

超微结构病理学在药物非临床安全性评价毒理学研究中的应用现状和关注点

王 娅^{1*}, 郑少秋^{1, 2, 3*}, 钱 庄¹, 闫振龙¹, 胡文元¹, 钟小群¹, 胡 静¹, 李一昊¹, 陈晓俊¹, 彭瑞楠¹, 李 慧¹, 葛建雅¹, 缪成贤¹, 邵 薇¹, 张亚群^{1*}, 吕建军^{1*}

1. 益诺思生物技术南通有限公司, 江苏 南通 226133

2. 江西中医药大学, 江西 南昌 330103

3. 长三角药物高等研究院, 长三角药学高等工程学院, 江苏 南通 226133

摘 要: 超微结构病理学是药物非临床毒理学研究中毒性病理学评估的重要辅助工具。简要介绍了超微结构病理学在药物非临床安全性评价毒理学研究中的应用现状和关注点, 并举例说明了透射电子显微镜等超微结构病理学技术在药物非临床安全性评价中的应用。目前, 超微结构病理学技术在药物非临床毒理研究中虽然使用率不高, 却是非临床毒理学研究中毒性病理学评估的重要辅助工具, 可用于对光学显微镜检查结果的进一步研究, 以作为早期药物发现和非临床安全性评价毒理学研究的有益补充。在使用超微结构病理学技术进行药物非临床毒理学研究时, 应关注其使用的必要性、良好实验室规范 (GLP) 依从性、专业性、科学性和使用局限性等方面。

关键词: 超微结构病理学; 毒性病理学; 透射电子显微镜; 非临床毒理学研究; 药物安全性评价

中图分类号: R965.3 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2022) 08-1487-06

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2022.08.004

Current practices and points to consider for use of ultrastructural pathology in toxicology studies during nonclinical safety evaluation of drugs

WANG Ya¹, ZHENG Shaoqiu^{1,2,3}, QIAN Zhuang¹, YAN Zhenlong¹, HU Wenyan¹, ZHONG Xiaoqun¹, HU Jing¹, LI Yihao¹, CHEN Xiaojun¹, PENG Ruinan¹, LI Hui¹, GE Jianya¹, MIAO Chengxian¹, SHAO Wei¹, ZHANG Yaquin¹, LYU Jianjun¹

1. Innostar Biotechnology Nantong Co., Ltd, Nantong 226133, China

2. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330103, China

3. Yangtze Delta Advanced Research Institute, Yangtze Delta Pharmaceutical College, Nantong 226133, China

Abstract: Ultrastructural pathology is an essential auxiliary tool for the assessment of toxicologic pathology in nonclinical toxicology studies of drugs. This paper briefly introduces the current application status and points to consider of ultrastructural pathology in toxicology studies during nonclinical safety evaluation of drugs, and exemplifies the application of ultrastructural pathology techniques such as transmission electron microscope (TEM) in nonclinical safety evaluation of drugs. At present, although the ultrastructural pathology technology has a low usage rate in nonclinical toxicology studies, it is an essential auxiliary tool for the evaluation of toxicologic pathology in toxicology studies of drugs. As a useful complement to drug discovery and nonclinical safety evaluation of drugs, it can be used for the further research on the results of light microscopy. Attention should be paid to the necessity of use, compliance with good laboratory practice (GLP), professionalism, scientific nature and the limitations when using ultrastructural pathology techniques for nonclinical toxicology studies of drugs.

Key words: ultrastructural pathology; toxicologic pathology; transmission electron microscope (TEM); nonclinical toxicology studies; safety evaluation of drugs

收稿日期: 2022-04-13

基金项目: 江苏省新药一站式高效非临床评价公共服务平台建设项目 (BM2021002)

