

**编委：**（以姓氏汉语拼音为序）

曹　毅　陈策实　陈新文　胡新天　赖　仞

梁　斌　吕龙宝　马原野　隋　南　徐　林

姚永刚　杨世华　张　云　赵旭东　郑　萍

郑永唐　周江宁

**编委会秘书：**王　霜



# Basic Biology and Disease Models of Tree Shrews

# 树鼩

## 基础生物学与疾病模型

主编 郑永唐　姚永刚　徐　林

云南出版集团公司
云南科技出版社
·昆　明·

**图书在版编目（CIP）数据**

树鼩基础生物学与疾病模型 / 郑永唐, 姚永刚, 徐林主编. -- 昆明 : 云南科技出版社, 2014.10
ISBN 978-7-5416-8552-1

Ⅰ. ①树… Ⅱ. ①郑… ②姚… ③徐… Ⅲ. ①树鼩科－生物学－研究②树鼩科－实验动物－试验模型 Ⅳ. ①Q959.848

中国版本图书馆CIP数据核字(2014)第249989号

责任编辑：温　翔
　　赵　敏
　　陈明英
整体设计：晓　晴
责任校对：叶水金
责任印制：翟　苑



Tree shrews

云南出版集团公司
云南科技出版社出版发行
（昆明市环城西路609号云南新闻出版大楼　邮政编码：650034）
昆明富新春彩色印务有限公司印刷　全国新华书店经销
开本：889mm×1194mm　1/16　印张：31.25　字数：820千字
2014年11月第1版　　2014年11月第1次印刷
印数：1～3500册　　定价：186.00元




## 内容简介 >

为解决生命科学和生物医药研究领域中的系列重大基础和临床问题，科学家们创建了不同种属的许多实验动物和动物模型，它们各自发挥着独特的重要作用。树鼩是灵长类近亲，是研究近视、心理应激和病毒性肝炎等许多人类疾病的理想模型动物。创建人类疾病的树鼩模型，树鼩的实验动物标准化和基础生物学数据是深入进行人类疾病机理研究和新药研发的必要条件。本书的各位作者多年来一直从事树鼩基础生物学与疾病模型研究工作，根据他们的最新研究成果，结合当前国内外最新进展编著而成本书。全书分为树鼩基础生物学和疾病模型两篇共28章。第一篇涵盖了树鼩的分子进化、群体遗传多样性、基因组学、免疫遗传、肿瘤相关基因、基础生理学和代谢学数据、血液生理生化、乳腺生物学、生殖生理与辅助生殖技术、共生微生物学、组织学、脑形态及脑立体定位、脑结构演化与行为、情绪相关脑区肽能神经元等树鼩基础生物学的研究内容；第二篇探讨了抑郁症、药物成瘾、情绪相关精神疾病、病毒感染、细菌感染、乳腺癌、胶质母细胞瘤、血栓疾病、代谢性疾病、转基因树鼩等模型的创建和研究。本书具有科学性、系统性和实用性，其中许多研究成果属于首次报道，对相关研究具有重要的参考价值。

本书可作为从事生物学、实验动物学、医药卫生、林业等领域的科研人员、教师、研究生和高年级大学生参考用书。




# 著者名单

（以姓氏汉语拼音为序）

**曹　毅**　中国科学院昆明动物研究所动物模型与人类疾病机理院重点实验室/中国科学院昆明灵长类研究中心

**陈策实**　中国科学院昆明动物研究所动物模型与人类疾病机理院重点实验室/中国科学院昆明灵长类研究中心

**陈佳琦**　中国科学院昆明动物研究所/中国科学院昆明灵长类研究中心

**陈仕毅**　中国科学院昆明动物研究所动物模型与人类疾病机理院重点实验室

**陈新文**　中国科学院武汉病毒研究所病毒学国家重点实验室

**代建昆**　中国科学院武汉物理与数学研究所

**杜廷义**　中国科学院昆明动物研究所动物模型与人类疾病机理院重点实验室/云南省第一人民医院

**范　宇**　中国科学院昆明动物研究所动物模型与人类疾病机理院重点实验室

**郭　静**　中国科学院武汉病毒研究所病毒学国家重点实验室

**郭　颖**　中国科学院昆明动物研究所动物模型与人类疾病机理院重点实验室

**郝　雪**　中国科学院昆明动物研究所动物模型与人类疾病机理院重点实验室

**何保丽**　昆明医科大学

**何小芹**　中国科学院昆明动物研究所动物模型与人类疾病机理院重点实验室

**季　爽**　中国科学院昆明动物研究所动物模型与人类疾病机理院重点实验室

**赖　仞**　中国科学院昆明动物研究所动物模型与人类疾病机理院重点实验室/中国科学院昆明灵长类研究中心

**雷　皓**　中国科学院武汉物理与数学研究所

**李　贵**　中国科学院昆明动物研究所动物模型与人类疾病机理院重点实验室

**李明泓**　中国科学院昆明动物研究所动物模型与人类疾病机理院重点实验室

**李盛安**　中国科学院昆明动物研究所动物模型与人类疾病机理院重点实验室

**李勇辉**　中国科学院心理研究所心理健康院重点实验室

**李　媛**　中国科学院昆明动物研究所动物模型与人类疾病机理院重点实验室/昆明理工大学

**李昀海**　中国科学院昆明动物研究所动物模型与人类疾病机理院重点实验室

**梁　斌**　中国科学院昆明动物研究所动物模型与人类疾病机理院重点实验室/中国科学院昆明灵长类研究中心

**廖莎莎**　中国科学院昆明动物研究所动物模型与人类疾病机理院重点实验室

**刘　杰**　中国科学院昆明动物研究所动物模型与人类疾病机理院重点实验室

**罗鹏昊**　中国科学技术大学生命科学学院

**吕龙宝**　中国科学院昆明动物研究所/中国科学院昆明灵长类研究中心

**马旭通**　中国科学院昆明动物研究所动物模型与人类疾病机理院重点实验室

**马玉华**　中国科学院昆明动物研究所/中国科学院昆明灵长类研究中心

**马原野**　中国科学院昆明动物研究所动物模型与人类疾病机理院重点实验室/中国科学院昆明灵长类研究中心

**孟肖路**　中国科学院心理研究所心理健康院重点实验室

**母　丹**　中国科学院昆明动物研究所动物模型与人类疾病机理院重点实验室

**倪荣军**　中国科学技术大学生命科学学院
**潘姿娇**　昆明医科大学
**祁可可**　中国科学院心理研究所心理健康院重点实验室
**舒愉棉**　中国科学技术大学生命科学学院
**隋　南**　中国科学院心理研究所心理健康院重点实验室
**童耀辉**　中国科学院昆明动物研究所动物模型与人类疾病机理院重点实验室
**涂　秋**　中国科学院昆明动物研究所动物模型与人类疾病机理院重点实验室
**王建红**　中国科学院昆明动物研究所动物模型与人类疾病机理院重点实验室/中国科学院昆明灵长类研究中心
**王　静**　中国科学院昆明动物研究所动物模型与人类疾病机理院重点实验室
**王　霜**　中国科学院昆明动物研究所动物模型与人类疾病机理院重点实验室
**吴春晨**　中国科学院武汉病毒研究所病毒学国家重点实验室
**吴晓云**　中国科学院昆明动物研究所动物模型与人类疾病机理院重点实验室
**夏厚军**　中国科学院昆明动物研究所动物模型与人类疾病机理院重点实验室
**徐　林**　中国科学院昆明动物研究所动物模型与人类疾病机理院重点实验室/中国科学院昆明灵长类研究中心
**徐　玲**　中国科学院昆明动物研究所动物模型与人类疾病机理院重点实验室
**许　凌**　中国科学院昆明动物研究所动物模型与人类疾病机理院重点实验室
**杨　琪**　中国科学院武汉病毒研究所病毒学国家重点实验室
**杨世华**　华南农业大学
**杨跃雄**　中国科学院昆明动物研究所动物模型与人类疾病机理院重点实验室
**姚永刚**　中国科学院昆明动物研究所动物模型与人类疾病机理院重点实验室/中国科学院昆明灵长类研究中心
**张林强**　中国科学院昆明动物研究所动物模型与人类疾病机理院重点实验室
**张喜鹤**　中国科学院昆明动物研究所动物模型与人类疾病机理院重点实验室
**张晓辉**　昆明理工大学
**张玉茹**　中国科学院昆明动物研究所动物模型与人类疾病机理院重点实验室
**张　云**　中国科学院昆明动物研究所动物模型与人类疾病机理院重点实验室/中国科学院昆明灵长类研究中心
**张治国**　中国科学院昆明动物研究所动物模型与人类疾病机理院重点实验室
**赵旭东**　中国科学院昆明动物研究所动物模型与人类疾病机理院重点实验室/中国科学院昆明灵长类研究中心
**郑　萍**　中国科学院昆明动物研究所遗传资源与进化国家重点实验室/中国科学院昆明灵长类研究中心
**郑永唐**　中国科学院昆明动物研究所动物模型与人类疾病机理院重点实验室/中国科学院昆明灵长类研究中心
**周江宁**　中国科学技术大学生命科学学院
**周　霞**　中国科学院昆明动物研究所动物模型与人类疾病机理院重点实验室




