

文章编号:1004-7220(2024)01-0001-08

· 专家论坛 ·

疾病动物模型建模过程中伦理和福利审查

邢凤英¹, 赵勇²

(1. 上海交通大学医学院附属第九人民医院 实验动物中心, 上海 200011;

2. 上海实验动物研究中心, 上海 201203)

摘要: 建立动物模型是研究各种相应疾病发病机制和治疗手段不可或缺的工具,其伦理和福利的审查是保证科研质量以及促进实验动物科学、合理使用的必要措施。在审查实践中发现,大部分申请者都无法准确理解伦理申请表中的各项内容及其对应的伦理原则。因此,一套切实可行的动物实验伦理操作指南十分必要。本文以口腔疾病动物模型为例,从其开展的法律、伦理基础为切入点,将建立口腔疾病动物模型的方法分为物理法、化学法、生物法、联合法,并详述不同建模方法的伦理和福利审查要点和模型评价方法。希望能帮助审查者和项目申请者更好地理解并执行伦理审查的要点,最终提高动物模型标准化程度和适用性。

关键词: 疾病动物模型; 伦理审查; 动物福利; 模型评价

中图分类号: R 052 文献标志码: A

DOI: 10.16156/j.1004-7220.2024.01.001

Ethical and Welfare Review in the Modeling Process of Disease Animal Models

XING Fengying¹, ZHAO Yong²

(1. Experimental Animal Center, Shanghai Ninth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200011, China; 2. Shanghai Laboratory Animal Research Center, Shanghai 201203, China)

Abstract: Disease animal model is an indispensable part of studying the pathogenesis and treatment of diseases. Review of the ethics and welfare is the necessary measure to ensure the quality of scientific research and promote the scientific and rational use of laboratory animals. In the review practice, it is found that most applicants are difficult to accurately understand the items listed in the application form and ethical principles related to items. Therefore, a practical and feasible set of ethical guidelines for animal experiments is necessary. This review focuses on the legal and ethical basis of developing oral disease animal models, and divides the methods of establishing oral disease animal models into physical methods, chemical methods, biological methods, and combined methods. It also elaborates on the ethical and welfare review points of different modeling methods and model evaluation methods. Hopefully, ethical censors and project applicants may get more understanding of ethical review for disease animal models, and ultimately improve the standardization and applicability of animal models.

Key words: disease animal models; ethical review; animal welfare; model evaluation

收稿日期:2024-02-01; 修回日期:2024-02-05

基金项目:上海交通大学医学院附属第九人民医院医院管理研究项目(YGB202313)

通信作者:邢凤英,高级实验师,E-mail: xingfengying@163.com

世界卫生组织 2023 年最新报告,全球有近 45% 的人口患有口腔疾病,龋病、牙周疾病、牙齿脱落和口腔癌是最主要的口腔疾病。实验动物在口腔疾病研究中发挥了关键性作用,利用口腔疾病动物模型研究疾病的病因、病理和新的防治手段,将极大地提高这部分人群的口腔健康。开展动物实验前的伦理审查正是保证动物福利、提高动物疾病模型质量的重要保障。但在实际审查中却发现,科研人员无法准确理解伦理申请表中各项内容的具体含义。大部分申请者在立项意义、实验方法、麻醉与镇痛药物选择和应用以及实验结果评估等内容上阐述得不够准确,甚至未作出阐述。同时还发现,国内口腔疾病期刊中仅有少数期刊要求发表动物实验论文时需提供伦理相关的证明材料,这说明动物实验伦理审查在口腔疾病研究中未得到足够重视。但目前国内尚未有针对口腔疾病动物模型的伦理审查操作指南,迫切需要一套切实可行的指导原则和操作方法,帮助申请者更好理解动物实验伦理。本文通过总结口腔疾病动物模型的分类和制作方法,剖析建模过程中动物实验伦理和动物福利审查的要点和原因,帮助申请者了解审查内容所针对的原则和理念,有的放矢地提供精确内容,切实提高实验动物的福利水平,保证动物实验符合伦理要求。

1 合规审查

《实验动物质量管理办法》和《实验动物许可证管理办法(试行)》均规定实验动物供应单位应取得实验动物生产许可证,如果用作动物实验的动物及其制品来源于野生动物,还应符合《中华人民共和国野生动物保护法》的有关规定。开展动物实验的场所应取得实验动物使用许可证,未取得实验动物使用许可证的单位或个人可以委托有使用许可证的单位开展动物实验,并由开展动物实验的单位负责动物实验的伦理审查。

