

· 述 评 ·

# 小型猪作为耳科新型动物模型在中国的建立与应用

伊海金

[摘要] 动物实验模型在生物医学研究领域占有重要地位,由于猪及小型猪的解剖、基因及病理生理与人类相似,目前已广泛应用于医学领域。近年来在耳科学研究中,尤其是在中国,猪及小型猪作为新型耳科动物模型已经建立并开始系统应用,显示出较其他动物模型的明显优势,为耳科学基础研究开辟崭新领域。

[关键词] 小型猪;耳科学;动物模型

[中图分类号] R764

[文献标志码] A

[文章编号] 2095-3097(2021)04-202-4

doi: 10.3969/j.issn.2095-3097.2021.04.001

## The establishment and application of miniature pigs as new otologic animal models in China

YI Haijin

(Department of Otolaryngology, Head & Neck Surgery, Beijing Tsinghua Changgeng Hospital, Tsinghua University School of Clinical Medicine, Beijing 102218, China)

[Abstract] Animal models are very important in biomedical research. Pigs and miniature pigs had drawn widespread attention in the field of medical science because of their high degree of similarity to humans in anatomy, genetics, and pathophysiology. In otology research, pigs and miniature pigs had been established and applied systematically as the new otologic animal models especially in China, and had shown obvious advantages over other animal models and opened a new field for the basic research of otology.

[Key words] Miniature pigs; Otology; Animal models

耳科学是以研究听觉与平衡系的重要学科,其常见疾病为耳聋与眩晕,我国目前有耳聋患者2 700万人,其中聋哑人200多万,并以每年3万多的数量在增长;眩晕更是临床常见的症状,眩晕的患病率为0.5%,约占内科门诊的5%、耳鼻咽喉科门诊15%,70岁以上的男性及女性老人眩晕的发病率分别达47%和61%。耳聋及眩晕给个人、家庭及社会带来巨大的痛苦和沉重负担,加强耳科学的基础与临床研究,尤其是拓展耳聋及眩晕基础研究,创新耳聋与眩晕的治疗技术是解决上述问题的关键所在。医学创新研究往往需要动物实验验证,动物模型在生物医学研究中占有重要地位。因此,寻找合适的动物模型至关重要。

动物模型指用于生物医学领域的实验动物,以进行相关疾病及其他科学问题研究,目前啮齿类动物应用最为广泛。啮齿类动物模型存在的主要问题是与人亲缘关系较远,其遗传、体型以及寿命与人类存在较大差异<sup>[1]</sup>,限制了在人类疾病、药物开发以及治疗方面的应用。非人类灵长类动物与人类

亲缘关系近,但存在伦理问题,并且应用费用昂贵、技术复杂、资源匮乏<sup>[1]</sup>。大量研究表明,猪与人的氨基酸同源性达84.1%,在解剖结果、生理代谢以及疾病发生机理上与人有很多相似之处<sup>[2]</sup>,目前在动物实验领域应用日趋广泛。

### 1 猪及小型猪动物模型在医学及耳科学领域的应用概述

以猪作为人类疾病动物模型的研究目前主要包括循环系统疾病、器官移植、神经系统疾病、糖尿病、皮肤病、遗传性疾病及肿瘤等领域,对于开展医学基础研究及创新临床新技术应用发挥重要作用<sup>[3-4]</sup>。尤其是自1949年明尼苏达州小型猪在Hormel研究所应用以来<sup>[5]</sup>,因其体型较小,操作方便,具有与人类在基因、解剖和生理上的相似性以及经济学、伦理学方面的优势,小型猪作为大型动物模型已经广泛应用于生物医学研究领域<sup>[6]</sup>。

在耳科学领域,新西兰兔、豚鼠、沙鼠等小型哺乳动物都是传统的耳科实验动物模型<sup>[7-10]</sup>,其中常

[基金项目] 国家重点研发计划(2020YFC2005203);北京市属医院科研培育计划(PX2017046)