*共同第一作者: 王 娅, 硕士, 研究方向为药物非临床安全性评价毒性病理学诊断。E-mail: ywang-6@innostar.cn

郑少秋, 硕士研究生, 研究方向为药物毒理学。E-mail: sqzheng.hm@sim.ac.cn

*共同通信作者: 吕建军, 主任药师, 研究方向为药物非临床安全性评价毒性病理学诊断。E-mail: jjlv@innostar.cn

张亚群, 助理研究员, 研究方向为药物非临床安全性评价毒性病理学诊断。E-mail: yqzhang@innostar.cn

毒性病理学是药物非临床安全性评价毒理学研究的重要组成部分,通过光学显微镜对经过福尔马林固定、苏木素-伊红染色的组织切片进行组织病理学检查对毒理学研究的结果和结论至关重要。在药物非临床安全性评价毒理学研究中,有时会用到透射电子显微镜(transmission electron microscope, TEM)技术以进一步探寻组织病理学检查结果的发病机制或研究药物的可能作用方式(mode of action, MOA)。有学者认为利用TEM进行超微结构病理学评估的方法已经被现代分子病理学技术所取代^[1],特别是在过去的20年里,基于成本和效率的原因,TEM技术在制药行业的应用价值受到了一些质疑^[2]。然而,近几年随着数字成像技术的进步,已经极大地提高了TEM技术的通量^[3],而且超微结构病理学检查是解决光学显微镜检查时许多模棱两可的结果或探寻其发病机制等问题的可靠方法^[4],因此近年来TEM技术在药物非临床安全性评价毒理学研究中的重要性显得越来越突出。到目前为止,国内外监管机构发布的药物非临床安全性评价研究相关指南或指导原则中并没有关于TEM使用的相关规定或是否应遵从良好实验室规范(good laboratory practice, GLP)的要求。因此,探讨超微结构病理学在药物非临床安全性评价毒理学研究中应用现状和关注点具有重要的理论意义和实用价值。

美国毒性病理学会(Society of Toxicological Pathology, STP)是药物非临床毒理学研究中病理诊断的重要组织,针对目前超微结构病理学的应用现状,STP成立了TEM工作组,进行了全球范围内的调查,以此次调查结果为依托和切入点,本文简要介绍当今药物开发和药物非临床安全性评价毒理学研究中使用超微结构病理学的应用现状和关注点,并举例补充说明国内外在超微结构病理学技术的实际应用情况;目前认为超微结构病理学依旧是药物非临床毒理学研究中毒性病理学评估的重要辅助工具之一,并在未来的非临床毒理学研究中具有广泛的使用前景和重要应用价值。

1 超微结构病理学在药物非临床安全性评价毒理学研究中的应用现状

STP的科学及监管政策委员会(Scientific and Regulatory Policy Committee, SRPC)成立了1个TEM工作组,以进行调查和评估在药物开发和药物非临床安全性评价毒理学研究中使用超微结构病理学的监管要求和应用现状。

1.1 工作组概况和目的

工作组的参与者包括具有电子显微镜专业知识的病理学家,来源于1个或多个全球毒性病理学会的成员,其工作范围跨越药物开发、生物技术、化学公司和合同研究组织(contract research organization, CRO)等多个病理学领域。该工作组以调查问卷形式向全球毒性病理学会,包括STP、欧洲毒性病理学会(European Society of Toxicologic Pathology, ESTP)、英国毒性病理学会(British Society of Toxicologic Pathology, BSTP)和日本毒性病理学会(Japanese Society of Toxicologic Pathology, JSTP)的会员进行了调研,调查问卷包括20个问题。此次调研共收到258份受访者的问卷回复,这些受访者分别来自制药企业、CRO机构、政府部门、学术机构和咨询公司等,STP收集了每位受访者的答复,并将其制成表格供工作组分析。

该调查的目的在于评估TEM技术作为非临床药物发现 and 安全性评估工具的现状,并根据这些结果结合Keirstead等^[5]的经验提供使用TEM技术过程中的“关注点(points to consider)”。此次调查的重点是确定TEM技术在超微结构评估中的应用普遍程度,以及在什么情况下应用TEM以支持非临床安全性研究中的药物开发和安全性评估,以及监管机构是否应关注超微结构病理学评估GLP规范的遵从性。