2018 年,我国出台了《实验动物福利伦理审查指南》的国家标准,借鉴国际上动物福利的“五大自由”和“3R”原则,各使用单位纷纷制订符合本单位的动物实验伦理审查办法。随着科技创新的快速发展,面临的伦理挑战日益增多,2022 年,中共中央办公厅、国务院办公厅又出台了《关于加强科技伦

理治理的意见》,其中再次明确了使用实验动物应符合“3R”原则,涉及人、实验动物的科技活动,应当按规定由本单位科技伦理(审查)委员会审查批准。因此,在动物实验开展前就需要进行伦理审查。

2 必要性审查

任何动物实验的开展首先必须具有科学价值并有利于社会。因此,实验动物项目实施前,申请者需提供项目的科学意义,是否有利于改善人类或动物的健康或福利,是否为了促进自然或生命科学的发展。例如,牙周炎是一种细菌感染性疾病,影响全球 20%~50% 的人口^[1],它可以引起牙周袋形成、牙槽骨吸收,进一步导致牙齿松动、脱落^[2],并且不可逆地影响牙齿支持组织。目前研究发现,牙周炎与全身系统性疾病如心血管疾病、糖尿病等相互作用,影响这些疾病的治疗效果^[3]。因此,构建牙周病动物模型进行深入研究,有助于提高患口腔疾病人群的口腔卫生和降低相关全身性疾病的发生风险。从上述描述可知,牙周病动物模型的建立有助于改善人类健康,可以产生巨大的社会效益,运用危害-效益分析,应该允许开展该类型动物实验。

3 符合伦理要求

动物实验的开展除了在科学上有充分的理由,还应该在动物实验过程中贯穿伦理原则:符合我国国情、符合伦理道德观、符合国际惯例等。口腔疾病动物模型是对人类口腔疾病发生、发展、治疗等方面进行系统的研究,以提高人类健康,这些研究可能使全球数以百万计的口腔疾病病人获益,在科学上是合理的,有着巨大的社会价值,符合社会的伦理价值观。同时,也看到有些实验的开展违背了伦理道德。例如,有学术交流平台发表雄性连体鼠受孕的实验,在伦理界和科学界均产生很大反响^[4]。尽管支持者认为此项研究具有一定的科学价值,但因其违反伦理道德,大部分人反对该项动物实验的开展。科研伦理审查制度的设置正是用社会价值来判断科研动作是否会违背伦理准则。

4 实验动物的选择

构建一种疾病动物模型,通常需要经过以下几

个步骤:分析疾病形成的病因;选择合适的实验动物;依据目前已知的病因选取适当的方法;强化、放大某种或多种致病因素,在较短的时间内模拟出相似的病变状态;通过各种手段检测病变相关指标,并与人类疾病的指标相对比,以明确所建模型是否为研究所需^[5]。构建口腔疾病动物模型时,应选择与人类口腔生理结构或病理过程相似的实验动物,以及选择该种动物的可行性。例如,常用大鼠构建牙周炎、龋齿、正畸牙移动等动物模型,是因为大鼠口腔每侧上下颌各有3颗磨牙,其磨牙结构^[6]、牙周组织结构、组织病理学都与人类近似,如牙周组织存在牙龈上皮、结合上皮、牙周膜纤维以及牙槽骨、牙骨质等结构,齿龈沟内上皮表面有角化存在,口腔内的病原体、菌斑形成及其滋生繁殖方式等与人类口腔相似。牙周炎时,其病理学特征也类似人的牙周病理^[7]。正畸动物模型在正畸性牙根吸收、牙周组织改建、正畸牙移动速度方面也与人类牙齿在移动过程中相似^[6]。而且大鼠易于饲养,生长周期短,费用低廉。免疫缺陷小鼠因无移植排斥反应,遗传学背景清楚,易于饲养和操作,多用于移植口腔癌的研究。同样,因小鼠在转基因修饰技术上的应用相对比较成熟,利用小鼠构建口腔癌转基因模型也是首选。因此,申请者需详细说明选择该种实验动物的原因。

