



人类疾病动物模型

四川大学实验动物中心

尹海林





人类疾病动物模型 (Animal models of human diseases): 是指各种医学科学研究中建立的具有人类疾病模拟表现的动物。顾名思义，就是在动物身上建立类似人类疾病的模型。可以用于实验生理学、实验病理学和实验治疗学（包括新药筛选）研究。



意义:

- 1.替代作用；临床上对外伤、中毒、肿瘤等研究不可能在人体重复进行。在动物体内试验，可以避免人体实验造成的风险、危害和伦理问题。
- 2.按需要进行取样；动物模型作为人类疾病的“复制品”，可按研究者的需要随时采集各种样品或分批处死动物收集标本，以了解疾病全过程。
- 3.可比较性；一般疾病多为零散发生，在同一时期内，很难获得一定数量的定性材料，而模型动物不仅在群体数量上容易得到满足，从而提高实验结果的可比性和重复性。
- 4.疾病动物模型还有助于全面认识疾病的本质；可以充分认识同一病原体给不同机体带来的各种危害，使研究工作上升到立体的水平来揭示某种疾病的本质。



分类:

1.自发性动物模型是指实验动物未经任何有意识的人工处置，在自然情况下所发生的疾病。包括突变系的遗传疾病和近交系的肿瘤疾病模型。

2.诱发性动物模型是指研究者通过使用物理的、化学的和生物的致病因素作用于动物，造成动物组织、器官或全身一定的损害，出现某些类似人类疾病时的功能、代谢或使动物患相应的传染病，又如用化学致癌剂、放射线、致癌病毒诱发动物的肿瘤等。

此外，按照不同的分类标准，疾病动物模型有其他多个分类，如按系统范围可分为疾病基本病理过程动物模型（如炎症，肿瘤，休克等）和各系统疾病动物模型（如心血管、呼吸、消化系统疾病等）；按模型种类可分为整体动物模型，离体器官和组织模型，细胞株模型等。



人类疾病动物模型的设计和评价原则

- 1.相似性：在动物身上复制人类疾病模型，目的在于从中找出可以推广应用于病人的有关规律。。
- 2.可重复性：理想的动物模型应该是可重复的，甚至是可以标准化的。
- 3.可靠性：复制的动物模型应该力求可靠地反映人类疾病，即可特异地、可靠地反映某种疾病或某种机能、代谢、结构变化，应具备该种疾病的主要症状和体征。



人类疾病动物模型的设计和评价原则

4.适用性和可控性：供医学实验研究用的动物模型，在复制时，应尽量考虑到今后临床应用和便于控制其疾病的发展，以利于研究的开展。

5.易行性和经济性：在复制动物模型时，所采用的方法应尽量做到容易执行和合乎经济原则。灵长类动物与人最近似，复制的疾病模型相似性好，但稀少昂贵，即使猕猴也不可多得，更不用说猩猩、长臂猿。除非不得已或一些特殊疾病（如痢疾、脊髓灰白质炎等）研究需要外，尽量不用灵长类动物。



人类疾病动物模型的设计和评价原则

4.适用性和可控性：供医学实验研究用的动物模型，在复制时，应尽量考虑到今后临床应用和便于控制其疾病的发展，以利于研究的开展。

5.易行性和经济性：在复制动物模型时，所采用的方法应尽量做到容易执行和合乎经济原则。灵长类动物与人最近似，复制的疾病模型相似性好，但稀少昂贵，即使猕猴也不可多得，更不用说猩猩、长臂猿。除非不得已或一些特殊疾病（如痢疾、脊髓灰白质炎等）研究需要外，尽量不用灵长类动物。

免疫缺陷动物模型:

免疫缺陷动物是一种先天免疫功能缺陷的动物，它的出现开创了肿瘤学、免疫学新的里程碑。同样它归属于疾病动物模型，在生命医学领域必不可少。





概念： 免疫缺陷动物（Immunodeficiency animals）是指由于先天遗传突变或用人工方法造成一种或多种免疫系统组成成分缺陷的动物。

按产生原因分类：

先天性免疫缺陷动物：又为自发性免疫缺陷动物，是指动物自然发生的免疫缺陷疾病，通过定向培育而获得的免疫功能缺陷或者低下的动物。包括裸小鼠，Beige小鼠，Xid小鼠，SCID小鼠，NOD/SCID小鼠，BNX小鼠。

获得性免疫缺陷动物：又为诱发性免疫缺陷动物，是指采用人工方式干预使其免疫功能缺陷或者低下的动物，主要是转基因的免疫缺陷动物。如AIDS模型，免疫抑制等模型。

按免疫缺陷程度分为：

T淋巴细胞缺陷：如裸鼠

B淋巴细胞缺陷：如XID小鼠

NK细胞缺陷：如Beige小鼠

联合免疫缺陷动物：如T、B淋巴细胞缺陷的小鼠（SCID、Nod-scid小鼠）



1. Nude小鼠，1966年(Flanagan, 1966)

科学家首次发现在C57BL/6品系中的Foxn1基因突变会导致胸腺上皮细胞发育异常，表现出没有毛发，且致使血液中缺乏T细胞，小鼠免疫力显著降低，但NK细胞活性增强，体液免疫能力正常，导致人类造血干细胞无法移植。可用于人类肿瘤及各种免疫缺陷疾病的研究。





2. CB17-scid小鼠，1983年(Bosma, Custer, & Bosma, 1983)

1983年科学家发现在CB17小鼠品系中的Prkdc突变首次让人类PBMCs能够在该小鼠品系中的移植得以极低水平的存活，但无法重建人类免疫系统。后续研究发现CB17-Scid缺乏成熟的T细胞和B细胞，但依然存在很高的NK细胞活性和固有免疫力，导致造血人类干细胞无法移植，该品系还是难以成为好的人源化小鼠模型。



3. Nod-scid小鼠，1995年(Shultz et al., 1995)

偶然的机会Shultz发现将scid突变小鼠和Non-obesediabetic (NOD) 小鼠杂交后出生的NOD-scid小鼠能够支持更多人类PBMCs或者造血干细胞移植的生长，后续研究发现该杂交品系抑制了NK细胞的活性，并且还伴随有固有免疫系统的缺陷。该品系成为近20年应用最广的重症免疫缺陷型小鼠，并且和众多不同品系杂交产生了更多的亚型小鼠。



4. IL2rg小鼠，1995年(Cao et al., 1995; DiSanto, Muller, Guy-Grand, Fischer,& Rajewsky, 1995)

1995年，数个独立的实验室报告了IL-2R γ -chain基因位点的突变会导致小鼠淋巴系统发育不良。IL-2R γ -chain是细胞因子IL-2，4，7，9，15和21受体的至关重要的组成部分，而其突变将导致这些细胞因子的信号传导受阻，使得NK细胞发育严重受阻，且T细胞和B细胞的功能也受到极大的破坏。在后面数年中进一步得到了IL2rg^{-/-}小鼠，在此小鼠中人类造血干细胞和PBMCs的移植变得容易了很多。



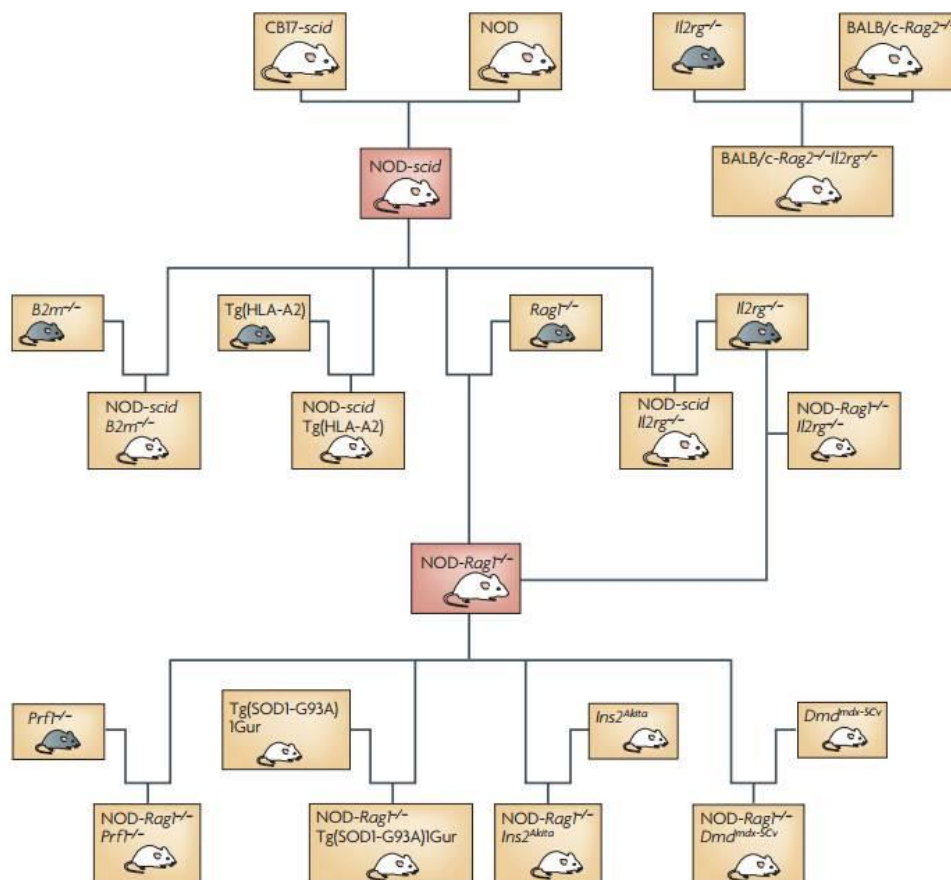
5. Rag1^{-/-}和Rag2^{-/-}小鼠，2000年(Shultz et al., 2000; Traggiai et al., 2004)