1.2 使用TEM技术的频率和目的

绝大多数的受访者来自企业,如CRO机构占比24%,制药企业、农药或化学品公司占比56%,咨询公司顾问占比7%,而非临床监管机构的审查人员仅占比1%。大多数受访者拥有专业兽医学位,以及使用TEM 10年以上的专业经验(64%)。65%受访者所在的机构在非临床毒理学研究中使用过TEM进行超微结构病理学评估以支持监管备案,41%受访者所在的机构曾用于早期药物发现或探索性研究。当TEM技术被用于监管申报的毒性研究时,大多数(70%)受访者表示,很少进行TEM检查(通常平均每年少于2项研究),常见原因包括设备缺乏、需求不多、费用昂贵、时间成本较长以及专业知识的匮乏。当TEM技术被用于基础研究和新药发现时,其优点包括在先导化合物优化阶段解决光学显微镜检查发现的问题、对疾病动物模型的光学显微镜结果进行超微结构评估、细胞成像、药物制剂优化以及药物标记等^[6-11]。

进行TEM检查研究最常见的目的是研究光学

显微镜检查结果的超微结构形态,其次是发病机制研究,再次是为了满足监管机构的要求,而通过TEM检查超微结构的改变来判断化合物的未观察到作用剂量(no observable effect level, NOEL)或未观察到有害作用剂量(no observable adverse effect level, NOAEL)是最为少见的目的。

1.3 TEM检查的组织 and 存档材料

大多数受访者表示在标准的一般毒理学研究方案中不包括TEM检查所需的组织采集要求的内容。在要求进行超微结构组织评估的试验方案中,采集肝脏(100%)和肾脏(94%)组织是最常见的要求,此外肺脏(12%)、心脏(6%)和脾脏(6%)等组织也有提及。1位受访者表示毒理学研究中通常每个剂量组选取1/10例大鼠,通过心脏经左心室灌注4%多聚甲醛固定后采集所有需要的脏器或组织^[12-13],而在犬4周重复给药毒性试验中,方案仅要求对肝脏、肺脏和肾脏进行10%中性缓冲福尔马林固定液浸泡固定,以准备可能的超微结构病理学检查。另一位受访者指出,仅在长期研究中会常规采集肝脏和肾脏用于TEM检查评估。

研究结束后的归档材料中签字版的超微结构病理学报告是必须的,此外归档资料包括脏器或组织树脂块(86%)、常规切片(63%)、超薄切片载网(60%)、数字图像(60%)、湿标本(46%)、电子或纸质打印的镜检记录(41%)和打印图像(37%)。多数受访者(85%)表示报告中包含了TEM图像,但并不作为标准操作规程(standard operating procedure, SOP)的要求,只有34%的参与者表示在超微结构病理学报告中包含TEM图像。

1.4 GLP遵从性和TEM检查报告

大多数(79%)受访者表示他们将TEM检查研究作为符合GLP的非临床毒理学研究的一部分。关于TEM处理和评估过程是否需要完全符合GLP要求存在差异,27%受访者表示始终在符合GLP要求的实验室内进行TEM检查研究,38%受访者表示不到一半的TEM研究过程是符合GLP要求的,17%受访者表示并未遵从GLP要求进行TEM研究;8%受访者表示因某一研究的TEM检查评估不遵从GLP要求而受到监管部门的质疑;仅有2名受访者表示必须遵循GLP规范重新开展TEM检查评估。42%受访者没有对符合GLP要求的TEM研究进行病理学同行评议,18%受访者接受了病理学同行评议。27%受访者认为与不符合GLP的TEM研究相比,执行符合GLP要求的TEM研究所花费的时间

是一样的,9%受访者则认为需要花费2倍的时间。大多数(78%)受访者认为不遵从GLP规范的TEM研究的科学价值与遵从GLP规范的TEM研究并无区别。

无论是否遵从GLP规范,大多数受访者认为提交监管机构的申报资料应包含1份书面的TEM检查报告。不同于常规的光学显微镜检查报告,TEM检查报告中通常包括图像,而且由于TEM数据通常不输入到实验室信息管理系统(laboratory information management system, LIMS)中,因此TEM检查报告通常不包括实验动物的个体数据表。

2 超微结构病理学在药物非临床毒理学研究中的关注点

上述工作组针对TEM技术在药物非临床毒理学研究中的应用现状调查结果表明,TEM检查评估仍然是药物非临床毒理学研究中毒性病理学评估的重要辅助工具,但由于设备缺乏、需求较少、费用昂贵、时间成本较长以及专业知识的匮乏等原因,其使用率并不高。工作组针对超微结构病理学在药物非临床毒理学研究中的应用提出的关注点有以下9个方面。