动物实验研究中,如无特殊要求,一般选用成年、体重相差不超过10%、年龄尽可能一致、雌雄各半的实验动物,以避免动物个体差异造成的结果误差。但在口腔疾病动物模型中,项目申请者常选用单一性别来控制性别带来的差异,部分实验未严格控制动物体重不超过10%的要求^[5],这些动物选择上变量的控制将影响实验结果的可信度,故要求申请者在实验方案中应详细描述实验动物的基本信息。审查时,需评估选择单一性别动物的理由是否充分,动物体重差异过大是否会影响统计结果的显著性等。

5 动物实验样本量

合理有效地使用实验动物是研究结论科学性和可靠性的保证,也是实验动物伦理原则的要求。但是,经验不足的研究人员在动物实验设计或统计分析方面缺乏专业知识,选择动物样本量时随意性

较大,样本量过小不具有广泛意义,样本量过大会造成时间、精力和资金的浪费。大量的论文中没有说明动物性别、年龄或体重,也没有说明动物样本量选择的理由^[8],这可能是实验结果无法进行复制的原因之一。医学实验研究通常分为探索性研究和验证性研究,样本量大小可以参考已发表的文献来确定,也可以咨询经验丰富的该领域研究人员或统计学专家。无论哪种方式,都应该在实验开展前确定,并充分了解样本量计算方法的优缺点。

6 口腔疾病动物模型构建方法与考量

口腔疾病动物模型的建模方法可归纳为物理法、化学法、生物法,以及以上两种或3种方法的联合法。口腔疾病模型中均涉及、项目负责人又难以准确表述的内容包括:建模时是否需要麻醉,实验周期中是否需要考虑仁慈终点,动物是否需要安乐死,以及安乐死后动物尸体的处理方式等,这些共性内容将在本文文末统一说明。而针对不同的建模方法及模型评价方法,伦理审查的要点却需要单独考量。

6.1 物理法

用丝线在完整或预先剥离牙龈的牙颈处结扎,均可以构建牙周病动物模型^[5]。丝线结扎或剥离牙龈时,动物会产生恐惧或疼痛,考虑到动物福利和实验的顺利开展,需对动物进行麻醉。丝线的粗细、材质均会对结扎的效果产生影响,丝线还有脱落的可能,故需说明结扎丝线的型号、材质、观察频率等。随着牙周炎的发生和发展,可能会对动物的饮食和饮水造成影响,这时可考虑将饲料软化后放置于动物身旁,如仍不能缓解,是否可以考虑补充营养液。若上述方法均不起作用,动物出现严重的影响动物福利的症状(如体重下降超过20%、不吃不喝超过24h等),是否考虑仁慈终点。用物理加压的方法构建正畸牙移动动物模型时,加压装置固定在移动牙邻近牙上,玻璃粒子黏附在移动牙上,这些装置的安装同样需要对动物进行麻醉后方可操作。正畸装置可能会导致口腔溃疡的形成,严重时会影响动物的饮食饮水,同牙周病动物模型一样,需要考虑缓解口腔溃疡对动物的影响,或者移除正畸装置,甚至严重情况须考虑对动物进行安乐

死处理。物理法构建口腔疾病动物模型一般不会对操作人员、周围环境造成影响,仅影响被处理的

实验动物,故评价此类建模方法需要申请者提供减轻动物疼痛或痛苦的考量内容(见表 1)。

表 1 物理法审查要点

Tab. 1 Key points of physical method review

类型	方法	审查要点	评价方法
线结扎法	牙颈部牙龈剥离后或直接用正畸用丝线结扎牙颈部,建立牙周病动物模型	1. 结扎丝线的粗细、材质 2. 观察频率 3. 若影响动物饮食饮水,考虑如何保证动物福利	1. 整体评估对动物的影响:精神状态、活动度、进食、进水、体重变化等 2. 牙龈各种指标变化:牙龈指数、龈沟出血程度、菌斑量、牙周袋深度、龈沟液渗出情况 3. 组织学评价 4. 生化指标,如炎症因子、促炎因子、肿瘤坏死因子等升高也是评价炎症反应的一种手段
物理加压法	在邻近牙上磨出浅切迹,移动牙用玻璃粒子粘结,安装加力装置,制备正畸牙移动动物模型	1. 加压装置和玻璃粒子是否会造成口腔溃疡 2. 若影响动物饮食饮水,考虑如何保证动物福利 3. 加压装置观察频率、加力值变化	1. 整体评估对动物的影响(同上) 2. 影像学检测:Micro-CT 测量牙齿移动距离、牙根吸收测量