科学家发现Rag1基因敲除后，小鼠体内的V(D)J重组丧失，T和B淋巴细胞分化、发育被完全阻断，使得小鼠血液中T细胞和B细胞丧失了正常的功能，引起一类严重的联合免疫缺陷，同样的表型在Rag2突变小鼠中也发生了。

免疫缺陷型动物家族图谱:

当下生物医药研究中大部分人源化动物模型，都是由以上五类免疫缺陷型动物相互杂交产生的（如下图），不同的杂交基因型具备不同的属性，适用于不同的适应症研究。

在四个大的研究领域，肿瘤学，免疫学，人源化肝脏和感染性疾病，实验所用到的动物模型全部来自于这个图谱的动物。





部分重要免疫缺陷动物及其发展方向

1. 其中最受关注的便是NRG小鼠（Rag2，IL2rg双敲小鼠），普遍认为是当今免疫缺陷程度最高的动物模型。将可诱导的uPA系统引入该品系，生产出URG小鼠，据研究人员表示，URG足以媲美FRG小鼠，可以重建最高80%的人类肝脏组织，用来研究HBV和HCV感染，以及药物毒性和代谢过程。大鼠具有更加明确的质量标准并可以提供足够的血液便于实验操作，现在利用CRISPR/Cas9 技术研发的NRG大鼠已应用于感染疾病及药物代谢的研究。

部分重要免疫缺陷动物及其发展方向

2. NRG与Fah-/-小鼠杂交获得的FRG小鼠成为了人源化肝脏研究领域最重要的模型，利用这个模型，使得我们研究得以研究肝脏纤维化疾病，肝脏代谢性疾病，药物代谢途径，肝脏肿瘤疾病，人类寄生虫（疟疾）和感染性疾病。目前已经成功构建出FRG大小鼠，已经开始应用于肝脏相关疾病的研究。





部分重要免疫缺陷动物及其发展方向

3. NOD-scid小鼠与IL2rg^{-/-}杂交所得的品系NOG (NOD/Shi-scid,IL-2R^γnull) 小鼠, 与NOD/scid小鼠相比, NOG小鼠的人体细胞和组织移植存活率显著提高, 同时能够植入更高比例的正常或癌变人类细胞和组织。另外, NOG小鼠还能满足作为人类免疫系统模型的需求, 植入人类造血干细胞后, NOG小鼠的外周淋巴组织可以产生人类T细胞。



免疫缺陷型动物应用领域

1. 肿瘤学研究：肿瘤生长、肿瘤转移、肿瘤复发及抗肿瘤药物筛选等研究。其中BALB/cNude小鼠在建立异种移植瘤模型较常见。裸大鼠没有胸腺，缺乏T细胞，裸大鼠可为常规血液学和血清生物化学分析实验提供足够的血样。
2. 免疫系统研究：免疫缺陷动物由于免疫功能缺陷因此可以用于免疫系统中如T细胞、B细胞、NK细胞及免疫相关疾病的研究，并且BALB/cNude还可以制备高效多产的单克隆抗体。
3. 肝脏研究：主要是指肝脏再生功能，药物代谢及肝脏相关疾病研究。
4. 感染性疾病：因为缺陷动物对环境细菌和病毒敏感，是研究病毒、细菌感染的很好的动物模型。



人源化动物（Humanized animal）

这类模型广泛用于人类疾病的研究，如癌症、传染病及免疫系统相关疾病等。然而在动物身上进行人类相关疾病的研究，需要排除机体间的免疫排斥，前面我们介绍的免疫缺陷动物，它的出现可谓是开创了人源化动物模型新的里程碑。

定义：

携带有人源的基因、细胞或者组织的动物模型

人源化动物分类：

组织人源化模型

基因人源化模型



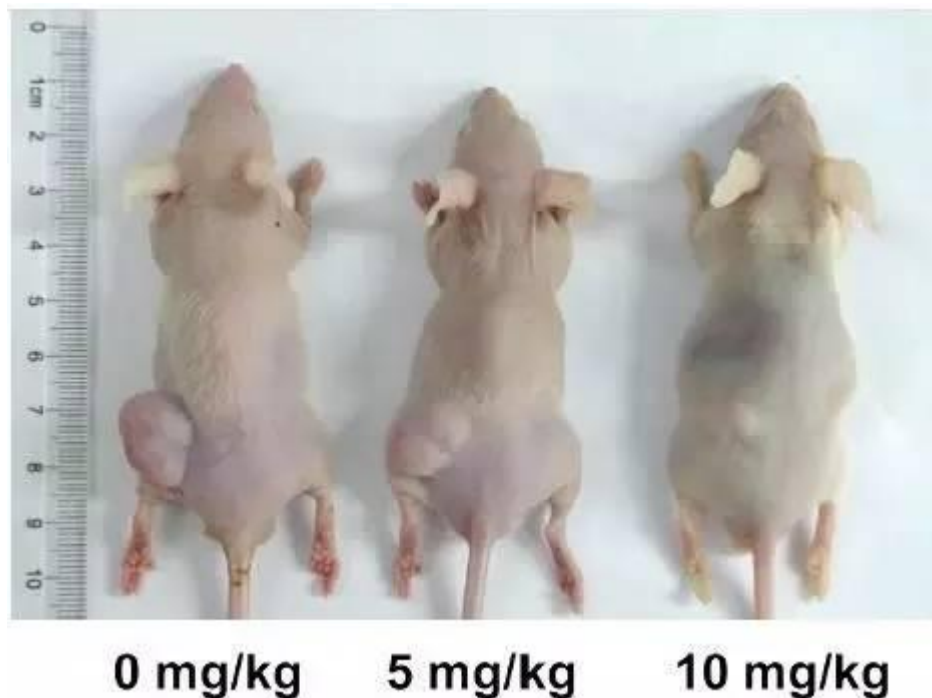
组织人源化模型：

所谓组织人源化动物，指的是接种了人类细胞或者器官组织（接种后能够正常生长并具有相应功能）的动物。正因为我们能够使用它们来研究一些人类疾病，所以人源化动物在医学研究中非常重要。人源肿瘤组织异种移植模型最大程度的避免了体外处理，可以更好地反映肿瘤真正的生物学特征。

免疫缺陷鼠如裸小鼠、Beige小鼠、Xid小鼠及联合多重免疫缺陷动物SCID小鼠、NRG小鼠等，在建立此类模型上必不可少。

组织人源化模型:

人源化肿瘤模型为例，它主要分为两种，一种是将人源的细胞系接种到免疫缺陷小鼠或大鼠体内，称为CDX model（cell-line-derived xenograft）。



CDX model: 免疫缺陷小鼠上的人源肿瘤细胞异种移植模型（乳腺癌）

组织人源化模型:

另一种是将来源于患者的肿瘤组织块接种到免疫缺陷小鼠或大鼠体内，称为PDX model（patient-derived xenograft）。



PDX model: 免疫缺陷小鼠人源肿瘤组织异种移植模型（前列腺癌）



组织人源化模型：

在癌症的相关研究中，CDX模型和PDX模型已得到广泛应用。异种移植模型的建立依赖于受体动物免疫功能的缺失。目前，制作CDX、PDX模型使用的小鼠品系包括BALB/C-nude、nu/nu、SCID、NOD-scid和NSG等。