2.1 TEM检查具有不可替代性

药物非临床毒理学研究中TEM检查尽管不是必需的,但具有不可替代性,因为TEM检查可提供某些亚细胞病理改变的明确诊断,而且这种明确诊断有助于了解潜在的毒性机制并进行毒理学评估。超微结构病理学检查仍然是确认光学显微镜检查结果潜在发病机制的最佳方法^[14]。

2.2 TEM检查无需遵从GLP规范

在遵从GLP规范的毒理学研究中,TEM检查可以不遵从GLP规范。TEM技术通常只对一小部分组织或者少数动物进行病理学结果的定性描述,以帮助解释光学显微镜检查结果。光学显微镜检查结果是确定严重程度、发生率和NOEL/NOAEL的金标准^[15]。因此,GLP研究中开展的TEM检查评估只要不破坏科学性,就无需完全遵从GLP规范。

2.3 TEM检查无需遵从SOP

归档的研究材料包括检查报告、试验方案、树脂块、病理切片、样本识别表、实验记录、纸质或数字图像。在报告中包含TEM图像是常见的做法,但无需撰写SOP予以明确。

2.4 TEM检查无需同行评议

超微结构病理学研究通常不进行同行评议。工作组建议可由其他病理学家对数字或纸质图像

进行正式或非正式的同行评议,或者在最终报告中附上代表性超微结构病理学结果图像以支持病理学家的解释。

2.5 TEM技术不是非临床毒理学研究的默认组成部分

如果超微结构变化不是已知的或预期的改变,则很少将TEM检查作为非临床毒理学研究的默认组成部分。工作组不建议在没有前期数据支持的基础上,将采集TEM样品作为常规检测标准。因此,如果当前研究的光学显微镜结果表明通过TEM技术对进一步研究可以提供帮助,则可能需要在适合TEM处理的固定剂中对福尔马林固定后的组织进行再固定。在一般的毒理学研究中,可以变更大体病理学检查和取材方案,以达到获得常规标本、数据和适当采集样品用于超微结构评估(即快速收集、冷冻固定、适当的样品厚度,优化固定液灌注)^[16]的目的。

2.6 TEM检查不建议评价NOEL或NOAEL

不建议使用TEM检查评价NOEL或NOAEL。大部分受访者采用透射电镜的目的是对光学显微镜下发现的结果进行超微结构诊断。在使用TEM进行超微结构研究之前,首先了解光学显微镜下改变的性质对于确定适当的取样位置,以优化捕获病变的机会和证明资源支出的合理性非常重要。在某些情况下,如免疫金透射电镜定位或疗效研究下,在光学显微镜检查未发现的情况下进行超微结构检查评估可能有价值,但工作组不建议用于常规的非临床毒理学研究中。

一般来说,为了定性地描述病理学变化,同时选择受试物组少数代表性动物和同期对照组动物进行评价即可。在确定发病率和不同剂量组间病理学差异的判定上,TEM检查并不实用。因此,鉴于能够合理地进行超微结构评估的组织 and 动物数量有限,工作组不建议在TEM检查中判定NOEL或NOAEL。当然,电子显微镜检查结果可用于了解光学显微镜检查结果的潜在不利因素(如细胞器缺乏等退行性变化)^[17]。

2.7 持续开展TEM评估需缩短时间和降低费用

电子显微镜中数字成像技术具有许多优点,例如增加成像和归档的方便性,并可更快速广泛地收集每个载网中图像子集。在非临床安全性评价方面,缩短时间和降低费用对于药物非临床安全性评价结构或CRO持续开展TEM评估非常关键。

2.8 使用TEM技术需咨询病理学家

在设计试验方案时,如果要用TEM进行超微结

构评估,应先咨询病理学家的意见,以保证试验顺利进行。

2.9 TEM检查注意专业性和科学性

使用TEM检查需要注意专业性和科学性。大多数受访者在非GLP条件下执行TEM检查,并认为最重要的是考虑保持高质量的技术专业知识和科学方面的准确性。当不能满足所有因素时(如无法遵从GLP规范),具有高质量技术专业知识的TEM机构是首要的考虑因素。