# 序

实验动物和人类疾病的动物模型对理解生命科学和生物医药领域的重大基础和临床问题均产生了不可或缺的巨大贡献。由于伦理及其它问题，人类疾病机理的解析和新药、新疫苗临床前评价只能依赖于特定的动物模型。1901～2012年，共有201位科学家获得诺贝尔生理学或医学奖，其中约83%的获奖者其科研成果得益于动物模型。常用的实验动物包括线虫、果蝇、斑马鱼、非洲爪蛙、啮齿类（大、小鼠）、兔、犬、猪、非人灵长类动物等。每种实验动物具有各自的优缺点，对解决特定科学问题和疾病机理具有特殊优势。创建新种属实验动物及疾病模型是一个巨大的工程，涉及特定野生动物的实验动物化、新型实验动物和新品种（系）的培育和饲养繁殖标准化、重大疾病的动物模型创建等，一旦成功往往会极大地推动生命科学和生物医学领域的跨越式发展和创新性突破。瞄准生命科学和生物医学研究中的重大需求，基于我国丰富的特色野生动物资源，创建我国标准化的新型实验动物无疑是十分重要而又极具挑战的基础性工作。

树鼩作为一种新型实验动物，正日益受到国内外的关注和应用。树鼩属攀鼩目（Scandentia）树鼩科（Tupaiidae）。我国现生树鼩有1属1种。云南是野生树鼩分布的主要区域之一。树鼩具有体形小、生殖与发育周期短、人工饲养条件下无明显繁殖季节、孕期短、多胎等优势。树鼩作为实验动物在生命和医学领域的应用已有30多年历史。研究证明，树鼩是灵长类的近亲，特别适合于人类近视、心理应激和病毒性肝炎等疾病的模型研究。

中国科学院昆明动物研究所是我国最早开展树鼩人工驯养繁殖的单位，该所自20世纪70年代末开始，就围绕树鼩人工驯养繁殖、疾病防治和动物模型创建等开展了一系列研究，早在1991年出版了国内第一本也是目前仅有的一本《树鼩生物学》专著。该专著出版后，在学术界产生了广泛影响。昆明动物研究所通过对树鼩饲养环境及设施、微生物、寄生虫和配合饲料等不断探索改进，已形成规范的饲养管理体系，实现了树鼩的标准化人工驯养繁育，并于2012年10月通过树鼩生产和使用许可证认证，成为全国首家获得树鼩生产许可证的机构。2012年，昆明动物研究所还组织了树鼩全基因组测定和解析工作，得到了高覆盖度（79X）的基因组序列，发现树鼩在神经及免疫系统等方面与人类具有

较高的同源性，在很多方面具有可用来替代猕猴等灵长类实验动物的遗传基础，可能适合于更多的免疫学、神经生物学及代谢等生物学问题和疾病机理的研究。

实验动物的基础生物学数据收集非常重要，是利用动物模型来研究人类疾病机理和药物研发的基础和前提，也是一项烦琐费时的工作。相对于其它成熟的实验动物如大鼠、小鼠和猕猴，树鼩缺乏基础生物学数据和专有检测试剂，遗传背景清晰、遗传成分稳定的种群或品系，这些因素限制了其广泛应用。近年来，在国家863计划、中国科学院重点部署集群项目、中国科学院基础前沿研究专项项目、中国科学院昆明动物研究所“一三五”重大专项课题等支持下，昆明动物研究所联合院内外兄弟单位开展了树鼩基础生物学与疾病模型的深入研究，取得了多项重要研究进展，在此基础上编著了《树鼩基础生物学与疾病模型》一书。该书作者均是研究一线的博士和卓有成效的中青年专家，他们结合自己的研究工作，较全面地介绍了树鼩基础生物学和疾病模型研究相关领域的最新进展与发展趋势，具有科学性、系统性和实用性，其中许多研究成果属于首次报道。

我相信《树鼩基础生物学与疾病模型》的出版将推动我国树鼩生物学研究和人类疾病树鼩模型的创建工作，实现“中国制造”的树鼩品系和疾病模型，推动树鼩在生命科学和生物医药等领域的广泛应用，培育并形成新产业。



中国科学院院士

2014年6月26日




# 前言

实验动物是生命科学和医药研究中必备的基本和支撑条件之一。树鼩作为实验动物在生命科学领域已有30多年历史。由于受到资源的限制，国际上仅有德国灵长类中心、美国伯明翰阿拉巴马大学、美国圣地亚哥野生动物园、墨西哥沃尔夫繁殖中心和欧洲灵长类中心（荷兰）等少数机构饲养繁殖树鼩。目前国际上利用树鼩进行疾病机理研究和新药评价尚处于起步阶段。云南是我国树鼩基础研究及应用研究最早和最发达的地区。中国科学院昆明动物研究所是我国最早开展树鼩人工驯养繁殖、生物学特性和疾病模型研究的机构，随着树鼩在人类疾病模型方面的应用潜力被逐步认识，全国各地一些科研院所相继开展了树鼩驯养繁殖和应用的研究。

早在1991年，中国科学院昆明动物研究所的彭燕章、叶智彰等就出版了国内第一本也是目前仅有的一本《树鼩生物学》，该专著较系统地总结了树鼩的生物学特性，包括树鼩分类与生态学、饲养与繁殖、寄生虫学与病理学、解剖学、神经生物学、遗传学、生物化学和免疫学等研究进展。《树鼩生物学》出版后在实验动物和生物医学界产生了广泛的学术影响。目前，国内外学者围绕树鼩生物学特性研究及疾病树鼩模型建立方面取得了大量的科研成果，尤其在病毒感染性模型、基因组学及功能基因、蛋白质组学、代谢组学、实验动物饲养和繁殖条件的标准化等方面。2012年，北京生命科学研究所研究团队根据报道的乙型肝炎病毒（HBV）结合受体的肽段Pre-S1设计探针，以树鼩原代肝细胞为材料，发现人HBV和丁型肝炎病毒的共用受体——“钠离子–牛磺胆酸共转运多肽（NTCP）”，解析了树鼩易感HBV的分子机制。2012年，中国科学院昆明动物研究所领衔测定和解析了树鼩全基因组，得到了高覆盖度、高质量的基因组序列，从全基因组水平证实树鼩是灵长类的近亲，发现树鼩在神经和免疫系统等方面与人类具有高度的同源性，在很多方面具有可用来替代猕猴等灵长类实验动物的遗传基础，可能还适合于更多的免疫学、神经生物学及代谢等生物学问题和疾病机理研究。2010年，由昆明医学院牵头调研和编制，云南省质量技术监督局颁布了《实验树鼩　云南省地方标准》——《实验树鼩（DB53/T 328.1–328.5–2010）》，形成了实验动物树鼩的云南省地方标准。中国科学院昆明动物研究所通过对树鼩饲养环境及设施、微生物、寄生虫和配合饲料等不断探索改进，已形成规范的饲养管理体系，实现了树鼩的标准化人工驯养繁育，并于2012年10月通过树鼩生产和使用许可证认证，成为全国首家获得树鼩生产许可证的机构。

实验动物的基础生物学数据是动物模型研究人类疾病和进行药物研发的基础和前提。作为一种新型实验动物，相对于其它成熟的实验动物，缺乏树鼩的基础生物学数据和专有检测研究试剂，没有遗传背景清晰、遗传成分稳定的种群或品系，从而极大地限制了其应用。为了推动我国树鼩生物学研究和在疾病模型中应用，近年来在中国科学院重点部署集群项目、中国科学院基础前沿研究专项项目和国家863计划等支持下，中国科学院和云南省“动物模型与人类疾病机理重点实验室”联合中国科学技术大学、中国科学院心理研究所、中国科学院武汉病毒研究所、中国

科学院武汉物理与数学研究所、华南农业大学等院内外兄弟单位开展了树鼩基础生物学与疾病模型的深入研究，取得了许多重要研究成果，在此基础上编著了《树鼩基础生物学与疾病模型》一书。本书研究内容涵盖了分子进化、群体遗传多样性、基因组学、免疫遗传、病毒限制因子、肿瘤相关基因、基础代谢学和生理学数据、血液生理生化、乳腺生物学、生殖生理、微生物学、组织学、脑形态及脑立体定位、脑结构演化与行为等树鼩基础生物学研究，以及包括抑郁症、药物成瘾、情绪相关精神疾患、病毒感染、细菌感染、乳腺癌、胶质母细胞瘤、血栓疾病、代谢性疾病等的树鼩模型研究，同时介绍了树鼩转基因技术的尝试和进展。各位编著者结合自己的研究工作，重点介绍了相关领域的最新进展和发展趋势，其中许多研究成果属于首次报道。编著者均是在研究一线的青年才俊和工作卓有成效的中青年专家，其中有国家杰出青年获得者5名，中国科学院“百人计划”获得者13名，国务院政府特殊津贴获得者8名。我们希望本书的出版能拓展实验动物树鼩基础生物学和疾病模型研究国内外同行的思路，加快树鼩在疾病机理研究和新药研发中的创新性发展。我们希望本书不仅对科研人员有价值，也对有志于该领域的研究生、大学生等青年后继人才有所帮助。

