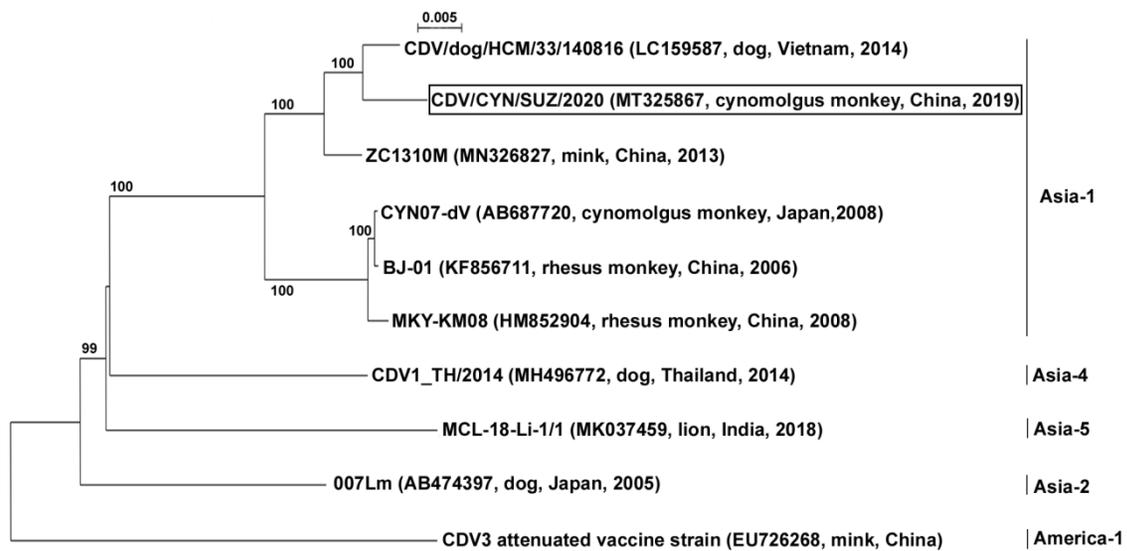


图4 基于不同CDV株全开放阅读框序列的系统发育分析(黑框标记的为本研究从病死猴皮肤组织中新分离的CDV株)

Figure 4 Phylogenetic analysis based on full-length open reading frame sequences of different CDV strains (the CDV strain newly isolated from the skin tissue of the deceased monkey in this study is marked with a black box)

长类动物的报道,且一旦感染,没有疫苗的保护,其发病率较高。接种MeV疫苗的动物通常也会对CDV产生免疫反应,所产生的抗体能够识别MeV和CDV之间保守的表位,从而为宿主提供一定程度的保护^[22-23]。因此推测,MeV免疫可能保护人类免受CDV感染,或至少使感染者未表现出临床症状。在感染CDV并接种MeV疫苗的非人灵长类动物模型中,动物产生的抗体可对CDV产生部分交叉反应,提供了一定的交叉保护^[24]。此外有文献报道,抗CDV血清治疗有助于促进CDV感染动物的康复^[11]。目前,已有CDV肽作为候选疫苗的研制报道,未来将有更为成熟的CDV疫苗产生^[25]。

本研究中,对患病猴和病死猴的临床标本进行实验室调查符合科赫法则^[10],本实验室的检测结果显示和动物表现出的典型临床症状共同证明了CDV是导致该猴群疾病暴发的主要原因。本研究不仅进行了CDV的核酸检测,还检测了CDV抗体以及会导致皮疹的猴水痘病毒(simian varicella virus, SVV)、MeV的核酸及其抗体。结果显示,患病猴血清中的CDV和MeV抗体检测均为阳性,而SVV核酸、抗体以及MeV的核酸检测均为阴性,进一步说明了CDV与MeV抗体之间的交叉反应。

本单位为实验动物第三方检测机构。回溯本单位在2020年6月至2024年6月针对CDV的全部检测数据显示:3414份实验猴血清样本中CDV抗体的总检出率

为44.11% (1506/3414),其中食蟹猴的CDV抗体检出率为53.88% (903/1676),恒河猴为37.14% (361/972),豚尾猴为31.54% (241/764);11333份全血、口腔/鼻拭子、粪便、肺组织等样本中CDV核酸的检出率为1.92% (218/11333),其中食蟹猴为1.05% (76/7268),恒河猴为3.49% (142/4073)。可以看出,CDV抗体的阳性率远高于核酸阳性率。这可能是因为近年来随着各单位对CDV感染非人灵长类动物的认识和了解,加强了预防与监测工作,部分动物接种了犬瘟热疫苗,另外部分猴群接种了麻疹疫苗,而这都会使动物产生与CDV抗原的交叉反应。因此,与抗体检测结果相比,核酸检测的阳性率更能反映猴群的实际感染情况。在本案例中,共有26只食蟹猴发病,其中8只死亡;在得知检测结果后,该猴场迅速对患病动物及与其有接触的可疑动物进行了隔离(总计约200只),并对隔离动物接种了CDV疫苗。此后,该猴场出现类似CDV感染症状的实验猴大幅减少,未发现新病例,也无新增死亡动物。鉴于此,笔者建议将CDV纳入猴群的日常监测计划中。

据报道,从中国不同地区的狐狸、浣熊和水貂等动物中分离出来的CDV与来自国外不同地区的CDV一起构成了6个主要的遗传谱系,包括美国1型(大多数疫苗株)、美国2型、亚洲1型、亚洲2型等^[26-27]。亚洲1型CDV于1991年首次由日本报道^[28],随后蔓延至多个亚洲国家,包括韩国、泰国和中国^[19]。近年,

河南省的一个果子狸农场也暴发了CDV疫情,经全基因组测序发现,该病毒与1997年导致小熊猫死亡的CDV相似度高达98.7%~99.72%,而与美国1型的一致性很低;这株CDV不仅导致圈养动物的免疫衰竭,还可能增加人畜共患风险^[29]。

本研究对华南地区某养殖猴场发现CDV感染症状的21只患病猴的血清、皮肤红疹拭子以及1只病死猴的全血、皮肤、肺、肝脏样本进行CDV核蛋白基因特异性实时荧光定量PCR扩增,结果均为CDV阳性。随后,采用免疫组织化学染色技术检测肺组织中的CDV抗原,发现肺泡上皮细胞、支气管和细支气管处聚集了大量的CDV核蛋白抗原。最后,成功从CDV阳性病死猴的皮肤组织中分离出CDV株并进行了全基因组测序,构建了遗传发育树。遗传进化分析发现,新分离的CDV/CYN/SUZ/2020病毒株与其他已知的亚洲1型、亚洲2型和CDV疫苗株存在差异,但与2014年越南发现的CDV/dog/HCM/33/140816病毒株相似度最高;而越南发现的CDV株与中国河北发现的KC427278.1株亲缘关系最接近^[19],这提示CDV的跨境传播可能发生在中国和越南之间。随后该猴场证实,此批食蟹猴确实是在CDV暴发感染的同年从越南引进。笔者认为,广泛研究来自中国不同地区及不同动物种属的CDV分离株,将有助于更好地了解中国CDV感染情况,特别是非人灵长类动物CDV的起源和演变,同时为CDV的诊断、疫苗研发和疾病防控提供重要支持。

[作者贡献 Author Contribution]

王晨娟负责临床样本收集、检测和结果分析,以及文献检索与论文撰写;

杨玲焰负责病毒分离培养和论文修改;

王立鹏负责PCR检测及数据整理;

孙雪萍负责免疫组织化学染色实验及分析;

李静文负责血清学检测;

郭连香、荣荣指导论文修改,参与论文审核;

时长军指导实验设计,负责论文审核。

[利益声明 Declaration of Interest]

所有作者均声明本文不存在利益冲突。

[参考文献 References]

