

宋冰, 辜吉秀, 汪永锋, 等. 实验动物替代技术研究[J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(5): 680-687.

Song B, Gu JX, Wang YF, et al. Research on alternative technology of laboratory animals [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(5): 680-687.

Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2020.05.014

实验动物替代技术研究

宋冰^{1,2}, 辜吉秀³, 汪永锋^{2*}, 余四九¹, 张延英^{2*}, 康万荣², 杨娇²

(1. 甘肃农业大学, 兰州 730070; 2. 甘肃中医药大学, 甘肃省实验动物行业技术中心, 兰州 730000;
3. 甘肃省疾病预防控制中心, 兰州 730000)

【摘要】 动物实验在医学研究过程中必不可少, 需要使用大量实验动物处死取材。目前在替代实验动物使用方面已经出现多种类型的技术, 与传统动物实验相比, 这些技术许多情况下有更好的可重复性, 而且便于实验条件的参数控制, 还可以减少在实验过程中动物的使用及伦理问题。计算机模拟, 信息学技术, 3D 细胞培养模型, 新型培养基, 动物源性抗体替代品等技术都可以减少动物使用数量, 降低实验成本, 保障实验结果准确性。同时由于动物和人类的种属差异性, 会导致与人类健康相关研究的部分实验结果可靠性存疑。最后, 实验动物替代技术虽然一定程度上有助于减少动物使用数量, 但不能完全避免研究中对动物的使用。本文通过总结近年来相关替代技术的进展, 为医学研究中动物实验提供思路, 达到减少动物使用的目的, 提高实验动物福利。

【关键词】 实验动物; 替代技术; 3R 原则

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2020) 05-0680-08

Research on alternative technology of laboratory animals

SONG Bing^{1,2}, GU Jixiu³, WANG Yongfeng^{2*}, YU Sijiu¹, ZHANG Yanying^{2*}, KANG Wanrong², YANG Jiao²

(1. Gansu Agriculture University, Lanzhou 730070, China. 2. Gansu University of Chinese Medicine, Gansu Industry Technology Center for Laboratory Animal, Lanzhou 730000.
3. Gansu Center for Disease Control and Prevention, Lanzhou 730000)

Corresponding author: WANG Yongfeng. E-mail: wyf@gszy.edu.cn; ZHANG Yanying. E-mail: 1360599656@qq.com

【Abstract】 Animal experiments are essential for medical research, which has led to the sacrifice of many laboratory animals (LA). However, various emerging techniques can be used to replace experiments requiring LA sacrifice or products of LA sacrifice. In many instances, these techniques provide more reproducibility and parameter control than experiments involving LA or LA products, and in particular can reduce the sacrifice of LA and avoid issues with ethical approval during the experiment. In silico simulation, informatics, 3D cell culture models, new types of cell culture medium, and products of animal-friendly affinity reagents are some innovative technologies that can reduce the sacrifice of LA, reduce the cost of experiments, and ensure the accuracy of experimental result. At the same time, owing to species differences between animals and humans, the reliability of some experimental result related to human health has also been questioned. Finally, alternatives to animal experiments help to reduce the number of animals required for research to a certain extent, but cannot completely eliminate the need for animals in research. This article summarizes the progress of related alternative

【基金项目】 国家自然科学基金(81760828), 甘肃省中医药管理局科研课题(GZK-2019-26), 中央引导地方科技发展专项兰白试验区实验动物技术创新服务平台建设(2018-2019)。

Funded by National Natural Science Foundation of China (81760828), Scientific Research Project of Gansu Provincial Administration of Traditional Chinese Medicine (GZK-2019-26), the Central Government Guides Local Science and Technology Development Projects-Construction of Laboratory Animal Technology Innovation Service Platform in Lanbai Experimental Area (2018-2019).

【作者简介】 宋冰(1982—), 男, 博士, 研究方向: 实验动物基础研究。Email: songbing@gszy.edu.cn

【通信作者】 汪永锋, 男, 硕士, 教授, 硕士生导师, 研究方向: 医学解剖学研究。Email: wyf@gszy.edu.cn;

张延英, 男, 硕士, 高级实验师, 研究方向: 实验动物学研究。Email: zyy@gszy.edu.cn。

* 共同通信作者

technologies in recent years, provides ideas for the development of relevant experiments in medical research, achieves the purpose of reducing LA sacrifice, and improves the welfare of LA.

【Keywords】 laboratory animal; substitution technology; 3R principle

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

实验研究和临床观察属于现代医学及中医学研究中的两个重要方法,而动物实验独特的优越性成为实验研究的重要组成部分,随着科学技术以及现代伦理学的发展,实验动物福利和对实验动物的保护开始得到越来越多的重视,在此基础上的实验动物替代方法研究,正逐渐成为实验动物领域当下以及未来的发展方向。

1 3R 原则及发展

人类自古以来在狩猎、饲养食用、观赏、试验等很多方面使用动物,在使用方面存在很大的任意性,动物作为人类的私有财产、商品或食物而任人宰割,全无福利和权利可言。1822 年,马丁法令一旨在禁止虐待动物议案的提出,并获得英国议会通过,这才标志着人类历史上首次以法律条文形式将动物的利益予以明确,从而保护动物免受虐待,自此人类对待动物的态度才开始发生变化。早期的动物福利主要针对遭受残忍对待的动物个体。1959 年,动物学家罗歇尔(William Moy Stratton Russell)和微生物学家布鲁克(Rex Leonard Burch)共同发表了《人道主义实验技术原理》(The Principles of Humane Experimental Technique),第一次系统性提出“3R”原则,即替代(replacement)、减少(reduction)和优化(refinement),首次建立实验动物替代方法理论,为实验动物福利和伦理方面的研究奠定了理论基础,并明确实验动物福利主要是针对养殖动物的饲养体系及实验动物的实验规则。从 20 世纪 80 年代开始,世界上主要发达国家美国、德国、瑞士、荷兰等国先后制定动物保护法,其中均涉及动物福利相关要求。