6.2 化学法

高糖黏性食物同样可以导致牙周炎^[9]。造模时,高糖黏性食物替代正常饲料,以自由采食的方式饲喂实验动物,该方法不会对动物造成明显的不适。但高糖黏性食物需特殊制备,饲料形状会影响动物的采食量,灭菌方式会影响营养成分的含量。饲料制作后未灭菌、使用过程中保存不当或饲料更换周期过长,均容易滋生细菌,产生毒素,不仅会影响饲料的品质,还会影响动物的健康,同时也可能对饲养环境产生有害的影响。因此,需要申请者提供特殊饲料制备过程是否经过灭菌处理、存储条件是否能保持食物的无菌性等说明(见表 2)。出现牙周炎症状时,需考虑动物福利的内容与物理法构建牙周炎病动物模型类似。

4-硝基喹啉 N-氧化物(4NQO, CAS NO. 56-57-5)是一种芳香杂环类水溶性喹啉衍生物,溶于水后通过氧化应激损伤和抑制 DNA 合成等机制诱导鳞状细胞癌的产生^[10],用于模型制备时要考察化学物质使用过程中动物的福利、相关人员的职业健康安全,以及对环境的影响。申请者需在动物实验申请时提供化学物质详细的安全数据表,了解化学品的危害和防护措施。制备、处理和动物给药过程中科研或饲养人员均可能接触到这些化学物质,故需要说明制备过程中佩戴何种个人防护用品,是否需要在通风橱或安全柜内配制溶液;溶液若经皮或经口进入动物体内,还需对溶液的无菌性进行说明;化学物质会从动物体内排出而污染笼盒或环境,是否需要在笼盒清洗前对动物排泄物进行无害化处理也需加以说明(见表 2)。

表 2 化学法审查要点

Tab. 2 Key points of chemical method review

类型	方法	审查要点	评价方法
高糖黏性食物	高糖黏性食物黏附牙面,促进口腔细菌滋生,同时高糖饮食降低免疫力,降低牙周组织的抗感染能力,引发炎症,构建牙周病动物模型	高糖黏性食物的来源、配方、灭菌方式、饲喂方法、炎症形成后是否需要软化食物,保证动物福利	同线结扎法制备牙周病动物模型的评价方法
致癌试剂	4NQO 直接饮水法或涂抹法构建口腔癌动物模型	致癌剂配制和使用应该穿戴护目镜、手套、防护服、在通风橱或生物安全柜内操作;空气经过滤后排放;实验废弃物作为医废处理	1. 整体评估对动物的影响:精神状态、活动度、进食、进水、体重 2. 口腔变化:黏膜颜色、质地、斑块、溃疡等 3. 组织病理学:口腔组织增生程度判断、特异性免疫染色判断癌变程度

6.3 生物法

饲料中添加或口腔接种伴放线菌团聚杆菌、牙龈卟啉单胞菌、具核梭杆菌中的一种或多种,均可以构建牙周病动物模型,因使用的细菌种类不同,须就每一种细菌做具体分析。根据 2023 版《人间传染的病原微生物目录》的规定,伴放线菌团聚杆菌感染实验动物需在动物生物安全防护 2 级实验室 (ABSL-2) 内进行,同时为了满足 SPF 级大、小鼠实验动物设施的微生物要求,感染动物实验中使用的病原微生物同时要符合国标《实验动物 微生物、寄生虫学等级及检测》的规定。基于以上要求,需要申请者提交特定病原体的生物危害相关信息和标准操作流程,确保生物危害得到控制,并将人和其他动物的暴露风险降低到可接受水平。主要内容包括:是否需要在 ABSL-2 内

操作,感染动物后病原体在动物体内的存在时间和浓度、排泄途径、排泄的浓度、废弃物处理方法等,所有操作都应该以保证人员职业健康安全和保护环境不受影响为前提。尽管牙龈卟啉单胞菌和具核梭杆菌不在《人间传染的病原微生物目录》上,在操作上述细菌时可以在 SPF 级实验动物设施内完成,但同样需要避免产生气溶胶的操作,以免影响相关人员和环境。细菌细胞壁外膜的脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 也可以构建牙周病动物模型。LPS 是一种内毒素,通过呼吸道和消化道进入人体内蓄积而含量过高时会导致发热、炎症、水肿、心血管疾病和肝肾功能障碍等疾病^[11],内毒素性质非常稳定,不易灭活,空气中的内毒素会吸附在粉尘上,故操作 LPS 时应减少产生气溶胶的行为(见表 3)。