树鼩基础生物学与疾病模型的研究始终得到中国科学院副院长张亚平院士、同济大学校长裴钢院士、中国科学院昆明植物研究所孙汉董院士和周俊院士、武汉大学副校长舒红兵院士的鼓励、支持和指导。中国科学院院士、中国科学院副院长张亚平研究员高度评价和认可本专著的出版，并承蒙亲笔作序。树鼩基础生物学和疾病模型研究工作及本书的出版主要得到中国科学院基础前沿研究专项项目“树鼩基础生物学及重要生物学特性研究”（KSCX2–EW–J–23）、中国科学院重点部署项目“树鼩品系资源的创制和推广”（KSCX2–EW–R–11）、中国科学院重点部署项目“树鼩的人类疾病模型建立”（KSCX2–EW–R–12）、863计划项目“重大经济价值生物资源遗传信息数字化关键技术研究”（2012AA021801）、中国科学院昆明动物研究所“一三五”重大专项课题以及多项国家自然科学基金的资助。感谢本书编委会秘书、中国科学院和云南省动物模型与人类疾病机理重点实验室主任助理王霜女士为本书的出版付出的艰辛劳动。各位编著者花费了大量时间和精力投入此书的撰写，对他们的鼎力支持和奉献，深表感谢！

由于编著者水平有限以及撰写风格各异，本书肯定存在诸多不足和遗漏，敬请读者和同行赐教指正。我们期待更多的学者能够投身到树鼩的研究中，实现更多的树鼩实验动物和疾病动物模型的“中国制造”！

**郑永唐　姚永刚　徐　林**

2014年6月26日

# 目录

Basic Biology and Disease Models of Tree Shrews

## 1 第一篇 树鼩基础生物学

### 第一章 树鼩进化分类地位的分子证据

第一节 前 言…… 3
第二节 树鼩的传统分类地位…… 4
一、树鼩归类于攀鼩目…… 4
二、争论不休的攀鼩目…… 4
第三节 基于分子证据界定树鼩的进化地位…… 6
一、基于分子证据界定物种进化地位的方法——系统发育研究方法…… 6
二、线粒体DNA数据揭示树鼩与兔形目动物是“近亲” …… 7
三、核基因数据分析…… 9
第四节 结 语…… 13

### 第二章 树鼩群体遗传多样性

第一节 前 言…… 17
第二节 遗传多样性概述…… 17
一、遗传多样性的概念…… 17
二、研究遗传多样性的主要指标…… 18
三、研究遗传多样性的主要方法…… 19
第三节 攀鼩目动物的系统分类与地理分布…… 20
第四节 树鼩表型多态性…… 23
第五节 群体间遗传多样性…… 25
一、微卫星位点的分析…… 25
二、线粒体DNA的研究 …… 26

三、基于其它分子标记的研究…… 29
第六节 树鼩群体遗传多样性研究和资源利用与保护…… 29

## 第三章 树鼩基因组测定与特点概述

第一节 前 言…… 32
第二节 基因与基因组…… 32
第三节 树鼩基因组测序…… 33
一、中美测定的树鼩基因组整体质量比较…… 33
二、树鼩基因组测序与组装…… 34
第四节 树鼩基因组的特点…… 36
一、树鼩的转座因子与分散重复序列…… 36
二、蛋白质编码基因…… 38
三、非编码RNA …… 38
第五节 树鼩基因组的进化…… 39
第六节 树鼩的功能基因…… 46
一、树鼩的假基因…… 46
二、树鼩特有的缺失基因…… 51
三、树鼩与灵长类特有的共同基因…… 52
四、树鼩的神经系统基因…… 55
五、树鼩的免疫系统基因…… 61
六、树鼩的代谢系统基因…… 64
七、树鼩运动系统相关基因…… 66
第七节 树鼩药物靶点基因…… 66
一、树鼩细胞色素P450（CYP）家族…… 67
二、树鼩肝炎药靶基因…… 67
第八节 树鼩转录组学研究…… 68
一、树鼩转录组测序…… 68
二、树鼩基因表达信息…… 69
第九节 树鼩基因组数据库的开发…… 70
第十节 展 望…… 71

## 第四章 树鼩主要组织相容性复合物（MHC）的研究

第一节 前 言…… 76
第二节 MHC基因和分子的结构及功能 …… 76
一、MHC基因及分子结构 …… 77
二、MHC Ⅰ和Ⅱ类分子的功能 …… 79
第三节 树鼩MHC的结构 …… 81
一、树鼩MHC Ⅰ类基因及分子结构 …… 81

二、树鼩MHC Ⅱ类基因及分子结构 …… 84
第四节 树鼩MHC基因的遗传学特点 …… 86
一、多态性 …… 86
二、单倍型遗传 …… 87
三、连锁不平衡 …… 88
第五节 结语与展望 …… 89

**第五章 树鼩病毒限制因子TRIM5α/TRIMCyp的研究**

第一节 病毒限制因子TRIM5α …… 91
一、宿主限制因子TRIM5α的发现 …… 91
二、*TRIM5*基因及其转录本结构 …… 92
三、TRIM5α各个结构域的功能 …… 92
四、TRIM5α mRNA的组织分布 …… 93
五、TRIM5α限制逆转录病毒的可能机制 …… 93
六、TRIM5α以物种特异性的方式限制逆转录病毒 …… 94
七、TRIM5的进化特征 …… 94
八、TRIM5α参与天然免疫通路 …… 95
第二节 病毒限制因子TRIMCyp …… 96
一、亲环素A及其逆转座子 …… 96
二、灵长类动物TRIMCyp …… 97
第三节 树鼩*TRIM5*的研究 …… 99
一、树鼩*TRIM5*基因及其转录本结构 …… 99
二、树鼩*TRIM5*的组织分布和功能 …… 100
第四节 树鼩*TRIMCyp*的研究 …… 102
一、树鼩*TRIMCyp*形成模式 …… 102
二、树鼩*TRIMCyp*在攀鼩目与灵长目/皮翼目分化后产生并固定 …… 104
三、树鼩*TRIMCyp*的组织分布 …… 105
四、树鼩*TRIMCyp*的RBCC结构域与*TRIM5*的RBCC结构域所受选择压力不同 …… 106
五、树鼩*TRIMCyp*不能限制HIV-1和SIVmac …… 106
六、树鼩*TRIMCyp*参与天然免疫调控 …… 108
第五节 结语与展望 …… 109

**第六章 树鼩肿瘤相关基因介绍**

第一节 前 言 …… 114
第二节 树鼩肿瘤相关基因比较分析 …… 114
一、肿瘤相关基因来源及比较方法 …… 114
二、同源性比对结果 …… 115
三、树鼩-人同源性比小鼠-人同源性高10%以上的基因介绍 …… 120

四、树鼩特有同源基因介绍…… 133
五、树鼩特有同源基因及树鼩–人同源性较高的肿瘤相关基因信号通路聚类分析 …… 140
第三节 肿瘤动物模型情况概述…… 143
第四节 结语与展望…… 143

## 第七章 树鼩的脑形态

第一节 树鼩脑的大体形态…… 146
第二节 树鼩脑的演化…… 147
第三节 树鼩脑中一些特化较大的结构…… 148
一、树鼩脑的皮层下结构…… 148
二、大脑及大脑皮层…… 149
第四节 树鼩脑功能解剖…… 150
一、视觉系统…… 150
二、听觉系统…… 152
三、体感系统…… 152
四、树鼩的锥体和锥体外运动系…… 153

## 第八章 树鼩脑活体$T_2$加权MRI立体定位图谱

第一节 前 言…… 156
第二节 $T_2$加权MRI树鼩大脑核团与白质结构标定 …… 156
一、动物准备与数据采集…… 156
二、数据处理…… 157
三、树鼩脑MRI的表面解剖 …… 157
四、主要核团和白质结构标注…… 158
第三节 结 语…… 163

## 第九章 树鼩脑结构的演化与行为

第一节 前 言…… 165
第二节 脑结构、功能及其演化…… 166
一、脑外观的基本形态和结构…… 166
二、树鼩脑的演化地位…… 167
第三节 感知觉及相关行为…… 168
一、视 觉…… 168
二、痛觉与行为…… 169
三、嗅觉和听觉…… 169
第四节 学习与记忆…… 170
第五节 应激及情绪行为…… 172

第六节 昼夜节律…… 173

## 第十章 树鼩情绪相关脑区肽能神经元分布

第一节 树鼩情绪相关脑区的解剖结构…… 175
一、下丘脑…… 175
二、内侧前额叶和扣带回皮层…… 177
三、杏仁核体…… 177
四、海马结构…… 178
五、隔 区…… 179
六、终纹床核…… 179
第二节 树鼩情绪相关脑区中肽能神经元分布…… 180
一、加压素神经元在情绪相关脑区中分布…… 180
二、催产素神经元在情绪相关脑区中分布…… 184
三、促肾上腺皮质激素释放激素神经元在情绪相关脑区中分布…… 188
四、血管活性肠肽神经元在情绪相关脑区中分布…… 192
五、神经肽Y神经元在情绪相关脑区中分布 …… 194

## 第十一章 树鼩基础生理学数据

第一节 前 言…… 207
第二节 驯养树鼩常规形态和解剖学数据…… 208
一、体尺指标数据…… 208
二、主要脏器指标数据…… 210
三、脑容量数据…… 211
第三节 驯养树鼩的基础生理学指标…… 212
一、基础身体指标…… 212
二、脑 电…… 214
三、生理节律…… 215
四、糖代谢指标…… 215
五、应激内分泌学指标…… 216
第四节 存在问题与展望…… 217

## 第十二章 树鼩基础生理代谢

第一节 树鼩基础生理代谢…… 220
一、树鼩体重、空腹血糖、性别和年龄的关系…… 220
二、树鼩肥胖与糖脂代谢…… 223
三、温度和季节对树鼩生理代谢的影响…… 224
第二节 树鼩肝脏和肌肉蛋白质组学…… 224