- [1] TROGU T, CASTELLI A, CANZIANI S, et al. Detection and molecular characterization of canine distemper virus in wildlife from northern Italy[J]. Pathogens, 2022, 11(12): 1557. DOI:10.3390/pathogens11121557.
- [2] SUN Z Z, LI A X, YE H H, et al. Natural infection with canine distemper virus in hand-feeding Rhesus monkeys in China[J]. Vet Microbiol, 2010, 141(3-4): 374-378. DOI: 10.1016/j.vetmic.2009.09.024.
- [3] DUQUE-VALENCIA J, SARUTE N, OLARTE-CASTILLO X A, et al. Evolution and interspecies transmission of canine distemper virus-an outlook of the diverse evolutionary landscapes of a multi-host virus[J]. Viruses, 2019, 11(7): 582. DOI:10.3390/v11070582.
- [4] OLEAGA Á, VÁZQUEZ C B, ROYO L J, et al. Canine distemper virus in wildlife in south-western Europe[J]. Transbound Emerg Dis, 2022, 69(4): e473-e485. DOI:10.1111/tbed.14323.
- [5] LIANG J, WANG T T, WANG Q, et al. Prevalence of canine distemper in minks, foxes and raccoon dogs from 1983 to 2023 in Asia, North America, South America and Europe[J]. Front Vet Sci, 2024, 11: 1394631. DOI: 10.3389/fvets.2024.1394631.
- [6] CHENG Y N, WANG J K, ZHANG M, et al. Isolation and sequence analysis of a canine distemper virus from a raccoon dog in Jilin Province, China[J]. Virus Genes, 2015, 51(2):298-301. DOI:10.1007/s11262-015-1236-3.
- [7] WILKES R P. Canine distemper virus in endangered species: species jump, clinical variations, and vaccination[J]. Pathogens, 2022, 12(1):57. DOI:10.3390/pathogens12010057.
- [8] DI FRANCESCO C E, SMOGLICA C, DI PIRRO V, et al. Molecular detection and phylogenetic analysis of canine distemper virus in marsican brown bear (*Ursus arctos marsicanus*) [J]. Animals, 2022, 12(14): 1826. DOI: 10.3390/ani12141826.
- [9] FRANZO G, DE VILLIERS L, COETZEE L M, et al. Unveiling the molecular epidemiology of canine distemper virus in Namibia: an expected pathogen showing an unexpected origin[J]. Heliyon, 2024, 10(15): e34805. DOI:10.1016/j.heliyon.2024.e34805.
- [10] SAKAI K J, NAGATA N, AMI Y, et al. Lethal canine distemper virus outbreak in cynomolgus monkeys in Japan in 2008[J]. J Virol, 2013, 87(2):1105-1114. DOI:10.1128/JVI.02419-12.
- [11] QIU W, ZHENG Y, ZHANG S F, et al. Canine distemper outbreak in rhesus monkeys, China[J]. Emerg Infect Dis, 2011, 17(8):1541-1543. DOI:10.3201/eid1708.101153.
- [12] 陆承平. 兽医微生物学[M]. 3版. 北京: 中国农业出版社, 2001: 525-526.
- [13] LU C P. Veterinary microbiology[M]. 3rd ed. Beijing: China Agricultural Press, 2001:525-526.
- [14] YOSHIKAWA Y, OCHIKUBO F, MATSUBARA Y, et al. Natural infection with canine distemper virus in a Japanese monkey (*Macaca fuscata*) [J]. Vet Microbiol, 1989, 20(3):193-205. DOI: 10.1016/0378-1135(89)90043-6.
- [15] 麦博, 王弘义, 盘宝进, 等. 灵长类动物感染犬瘟热[J]. 中国比较医学杂志, 2012, 22(6):72-76. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7856.2012.06.016.
- [16] MAI B, WANG H Y, PAN B J, et al. Natural infection with canine distemper virus in Primates[J]. Chin J Comp Med, 2012, 22(6):72-76. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7856.2012.06.016.
- [17] 李慧敏. 犬瘟热病毒的分离鉴定及其抗原蛋白的研究[D]. 成都: 四川农业大学, 2006.
- [18] LI H M. Isolation and identification of canine distemper virus and study on its antigenic protein[D]. Chengdu: Sichuan Agricultural University, 2006.
- [19] 黄国君, 岳华, 杨发龙, 等. SYBR Green I 荧光定量 RT-PCR 检测犬瘟热病毒方法的建立及应用[J]. 中国预防兽医学报, 2008, 30(6):450-454. DOI: 10.3724/SP.J.1011.2008.00534.
- [20] HUANG G J, YUE H, YANG F L, et al. Development of a SYBR Green I real-time RT-PCR assay for detection of canine

- distemper virus[J]. Chin J Prev Vet Med, 2008, 30(6):450-454. DOI: 10.3724/SP.J.1011.2008.00534.
- [17] GOUY M, GUINDON S, GASCUEL O. SeaView version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building[J]. Mol Biol Evol, 2010, 27(2):221-224. DOI:10.1093/molbev/msp259.
- [18] GUINDON S, GASCUEL O. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood[J]. Syst Biol, 2003, 52(5): 696-704. DOI: 10.1080/10635150390235520.
- [19] NGUYEN D V, SUZUKI J, MINAMI S, et al. Isolation and phylogenetic analysis of canine distemper virus among domestic dogs in Vietnam[J]. J Vet Med Sci, 2017, 79(1):123-127. DOI:10.1292/jvms.16-0394.
- [20] QUINTERO-GIL C, RENDON-MARIN S, MARTINEZ-GUTIERREZ M, et al. Origin of canine distemper virus: consolidating evidence to understand potential zoonoses[J]. Front Microbiol, 2019, 10:1982. DOI:10.3389/fmicb.2019.01982.
- [21] RIVERA-MARTÍNEZ A, RODRÍGUEZ-ALARCÓN C A, ADAME-GALLEGOS J R, et al. Canine distemper virus: origins, mutations, diagnosis, and epidemiology in Mexico[J]. Life, 2024, 14(8):1002. DOI:10.3390/life14081002.
- [22] SHESHERADARAN H, NORRBY E, MCCULLOUGH K C, et al. The antigenic relationship between measles, canine distemper and rinderpest viruses studied with monoclonal antibodies[J]. J Gen Virol, 1986, 67 (Pt 7): 1381-1392. DOI: 10.1099/0022-1317-67-7-1381.
- [23] ROUXEL R N, SVITEK N, VON MESSLING V. A chimeric measles virus with canine distemper envelope protects ferrets from lethal distemper challenge[J]. Vaccine, 2009, 27 (36):4961-4966. DOI:10.1016/j.vaccine.2009.05.096.
- [24] OTSUKI N, SEKIZUKA T, SEKI F, et al. Canine distemper virus with the intact C protein has the potential to replicate in human epithelial cells by using human nectin4 as a receptor [J]. Virology, 2013, 435(2): 485-492. DOI: 10.1016/j.virol.2012.10.033.
- [25] RENDON-MARIN S, RUÍZ-SÁENZ J. Universal peptide-based potential vaccine design against canine distemper virus (CDV) using a vaccinomic approach[J]. Sci Rep, 2024, 14(1): 16605. DOI:10.1038/s41598-024-67781-5.
- [26] SWATI, DEKA D, UPPAL S K, et al. Isolation and phylogenetic characterization of Canine distemper virus from India[J]. Virusedisease, 2015, 26(3): 133-140. DOI: 10.1007/s13337-015-0256-x.
- [27] GUERCIO A, MIRA F, DI BELLA S, et al. Biomolecular analysis of canine distemper virus strains in two domestic ferrets (*Mustela putorius furo*) [J]. Vet Sci, 2023, 10(6): 375. DOI: 10.3390/vetsci10060375.
- [28] MOCHIZUKI M, HASHIMOTO M, HAGIWARA S, et al. Genotypes of canine distemper virus determined by analysis of the hemagglutinin genes of recent isolates from dogs in Japan[J]. J Clin Microbiol, 1999, 37(9):2936-2942. DOI:10.1128/JCM.37.9.2936-2942.1999.
- [29] SHI N, ZHANG L, YU X H, et al. Insight into an outbreak of canine distemper virus infection in masked palm civets in China[J]. Front Vet Sci, 2021, 8: 728238. DOI: 10.3389/fvets.2021.728238.

(收稿日期: 2024-11-04 修回日期: 2024-12-30)
(本文责任编辑: 张俊彦)

【引用本文】

王晨娟, 杨玲焰, 王立鹏, 等. 2019年某实验猴养殖场食蟹猴犬瘟热暴发的诊断[J]. 实验动物与比较医学, 2025, 45(3): 360-367. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.160.

WANG C J, YANG L Y, WANG L P, et al. Diagnosis of an outbreak of canine distemper in cynomolgus monkeys in an experimental monkey farm in 2019[J]. Lab Anim Comp Med, 2025, 45(3): 360-367. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.160.

《实验动物与比较医学》有关实验动物福利伦理内容的说明

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

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

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

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

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

《实验动物与比较医学》编辑部

鳞状皮屑裸小鼠木糖葡萄球菌的分离鉴定

孔志豪¹, 魏晓锋¹, 于灵芝¹, 冯丽萍¹, 朱琦¹, 施国君², 王晨²

[1. 上海实验动物研究中心, 上海 201203; 2. 英威沃(上海)生物科技有限公司, 上海 201203]