常用到的NRG小鼠（Rag2，IL2rg双敲小鼠），普遍认为是当今免疫缺陷程度最高的动物模型，可以重建最高80%的人类肝脏组织；NRG与Fah-/-小鼠杂交获得的FRG小鼠成为了人源化肝脏研究领域最重要的模型。

在这类高度免疫缺陷的动物上诱导型肝损伤，再移植人的肝脏细胞，可获得真正意义上的人源化肝脏小鼠模型，可以更准确地研究人类疾病发展过程，并助力药物研发。



组织人源化模型：PDTX模型

近年来，随着“肿瘤精准医疗”概念的提出，一种新的肿瘤模型应运而生，并被称为“目前最接近人类临床实际情况的肿瘤模型”，它对肿瘤新药研发、靶点筛选及个性化治疗起着重大推动作用。它就是人源肿瘤组织异种移植模型（PDTX），这里简要介绍PDTX模型的应用和常见PDTX模型的建立。



组织人源化模型：PDTX模型

PDTX (Patient-derived tumor xenograft) 即人源性肿瘤组织异种移植模型，又名PDX。指将肿瘤患者的新鲜肿瘤组织移植（异位或原位）到免疫缺陷鼠（NOD/SCID、NRG小鼠等）上，在小鼠上培育出人的肿瘤组织。该模型保持了人源肿瘤的原始多样性，更好地模拟了肿瘤细胞在人体内的生长环境。



组织人源化模型：PDTX模型

CDTX也可称为传统的荷瘤模型，即使用传统的体外处理过的永生化肿瘤细胞系移植小鼠，由于这类细胞的同质性，缺少细胞外基质、非肿瘤细胞等肿瘤微环境，使得肿瘤移植后难以有临床组织病理特征。因此所得出的药物剂量范围、疗效与实际临床会有较大出入。

就在去年，美国国家癌症研究所（NCI）宣布被全世界使用了**25年**的**NCI-60**（在培养基中生长的**60种**人类癌细胞系）从其药物筛选程序中“退休”，并决定将启动一个得到更新的、来源于病人新鲜样本的癌症模型库。

组织人源化模型：PDTX模型

PDTX与CDTX的比较

CDTX	PDTX	患者自身肿瘤
较低肿瘤异质性	较高肿瘤异质性	高度肿瘤异质性
分子多样性低	分子多样性较高	分子多样性全面
仅鼠源间质	鼠源和人源间质	人源间质
与临床结果有较大出入	更接近临床结果	可以观察临床
构建简单，周期短 (<1 个月)	构建模型较难且 周期长(4-8个月)	 邦耀实验室



组织人源化模型：PDTX模型应用

1. 药物筛选：经过近几十年的研究，发现PDTX模型进行药物筛选的结果跟临床的相关性非常高，所以很多研究单位和制药企业都纷纷采用PDTX模型进行肿瘤药物的筛选和评估，得出更加合理有效的治疗方案。

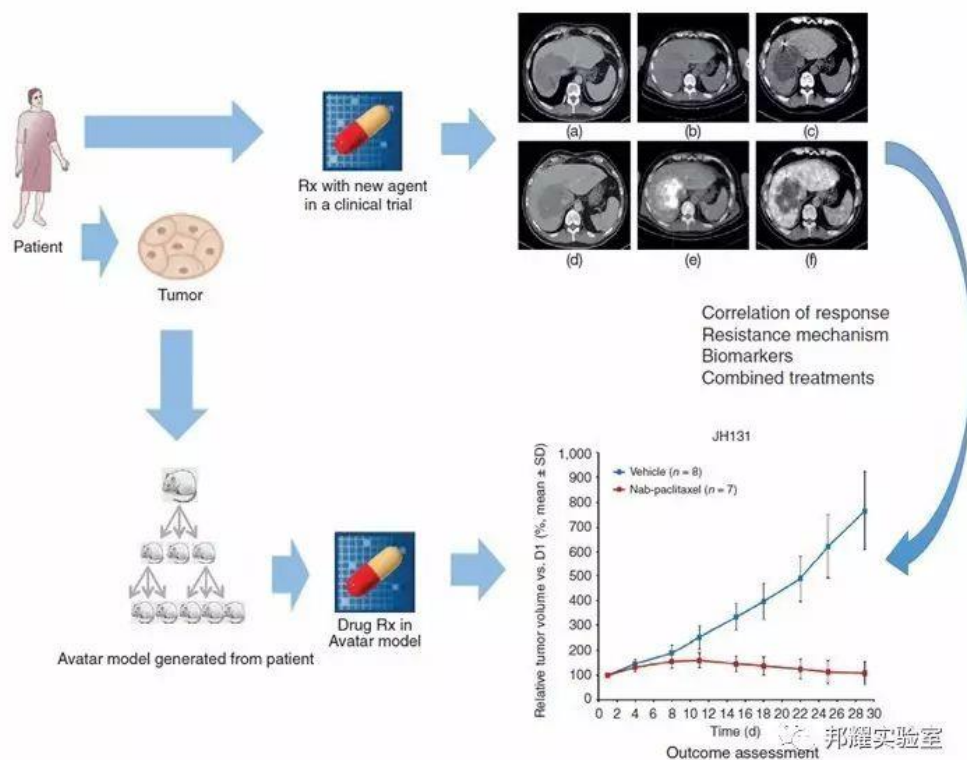


组织人源化模型：PDTX模型应用

2. 肿瘤个性化治疗：同一肿瘤在不同患者上发展情况不同，加上同一肿瘤还有许多分型，因此选择的治疗方法也不相同。通过取不同患者自身组织建立PDTX模型进行药物敏感性研究，可很好预测每个患者对药物是否敏感，有利于提高药物治疗的针对性，给患者带来更大的临床受益。

组织人源化模型：PDTX模型应用

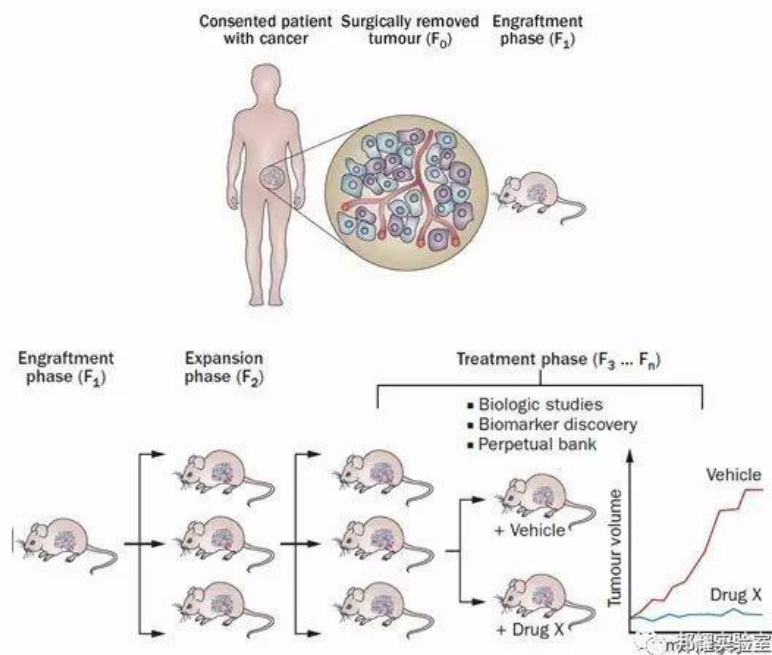
3. 发现分子标记： PDTX 模型的肿瘤组织可以保存和传代，为肿瘤发生机制及潜在治疗靶点的探究提供了非常宝贵的标本。目前NCI已建立了超过300例PDTX模型， Jax Lab约450例。如下图所示：



PDTX模型在临床药物评价的应用

组织人源化模型：PDTX模型构建

1.基本过程：取肿瘤患者（知情且同意）的新鲜肿瘤组织剪成小块移植到免疫缺陷小鼠（如nude，NOD/scid，NSG）。一般为了获得更多更贴近人类的实验样本，需多次传代。





组织人源化模型：PDTX模型构建

2. 一般根据移植部位的不同，分为原位Orthotopic和异位Heterotopic移植（皮下移植，肾包膜移植等）。

1) 异位之皮下移植（Subcutaneous PDTX model）：与细胞荷瘤一样，将组织移植于免疫缺陷小鼠皮下，移植部位一般选择血液丰富的位置，如腋下、腹股沟、侧腹部等。