3 超微结构病理学在药物非临床毒理学研究中的应用示例

在药物非临床毒理学和药效学研究中,超微结构病理学在亚细胞结构的形态学评价中至关重要。

3.1 眼科药物的动物模型

在用小鼠制作的眼科疾病模型中,临床检查通常与视网膜电图(electroretinogram, ERG)和光学相干断层成像(optical coherence tomography, OCT)等技术相结合,以更全面地描述病理发现^[18]。TEM检查可以为这些方法提供基于图像的关键性联系,为ERG或OCT结果的解释提供更大的可信度。除了疾病模型外,透射电镜还可以提供临床检查或非临床毒理学研究中光学显微镜下视网膜变化的详细图示。由于眼睛呈球体,因此对TEM检查中的修块、定位、成像和评价都具有较高的挑战性,眼睛的不同组成部分需要专门的方法来包埋以便于切片,控制视网膜的方向对于评估的一致性至关重要,因此需要改进的方法来嵌入这个独特而复杂的器官。Hayden等^[19]2020年报道了1种用于视网膜、脉络膜TEM检查的大、小鼠眼睛后侧面的最佳样品制备方法。

3.2 电镜技术辅助诊断

李诗恒^[20]2015年报道了电子显微镜技术在病理诊断中的应用,丰富了对生物大分子、细胞、组织等形态学上的认识,同时在病理学的发展上,利用电子显微镜技术观察到微小的病变,有利于临床的早期诊断和疾病的分期分型,极大地拓展了临床视野。电子显微镜技术作为诊断上的辅助手段,还可以做到观其形态知其功能,并推测其基因改变、代谢紊乱等。宋瑞雯等^[21]2018年采用TEM观察各组大鼠下丘脑神经元超微形态结构,结果显示模型组大鼠电子显微镜下的下丘脑超微形态结构发生显著改变、神经元严重受损,从形态学上证明了大鼠下丘脑神经元超微结构的改变,从而辅助了非临床诊断。

3.3 确认血液检查结果

TEM检查还可以确认药物非临床安全性评价中血液学检查结果^[22]。常志尚等^[23]2018年采用高脂饮食联合链脲佐菌素腹腔注射的方法成功建立了糖尿病大鼠模型,采用TEM观察大鼠肠上皮细胞连接的病理学改变,表明TEM检查对于糖尿病大鼠的肠黏膜屏障功能评价具有重要意义。刘增波等^[24]2015年应用TEM观察肾脏的肾间质血管内皮细胞、肾小球内皮细胞、足细胞和肾间质细胞连接的糖萼的显示情况,上述实验证明TEM检查对观察细胞连接的病理学变化具有较高的可靠性。

3.4 辅助确认其他指标

TEM检查还可作为药物非临床安全性评价其他指标的辅助手段,用于描述非临床药效学研究的人类疾病动物模型的特征,还可以用于证实白蛋白和骨桥蛋白作为肾小球损伤的敏感生物标志物^[25]。王希红等^[26]2019年探讨新型的过氧化物酶体增殖物激活受体 α 激动剂匹立尼酸对肝缺血再灌注损伤的防治作用及机制,对肝细胞进行TEM检测以观察细胞的死亡情况,证明匹立尼酸能减轻小鼠肝缺血再灌注的损伤。杨恣旻等^[27]2021年研究酸枣仁汤对线粒体介导的神经细胞凋亡的影响,通过TEM观察发现模型组大鼠线粒体形态异常,线粒体发生明显肿胀并且伴有空泡化,出现了“髓鞘样”改变,线粒体嵴发生断裂且数量减少;而酸枣仁汤高剂量组大鼠的线粒体损伤减轻,部分线粒体嵴断裂,空泡化现象减少,并未出现明显肿胀。采用TEM检查证明酸枣仁汤可以改善下丘脑神经细胞线粒体功能,抑制神经细胞凋亡。

