

匡德宣,王文广,孙晓梅,等. 树鼩实验动物标准化质量控制标准的研究编制 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(3): 67-71.
Kuang DX, Wang WG, Sun XM, et al. Establishment of quality control standards for laboratory animal standardization in tree shrew [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(3): 67-71.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2019.03.011

树鼩实验动物标准化质量控制标准的研究编制

匡德宣,王文广,孙晓梅,陆彩霞,罕园园,仝品芬,李娜,代解杰*

(中国医学科学院/北京协和医学院 医学生物学研究所树鼩种质资源中心,云南省重大传染病疫苗研发重点实验室,云南省实验树鼩标准化与应用研究创新团队,昆明 650118)

【摘要】 树鼩在新陈代谢、生理机能、大体解剖和基因组等方面与人类具有相似性,已被广泛应用于医学和生物学研究领域。作为一种极具价值和科学研究需求的实验动物新资源,标准化质量控制已经成为树鼩使用中亟待解决的技术瓶颈和研究发展的必然趋势。本文对树鼩质量控制团体标准进行归纳总结和分析说明,加强标准的宣传推广和贯彻实施,为树鼩实验动物标准化质量控制及国家标准的制订提供参考依据,最终促进树鼩推广应用和产业化发展。

【关键词】 树鼩;实验动物;质量控制;标准

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2019) 03-0067-05

Establishment of quality control standards for laboratory animal standardization in tree shrew

KUANG Dexuan, WANG Wenguang, SUN Xiaomei, LU Caixia, HAN Yuanyuan, TONG Pinfen, LI Na, DAI Jiejie*
(The Center of Tree Shrew Germplasm Resources, Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Yunnan Key Laboratory of Vaccine Research & Development on Severe Infectious Diseases, Yunnan Innovation Team of Standardization and Application Research in Tree Shrew, Kunming 650118, China)

【Abstract】 Tree shrews are similar to human beings in terms of their metabolism, physiological function, general anatomy, and genome. They have thus been widely used in medical and biological research. For this new experimental animal resource of great value in scientific research, standardized quality control has become a technical bottleneck and an inevitable trend of research and development in the use of tree shrews. This paper analyzes and summarizes the quality control group standards of laboratory animal tree shrew, strengthens the promulgation and implementation of these standards, and provides a reference for the establishment of standardized tree shrew populations and national standards. Finally, this paper promotes the application and industrial development of tree shrews.

【Keywords】 tree shrew; laboratory animal; quality control; standardization

树鼩,学名(*Tupaia belangeri*),英文名(tree shrew),与松鼠非常相似,体型小,吻尖细,犬齿细小,前臼齿宽大,前后肢各有5趾。生殖周期短(约6~8月即达性成熟),繁殖能力较强(一胎可产2~5

【基金项目】 云南省技术创新人才培养项目(2016HB006);云南省科技人才和平台计划项目(2017HC019);国家科技支撑计划项目(2014BAI01B01);云南省联合支持国家计划项目(2015GA009);重点实验室运行补助专项(KF2015-01, 2017DG008);云南省重大科技专项(2017ZF007)。

【作者简介】 匡德宣(1974—),男,主任技师,博士,从事实验动物疾病模型工作。E-mail: kdx@imbcams.com.cn

【通信作者】 代解杰(1961—),男,博士生导师,研究员。E-mail: dj@imbcams.com.cn

只),使用成本低。树鼩为昼出夜伏的小型哺乳类动物,行动敏捷,易受惊,多栖息活动于热带雨林、次生林、山地森林和灌木林地区,主要分布于南亚、东南亚及中国西南地区^[1]。树鼩在分类上比啮齿类动物更接近灵长类^[2-3],在遗传上的基因组和进化上非常接近灵长类^[4],被广泛应用于免疫学、病毒学、肿瘤学、眼科学、脑科学、神经生物学等诸多人类医学实验研究领域^[5-6]。为了保证树鼩的质量和标准操作,实验数据的可靠性、一致性和可重复性,全国实验动物标准化技术委员会于 2017 年颁布实施了 6 项实验动物树鼩团体标准。本文总结分析了树鼩微生物学与寄生虫学、遗传监测、配合饲料、环境设施和病理学诊断规范质量控制标准的编制内容,旨在加强该团体标准的宣传和实施,促进实验树鼩新品种资源的建设、标准化研究与应用和产业化发展,并为制订树鼩国家标准提供参考。