[作者单位] 102218 北京,清华大学附属北京清华长庚医院耳鼻咽喉头颈外科,清华大学临床医学院(伊海金)

用动物模型是啮齿类动物,因其体型及内耳体积较小,发育成熟晚,解剖结构与人类差异较大,阻碍了此类动物模型在耳科领域的进一步应用。由于猪与人类存在诸多相似性,诸多学者开始初步探索猪在耳科动物实验中的应用。Ikarashi等<sup>[11-12]</sup>以猪为模型进行了中耳炎与乳突气化之间相关性研究,也有部分学者应用猪模拟人类中耳手术进行中耳手术教学训练<sup>[13-14]</sup>。此外,还有学者对猪听觉功能的初步研究,Hansen等人<sup>[15]</sup>在1992年研究高胆红素血症对新生仔猪听觉诱发电位的影响,在实验过程中清晰的记录到新生仔猪听觉脑干反应。与在其他医学领域广泛应用相比,猪在耳科动物实验领域的应用并没有形成体系,而且应用对象仅限于家猪,在世界范围内没有应用小型猪耳科动物模型的报道。

## 2 小型猪耳科动物模型在中国的建立及应用

国内关于小型猪在耳科领域内的应用主要集中在中国人民解放军总医院耳鼻咽喉头颈外科杨仕明、郭维维团队,该团队通过创新研究,在国际上率先提出并证明了小型猪是耳科疾病研究最为理想的实验动物,并系统应用小型猪开展耳聋及眩晕发病机制、新型治疗技术实验研究,为耳聋及眩晕基础研究开创新领域。

### 2.1 小型猪耳部形态学、发育学、听力学和前庭功能及电生理研究为小型猪耳科动物模型建立奠定基础

#### 2.1.1 小型猪颞骨及耳部显微解剖

通过对小型猪颞骨及耳部进行显微解剖研究,目前已证实小型猪颞骨结构中的中耳、内耳、面听神经及外侧隐窝和人类耳部具有高度相似性。通过对小型猪的外耳、中耳、内耳及外侧隐窝的形态观察和数据测量发现<sup>[16-17]</sup>:小型猪的中耳包括鼓室6壁,其上壁、外壁、内壁、前壁与人类类似,下壁为乳突,后壁为半规管,与人类不同,鼓室内听骨、面神经及其分支的位置、毗邻均类似人类;小型猪耳蜗为3转半,除此不同之处以外,其耳蜗、前庭及半规管的形态、位置均与人类相似;小型猪的脑干耳蜗核的形态、结构及毗邻,包括外侧隐窝、脉络丛及听面束等神经的形态、位置及毗邻与人类类似,其Luschka孔位于绒球、二腹叶和舌咽神经根部围成的三角形内<sup>[16-17]</sup>。另外,侯昭晖等<sup>[18]</sup>通过对小型猪咽鼓管的研究也证实小型猪是咽鼓管研究的理想动物模型。

#### 2.1.2 小型猪内耳形态及发育

猪耳蜗感觉上皮的

分化首先从底圈开始,再到蜗管中部,然后逐渐向顶圈进行,这与人类耳蜗发育及功能的建立具有相似性<sup>[19]</sup>。通过形态学研究发现:耳蜗螺旋器和螺旋神经节的结构与人类相似,猪的螺旋器包含毛细胞、柱细胞、Deiters'细胞、Hensen's细胞、Böttcher细胞(人类除外)和内外沟细胞。另外,猪耳蜗具有与人类相似的4排毛细胞的排列方式,不同之处在于顶回毛细胞的静纤毛呈束状排列且较长;其前庭毛细胞呈树枝状排列,并且有耳石覆盖<sup>[20]</sup>。以上研究证实,小型猪内耳的发育与形态学与人类极其类似。

