



[专家简介] 陈华,原解放军总医院医学创新研究部某中心主任,博士,研究员。兼任国家实验动物专家委员会委员、中国实验动物学会常务理事、北京实验动物学会副理事长。《实验动物科学》杂志副主编。研究方向为小型猪医学研究模型的建立与应用。获国家科技攻关计划(十五)、国家科技支撑计划(2010)和国家自然科学基金(4项)资助,发表论文50余篇,曾获中国实验动物学会科技成果一等奖(2012)。

小型猪糖尿病模型的建立、应用及关键技术问题:实践经验及文献回顾

陈 华

解放军总医院医学创新研究部,北京 100853

摘要:糖尿病在全球范围内患病率逐年升高,糖尿病并发症已经成为终末期眼病和终末期肾病的主要病因。因此,需要不断深入研究糖尿病和相关并发症的发病机制,开发新的诊断和治疗策略。动物模型是实验研究必不可少的手段,小型猪糖尿病模型近年来受到重视,被认为是啮齿类动物模型研究成果向临床转化的桥梁。结合本实验室的研究经验,本文综述了小型猪糖尿病模型的建立与应用研究进展,包括小型猪在糖尿病研究中的优势、小型猪1型糖尿病模型、小型猪2型糖尿病模型、遗传修饰小型猪糖尿病模型、糖尿病并发症研究和需要关注的技术问题,旨在帮助糖尿病研究者快速了解相关内容,并提供有价值的经验借鉴。

关键词:小型猪;糖尿病;动物模型;并发症;遗传修饰

中图分类号:R-332;Q95-3

文献标志码:A

文章编号:2095-5227(2025)01-0028-09

DOI: 10.12435/j.issn.2095-5227.24092301

引用本文:陈华.小型猪糖尿病模型的建立、应用及关键技术问题:实践经验及文献回顾[J].解放军医学院学报,2025,46(1):28-36.

Establishment, applications, and key technical challenges of diabetic models in miniature pigs: practical experience and literature review

CHEN Hua

Medical Innovation Research Department of PLA General Hospital, Beijing 100853, China

Corresponding author: CHEN Hua. Email: chenhua301paper@163.com

Abstract: The prevalence of diabetes mellitus is increasing worldwide, and diabetic complications have become the main causes of end-stage eye disease and end-stage renal disease. Therefore, there is a need for continuous in-depth research on the pathogenesis of diabetes and related complications and the development of new diagnostic and therapeutic strategies. Animal model is an indispensable means of experimental research. In recent years, diabetic miniature pig model has received extensive attention and is considered as a bridge for the translation of rodent model research results to clinical practice. Based on the research experience of our laboratory, this paper reviews the research advances in the establishment and application of diabetic models in miniature pigs, including: the advantages of miniature pig in diabetes research, type 1 diabetic models of miniature pig, type 2 diabetic models of miniature pig, diabetic models of genetically modified miniature pig, diabetic complications research in miniature pig and technical issues need attentions, so as to assist diabetes researchers to quickly understand the relevant content and provide valuable experience.

Keywords: minipig; diabetes mellitus; animal model; complications; genetic modification

Cited as: Chen H. Establishment, applications, and key technical challenges of diabetic models in miniature pigs: practical experience and literature review[J]. Acad J Chin PLA Med Sch, 2025, 46(1): 28-36.

糖尿病在全球范围内患病率逐年升高。2021

年,国际糖尿病联盟估计,全球20~79岁年龄者中有5.37亿糖尿病病例,推测到2045年这一数字将达到7.83亿^[1]。糖尿病是一种异质性疾病,美国糖尿病协会将糖尿病分为4种类型:(1)1型糖尿病

收稿日期:2024-09-23

基金项目:国家自然科学基金项目(32370568)

通信作者:陈华,博士,研究员。Email: chenhua301paper@163.com

(type 1 diabetes, T1D), 特征为产生胰岛素的 β 细胞由于自身免疫导致不可逆的破坏; (2) 2型糖尿病(type 2 diabetes, T2D), 特征为胰岛素抵抗和胰岛素相对缺乏, 患者通常伴有肥胖; (3) 妊娠糖尿病; (4) 其他特定病因的糖尿病。其中, 1型糖尿病占糖尿病总人数的5%~10%, 2型糖尿病占90%~95%, 其他类型占比很少。

糖尿病现有治疗措施不能完全阻止其病情进展, 而且存在高风险的继发性改变, 如糖尿病视网膜病、肾病、神经病和心血管疾病。因此, 需要不断深入研究糖尿病和相关并发症的发病机制, 开发新的诊断和治疗策略。动物模型是实验研究必不可少的手段, 国内外已经建立了大量用于糖尿病研究的动物模型, 应用最广泛的是啮齿类动物模型, 此外, 猫、犬、猪和非人灵长类动物糖尿病模型也有一定应用^[2-3]。旧大陆猴被认为是糖尿病研究的理想模型动物, 但资源有限以及费用和伦理问题限制了其应用。小型猪糖尿病模型近年来受到重视, 被认为是啮齿类动物模型研究成果向临床转化的桥梁。本实验室从“十五”期间开始致力于小型猪医学研究模型的建立与应用研究, 本文结合我们的研究经验综述了小型猪在糖尿病研究领域的应用进展, 旨在便于研究者快速了解相关内容, 并提供有价值的经验借鉴。

1 小型猪在糖尿病研究中的优势

Renner等^[4]比较了小鼠、大鼠、兔、猪和非人灵长类动物在糖尿病研究中的应用特点, 认为猪在解剖、生理和体形大小等方面更接近人类, 与灵长类动物相比有着更好的伦理接受度, 是糖尿病研究的良好模型。胰岛是调控血糖稳态的关键器官, Tritschler等^[5]综述了近期在胰岛发育、结构和功能方面的单细胞转录组学研究进展, 发现啮齿类动物与人类表现出较多的差异, 而猪胰岛则更接近人类。Hoang等^[6]分析了胰岛大小分布、解剖结构和血管形成、胰岛 β 细胞组成的比例, 以及空间立体排布和内分泌细胞相互作用类型, 发现小鼠、猪和人类胰岛结构在进化上是相对保守的, 猪胰岛更接近人类。Kim等^[7]观察了从胚胎期到新生猪胰腺发育情况, 并对分离的 α 、 β 和 δ 细胞进行了转录组学分析, 发现猪与人类 β 细胞和 α 细胞共有分子特性和发育特点, 而在相应的小鼠细胞中却未观察到。此外, 与人类一样, 猪是杂食动物, 胃肠道结构和功能与人类相似, 其心血管系