上述实例表明超微结构病理学在药物非临床毒理学研究中具有重要的应用价值。

4 结语

超微结构病理学检查作为药物非临床毒理学研究中毒性病理学评估的重要辅助工具之一,虽然使用频率相对较低,但可用于对光学显微镜检查结果的进一步研究,以作为早期药物发现和非临床安全性评价毒理学研究的有益补充。在某些情况下,TEM技术仍然是确认某些病理学过程(如肾小球病理学变化^[28]、肝细胞酶诱导滑面内质网增加等)的最终标准。随着中国创新药物研发的飞速进步和新型给药方式的不断涌现,超微结构病理学在药物非临床安全性评价毒理学研究中的使用也越来越多。相信今后会有更多的毒性病理学家或毒理学家在设计毒理学研究或药效学研究的试验方案时,

将TEM技术纳入考虑范围,以用于辅助组织病理学检查。总之,超微结构病理学技术是目前药物非临床安全性评价的重要工具之一,在某些情况下仍然是描述毒性特征、发病机制或了解新疗法作用方式的唯一方法,在未来的药物非临床毒理学研究中具有广泛使用前景和重要应用价值。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Grover A, Sinha R, Jyoti D, et al. Imperative role of electron microscopy in toxicity assessment: A review [J]. *Microsc Res Tech*, 2021, 85(5): 1976-1989.
- [2] Fagerland J A, Wall H G, Pandher K, et al. Ultrastructural analysis in preclinical safety evaluation [J]. *Toxicol Pathol*, 2012, 40(2): 391-402.
- [3] L'imperio V, Brambilla V, Cazzaniga G, et al. Digital pathology for the routine diagnosis of renal diseases: A standard model [J]. *Rom J Morphol Embryol*, 2021, 34(3): 681-688.
- [4] Morfeld P, Treumann S, Ma-Hock L, et al. Deposition behavior of inhaled nanostructured TiO₂ in rats: Fractions of particle diameter below 100 nm (nanoscale) and the slicing bias of transmission electron microscopy [J]. *Inhal Toxicol*, 2012, 24(14): 939-951.
- [5] Keirstead N D, Janovitz E B, Meehan J T, et al. Scientific and regulatory policy committee points to consider*: Review of scientific and regulatory policy committee points to consider: Review of current practices for ultrastructural pathology evaluations in support of nonclinical toxicology studies [J]. *Toxicol Pathol*, 2019, 47(4): 461-468.
- [6] Rudawska A, Haniecka I, Jaszek M, et al. The influence of biochemical modification on the properties of adhesive compounds [J]. *Polymers*, 2016, 9(1): 422-437.
- [7] Bensalem S, Pareau D, Cinquin B, et al. Impact of pulsed electric fields and mechanical compressions on the permeability and structure of *Chlamydomonas reinhardtii* cells [J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 2668-2679.
- [8] Triarhou L C, Manto M. Exploring subcellular cerebellar fractions with the electron microscope [J]. *Cerebellum*, 2021, 20(4): 492-494.
- [9] Gopi S, Balakrishnan P. Evaluation and clinical comparison studies on liposomal and non-liposomal ascorbic acid (vitamin C) and their enhanced bioavailability [J]. *J Liposome Res*, 2021, 31(4): 356-364.
- [10] Żak A M, Kaczmarczyk O, Piksa M, et al. Light-induced in situ transmission electron microscopy: Novel approach for antimicrobial photodynamic therapy imaging [J].