2 实验动物使用及替代情况

从当前生命科学的发展需求来看,动物实验仍然是科学研究不可或缺的关键部分。据估计,目前全世界每年约有数亿只动物被应用于各种科学研究及生物医学产业,数据显示 2008 年就有近 1.15 亿只动物被使用^[1]。2014 年德国有 280 万只动物用于科学研究,其中约有 200.8 万作为实验动物使用,其余则用于摘取器官^[2]。依据欧盟相关数据,

2012 年有 262 148 只实验动物用于科研实验,其中小鼠最多为 196 103 只,其次为大鼠 32 205 只,猪 4784 只^[3]。美国实验动物使用情况并不透明,但估计实验动物每年使用量在 2000 万只以上,善待动物组织(People for the Ethical Treatment of Animals, PETA)通过分析 25 个美国国立卫生研究院(National Institutes of Health, NIH)资助的主要机构,发现在过去的 15 年间,实验动物的用量增长了 73%,其中小鼠用量超过总量的 3/4^[4]。

实验动物的使用同样需要兼顾科学发展和人类伦理进步,从法律法规,政策制定,新技术替代等多方面采取措施,减少对动物实验的依赖。德国于 2015 年将德国动物试验替代方法制定和论证中心(Center for Documentation and Evaluation of Alternative Methods to Animal Experiments, ZEBET)扩建为德国实验动物保护中心(German Centre for the Protection of Laboratory Animals, Bf3R)^[5-6],设立“动物保护研究奖”并自 2016 年开始将奖金提升为 2.5 万欧元,在过去的 30 年德国联邦教研部共资助 500 多个动物实验替代相关项目,总计 1.6 亿欧元^[7-9]。欧盟一直强调替代方法验证工作的重要性和发挥欧洲替代方法验证中心(European Center for Validation of Alternative Methods, ECVAM)的作用。2009 年,瑞典设立实验动物替代方法研究项目,每年经费约 1200 万瑞典克朗,瑞典不使用动物实验研究基金会截至目前共向 500 余项相关科学研究提供 2900 万瑞典克朗资金支持^[10-11]。

3 实验动物替代技术进展

实验动物在血液循环、呼吸、神经、内分泌系统等方面与人类具有相似的生理机制,由于这些相似性的存在,同时便于在实验室开展科学研究,因此实验动物为生命科学相关领域的研究人员提供非常好的实验条件。现在实验动物替代方法研究领域不断出现的技术发展,不仅会减少科学研究面临的伦理难题,而且可以弥补传统动物实验在相关科学研究中的缺点,从而对生物医学研究的进展产生全面而积极的影响^[12]。

3.1 计算机模拟分析及技术教学

计算机模拟是用计算机程序或网络对人体生物、化学系统进行模拟,是替代实验动物的主要方法之一。传统动物实验研究方法存在一些问题,例如动物模型与人体相差较大,将结论直接推广至人体存在困难;实验动物存在个体差异,为获取具有统计规律的数据,需进行大样本实验,耗费大量人力物力且存在伦理难题;有些需要极端实验条件或实验周期太长等情况下,动物实验仍存在较大局限性。因此计算机模拟通过构造一个与真实系统具有某种相似的模型,利用该系统进行一系列实验具有明显优势,同时在生物医学基础教学领域也体现了传统方式无法比拟的特点。

Washio 等^[13]应用计算机模型模拟人类代谢,研究血管中斑块的形成和心血管风险,并评估药物的毒性。Lipinski 等^[14]、Raunio^[15]分别使用基于生理学的生物动力学(Physiologically Based Biokinetic PBBK)模型,分析环境中污染物毒性以及化妆品的毒药物动力学(ADME),即机体对外源化学物的吸收(absorption)、分布(distribution)、代谢(metabolism)及排泄(excretion)过程。Adler 等^[16]、Ekins 等^[17]使用计算机模拟和信息学方法通过对潜在靶向药物分子进行筛选,减少实验动物在研发过程中的用量。黎永良等^[18]通过采用 MEK1 晶体构象构建口袋模型和 Flex Search 模型,很好地重现了晶体结构,并筛选出多个有效中药成分用于 MEK1 和黑色素瘤抑制的研究。周月等^[19]采用同源建模手段构建人 CNT2 三维结构模型,采用 Vina 软件虚拟进行筛选菊苣小分子化合物作用于 CNT2 的化学成分的研究。Kwong 等^[20]、孟康等^[21]、张晓云等^[22]通过使用计算机模拟仿真教学,减少实验动物在基础生物科学教学领域的使用。目前高清晰度三维解剖计算机模型可取代动物解剖用于解剖学教学^[23]。