统^[8]、肾^[9]、眼睛^[10]、内耳^[11]和皮肤^[12]等与人类一致性很高, 心脏和肾的人类异种移植研究已取得显著进展。猪的全基因组测序已经完成, 不同品种猪的遗传资料不断积累和丰富, 猪的基因编辑等遗传修饰技术已十分成熟^[4]。这些都为糖尿病领域的基础研究提供了便利条件和丰富的背景资料。

为了辅助遗传选育研究, 本实验室利用糖尿病易感小型猪遗传选育研究的材料, 进行了巴马小型猪2型糖尿病易感单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)筛选, 获得了位于16个基因的135个SNP位点, 为糖尿病的遗传易感性研究提供了基础资料^[13]; 同时我们利用16S rRNA基因测序技术, 获得了糖尿病小型猪肠道微生物组学资料, 探讨了高脂饲料、肠道微生物和糖尿病的关系, 为小型猪糖尿病模型在肠道微生物研究中的应用提供了新的视野^[14]。Zhang等^[15]应用小型猪糖尿病模型, 评价了皮下注射葡萄糖反应性胰岛素复合物, 获得了长效的血糖控制效果; Yu等^[16]应用小型猪糖尿病模型, 评价了葡萄糖反应性胰岛素微针贴片药物递送系统, 为这些产品的临床转化提供了重要支持。

2 小型猪1型糖尿病模型

2.1 胰腺切除建立的1型糖尿病模型

胰腺切除用于模拟胰岛素绝对缺乏效果可靠, 是胰腺或胰岛移植研究的理想模型。缺点是胰腺切除手术需要专业的外科训练, 动物创伤较大, 术后需要外源性胰酶补充等。Ludwig等^[17]描述了胰腺切除的手术方案、术中与术后的药物处理和注意事项。Wilson等^[18]和Strauss等^[19]分别对比了胰腺切除法与 β 细胞毒性试剂诱导法的优缺点。

2.2 化学试剂诱导的1型糖尿病模型

有两种特异性的 β 细胞毒性化合物用于糖尿病动物模型的建立, 分别为链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)和四氧嘧啶。由于STZ或四氧嘧啶与葡萄糖结构相似, 与葡萄糖竞争相同的受体进入细胞, 因此空腹动物更易于诱发糖尿病。四氧嘧啶的致糖尿病剂量很窄, 甚至轻微的过量即可引起广泛的毒性, 因此目前糖尿病动物模型研究主要应用STZ^[20]。STZ的作用与低结合力的葡萄糖转运子GLUT2表达相关。 β 细胞毒性在不同种类动物之间的变异, 也可能与动物种类之间GLUT2的表达水平差异有关^[21]。

应用特异性 β 细胞毒性的化学试剂建立糖尿病

模型已经广泛应用于啮齿类动物,应用于小型猪的研究报道最早见于1979年^[22]。早期的研究主要探讨应用化学诱导剂的剂量、高血糖持续时间和对动物健康的影响。应用的实验猪以幼年或青年农业杂交猪为主。虽然也有应用2次或多次化学诱导剂的探讨^[22-23],也有联合用药的研究^[24],但现在主要采用单次静脉注射剂量为150 mg/kg STZ的方法^[17,21],猪可耐受这个剂量的STZ,没有明显的谷草转氨酶、谷丙转氨酶或肌酐(creatinine, CRE)的升高,动物可全部存活。本实验室应用青年巴马小型猪静脉注射120 mg/kg的STZ,动物获得了持续2周左右的一过性高血糖,血糖值在6.6~21.3 mmol/L范围波动,1个月后动物的血糖基本恢复正常。应用150 mg/kg STZ的6只猪中,只有3只猪表现为持续1个月以上的高血糖,血糖值在6.1~35 mmol/L范围波动,2只猪表现为一过性高血糖,高血糖持续2周左右(5.3~22.2 mmol/L),还有1只猪血糖一直未能升高^[25]。总结本实验室的多次实验结果,单次静脉注射150 mg/kg的STZ,获得超过1个月的持续高血糖的动物比例为60%左右。通过对症状不明显的小型猪追加STZ的方法或单次增加STZ的剂量会增加肝肾毒性,进而影响糖尿病动物模型的应用。

150 mg/kg的STZ处理并不能导致猪胰岛 β 细胞的全部损毁,应用STZ的4周后已发现有部分动物血糖得以恢复,形态学上可观察到明显的胰岛 β 细胞再生^[21,25]。此外,最近有研究发现,STZ可引起淋巴细胞减少和T调节细胞相对增多,这可能会干扰移植免疫耐受研究的解释^[26]。Dufrane等^[21]比较了大鼠、非人灵长类动物和猪的正常胰岛与应用STZ后的变化,发现猪表现未成熟细胞特征的 β 细胞簇的面积占胰腺中 β 细胞总数的7.3%,显著高于大鼠(1.7%)和猴(2.7%)。Tuch等^[27]报道STZ不能破坏未成熟的 β 细胞。应用猪胰岛细胞的研究表明,胚胎胰岛细胞相比成熟胰岛细胞对STZ更有抵抗力^[28]。这也可能解释了猪胰岛对STZ的毒性作用相对不敏感,且存在再生能力的现象。

3 小型猪2型糖尿病模型

3.1 单纯高脂饲料诱发糖尿病

虽然猪在代谢方面与人类存在很多的相似性,但即使存在致糖尿病的环境因素,如高能量膳食和较少运动等,猪也很少自发糖尿病。按照Gerstein和Waltman^[29]的解释,原因可能在于猪在

进化中,在夏季聚集和储存能量,从而用于度过食物获得困难的冬季。猪的这种合成代谢-脂肪储集能力在家畜化的过程中被放大,导致猪具有大容量的胰岛 β 细胞群,从而对致糖尿病的环境因素有抵抗力。通过高脂饮食诱发猪的糖尿病需要很长时间,而且无法获得十分显著的高血糖症状^[30-33]。本实验室应用高脂饮食连续饲喂五指山小型猪、巴马小型猪和农大小型猪8个月,以农大小型猪(n=4)饲喂常规饲料为对照组,实验期间空腹血糖平均值在3.31~4.36 mmol/L范围波动。巴马小型猪(n=6)和五指山小型猪(n=6)的空腹血糖在高脂饲喂的第7个月开始与对照组有显著差异,平均值分别为5.65 mmol/L和5.57 mmol/L,至第8个月,分别为5.16 mmol/L和6.28 mmol/L,并出现糖耐量轻度受损,但没有血糖值升高显著的个体。应用高脂饲料的农大小型猪(n=6)仅表现出肥胖症状,但空腹血糖、空腹胰岛素和糖耐量指标与对照组无显著差异^[33]。