表 3 生物法审查要点

Tab. 3 Key points of biological method review

类型	方法	审查要点	评价方法
细菌接种法	食物中添加、牙龈局部反复涂抹、龈沟局部直接注入伴放线菌团聚杆菌、牙龈卟啉单胞菌、具核梭杆菌中的一种或多种,构建牙周病动物模型。	伴放线菌团聚杆菌接种动物实验应在 ABSL-2 内操作,而其他细菌无特殊要求	同线结扎法制备牙周病动物模型评价
细菌成分注射法	局部接种或定位注射 LPS, 构建牙周炎动物模型	LPS 配制和使用需做好个人防护,包括口罩、手套等,注意避免气溶胶的操作	同线结扎法制备牙周病动物模型评价
细胞或组织接种	口腔癌细胞皮下接种或舌部接种,构建口腔癌动物模型。	皮下接种考虑肿瘤的大小,是否破溃,体重明显降低,舌部接种考虑肿瘤是否影响动物的进食和饮水,而导致体重明显下降	1. 整体评估对动物的影响 2. 肿瘤生长部位、大小、形状、质地、生长速度、是否破溃 3. 组织病理学检测:发病部位和转移部位 HE 染色,免疫组化特异性染色 4. 影像学检测 5. 分子指标检测
基因修饰法	转基因的方法或条件性诱导的方法构建口腔癌动物模型	实验目的是否符合伦理、转基因动物的福利	1. 发病前及发病后整体评估对动物的影响 2. 发病部位观察及进展 3. 其他评估同接种细胞制备口腔癌模型 4. 目的基因检测:突变、mRNA、蛋白水平检测 5. 影像学检测:GFP 或荧光素酶检测

生物法构建口腔肿瘤动物模型主要有两种方式,原位或异位注射肿瘤细胞和基因修饰。注射肿瘤细胞需要考虑细胞的无菌性,若肿瘤细胞来源于病人,还需排除人源性病原体对实验动物和操作人员的健康影响。这需要申请者提供人源病原体的检测报告或结果,如排除人的 HIV、结核、梅毒等。

其次,考虑肿瘤负荷的大小。一般建议小鼠皮下肿瘤最大直径不超过 20 mm,大鼠皮下肿瘤最大直径不超过 40 mm,如果动物患有多个肿瘤,则多个肿瘤的最大直径之和不大于上述推荐直径^[12]。除了负荷肿瘤大小外,如果肿瘤或周围皮肤出现溃疡,肿瘤的生长影响其正常生理或社会行为,也建议对此

动物进行安乐死。除皮下肿瘤外,其他方式产生的肿瘤难以监测,建议通过观察动物日常活动的减少、体重的降低、生理指标的异常、动物影像学等方式来判断是否需要安乐死(见表 3)。这也要求申请者在提交申请时详细描述肿瘤产生的方法,评价模型成功的指标,通过考量肿瘤动物模型的整体健康提出实施仁慈终点的标准。

基因修饰法构建口腔疾病动物模型主要考虑这些模型动物的福利。基因修饰法产生的模型动物可以等同于背景品系动物,由于此类动物模拟人类的某些疾病,会在不同程度、不同生命周期、不同器官出现疼痛或痛苦的症状;另外,由于基因编辑的脱靶效应,可能导致被编辑的动物产生非预期的畸形;由于人们对基因和疾病关系的认识有限,这种局限性可能导致基因编辑的动物产生新的疾病甚至死亡。因此,对于基因修饰动物需要申请者详细描述可能产生的症状以及应对措施,还需增加对动物观察的频次,以便及时发现非预期的影响动物福利的事件发生(见表 3)。

表 4 联合法审查要点

Tab. 4 Key points of combining method review

类型	方法	审查要点	评价方法
结扎法配合正畸法建立牙周病正畸治疗	丝线结扎法制备牙周炎模型 抗生素治疗牙周病 对患牙周炎牙齿进行正畸治疗	1. 丝线结扎法审查要点 2. 治疗过程需麻醉,麻醉方案的审查要点 3. 抗生素种类、浓度、注射频率、注射周期	1. 牙周病动物模型的评价方法 2. 评估牙周病的治疗效果 3. 正畸动物模型的评价方法
细菌接种法联合特定饮食法建立龋病模型	口腔接种致龋细菌变形链球菌、唾液链球菌或发酵乳杆菌,并辅以特定致龋饮食,制备龋病动物模型	1. 内源性细菌抑制的审查要点 2. 细菌接种审查要点 3. 特殊饮食审查要点	1. 评估内源性细菌抑制效果 2. 整体评估对动物的影响 3. 龋损评定;龋损范围、深度