组织人源化模型：PDTX模型构建肺癌为例讲述皮下PDTX的构建过程：

(1) 处理新鲜肺癌组织F0：在无菌条件下的冰上对新鲜离体的肺癌肿瘤组织，剔除包膜及坏死组织，切成约 15mm^3 ($2\text{mm} \times 2\text{mm} \times 3\text{mm}$) 的小块；

(2) 首次接种小鼠F1：将切好的组织碎片用镊子填入定制的套管针尖端内，注射到5-6周NOD/SCID重症联合免疫缺陷小鼠背部皮下，每只老鼠背部可以接种1-2个位点，每例肿瘤接种2-3只小鼠，此接种过程须在肿瘤标本离体后2h之内完成，为提高成瘤率肿瘤块也可混合10% Matrigel进行荷瘤；

(3) 再次传代F1：当裸鼠皮下肿瘤生长至 1000mm^3 左右，表示移植成功，对其处于对数增长期的原代皮下移植小鼠模型进行传代；

(4) 剥离皮下肿瘤，部分组织速冻至液氮备用或经4%多聚甲醛固定后石蜡包埋；

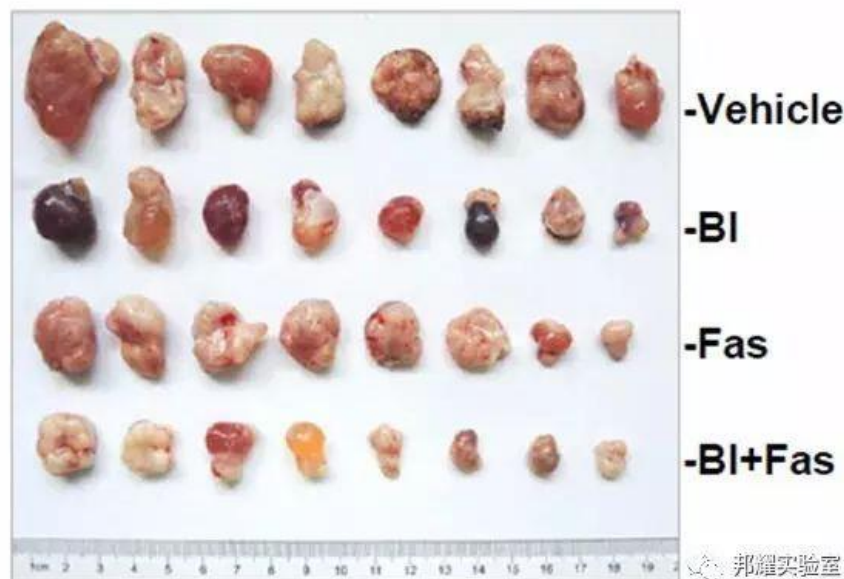
(5) 另一部分则传F2代：按上述接种步骤，移植到4-5只裸鼠皮下；

组织人源化模型：PDTX模型构建肺癌为例讲述皮下PDTX的构建过程：

（6）按照此流程，在裸鼠体内连续传3代后，移植瘤的生长速度开始稳定，可进行动物实验。

（7）后续试验分析：如下图为皮下接种KRAS突变的非小细胞肺癌的F3代PDTX模型，对照组和给药组的比较。

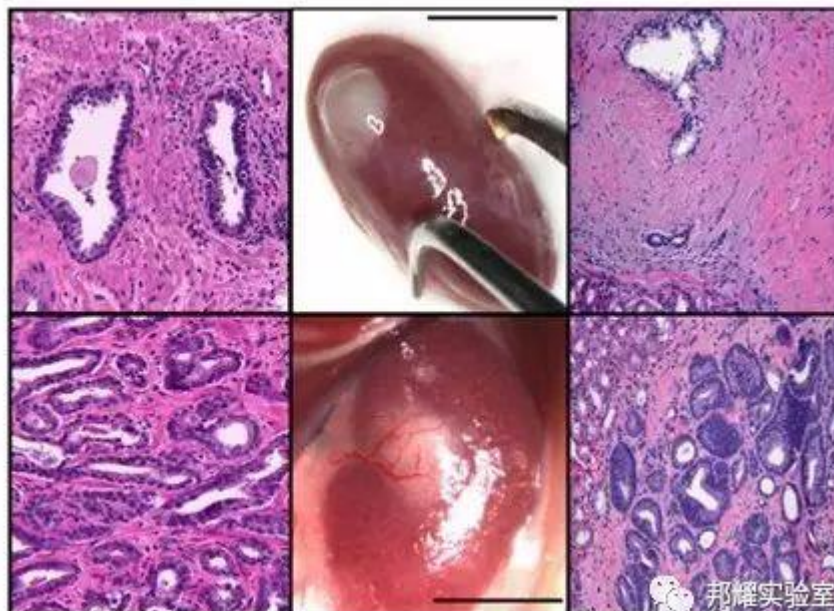
PDTX (KRAS MUT)



组织人源化模型：PDTX模型构建

2) 异位之肾包膜移植 (Subrenal capsule, SRC PDTXmodels):
SRC PDTX是将人体新鲜肿瘤移植于免疫缺陷鼠肾包膜下, 由于肾包膜血管丰富等优势, 为一些皮下难以成瘤的模型开辟了一个新途径。如非小细胞肺癌NSCLC的肾包膜成功率高达90%, 皮下仅为25%。

正常
组织



肿瘤
组织



组织人源化模型：PDTX模型构建

3) 原位移植 (Orthotopic PDTX models)

将患者肿瘤组织移植在原位，以模拟肿瘤在患者体内的生长及转移过程。目前已在多种肿瘤中构建成功用于药物筛选。

可发生近端或远端转移，是最贴近人类肿瘤生长模式的移植。但是操作比较困难，且肿瘤处于原位不易观察，需要借助活体成像，因此限制了它的使用。



组织人源化模型：PDTX模型构建

■ 注意事项：

（1）移植肿瘤组织的特性及处理过程对移植的成功率影响较大，需特别注意标本的新鲜度及标本离体后到移植之间的时间跨度必须控制在2h内；

（2）传代时接种的瘤块尽可能保持均一，防止个体差异过大；

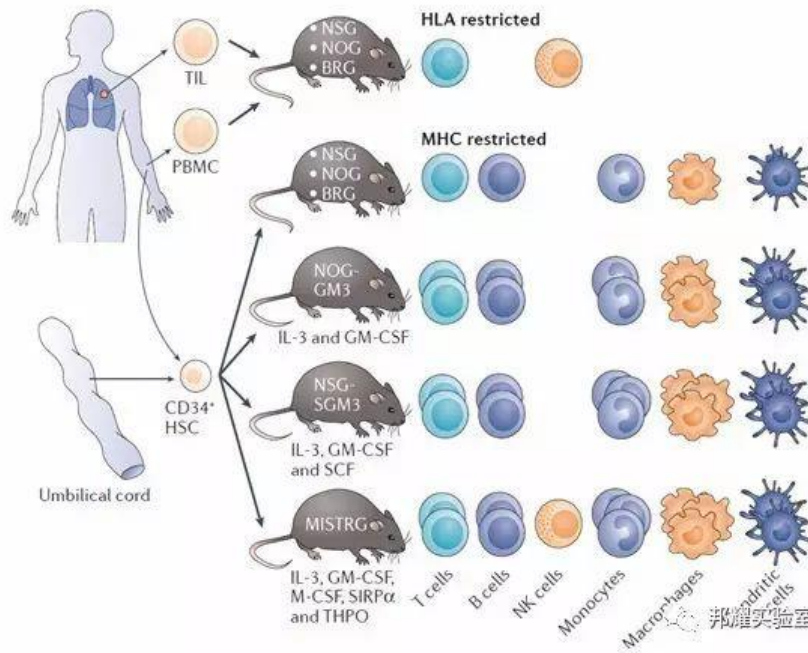
（3）乳房垫接种位置较小，瘤块不可过大，尽量剪小，防止接种后移位；

（4）为提高成瘤率肿瘤块也可混合10% Matrigel进行荷瘤

。

组织人源化模型：新一代PDTX模型（人源化免疫系统的PDTX）

1.基本原理：首先在免疫缺陷小鼠上移植病人来源的肿瘤，待成瘤以后，通过静脉注射分离自病人的（最好是同一病人来源的）肿瘤浸润淋巴细胞（TILs）、外周血单核细胞（PBMC）或CD34阳性造血干细胞（HSC），并通过补充特定类型细胞因子，诱导细胞定向分化为T细胞、B细胞、NK细胞和巨噬细胞等，在小鼠体内重建起人源化的免疫系统，以用于免疫治疗相关的研究，目前该模型已被多次报道。