1 编制背景

实验动物标准化和动物实验的规范化研究是实验动物学科及其行业的重要特点和本质特征。树鼩是我国重要的野生动物之一,为了使之成为实验动物新品种,必须进行实验动物标准化的研究,以满足生物医学研究的多样性、特殊性和国际性的发展需求^[7]。在将野生树鼩进行人工驯化、饲养繁殖及应用的过程中,必须对树鼩微生物学与寄生虫学、遗传学、营养学、环境设施和病理学质量控制等方面进行严格控制及监测,以保证树鼩和树鼩实验的质量。虽然对树鼩的研究已有很长时间,但直到上世纪 80 年代树鼩作为模型动物在生物医学领域的研究才引起较多的关注。随着相关研究的不断深入,树鼩得到越来越多的科技工作者的青睐,树鼩的标准化研究也就显得迫切而重要。在国家科技支撑计划项目及全国实验动物标准化技术委员会的资助和大力支持下,经过大量的实验研究及验证,反复多次的咨询论证和广泛的征求意见,逐步形成了对制定实验动物树鼩微生物学等级及监测、寄生虫学等级及监测、环境及设施、遗传质量控制、配合饲料以及病理学诊断规范质量控制标准的共识,制订形成实验动物树鼩团体标准。该实验树鼩质量标准的制定在很大程度上保证科研数据的可靠性、一致性和可重复性,对提升我国实验动物科学自主创新的研究水平,进而提高我国在实验动物领域的国际地位亦具有重要的科学意义。

2 编制原则及依据

本标准的编制遵循“科学性、实用性、统一性、规范性”的原则,在确定本标准的各项指标时,严格遵循国家颁发的《实验动物管理条例》和《实验动物质量管理办法》。以实验动物相应的微生物、寄生虫、环境设施、配合饲料、遗传检测及病理诊断国家标准为依据,参考了云南省技术监督局颁布实施的实验用树鼩地方标准《DB53/T 328-2010 实验树鼩(第 1-5 部分)》和《DB53/T 328-2012 实验树鼩(第 6-10 部分)》等相关文献资料^[8-17],在大量实验验证的基础上进行科学的修正和完善,充分考虑人员及树鼩的福利,使所编制树鼩团体标准既符合国家标准的要求,又能结合实际并具有很好的可操作性。有利于树鼩资源的有效利用,提升国家实验动物标准化建设内容,拓展使用范围。

3 编制内容

3.1 树鼩微生物学和寄生虫学质量控制标准

病原微生物和寄生虫直接影响树鼩健康状况、生产和应用。树鼩病原微生物主要涉及:沙门菌、皮肤真菌、志贺菌、肺炎链球菌、变形杆菌、金黄色葡萄球菌、空肠弯曲菌以及疱疹病毒、疱疹病毒、轮状病毒、呼肠孤病毒及腺病毒等^[18-22],树鼩寄生虫主要涉及:虱、蜱、螨虫、弓形虫、线虫、绦虫及肉孢子虫等^[23-26]。在参考实验树鼩微生物和寄生虫学等级及监测地方标准基础上,《T/CALAS 08-2017 实验动物 树鼩微生物学等级及监测》和《T/CALAS 09-2017 实验动物 树鼩寄生虫学等级及监测》团体标准规定了树鼩的微生物学和寄生虫等级分类、检测要求、检测程序、检测规则、检测方法、结果判定、判定结论等^[27-28]。将沙门菌、皮肤真菌、志贺菌、弓形虫、线虫、绦虫及肉孢子虫等定为普通级树鼩质量控制必须检测和排除的项目,肺炎链球菌、变形杆菌、金黄色葡萄球菌和空肠弯曲菌被列为 SPF 级树鼩必要时检测项目。疱疹病毒、轮状病毒、呼肠孤病毒和腺病毒被列为 SPF 级树鼩必须检测和排除项目。另外,结核杆菌会引发人畜共患病,虽然有文献报道实验性结核分枝杆菌能感染中国树鼩^[29],但我们对野外引进树鼩和人工繁育封闭群树鼩做过结核杆菌检测,也曾用人型结核杆菌接种过树鼩,均没有发现结核的阳性结果及临床病例,与文献报道有较大差异,推测可能与结核杆菌的特异