高能量饮食诱导的2型糖尿病猪模型在疾病发生发展方面近似人类临床的真实情况,然而对于普通小型猪需要太长的时间,症状也不够显著。不同品种、不同动物个体存在对糖尿病的易感性差异,因此有学者探讨通过遗传选育的方法获得糖尿病易感猪,从而缩短建模时间。美国学者曾经利用静脉糖耐量实验(intravenous glucose tolerance test, IVGTT),根据糖耐量测试结果对尤卡坦小型猪进行了4~5代的选育,结果在繁殖到第7世代时发现选育的性状已经丧失^[34]。本实验室利用1只孕期高血糖的巴马小型猪,通过高脂饲料诱导实验对其后代进行遗传选育,经过3个世代的选育,易感组的小型猪糖尿病模型建立时间显著缩短^[35],遗憾的是,由于出现繁殖困难而未再继续选育研究。

此外,美国的奥斯萨巴小型猪和西班牙的伊比利亚猪被认为是天然具有2型糖尿病易感性的猪品种。然而,给奥斯萨巴猪饲喂10周的高脂饲料,出现了肥胖、血脂紊乱、胰岛素抵抗、高血压等代谢综合征表现,血糖平均值却只有约110 mg/dL(6.1 mmol/L,瘦型)和140 mg/dL(7.8 mmol/L,肥胖型)^[36-37]。伊比利亚猪高脂饲料诱导3个月,同样出现肥胖、血脂紊乱、胰岛素抵抗和血压升高等代谢综合征的表现,但空腹血糖尚未显著升高^[32]。

3.2 高脂饲料结合STZ诱发的糖尿病

由于单纯高脂饲料诱导难以获得明显的糖尿

病表型, 2000年Reed等^[38]率先创立了高脂饮食诱导动物发生胰岛素抵抗, 再以小剂量STZ破坏胰岛β细胞建立大鼠2型糖尿病模型的方法。此后, Srinivasan等^[39]进一步完善了这一模型, 确立了高脂饲喂2周, 再应用35 mg/kg的STZ建立大鼠2型糖尿病模型的方法, 并成为现在最常用的2型糖尿病模型。

不少学者参照这种方法建立小型猪2型糖尿病模型, 高脂饲喂时间为4周、3个月、6个月、7个月或12个月, 应用的STZ剂量为 40×2 mg/kg、 60×2 mg/kg、 80×2 mg/kg、 90×2 mg/kg、 100×2 mg/kg, 实验结果均报道获得了显著高血糖症状^[40-44]。本实验室以高脂饲料饲喂小型猪3个月后, 静脉注射90 mg/kg的STZ, 成功地建立了小型猪2型糖尿病模型。巴马小型猪高脂饲料饲喂3个月, 动物体质量显著高于对照组, 表现肥胖的趋势; 糖耐量轻度受损; 血脂紊乱(TC、HDL-C和LDL-C值升高), 表明动物存在轻度的胰岛素抵抗。应用STZ后, 10只动物中的8只空腹血糖升高, 维持在10.3 ~ 29.4 mmol/L, 达到对照组(2.0 ~ 5.7 mmol/L)的5倍左右, 并持续到实验结束(6个月)。高血糖期间动物糖耐量受损, 胰岛素分泌不足。这种方法建立的糖尿病模型血糖升高显著, 持续时间长, 模型成功率高(8/10)^[44]。

4 遗传修饰小型猪糖尿病模型

近年来, 随着猪全基因组测序工作的完成, 研究者发现小型猪不仅在解剖结构和生理代谢方面接近于人, 在基因组构成和遗传模式方面也与人类十分相近^[45-46]。由于在农业和医学领域有着独特而重要的地位, 猪基因组数据积累已有很大突破。2012年11月, 《Nature》发表了国际猪基因组测序联盟完成的猪基因组分析。此后, 陆续有数百只猪的基因组被重测序, 用于研究基因组变异、进化演进和选择培育^[47]。目前动物基因组注释资料也在快速积累中, 为利用转基因和基因敲除技术建立糖尿病研究的小型猪模型提供了重要基础^[48]。

第1只转基因猪产生于近40年前, Hammer等^[49]通过显微注射技术将目的DNA注入猪受精卵实现了基因转移。近年来, 猪遗传工程的工具箱持续扩展, 重要技术突破包括猪体细胞核移植技术和CRSPR/Cas9基因编辑技术, 使糖尿病研究相关的遗传修饰小型猪模型快速增长。Zettler等^[50]报道了该研究团队10年中的研究成果, 共计总结了7

种糖尿病研究相关的遗传修饰猪模型, Ludwig等^[17]和Renner等^[9]分别综述了糖尿病研究相关遗传修饰猪模型的进展, 用遗传工程技术产生的定制猪模型已经超过了20种。其中, 胰岛素基因突变转基因猪(INS^{C94Y}转基因猪和INS^{C93S}转基因猪), 在出生第1周即表现高血糖症状, 至4.5月龄, 其胰岛β细胞相比同窝野生型猪减少了70%; GIPR^{dn}转基因猪表现出一些类似于糖尿病前期的特征, 包括肠降血糖素的效应降低、糖耐量受损、胰岛素分泌降低和β细胞渐进性减少; 生长激素受体基因敲除猪, 出现在了尿素循环、三羧酸循环中氨基酸降解酶丰度增加, 而β氧化的线粒体脂肪酸输出减少等一系列代谢改变; 在胰岛素启动子控制下的增强绿色荧光蛋白转基因猪, 可用于猪胰岛发育研究等。这些遗传修饰小型猪模型是啮齿类动物模型最好的补充和扩展, 是深入开展糖尿病发病机制研究和疾病遗传学分析的理想模型。但占糖尿病病例绝大多数的2型糖尿病的遗传机制远未清楚, 仍缺乏理想的2型糖尿病模型。

2型糖尿病是由基因和环境共同作用所引起的多基因遗传病。遗传因素的作用首先体现在2型糖尿病具有家族聚集性^[51], 针对双胞胎的研究表明, 2型糖尿病的病因中遗传因素的作用可达26% ~ 73%^[52-53]。随着人类基因组计划的完成, 通过大规模的患者与健康人群全基因组SNP多态性对比分析, 成为发现遗传变异与疾病相关性的主要手段。最早的2型糖尿病全基因组相关性(genome-wide association studies, GWAS)研究起始于2007年, 2018—2023年通过GWAS研究已经发现了约700个2型糖尿病的风险遗传变异位点, 这些研究的人群样本规模达到了20万 ~ 100万。遗憾的是, GWAS研究发现的2型糖尿病易感性相关基因均为微效基因, 研究成果的临床转化, 无论新药发现还是患病风险预测方面, 一直进展缓慢^[53]。因此, 多基因联合转基因猪模型可能是探讨微效基因联合作用的有效手段, 也可能建立有用的2型糖尿病模型。我国学者杨述林等长期致力于探讨2型糖尿病多基因转基因猪模型的建立研究, 目前已经建立了多基因转基因猪, 模型性状的评估和验证工作正在进行^[54-56]。