#### 2.1.3 小型猪听觉与前庭电生理

在对小型猪形态学研究的基础之上,通过研究小型猪听阈及敏感听力范围发现:小型猪与人类听性脑干电位的特性比较发现猪都可以分化出7个波,但猪以II波和V波最显著,人以V波最显著,其ABR波形、潜伏期与人极为相似<sup>[21-22]</sup>,啮齿类的动物只能分化出I~V波,说明在整个听觉传导通路上,猪与人有相似的神经核团,而鼠有所缺失。同时对小型猪的耳蜗内电位进行测试,为今后以小型猪为模型进行耳科疾病的外科治疗实验及电生理测试奠定基础。另外对前庭系统也进行系统研究<sup>[23-24]</sup>,探索小型猪肌源性诱发前庭电位的最佳检测方法,并得出结论,小型猪颈部伸肌和咬肌在强声下诱发的肌源性电位潜伏期和阈值均一致,其咬肌位置表浅,便于定位,更易于肌源性诱发电位的记录。以上研究为通过小型猪开展前庭疾病研究奠定基础。

### 2.2 以小型猪为动物模型开展各种耳聋模型及耳聋机制研究

通过小型猪形态及内耳研究,成功构建了新型耳科动物模型,以此动物模型为基础,进一步构建不同类型耳聋模型并进行耳聋与眩晕的基础研究。如通过噪声暴露方法、乙基亚硝基脲(N-ethyl-N-nitrosourea, ENU)化学诱变方法和基因编辑技术构建了小型猪噪声性聋、Mondini畸形、单侧聋、MITF基因突变、大前庭水管综合征等一系列小型猪模型,为研究噪声性耳聋及遗传性耳聋发病机制奠定了基础<sup>[25]</sup>。

#### 2.2.1 噪音性聋

应用脉冲式火花噪声仪对正常小型猪进行噪声暴露,首次成功的建立了小型猪噪声性聋动物模型,分析噪声性聋小型猪听功能及内耳形态的特点,填补了大型哺乳动物噪声性聋动物模型的空白。在此基础之上,尝试应用mPEG-PLGA-BSA-FITC-NPs纳米颗粒进行小型猪噪声性聋动物模型的内耳导入研究,为未来大型哺乳动物听功能干预研究提供重要的研究基础<sup>[26]</sup>。

#### 2.2.2 遗传性聋

在小型猪耳科动物模型的建立与

应用过程中,科研团队定位、克隆出一种自发性先天性耳聋猪模型的致病基因,其临床表现与人类 Waardenburg 综合征 2A 型的特点类似<sup>[20]</sup>,通过研究证实其发病机制可能是由于 MITF-M 型基因突变,其内耳血管纹中间细胞缺失、毛细胞缺失、蜗管发育异常、螺旋神经节数量减少,导致其耳蜗内电位异常、听性脑干反应电位不能引出,为研究该病的机制和治疗提供了天然的模型<sup>[27-28]</sup>,对于研究干细胞移植等耳聋治疗措施的途径和方法也具有很大的帮助<sup>[29]</sup>。另外,通过 ENU 化学诱变小型猪的方法获得白色耳聋突变小型猪,并建立家系,对该家系的表型、听力及内耳形态学等方面进行评估,首次发现 Mondini 畸形小型猪模型及家系,为 Mondini 畸形的进一步研究提供了宝贵的动物模型。小型猪动物模型将为人遗传性聋的致病机理研究、临床治疗及药物筛选等提供重要的生物工具<sup>[29]</sup>。

**2.2.3 听神经病** 通过实验研究发现 ouabain 溶液对小型猪螺旋神经节细胞有损伤,可导致听阈明显提高,且损伤程度具有浓度依赖性,但 ouabain 对毛细胞的影响不明显,此研究结果有助于通过使用 ouabain 溶液建立小型猪的听神经病动物模型。后续实验会进一步研究应用 ouabain 溶液时畸变产物耳声发射 (distortion product otoacoustic emissions, DPOAE)、耳蜗微音器电位 (cochlear microphonics, CM) 及内耳形态学等指标的变化,有望成功的建立人类听神经病的小型猪动物模型<sup>[30]</sup>。