[摘要] 目的 拟从鳞状皮屑裸小鼠的皮肤上分离病原菌, 并进行病原鉴定、溯源分析和致病性研究, 以期为鳞状皮屑裸小鼠的病原体诊断提供新的思路。方法 对1只患鳞状皮屑皮肤病的裸小鼠的皮肤进行拭子采样, 通过核酸检测、细菌分离培养、生化鉴定、16S rDNA 基因扩增测序、全基因组测序构建系统进化树等方法鉴定菌株。然后取15只 BALB/c 裸小鼠, 随机分为涂擦生理盐水的对照组、涂擦 1.8×10^8 CFU/mL 分离病菌液的高浓度组和涂擦 1.8×10^7 CFU/mL 分离病菌液的低浓度组, 通过动物感染试验及 HE 染色观察皮肤组织病理学变化, 进行该菌株的致病性分析。结果 送检裸小鼠的皮肤拭子样本中牛棒状杆菌核酸阴性, 排除了牛棒状杆菌的感染。进一步分离培养的病原菌经高盐甘露醇琼脂平板和血琼脂平板培养以及革兰染色提示为革兰阳性葡萄球菌。16S rDNA 测序和全自动微生物鉴定系统鉴定结果显示, 该菌株为木糖葡萄球菌。全基因组测序后的系统进化树分析显示, 该菌株与韩国叶菜分离株 (GenBank GCA_00207825.1) 的亲缘关系最近。动物感染试验显示, 高浓度和低浓度分离菌液分别感染17 d 和20 d 时裸小鼠头颈部和背部开始出现鳞状皮屑, 之后逐渐扩散至其他部位; 而且两组的皮屑症状均表现为一过性, 分别持续7 d 和3 d 皮屑消失; 高浓度组和低浓度组的感染率均为33.33%。与对照组相比, 感染后的裸小鼠皮肤组织病理学观察未发现明显异常, 提示该菌株对裸小鼠的致病力存在明显的个体差异。结论 从患鳞状皮屑裸小鼠皮肤上分离鉴定出1株木糖葡萄球菌菌株。该菌株是一种机会性感染病原体, 临床表现为过性的鳞状皮屑症状, 组织病理学并未发生明显改变, 并且裸小鼠对该菌株的敏感性存在个体差异。本研究结果为免疫缺陷小鼠或基因敲除小鼠的病原体诊断提供了数据支撑。

[关键词] 裸小鼠; 鳞状皮屑; 木糖葡萄球菌; 系统进化树

[中图分类号] Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2025)03-0368-08



Isolation and Identification of *Staphylococcus xylosus* in Nude Mice with Squamous Skin Scurfs

KONG Zhihao¹, WEI Xiaofeng¹, YU Lingzhi¹, FENG Liping¹, ZHU Qi¹, SHI Guojun², WANG Chen²

[1. Shanghai Laboratory Animal Research Center, Shanghai 201203, China; 2. INVIVO (Shanghai) Biotechnology Co., Ltd., Shanghai 201203, China]

Correspondence to: WEI Xiaofeng (ORCID: 0009-0009-5089-8342), E-mail: wei.xf@outlook.com;

YU Lingzhi (ORCID: 0009-0004-1835-3493), E-mail: yulingzhi@slarc.org.cn

[ABSTRACT] **Objective** To isolate pathogenic bacteria from the skin of a nude mouse exhibiting squamous skin scurfs, and perform bacterial identification, traceability analysis, and pathogenicity studies to provide a new approach for the diagnosis of pathogens in nude mice with squamous skin scurfs.

Methods Skin swab samples were collected from a nude mouse exhibiting squamous skin scurfs for nucleic acid testing, bacterial isolation and culture, biochemical identification, 16S rDNA gene amplification and sequencing, and whole genome sequencing to construct a phylogenetic tree. Fifteen BALB/c nude mice were randomized into a saline-treated control group, a high-concentration group treated with 1.8×10^8 CFU/mL of the isolated bacterial suspension, and a low-concentration group treated with 1.8×10^7 CFU/mL

[基金项目] 上海实验动物研究中心科技创新计划新星项目“木糖葡萄球菌快速分子检测方法的建立及应用”(2024NS05)

[第一作者] 孔志豪(2001—),男,大专,主要从事实验动物质量控制研究。E-mail: kongzhihao@slarc.org.cn

[通信作者] 魏晓锋(1980—),男,硕士,副研究员,主要从事实验动物质量控制研究。E-mail: wei.xf@outlook.com。ORCID: 0009-0009-5089-8342;

于灵芝(1980—),女,博士,助理研究员,主要从事实验动物病原体核酸检测方法研究。E-mail: yulingzhi@slarc.org.cn。ORCID: 0009-0004-1835-3493

of the isolated bacterial suspension. Pathogenicity was assessed by animal infection experiments and observation of histopathological changes in skin tissue using HE staining. **Results** The nucleic acid test for *Corynebacterium bovis* was negative, excluding infection by this organism. The pathogen isolated on mannitol salt agar and blood agar, combined with Gram staining, suggested a Gram-positive *Staphylococcus* species. The isolated strain was identified by 16S rDNA sequencing and a fully automated microbial identification system as *Staphylococcus xylosus*. Phylogenetic tree analysis based on whole genome sequencing showed that the strain was most closely related to an isolate from leafy vegetables in South Korea (GenBank GCA_00207825.1). In the high-concentration group, squamous skin scurfs appeared on the head, neck, and back of nude mice on the 17th day post-infection, while in the low concentration group, similar symptoms appeared on the 20th day post-infection and gradually spread to other areas. The scaling symptoms were transient, lasting for 7 days in the high-concentration group and 3 days in the low-concentration group, after which the skin returned to normal. The infection rate was 33.33% in both the high- and low-concentration groups. No significant pathological changes were observed in the skin tissues of infected mice compared to the control group, indicating marked individual differences in the pathogenicity of the strain in nude mice. **Conclusion** A strain of *Staphylococcus xylosus* was isolated from the skin of a nude mouse exhibiting squamous skin scurfs. The strain is an opportunistic pathogen that causes transient squamous skin scurfs without significant histopathological changes, and there are individual differences in the sensitivity of nude mice to this strain. These findings can provide valuable data for pathogen identification in immunodeficient or gene knockout mice.

[Key words] Nude mice; Squamous skin scurfs; *Staphylococcus xylosus*; Phylogenetic tree

无胸腺裸小鼠作为一种免疫缺陷动物，是目前生物医药领域常用的实验动物模型。裸小鼠鳞状皮肤病是一种全身性角化过度皮炎，典型的临床症状表现为全身皮肤出现白色鳞状皮屑^[1]。牛棒状杆菌通常被认为是引起该症状的病原体^[2-3]。但是，有临床诊断病例提示感染木糖葡萄球菌也可引起同样的临床症状^[4]。木糖葡萄球菌是一种寄居在哺乳动物皮肤的条件致病性共生菌，但其对免疫缺陷和基因敲除的小鼠表现出明显的致病性^[5]，症状为皮炎和脓肿等^[6-9]，在这些小鼠的皮肤样本中均可分离到该菌。因此，木糖葡萄球菌被认为是免疫缺陷和基因敲除小鼠的潜在机会性病原体^[10]。

笔者所在检测室于2023年8月接收到一只临床症状为鳞状皮屑的BALB/c裸小鼠，经核酸检测排除牛棒状杆菌感染后，对该裸小鼠病灶区皮肤样本进行病原分离鉴定、全基因组测序、动物感染试验和组织病理学检测等研究，判断其感染病原为木糖葡萄球菌，并进一步探讨该菌对裸小鼠的致病性，以期鳞状皮屑裸小鼠的病原体诊断提供更广阔的思路。

1 材料与方法

1.1 实验动物

1只患鳞状皮屑皮肤病的裸小鼠来自上海实验动物

研究中心质监站的日常检测，对其患病皮肤进行无菌棉拭子采样，用于病原体诊断。

用于动物感染试验的15只雄性BALB/c裸小鼠均8周龄，购自上海必凯科翼生物科技有限公司[SCXK(沪)2023-0009]，饲养在上海实验动物研究中心屏障设施[SYXK(沪)2019-0003]。环境温度为20~24℃，相对湿度为45%~55%，饲料、水、垫料和笼盒等均经高压蒸汽灭菌，动物自由采食，光照采取12h/12h昼夜交替。本实验方案通过上海实验动物研究中心实验动物福利伦理审查委员会审查批准(PA202303201)，全程严格遵循3R原则。

1.2 主要试剂和仪器

32通道全自动核酸纯化仪及配套的磁珠法核酸提取试剂均购自麦诺迪(上海)生物科技有限公司；全自动微生物鉴定系统(VITEK2 Compact)购自法国Biomerieux公司；荧光定量PCR仪(型号CFX Opus 96)购自美国Bio-Rad公司；荧光定量PCR反应液TaqMan™ Gene Expression Master Mix(批号2654759)购自美国ABI公司；高盐甘露醇琼脂平板(批号20230801)和血琼脂平板(批号20230808)均购自上海科玛嘉微生物技术有限公司；革兰染色试剂(批号230109)购自杭州滨和微生物试剂有限公司。生物荧光显微镜(型号Imager A1)购自德国Carl Zeiss公司。

Ezup 柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒购自生工生物工程（上海）股份有限公司。

1.3 DNA 提取及核酸检测

将鳞状皮屑皮肤患处采集的拭子样本置于 2 mL 离心管中，加入 1 mL 无菌生理盐水，浸泡 5~10 min 后振荡 30 s，取 200 μ L 菌悬液进行全基因组 DNA 提取。按照 32 通道全自动核酸纯化仪及配套的磁珠法核酸提取试剂说明书操作。