第三节　树鼩脂代谢相关基因研究…… 225
一、树鼩脂代谢基因比较基因组学…… 225
二、树鼩FABP家族 …… 227
三、硬脂酰辅酶A去饱和酶基因 …… 228

## 第十三章　树鼩的血液生理生化

第一节　树鼩的常用血液生物化学指标…… 233
第二节　树鼩的常用血液学指标…… 237
一、骨髓细胞形态学分析…… 237
二、外周血细胞数量检测…… 241

## 第十四章　树鼩乳腺生物学

第一节　树鼩乳腺的正常发育…… 245
一、树鼩乳腺的特征…… 245
二、树鼩乳腺发育过程中的激素变化…… 250
第二节　树鼩乳腺相关疾病…… 251
一、树鼩乳腺自发肿瘤…… 251
二、树鼩乳腺寄生虫…… 255
第三节　树鼩乳腺相关基因克隆和分析…… 255
一、激素受体*ESR*基因 …… 255
二、生长因子受体…… 257
三、原癌基因和抑癌基因信号途径…… 259

## 第十五章　树鼩共生微生物

第一节　微生物与微生物学基础理论…… 265
一、微生物与微生物学…… 265
二、微生物的种类与分布…… 265
三、微生物的特点…… 266
第二节　动物与微生物的关系…… 267
一、有益微生物…… 267
二、条件致病微生物…… 267
三、病原微生物…… 267
第三节　树鼩共生微生物情况分析…… 267
一、体表共生微生物…… 268
二、口腔共生微生物…… 269
三、呼吸道共生微生物…… 269
四、肠道共生微生物…… 270

五、肛门共生微生物…… 271
第四节 树鼩共生微生物对树鼩资源的开发利用与标准化研究的意义…… 272
一、人工驯养繁殖对树鼩共生微生物的影响…… 272
二、树鼩的共生微生物研究推进其实验动物化进程…… 273
三、树鼩的人工驯养繁殖和实验树鼩标准化的推进…… 273

## 第十六章 树鼩正常组织学及图解

第一节 神经系统…… 275
第二节 循环系统…… 278
第三节 呼吸系统…… 279
第四节 消化系统…… 281
一、消化管…… 281
二、消化腺…… 281
第五节 泌尿系统…… 287
第六节 生殖系统…… 289
第七节 内分泌系统…… 291
第八节 免疫系统…… 293
第九节 肌肉、皮肤和脂肪…… 295

## 第十七章 树鼩生殖生理与辅助生殖

第一节 树鼩生殖器官解剖结构及生理特性…… 297
一、雄性生殖器官解剖结构及生理特性…… 297
二、雌性生殖器官解剖结构及生理特性…… 302
第二节 树鼩生殖内分泌学研究…… 309
一、妊娠期孕酮的分泌范型…… 309
二、雄性树鼩发育中雄激素分泌的范型…… 309
第三节 树鼩人工辅助生殖技术…… 310
一、树鼩精液采集和冷冻保存…… 310
二、胚胎移植…… 324

## 第十八章 树鼩规范化人工繁育

第一节 树鼩饲养环境和设备…… 330
一、饲养环境…… 330
二、树鼩的饲养笼具…… 331
第二节 树鼩的饲料和饮水…… 332
一、饲料和饮水…… 332
二、应用效果…… 333

第三节　树鼩规范化人工繁育……334
一、树鼩的引进和检疫……334
二、树鼩繁殖群的管理……335
三、仔树鼩的培育……339
第四节　树鼩常见疾病及其防治……341
一、传染性胃肠炎……341
二、肺　炎　……342
三、外伤性创伤……342

# 2 第二篇 疾病树鼩模型

## 第十九章　抑郁症树鼩模型

第一节　抑郁症……347
第二节　抑郁症发病机理假说简介……347
一、“单胺类神经递质”假说……348
二、“神经营养因子”假说……348
三、“成年海马神经元新生”假说……348
四、“奖励缺失”假说……348
五、“应激”假说……348
六、“神经可塑性”假说……348
七、“谷氨酸受体功能”假说……349
第三节　抑郁症的动物模型……349
第四节　对现有抑郁症动物模型的评述……351
第五节　抑郁症动物模型的科学意义……352
第六节　抑郁症的树鼩模型研究进展……352
一、树鼩作为模型动物的潜在优势……352
二、树鼩抑郁症动物模型的研究进展……353
第七节　树鼩抑郁症动物模型研究现状及展望……355
一、树鼩抑郁症动物模型的研究现状……355
二、存在问题的分析与未来发展方向的展望……357

## 第二十章 树鼩与药物成瘾

第一节 药物成瘾及常用研究方法…… 363
第二节 树鼩的药物成瘾研究现状和初步结果…… 364
一、戒断症状…… 366
二、部分树鼩可建立纳洛酮催瘾所致条件化位置厌恶…… 367
三、结合相邻饲养检测树鼩是否形成吗啡条件化位置偏好…… 368
第三节 树鼩建立吗啡依赖模型的局限性…… 369

## 第二十一章 情绪相关精神疾患的树鼩模型

第一节 前 言…… 371
第二节 抑郁症模型…… 372
一、社会挫败模型…… 373
二、习得性无助模型…… 375
三、慢性不可预见性温和应激模型…… 376
第三节 树鼩的药物成瘾模型…… 377
一、自我给药模型…… 377
二、条件位置偏爱模型…… 378
第四节 树鼩的创伤后应激障碍模型…… 379
第五节 慢性痛模型…… 381
第六节 树鼩的攻击行为…… 382
第七节 研究展望…… 382

## 第二十二章 树鼩病毒感染模型的研究

第一节 前 言 …… 385
第二节 乙型肝炎病毒树鼩感染模型的研究…… 385
一、乙型肝炎病毒…… 385
二、乙型肝炎病毒的树鼩原代肝细胞培养模型…… 388
三、乙型肝炎病毒的树鼩体内感染模型…… 389
第三节 丙型肝炎病毒树鼩感染模型的研究…… 391
一、丙型肝炎病毒…… 391
二、丙型肝炎病毒的原代树鼩肝细胞培养模型…… 392
三、丙型肝炎病毒的树鼩体内感染模型…… 393
四、与丙型肝炎病毒相关的树鼩基因组学研究…… 393
第四节 其它病毒树鼩感染模型的研究…… 393
第五节 结语与展望…… 394

## 第二十三章　树鼩细菌感染模型

第一节　细菌感染疾病及其动物模型…… 399
第二节　几种树鼩细菌感染模型的建立…… 401
一、树鼩生物材料细菌感染模型…… 401
二、树鼩皮肤烧伤金黄色葡萄球菌感染模型…… 402
三、模型特点及应用…… 404
四、免疫抑制的树鼩绿脓杆菌肺炎模型…… 404
五、树鼩盲肠结扎与穿孔导致的多种细菌感染模型…… 406
六、树鼩对细菌内毒素（LPS）的免疫反应 …… 407
第三节　结语与展望…… 408

## 第二十四章　树鼩乳腺癌模型研究

第一节　动物模型在乳腺癌研究中的意义…… 411
一、乳腺癌的发生发展过程…… 411
二、乳腺癌动物模型类型…… 412
三、乳腺癌动物模型存在的困境…… 413
第二节　致癌剂DMBA联合MPA创建树鼩乳腺癌模型 …… 414
一、研究背景…… 414
二、树鼩乳腺癌诱发过程…… 414
三、肿瘤组织的检测…… 416
四、基因突变分析…… 418
五、讨　论…… 419
第三节　PyMT慢病毒诱导创建树鼩乳腺癌模型 …… 420
一、研究背景…… 420
二、慢病毒诱导树鼩乳腺肿瘤过程…… 421
三、慢病毒诱导乳腺肿瘤病理检测…… 422
四、讨　论…… 423

## 第二十五章　树鼩胶质母细胞瘤模型

第一节　胶质母细胞瘤概述…… 427
一、胶质母细胞瘤简介…… 427
二、人类胶质母细胞瘤的遗传学变异…… 428
三、人类胶质母细胞瘤组织病理学特征…… 428
四、胶质母细胞瘤治疗及前景…… 429
第二节　脑胶质瘤动物模型的研究及进展…… 430
一、非确定基因改变策略…… 430

二、确定基因改变策略…… 431
第三节 树鼩胶质母细胞瘤模型的研究…… 432
第四节 结语与展望…… 435

## 第二十六章 树鼩血栓疾病动物模型

第一节 血栓疾病研究概况…… 438
一、血栓概念及发病情况…… 438
二、血栓形成机制的研究…… 440
三、抗血栓药物研究情况…… 441
第二节 血栓疾病动物模型…… 442
一、人类疾病与动物模型…… 442
二、血栓疾病动物模型的研究情况…… 442
第三节 树鼩血栓模型…… 444
一、树鼩作为动物疾病模型的优势…… 444
二、树鼩颈部动静脉旁路血栓模型的构建…… 445
第四节 结 语…… 447

## 第二十七章 树鼩代谢性疾病模型

第一节 树鼩糖尿病动物模型…… 451
一、树鼩自发糖尿病…… 452
二、树鼩1型糖尿病动物模型 …… 453
三、树鼩2型糖尿病动物模型 …… 453
第二节 树鼩非酒精性脂肪肝模型…… 458
一、高热量食物诱导的树鼩非酒精性脂肪肝…… 458
二、罗格列酮治疗树鼩非酒精性脂肪肝…… 460
第三节 树鼩动脉粥样硬化…… 461