性和专属性有关,在自然条件下树鼩不会感染结核杆菌。因此,标准编制时结核杆菌暂时未列入检测项目,将来是否需要作为检测项目有待进一步斟酌和研究。总之,该标准目前适用于树鼩微生物学和寄生虫学等级监测,防止外来生物和病原体的干扰,避免人及树鼩受病原微生物和寄生虫的影响,保证树鼩健康和实验的可靠性和准确性,为将来制定树鼩微生物学和寄生虫学等级及监测国家标准奠定基础 and 提供参考。

3.2 树鼩遗传学质量控制标准

树鼩的遗传质量直接决定着实验的可重复性、稳定性。因此,遗传质量控制也是树鼩标准化的重要组成部分。目前,国内外使用的树鼩多源于中缅甸树鼩滇西亚种的野生型,虽然已被广泛应用于各种人类疾病模型的建立,但其遗传背景不清晰,一直是制约树鼩实验动物标准化的一大瓶颈。虽然国内有部分关于树鼩遗传学的研究报道^[30-33],但没有形成国家层面的遗传检测体系和标准。在参考实验树鼩遗传质量控制地方标准和汇集国内外文献资料的基础上^[34-36],制定了《T/CALAS 11-2017 实验动物 树鼩遗传质量控制》团体标准,由全国实验动物标准化技术委员会颁布实施,填补了无国家层面和指导性强的树鼩遗传质量控制标准的空白。该标准规定了封闭群树鼩的命名、繁殖方法和遗传质量的检测方法^[37]。为封闭群树鼩的引种、繁殖和生产以及保种、性状控制、生产管理及遗传学监测提供了技术依据,对促进我国树鼩从资源优势转化为科研优势和商品优势,实现我国树鼩的标准化,对引导和规范行业发展都具有重要意义。

3.3 树鼩环境与设施的质量控制标准

树鼩的环境设施指将树鼩饲养在人为控制的有限空间,并按照人们的意志进行生长、繁殖、实验的一个人工的特定场所及生活环境。环境设施条件不仅影响树鼩的品质还直接影响树鼩实验的科学性、敏感性和实验结果的可重复性、准确性。树鼩环境设施的条件因素包括:温度、湿度、气流速度、氨浓度、光照周期及照度、噪声、笼器具及饲养间和实验间辅助设施的各种理化因素等^[38-42],这些因素的改变,容易引起代谢紊乱,影响树鼩生长发育、繁殖(发情异常、吃仔、哺乳不良等现象)、行为和形态,机体抵抗力下降,发病率增加。近年来,虽然国内外有不少关于生长环境及设施的相关研究报告,但各研究报告在生长环境的参数控制和设施

的配置情况上具有较大差异。在实验树鼩环境及设施地方标准的基础上,中国实验动物标准化技术委员会颁布实施《T/CALAS 10-2017 实验动物 树鼩环境及设施》团体标准^[43],规定了树鼩设施、工艺布局、环境条件的技术要求以及饮水、笼具、产仔窝箱、动物运输的原则要求,保证树鼩种群的健康及稳定的生长繁殖,为实验树鼩生产和使用机构申请许可证认证时提供检测依据,保证实验结果的科学性和可靠性。