采用中国实验动物学会团体标准 T/CALAS 20—2017 推荐的实时荧光定量 PCR 法^[11] 检测牛棒状杆菌。PCR 扩增上游引物序列为 5'-CGGCAGGGACGAA-GCTT-3'，下游引物序列为 5'-CACGTAGTTAGCCG-GTGCTTCT-3'，探针序列为 FAM-TGTGACGGTAC-CTGCAT-MGB。引物和探针均由生工生物工程（上海）股份有限公司合成。PCR 扩增条件：50 $^{\circ}$ C 2 min；95 $^{\circ}$ C 10 min；95 $^{\circ}$ C 15 s，60 $^{\circ}$ C 1 min，40 个循环。以牛棒状杆菌扩增片段的重组质粒作为阳性对照，以牛棒状杆菌阴性正常小鼠的皮肤组织 DNA 为阴性对照。

1.4 细菌培养及革兰染色镜检

按中国实验动物学会团体标准 T/CALAS 92—2020 推荐方法^[12] 进行木糖葡萄糖球菌的常规分离培养。用无菌棉拭子蘸取生理盐水后，刮取鳞状皮屑，将拭子涂在高盐甘露醇琼脂平板，36 $^{\circ}$ C 培养 24 h，观察菌落生长结果。挑取直径为 (1.0 \pm 0.5) mm，表面光滑，呈白色圆形凸起，周围有晕环的疑似菌落，在血琼脂平板上进行单菌落培养，36 $^{\circ}$ C 培养 24 h 后，按革兰染色试剂说明书推荐步骤进行革兰细菌染色。用生物荧光显微镜（1 000 倍）观察视野内菌落形成情况。

1.5 菌落基因组提取及菌种鉴定

收集纯培养的菌落，送至生工生物工程（上海）股份有限公司进行菌种鉴定。用 Ezup 柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒进行菌落基因组提取。以 16S rDNA 通用扩增引物 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-GGTACCTTGTACGACTT-3') 进行 PCR 扩增。引物由生工生物工程（上海）股份有限公司合成。PCR 反应体系：10 \times PCR Buffer 5 μ L，25 mmol/L MgCl₂ 2 μ L，2 mmol/L dNTP 0.5 μ L，10 μ mol/L 的 27F 和 1492R 引物各 1 μ L，5 U/ μ L 的 Taq DNA 聚合酶 0.5 μ L，基因组 DNA 1 μ L，加水至 25 μ L。普通 PCR 扩增条件：94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min；94 $^{\circ}$ C 30 s，60 $^{\circ}$ C 30 s，72 $^{\circ}$ C 1 min，35 个循环；72 $^{\circ}$ C 延伸 8 min。PCR 产物经

1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测后，进行 16S rDNA 测序分析，同时用全自动微生物鉴定系统进行菌种确认。

1.6 全基因组测序及系统进化树分析

收集纯培养的菌落，送至生工生物工程（上海）股份有限公司进行二代全基因组测序。全基因组测序的主要过程：用 MagPure 细菌 DNA 提取试剂盒提取细菌基因组 DNA，用 Illumina NovaSeq 6000 测序系统构建文库。整个基因组 DNA 被随机片段化，平均大小为 200~400 bp。所选片段经过末端修复、3' 腺苷酸化、接头连接和 PCR 扩增。用磁珠纯化后，用 Qubit 4.0 荧光计进行文库定量，并通过 2% 琼脂糖凝胶电泳评估文库的长度。在 Illumina NovaSeq 6000 平台上测序，然后用 Trimmomatic (v0.36) 工具对初始读取的片段进行过滤，去除低质量碱基，获得质量合格的片段。使用 SPAdes (v1.15) 工具完成基因组组装后，采用 Gapfiller (v1.11) 软件填补基因组空白。

以核心基因集的单拷贝基因集为多序列比对结果，以 Neighbour-joining 聚类方式，构建该分离菌株的系统进化树（核心基因树），以自展值百分比（bootstrap percentage, Bp）评估进化树分支可信度。

1.7 动物感染试验及组织病理学观察

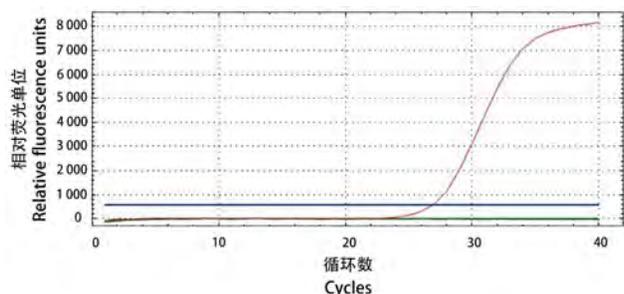
将 15 只 BALB/c 裸小鼠随机分为 3 组：对照组 3 只，高浓度组 6 只，低浓度组 6 只。适应性饲养 3 d 后，对照组用灭菌棉签蘸取生理盐水 100 μ L，沿裸小鼠颈背部脊柱滚动涂擦所在区域的皮肤；以 1.8×10^8 CFU/mL 为高浓度组， 1.8×10^7 CFU/mL 为低浓度组，用灭菌棉签分别蘸取不同浓度的纯培养的分离菌液均 100 μ L，对相同部位进行感染。每天早上 9:00 观察记录 3 组裸小鼠的临床症状，对首次发现皮屑的时间记录为皮屑第 1 天，感染 28 d 后，将所有裸小鼠行 CO₂ 窒息并脱颈椎法安乐死。

采集裸小鼠的背部脊柱位置皮肤，经 10% 甲醛溶液固定、石蜡包埋、切片（由上海千崖康药生物科技有限公司完成）后，通过常规苏木精-伊红（hematoxylin-eosin, HE）染色观察组织病理学变化。

2 结果

2.1 核酸检测显示该鳞状皮屑病原菌并非牛棒状杆菌

针对牛棒状杆菌的核酸检测结果表明，这只患鳞状皮屑的裸小鼠的皮肤拭子样本用于实时荧光定量 PCR 未出现典型的扩增曲线（图 1），提示牛棒状杆菌核酸阴性。



注：红色曲线代表阳性对照，黑色曲线代表阴性对照，绿色曲线代表样本。蓝色直线代表阈值线。

Note: Red curve shows the positive control. Black curve shows the negative control. Green curve shows the sample. Blue line shows the threshold line.

图1 实时荧光定量PCR检测显示牛棒状杆菌阴性
Figure 1 Detection of *Corynebacterium bovis* was negative by real-time fluorescence PCR

2.2 细菌培养显示该鳞状皮屑病原菌为革兰染色阳性葡萄球菌

将鳞状皮屑裸小鼠的皮肤拭子样本在高盐甘露醇琼脂平板上培养，生长出的菌落直径为 (1.0 ± 0.5) mm 时，表面光滑，呈白色圆形凸起，周围有晕环（图2A）。而在血琼脂平板上菌落直径长至为 (1.0 ± 0.5) mm 时，边缘整齐，表面光滑，且呈不溶血的灰白色圆形凸起，周围无晕环（图2B）。进一步的革兰染色结果显示阳性（图2C）。

2.3 菌种鉴定显示病原菌为木糖葡萄球菌

从这只鳞状皮屑裸小鼠的皮肤拭子中分离培养的

病原菌提取菌落基因组后，测得的16S rDNA序列经BLAST比对，发现与木糖葡萄球菌的16S rDNA序列同源性为99.86%。用全自动微生物鉴定系统鉴定该菌株的置信度达95%（表1）。综合两种鉴定方法，结果提示该分离菌为木糖葡萄球菌。

2.4 分离菌株的系统进化树构建

全基因组测序后系统进化树分析结果表明，本分离株与韩国叶菜分离株（GenBank GCA_002078255.1）的亲缘关系最近（Bp为100）（图3）。然后将本次的分离株命名为slarc01，提交GenBank，登录ID号为JBHOFF000000000。

2.5 分离培养菌感染动物后的临床表现

动物感染试验显示，生理盐水对照组裸小鼠未出现皮屑（图4A），而分离菌高浓度组和低浓度组的裸小鼠分别在17 d和20 d时头颈部和背部开始出现鳞状皮屑，随后逐渐扩散至其他部位，鳞状皮屑增多。症状较轻的小鼠仅颈部和背部出现皮屑（图4B）；症状严重的则在面部、头部、大腿外侧、背部及腹部均有皮屑（图4C和4D）。皮屑症状表现为一过性：高浓度组较为严重，持续7 d后皮屑消失；低浓度组症状较轻，持续3 d后皮肤恢复至原来的状态。高浓度组和低浓度组均各有2只裸小鼠出现皮屑，感染率均为33.33%（2/6），其中高浓度组的鳞状皮屑症状较为严重，裸小鼠均抓咬背颈部等出现皮屑的位置。结果表明，木糖葡萄球菌感染后裸小鼠临床症状存在个体差异。



图2 分离菌株在高盐甘露醇琼脂平板(A)和血琼脂平板(B)上的菌落形态图以及革兰染色镜检图(C)

Figure 2 Colony morphology on mannitol salt agar plate (A) and blood agar plate (B) and Gram staining microscopic examination (C) of the isolated strain