- Photodiagnosis Photodyn Ther, 2021, 35: 102463.
- [11] El-Shenawy A A, Mahmoud R A, Mahmoud E A, et al. Intranasal in situ gel of apixaban-loaded nanoethosomes: Preparation, optimization, and *in vivo* evaluation [J]. AAPS Pharm Sci Tech, 2021, 22(4): 147.
- [12] Gage G J, Kipke D R, Shain W. Whole animal perfusion fixation for rodents [J]. J Vis Exp, 2012, 65: e3564
- [13] Zhou Y Q, Davidson L, Henkelman R M, et al. Ultrasound-guided left-ventricular catheterization: A novel method of whole mouse perfusion for microimaging [J]. Lab Invest, 2004, 84(3): 385-389.
- [14] Xiao X, Wang W, Li Y, et al. HSP90AA1-mediated autophagy promotes drug resistance in osteosarcoma [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2018, 37(1): 201.
- [15] Fani A, Sofia K, Theodora P, et al. Pseudoexfoliation syndrome in diabetic patients: Transmission electron microscopy study of anterior lens epithelial cells [J]. Rom J Ophthalmol, 2021, 65(1): 38-45.
- [16] Tizro P, Choi C, Khanlou N. Sample preparation for transmission electron microscopy [J]. Method Mol Biol, 2019, 1897: 417-424.
- [17] Alibardi L. Transmission electron microscopic and immunohistochemical observations of resting follicles of feathers in chicken show massive cell degeneration [J]. Anat Sci Int, 2018, 93(4): 548-558.
- [18] Liu L, Suzuki T, Shen J, et al. Rescue of retinal morphology and function in a humanized mouse at the mouse retinol-binding protein locus [J]. Lab Invest, 2017, 97(4): 395-408.
- [19] Hayden C M, Meseck E K. Transmission electron microscopy of the retina: A method for sample preparation and evaluation [J]. Toxicol Pathol, 2021, 49(3): 521-527.
- [20] 李诗恒. 电镜技术在病理诊断中的应用 [J]. 长春中医药大学学报, 2015, 31(1): 195-196.
- Li S H. Electron microscopy technology in the application of the pathological diagnosis [J]. J Changchun Univ Chin, 2015, 31(1): 195-196.
- [21] 宋瑞雯, 张丽萍, 陈颖, 等. 加味温胆汤对抑郁模型大鼠下丘脑神经元超微结构的影响 [J]. 中医药学报, 2018, 46(6): 33-35.
- Song R W, Zhang L P, Cheng Y, et al. Effect of adding Warm Gall Bladder Soup on hypothalamic neurons of rats in depression model ultrastructural effects [J]. Acta Chin Med Pharmacol, 2018, 46(6): 33-35.
- [22] Bodie K, Gagne G D, Sramek M K, et al. Asymptomatic macrothrombocytopenia in a young pure-bred beagle dog: A case report [J]. Toxicol Pathol, 2011, 39(6): 980-987.
- [23] 常志尚, 毋亚仙, 刘立娜, 等. 透射电镜在糖尿病大鼠肠上皮细胞连接分析中的应用 [J]. 解剖学杂志, 2018, 41(3): 249-252.
- Chang Z S, Wu Y X, Liu L N, et al. Application of transmission electron microscopy in the analysis of intestinal epithelial cell connections in diabetic rat [J]. Chin J Anat, 2018, 41(3): 249-252.
- [24] 刘增波, 梅长林, 胡惠民, 等. 镧示踪法透射电镜显示肾脏细胞糖萼的方法学研究 [J]. 临床肾脏杂志, 2015, 15(1): 42-46.
- Liu Z B, Mei C L, Hu H M, et al. The best lanthanum tracing method of displaying kidney cell glycocalyxes with transmission electron microscope [J]. Chin J Histochem Cytochem, 2015, 15(1): 42-46.
- [25] Bonventre J V, Vaidya V S, Schmouder R, et al. Next-generation biomarkers for detecting kidney toxicity [J]. Nat Biotechnol, 2010, 28(5): 436-440.
- [26] 王希红, 张超. 匹立尼酸对小鼠肝缺血再灌注损伤的防治作用 [J]. 广东医学, 2019, 40(21): 2985-2990.
- Wang X H, Zhang C. The protective effects of pirinixic acid on hepatic ischemia reperfusion injury in mice [J]. Guangdong Med J, 2019, 40(21): 2985-2990.
- [27] 杨恣旻, 刘鑫, 游秋云, 等. 酸枣仁汤对老年慢性快动眼睡眠剥夺模型大鼠中枢下丘脑线粒体损伤及细胞凋亡的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(16): 47-52.
- Yang M M, Liu X, You Q Y, et al. Effect of Suanzaoren Tang on mitochondrial damage and apoptosis in hypothalamus of elderly rats with chronic rapid eye movement sleep deprivation [J]. Chin J Expe Tradit Med Form, 2021, 27(16): 47-52.
- [28] Crivellenti L Z, Silva G E, Borin-Crivellenti S, et al. Prevalence of glomerulopathies in canine mammary carcinoma [J]. PLoS One, 2016, 11(10): e0164479.

[责任编辑 李红珠]