## 第二十八章 利用树鼩精原干细胞建立转基因树鼩的尝试

第一节 前 言…… 465
第二节 基因编辑的分子生物学技术简介…… 465
一、外源基因的随机插入…… 465
二、基因的定点编辑技术…… 465
第三节 进行稳定遗传基因编辑需要的细胞种类…… 467
一、在1-细胞胚胎中进行基因编辑…… 467
二、在多能干细胞中进行基因编辑…… 468
三、在雄性生殖干细胞中进行基因编辑…… 468
第四节 树鼩基因编辑的现状分析…… 468

第五节　利用精原干细胞建立转基因树鼩的初步尝试…… 469
一、树鼩睾丸细胞的分离及精原干细胞的体外培养尝试…… 469
二、树鼩精原干细胞的表面分子标记的筛选…… 471
三、白消安处理建立精原干细胞移植受体…… 471
第六节　结语与展望…… 474

# 1 第一篇
# 树鼩基础生物学

TREE SHREW BASIC BIOLOGY


- 第一章　树鼩进化分类地位的分子证据
- 第二章　树鼩群体遗传多样性
- 第三章　树鼩基因组测定与特点概述
- 第四章　树鼩主要组织相容性复合物（MHC）的研究
- 第五章　树鼩病毒限制因子TRIM5α /TRIMCyp的研究
- 第六章　树鼩肿瘤相关基因介绍
- 第七章　树鼩的脑形态
- 第八章　树鼩脑活体$T_2$加权MRI立体定位图谱
- 第九章　树鼩脑结构的演化与行为
- 第十章　树鼩情绪相关脑区肽能神经元分布
- 第十一章　树鼩基础生理学数据
- 第十二章　树鼩基础生理代谢
- 第十三章　树鼩的血液生理生化
- 第十四章　树鼩乳腺生物学
- 第十五章　树鼩共生微生物
- 第十六章　树鼩正常组织学及图解
- 第十七章　树鼩生殖生理与辅助生殖
- 第十八章　树鼩规范化人工繁育



# Tree shrews



# 第一章

第一篇树鼩基础生物学
TREE SHREW BASIC BIOLOGY

Tree shrews

# 树鼩进化分类地位的分子证据

许　凌　姚永刚

## 第一节 前　言

树鼩（tree shrew），隶属于攀鼩目（Scandentia），为外形类似于松鼠的一类小型哺乳动物，体重一般不超过300g，广泛分布于南亚、东南亚及我国南部与西南部地区[1]。虽然人类对树鼩的研究已有约200年历史，但直到20世纪七八十年代，树鼩在生物医学方面的研究才引起较多的关注[2]。在生理解剖、神经发育、肝炎病毒感染特性及心理应激模式等方面树鼩与灵长类，甚至人类高度相似[3]。且树鼩具有体形小、饲养成本低及繁殖周期短等特点，被应用于人类医学实验研究的诸多领域，尤其是在人类病毒性肝炎模型的研究中具有独特优势[4]。另外，树鼩拥有哺乳动物中最大的脑–体重比，是研究脑功能和神经退行性疾病的理想模型[5, 6]。如今，树鼩作为一类具有潜在应用价值的新型模式动物，已越来越多地受到人们的关注。

在树鼩被应用于生物医学研究诸多领域的同时，对于树鼩自身所处的系统进化分类地位的研究也未曾离开人们的视线。由于根据形态学数据与分子证据得到的结论之间存在显著差异，导致树鼩系统分类地位一直存在争议[7, 8]。为了解决这个问题，研究者纷纷利用更有代表性的DNA长片段（甚至是树鼩全基因组序列）、建立更多独立的数据集合及结合更多种计算方法等手段来阐明树鼩与其它物种的亲缘关系。这些方法的建立和利用丰富了分子系统发育进化理论，也为探讨各物种分类提供了有效的分子证据。本章节通过回顾树鼩的分类地位，总结各国学者通过不同分子证据，主要是线粒体基因序列和核基因序列数据，探讨树鼩系统进化分类地位的问题，以期全面认识树鼩的进化地位。

## 第二节 树鼩的传统分类地位

### 一、树鼩归类于攀鼩目

1780年，树鼩被误认为是松鼠而被准确描述并附绘图，但直到40年后才作为哺乳动物的一个独立类群而被认识，并被归入食虫类，如最早被定名的普通树鼩（*Tupaia glis*）即是作为鼩鼱属的一个物种被命名的（*Sores glis* Diard, 1820）。1821年，Raffles在描记两新物种的同时以新种*Tupaia ferruglinea*（*Tupaia glis* 同物异名）为模式种建立了树鼩属（*Tupaia*）[1]。此后Gray于1825年以树鼩属为模式属建立树鼩亚科（Tupaiinae）并置于鼹科（Talpidae），当然此时的鼹科包含了除象鼩（macroscelids）以外的所有现生食虫类动物（Gray，1825）。随着研究的深入，特别是解剖学研究的进展，19世纪中叶发现原有食虫类动物存在盲肠有（树鼩、象鼩）或无（其它食虫类）的区分，这一发现在进化与分类上的意义部分为21世纪初分子系统学研究所证实[9]。然而进一步的形态学研究表明，树鼩科动物与原始的狐猴类动物在颅骨和生殖系统方面具有相似性。Carlsson（1922）首次提出树鼩与灵长目之间存在着密切关系，其依据是两者在颅骨、牙齿、肌群、胃肠道及生殖系统等方面有很多共同特征，但是这些特征在象鼩或其它食虫类动物中没有，因而将树鼩科归入灵长类原猴亚目（Prosimii）。这一假说随后得到基于树鼩头骨、大脑、颅后骨等详细解剖数据的支持[10]，并且古生物学、分子与形态研究等结果也提示树鼩应归入灵长目[11～13]。然而，作为一个独立的类群，树鼩并无现存的近亲，而被认为最好建立一个目级分类单元——攀鼩目（Scandentia）。Zeller（1986）根据树鼩头骨形态发生的研究结果，即树鼩与灵长类间无联系，强烈支持树鼩科应作为一个独立的目（表1–1）。近年来在哺乳动物高级分类阶元的研究中，分子系统发育研究结果揭示树鼩与皮翼类、灵长类及食虫类明显形成了一个自然的独立类群[9]。

表1–1 树鼩分类地位历史（经Wiley许可，引自文献2）

| | |
|---|---|
| 食虫目 | Wagner, 1855; Haeckel, 1866 |
| 盲肠目 | Gregory, 1910 |
| 灵长目 | Carlsson, 1922; Le Gros Clark, 1926; Simpson, 1945; Napier and Napier, 1967 |
| 移出灵长目 | Van Valen, 1965; McKenna, 1966; Campbell, 1966; Martin, 1966; Szalay, 1969 |
| 攀鼩目 | Butler, 1972 |

### 二、争论不休的攀鼩目

在明确攀鼩目为一独立分类单元后，对于攀鼩目在哺乳动物中的系统关系，即究竟是灵长总目中灵长动物分支成员还是啮齿动物分支成员，仍有不少争议。总体而言大致有以下三种观点：①将皮翼目（Dermoptera）和攀鼩目归为巽他兽类（Sundatheria）的一支而成为灵长目的旁系群[9, 14]；

②认为攀鼩目与皮翼目动物和灵长目动物共同组成了灵长动物（Euarchonta），更进一步将灵长目及皮翼目归为灵长形类（Primatomorpha）而成为攀鼩目的旁系群[15]；③认为攀鼩目是兔形目（Lagomorpha）的近缘旁系群[16]，再加上啮齿目动物一同形成了灵长总目的啮齿动物（Glires）分支。这样的争论时至今日，仍然没有得到统一的结论。

目前，攀鼩目被分为2科5属。2科分别为白昼活动的树鼩科（Tapaiidae）和黄昏或者晚上活动的笔尾树鼩科（Ptilocercidae）。树鼩科由4属组成，包含20种及44亚种，分布于南亚、东南亚及中国南部与西南部地区，分别是南印树鼩属（*Anathana*）、细尾树鼩属（*Dendrogale*）、树鼩属（*Tupaia*）及菲律宾树鼩属（*Urogale*）；而笔尾树鼩科只有1单型属笔尾树鼩属（*Ptilocercus*）。树鼩科中最大属为树鼩属（*Tupaia*），分布有15种40亚种[1]（相关物种或亚种的名录详见第二章）。然而这样的分类也存在争议，Davis认为这样的划分不可行，因为细尾树鼩属从形态学角度介于笔尾树鼩和其它树鼩之间[17]。时至今日，对于攀鼩目动物内部的系统进化关系亦还没有一致结论（图1–1）。

北树鼩（*Tupaia belangeri*）为攀鼩目在我国的唯一代表，分布于克拉地峡（Isthmus of Kra）以北地区，包括泰国、柬埔寨、老挝、越南、缅甸、孟加拉、印度东北部与中国南部。在亚种分类上，王应祥[18]基于外部毛色及形态特征比较将中国现生树鼩分为6个亚种，即：滇西亚种（*T. b. chinensis*）、高黎贡山亚种（*T. b. gaoligongensis*）、海南亚种（*T. b. modesta*）、越北亚种（*T.*