2.6 分离培养菌感染后的皮肤组织病理学变化

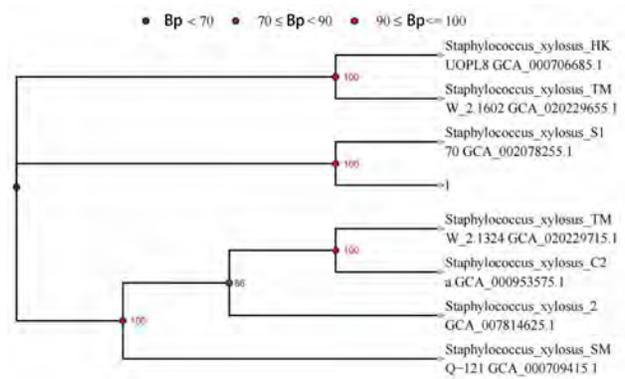
HE染色显示，与对照组（图5A）裸小鼠相比，低浓度组（图5B）和高浓度组（图5C）出现皮屑的裸

小鼠其背部脊柱位置的皮肤表皮结构、真皮毛囊（黑色箭头）和皮脂腺（红色箭头）结构均完整，无明显充血、出血、炎症及坏死等病理性改变。

表1 分离菌株的生化鉴定结果显示为木糖葡萄球菌

Table 1 Biochemical identification results indicating that the isolated strain was *Staphylococcus xylosus*

生化项目 Biochemical items	鉴定结果 Results
D-苦杏仁甙 <i>D</i> -amygdalin	-
磷脂酰肌醇磷脂酶 C Phosphatidylinositol phospholipase C	-
D-木糖 <i>D</i> -xylose	+
精氨酸双水解酶 1 Arginine dihydrolase 1	+
β -半乳糖苷酶 β -galactosidase	+
α -葡糖苷酶 α -glucosidase	+
丙氨酸-苯丙氨酸-脯氨酸芳胺酶 Ala-Phe-Pro-arylamidase	-
环糊精 Cyclodextrin	-
L-天冬氨酸芳胺酶 <i>L</i> -aspartate arylamidase	-
β -半乳糖吡喃糖苷酶 β -galactopyranosidase	-
α -甘露糖苷酶 α -mannosidase	-
磷酸酶 Phosphatase	+
亮氨酸芳胺酶 Leucine arylamidase	-
L-脯氨酸芳胺酶 <i>L</i> -proline arylamidase	-
β -葡萄糖醛酸酶 β -glucuronidase	+
α -半乳糖苷酶 α -galactosidase	-
L-吡咯烷酮芳胺酶 <i>L</i> -pyrrolidonyl-arylamidase	+
β -葡萄糖醛酸酶 β -glucuronidase	+
丙氨酸芳胺酶 Alanine arylamidase	-
酪氨酸芳胺酶 Tyrosine arylamidase	-
D-山梨醇 <i>D</i> -sorbitol	-
尿素酶 Urease	+
多黏菌素 B Polymyxin B	-
D-半乳糖 <i>D</i> -galactose	-
D-核糖 <i>D</i> -ribose	+
L-乳酸盐碱化 <i>L</i> -lactate alkalinization	+
乳糖 Lactose	+
N-乙酰-D-氨基葡萄糖 N-acetyl-D-glucosamine	+
D-麦芽糖 <i>D</i> -maltose	+
杆菌肽耐药 Bacitracin resistance	+
新生霉素耐药 Novobiocin resistance	+
6.5%NaCl 中生长 Growth in 6.5% NaCl	+
D-甘露醇 <i>D</i> -mannitol	+
D-甘露糖 <i>D</i> -mannose	+
甲基- β -D-吡喃葡萄糖苷 Methyl- β -D-glucopyranoside	+
支链淀粉 Pullulan	-
D-棉子糖 <i>D</i> -raffinose	-
O/129 耐药 O/129 resistance	+
水杨素 Salicin	-
蔗糖 Saccharose/Sucrose	+
D-海藻糖 <i>D</i> -trehalose	+
精氨酸双水解酶 2 Arginine dihydrolase 2	-
奥普托欣耐药 Optochin resistance	+



注：1代表分离菌株 slarc01。Bp 代表自展值百分比。

Note: "1" represents the isolated strain slarc01. "Bp" represents the bootstrap percentage.

图3 分离菌株基于单拷贝基因集的系统进化树分析

Figure 3 Phylogenetic tree analysis based on single-copy orthologue of the isolated strain

3 讨论

2023年,本实验室接检一只鳞状皮屑裸小鼠,根据其临床症状首先怀疑是牛棒状杆菌感染。然而,取该裸小鼠皮肤样本经核酸检测,结果显示牛棒状杆菌核酸阴性。接着采用细菌分离培养的方法,从其皮肤中分离出大量革兰阳性球菌,16S rDNA 测序菌种鉴定和全自动微生物鉴定系统均显示该菌为木糖葡萄球菌。经回访,送检该患病裸小鼠的设施按国家标准规定的 SPF 级动物病原体项目每季度进行检测,结果均为阴性;且该设施温湿度符合国家标准要求,在同一设施饲养的其他裸小鼠未发现该病变,因此排除温湿度或其他药物因素等引起该病的可能。

木糖葡萄球菌通常被认为是一种非致病性共生细菌。但是,作为一种机会性致病病原菌,木糖葡萄球菌在免疫缺陷或基因敲除小鼠中可表现为不同的皮肤炎症^[4,10,13-14]。本研究结果提示,这只鳞状皮屑裸小鼠可能由木糖葡萄球菌感染导致。2012年的另一例临床诊断报告也阐述了类似的研究结果假设^[4]。病原菌鉴定结果反馈后,送检单位对出现该临床症状裸小鼠的供应商提供的所有动物进行了进一步排查,即对新购动物在接收当日进行采样送检,结果发现其中两家动物供应商的多个批次均检测出木糖葡萄球菌阳性,提示该细菌可能由供应商动物本身携带,且在国内动物供应商种群中并非偶发。因此,笔者建议:虽然木糖葡萄球菌未列入国家标准 SPF 级动物病原体排除列表,但仍应引起实验动物使用单位的注意^[15]。

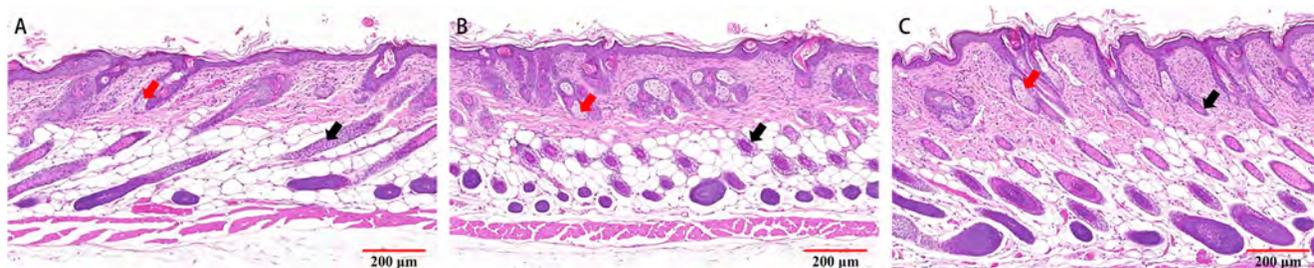


注：A，颈背部皮肤涂擦生理盐水的对照组；B，颈背部皮肤涂擦 1.8×10^7 CFU/mL分离培养菌液的低浓度组；C，颈背部皮肤涂擦 1.8×10^8 CFU/mL分离培养菌液的高浓度组腹部症状；D，颈背部皮肤涂擦 1.8×10^8 CFU/mL分离培养菌液的高浓度组背部症状。

Note: A, Control group of applying physiological saline solution to the skin on the neck and back; B, Low concentration group of 1.8×10^7 CFU/mL isolated bacterial solution applied to the skin on the neck and back; C, Abdominal symptoms in the high concentration group of isolated bacterial solution with a concentration of 1.8×10^8 CFU/mL applied to the skin on the neck and back; D, Back symptoms in the high concentration group treated with 1.8×10^8 CFU/mL isolated bacterial solution applied to the skin on the neck and back.

图4 不同组别裸小鼠感染分离菌液后出现皮屑的临床表现

Figure 4 Clinical manifestations of scaling in different groups of nude mice infected with isolated bacterial suspension



注：A，对照组；B，低浓度组；C，高浓度组。黑色箭头指示真皮毛囊，红色箭头指示皮脂腺（比例尺大小为 $200 \mu\text{m}$ ）。

Note: A, Control group; B, Low concentration group; C, High concentration group. Black arrow indicates dermal hair follicle; red arrow indicates sebaceous gland (Scale bar: $200 \mu\text{m}$).