### 2.3 以小型猪为动物模型开展人工听觉植入研究

**2.3.1 人工耳蜗植入** 动物实验是验证新型人工耳蜗的必要步骤,小型猪耳蜗与人类类似,可以直接应用人类耳蜗电极进行植入实验,是非常合适的人工耳蜗实验动物模型<sup>[31-32]</sup>。传统耳蜗动物模型包括猫、豚鼠等,产生的实验数据不能完全反映人类用电极真实情况。通过用小型猪模型进行电子耳蜗植入研究,将国产电子耳蜗样机植入小型猪耳内,检验产品的安全性、有效性和稳定性,为临床患者的实际应用奠定基础,同时初步获得了耳聋猪的听力恢复数据<sup>[33]</sup>,为建立人工耳蜗大型哺乳动物实验植入平台奠定基础。

**2.3.2 听觉脑干植入** 对于蜗后病变,包括螺旋神经节、听神经以及听觉中枢病变需要人工听觉脑干植入进行干预。经迷路入路提供最直接的进入耳蜗核及相关解剖的路径<sup>[32]</sup>,其手术复杂、风险较高,小型猪的听觉脑干结构类似于人类,通过在小型猪上模拟进行 ABI 的过程,可以进行手术模拟训练并验证效果,为临床应用奠定基础。

### 2.4 以小型猪为动物模型开展前沿治疗方法探索

**2.4.1 干细胞治疗耳聋研究** 随着干细胞技术快速发展,干细胞移植治疗耳聋在小型猪动物模型中已取得一定进展。目前存在的主要问题包括移植路径的优化,既可将细胞移植损伤部位又可最大程度减小内耳损伤<sup>[34]</sup>。

目前已开展通过小型猪腰椎蛛网膜下腔穿刺-脑脊液途径移植干细胞治疗螺旋神经节细胞以及听神经的病变。实验研究发现经蛛网膜下腔注射途径移植人脐带间充质干细胞可以迁移至耳蜗,并对其听性脑干反应造成影响<sup>[35]</sup>。对于毛细胞、听神经都有病变的感音神经性耳聋,干细胞移植联合植入人工耳蜗,有望达到更好重建听力的效果。

**2.4.2 基于活体基因组编辑的基因治疗技术探索** 在成功建立小型猪耳聋动物模型基础之上,探索基因治疗的相关研究<sup>[36]</sup>,包括利用腺相关病毒 (adeno-associated virus, AAV) 将 CRISPR/Cas9 导入到早期 MITF<sup>-/-</sup> 荣昌猪的内耳组织中,以期修复 MITF 基因的突变,实现基因治疗。目前为实现 CRISPR/Cas9 在猪基因组中的高效、定点编辑,已利用猪的成纤维细胞在体外水平筛选出针对荣昌猪突变的高效切割位点,基因组编辑的效率可达到约 50%。下一步的工作将集中于 CRISPR/Cas9 的导入时机和方式以及导入后表型变化的测定<sup>[36]</sup>。

随着对猪与人类在解剖和功能方面相似性的认识逐步加深,小型猪作为耳科新型动物模型应用日趋成熟,开辟了耳科动物模型的全新领域,有可能引起耳科学基础研究革命性变化。以此为基础建立的各种耳聋、眩晕发病机制研究平台、人工耳蜗植入实验平台、干细胞及基因治疗实验平台,具有基础医学向临床医学应用转化的价值,在听觉及前庭基础研究以及临床耳病相关研究方面的应用前景十分广阔。目前由于小型猪新型耳科动物模型出现较晚,应用不够广泛,尚需进一步加强其在耳科研究中的推广与应用。