3.4 树鼩配合饲料质量控制标准

在野外环境中,树鼩食性广,喜食水果、昆虫、鸟蛋和谷类等食物,对甜软多汁食物较喜欢,对酸涩干硬之物则很少吃,常把食物搬到他们喜欢的地方去吃,也将食物藏于洞内,过后再返回来吃,在吃食后饮水,并用前趾清洁嘴唇和面部。因此,在人工饲养条件下,树鼩生长、发育、繁殖、增强体质和抵御疾病以及一切生命活动均依赖于饲料和营养^[44]。充足的营养是维持树鼩机体正常生长、繁殖以及健康的先决条件,是树鼩遗传和各种生物学特性得以充分表达的必要条件,是维持树鼩健康和提高实验结果的重要因素。鉴于树鼩在野外环境和人工饲养条件差别较大,在云南省实验树鼩配合饲料地方标准的基础上,《T/CALAS 12-2017 实验动物 树鼩配合饲料》团体标准规定了树鼩配合饲料的质量要求、营养成分要求及配方、营养成分测定要求、卫生要求、检测规则以及标签、包装、贮存和运输要求^[45]。保证了树鼩配合饲料中的蛋白质、脂肪、钙、磷、氨基酸、维生素等各类营养物质含量符合树鼩自身的生理需求及生物学特性,满足各阶段营养需求、适口性和卫生标准,确保繁育的树鼩到达实验动物质量要求,为生命科学和医药研究提供符合我国实验动物质量标准的树鼩资源。

3.5 树鼩病理学诊断规范标准

通过大体解剖和光学显微镜观察,并结合全身所见症状及各项检测指标对实验动物进行综合的病理学诊断,是判断评估实验动物健康和质量状况的重要手段和最好方法^[46-47]。由于病理学诊断的复杂性和难于标准化,以往实验动物国家标准主要关注传染性疾病对动物质量的影响,至今实验动物的国家标准还没有病理学诊断标准。就树鼩病理学质量控制标准而言,目前只有 2017 年中国实验动物标准化技术委员会颁布实施的《T/CALAS 13-2017 实验动物 树鼩病理学诊断规范》团体标

准^[48],是目前国内关于树鼩病理学诊断最具权威和参考价值标准。该标准规定了树鼩病理学诊断的规则、程序、外观和临床检查、解剖和病理学检查、结果判定和结论等内容和方法,为树鼩传染性疫情监控、饲养繁育、疾病防治及疾病机理机制研究提供科学依据。

4 存在争议

尽管树鼩亲缘关系与灵长类最接近,在生理解剖、生化代谢、神经发育、病毒感染特性、心里应激模式等方面与灵长类甚至人类之间都存在高度的相似性,在医学生物学研究上的有诸多优势。但树鼩原本是野生动物,野外环境和人工饲养条件差别较大,受病原微生物和寄生虫、环境设施、营养饲料、检测试剂特异性、检测方法和手段、有毒有害物质及其它众多因素的综合影响,某些生物学特性指标会随之改变。因此,树鼩的实验动物标准化研究是一个复杂而漫长的过程,目前制定颁布的 6 项树鼩团体标准还需要今后不断完善和提升。

5 未来展望

中国实验动物标准化技术委员会颁布实施的 6 项树鼩团体标准为树鼩人工饲养繁育和科学研究提供了技术保障,标志着树鼩实验动物化研究取得了阶段性进展。由于树鼩的诸多生物学特性与人类有高度的同源性或相似性,加之与非人灵长类动物比较,其具有体型小、繁殖快、饲养和研究成本低等优势,未来利用树鼩开展人类疾病动物模型创建、揭示疾病的发生、发展及机制和药物筛选与评价将发挥重要和积极的作用。虽然云南省昆明市建有符合实验动物标准化的树鼩种质资源基地,国内需求树鼩开展科学研究的单位和机构也较多,但是,目前树鼩的推广应用十分有限,其原因是诸多外省需求单位不能提供树鼩使用许可证,以至于无法办理树鼩准运证和运输,使树鼩的广泛应用受到极大的限制。因此,加强树鼩团体标准的宣传推广和贯彻实施,让更多的实验动物管理部门及科技工作者更加重视树鼩作为实验动物新资源对生命科学和生物医药研究的重要性和必要性,尽快完善树鼩的质量标准和检测体系,将树鼩团体标准提升为国家标准,为各省市核发树鼩使用许可证提供技术标准依据。我们相信,树鼩在科学研究和生物医药大健康领域中将发挥越来越重要的作用。