组织人源化模型：新一代PDTX模型（人源化免疫系统的PDTX）

基本原理：首先在免疫缺陷小鼠上移植病人来源的肿瘤，待成瘤以后，通过静脉注射分离自病人的（最好是同一病人来源的）肿瘤浸润淋巴细胞（TILs）、外周血单核细胞（PBMC）或CD34阳性造血干细胞（HSC），并通过补充特定类型细胞因子，诱导细胞定向分化为T细胞、B细胞、NK细胞和巨噬细胞等，在小鼠体内重建起人源化的免疫系统，以用于免疫治疗相关的研究，目前该模型已被多次报道。



基因人源化模型：

所谓基因人源化，即将人类基因插入或者替代原有动物基因中，从而产生人类基因嵌合动物，从而可在此种人源化动物体内表达部分人类蛋白，模拟蛋白反应或者信号传导在体内的环境。

特别是在以**CRISPR/Cas9**为代表的新一代基因编辑技术兴起之后，插入大片段人类基因变得十分简单，因此基因人源化模型逐步变得热门起来。应该根据研究不同的疾病，根据实验目标，选择最合适的动物模型（包括免疫缺陷和非免疫缺陷动物模型），才能得到科学的结论和理想的实验结果。



基因人源化模型：

肿瘤免疫疗法是当前肿瘤治疗领域中最具前景的研究方向之一，《**Science**》杂志将肿瘤免疫疗法评为**2013**年十大科学突破第一位。



基因人源化模型：免疫检查点人源化小鼠

特别在T细胞免疫检查点抗体治疗的研究中，人源化模型给检查点抑制剂提供了很好的体内实验环境。肿瘤免疫治疗种类繁多，但本质上绝大多数都是通过T细胞发挥抗肿瘤作用，从传统细胞因子、多肽类药物到最新的免疫检查点抑制剂与**CAR-T**细胞治疗均是间接或者直接激活人体T细胞来清除肿瘤细胞。



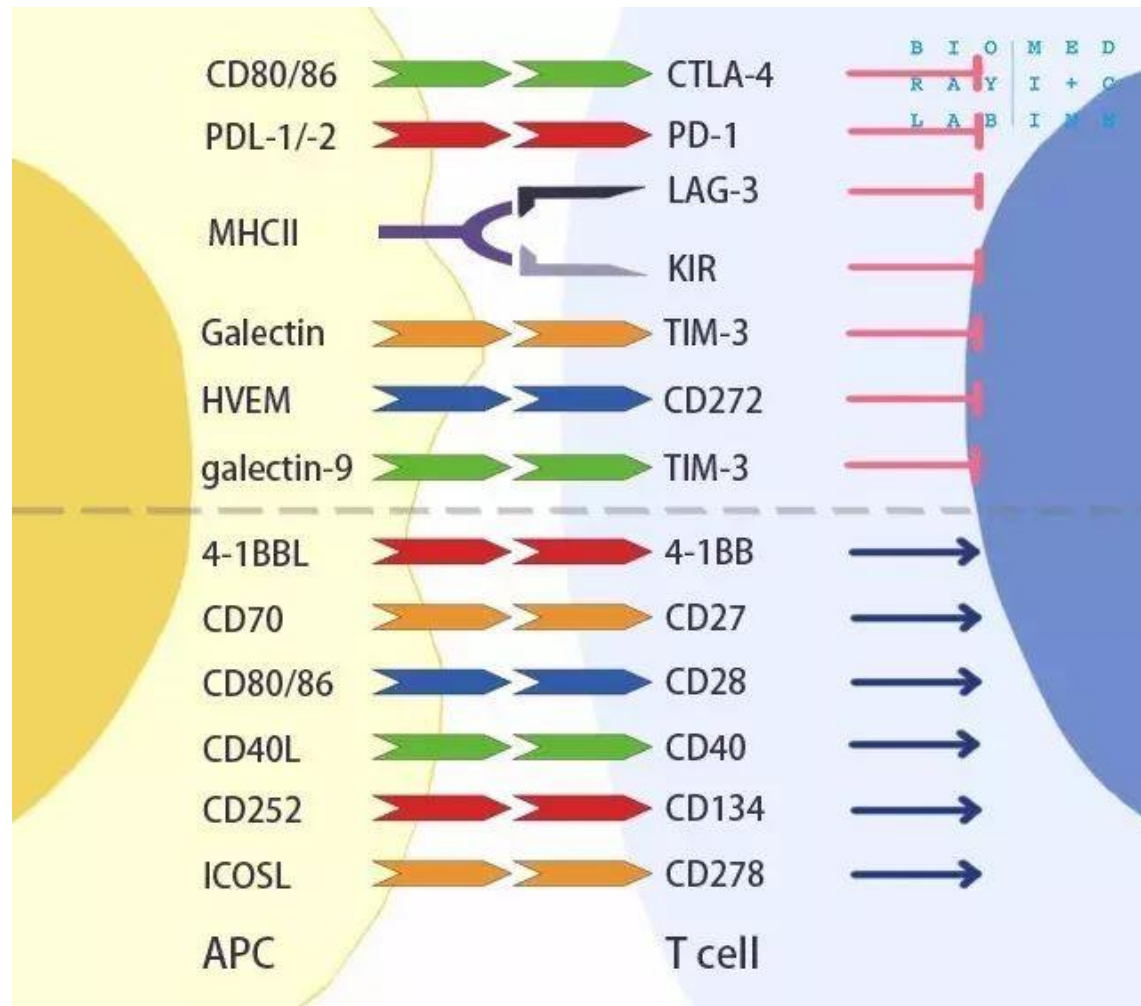
基因人源化模型：免疫检查点人源化小鼠

在有效的抗肿瘤免疫过程中，T细胞作为核心的执行者，首先被T细胞受体（T cell receptor, TCR）介导的抗原识别信号激活，同时众多的共刺激信号和共抑制信号精细调节T细胞反应的强度和质量，这些抑制信号即为免疫检查点。

在生理情况下，共刺激分子与免疫检查点分子保持平衡，从而最大程度减少对于周围正常组织的损伤，维持对自身组织的耐受、避免自身免疫反应。而肿瘤细胞可以通过此机制，异常上调共抑制分子及其相关配体，抑制T细胞激活，从而逃避免疫杀伤。针对免疫检查点的阻断是增强T细胞激活的有效策略之一，也是近些年抗肿瘤药物开发最热门靶点。

基因人源化模型：免疫检查点人源化小鼠

目前热门免疫检查点靶点





基因人源化模型：免疫检查点人源化小鼠

针对这些检查点，如果加以抑制（或激活，如4-1BB），将提高T细胞活性，增强肿瘤杀伤效果。目前，针对PD-1/PD-L1通路抑制剂的研究受到了特别的关注。PD-1人源化小鼠已经开始崭露头角，为肿瘤药物临床前研发提供了有力工具。

目前已经构建或正在努力开发针对以上靶点的人源化动物模型，将以上靶点基因的人类基因片段或者全长插入/替换相应小鼠基因，会产生表达人类靶点蛋白的动物模型，为免疫治疗研究提供更加有力的动物模型。



基因人源化模型：递送人类的细胞因子人源化小鼠

尽管，当前备受瞩目的NRG、NSG小鼠应用广泛，极大推进了生物医学的研究进程。但仍存在较多问题，一个主要因素是小鼠细胞因子与相对应的人的细胞因子交互反应影响人的HSCs，PBMCs的发育和功能。

因此，给人的HSCs，PBMCs一个完整的人的细胞因子的环境，将递送人的细胞因子到NRG或NSG宿主鼠上，使其为人类细胞移植提供一个理想的环境，将会促使NRG或NSG小鼠成为更为理想的临床前动物模型。



基因人源化模型：递送人类的细胞因子人源化小鼠

移植人的CD34⁺造血干细胞和前体细胞到NRG, NSG小鼠中，虽然能够产生多种类型的造血干细胞，包括T细胞，B细胞，NK细胞，单核细胞，树突细胞，红细胞和血小板。

但是，其中一些细胞系的发育及其功能并不理想。可能原因是人的细胞因子与小鼠的细胞因子相互作用，从而使移植的人的细胞生存及生长受到影响。因此，为人源化小鼠提供更多的人的细胞因子（表-1）将促使当前的NRG, NSG等人源化小鼠更加接近于人的环境。