3.2 三维细胞培养模型

三维细胞培养模型(3D cell-culture models)是体外细胞培养的新技术,主要包括多层细胞模型(multicellular layers, MCL)和多细胞球体模型(multicellular spheroids, MCS)。作为体外培养的细胞模型,其不仅可以阐明药物在细胞及亚细胞水平的摄取、分布、代谢、排泄等动力学过程,还可以模拟在体肿瘤组织的生理状态及特异性微环境。三维细胞模型因特有的立体结构,成为评价药物在肿瘤内穿透、分布的最佳模型之一。现阶段三维细胞

模型已广泛应用于抗肿瘤药物的药代动力学和药效学研究。

鲁萌等^[24]对三维细胞模型在抗肿瘤药物早期药代动力学筛选方面开展相关研究,表明该模型表现药物作用在实体瘤内真实情况方面具有明显优点,与活体研究相比,在干扰因素及成本方面更具优势,适用于早期药物筛选。江翰等^[25]通过建立胆囊癌 3D 细胞培养模型,研究胆囊癌细胞对新型纳米载药治疗方法的影响,表明与体内细胞发育结构相近,可以有利于对肿瘤细胞的局部黏附、侵袭和远端转移分子作用机制开展更好的研究。彭雪梅等^[26]通过在体外构建人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 3D 模型,表明其可以为 MDA-MB-231 乳腺癌细胞的恶变、远端转移研究提供可靠的模型并有利于抗癌药物作用机制的研究。

3.3 无动物源性培养基

细胞培养基提供细胞体外存活和扩增所必须的氨基酸、生长因子、维生素、糖、脂质、无机盐等各类营养物质。但传统的培养基多数采用胎牛血清、新生牛血清等制备,虽有价格便宜、供应充足的优点,但存在传播传染病的潜在风险,而且由于是异种蛋白,不能支持例如人 T 淋巴细胞等细胞的生长。而人 AB 血清虽然可以解决相关问题,但是来源困难供应受限,同时也有传播疾病的风险,因此以临床应用为目的细胞培养基中,应该尽量减少或避免使用来源于动物和人体的原料。另外,由于物源性培养基主要采用动物源性的蛋白胨,其中复合成分以及比例目前研究并不完全清楚,同时在每批次中也不固定,一定程度上导致检测结果可对比性较差,直接影响微生物检验和研究结果的准确性。

陈元芬等^[27]通过使用 Hy Pep5603、大豆胨按一定比例替代培养基中动物源性成分作为氮源培养百日咳杆菌,证实可以替代原有的动物源培养基。代帆等^[28]使用酵母浸出物作为氮源替代培养基中动物源性成分,提高了破伤风梭菌的产毒量。陈文敏等^[29]在 2 型肺炎球菌培养中采用无动物源性成分培养基,通过鉴别试验,发现制备的多糖具有抗原特异性,同时一定程度上提高了多糖收率。任春红等^[30]使用无动物源成份培养基 XF/SF-MSCM 在体外扩增脐带间充质干细胞,发现可以保持免疫学表型稳定、维持分化潜能,且供应量可以满足临床治疗及科研需要。

3.4 无血清动物细胞培养基

新生牛血清和胎牛血清中含有丰富的细胞生长必须营养成分,在细胞体外培养中具有极为重要的功能。尤其胎牛血清为了避免外界污染,是母牛在怀孕五至八月龄胎时,将胎牛取出并进行心脏穿刺取血制备。还因为胎牛还未接触外界,血清中所含的抗体、补体等对细胞有害的成分最少,与新生牛血清相比,胎牛血清品质最优,但存在产量低,成本高的问题。同时在胎牛血清生产和使用中还存在伦理学方面的问题。

无血清动物细胞培养基在解决相关问题方面体现出优越性。阿尔祖古丽·阿依丁等^[31]采用无血清悬浮培养建立 Marc-145 细胞系,分析无血清驯化传代对细胞特性的影响,表明无显著差异,可以为大规模生产疫苗提供基础。应丹妮等^[32]以 Natural killer-92 cells, NK-92 自然杀伤细胞系为研究对象,通过对扩增之后的 NK-92 细胞中 CD3-CD56+ 的细胞比例和杀伤活性进行分析,结果优于对照组,为免疫效应细胞无血清培养基的开发提供了技术支持。刘华敏等^[33]以 CHO-K1 细胞为研究对象,将自配无血清培养基 CHO-SFM 与 Sigma Ex-CELL CD CHO 和 Gibco CD CHO 培养基进行对比,表明了自配无血清培养基的优越性。缪亚娜等^[34]以无血清悬浮培养基 M1 为基础,对比酵母提取物(YE)、胰蛋白胨(Tyr)、大豆蛋白胨(Soy)对 CHO 细胞生长、周期、胞凋亡及 HSA/IL2 融合蛋白表达的影响,证实 YE 有利于细胞生长,提高细胞 G1 期比例,延长表达期时,从而有利于 HSA/IL2 表达。夏肖雪等^[35]通过比较毛囊干细胞生长培养基中使用 Knock Out 血清替代物(KSR)和胎牛血清的情况,证实毛囊干细胞在无血清培养基中可正常生长并表达 $\alpha 6$ -整合素、角蛋白 K14 和 P63,能够重建有毛皮肤。