### 【参考文献】

- [1] Bassols A, Costa C, Eckersall PD, et al. The pig as an animal model for human pathologies: A proteomics perspective [ J ]. Proteomics Clin Appl, 2014, 8(9-10):715-731.
- [2] Fang X, Mou Y, Huang Z, et al. The sequence and analysis of a Chinese pig genome [ J ]. GigaScience, 2012, 15( 1 ): 16.
- [3] Bellinger DA, Merricks EP, Nichols TC. Swine models of type 2 diabetes mellitus: insulin resistance, glucose tolerance, and cardiovascular complications [ J ]. JILAR J, 2006, 47( 3 ): 243-258.
- [4] Prescott MF, McBride CH, Hasler-Rapacz J, et al. Development of complex atherosclerotic lesions in pigs with inherited hyper-LDL cholesterolemia bearing mutant alleles for apolipoprotein B

- [ J ]. *Am J Pathol*, 1991, 139( 1 ): 139—147.
- [5] England DC, Winters LM, Carpenter LE. The development of a breed of miniature swine; a preliminary report[ J ]. *Growth*, 1954, 18(4): 207 - 214.
- [6] Polejaeva IA, Chen SH, Vaught TD ,et al. Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells[ J ]. *Nature*, 2000, 407 (6800): 86 - 90.
- [7] Bakaletz LO. Chinchilla as a robust, reproducible and polymicrobial model of otitis media and its prevention[ J ]. *Expert Rev Vaccines*, 2009, 8(8): 1063 - 1082.
- [8] Goksu N, Hazirolu R, Kemalolu Y, et al. Anatomy of the guinea pig temporal bone[ J ]. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, 1992, 101 (8): 699 - 704.
- [9] Schwager K. Titan als Gehörknöchelchensatzmaterial. In vivo-Untersuchungen im Mittelohr des Kaninchens und Untersuchungen zur Proteinadsorption am Implantatmaterial, Medizinische Fakultät, Julius-Maximilian-Universität, Würzburg, 1998.
- [10] Stieve M, Hedrich HJ, Battmer RD, et al. Experimental middle ear surgery in rabbits: a new approach for reconstructing the ossicular chain [ J ]. *Lab Animal*, 2009; 43(2): 198 - 204.
- [11] Ikarashi H, Nakano Y. The effect of chronic middle ear inflammation on the pneumatization of the tympanic bulla in pigs[ J ]. *Acta Otolaryngol*, 1987, 104(1-2):130-137.
- [12] Ikarashi F, Nakano Y, Okura T. The relationship between the degree of chronic middle ear inflammation and tympanic bulla pneumatization in the pig as animal model[ J ]. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 1994; 251(2):100-104.
- [13] Pracy JP, White A, Mustafa Y, et al. The comparative anatomy of the pig middle ear cavity: a model for middle ear inflammation in the human? [ J ]. *J Anat*, 1998, 192: 359 - 368. Pracy JP, White A, Mustafa Y, Smith D, Perry ME. The comparative anatomy of the pig middle ear cavity: a model for middle ear inflammation in the human? *J Anat*. 1998, 192 ( Pt3):359-368.
- [14] Gurr A, Kevenhörster K, Stark T, et al. The common pig: a possible model for teaching ear surgery[ J ]. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 2010, 267(2):213 - 217.
- [15] Hansen TW, Cashore WJ, Oh W. Changes in piglet auditory brainstem response amplitudes without increases in serum or cerebrospinal fluid neuron-specific enolase[ J ]. *Pediatr Res*, 1992, 32(5):524-529. 134(1)(2014), 26-33.
- [17] Haijin Yi, Weiwei Guo, Lei Chen, et al .Microdissection of Miniature Pig Ear[ J ].*Journal of Otology*, 2013, 8(2): 91-96.