基因人源化模型：递送人类的细胞因子人源化小鼠

Human cytokine delivery	Cytokine	Model
Injection of recombinant protein	IL-15/IL-15R α complex	BRG
	IL-7	BRG
Hydrodynamic injection of DNA	IL-15 $\pm$ FLT3L	NSG
	FLT3L + GM-CSF + IL-4	NSG
	M-CSF	NSG
	IL-3 + EPO	NSG
Lentiviral expression	IL-7	BRG
	IL-7R α	BRG
Transgenic overexpression	IL-3/GM-CSF/SCF	NSG
Knock-in gene replacement	TPO	BRG*
	IL-3/GM-CSF	BRG*

*Mixed 129 x BALB/c genetic background





自发性糖尿病模型

该模型绝大多数采用有自发性DM倾向的近交系纯种动物，如BB (Biobreeding) 鼠、NOD (non-obesity diabetes) 小鼠、GK (Goto-kakisaki) 鼠和中国地鼠 (chinese hamster) 等动物造模。自发性DM动物模型是指动物未经过任何有意识的人工处置，在自然情况下发生DM的动物模型。已用于研究的自发性DM动物约有20种，可分为两类：一类为缺乏胰岛素，起病快、症状明显，并伴有酮症酸中毒，如BB (Biobreeding) 鼠、NOD (non-obesity diabetes) 小鼠和LETL大鼠，它们可以作为1型DM的动物模型使用。这些动物没有肥胖，发病之初呈现胰腺炎的征状，人类组织相关性抗原 (MHC) 参与发病过程，这些都与人1型DM的特征相似。利用这些模型可以对人1型DM的发病机制进行深入研究。另一类为胰岛素抵抗性高血糖症，其特点是病程长，不合并酮症，为2型DM动物模型。常用的2型DM自发性动物模型有中国地鼠 (Chinese hamster)、GK (Goto-Kakisaki Wistar rats) 大鼠、NSY (Nagoya-Shibata-Yasuda) 鼠和OLETF大鼠。



NOD 小鼠(nonobese diabetes mouse)



NOD 小鼠是JCL —ICR品系小鼠衍生的CTS(白内障易感亚系)糖尿病小鼠近亲杂交而来,其发病多突然,表现明显多饮、多尿、消瘦,血糖显著升高,不用胰岛素治疗,动物存活不了一个月,通常死于酮血症。NOD小鼠是自发性自身免疫I型糖尿病的一个很好的模型,是由T2细胞(包括CD4和CD8细胞)介导的,其发展受控于一系列T细胞的调节。 β 细胞损伤继发于自身免疫过程,引起低胰岛素血症。免疫调节剂,可溶性白介素21受体,可溶性TNF受体p55,高果糖饮食等可预防NOD小鼠糖尿病发作。NOD小鼠的糖尿病发病率与性别有关,雌性鼠发病率显著高于雄性鼠,且发病早。



KK小鼠

是日本学者培育的一种轻度肥胖型2型糖尿病动物。后与C57BL/6J小鼠杂交,并进行近亲繁殖,Toronto2 (T2kk)小鼠。将黄色肥胖基因(即Ay)转至KK小鼠,得KK2Ay鼠,与KK小鼠相比,有明显的肥胖和糖尿病症状。从5周龄起,血糖、血循环中的胰岛素水平以及HbA1c 水平逐步升高。 β 细胞有脱颗粒和糖原浸润,随后出现胰岛肥大和中心气泡。肝脂肪化和脂肪组织增多。脂肪组织的胰岛素敏感性降低比KK小鼠明显,且到16 周龄时完全丧失。肾脏病变发生早,发展迅速,肾小球基底膜增厚。用KK2Ay鼠可评价抗糖尿病药物的胰腺外作用。



ob/ob 小鼠

2型糖尿病动物模型,属常染色体隐性遗传。纯合体动物表现为肥胖,高血糖及高胰岛素血症。症状的轻重取决于遗传背景, ob/ob小鼠 (obesemouse) 与C57BL/KsJ交配的子代症状严重,而ob/ob与C57BL/6J交配的子代症状则较轻,后者是杂合体。Ob/ob小鼠leptin(ob 基因产物)缺乏,引起肝脂肪生成和肝糖原异生,高血糖又刺激胰岛素分泌,引起胰岛素抵抗的恶性循环。糖尿病ob/ob小鼠肝PPAR γ 2表达水平升高与胰岛素抵抗有关,可能作为一种补偿机制,试图保持胰岛素的敏感性口服雌酮硫酸盐 (estrone sulfate)可降低ob/ob小鼠肝葡萄糖-6-磷酸酶的活性和酶蛋白的水平,从而使血糖正常。

ob/ob 小鼠





诱发性肿瘤动物模型

- 用致癌因素在实验条件下诱发出动物肿瘤所形成的模型。由于诱发因素和条件可人为控制，诱发率远高于自然发病率，故在肿瘤实验研究中较自发性肿瘤动物模型更为常用。
- 致癌因素主要有化学性、物理性及生物性致癌物。
- 常用的动物以哺乳类啮齿动物的使用最多、应用最广，包括各种大鼠、小鼠、豚鼠等。



肿瘤诱发方法

- **原位诱发**是指将致癌物直接与动物靶组织或靶器官接触而诱发该组织或器官发生肿瘤，接触方法可通过涂抹、灌注、喂养或埋置等。
- **异位诱发**是将与致癌物接触后的动物组织或器官埋置于该动物或另一正常动物皮下而产生该组织或器官的肿瘤。



在进行诱发动物肿瘤的实验，必须注意：

- 致瘤方法
- 动物种系
- 致癌物的种类
- 溶剂给药剂量、途径
- 观察时间

应尽量简便易行，有较好的重复性，并利于与人肿瘤比较研究；选择对所用致癌物很敏感的方法和种系。致癌物的剂量应能保证动物存活率较高、诱发期较短而又可诱发较高频率的肿瘤。



给药基本方法和途径

- (1) 涂抹法：将致癌物涂抹于动物背侧及耳部皮肤，主要用于诱发皮肤肿瘤（如乳头状瘤、鳞癌等）。常用于此法的致癌物有煤焦油、3, 4-苯并芘及20-甲基胆蒽等。
- (2) 经口给药法：本法将化学致癌物溶于饮水或以某种方式混合于动物食物中自然喂养或灌喂动物而使其发生肿瘤。诱导食管癌、胃癌和大肠癌等肿瘤常用此方法。



- (3) 注射法：注射法是将化学致癌物制成溶液或悬浮物，经皮下、肌肉、静脉或体腔等途径入体内而诱发肿瘤。本法亦很常用，其中皮下和静脉注射又最常用。
- (4) 气管灌注法：常用于诱发肺癌。将颗粒性致癌物制成悬乳液直接注入或用导液管注入动物气管内。多使用金黄地鼠和大鼠为实验动物。
- (5) 埋藏法：将致癌物包埋于皮下或其它组织内，或将经致癌物作用过的器官、组织移植于同种或同种系裸鼠皮下进行肿瘤的重复实验。



(6) 穿线法: 适于将多环芳烃类致癌物直接置于某特定部位或器官, 如宫颈、食管和腺胃等部位。方法是将定量的致癌物放置于无菌试管内, 加热使致癌物蒸发, 趁热吸附于预制的线结上; 将含致癌物的线结置于靶器官或靶组织而诱发肿瘤。



常见肿瘤的动物模型

肺癌

- (1) 二乙基亚硝胺 (DEN) 诱发小鼠肺癌模型：每周皮下注射1% DEN水溶液一次，每次剂量56mg/kg，DEN总剂量大到868mg，观察时间为100d左右，发生率约40%。若将DEN总剂量增到1176mg时，观察时间为半年左右，诱发率可达90%以上。
- (2) 乌拉坦诱发肺腺癌：小鼠 (A系，1~11/2月龄) 较大鼠敏感，每次每只腹腔注入10%乌拉坦生理盐水液0.1~0.3ml，间隔3~5日再注，共注2~3个月，每只小鼠用量约为100mg，注后3个月肺腺癌发生率为100%，而且多数为多发性，这种诱发瘤为良性。



(3) 气管灌注致癌物诱发肺癌模型：向气管内注入苯并芘、硫酸胺气溶胶或甲基胆蒽等物质。

常用的有：

- ①猴气管内注入3, 4苯并芘（苯并花为3~15mg与等量之 Fe_2O_3 混合液），每周一次，共10次，6只猴中有2只诱发肺的鳞状上皮癌。
- ②硫酸胺气溶剂给100只大鼠吸入，13个月后所有大鼠都发生了肺腺癌。