5 糖尿病并发症研究

糖尿病并发症是糖尿病患者致残、致死和医疗费用增加的主要原因, 并发症的发生与患者年

龄、性别、吸烟、收缩压、血清糖化血红蛋白(glycosylated hemoglobin, HbA1c)浓度等高度相关,而血糖控制情况和病程长短被认为是关键因素^[57]。糖尿病并发症包括糖尿病肾病、眼病、外周神经病和大血管疾病等,小型猪模型在微血管并发症方面形成了一定的资料积累。

5.1 糖尿病视网膜病

视网膜病是糖尿病的主要并发症之一,而且是世界范围内成年人致盲性眼病的主要因素^[58]。临床上,视网膜微动脉瘤、出血、棉絮斑和血管新生是视网膜微血管紊乱的经典标志。在这些临床表现出现之前,毛细血管基底膜增厚、周皮细胞丢失或鬼影残留、无细胞毛细血管结构和内皮细胞增生等病理组织学变化更早出现^[59]。

猪的眼睛与人眼在大小和结构上高度相似^[10],视网膜的基本结构和血管分布也十分接近^[60]。本实验室观察了小型猪糖尿病1个月、6个月和28个月3个时间点眼睛的病理变化。在小型猪糖尿病病程持续1个月时,视网膜未检出异常改变^[25]。病程持续6个月时,可观察到视网膜毛细血管基底膜增厚现象^[44]。病程持续15个月时,双目开始出现轻度白内障。病程持续28个月时,视网膜出现明显的病理改变,可观察到视网膜毛细血管基底膜增厚、周皮细胞丢失、无细胞毛细血管。视网膜内核层细胞固缩、减少,节细胞层细胞显著减少和神经纤维层空泡变性^[61]。

Hainsworth等^[62]观察了尤卡坦小型猪四氧嘧啶性糖尿病的视网膜病变,在第20周观察到视网膜毛细血管基底膜增厚。Lee等^[63]对约克夏猪的STZ性糖尿病进行观察,在18~32周的观察期内,所有糖尿病猪均出现不同程度的白内障,有6只猪(75%)出现视网膜毛细血管基底膜增厚。这表明在相对较短的时间内,单纯的高血糖症可引发小型猪明显的视网膜病变,这一病变过程较好地模拟了人类的糖尿病视网膜病变。

出生后就患有高血糖的转基因猪,如INS^{C94Y}转基因猪,在出生的第1周就出现早期白内障的症状,并很快进展为晶状体完全不透明的成熟型白内障^[64]。在HNF1A^{P291fsinsC}转基因猪,2月龄时观察到白内障^[65]。视网膜的病变也明显较早,如HNF1A^{P291fsinsC}转基因猪,在4月龄就出现视网膜出血、棉絮斑等糖尿病视网膜病变的早期变化^[66]。糖尿病病程是视网膜病发生和发展最强的预测因子,研究糖尿病眼病发病机制和测试新的干预

手段需要持续时间比较长的小型猪糖尿病模型。

5.2 糖尿病肾病

高达20%~40%的糖尿病患者会发展至糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN),是世界范围内慢性肾病的主要因素,通常导致终末期肾病^[66],是糖尿病最重要的微血管并发症之一。DN通常发现于诊断糖尿病后的10~15年。组织学上, DN通常标志为肾小球肾炎形成、肾小管萎缩和肾间质纤维化,最终影响所有的肾结构^[67]。DN最早可检测的形态学变化包括足细胞肥大和肾小球基底膜增厚,继之肾小球扩大(如肾小球肥大)伴随系膜扩张和足细胞足突的消失^[68]。

与其他动物相比,小型猪的肾在解剖和功能上与人更相似。与人肾一样,小型猪的肾也是多小叶、多乳头肾^[4]。本实验室观察了小型猪糖尿病1个月、6个月和28个月3个时间点肾病理变化。在糖尿病病程1个月时未观察到肾功能和形态学改变^[25]。糖尿病病程6个月时,观察到了肾小球毛细血管基底膜增厚,足细胞尚无异常,肾功能指标无显著异常^[44]。糖尿病病程28个月时可观察到明显的肾病理学变化,包括肾小球基底膜增厚、足细胞减少和系膜扩张,还可查见肾小球系膜重度扩张和肾小球硬化(发生率<5%,多位于皮质和髓质交界处),在病程的第15个月开始出现蛋白尿,此后逐渐加重,在第28个月肾功能开始出现下降的趋势(0个月 vs 28个月: BUN 2.35 mmol/L vs 6.47 mmol/L; CRE 96.7 mmol/L vs 105 mmol/L)^[61]。Marshall等^[69]观察了Hanford小型猪STZ所致糖尿病在6个月和18个月时的肾病理学变化,并有2头猪观察到了23个月和37个月,其实验结果与我们的研究结果类似,在第37个月,除了肾小球系膜重度扩张的发生率增加外,还观察到了肾小球囊壁的透明变性。Maile等^[70]和Khairoun等^[71]的研究中,在STZ型糖尿病的基础上,叠加了高脂饲料喂养,分别观察了糖尿病第6个月和15个月的肾病理变化,其结果与单独应用STZ的结果类似。上述结果表明,小型猪STZ性糖尿病脏并发症的进程主要与糖尿病的病程长短有关。

出生第1周即患高血糖的INS^{C94Y}转基因猪,在4.5月龄时,未检测到肾小球基底膜增厚^[64]。HNF1A^{P291fsinsC}转基因猪由于胰岛β细胞减少,表现出严重的糖尿病表型,4~5月龄时,在肾皮质深部的肾小球观察到明显的肾小球肥大和肾小球结节形成^[65]。

6 需关注的技术问题

6.1 应激反应与血糖值测定

空腹血糖是糖尿病诊断的核心指标,是机体血糖调控状态的集中反映。由于应激反应会造成血糖一过性升高,因此在测定血糖时应尽可能减少小型猪的应激反应。由于国内小型猪实验动物化的历史较短,普遍存在捉拿保定不配合、易应激的情况。此外,动物本身也存在不同的神经类型,对于捉拿、保定的反应存在很大的个体差异。根据本实验室的经验,如小型猪较温顺,在保定过程中没有激烈挣扎,则在保定吊床^[72]中稳定5 min后即可进行血糖测定,如果小型猪在保定过程中经过了剧烈挣扎,则需要保定吊床中至少稳定20 min才能进行血糖测定。