参考文献:

- [1] 彭燕章,叶智彰,邹如金,等.树鼩生物学[M].云南科技出版社,1991:1-11.
- [2] 许凌,范宇,蒋学龙,等.树鼩进化分类地位的分子证据[J].动物学研究,2013,34(2):70-76.
- [3] 王应祥.中国树鼩的分类研究[J].动物学研究,1987,8(3):213-230.
- [4] Fan Y, Huang ZY, Cao CC, et al. Genome of the Chinese tree shrew[J].Nature Commun, 2013,4:1426-1434.
- [5] 徐林,张云,梁斌,等.实验动物树鼩和人类疾病的树鼩模型研究概述[J].动物学研究,2013,34(2):59-69.
- [6] 沈培清,郑红,刘汝文,等.中国树鼩实验动物化研究进展和展望[J].动物学研究,2011,32(1):109-114.
- [7] 李冠民,李继平.实验动物科学发展回顾[J].实验动物科学与管理,2002,19(3):27-29.
- [8] DB53/T 328. 1-2010, 实验树鼩(第 1 部分):微生物学等级及检测[S].
- [9] DB53/T 328. 2-2010, 实验树鼩(第 2 部分):寄生虫学等级及检测[S].
- [10] DB53/T 328. 3-2010, 实验树鼩(第 3 部分):遗传学质量控制[S].
- [11] DB53/T 328. 4-2010, 实验树鼩(第 4 部分):配合饲料[S].
- [12] DB53/T 328. 5-2010, 实验树鼩(第 5 部分):环境及设施[S].
- [13] DB53/T 328. 6-2012, 实验树鼩(第 6 部分):饲养管理[S].
- [14] DB53/T 328. 7-2012, 实验树鼩(第 7 部分):生物学特性数据测定[S].
- [15] DB53/T 328. 8-2012, 实验树鼩(第 8 部分):实验基本操作技术[S].
- [16] DB53/T 328. 9-2012, 实验树鼩(第 9 部分):HCV 病毒感染树鼩原代肝细胞模型制作[S].
- [17] DB53/T 328. 10-2012, 实验树鼩(第 10 部分):HCV 病毒感染树鼩模型制作[S].
- [18] 全品芬,年朝琴,彭超,等.致树鼩腹泻的奇异变形杆菌分离鉴定及药敏试验[J].实验动物科学,2014,31(1):41-43.
- [19] 尹博文,陈玲霞,李振宇,等.人工饲养树鼩皮肤真菌携带的调查[J].中国比较医学杂志,2015,25(11):13-16.
- [20] 邢进,冯育芳,付瑞,等.野生树鼩可培养细菌和真菌携带情况的调查[J].实验动物科学,2012,29(3):34-38.
- [21] 王新兴,李婧潇,王文广,等.野生中缅树鼩病毒携带情况的初步调查[J].动物学研究,2011,32(1):66-69.
- [22] 徐娟,黄晓燕,李晓飞,等.树鼩呼肠孤病毒的分离鉴定[J].动物学研究,2013,34(2):116-120.
- [23] 黄璋琼,陆彩霞,罕园园,等.滇西亚种树鼩体外寄生虫自然感染状况及分析[J].中国比较医学杂志,2011,21(5):70-73.
- [24] 孙晓梅,全品芬,匡德宣,等.野生树鼩肠道蠕虫感染调查及分析[J].中国比较医学杂志,2015,25(2):15-17.
- [25] 申丽洁,李伟.野栖树鼩的蠕虫感染[J].中国媒介生物学及控制杂志,2005,16(6):143-144.

[26] 吕龙宝,马玉华,邹丰才,等.驯养中缅树鼩的消化道寄生虫监测及寄生蠕虫驱虫效果[J].中国实验动物学报,2011,19(6):522-524.

[27] T/CALAS 08-2017, 实验动物 树鼩微生物学等级及监测[S].

[28] T/CALAS 09-2017, 实验动物 树鼩寄生虫学等级及监测[S].