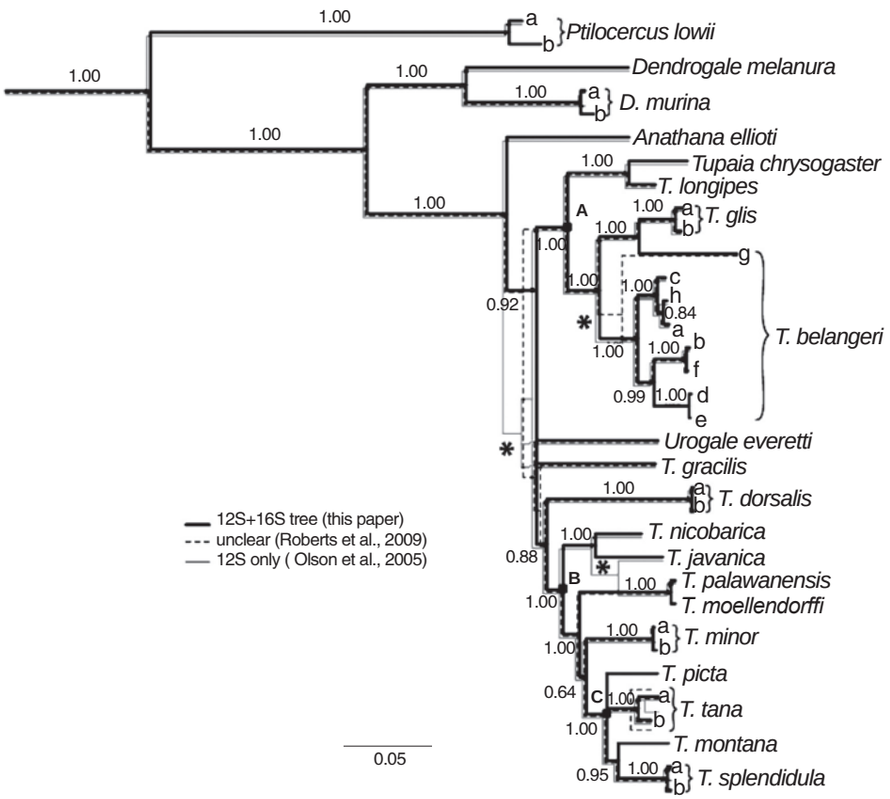



**图1–1　攀鼩目动物内部的系统进化关系至今仍未确定**

用MrBayes计算达到50%一致的（黑色）系统进化树，覆盖先前公布的Olson等[17]和Roberts等[19]人构建的树鼩内部不同亚种的拓扑结构，分支长度及后验概率仅适用于新的树，其它树木均只参考拓扑结构。星号表示这些树木之间分歧的领域。分支终端显示不同的个体在不同的研究标本测序组差异（经Elsevier许可，引自文献20）。

*b. tonquinia*）、滇南亚种（*T. b. yunalis*）及瑶山亚种（*T. b. yaoshanensis*）。尽管Corbet & Hill（1992）承认了其中的4个亚种，但认为*chinensis*和*modesta*为同物异名。Helgen[1]则将北树鼩仅分为2亚种：*T. b. belangeri*和*T. b. chinensis*，当然，他也指出需要对该物种的种内地理分化进行仔细研究。

## 第三节 基于分子证据界定树鼩的进化地位

### 一、基于分子证据界定物种进化地位的方法——系统发育研究方法

一般而言，界定某一物种的进化分类地位，除了依靠传统分类学家根据物种的形态、化石进行划分外，分子证据对追溯物种进化历史、进化机制也必不可少。从分子的角度进行研究，需要借助一些研究物种系统发生关系的方法，主要通过构建系统发生树（phylogenetic tree）来进行。系统发生树，亦称演化树（evolutionary tree），是根据物种之间的遗传历史来描述它们的世系关系，表明被认为来自共同祖先的各物种间演化关系树。在进化树中，每个节点代表其各分支内物种的最近共同祖先，而节点间的枝长度对应于计算得到的进化距离（如估计的演化时间）。构建系统发生树的算法多种多样，常见的有近邻结合法（Neighbor-Joining, NJ）、最大简约法（Maximum Parsimony, MP）、最大似然法（Maximum Likelihood, ML）、贝叶斯（Bayesian）后验概率法等。采用不同算法有时会出现构建的系统发育树聚类结果不同的现象，这主要是由于不同的算法侧重点不同，故而产生不同的结果。

#### （一）近邻结合法（Neighbor–Joining, NJ）

近邻结合法最早由Naruya Saitou和Masatoshi Nei（1987）提出。该方法依赖距离矩阵资料建立支序图或亲缘关系图。先由序列算出每一组物种间的进化距离，将所有的进化距离资料整理成一个距离矩阵，再利用距离矩阵的资料画出树形。依据该方法构建的进化树相对准确，而且计算快捷。其缺点是序列上的所有位点都被同等对待，而且，所分析的序列的进化距离不能太大。

#### （二）最大简约法（Maximum Parsimony, MP）

最大简约法根据分子序列的变异程度，来分析物种之间的演化关系，进而建构出演化树。该方法对所有可能的拓扑结构进行计算，并计算出所需替代数最小的那个拓扑结构，作为最优树。简而言之，以最大简约法建构的系统发生树是以进化过程具有最少次变化为前提，表示现存资料在过去的进化过程应由最少次步骤所形成，所需变异次数最少的一棵演化树为最合适的结果（Fitch, 1971）。其优点是不需要在处理核苷酸或者氨基酸替代的时候引入假设（替代模型）。此外，最大简约法对于分析某些特殊的分子数据如插入、缺失等序列有用。在分析的序列位点上没有回复突变或平行突变，且被检验的序列位点数很大的时候，最大简约法能够推导获得一个很好的进化树。然而，当分析的序列上存在较多的回复突变或平行突变，而被检验的序列位点数又比较少的时候，最大简约法可能会给出一个不合理的甚至可能是错误的进化树，使得原本不同起源的生物被归为相近生物。

### （三）最大似然法（Maximum Likelihood, ML）

最大似然法分析中，选取一个特定的替代模型来分析给定的一组序列数据，使得获得的每一个拓扑结构的似然率都为最大值，然后再挑出其中似然率最大的拓扑结构作为最优树。该方法的基本思想是：当从模型总体随机抽取*n*组样本观测值后，最合理的参数估计量应该使得从模型中抽取该*n*组样本观测值的概率最大，而不是像最小二乘估计法旨在得到使模型能最好地拟合样本数据的参数估计量。在最大似然法的分析中，所考虑的参数并不是拓扑结构而是每个拓扑结构的枝长，并对似然率求最大值来估计枝长。最大似然法明确地使用概率模型，寻找能够以较高概率产生观察数据的系统发生树。作为一类完全基于统计的系统发生树重建方法的代表，该方法在每组序列比对中考虑了每个核苷酸替换的概率，但缺点是计算强度非常大，极为耗时。

### （四）贝叶斯法（Bayesian）

贝叶斯法是基于后验概率的一种算法。“贝叶斯法则”的原理无须数字也可明了，当不能准确知悉一个事物的本质时，可以依靠与事物特定本质相关的事件出现的多少去判断其本质属性的概率，即支持某项属性的事件发生得愈多，则该属性成立的可能性就愈大。依据贝叶斯法得到的系统进化树不需要利用自引导法进行检验，其后验概率直观地反映了系统进化树的可信程度，它既能根据分子进化的现有理论和各种模型用概率重建系统进化关系，又克服了最大似然法计算速度慢、不适用于大数据集样本的缺陷；缺点是其值完全依赖于数学上的计算，没有充分考虑到生物学背景知识。

## 二、线粒体DNA数据揭示树鼩与兔形目动物是“近亲”

线粒体DNA（mtDNA）由于具有母系遗传及缺乏重组等特点，被广泛用于研究物种系统发生关系[21~25]。树鼩线粒体全基因组最早由德国灵长类研究中心在2000年测序完成[26]，全长16754个碱基，与已知的哺乳动物线粒体基因组组成基本类似。有趣的是，树鼩线粒体基因组中的*COXII*基因和tRNA-Lys紧密相连，该特点与啮齿目动物几内亚猪（*Cavia porcellus*）相同，但不同于其它哺乳动物。

Schmitz等[26]利用树鼩线粒体DNA重链的12个蛋白编码序列与翼手目动物牙买加果蝠（*Artibeus jamaicensis*），啮齿目动物小家鼠（*Mus musculus*）、褐家鼠（*Rattus norvegicus*），兔形目动物欧兔（*Oryctolagus cuniculus*）、天竺鼠（*Cavia porcellus*），偶蹄目动物马（*Equus caballus*）、欧洲野牛（*Bos taurus*）以及7个具有代表性的类人猿亚目动物的序列进行系统树构建，并以负鼠（*Didelphis virginiana*）作为外群，通过不同的算法，最终认为树鼩是兔形目动物的近缘旁系群这个结论有较高的可信度。Lin等[27]在研究兔形目和啮齿目动物mtDNA基因组的系统发育关系过程中，也发现树鼩与兔形目存在很强的近缘关系，攀鼩目是兔形目的近缘旁系群。但是这样的划分也存在不合理之处，因为这类分析没有包括灵长目的另一类近缘动物——皮翼目动物[26，27]。于是，Arnason等[16]通过对60个真兽亚纲动物的mtDNA基因组全序列在核苷酸和蛋白水平上进行系统进化发育关系分析，发现在有皮翼目动物猫猴（*Cynocephalus variegatus*）的情况下，树鼩与兔形目动物的亲缘关系依然要近于灵长动物（图1–2A）。另外，线粒体编码的蛋白共有13个，但是在Schmitz等[26]的研究中，没有使用由轻链编码的ND6蛋白，这是由于ND6蛋白在氨基酸组成上与其它线粒体编码的蛋白相比变异度非常大[28]，很少被用于系统进化分析。有趣的是，利用这