对于需要每日多次监测血糖指标的实验,Ludwig等^[17]建议采用瞬时血糖监测系统(flash glucose monitoring system, FGM)或连续血糖监测系统,应用前者,将传感器埋置于皮下(无校准,使用寿命2周),通过简单扫描即可获得血糖值,且不但可以显示瞬时读数,还可以提供最近8 h的连续血糖值,以及是否血糖水平正在升高/降低或变化缓慢的趋势。FGM的缺点在于血糖值来源于对组织液的测定,与循环血液测定值存在差异。

6.2 全身麻醉与血糖值测定

药物注射麻醉是小型猪制动、镇静的可靠手段,鉴于小型猪的捉拿应激会导致血糖升高,干扰实验结果,是否可以通过麻醉手段减少动物的应激反应,从而获得准确的血糖结果呢?答案是否定的。实验表明,全身麻醉对动物的血糖测定值产生显著影响,在大鼠、家兔、小型猪和人类临床研究中均观察到这一现象,而且不同麻醉剂导致血糖升高的幅度和机制也存在差异^[73]。本实验室检测了盐酸氯胺酮与盐酸赛拉嗪联合麻醉后小型猪的空腹血糖值,结果高于未麻醉状态,且动物的血糖升高程度个体差异很大,饲喂高胆固醇高脂饲料的小型猪血糖升高幅度更大。也有临床研究发现,对血糖值的影响程度,全身麻醉>椎管内麻醉>神经阻滞^[74]。由于不同的麻醉药导致血糖升高的机制存在差异,且对血糖值测定值的影响存在个体差异,因此不建议麻醉状态下测定空腹血糖值。

6.3 口服糖耐量实验与静脉糖耐量实验

葡萄糖耐量是检测机体对血糖浓度的调节能

力。口服糖耐量实验(oral glucose tolerance test, OGTT)是目前公认的诊断糖尿病的“金标准”。实验研究中,糖耐量检测对于动物血糖调控情况的判定十分重要,同时在动物给糖后的不同时间点检测血清胰岛素(胰岛素激发试验),还可以判定胰岛素的分泌能力。小型猪实验中,由于操作便利,普遍采用IVGTT,通过静脉注射给糖,能够更准确地反映血糖调控情况。我们实验室应用50%葡萄糖,以1.2 mL/kg的剂量在4 min内完成静脉注射,检测6个时间点(0 min、10 min、30 min、60 min、90 min)血糖值。结果表明,对照组动物给糖前血糖值为3.2~3.7 mmol/L,给糖后10 min达峰值12.3~14.7 mmol/L,60 min基本恢复至3.5~4.9 mmol/L,90 min完全恢复至3.1~4.3 mmol/L。

小型猪进行OGTT实验血糖恢复缓慢,与IVGTT结果存在差异。Xi等^[30]和Hu等^[75]应用2 g/kg的葡萄糖混合25 g常规饲料投喂动物,在动物完成进食后的0 min、30 min、60 min、90 min、120 min检测血糖值,正常饲料喂养的对照组动物血糖平均值分别为5.5 mmol/L、8.6 mmol/L、8.1 mmol/L、8.2 mmol/L、7.6 mmol/L(根据曲线图的估算值),该结果表明小型猪口服葡萄糖后的血糖恢复相比静脉注射明显缓慢,也不同于人类的OGTT实验。这种差异可能与胃肠道胰高血糖素样多肽1(glucagon-like peptide-1, GLP-1)的作用有关。GLP-1由胃肠道的L-细胞分泌,在营养物质经胃肠道消化吸收过程中释放增加,促进胰岛β细胞的胰岛素释放。Manell等^[76]通过放射自显影技术发现,GLP-1Rs主要分布于猪的胰腺和十二指肠,在胃、空肠、回肠和结肠为低密度表达。这与在人类组织和非人灵长类动物组织中的研究结果一致。GLP-1在人类高血糖条件下能够促进胰岛β细胞的胰岛素分泌,GLP-1-GLP-1R轴作为对于进食的反应可临时促进胰岛素的分泌^[77]。然而,Manell等^[76]的研究表明,猪在口服葡萄糖后,血液中GLP-1浓度没有增加,仅一小部分GLP-1受体被内源性GLP-1占用。

6.4 糖化血红蛋白检测

糖化血红蛋白是血红蛋白和糖类之间化学反应的结果。A1c是糖化血红蛋白的主要组分^[78]。HbA1c能够反映之前2~3个月的平均血浆葡萄糖水平,并且不受短期血糖波动的影响,成为糖尿病患者血糖控制水平监控的重要指标。2011年,WHO推荐血清HbA1c高于6.5%作为诊断糖尿病

节点^[79]。因此, HbA1c也是糖尿病动物实验研究经常应用的检测指标。

在动物实验研究中, 已经有小鼠、大鼠、家兔、犬、猴和狒狒的HbA1c检测报道, 尽管检测结果变异很大, 但与人类一样, 也表现出在糖尿病动物体内升高。糖化血红蛋白水平在不同动物种类之间变异很大, 因为其差异不仅与红细胞寿命有关, 还与红细胞对葡萄糖的通透性相关。Higgins等^[80]利用血液样本, 比较了人类、狒狒、恒河猴、犬、兔和猪体内糖化血红蛋白检测情况, 结果测得血浆血糖与红细胞内血糖的比例平均值分别为67.1%、77%、70.8%、34.2%、19.2%和3.8%。这表明狒狒和恒河猴红细胞的葡萄糖通过性与人类差异不显著, 犬、兔和猪红细胞的葡萄糖通过性显著低于人类, 猪红细胞的葡萄糖通过性极低。

本实验室利用高脂饲料结合STZ的方法成功建立了小型猪糖尿病模型, 其中2个糖尿病组小型猪持续观察了6个月, 空腹血糖值在15.4~31.1 mmol/L和10.3~29.4 mmol/L范围波动。我们对所有实验应用的小型猪进行了血清HbA1c检测, 结果检测值在1.7%~5.8%范围内波动, 平均值显著低于人类的正常值, 而且随着动物血糖的升高, 变化不明显。由于我们应用的检测方法为高效液相色谱法已经作为标准化参考系统的参考方法^[81], 因此可以认为HbA1c指标不适于小型猪糖尿病研究。

综上所述, 由于在生理、解剖和代谢等方面与人类的相似性, 小型猪成为人类糖尿病研究的良好模型。同时, 我们也认识到小型猪在OGTT实验、血浆HbA1c检测等方面与人类存在差异。未来我们将不断总结经验, 借鉴已有的研究成果, 为小型猪糖尿病研究提供更有效的模型。