[29] Zhan LG, Ding HR, Lin SZ, et al. Experimental Mycobacterium tuberculosis infection in the Chinese tree shrew [J]. FEMS Microbiol Lett, 2014, 360(1):23-32.

[30] 何保丽,沈培清,陈丽玲,等.树鼩微卫星 DNA 的多态性研究[J].中国实验动物学报,2009,17(2):143-145.

[31] 张媛,李晓飞,李振宇,等.滇西亚种树鼩微卫星分子标记的筛选[J].中国比较医学杂志,2015,25(6):36-41.

[32] 李婧潇,王新兴,王文广,等.中缅树鼩微卫星分子标记的筛选[J].中国实验动物学报,2011,19(4):312-315.

[33] 黎家敏,李海燕,李婧潇,等.应用 RAPD 标记技术对树鼩遗传多样性的分析[J].中国比较医学杂志,2010,20(2):34-40.

[34] Liu XH, YAO YG. Characterization of 12 polymorphic microsatellite markers in the Chinese tree shrew (*Tupaia belangeri chinensis*) [J]. Zool Res, 2013, 34(2):62-68.

[35] Lindblad-Toh K, Garber M, Zuk O, et al. A high-resolution map of human evolutionary constraint using 29 mammals[J]. Nature, 2011, 478(7370):476-482.

[36] Xu L, Chen SY, Nie WH, et al. Evaluating the phylogenetic position of Chinese tree shrew (*Tupaia belangeri chinensis*) based on complete mitochondrial genome: implication for using tree shrew as an alternative experimental animal to primates in biomedical research[J]. J Genet Genomics, 2012, 39(3):131-137.

[37] T/CALAS 11-2017, 实验动物 树鼩遗传质量控制[S].

[38] 匡德宣,王文广,孙晓梅,等.规模化饲养树鼩常见临床疾病的诊治[J].亚洲兽医病例研究,2017,6(2):15-20.

[39] 匡德宣,江勤芳,黄璋琼,等.树鼩独立换气笼具的设计[J].中国比较医学杂志,2012,22(9):77-80.

[40] 陈丽玲,李玛琳,刘汝文,等.树鼩驯化中应激综合征的防治[J].野生动物杂志,2009,30(4):177-179.

[41] 匡德宣,孙晓梅,全品芬,等.人工饲养母树鼩产后食仔的综合干预[J].中国比较医学杂志,2014,24(1):75-79.

[42] 匡德宣,孙晓梅,江勤芳,等.树鼩的动物福利措施探讨[J].中国比较医学杂志,2013,23(4):74-78.

[43] T/CALAS 10-2017, 实验动物 树鼩环境及设施[S].

[44] 全品芬,高家红,匡德宣,等.实验树鼩配合饲料的研究与应用[J].中国比较医学杂志,2012,22(4):36-37.

[45] T/CALAS 12-2017, 实验动物 树鼩配合饲料[S].

[46] 宋志琦,李超,董浩迪,等.病理学监测在实验动物质量评价中的地位[J].实验动物科学,2016,33(1):49-53.

[47] 陈华,赵德明,黎立,等.实验用小型猪病理学诊断规范的制定[J].实验动物与比较医学,2011,33(5):368-370.

[48] T/CALAS 13-2017, 实验动物 树鼩病理学诊断规范[S].

[收稿日期] 2018-09-21

专题计划

2019 年《中国实验动物学报》专题计划

《中国实验动物学报》2019 年第 2 期	专题:斑马鱼发育和遗传 主持人:王强 E-mail: qiangwang@ioz.ac.cn
《中国实验动物学报》2019 年第 3 期	专题:非人灵长类动物(树鼩)模型研究及其应用 主持人:代解杰 E-mail: dj@imbcams.com.cn
《中国实验动物学报》2019 年第 5 期	专题:感染动物模型与生物安全 主持人:周晓辉 E-mail: zhouxiaohui@shphc.org.cn
《中国实验动物学报》2019 年第 6 期	专题:大动物猴和猪的疾病模型研制,评价与应用 主持人:黄韧 E-mail: 1649405216@qq.com

有相关研究内容请与主持人联系!