图5 分离菌感染后鳞状皮屑裸小鼠的皮肤组织病理学变化(HE染色, $\times 100$)

Figure 5 Pathological changes in skin tissues of nude mice with squamous skin scurfs after infection with isolated bacteria (HE staining, $\times 100$)

为了深入了解木糖葡萄糖球菌对裸小鼠的致病性，本研究将分离的菌株进行了动物感染试验，设置低浓度组、高浓度组与对照组共3组。细菌接种后，每天笼边观察记录临床症状，28 d后结束试验。结果发现，高浓度组和低浓度组分别有2只裸小鼠皮肤上出现白色不规则鳞状皮屑，其中1只症状轻微的仅出现在头颈部和背部，另1只严重者的皮屑几乎完全覆盖背部、肩部、头部和胸腹部皮肤，和文献[4]描述的临床症状基本一致。不同的是，本研究中的裸小鼠皮屑临床症状为一过性，3~7 d即消失，没有明显脱落，而文献[4]中的皮屑伴有部分不规则地脱落，这可能是由于文

献[4]中皮屑症状比较严重，已出现厚厚的成片的皮屑结块，因此容易脱落。本研究中，高低浓度两组各有4只裸小鼠未出现皮屑，表明裸小鼠感染木糖葡萄糖球菌存在个体差异。以往文献有报道，木糖葡萄糖球菌作为皮肤病原体的致病能力还存在物种特异性差异^[16-17]。

本研究中组织病理学HE染色结果表明，低浓度组和高浓度组出现皮屑的裸小鼠与对照组裸小鼠的表皮层结构以及真皮层毛囊和皮脂腺结构均完整，均无明显的充血、出血、炎症及坏死等病理性改变。这同以往文献的结论是一致的：在吞噬细胞超氧化物正常产生但有其他免疫缺陷的小鼠中，偶尔会出现浅表病变，

仅限于眼睑、眼结膜和皮肤；而在吞噬细胞超氧化物缺失的小鼠中，木糖葡萄球菌感染会导致严重的组织病理学变化，包括淋巴结、肺、肌肉和骨骼等^[6,18]。文献[19-20]中，木糖葡萄球菌感染的裸小鼠组织病理学表现均有严重的表皮角质化、真皮层水肿和炎性细胞浸润等，导致该差异的原因可能跟菌株有关。菌株不同，毒力可能不同，临床症状和组织病理学结果也可能不同。另外，还有一篇文献报道木糖葡萄球菌感染的裸小鼠出现了表皮角质化、真皮层水肿和炎性细胞浸润等临床症状，但这仅是一篇临床病例报道，并没有进行动物致病性实验^[4]。

由于皮肤黏膜中共生微生物、免疫和环境因素之间的复杂相互作用，木糖葡萄球菌引起裸小鼠发生鳞状皮屑疾病的机制尚未阐明。金黄色葡萄球菌肠毒素 B 或其衍生的 α 毒素可诱导白细胞介素 17A (interleukin-17A, IL-17A) 分泌，导致角质形成细胞异常增殖和炎性细胞募集^[21-23]。木糖葡萄球菌是否通过诱导 IL-17A 分泌，导致角质形成细胞异常增殖和炎性细胞募集有待进一步研究。本研究中动物感染试验的给药方式是涂擦皮肤，结果表明木糖葡萄球菌可通过接触方式进行传播，是否存在其他传播方式尚有待研究。在后续研究中，还可进一步探讨木糖葡萄球菌的致病机制，包括感染剂量、宿主个体差异等对病变程度的影响。本研究基于全基因组序列建立了该分离菌株的系统进化树，溯源分析后发现该菌株与韩国叶菜分离株 (GenBank GCA_002078255.1) 的亲缘关系最为接近，提示两者之间可能存在着未知途径的传播。

需要指出，本研究存在一定局限性。例如：(1) 根据木糖葡萄球菌的动物感染试验中阴性对照未发生鳞状皮屑得出结论尚不够严谨，如果能排除引起鳞状皮屑的其他病原菌感染或合并真菌感染的可能性则更有说服力；(2) 使用的实验动物品种、品系、性别、年龄和数量，以及使用的分离菌株有限。排除上述局限性后得出木糖葡萄球菌对裸小鼠有鳞状皮屑致病性的结论才更为准确和可靠。

综上所述，动物感染试验表明，本研究中分离的木糖葡萄球菌菌株对裸小鼠鳞状皮肤病是一种机会性感染病原体，临床表现为一过性的鳞状皮屑症状，组织病理学并未发生明显改变，并且裸小鼠对该菌株的敏感性存在个体差异。因此，不仅牛棒状杆菌，木糖葡萄球菌也可能使免疫缺陷裸小鼠出现鳞状皮肤病。为提高实验动物兽医师对该菌的认识和关注程度，避

免木糖葡萄球菌感染导致免疫缺陷小鼠或基因敲除小鼠损失，迫切需要深入研究木糖葡萄球菌对免疫缺陷小鼠或基因敲除小鼠皮肤的致病性及其科学意义。

[医学伦理声明 Medical Ethics Statement]

本研究涉及的动物实验方案均已通过上海实验动物研究中心实验动物福利伦理审查委员会批准 (批号: PA202303201)。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 laboratory animal protocols in this study were reviewed and approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of Shanghai Laboratory Animal Research Center (Approval No. PA202303201). All experimental procedures were performed in accordance with the requirements of laws and regulations in China related to laboratory animals.

[作者贡献 Author Contribution]

孔志豪参与动物实验，负责查阅资料、数据处理和图片制作；魏晓锋负责确定研究方案、拟定文章提纲、修订文章；于灵芝负责动物试验、数据分析、文章撰写并投稿；冯丽萍指导细菌分离培养和鉴定；朱琦参与完成细菌分离培养鉴定；施国君提供兽医观察等指导；王晨负责动物饲养指导。

[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] SCANZIANI E, GOBBI A, CRIPPA L, et al. Hyperkeratosis-associated coryneform infection in severe combined immunodeficient mice[J]. Lab Anim, 1998, 32(3):330-336. DOI: 10.1258/002367798780559239.
- [2] KIM T H, KIM D S, HAN J H, et al. Detection of *Corynebacterium bovis* infection in athymic nude mice from a research animal facility in Korea[J]. J Vet Sci, 2014, 15(4):583-586. DOI:10.4142/jvs.2014.15.4.583.
- [3] MANUEL C A, PUGAZHENTHI U, LESZCZYNSKI J K. Surveillance of a ventilated rack system for *Corynebacterium bovis* by sampling exhaust-air manifolds[J]. J Am Assoc Lab Anim Sci, 2016, 55(1):58-65.
- [4] RUSSO M, INVERNIZZI A, GOBBI A, et al. Diffuse scaling dermatitis in an athymic nude mouse[J]. Vet Pathol, 2013, 50(4):722-726. DOI:10.1177/0300985812463408.
- [5] TAVAKKOL Z, SAMUELSON D, DELANCEY PULCINI E, et al. Resident bacterial flora in the skin of C57BL/6 mice housed under SPF conditions[J]. J Am Assoc Lab Anim Sci, 2010, 49(5):588-591.
- [6] GOZALO A S, HOFFMANN V J, BRINSTER L R, et al. Spontaneous *Staphylococcus xylosus* infection in mice deficient in NADPH oxidase and comparison with other