利益冲突 所有作者声明无利益冲突。

参考文献

- IDF Diabetes Atlas 2021 [EB/OL]. <https://diabetesatlas.org/atlas/tenth-edition>.
- Lutz TA. Mammalian models of diabetes mellitus, with a focus on type 2 diabetes mellitus [J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2023, 19 (6): 350-360.
- Brito-Casillas Y, Melián C, Wägner AM. Study of the pathogenesis and treatment of diabetes mellitus through animal models [J]. *Endocrinol Nutr*, 2016, 63 (7): 345-353.
- Renner S, Dobenecker B, Blutke A, et al. Comparative aspects of rodent and nonrodent animal models for mechanistic and translational diabetes research [J]. *Theriogenology*, 2016, 86 (1): 406-421.
- Tritschler S, Theis FJ, Lickert H, et al. Systematic single-cell analysis provides new insights into heterogeneity and plasticity of the pancreas [J]. *Mol Metab*, 2017, 6 (9): 974-990.
- Hoang DT, Matsunari H, Nagaya M, et al. A conserved rule for pancreatic islet organization [J]. *PLoS One*, 2014, 9 (10): e110384.
- Kim S, Whitener RL, Peiris H, et al. Molecular and genetic regulation of pig pancreatic islet cell development [J]. *Development*, 2020, 147 (6): dev186213.
- Clauss S, Bleyer C, Schüttler D, et al. Animal models of arrhythmia: classic electrophysiology to genetically modified large animals [J]. *Nat Rev Cardiol*, 2019, 16 (8): 457-475.
- Renner S, Blutke A, Clauss S, et al. Porcine models for studying complications and organ crosstalk in diabetes mellitus [J]. *Cell Tissue Res*, 2020, 380 (2): 341-378.
- Sanchez I, Martin R, Ussa F, et al. The parameters of the porcine eyeball [J]. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2011, 249 (4): 475-482.
- 陈华. 小型猪医学研究模型的建立与应用 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2015.
- Schneider MR, Wolf E. Genetically engineered pigs as investigative and translational models in dermatology [J]. *Br J Dermatol*, 2016, 174 (1): 237-239.
- Niu MM, Zhao YQ, Jia YX, et al. Whole-genome sequencing study to identify candidate markers indicating susceptibility to type 2 diabetes in Bama miniature pigs [J]. *Animal Model Exp Med*, 2023, 6 (4): 283-293.
- Niu MM, Zhao YQ, Xiang L, et al. 16S rRNA gene sequencing analysis of gut microbiome in a mini-pig diabetes model [J]. *Animal Model Exp Med*, 2022, 5 (1): 81-88.
- Zhang J, Wei XQ, Liu W, et al. Week-long normoglycaemia in diabetic mice and minipigs via a subcutaneous dose of a glucose-responsive insulin complex [J]. *Nat Biomed Eng*, 2024, 8 (10): 1214-1225.
- Yu JC, Wang JQ, Zhang YQ, et al. Glucose-responsive insulin patch for the regulation of blood glucose in mice and minipigs [J]. *Nat Biomed Eng*, 2020, 4 (5): 499-506.
- Ludwig B, Wolf E, Schönmann U, et al. Large animal models of diabetes [J]. *Methods Mol Biol*, 2020, 2128: 115-134.
- Wilson JD, Dhall DP, Simeonovic CJ, et al. Induction and management of diabetes mellitus in the pig [J]. *Aust J Exp Biol Med Sci*, 1986, 64 (Pt 6): 489-500.
- Strauss A, Moskalenko V, Tiurbe C, et al. Goettingen minipigs (GMP): comparison of two different models for inducing diabetes [J]. *Diabetol Metab Syndr*, 2012, 4: 7.
- Lenzen S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes [J]. *Diabetologia*, 2008, 51 (2): 216-226.
- Dufrane D, van Steenberghe M, Guiot Y, et al. Streptozotocin-induced diabetes in large animals (pigs/Primates): role of GLUT2 transporter and beta-cell plasticity [J]. *Transplantation*, 2006, 81 (1): 36-45.
- Marshall M. Induction of chronic diabetes by streptozotocin in the miniature pig [J]. *Res Exp Med*, 1979, 175 (2): 187-196.
- Gäbel H, Bitter-Suermann H, Henriksson C, et al. Streptozotocin diabetes in juvenile pigs. Evaluation of an experimental model [J]. *Horm Metab*, 1985, 17 (6): 275-280.
- Larsen MO, Wilken M, Gottfredsen CF, et al. Mild streptozotocin diabetes in the Göttingen minipig. A novel model of moderate insulin deficiency and diabetes [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2002, 282 (6): E1342-E1351.
- 刘亚千, 赵玉琼, 王凯, 等. 巴马小型猪1型糖尿病模型的建