常见肿瘤的动物模型

肝癌

(1) 二乙基亚硝胺 (DEN) 诱发大白鼠肝癌：取体重250g左右的封闭群大白鼠，雌雄不拘。按性别分笼饲养。

- 除给普通食物外，饲以致癌物，即用 0.25% DEN 水溶液灌胃，剂量为10mg/kg，每周一次，其余5天用0.025% DEN 水溶液放入水瓶中，任其自由饮用。共约4个月可诱发成肝癌。
- 单用0.005% 掺入饮水中口服8个月诱发肝癌。4-2 甲基氨基氮苯 (DBA) 诱发大鼠肝癌：用含0.06% DBA 的饲料喂养大鼠，饲料中维生素B2 不应超过1.5 ~ 2mg/kg，4 ~ 6月就有大量的肝癌诱发成功。



(2) 2-乙酰氨基酸 (2AAF) 诱发小鼠、狗、猫、鸡、兔肝癌：给成年大鼠含0.03% 2AAF标准饲料。每日每平均2~3mg2AAF (也可将2AAF混于油中灌喂)，3~4月后有80~90%动物产生肝肿瘤

。

(3) 二乙基亚硝胺诱发大鼠肝癌：用剂量为每日0.3~14mg/kg体重，混于饲料或饮水中给予，6~9个月后255/300大鼠发生了肝癌。

(4) 黄曲霉素诱发大鼠肝癌：每日饲料中含0.001~0.015ppm，混入饲料中喂6个月后，肝癌诱发率达80%。



(5) 亚胺基偶氮甲苯 (OAAT) 诱发小鼠肝癌:

- 用1%OAAT苯溶液 (约0.1ml含1mg) 涂在动物的两肩胛间皮肤上, 隔日一次, 每次2~3滴, 一般涂100次。实验后7~8周即而出现第一个肝肿瘤, 7个月以上可诱发小鼠肝肿瘤约55%。
- 用2.5mgOAAT溶于葵花子油中, 给C3H小鼠皮下注射4次, 每日间隔10天, 也可诱发成肝癌。



常见肿瘤的动物模型

胃癌

(1) 甲基胆蒽诱发小鼠胃癌：取20g左右的小鼠，无菌手术下，在腺胃粘膜面穿挂含甲基胆蒽（MC）线结。含MC的线结是用普通细线，在一端打结后，将线结置于盛有MC小玻璃试管内，在酒精灯上微微加温，使MC液化渗入线结。MC浓度为0.05~0.1g/20-甲基胆蒽内浸入10~20根线。手术埋线后4~8个月可诱发成功胃癌。



- (2) 用不对称亚硝胺，剂量为 0.25ml/kg 体重，3个月后全部动物发生前胃乳头状癌，7~8个月后有85~100%发生前胃癌。昆明种最敏感。A系次之，615系小鼠敏感性最差。
- (3) 用甲基亚硝基醋酸尿素给BD大鼠饮水中加 2mg/kg 体重，每周5次饮用，520天后全部大鼠均发生了腺胃癌。
- (4) 雄性金黄仓鼠口服甲基硝基亚硝基胍。
- (5) 肌氨酸乙酯和亚硝酸钠诱发鸡胃癌模型。



常见肿瘤的动物模型

鼻咽癌

(1) 二甲基胆蒽 (MC) 诱发大鼠鼻咽癌: 取直径2~3mm的硬质塑米管, 在酒精灯上小火拉成锥形, 每段长约3.5cm, 管内填以结晶体MC。小管一端用火封闭, 以防药物外溢, 尖端用针刺数孔, 使MC能从小孔溢出。取体重120g左右的大白鼠, 雌雄均可, 乙醚麻醉后, 由前鼻孔将上述含MC的塑料小管插入鼻腔, 利用前鼻孔较小管粗端为小的特点, 稍加用力, 迫使小管全部进入鼻腔内, 其尖部可达鼻咽腔。不需另加固定, 即可使小管长期留于鼻腔内。待到预定时间 (半年以上), 或动物自行死亡时, 到其鼻咽部, 10%福尔马林固定, 脱钙后, 石蜡包埋, 进行连续切片。发癌率可达60%以上。



(2) 二乙基亚硝胺滴鼻法诱发鼻咽癌：取120g左右大白鼠，雌雄均可，乙醚麻醉后，用磨平针尖的8号针头，从前鼻孔轻轻插入，针尖可达鼻咽腔。经注射器灌注用1%吐温-80新配的 33.3%DEN混悬液0.02ml (含DEN6.7mg) 每周1次，共15~20次，可诱发成鼻咽癌。



诱发性糖尿病动物模型

■ 手术切除胰腺

是最早的糖尿病动物模型复制方法。1890 年, Mehring 和 Minkowski 报道, 在切除狗胰腺后, 出现多尿, 多饮, 多食和严重的糖尿现象

一般选用较大的实验动物, 如狗和家兔等, 其次用大鼠。全部或大部分切除胰腺, 但保存胰十二指肠动脉吻合弓。如果连续两天血糖值超过 11.1mmol/L 或 120min 葡萄糖耐受量试验, 血糖值未恢复到注射前水平则认为 DM 造模成功。其机制是全部或大部分切除胰腺后, β 细胞缺乏而产生无胰性糖尿病动物模型。



诱发性糖尿病动物模型

■ 化学药物特异性破坏胰岛 β 细胞

(1) 链脲佐菌素 (streptozotocin, STZ) : STZ 通过自由基损伤 β 细胞, 使 β 细胞功能受损, 胰岛素合成减少, 引发糖尿病。同一种系中 STZ 致细胞损伤程度取决于 STZ 的量, 低剂量诱导 β 细胞 INS - 1 凋亡, 高剂量致 β 细胞坏死。一次性大剂量注射 STZ (大鼠 60 ~ 80 mg/kg, iv 或 ip, 小鼠 100 ~ 200 mg/kg, iv 或 ip, 临用前溶于 0.1 mol/L 柠檬酸缓冲液中) 可致 β 细胞坏死而无胰岛炎, 制成无炎性 I 型糖尿病模型。注射 72 h 后, 血糖可稳定升高, 动物有多饮, 多食, 多尿。预测血糖在 11.1 mmol/L 以上即可选用。小鼠多次小剂量注射 (40 mg/kg, 连续 5 d), 可引发胰岛炎, 制成免疫 I 型糖尿病模型, STZ 可能通过细胞介导的自身免疫反应起作用。作用强度与性别有关, 雄性鼠更敏感。



(2) 四氧嘧啶 (alloxan) : 四氧嘧啶产生超氧自由基而破坏 β 细胞, 导致胰岛素合成减少, 胰岛素缺乏。其作用可能与干扰锌的代谢有关。豚鼠具有抗药性。四氧嘧啶引起的血糖反应分三个时相, 开始血糖升高, 持续约 2h, 继而因 β 细胞残存的胰岛素释放引起低血糖约 6h, 12h 后开始持久的高血糖。动物禁食对四氧嘧啶诱发高血糖较为敏感。给药剂量依动物及给药途径不同而异 (均需临用前配), 大鼠 150 ~ 200 mg/kg (ip), 40 ~ 60 mg/kg (iv); 小鼠 200mgP/kg (ip), 85 ~ 100 mg/kg (iv)。