3.5 动物源性抗体替代品

单/多克隆抗体相关产品由于其独有的特征,问世以来迅速应用于医学相关领域,据估计 2016 年全球抗体药物市场份额达到了千亿美元规模,其中大部分是动物源性单/多克隆抗体,作为检验医学实验室的诊断试剂,广泛应用于酶联免疫吸附试验、放射免疫分析、免疫组化和流式细胞仪等技术,并很大程度上促进了商品化试剂盒的发展,同时还作为一类重要药物应用于多种自身免疫疾病的临床治疗中。在这些抗体药物的制备中,动物的大量

使用必不可少,而且由于高质量的动物源性抗体生产周期过长,且批量生产时会出现很多问题,因此动物源性抗体替代品,即动物友好型“抗体”试剂得到一定的发展。动物友好型“抗体”试剂作为替代品是不经动物免疫而产生的抗体,通常是通过噬菌体、核糖体或酵母在体外表达来实现^[36]。2017 年, Tiede 等^[37]已开发出一项代替传统基于动物源性抗体检验生物分子和生命过程(如 Western Blot)的 Affimer 技术,该技术体现出比动物抗体更可靠的特性,并且作为人工合成品,对科研人员来说更环保,更科学合理。

3.6 低等实验动物替代

其他脊椎和无脊椎的低等动物,在某些情况下可以作为实验动物使用,如细菌、真菌、昆虫、软体动物或水生动物等,在实验中这些低等动物能够获得与高等哺乳类实验动物相近的实验结果^[38-39]。水生实验动物的研究和应用目前已较为成熟,其中斑马鱼、剑尾鱼等已经在发育生物学、行为学、人类疾病等方面得到广泛应用^[40]。从基因相似度上看,斑马鱼和人类的相似度达到 87%,因此使用斑马鱼开展药物的有效性和安全性试验,大多数的情况下得到的结果也与人体相符合^[41]。我国在这方面的研究基本与国际同步开始,美国 Oregon 大学 Streisinger G 于 20 世纪 80 年代即培育成功纯合子斑马鱼,而我国农业部也于 1987 年对水生实验动物开发应用进行科技立项,并于 2003 年完成剑尾鱼(RR-B)系的审定,成为我国第一个拥有自主知识产权的水生实验动物品系,已经在国内动物疾病模型、化妆品毒性检测、水环境监测、水产药物安全性评价等领域得到广泛应用^[42-44]。

果蝇在微量元素代谢的过程中表现出较高的保守型,同时果蝇体内存在很多与哺乳动物微量元素代谢相关的同源蛋白^[45],2006 年果蝇就作为动物模型被用于观察金属离子在体内的作用及生物毒性研究^[46]。果蝇还被广泛应用于神经退行性疾病的研究中,如经典的阿尔茨海默氏症模型,就是通过果蝇体内表达 AP42(amyloid P 42)多肽的途径来制备^[47]。

线虫基因与人的同源性可以达到 60% ~ 80%,是最简单的多细胞模型动物,由于其具有结构简单、遗传背景清晰、生命周期短等优势,已经广泛使用在发育生物学、遗传学、神经生物学、药物筛选等诸多领域。Leung 等^[48]研究认为,线虫在对新型化

工产品毒性高通量快速筛查,对人群开展健康安全评价等方面具有非常广泛的应用前景。Boyd 等^[49]使用线虫对敌草快和亚砷酸钠等化学品进行毒性研究,表明线虫模型在化学品的毒性初步筛查试验中具有高效、经济很多优势,符合替代原则。

我国低等实验动物的替代研究与国外同时期开展,但是受限于使用条件、便利程度、种质资源、供应来源等多方面原因,除斑马鱼和剑尾鱼外,大多数研究成果未能在实际中得到广泛应用。但国外,尤其是美国对于低等实验动物的替代使用更为成熟,具有明显优势,其中俄勒冈州大学斑马鱼国际资源中心以及德克萨斯州大学剑尾鱼遗传资源中心拥有斑马鱼 13161 个品系,剑尾鱼 23 种计 65 个品系。截至 2015 年,美国共有 6 个低等其他脊椎和无脊椎实验动物资源中心,果蝇资源中心(Bloomington Drosophila Stock Center)、果蝇基因组学资源中心(DGRC)、线虫遗传资源中心(Caenorhabditis Genetics Center, CGC)、国家海兔资源中心(National Resource for Aplysia)、国家嗜热四膜虫资源中心(National Resource for Cephalopods)、国家蟾蜍资源中心(National Xenopus Resource Center)^[4]。

4 真实毒性在动物实验中的差异

目前在很多药物研发中动物实验是重要环节,尽管新药物在动物模型上的应用都显示有效,但由于实验动物和人体的差异,导致进入临床实验的药物中有 95% 无法进入市场^[50]。毒性试验传统上包括动物实验和以胎牛血清为培养基的细胞培养实验,但有 META 分析研究表明,这些涉及动物实验最终获取的结果,与人类的生理学特性相关性并非密切相关,因此导致不少药物和化妆品在申请 FDA 批准的最后阶段失败^[51]。

软饮料、婴儿食品、油漆、化妆品和洗发水等产品中含有大量化学合成物质,如防腐剂、染料、表面活性剂或其他污染物等,这些物质的毒性主要使用兔子、大小鼠和狗等动物进行测试。但有基因组比较研究发现,人类和小鼠模型对不同病因引起的炎症应激反应相关性较差,其结果在与人类进行对照时,结果几乎是随机的^[52]。还有研究表明,通过对 76 项被高频次引用的动物实验方法进行人体对照试验,发现有 14 项(18%)自相矛盾,34 项(45%)未通过测试,只有 28 项(37%)可以被复制^[53]。