样变异度大的蛋白进行系统发育进化分析，显示树鼩与啮齿目动物的亲缘关系依然要更近于灵长动物[28]。与该结果一致的是，Hudelot等[29]利用数据库中69个物种的线粒体全基因组中的tRNA和rRNA序列，针对RNA替换速率的特点（作为DNA–氨基酸的中间态的RNA，其替换速率取决于序列中碱基的热稳定性），选用似然法中的两种进化模型模拟线粒体RNA序列中的不同部分（对于配对位点选用配对位点模型；对于非配对位点选用单位点模型），再加上贝叶斯算法（Bayesian algorithm）和马尔卡夫蒙地卡罗算法（Markov Monte Carlo method，MCMC）以获得最可能的系统进化发育树和后验概率枝系，结果也支持树鼩与兔形目动物的亲缘关系更加接近[29, 30]。由此看来，mtDNA数据分析的结果一致认为树鼩是兔形目动物的近缘旁系群。

在前期研究中，我们测定了3只中国树鼩（*Tupaia belangeri chinensis*）和1只马来猫猴（*Galeopterus variegatu*）的mtDNA全基因组序列。结合前人报道的灵长动物和其它相关物种的mtDNA基因组数据，我们对攀鼩目、皮翼目和灵长目中代表性物种之间的亲缘关系进行了重构[31]。结果显示，中国树鼩和马来猫猴mtDNA基因组的基因组织和结构形式与其它哺乳动物的mtDNA基因组相似。依据12个线粒体蛋白编码基因构建的系统发育树显示攀鼩目动物和兔形目动物之间的关系更加密切，而皮翼目动物和灵长类动物组成姐妹群，该结果与前人基于mtDNA数据分析的结果相吻合。基于文献及我们mtDNA基因组研究的结果表明，树鼩同灵长类动物的亲缘关系可能并没有我们想象的那么接近[31]（图1–2B）。

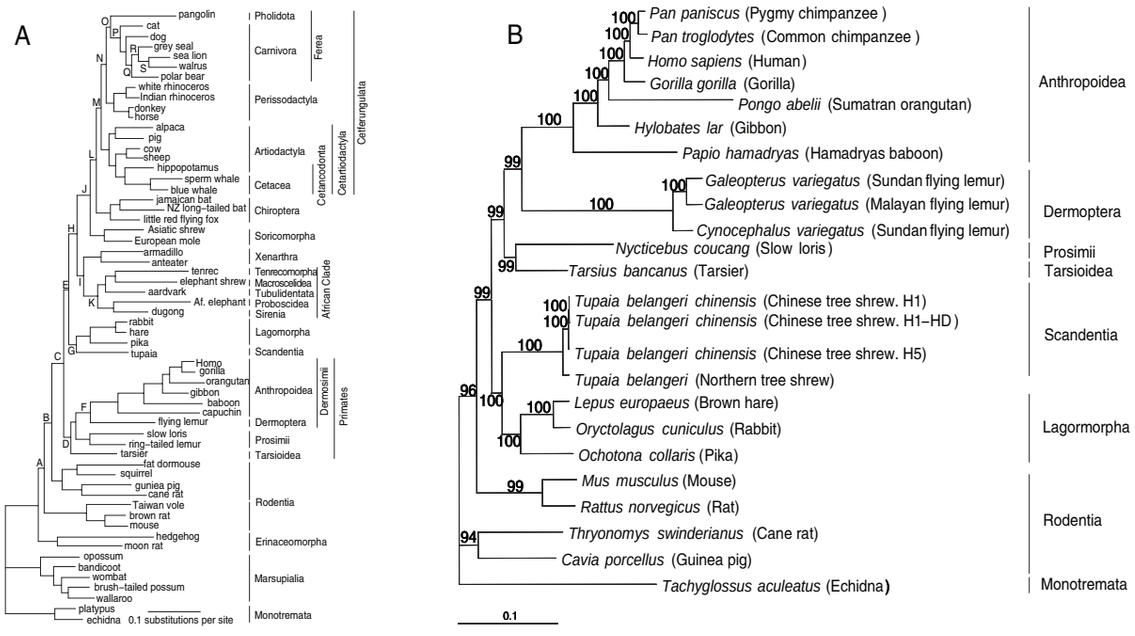



**图1–2　基于线粒体DNA数据揭示树鼩与兔形目动物是“近亲”**

（A）根据60个真哺乳亚纲动物构建的系统树显示树鼩是兔形目近缘旁系群[16]；（B）根据18种灵长总目构建的系统发育树显示中国树鼩与兔形目的亲缘关系最近（经Elsevier许可，引自文献31）。

树鼩科内部不同种属间的系统发育地位也是一个有趣的问题。Olson等[17]利用具有高保守性的线粒体12S rRNA序列片段，分析了来自多个地域的已报道树鼩物种的系统发育关系，认为笔尾树鼩属是其它树鼩属的姐妹支系，较早与其它属发生分歧；接着是婆罗洲树鼩与其它树鼩科动物发生分歧；但是仍然未分辨出树鼩科内其它属之间的种系关系。

## 三、核基因数据分析

由于mtDNA数据的局限性，来自核基因的数据被较多地应用于树鼩的分类地位探讨。基于单个核基因片段或多个核基因数据集，目前已有较多研究，然而这些研究揭示的结果不尽相同。

### （一）树鼩是皮翼目动物猫猴的近缘旁系群

Madsen等[14]通过分析26种有胎盘动物的DNA拼接片段，长度分别是5708bp和2947bp，否定了树鼩与皮翼目动物和灵长目动物共同形成灵长动物这一假说。但这两个DNA数据分析的结果不一致：5708bp的DNA数据支持树鼩与皮翼目动物共同形成近缘旁系群，而2947bp数据显示树鼩作为整个灵长总目动物（包括灵长动物和啮齿动物）的外群更为合适。在同一时期，Murphy等[9]利用16.4kb的DNA片段（包括19个核基因和3个线粒体基因），通过贝叶斯算法和最大似然法对42种有胎盘动物和2种有袋动物（作为外群）进行了系统发育关系重建，结果支持树鼩是皮翼目动物的近缘旁系群（图1–3）。另外，Amrine-Madsen等[32]采用载脂蛋白B（*APOB*）基因（共26个外

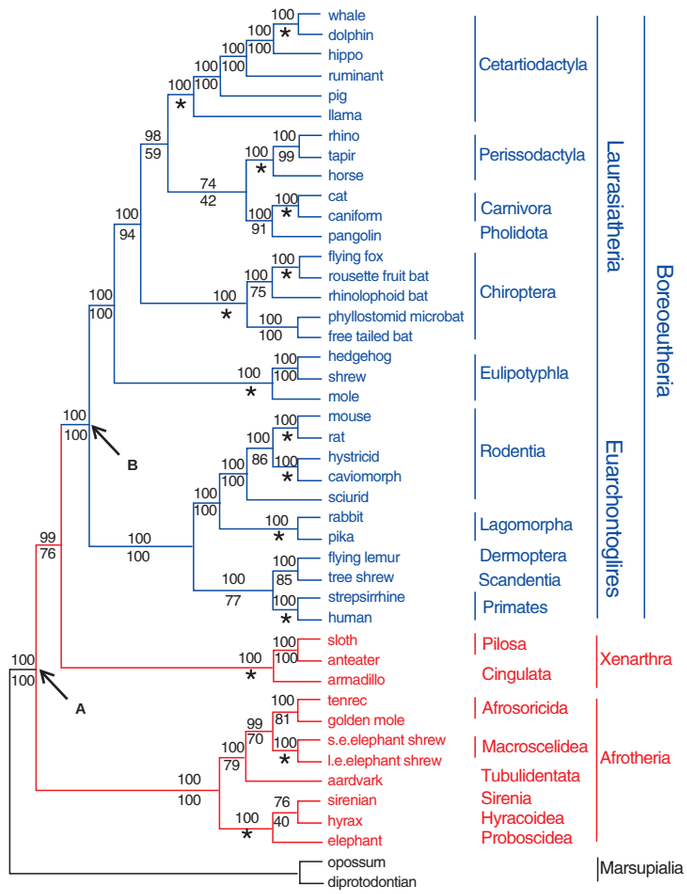



**图1–3　树鼩是皮翼目动物猫猴的近缘旁系群**

根据16.4kb的DNA片段（包括19个核基因和3个线粒体基因）构建的系统树显示树鼩与猫猴的亲缘关系[9]。

显子，1342bp），对63个属于真兽亚纲的动物进行了系统发育关系的分析，并将*APOB*基因片段同Murphy等[9]研究中16.4kb的DNA片段进行拼接串联，通过贝叶斯方法和最大似然法进行分析，结果支持树鼩与皮翼目动物的亲缘关系更加接近，而单独的*APOB*基因则支持树鼩与兔形目和啮齿目动物共同组成的啮齿动物分支。灵长总目动物中的染色体图染（chromosome painting）和细胞核型比较分析证实，树鼩的核型相对于人类而言具有很高的衍生性[33]。Nie等[34]通过染色体图染的方法建立了人和皮翼目动物猫猴的全基因组染色体比较图谱，在确定了44个猫猴和人同源性染色体后，通过与已发表染色体图谱相比较，G带核型（G-banded karyotype）分析认为树鼩与猫猴（*Galeopterus variegatu*）共享有一个独特的衍生型联接——HSA2q/21，该人类结合片段联接（human syntenic segment association, HSA）提示树鼩与猫猴是姐妹枝系，并且这个联接的产生来自于二者相似的常染色体。染色体图染结果支持树鼩是皮翼目动物猫猴的近缘旁系群[34]。