- 立 [J]. 实验动物科学, 2015, 32 (4): 1-7.
- 26 Muller YD, Golshayan D, Ehrirchiou D, et al. Immunosuppressive effects of streptozotocin-induced diabetes result in absolute lymphopenia and a relative increase of T regulatory cells [J]. *Diabetes*, 2011, 60 (9): 2331-2340.
- 27 Tuch BE, Turtle JR, Simeonovic CJ. Streptozotocin is not toxic to the human fetal B cell [J]. *Diabetologia*, 1989, 32 (9): 678-684.
- 28 Liu XM, Federlin KF, Bretzel RG, et al. Persistent reversal of diabetes by transplantation of fetal pig proislets into nude mice [J]. *Diabetes*, 1991, 40 (7): 858-866.
- 29 Gerstein HC, Waltman L. Why don't pigs get diabetes? Explanations for variations in diabetes susceptibility in human populations living in a diabetogenic environment [J]. *J De L' association Med Can*, 2006, 174 (1): 25-26.
- 30 Xi SM, Yin WD, Wang ZB, et al. A minipig model of high-fat/high-sucrose diet-induced diabetes and atherosclerosis [J]. *Int J Exp Pathol*, 2004, 85 (4): 223-231.
- 31 Liu Y, Wang ZB, Yin WD, et al. Severe insulin resistance and moderate glomerulosclerosis in a minipig model induced by high-fat/high-sucrose/high-cholesterol diet [J]. *Exp Anim*, 2007, 56 (1): 11-20.
- 32 Torres-Rovira L, Astiz S, Caro A, et al. Diet-induced swine model with obesity/leptin resistance for the study of metabolic syndrome and type 2 diabetes [J/OL]. <https://doi.org/10.1100/2012/510149>.
- 33 Chen H, Liu YQ, Li CH, et al. The susceptibility of three strains of Chinese minipigs to diet-induced type 2 diabetes mellitus [J]. *Lab Anim (NY)*, 2009, 38 (11): 355-363.
- 34 Hand MS, Surwit RS, Rodin J, et al. Failure of genetically selected miniature swine to model NIDDM [J]. *Diabetes*, 1987, 36 (3): 284-287.
- 35 陈华, 刘亚千, 赵玉琼, 等. 2型糖尿病易感小型猪遗传选育研究进展 (一) [J]. 实验动物科学, 2015, 32 (2): 1-6.
- 36 Panasevich MR, Meers GM, Linden MA, et al. High-fat, high-fructose, high-cholesterol feeding causes severe NASH and cecal microbiota dysbiosis in juvenile Ossabaw swine [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2018, 314 (1): E78-E92.
- 37 Lim RR, Grant DG, Olver TD, et al. Young ossabaw pigs fed a western diet exhibit early signs of diabetic retinopathy [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2018, 59 (6): 2325-2338.
- 38 Reed MJ, Meszaros K, Entes LJ, et al. A new rat model of type 2 diabetes: the fat-fed, streptozotocin-treated rat [J]. *Metabolism*, 2000, 49 (11): 1390-1394.
- 39 Srinivasan K, Viswanad B, Asrat L, et al. Combination of high-fat diet-fed and low-dose streptozotocin-treated rat: a model for type 2 diabetes and pharmacological screening [J]. *Pharmacol Res*, 2005, 52 (4): 313-320.
- 40 滕东剑, 高碧云, 农晓琳, 等. 广西巴马小型猪2型糖尿病模型的建立及其牙龈组织病理学观察 [J]. 广西医科大学学报, 2017, 34 (10): 1411-1414.
- 41 孙若飞, 王昆华, 赵泉, 等. 2型糖尿病滇南小耳猪动物模型的建立 [J]. 实验动物科学, 2012, 29 (5): 37-40.
- 42 肖国华, 张素君, 余坚, 等. 高糖高脂联合低剂量STZ诱导版纳微型猪2型糖尿病动物模型的建立 [J]. 中南医学科学杂志, 2012, 40 (4): 351-356.
- 43 Wu YJ, Zhang L, Liang J, et al. Comparative analysis on liver transcriptome profiles of different methods to establish type 2 diabetes mellitus models in Guangxi Bama mini-pig [J]. *Gene*, 2018, 673: 194-200.
- 44 Zhao YQ, Niu MM, Jia YX, et al. Establishment of type 2 diabetes mellitus models using streptozotocin after 3 months high-fat diet in Bama minipigs [J]. *Anim Biotechnol*, 2023, 34 (7): 2295-2312.
- 45 Archibald AL, Bolund L, Churcher C, et al. Pig genome sequence: analysis and publication strategy [J]. *BMC Genomics*, 2010, 11: 438.
- 46 Walters EM, Wolf E, Whyte JJ, et al. Completion of the swine genome will simplify the production of swine as a large animal biomedical model [J]. *BMC Med Genomics*, 2012, 5: 55.
- 47 Groenen MA. A decade of pig genome sequencing: a window on pig domestication and evolution [J]. *Genet Sel Evol*, 2016, 48: 23.
- 48 Andersson L, Archibald AL, Bottema CD, et al. Coordinated international action to accelerate genome-to-phenome with FAANG, the Functional Annotation of Animal Genomes project [J]. *Genome Biol*, 2015, 16 (1): 57.
- 49 Hammer RE, Pursel VG, Rexroad CE Jr, et al. Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection [J]. *Nature*, 1985, 315 (6021): 680-683.
- 50 Zettler S, Renner S, Kemter E, et al. A decade of experience with genetically tailored pig models for diabetes and metabolic research [J]. *Anim Reprod*, 2020, 17 (3): e20200064.
- 51 Almgren P, Lehtovirta M, Isomaa B, et al. Heritability and familiarity of type 2 diabetes and related quantitative traits in the Botnia Study [J]. *Diabetologia*, 2011, 54 (11): 2811-2819.
- 52 Poulsen P, Kyvik KO, Vaag A, et al. Heritability of type II (non-insulin-dependent) diabetes mellitus and abnormal glucose tolerance: a population-based twin study [J]. *Diabetologia*, 1999, 42 (2): 139-145.
- 53 Medici F, Hawa M, Ianari A, et al. Concordance rate for type II diabetes mellitus in monozygotic twins: actuarial analysis [J]. *Diabetologia*, 1999, 42 (2): 146-150.
- 54 Imamura M, Maeda S. Perspectives on genetic studies of type 2 diabetes from the genome-wide association studies era to precision medicine [J]. *J Diabetes Investig*, 2024, 15 (4): 410-422.
- 55 Kong SY, Ruan JX, Xin LL, et al. Multi-transgenic minipig models exhibiting potential for hepatic insulin resistance and pancreatic apoptosis [J]. *Mol Med Rep*, 2016, 13 (1): 669-680.
- 56 杨述林, 张凯艺, 朱文娟, 等. 小型猪2型糖尿病模型的构建方法及应用: CN201910644543.X [P]. 2019-10-08.
- 57 Lagani V, Koumakis L, Chiarugi F, et al. A systematic review of predictive risk models for diabetes complications based on large scale clinical studies [J]. *J Diabetes Complications*, 2013, 27 (4): 407-413.
- 58 Sivaprasad S, Gupta B, Crosby-Nwaobi R, et al. Prevalence of diabetic retinopathy in various ethnic groups: a worldwide perspective [J]. *Surv Ophthalmol*, 2012, 57 (4): 347-370.
- 59 Durham JT, Herman IM. Microvascular modifications in diabetic retinopathy [J]. *Curr Diab Rep*, 2011, 11 (4): 253-264.
- 60 Bloodworth JMB, Gutgesell HP, Engerman RL. Retinal vasculature of the pig: Light and electron microscope studies [J]. *Exp Eye Res*, 1965, 4 (3): 174-178.
- 61 Niu MM, Liu YQ, 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.
- 62 Hainsworth DP, Katz ML, Sanders DA, et al. Retinal capillary basement membrane thickening in a porcine model of diabetes mellitus [J]. *Comp Med*, 2002, 52 (6): 523-529.
- 63 Lee SE, Ma WC, Rattigan EM, et al. Ultrastructural features of retinal capillary basement membrane thickening in diabetic swine [J]. *Ultrastruct Pathol*, 2010, 34 (1): 35-41.
- 64 Renner S, Braun-Reichhart C, Blutke A, et al. Permanent