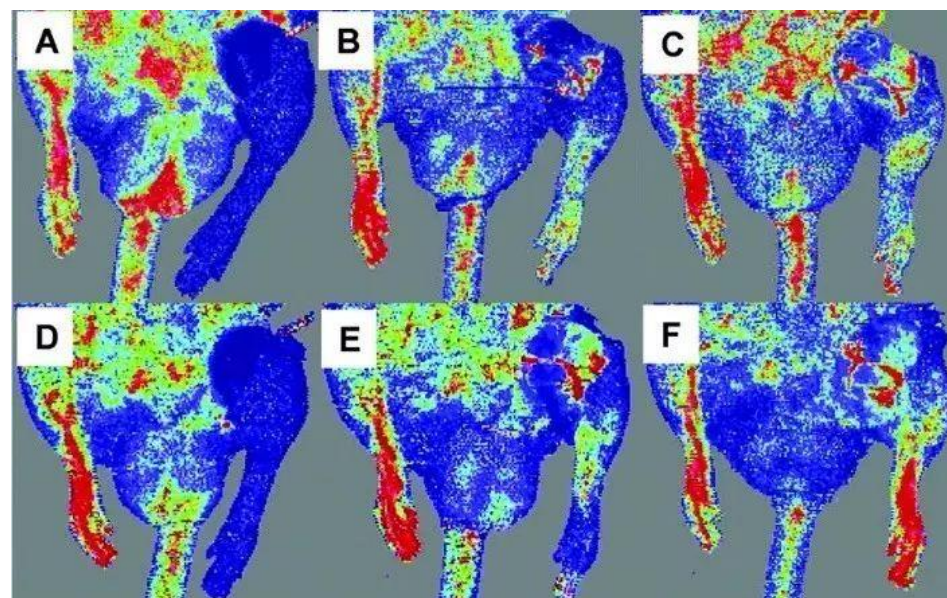
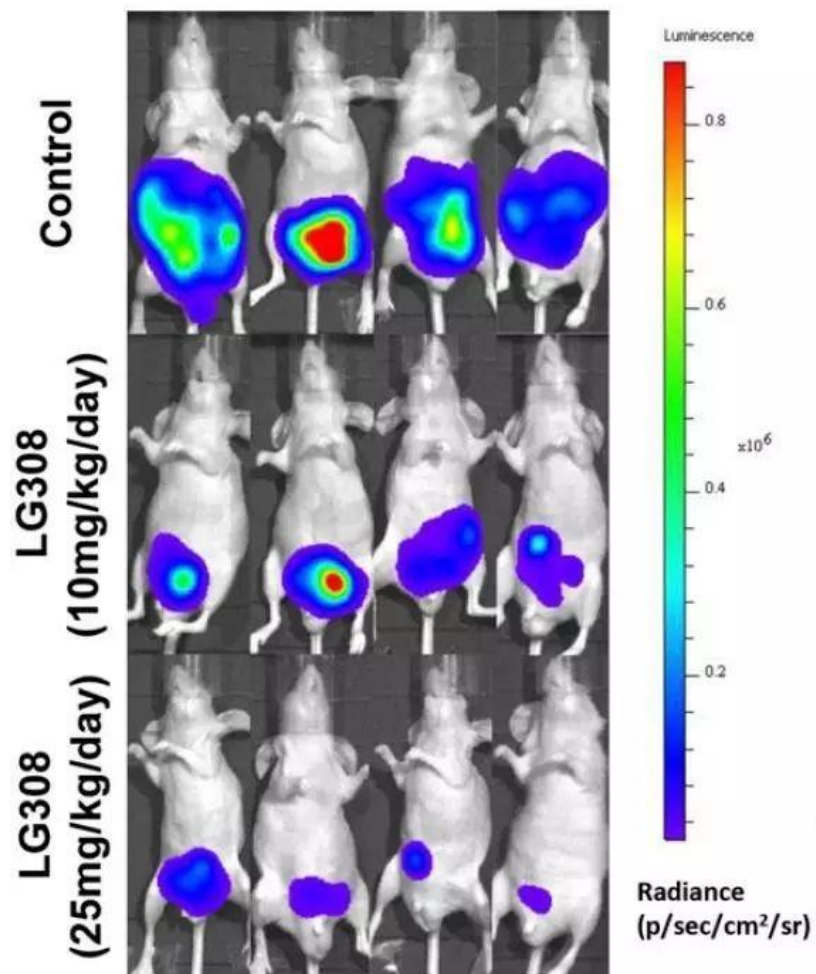
两种方法相比, STZ 优于四氧嘧啶, 因其造模稳定, 快速, 种属选择性不强 (豚鼠只能用 STZ 造模), 复制前不需禁食, 组织毒性相对较小等。不足之处是价格较四氧嘧啶贵。



诱发性糖尿病动物模型

■ 手术及药物联合制作糖尿病模型

通过手术切除实验动物较易切除的胰腺钩突及体尾部, 然后局部或全身应用胰腺 β 细胞毒性药物, 以破坏残留胰腺的 β 细胞, 使其丧失功能, 造成实验动物体内胰岛素缺乏, 从而诱发实验动物出现糖尿病的临床症状。克服了全胰切除所致的严重创伤和胰腺外分泌障碍的缺点, 也避免了大剂量应用胰腺 β 细胞毒性剂给其他组织器官带来的严重损伤。



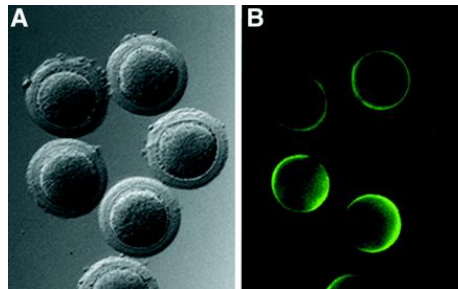
转基因猴和疾病模型

单精注射 (ICSI)



Molecular Human
Reproduction
2000

逆转录病毒



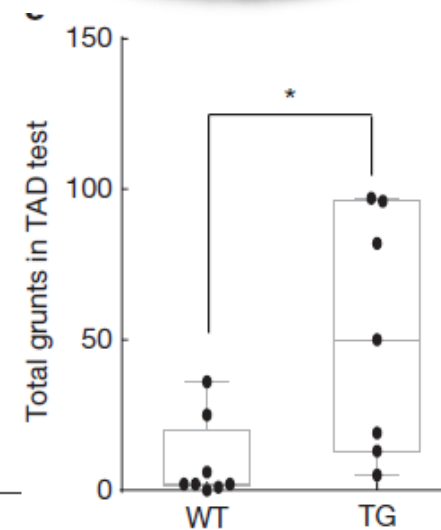
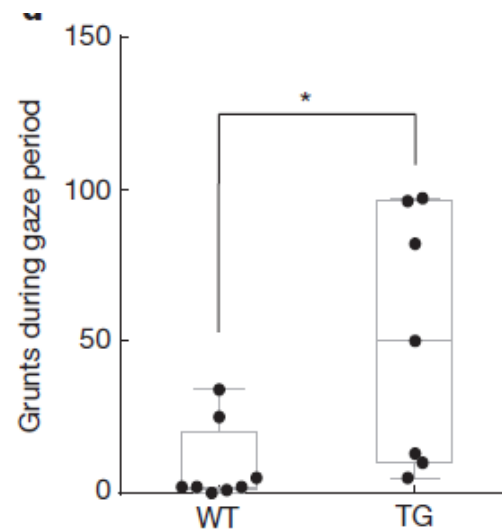
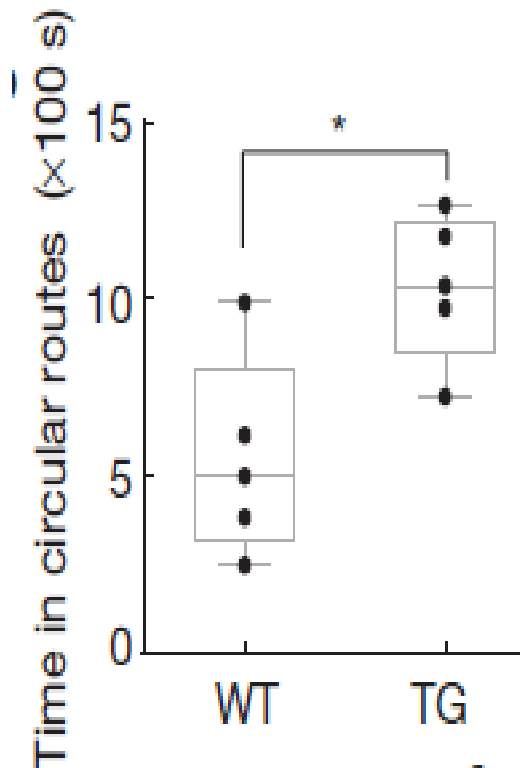
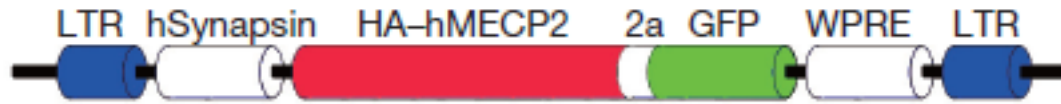
Science 2001

慢病毒



PNAS 2010

自闭症模型



灵长类动物模型

估计美国进口约5-10万只/年

主要被制药企业用于药物临床前评价

安全性评价，毒理
学评价等

中国目前约3万只/年，
<\$2000/只

药效学评价

动物模型：5-10
万人民币/只



Thank you!