7 口腔疾病动物模型评价

动物模型是否成功决定了动物模型的质量,对模型进行评价需要不同类型的评价指标互相验证。模型评价指标有动物基本信息、表观指标、病理指标、生化指标和影像学指标等。实际文章发表或伦理申请中对动物基本信息的重视程度不足,如对动物性别没有说明,或仅选择单一性别而没有说明原因^[8]。很多口腔模型评价研究缺少动物性别、动物体重变化^[15]等方面的描述,使读者无法客观、准确地评估其真实性和学术价值^[16]。例如,单纯饲喂高糖黏性食物,有报道 12 周后出现牙周炎^[17],也有报

6.4 联合法

不同建模方法联合使用更能模拟口腔疾病的病因学,可较快诱导口腔出现疾病的各种反应。例如,用丝线结扎法建立大鼠牙周炎模型后再对患牙周炎的牙齿进行正畸矫正,以模拟人类用正畸的方法治疗牙周炎^[13]。该项目伦理审查的要点包括 3 个方面:① 牙周炎模型的审查要点;② 牙周炎治疗。需麻醉大鼠或小鼠,去除丝线,牙周切口、翻瓣,刮除炎性组织,修整袋内壁,在龈沟内注射抗生素,评估牙周炎治疗情况;③ 正畸牙移动审查要点。龋病动物模型通常采用变形链球菌、唾液链球菌或发酵乳杆菌辅以致龋饮食进行制作^[14](见表 4)。为了避免动物体内致龋菌对模型效果和评价的影响,在接种致龋菌前饲喂含抗生素的饲料和饮水,致龋饲料的伦理审查要点同高糖黏性饲料,饮水的伦理审查要点与化学药品的配置、使用类似。后续采用致龋细菌中的变形链球菌属《人间传染的病原微生物目录》中第三类传染病病原体,感染动物实验需在 ABSL-2 内进行。

道 4~6 周就出现牙周炎,并在 3 个月后可发展为重度牙周炎^[18]。同一模型不同实验室得出的结果相差甚大,需要对建模过程中的详细过程进行剖析,才能分析出差异原因。实验动物研究报告的国际指南中要求每一个动物实验都应该对动物的品种或品系、年龄、体重、性别、分组、样本量、健康状态等进行说明并评价,读者和审稿人只有依靠这些内容才能评估研究结果的可靠性。表观指标在临床诊断中占重要地位,如牙周炎诊断需进行牙龈指数、龈沟出血指数、菌斑指数、牙周袋深度、龈沟液渗出水平等进行观察^[7],龋齿动物模型主要评估龋损的程度^[14]。组织病理指标有 HE 染色、免疫组化

等直接证据,如确定牙周病须观察到牙周袋形成、牙槽骨吸收、病理性成骨^[7]。生化指标的变化并不是一直出现,属间接相关指标^[19]。CT、磁共振、活体成像等影像学技术在动物模型评价方面也提供了较为可靠的证据,尤其在活体动物上的连续观察更直观,也是伦理原则优化的体现。申请者在提交伦理申请时应按照疾病的特点提供模型的评价方法和指标,表1~4的评价方法可供参考。