- neonatal diabetes in INS (C94Y) transgenic pigs [J]. *Diabetes*, 2013, 62 (5): 1505-1511.
- 65 Umeyama K, Nakajima M, Yokoo T, et al. Diabetic phenotype of transgenic pigs introduced by dominant-negative mutant hepatocyte nuclear factor 1 α [J]. *J Diabetes Complications*, 2017, 31 (5): 796-803.
- 66 Alicic RZ, Rooney MT, Tuttle KR. Diabetic kidney disease: challenges, progress, and possibilities [J]. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2017, 12 (12): 2032-2045.
- 67 Kopel J, Pena-Hernandez C, Nugent K. Evolving spectrum of diabetic nephropathy [J]. *World J Diabetes*, 2019, 10 (5): 269-279.
- 68 Cohen Tervaert TW, Mooyaart AL, Amann K, et al. Pathologic classification of diabetic nephropathy [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2010, 21 (4): 556-563.
- 69 Marshall M, Oberhofer H, Staubesand J. Early micro- and macro-angiopathy in the streptozotocin diabetic minipig [J]. *Res Exp Med (Berl)*, 1980, 177 (2): 145-158.
- 70 Maile LA, Busby WH, Gollahon KA, et al. Blocking ligand occupancy of the α V β 3 integrin inhibits the development of nephropathy in diabetic pigs [J]. *Endocrinology*, 2014, 155 (12): 4665-4675.
- 71 Khairoun M, van den Heuvel M, van den Berg BM, et al. Early systemic microvascular damage in pigs with atherogenic diabetes mellitus coincides with renal angiotensin dysbalance [J]. *PLoS One*, 2015, 10 (4): e0121555.
- 72 刘亚千, 李春海, 陈华. 小型猪保定吊床的设计与使用 [J]. *实验动物科学*, 2009, 26 (2): 64-65.
- 73 相磊, 刘亚千, 赵玉琼, 等. 全身麻醉对巴马小型猪空腹血糖测定的影响 [J]. *实验动物科学*, 2018, 35 (3): 70-73.
- 74 曹芳, 宋俊杰, 李海波. 全身麻醉与腰硬联合麻醉对烧伤患者血糖值的影响 [J]. *哈尔滨医科大学学报*, 2014, 48 (4): 332-334.
- 75 Hu XB, She MH, Hou HJ, et al. Adiponectin decreases plasma glucose and improves insulin sensitivity in diabetic Swine [J]. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2007, 39 (2): 131-136.
- 76 Manell E, Puuvuori E, Svensson A, et al. Exploring the GLP-1-GLP-1R axis in porcine pancreas and gastrointestinal tract in vivo by ex vivo autoradiography [J]. *BMJ Open Diabetes Res Care*, 2021, 9 (1): e002083.
- 77 Baggio LL, Drucker DJ. Biology of incretins: GLP-1 and GIP [J]. *Gastroenterology*, 2007, 132 (6): 2131-2157.
- 78 Peacock I. Glycosylated haemoglobin: measurement and clinical use [J]. *J Clin Pathol*, 1984, 37 (8): 841-851.
- 79 World Health Organization. Use of Glycated Haemoglobin (HbA1c) in the Diagnosis of Diabetes Mellitus: Abbreviated Report of a WHO Consultation [R]. Geneva: World Health Organization, 2011.
- 80 Higgins PJ, Garlick RL, Bunn HF. Glycosylated hemoglobin in human and animal red cells. Role of glucose permeability [J]. *Diabetes*, 1982, 31 (9): 743-748.
- 81 Little RR, Rohlfing CL, Wiedmeyer HM, et al. The national glycohemoglobin standardization program: a five-year progress report [J]. *Clin Chem*, 2001, 47 (11): 1985-1992.

(责任编辑:孟晓彤)

(上接第27页)

- 29 Li QM, Dormer J, Daryani P, et al. Radiomics analysis of MRI for predicting molecular subtypes of breast cancer in young women [J]. *Proc SPIE Int Soc Opt Eng*, 2019, 10950: 1095044.
- 30 Rodriguez-Meira A, Buck G, Clark SA, et al. Unravelling intratumoral heterogeneity through high-sensitivity single-cell mutational analysis and parallel RNA sequencing [J]. *Mol Cell*, 2019, 73 (6): 1292-1305.
- 31 Moncada R, Barkley D, Wagner F, et al. Integrating microarray-based spatial transcriptomics and single-cell RNA-seq reveals tissue architecture in pancreatic ductal adenocarcinomas [J]. *Nat Biotechnol*, 2020, 38 (3): 333-342.
- 32 Taberlay PC, Achinger-Kawecka J, Lun ATL, et al. Three-dimensional disorganization of the cancer genome occurs coincident with long-range genetic and epigenetic alterations [J]. *Genome Res*, 2016, 26 (6): 719-731.
- 33 Mumbach MR, Rubin AJ, Flynn RA, et al. HiChIP: efficient and sensitive analysis of protein-directed genome architecture [J]. *Nat Meth*, 2016, 13: 919-922.
- 34 Rehm HL, Page AJH, Smith L, et al. GA4GH: International policies and standards for data sharing across genomic research and healthcare [J]. *Cell Genom*, 2021, 1 (2): 100029.
- 35 Kreitmaier P, Katsoula G, Zeggini E. Insights from multi-omics integration in complex disease primary tissues [J]. *Trends Genet*, 2023, 39 (1): 46-58.
- 36 Joshi A, Rienks M, Theofilatos K, et al. Systems biology in cardiovascular disease: a multiomics approach [J]. *Nat Rev Cardiol*, 2021, 18 (5): 313-330.
- 37 Zhang M, Cui Z, Neumann M, et al. An end-to-end deep learning architecture for graph classification [C] // AAAI'18/ IAAI'18/EAAI'18: Proceedings of the Thirty-Second AAAI Conference on Artificial Intelligence and Thirtieth Innovative Applications of Artificial Intelligence Conference and Eighth AAAI Symposium on Educational Advances in Artificial Intelligence. AAAI Press, 2018.
- 38 Chuai GH, Ma HH, Yan JF, et al. DeepCRISPR: optimized CRISPR guide RNA design by deep learning [J]. *Genome Biol*, 2018, 19 (1): 80.
- 39 Jumper J, Evans R, Pritzel A, et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold [J]. *Nature*, 2021, 596 (7873): 583-589.
- 40 He Y, Fang P, Shan YT, et al. LucaOne: generalized biological foundation model with unified nucleic acid and protein language [J/OL]. <https://doi.org/10.1101/2024.05.10.592927>.
- 41 Nguyen E, Poli M, Durrant MG, et al. Sequence modeling and design from molecular to genome scale with Evo [J]. *Science*, 2024, 386 (6723): eado9336.

(责任编辑:孟晓彤)