5 动物实验的缺陷

历史上基于动物实验得出的结论曾造成过严重后果。如著名的“反应停”事件,反应停即镇静剂沙利度胺,于 20 世纪 50 至 60 年代在全世界广泛使用,能够有效地阻止女性早期孕吐,但导致其中一些孕妇生下没有四肢的“海豹畸形婴儿”。而当时几乎应用所有的实验动物模型,如小鼠、大鼠、兔子、仓鼠、猫、狗、狢狢、豚鼠、猪、雪貂等对该药物进行了测试,结果却显示仅有暂时性致畸作用^[54]。

抗 CD28 人源化单克隆抗体(TGN1412)是研发用于类风湿性关节炎等自身免疫性疾病及白血病治疗的药物,应用于小鼠、大鼠、兔子和猕猴等非人类灵长类动物上均未观察到不良反应,但在 2006 年首次用于人体的 I 期临床试验中,6 名健康志愿者 12 ~ 16 h 内出现多器官功能衰竭和弥散性血管内凝血,24 h 内淋巴细胞和单核细胞耗竭的罕见严重不良反应^[55]。Bailey^[56]观察到大约有 90 种在动物实验中成功的艾滋病毒(Human Immunodeficiency Virus, HIV)疫苗应用于人类临床时失败。在帕金森疾病治疗中,一些在 NHPs 和大鼠模型中看起来很有希望的治疗方法,在人类临床观察中却得不到满意结果^[57]。

当然,实验动物学仍然是一门不断持续发展的科学,虽然存在以上种种问题,但动物实验在未来生命科学发展中的重要性不容忽视,如果片面否定动物实验的作用,对生命科学研究及生物医学产业的发展将是不可估量的损失。

6 结论

从人类文明的早期开始,动物就被用于驯化、饲养和研究。由于人类需要获得解剖学、生理学、生物学等方面基础知识,在这些方面动物做出过很多重要贡献。随着科学的发展,对实验动物的使用逐渐从初级的解剖学研究转向更高级别的研究,在现代生物学和医药学发展的基础上,得到了大量以动物实验为基础的研究结果^[58]。同时,批准任何药物的临床试验,都需要先以实验动物模型为基础,研究该种药物在动物体内的效应和代谢情况,这基本成为一种共识。

20 世纪是生命科学快速发展时代,但由于人们实验动物伦理道德意识上的欠缺,导致在实验的设计中,没有过多考虑替代方案来减少或改进实验动

物的使用,一定程度上存在着对实验动物过度使用的情况^[59]。世界范围内对科学研究中动物使用福利伦理的关注,使传统动物实验方法面临巨大挑战。目前已经有越来越多的实验及诊断技术被开发出来,用以填补动物体内实验和体外实验之间的空白,甚至不久后能够取代相当一部分动物实验。在微生物学和医学诊断领域中,已经有越来越多的动物源性产品被替代。重组技术在减少动物使用方面也起着愈加重要的作用。现在的药物设计和开发更多地借助生物信息学软件加以整理分析,用以减少风险,防止再次出现药物在动物试验中取得成功,却在临床试验中失败的情况发生。

现在科学界更加关注实验动物福利以及对实验动物的保护问题,且多以通过发布指南、准则甚至是全世界范围内的立法形式体现,因此基于替代(replacement)、减少(reduction)和优化(refinement)的“3R”原则推动实验动物替代技术进展,将会成为人类生命科学进步史上的一个重要标志。

参 考 文 献(References)