- laboratory mouse strains[J]. J Am Assoc Lab Anim Sci, 2010, 49(4):480-486.
- [7] JACKSON S H, GALLIN J I, HOLLAND S M. The p47phox mouse knock-out model of chronic granulomatous disease [J]. J Exp Med, 1995, 182(3):751-758. DOI:10.1084/jem.182.3.751.
- [8] PIZZOLLA A, HULTQVIST M, NILSON B, et al. Reactive oxygen species produced by the NADPH oxidase 2 complex in monocytes protect mice from bacterial infections[J]. J Immunol, 2012, 188(10): 5003-5011. DOI: 10.4049/jimmunol.1103430.
- [9] LAUBACH V E, SHESELY E G, SMITHIES O, et al. Mice lacking inducible nitric oxide synthase are not resistant to lipopolysaccharide-induced death[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92(23):10688-10692. DOI:10.1073/pnas.92.23.10688.
- [10] WON Y S, KWON H J, OH G T, et al. Identification of *Staphylococcus xylosus* isolated from C57BL/6J-*Nos2^{tm1Lau}* mice with dermatitis[J]. Microbiol Immunol, 2002, 46(9): 629-632. DOI: 10.1111/j.1348-04212002.tb02744.x.
- [11] 中国实验动物学会. 实验动物 牛棒状杆菌检测方法: T/CALAS 20—2017[S]. 北京: 科学出版社, 2017.
Chinese Association for Laboratory Animal Sciences. Laboratory animal – Method for examination of *Corynebacterium bovis*: T/CALAS 20—2017[S]. Beijing: Science Press, 2017.
- [12] 中国实验动物学会. 实验动物 木糖葡萄球菌检测方法: T/CALAS 92—2020[S/OL]. [2024-12-30]. <https://www.ttbz.org.cn/Pdfs/Index/?ftype=st&pms=74557>.
Chinese Association for Laboratory Animal Sciences. Laboratory animal – Method for the detection of *Staphylococcus xylosus*: T/CALAS 92—2020[S/OL]. [2024-12-30]. <https://www.ttbz.org.cn/Pdfs/Index/?ftype=st&pms=74557>.
- [13] NATSIS N E, COHEN P R. Coagulase-negative *Staphylococcus* skin and soft tissue infections[J]. Am J Clin Dermatol, 2018, 19(5):671-677. DOI:10.1007/s40257-018-0362-9.
- [14] BRADFIELD J F, WAGNER J E, BOIVIN G P, et al. Epizootic fatal dermatitis in athymic nude mice due to *Staphylococcus xylosus*[J]. Lab Anim Sci, 1993, 43(1):111-113.
- [15] 于灵芝, 冯丽萍, 孔志豪, 等. 木糖葡萄球菌实时荧光定量PCR检测方法的建立及其应用[J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(1):73-79. DOI: 10.3969/j.issn.1005-4847.2024.01.010.
YU L Z, FENG L P, KONG Z H, et al. Establishment of qPCR method to detect *Staphylococcus xylosus* and its application [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(1): 73-79. DOI: 10.3969/j.issn.1005-4847.2024.01.010.
- [16] BATTAGLIA M, GARRETT-SINHA L A. *Staphylococcus xylosus* and *Staphylococcus aureus* as commensals and pathogens on murine skin[J]. Lab Anim Res, 2023, 39(1):18. DOI: 10.1186/s42826-023-00169-0.
- [17] RESHAMWALA K, CHEUNG G Y C, HSIEH R C, et al. Identification and characterization of the pathogenic potential of phenol-soluble modulin toxins in the mouse commensal *Staphylococcus xylosus*[J]. Front Immunol, 2022, 13:999201. DOI:10.3389/fimmu.2022.999201.
- [18] ACUFF N V, LAGATTA M, NAGY T, et al. Severe dermatitis associated with spontaneous *Staphylococcus xylosus* infection in *Rag^{-/-} Tpl2^{-/-}* mice[J]. Comp Med, 2017, 67(4): 344-349.
- [19] LI Z Q, DONG J X, WANG M, et al. Resveratrol ameliorates liver fibrosis induced by nonpathogenic *Staphylococcus* in BALB/c mice through inhibiting its growth[J]. Mol Med, 2022, 28(1):52. DOI:10.1186/s10020-022-00463-y.
- [20] QU Q W, CUI W Q, XING X X, et al. Rutin, a natural inhibitor of IGPD protein, partially inhibits biofilm formation in *Staphylococcus xylosus* ATCC700404 *in vitro* and *in vivo*[J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 728354. DOI: 10.3389/fphar.2021.728354.
- [21] EYERICH K, PENNINO D, SCARPONI C, et al. IL-17 in atopic eczema: linking allergen-specific adaptive and microbial-triggered innate immune response[J]. J Allergy Clin Immunol, 2009, 123(1):59-66.e4. DOI:10.1016/j.jaci.2008.10.031.
- [22] NIEBUHR M, GATHMANN M, SCHARONOW H, et al. *Staphylococcal* alpha-toxin is a strong inducer of interleukin-17 in humans[J]. Infect Immun, 2011, 79(4): 1615-1622. DOI: 10.1128/IAI.00958-10.
- [23] KIM Y, LEE Y S, YANG J Y, et al. The resident pathobiont *Staphylococcus xylosus* in *Nfkbiz*-deficient skin accelerates spontaneous skin inflammation[J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 6348. DOI:10.1038/s41598-017-05740-z.

(收稿日期:2024-11-12 修回日期:2025-02-05)

(本文责任编辑:张俊彦)

[引用本文]

孔志豪, 魏晓锋, 于灵芝, 等. 鳞状皮屑裸小鼠木糖葡萄球菌的分离鉴定[J]. 实验动物与比较医学, 2025, 45(3): 368-375. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.166.

KONG Z H, WEI X F, YU L Z, et al. Isolation and identification of *Staphylococcus xylosus* in nude mice with squamous skin scurfs [J]. Lab Anim Comp Med, 2025, 45(3): 368-375. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.166.



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。

无替代，何谈取消

孙强

(中国科学院脑科学与智能技术卓越创新中心,上海 200031)



[中图分类号] Q95-33 [文献标志码] B [文章编号] 1674-5817(2025)03-0376-03

在本栏目的开始，我们讨论过“为什么要开展动物实验”^[1]以及“如果动物实验不严谨”等问题^[2]，读者朋友们对动物实验的作用及其重要性有了初步认识，但这还远远不够。近年来，国内外有关“动物实验将全面替代或取消”的舆论氛围很浓，大有误导公众的迹象。因此，这一期我们就从“替代”的角度，进一步探讨现如今是否真到了可以取消动物实验的时候。

2025年4月，美国食品药品监督管理局（Food and Drug Administration, FDA）发布公告，宣称将在单克隆抗体（monoclonal antibody）等药物研发中采用一系列“新的替代方法”（new alternative methods, NAMs），包括基于人工智能的毒性计算模型、细胞系及实验室环境下的类器官毒性测试等，以此来替代或减少动物实验的使用^[3]。公告发布后，立即引发了科学界、医药界、实验动物产业界等相关领域专业人士及普通公众的广泛关注。尽管FDA的这一举措在保护动物福利和推进科研进步方面展现出积极姿态，但我们必须认识到，目前“替代动物实验”方法尚未达到普遍适用的程度，也未真正成熟到可以完全取代动物实验的阶段。

实际上，早在2022年9月29日，美国前总统拜登签署新的“FDA现代化法案2.0”（The FDA Modernization Act 2.0）时^[4]，国内就曾出现“FDA取消动物实验”之类的过度解读。该法案修改了FDA延续了80多年的药品临床试验申请政策——即所有药品

在申请临床（人体）试验前，必须先通过动物实验来验证其安全性和有效性。这一制度性变动在全球范围内引发热议，许多人误认为该法案的出台意味着FDA将完全取消动物实验。

美国FDA成立于1906年，主要使命是保护消费者免受品牌虚假宣传的误导，以及掺假食品、药品和化妆品的侵害^[5]。作为公共卫生的守护者，FDA在美国医药行业中发挥着举足轻重的作用，是药物上市前的监管和审查机构，其职责是确保药物的获益大于潜在风险。

在新药研发过程中，候选药物进入临床试验阶段之前，必须接受急性、慢性、发育、生殖毒性以及致癌性的全面评估，以确保其在人体应用中的有效性和安全性^[6]。由于许多干预性实验无法在人类身上直接进行，因此实验动物如小鼠、大鼠、兔、猪、猫、犬和非人灵长类动物被广泛应用于临床前研究。这主要得益于实验动物在遗传组成、分子靶标及代谢途径等方面与人类具有高同源性，为候选药物应用于人体提供了可外推的安全性窗口。

有人将FDA现代化法案2.0的出台等同于取消动物实验，是对该法案的片面理解。该法案仅规定动物实验不再是递交临床试验申请的强制前提；若申请方能提供充分的科学数据证明候选药物的安全性与有效性，也可以开展临床试验。这是FDA鼓励多种动物替代方法的举措之一，而非彻底否定动物实验。作为美国公

共卫生的守门人，FDA 仍需将临床试验风险降至最低。

建立无动物药物测试体系，一直是科学界追求的重要目标。尽管在某些领域已开发出经过验证的非动物测试方法（如皮肤刺激测试），但在大多数毒理学与药理学安全评价中，替代技术仍不成熟或尚未通过验证^[7]。此外，科学界也在不断努力推动更广应用领域的动物实验替代方法的开发和应用。然而，完全替代仍是长远愿景，而非即时实现。因此，FDA 现代化法案 2.0 反映了全球范围内在减少动物实验依赖方面的努力，却并不意味着动物实验将被彻底抛弃^[8]；在缺乏公认且经过验证的替代方案出台之前，动物实验仍是药物临床前评价的基石。

在此次公告中，FDA 提出在未来 1~3 年内，基于现有数据减少动物实验，把单克隆抗体药物的动物实验周期由 6 个月缩短到 3 个月，并鼓励企业提交 NAMs 数据以“取代”动物实验^[9]。然而，这一愿景在落地时面临诸多挑战：（1）人体系统的复杂性远超细胞模型和体外实验所能模拟的范围^[10]。目前的体外测试、类器官及计算机模拟尚无法完整覆盖药物在体内的代谢、免疫反应及毒理学特性。（2）FDA 若想缩减乃至取消动物实验，必须确保替代方法在科学与临床层面足以支撑新药的安全性和有效性评估，而目前能被监管部门直接写入法规的替代技术寥寥无几。（3）单克隆抗体的应用广泛，涉及癌症免疫治疗、炎症、自身免疫等重大疾病领域，若 NAMs 尚未成熟便贸然减少动物实验，恐无法有效保障受试者与未来患者的安全。