8 模型构建过程中共性考量内容

8.1 麻醉和镇痛

动物实验中,有效的麻醉不仅是保证实验顺利进行的关键环节,也是保证实验动物福利的基本要求。通常假设人类身上感到疼痛的事件也会发生在动物身上。如何根据研究目的采用合适的麻醉方案是动物实验顺利进行的重要前提。麻醉方案的选择应从是否需要麻醉、麻醉药品、麻醉方式等方面考虑。美国《实验动物饲养管理及使用指南(Guide)》以及美国农业部(USDA)将实验动物所承受的疼痛分为B、C、D、E四个等级,C、D等级的疼痛或痛苦需要申请者在实验方案中详细描述手术或操作过程,C等级的疼痛可以不使用麻醉药物,而D等级的操作需要选择合适的麻醉方案。本文中所列的口腔疾病动物模型中饲喂特殊食物、饮水中添加特殊物质和皮下注射肿瘤细胞一般作为C级疼痛处理,而其他的建模方法则被认为是D级疼痛,需要选择合适的麻醉药和麻醉方式。麻醉药物的选择需要遵守《中华人民共和国药品管理法》《麻醉药品和精神药品管理条例》《兽药管理条例》《兽用麻醉药的供应、使用、管理办法》《兽用处方药和非处方药管理办法》等相关法律法规,防止麻醉药品和精神类药品滥用,使用正规兽药。如因实验需要使用非药物级别麻醉剂或无法购买到正规兽用麻醉药品,需向实验动物管理(伦理)委员会(IACUC)提供使用非药用级别麻醉药的理由,并在得到批准后方可使用。有些实验操作会影响麻醉方式的选择,如口腔原位肿瘤的接种或口腔溃疡模型的观察就不适合选用气体麻醉,这是因为气体麻醉需要配合面罩才能产生持续的麻醉效果,而麻醉面罩的存在会影响对口腔的观察和操作,故需要申请者仔细评估麻醉方案的可行性。有些实验还需考虑麻醉

药是否会影响实验目的。例如,右美托咪定作为镇定镇痛剂常与舒泰配合对大小鼠进行联合麻醉,但同时右美托咪定也广泛用于脓毒症的治疗,在研究脓毒症的动物模型中应慎用右美托咪定。

8.2 仁慈终点

仁慈终点的定义随着动物福利观念和技术发展不断变化,早期的定义为:能反映实验动物遭受严重疼痛、痛苦或濒临死亡最早的指标,也就是在所提及指标出现时提前对动物实施安乐死。随着“3R”原则的普及,仁慈终点逐步被看作优化原则的具体应用^[20],定义演变为:考虑人道对待动物的要求和实验要求,合理终止动物用于实验的时机。仁慈终点提供了导致动物无法缓解或严重痛苦和疼痛(包括死亡)的实验终点的替代方案,现已纳入实际伦理审查和监督工作中。刘晓宇等^[20]详细论述了实施仁慈终点的判断标准、具体内容和执行标准。通常要求申请者在提交伦理申请时就提供仁慈终点的标准,一旦研究的科学目标达到,即根据既定标准实施仁慈终点,但是如果动物出现诸如:①无法行走或保持直立而导致无法轻松获取食物和水;②严重消瘦的迹象;③皮肤严重溃烂或出血;④濒死的状态等严重症状时,无论是否达到科学目标都应该被立刻执行仁慈终点,包括安乐死。申请者在实验方案中应详细描述可能出现影响动物福利的评价指标和执行标准,以及这些动物是继续参与实验、采取减轻症状的措施、从实验处理中移除还是采用仁慈终点,包括安乐死。

8.3 动物实验中废弃物的处理

为保障相关人员的身体健康和保护环境,必须对动物尸体及其组织、相关的试剂、耗材和动物排泄物进行分类处理。根据《中华人民共和国固体废物污染环境防治法》《中华人民共和国生物安全法》《国家危险废物名录》《医疗废物管理条例》《医疗废物分类目录》和《病原微生物实验室生物安全管理条例》等法律法规、部门规章的规定,废弃的医学实验动物的组织和尸体属于医疗病理性废物,应由有资质的医疗废弃物集中处置单位处理。药物性废物和化学性废物可分别按照《国家危险废物名录》中HW03类和HW49类进行处置。涉及病原微生物的实验动物尸体及其废弃物需要进行无害化处理后再按照医疗废物处理。取得实

验动物使用许可证的单位,都已经与具有上述废物处理资质的单位签订了服务合同,故要求申请者及时了解具体的标准操作流程,在伦理申请中体现并遵照执行。

9 结论

利用实验动物开展科学研究的种类千差万别,故实验动物伦理和福利审查涉及的范围和内容众多,审查者很难对全部内容非常熟悉。而研究人员,尤其是动物实验经验不足的研究人员,可能在设计实验方案时忽略实验动物福利和伦理的某部分内容,而降低实验结果的可信度。本文详述了实验动物伦理和福利审查在口腔疾病动物模型中关注的重点和审查的顺序。从实验开展的必要性、合法性、合理性,到不同实验方法审查的要点,不仅评估整个实验过程中实验动物福利和动物实验伦理,还评估动物实验的开展对环境和人员的影响。希望通过本文的梳理,给人类疾病模型的研究者或审查者提供一些参考。但每个实验都有其独特性,对动物福利和伦理的认知也在不断变化中,越来越多的动物实验替代方法也在快速地开发和推广。因此,任何动物实验在开展前均需提交有针对性的伦理审查内容,并得到 IACUC 的批准。

利益冲突声明: 无。

作者贡献声明: 邢凤英负责论文构思和撰写;赵勇负责伦理和福利政策法规的解读,并对论文结构和内容提出关键性修改建议。

参考文献:

[1] NAZIR M, AL-ANSARI A, AL-KHALIFA K, *et al.* Global prevalence of periodontal disease and lack of its surveillance [J/OL]. *Sci World J*, 2020, doi: 10.1155/2020/2164160.