- [1] Taylor K, Gordon N, Langley G, et al. Estimates for worldwide laboratory animal use in 2005[J]. *Altern Lab Anim*, 2008, 36(3): 327-342.
- [2] 王金花. 德国实验动物的应用和管理情况[J]. *全球科技经济瞭望*, 2016, 31(12): 72-76.
Wang JH. Application and management of laboratory animals in Germany[J]. *Global Sci Technol Econ Outlook*, 2016, 31(12): 72-76
- [3] 艾瑞婷. 瑞典实验动物管理体系浅析[J]. *全球科技经济瞭望*, 2016, 31(11): 73-76.
Ai RT. Analysis of the Swedish laboratory animal management system[J]. *Global Sci Technol Econ Outlook*, 2016, 31(11): 73-76.
- [4] 孔琪, 夏霞宇, 赵永坤. 美国实验动物品种资源现状分析[J]. *中国实验动物学报*, 2015, 23(5): 539-542.
Kong Q, Xia XY, Zhao YK. Analysis of the current situation of experimental animal breed resources in the United States[J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2015, 23(5): 539-542.
- [5] Bundesinstitut fuer Risikobewertung. Fragen und Antworten zum Deutschen Zentrum zum Schutz von Versuchstieren (Bf3R) [EB/OL]. (2016-01-29) [2020-04-05]. http://www.bfr.bund.de/de/deutsches_zentrum_zum_schutz_von_versuchstieren.html.
- [6] Bundesinstitut für Risikobewertung, Deutsches Zentrum zum Schutz von Versuchstieren (Bf3R). Das Bf3R Aufgaben, Ziele und Kompetenzbereiche [EB/OL]. (2016-10-25) [2020-04-05]. http://www.bfr.bund.de/de/deutsches_zentrum_zum_schutz_von_versuchstieren.html.
- [7] Bundesministerium fuer Ernaehrung und Landwirtschaft. Tierschutzbericht der Bundesregierung 2015-Bericht über den Stand der Entwicklung des Tierschutzes[EB/OL]. (2016-10-25) [2020-04-05]. http://www.bmel.de/SharedDocs/Downloads/Broschueren/Tierschutzbericht-2015.pdf?_blobpublicationFile.
- [8] Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft. BMEL erhöht Dotierung des Tierschutzforschungspreises [EB/OL]. (2016-10-25) [2020-04-05]. http://www.bmel.de/DE/Tier/Tierschutz/_texte/TierschutzTieforschung.html?nn=310198&first=true&docId=377414
- [9] Deutsche Forschungsgemeinschaft. Tierversuch in der Forschung [EB/OL]. (2016-02-01) [2020-04-05]. http://www.dfg.de/dfg_magazin/forschungspolitik_standpunkte_perspektiven/tierexperimentelle_forschung/.
- [10] Forska Utan Djurförsök. Efforts in Sweden to replace animal experiments [EB/OL]. (2016-07-21) [2020-04-05]. <http://forskautandjurforsk.se/swedish-fund-for-research-without-animal-experiments/3rs-in-sweden/>.
- [11] Forska Utan Djurförsök. Swedish Fund for Research Without Animal Experiments[EB/OL].(2016-05-07) [2020-04-05]. <http://forskautandjurforsk.se/swedish-fund-for-research-without-animal-experiments/>.
- [12] 姜晨晨, 彭宗根. 丙型肝炎病毒感染实验动物模型的研究进展[J]. *中国实验动物学报*, 2014, 22(5): 87-94.
Jiang CC, Peng ZG. Research progress of experimental animal models of hepatitis C virus infection [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2014, 22(5): 87-94.
- [13] Washio T, Okada J, Takahashi A, et al. Multiscale heart simulation with cooperative stochastic cross-bridge dynamics and cellular structures[J]. *Multiscale Model Simul*, 2013, 11(4): 965-999.
- [14] Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, et al. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2001, 46(1-3): 3-26.
- [15] Raunio H. In silico toxicology-non-testing methods [J]. *Front Pharmacol*, 2011, 2: 33.
- [16] Adler S, Basketter D, Creton S, et al. Alternative (non-animal) methods for cosmetics testing: current status and future prospects -2010[J]. *Arch Toxicol*, 2011, 85(5): 367-485.
- [17] Ekins S, Mestres J, Testa B. In silico pharmacology for drug discovery: methods for virtual ligand screening and profiling[J]. *Br J Pharmacol*, 2007, 152(1): 9-20.
- [18] 黎永良, 杜志云, 郑杰. 基于分子对接虚拟筛选 MEK1 中药抑制活性成分 [J]. *中国中药杂志*, 2017, 42(10): 1951-1956.
Li YL, Du ZY, Zheng J. Virtual screening of MEK1 traditional Chinese medicine inhibitory active ingredients based on molecular docking[J]. *Chin J Tradit Chin Med*, 2017, 42(10): 1951-1956.
- [19] 周月, 张冰, 林志健, 等. 基于分子对接技术虚拟筛选菊苣与肠道 CNT2 结合的化学成分研究 [J]. *中国中药杂志*,