1 化妆品研发中完全替代动物实验的实践

要深入理解完全替代动物实验所面临的挑战，不妨回顾一下欧盟在全面禁止对化妆品开展动物实验的实践过程。自 2004 年起，欧盟提出要分阶段禁止对化妆品进行动物实验，计划至 2013 年全面禁止。然而实践表明，在禁令实施后的十年间，欧盟境内几乎未见有专为化妆品研发的新分子问世。为了推进产品更新换代和多样化，化妆品企业只能沿用医药、化工等领域已完成安全性验证的原料，或在既有安全原料基础上进行配方与功效叠加，达成产品创新。原因在于一旦采用全新分子，就需要提交安全性数据，若缺乏欧盟认可的替代测试方法，便无法完成评价。此外，欧盟“Regulation 1223/2009 and the cosmetic products enforcement regulations 2013: Great Britain”仅涉及消费者的安全，却未涵盖工人在生产过程中暴露于化学品的风险；这部分风险由欧洲化学品管理局

(European Chemicals Agency, ECHA) 监管。因此，当企业违规使用未经充分安全验证的原料时，仍可能被 ECHA 要求补充动物实验数据 [如同柳酸盐 (homosalate) 和水杨酸 2-乙基己酯 (2-ethylhexyl salicylate)^[11]]。可见，即便在相对低风险的化妆品领域，“零动物实验”也并非易事。

化妆品与单克隆抗体的风险级别以及动物实验替代门槛截然不同：前者多为局部、低剂量暴露，关键毒理终点主要集中在皮肤或眼睛刺激及致敏性方面，并且已经开发出若干经验证的 NAMs^[12]；而单克隆抗体药物通常经静脉或皮下注射，随后全身分布，因此需要评估其免疫原性、细胞因子风暴与靶点相关失调等复杂终点。这些差异决定了 NAMs 在化妆品领域的应用门槛远低于疾病治疗用的单克隆抗体药物。

2 动物实验替代方法开发的困境

要让 NAMs 真正升格为监管层面的“黄金标准”，必须依赖毒理学、系统生物学与监管科学的深度协作，才能建立 NAMs 与真实世界数据的闭环证据链，同时还需要进行可靠性或相关性标准的多实验室验证，最后提交 FDA 进行资格认证。十多年来，化妆品业界投入了大量资金进行动物实验替代方法的研究。例如，仅在 2007—2011 年，欧盟官方就投入了约 2.4 亿欧元用于推动动物实验替代的实验技术研究^[13]。然而，完全替代动物实验的测试方法至今仍屈指可数，目前大部分方法只能作为辅助方式或部分减少动物的使用量，无法完全脱离对动物实验的依赖。以目前唯一被验证可用于测试急性口服毒性的新方法——3T3 中性红成纤维细胞光毒替代试验为例^[14]，其作用只能是通过为在体实验提供起始剂量参考来减少实验动物的使用数量，并不能完全替代动物实验，因此该方法也仅能作为测试策略或“证据权重法”的一部分，无法单独用于评估被试品的安全性。另一个动物替代技术是经济合作与发展组织 (The Organisation for Economic Cooperation and Development, OECD) 推出的皮肤致敏整合法 (OECD TG 497)^[15]，从提出到列入国际认可的测试指南耗时整整十年。由此可见，动物实验替代虽然是我们追求的最终目标，但完全替代仍是遥不可及。

3 动物实验替代的舆论导向和引导

事实上，早在 1996 年，化妆品行业就将“无虐待动物”认证纳入市场推广；欧盟发布相关禁令后，“无动物实验”的标签更加普及，却也放大了消费者对替

代技术成熟度的误解。由于这类片面宣传占据了主导地位，公众误以为替代方法已足够成熟，购买时高度关注“无动物实验”标签。同时，由于社会对动物福利保护的高度关注，“是否进行动物实验”成了舆论讨论的焦点。然而，“是否已有或正在研发足以替代动物实验的其他方法”这一问题，却往往被人们忽视。若缺乏科学普及和公众教育，消费者可能会误以为“所有动物实验都可以说停就停”。然而现实是，如果目前尚无完善的替代方案，贸然放弃动物实验只会带来更大的安全隐患。

由此可见，加强对公众的科普，把社会讨论的焦点从“做没做动物实验”转向“替代技术如何验证、何时落地”尤其重要。当前公众的注意力仍过度集中于前者，而对替代技术的成熟度缺乏足够认知。为了避免这种本末倒置的现象，需要科研工作者、监管部门与产业界通力合作，共同加大资源投入，并系统推进药物安全性评价的替代方案开发与推广验证。

综上所述，FDA公告提出的“减少并优化动物实验”方向本身值得肯定；科学研究也理应朝着更人道、更经济、更精准的方向迈进。但在“无替代”之前，谈“取消”无异于缘木求鱼。只有建立充分可靠的新方法学并构建数据库支撑，才能逐步降低动物实验占比，最终实现完全替代；反之，便会陷入“新屋未成、旧屋先拆”的窘迫境地，既牺牲科学严谨性，也无法真正保障消费者与患者安全。

作为全球最具影响力的药品监管机构之一，美国FDA的决策向来是各国法规的风向标。若仓促放宽动物实验要求，可能导致其他地区在药物审批标准上盲目跟进，带来监管混乱。毕竟科学稳健才是药品安全的基石，在NAMs未成熟前，应循序渐进、可量化地减少动物实验，而非以一句“全面取消”的口号为公众制造不切实际的期待。欧盟化妆品禁令的经验表明，要真正替代动物实验，需要投入巨额资金、庞大人力和漫长时间；而在单克隆抗体这类对安全与有效性要求极高的药物领域，“一刀切”地取缔动物实验很可能产生难以估量的风险。

因此，科学界尤其是实验动物科技界有责任让公众了解动物实验替代的实践进程及其内涵。事实上，就目前而言，尚无替代，何谈取消？

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] CULLINEY, K. EC Stands by ECHA rulings for animal data on cosmetic ingredients under REACH[EB/OL]. (2020-12-07) [2025-05-17]. <https://www.cosmeticsdesign-europe.com/Article/2020/12/04/European-Commission-stands-by-ECHA-Board-of-Appeal-Symrise-rulings-for-animal-data-under-REACH>.

[4] SILVA R J, TAMBURIC S. A state-of-the-art review on the alternatives to animal testing for the safety assessment of cosmetics[J]. *Cosmetics*, 2022, 9(5): 90. DOI: 10.3390/cosmetics9050090.

[5] 何辉, 周刚. 美国FDA警告信的制度模式介绍[J]. 中国新药杂志, 2025, 34(5): 473-476. DOI: 10.20251/j.cnki.1003-3734.2025.05.004.

[6] 阚红金, 韦薇, 程速远. 特立帕肽生物类似药的研发考虑[J]. 中国新药杂志, 2025, 34(6):643-649. DOI: 10.20251/j.cnki.1003-3734.2025.06.014.

[7] 潘叙恩, 卢章顺, 杨光, 等. 皮肤腐蚀和皮肤刺激替代试验的发展及其在化学品危险性分类的应用[J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31 (10):99-106. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7856.2021.10.015.

[8] MEHLING A, KOLLE S N, WAREING B, et al. True grit: a story of perseverance making two out of three the first non-animal testing strategy (adopted as OECD guideline No. 497) [J]. *Cosmetics*, 2022, 9(1):22. DOI: 10.3390/cosmetics9010022.

[9] 万颖寒, 顾也欣, 袁雨浓, 等. FDA现代化法案2.0给疾病动物模型发展带来的启示和思考[J]. 实验动物与比较医学, 2023, 43(5): 472-481. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2023.083.

[10] PANG K L, JIANG R C, ZHANG W, et al. An App knock-in rat model for Alzheimer's disease exhibiting A β and tau pathologies, neuronal death and cognitive impairments[J]. *Cell Res*, 2022, 32(2):157-175. DOI: 10.1038/s41422-021-00582-x.

[11] Government of the United Kingdom. Scientific advisory group on chemical safety in consumer products[EB/OL]. (2021-07-29) [2025-05-17]. <https://www.gov.uk/government/groups/scientific-advisory-group-on-chemical-safety-in-consumer-products>.

[12] 徐飞飞, 赵晓晗, 周濛, 等. 毒性测试替代方法及其在化妆品安全风险评估中应用进展[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2024, 38(10): 723-733. DOI: 10.3867/j.issn.1000-3002.2024.10.001.

[13] MACMILLAN D S, BERGQVIST A, BURGESS-ALLEN E, et al. The last resort requirement under REACH: from principle to practice[J]. *Regul Toxicol Pharmacol*, 2024, 147:105557. DOI: 10.1016/j.yrtph.2023.105557.

[14] 杨颖, 熊习昆, 杨杏芬, 等. 3T3中性红成纤维细胞光毒替代试验方法的建立[J]. 毒理学杂志, 2006, 20(5):332-333. DOI: 10.16421/j.cnki.1002-3127.2006.05.023.

[15] HAN Y B, KIM H Y, KIM H R. Development of a novel *in vitro* respiratory sensitization assay and its application in an integrated testing strategy (ITS)[J]. *Arch Toxicol*, 2025, 99(2): 775-785. DOI: 10.1007/s00204-024-03924-x.

(收稿日期: 2025-04-23 修回日期: 2025-06-09)

(本文责任编辑: 丁宇菁)

[引用本文]

孙强. 无替代, 何谈取消[J]. 实验动物与比较医学, 2025, 45(3): 376-378. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2025.064.