- [18] Feng-Wei An, Hu Yuan, Weiwei Guo, et al .Establishment of a Large Animal Model for Eustachian Tube Functional Study in Miniature Pigs[ J ].*Anat Rec*, 2019, 302(6):1024-1038.
- [19] Qinghua Wang, Yan Zhang, Weiwei Guo, et al . Transcription analysis of cochlear development in minipigs[ J ].*Acta Oto-Laryngologica*, 2017, 137(11): 1166-1173.
- [20] 任丽丽. 白化荣昌猪耳聋的分子病理机制研究[D]. 解放军医学院, 2013.
- [21] XIE Yafang, LIN Chang, MA Long, et al. A Characteristics Comparison of Auditory Brainstem Response on Minipig and Human [ J ]. *Chinese Journal of Otology*, 2014, 12(3):485-489.
- [22] Weiwei Guo, Lei Chen, Dengke Li, et al .Endocochlear Potential and Potassium Concentration Recording in Minipig Cochlea[ J ]. *Journal of Otology*, 2012, 7(2):103-105.
- [23] Ya Li, Yan Zhang, Shiwei Qiu, et al .Vestibular-Evoked Myogenic Potentials Recorded from Miniature Pigs and Rats[ J ].*Journal of Otology*, 2016, 11(3):138-143.
- [24] 李亚, 张悦, 赵立东, 等. 小型猪肌源性诱发前庭电位的检测, 中华耳科学杂志, 2016, 14(1):21-26
- [25] Hai T, Guo W, Yao J, et al. Creation of Miniature Pig Model of Human Waardenburg Syndrome Type 2A by ENU Mutagenesis[ J ].*Human Genetics*, 2017 136(11-12):1463-1475.
- [26] 陈志婷, 吴南, 邓雄威, 等. mPEG-PLGA-BSA-FITC-NPs 纳米载体体外安全性与有效性评估, 临床耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2015, 29(1):48-51.
- [27] Graw J, Pretsch W, Löster J. Mutation in intron 6 of the hamster *Mitf* gene leads to skipping of the subsequent exon and creates a novel animal model for the human Waardenburg syndrome type II[ J ]. *Genetics*, 2003, 164(3):1035-1041.
- [28] Opdecamp K, Vanvooren P, Riviere M, et al. The rat microphthalmia-associated transcription factor gene(*Mitf*) maps at 4q34-q41 and is mutated in the mib rats[ J ]. *Mamm Genome*, 1998, 9(8): 617-621.
- [29] 马玥莹. 间充质干细胞治疗感音神经性耳聋的实验研究[D]. 南开大学, 2014.
- [30] 张雪茹, 杨仕明, 李登科, 等. 不同浓度 Ouabain 对贵州小型猪内耳形态及听力的影响[ J ]. *中华耳科学杂志*, 2013, 11(2): 279-283.
- [31] Ling-Ling Zhong, Yan Zhang, Xiao-Jie Liang, et al . Inner ear structure of miniature pigs measured by multi-planar reconstruction techniques[ J ]. *American Journal of Translational Research* , 2018 , 10 ( 3 ) : 709-717.
- [32] Haijin Yi, Weiwei Guo, Wei Chen, et al . Miniature pigs: a large animal model of cochlear implantation[ J ] *American Journal of Translational Research*, 2016, 8(12):5494-5502.
- [33] Wei Chen, Haijin Yi, Liang Zhang, et al . Establishing the standard method of cochlear implant in Rongchang pig[ J ]. *Acta Oto-Laryngologica*, 2017, 137(5): 503-510.
- [34] Xu L, Yuan S, Chen W, et al . Transplantation and tracking of the human umbilical cord mesenchymal stem cell labeled with superparamagnetic iron oxide in deaf pigs[ J ]. *Anat Rec*, 2020, 303(3): 494-505.
- [35] Ma Y, Guo W, Yi H, et al . Transplantation of human umbilical cord mesenchymal stem cells in cochlea to repair sensorineural hearing[ J ]. *American Journal of Translational Research*, 2016, 8 (12):5235-5245.
- [36] Ji XJ, Chen W, Wang X, et al . Canalostomy is an ideal surgery route for inner ear gene delivery in big animal model[ J ]. *Acta Otolaryngol*, 2019, 139(11): 939-947