- 2016, 41(21): 3962-3967.
- Zhou Y, Zhang B, Lin ZJ, et al. Study on the virtual screening of the chemical composition of chicory combined with intestinal CNT2 based on molecular docking technology [J]. *Chin J Chin Mater Med*, 2016, 41(21): 3962-3967.
- [20] Kwong PD, Chuang GY, Dekosky BJ, et al. Antibodyomics: bioinformatics technologies for understanding B-cell immunity to HIV-1 [J]. *Immunol Rev*, 2017, 275(1): 108-128.
- [21] 孟康, 李全. 心血管影像教学在心血管介入医师培训中的应用体会 [J]. *继续医学教育*, 2015, 29(3): 8-9.
- Meng K, Li Q. Application experience of cardiovascular imaging teaching in training of cardiovascular interventional physicians [J]. *Contin Med Educ*, 2015, 29(3): 8-9.
- [22] 张晓云, 徐力, 魏芳婧, 等. 西部地区医学院校心血管内科 CBL 及计算机模拟教学方法运用的探讨 [J]. *内蒙古医科大学学报*, 2014, 36(S2): 365-367.
- Zhang XY, Xu L, Wei FJ, et al. Discussion on the application of CBL and computer simulation teaching methods in cardiovascular medicine in western medical colleges [J]. *J Inner Mongolia Med Univ*, 2014, 36(S2): 365-367.
- [23] Azer SA, Azer S. 3D anatomy models and impact on learning: a review of the quality of the literature [J]. *Health Prof Educ*, 2016, 2(2): 80-98.
- [24] 鲁萌, 周芳, 刘嘉莉, 等. 三维细胞模型在抗肿瘤药物早期药代动力学筛选中的应用进展 [J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2017, 22(3): 342-349.
- Lu M, Zhou F, Liu JL, et al. Application progress of three-dimensional cell model in early pharmacokinetic screening of antitumor drugs [J]. *Chin J Clin Pharmacol Therapeut*, 2017, 22(3): 342-349.
- [25] 江翰, 王子豪, 李永盛, 等. 基于 3D 细胞培养模型的新型纳米载药系统抗胆囊癌活性的效果及作用机制 [J]. *临床肝胆病杂志*, 2014, 30(3): 264-268.
- Jiang H, Wang ZH, Li YS, et al. Effect and mechanism of anti-gallbladder cancer activity of a new type of nano drug-loading system based on 3D cell culture model [J]. *J Clin Hepatol*, 2014, 30(3): 264-268.
- [26] 彭雪梅, 刘永文, 张海燕. 人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 三维培养模型的构建 [J]. *山西大同大学学报(自然科学版)*, 2018, 34(4): 34-38.
- Peng XM, Liu YW, Zhang HY. Construction of three-dimensional culture model of human breast cancer cell MDA-MB-231 [J]. *J Shanxi Datong Univ (Nat Sci)*, 2018, 34(4): 34-38.
- [27] 陈元芬, 马礼耕, 吴强, 等. 百日咳杆菌无动物源培养基的筛选及其对百日咳毒素和丝状血凝素产量的影响 [J]. *中国生物制品学杂志*, 2018, 31(2): 129-133.
- Chen YF, Ma LG, Wu Q, et al. Screening of animal-free culture medium for Pertussis Bacillus and its effect on the production of pertussis toxin and filamentous hemagglutinin [J]. *Chin J Biol Products*, 2018, 31(2): 129-133.
- [28] 代帆, 史建明, 朱涛. 破伤风梭菌无动物源培养基发酵及纯化工工艺的探索 [J]. *中国新药杂志*, 2016, 25(2): 151-156.
- Dai F, Shi JM, Zhu T. Exploration of fermentation and purification process of animal-free medium of Clostridium tetanus [J]. *Chin J New Drugs*, 2016, 25(2): 151-156.
- [29] 陈文敏, 尚玥, 谯守应, 等. 2 型肺炎球菌无动物源性培养基制备精糖检测及比较 [J]. *生物技术世界*, 2015, 9: 103.
- Chen WM, Shang Y, Qiao SY, et al. Detection and comparison of refined sugar prepared from animal-free medium for pneumococcal type 2 [J]. *World Biotechnol*, 2015, 9: 103.
- [30] 任春红, 张昕. 无动物源成分培养基用于人脐带间充质干细胞培养的研究 [J]. *延安大学学报(医学科学版)*, 2015, 13(1): 1-4.
- Ren CH, Zhang X. Studies on the culture medium without animal origin for human umbilical cord mesenchymal stem cell culture [J]. *J Yanan Univ (Med Sci)*, 2015, 13(1): 1-4.
- [31] 阿尔祖古丽·阿依丁, 卢美琳, 李自良, 等. Marc-145 细胞低血清适应培养传代稳定性和无血清驯化研究 [J]. *浙江农业学报*, 2020, 32(3): 415-420.
- Al Zuguli Aydin, Lu ML, Li ZL, et al. Study on the stability of Marc-145 cells with low serum adaptability to subculture and serum-free domestication [J]. *Acta Agr Zhejiangensis*, 2020, 32(3): 415-420.
- [32] 应丹妮, 陈焕芸, 付岩, 等. 谷氨酰胺和丙酮酸钠可促进 NK-92 细胞体外扩增 [J/OL]. *高校化学工程学报*: 1-9 [2020-04-03]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/33.1141.TQ.20200327.1845.002.html>.
- Ying DN, Chen HY, Fu Y, et al. Glutamine and sodium pyruvate can promote the expansion of NK-92 cells in vitro [J/OL]. *Journal of Chemical Engineering of Universities*: 1-9 [2020-04-03]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/33.1141.TQ.20200327.1845.002.html>.
- [33] 刘华敏, 漆彦斌, 雷志斌. CHO-K1 细胞的悬浮驯化及无血清培养 [J]. *顺德职业技术学院学报*, 2019, 17(4): 1-3, 8.
- Liu HM, Qi YB, Lei ZB. Suspension and domestication of CHO-K1 cells and serum-free culture [J]. *J Shunde Vocat Tech Coll*, 2019, 17(4): 1-3, 8.
- [34] 缪亚娜, 熊文典, 万爱妮, 等. 表达 HSA/IL2 的重组 CHO 细胞的无血清培养基优化研究 [J]. *食品与生物技术学报*, 2019, 38(6): 95-101.
- Miao YN, Xiong WD, Wan AN, et al. Optimization of serum-free medium for recombinant CHO cells expressing HSA / IL2 [J]. *J Food Biotechnol*, 2019, 38(6): 95-101.
- [35] 夏肖雪, 吕正梅, 张守兵. 大鼠毛囊干细胞体外无血清培养体系的建立 [J]. *安徽医科大学学报*, 2018, 53(10): 1631-1635.
- Xia XX, Lv ZM, Zhang SB. Establishment of an in vitro serum-free culture system for rat hair follicle stem cells [J]. *J Anhui Med Univ*, 2018, 53(10): 1631-1635.
- [36] Stoevesandt O, Taussig MJ. Phospho-specific antibodies by design [J]. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(10): 889-891.
- [37] Tiede C, Bedford R, Heseltine SJ, et al. Affimer proteins are versatile and renewable affinity reagents [J]. *Elife*, 2017,