[2] VERGNES JN, MAZEVET M. Oral diseases: A global public health challenge [J]. *Lancet*, 2020, 395(10219): 186.

[3] 朱双, 汤帅, 丁刚. 口腔菌群与口腔疾病及全身性疾病关系的研究进展[J]. *中国医药导报*, 2023, 20(18): 35-38.

[4] 桂益欣, 蒋辉, 张雷, 等. 医学研究生动物实验伦理认知考察:以雄性连体鼠受孕为例[J]. *医学与哲学*, 2023, 44(1):

25-29.

[5] 姚丽艳, 王文瑜, 钟泉, 等. 大鼠实验性牙周病模型的建立及组织学评价[J]. *福建医药杂志*, 2009, 31(3): 63-65.

[6] 龙茜, 管晓燕, 刘建国. 正畸牙移动的实验模型研究进展[J]. *遵义医学院学报*, 2019, 42(2): 227-231.

[7] 陈亚伟, 王晖. 牙周病实验动物模型的建立和应用[J]. *现代食品与药品杂志*, 2006(1): 12-15.

[8] 曹策, 李玲美, 訾明杰, 等. 医学研究中动物实验样本量的确定方法[J]. *中国比较医学杂志*, 2023, 33(2): 99-105.

[9] 宋忠臣, 束蓉. 实验性牙周炎动物模型的研究进展[J]. *牙体牙髓牙周病学杂志*, 2005, 15(10): 577-581.

[10] 李晶, 于大海, 卿海云, 等. 4-NQO 饮水法构建 Balb/c 小鼠口腔癌及淋巴道转移模型[J]. *广西医科大学学报*, 2012, 29(4): 515-518.

[11] 王圣翔, 强煜云, 布培培. 内毒素致病机理及防治研究进展[J]. *畜牧产业*, 2021(11): 73-75.

[12] WORKMAN P, ABOAGYE EO, BALKWILL F, *et al.* Guidelines for the welfare and use of animals in cancer research [J]. *Br J Cancer*, 2010, 102(11): 1555-1577.

[13] 周芳, 唐成芳, 曾辉, 等. 牙齿移动对静止期牙周病动物模型牙槽骨的影响[J]. *山西医科大学学报*, 2020, 51(7): 660-665.

[14] 谢雪洁, 吴泽钰, 宋洁, 等. 苦参提取物防龋作用的动物实验研究[J]. *现代口腔医学杂志*, 2022, 36(1): 1-5.

[15] BASSON AR, COMINELLI F, RODRIGUEZ-PALACIOS A. 'Statistical irreproducibility' does not improve with larger sample size: how to quantify and address disease data multimodality in human and animal research [J]. *J Pers Med*, 2021, 11(3): 234.

[16] 张俊彦, 刘晓宇, 李焱, 等. 动物实验研究报告的国际指南 ARRIVE 2.0 介绍及期刊实施计划[J]. *实验动物与比较医学*, 2023, 43(1): 86-94.

[17] ESCARTIN Q, LALLAM-LAROYE C, BAROUKH B, *et al.* A new approach to treat tissue destruction in periodontitis with chemically modified dextran polymers [J]. *FASEB J*, 2003, 17(6): 644-651.

[18] IWAMA A, NISHIGAKI N, NAKAMURA K, *et al.* The effect of high sugar intake on the development of periradicular lesions in rats with type 2 diabetes [J]. *J Dent Res*, 2003, 82(4): 322-325.

[19] 谢欣序, 刘鹏, 贾静, 等. 几种抗癌化疗药物致大鼠口腔溃疡模型的比较研究[J]. *中国药理学通报*, 2021, 37(2): 289-295.

[20] 刘晓宇, 卢选成, 贺争鸣. 实验动物仁慈终点技术研究的发展与应用[J]. *实验动物科学*, 2016, 33(2): 54-60.