- 6; e24903.
- [38] 管博文, 李程程, 孟爱民. 实验动物替代研究进展[J]. 生命科学, 2017, 29(6): 546-551.
Guan BW, Li CC, Meng AM. Advances in laboratory animal substitution research[J]. Life Sci, 2017, 29(6): 546-551.
- [39] 李长龙, 尚书江, 朱德生. 科技进步与实验动物福利[J]. 科学导报, 2017, 35(24): 32-39.
Li CL, Shang SJ, Zhu DS. Science and technology progress and experimental animal welfare[J]. Sci Her, 2017, 35(24): 32-39.
- [40] 汪玲, 陈朝红. 斑马鱼: 人类肾脏疾病治疗药物筛选的新工具[J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(12): 113-118.
Wang L, Chen CH. Zebrafish: a new tool for screening drug treatment for human kidney disease[J]. Chin J Comp Med, 2018, 28(12): 113-118.
- [41] Joyce PI, Fratta P, Fisher EM, Acevedo-Arozena A. SOD1 and TDP-43 animal models of amyotrophic lateral sclerosis: recent advances in understanding disease toward the development of clinical treatments[J]. Mamm Genome, 2011, 22(7-8): 420-448.
- [42] 黄志斌, 吴淑勤, 石存斌, 等. 剑尾鱼的若干生物学特性研究[J]. 中国水产科学, 2000, 7(3): 107-109.
Huang ZB, Wu SQ, Shi CB, et al. Study on some biological characteristics of swordtail fish[J]. Chin Fisheries Sci, 2000, 7(3): 107-109.
- [43] 范灿鹏, 王奇, 刘昕宇, 等. 四溴联苯醚对剑尾鱼毒性及其抗氧化系统的影响[J]. 环境科学学报, 2011, 31(3): 642-648.
Fan CP, Wang Q, Liu XP, et al. Toxicity and effect of tetrabromodiphenyl ether upon the antioxidant defense system of swordtail fish (Xiphophorus helleri) [J]. Acta Sci Circumstantiae, 2011, 31(3): 642-648.
- [44] 全迎春, 刘宇飞, 白俊杰. 水生实验动物剑尾鱼的 DNA 指纹图谱构建[J]. 中国比较医学杂志, 2011, 21(6): 29-33.
Quan YC, Liu YF, Bai JJ. Construction of DNA fingerprint of aquatic experimental animal swordtail fish[J]. Chin J Comp Med, 2011, 21(6): 29-33.
- [45] 徐荣刚, 王霞, 王芳, 等. 果蝇研究技术与资源的开发[J]. 中国实验动物学报, 2018, 26(4): 489-492.
Xu RG, Wang X, Wang F, et al. Development of fruit fly research technology and resources [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2018, 26(4): 489-492.
- [46] Wang X, Zhou B. Dietary zinc absorption: A play of Zips and ZnTs in the gut[J]. IUBMB Life, 2010, 62(3): 176-182.
- [47] Iijima K, Liu HP, Chiang AS, et al. Dissecting the pathological effects of human Abeta40 and Abeta42 in Drosophila: a potential model for Alzheimer's disease[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004, 101(17): 6623-6628.
- [48] Leung MC, Williams PL, Benedetto A, et al. Caenorhabditis elegans: an emerging model in biomedical and environmental toxicology[J]. Toxicol Sci, 2008, 106(1): 17-19.
- [49] Boyd WA, McBride SJ, Rice JR, et al. A high-throughput method for assessing chemical toxicity using a Caenorhabditis elegans reproduction assay[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2010, 245(2): 153-159.
- [50] Thomas H. Food for thought look back in anger-what clinical studies tell us about preclinical work [J]. ALTEX, 2013, 30(3): 275-291.
- [51] Astashkina A, Mann B, Grainger DW. A critical evaluation of in vitro cell culture models for high-throughput drug screening and toxicity[J]. Pharmacol Ther, 2012, 134(1): 82-106.
- [52] Seok J, Warren HS, Cuenca AG, et al. Genomic responses in mouse models poorly mimic human inflammatory diseases [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013, 110(9): 3507-3512.
- [53] Hackam DG, Redelmeier DA. Translation of research evidence from animals to humans[J]. JAMA, 2006, 296(14): 1727.
- [54] Schardein JL: Drugs as Teratogens. CRC Press. Boca Raton. Fla, 1976.
- [55] 王小艳. 新药 TGN1412 临床研究中出现极为罕见的不良反应[J]. 中国处方药, 2006, 4: 70-71.
Wang XY. Extremely rare adverse reactions occurred in the clinical study of the new drug TGN1412 [J]. Chin Prescription Drugs, 2006, 4: 70-71.
- [56] Bailey J. An assessment of the role of chimpanzees in AIDS vaccine research [J]. Altern Lab Anim, 2008, 36(4): 381-428.
- [57] Lane E, Dunnett S. Animal models of Parkinson's disease and L-dopa induced dyskinesia: How close are we to the clinic [J]? Psychopharmacology, 2008, 199(3): 303-312.
- [58] 孙德明, 李蔚鸥, 王天奇, 等. 实验动物福利伦理审查的标准化与我国新国标解读 [J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(10): 133-137.
Sun DM, Li WO, Wang TQ, et al. Standardization of the ethical review of laboratory animal welfare and interpretation of China's new national standard [J]. Chin J Comp Med, 2018, 28(10): 133-137.
- [59] 高建峰, 汤宏斌, 杨四军, 等. 医学生实验动物福利与伦理实践教学思考 [J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(11): 115-118.
Gao JF, Tang HB, Yang SJ, et al. Reflections on the teaching of experimental animal welfare and ethics practice for medical students [J]. Chin J Comp Med, 2018, 28(11): 115-118.