### （二）树鼩与皮翼目动物和灵长目动物共同组成灵长动物

部分报道的核DNA研究结果显示树鼩与猫猴亲缘关系较远，猫猴与灵长目动物的亲缘关系更加接近，三者一同形成灵长动物分支。Janečka等[15]通过两种独立的方式对灵长总目的进化关系进行了分析：首先对21个灵长总目动物的基因组中罕见的外显子插入缺失（共有197522个基因外显子）进行了多物种序列比对，其中，有3个特异性缺失支持灵长动物的单系起源，但没有任何的特异性缺失将树鼩与猫猴联系在一起，反而猫猴和灵长目共享了7个特异性缺失，树鼩与灵长目动物只共享了1个。其次，利用14kb、共19个核基因拼接片段进行贝叶斯和最大似然法分析，构建的系统发育树支持与灵长目动物最近缘的动物是皮翼目动物猫猴，该结果与mtDNA分析结果一致（图1–4）。另外，Killian等[35]利用甘露糖–6–磷酸和胰岛素样生长因子Ⅱ序列进行分析的结果，也支持树鼩与皮翼目动物和灵长目动物一同形成灵长动物分支，但皮翼目动物与灵长目动物亲缘关系更近。

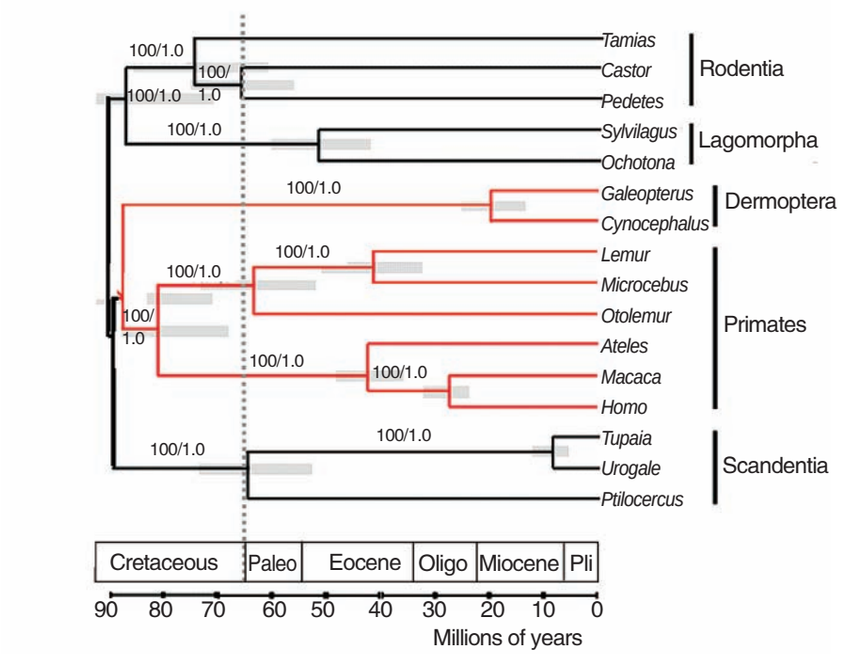



**图1–4　树鼩与皮翼目动物和灵长目动物共同组成灵长动物**

根据21个灵长总目动物的基因组中罕见的外显子插入缺失和长达14kb，共19个核基因片段构建的系统树显示树鼩与灵长动物的亲缘关系[15]。

### （三）树鼩是啮齿动物的近缘旁系群

目前也有核基因数据结果与线粒体数据结果一致的报道，显示树鼩属于啮齿动物分支。Bailey等[36]分析了11个灵长目动物和树鼩等的ε-球蛋白基因（*ε-globin* genes），结果显示树鼩与兔形目的亲缘关系更加接近。另外，Porter等[37]比较了包括树鼩在内的27个物种von Willebrand因子（von Willebrand factor, vWF）第28号外显子序列变异，基于最大简约法分析得到的系统发育树支持树鼩是啮齿动物的近缘旁系群。短分散重复序列（short interspersed elements, SINEs）来源于小RNA的复位，通过插入方式存在于所有的真核细胞基因组中，因为SINE具有在基因组中拷贝数高及在不同物种中序列的复杂性不同等特点，使得SINE成为有效的系统发育分子标记[38]。SINE由7SL RNA演化而来，并且在所有的灵长动物中都有不同的衍生形式，由单体二聚化形成二聚体[38]。Alu二聚化形式仅在灵长目动物中出现，B1型在啮齿目动物出现，树鼩中出现的Tu型单体（Tu type-m）序列则是Alu和B1型两种序列的嵌合型[39]。通过基因组搜索发现人和树鼩共享5个独立的反转录插入，而树鼩与褐家鼠（*Rattus norvegicus*）、小家鼠（*Mus musculus*）和欧兔（*Oryctolagus cuniculus*）共享了14个独立的反转录插入，这提示树鼩与啮齿动物共享更多相同的独特反转录插入[38]。但由于Kriegs等[38]的研究缺少其它兔形目动物和猫猴的数据，对树鼩具体的进化地位未能提供更多的信息（图1–5）。Hallström等[40]应用最大似然法对31个哺乳动物的3364个同源基因进行构树，结果显示树鼩与啮齿动物亲缘关系更近，但pSH（Shimodaira-Hasegawa probabilities）检测在一定程度上支持树鼩与灵长目更近，而邻接网络分析（neighbor-net）无法确定树鼩与灵长目和啮齿动物的关系。Meredith等[41]基于26个基因采用最大似然法和贝叶斯法构建系统发育树，发现树鼩与啮齿动物的亲缘关系更近。

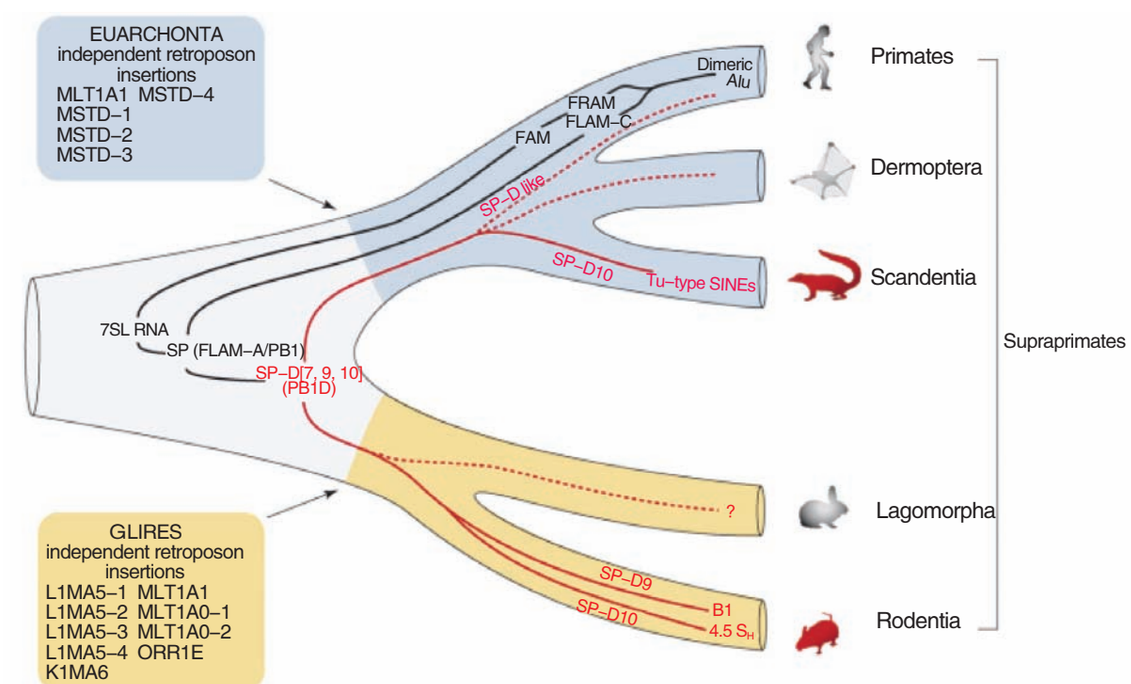



**图1–5　灵长总目的系统发育树显示由7SL RNA派生的SINE（经Elsevier许可，引自文献38）**
显示出树鼩与灵长目更接近的亲缘关系。

## （四）全基因组数据揭示树鼩是灵长类近亲

Lindblad-Toch等[42]利用美国Broad研究所公布的2X的不完整的树鼩基因组数据重构了29个哺乳动物的系统发育关系，显示树鼩是最接近灵长类的动物。在近期的一项研究中，Song等[43]

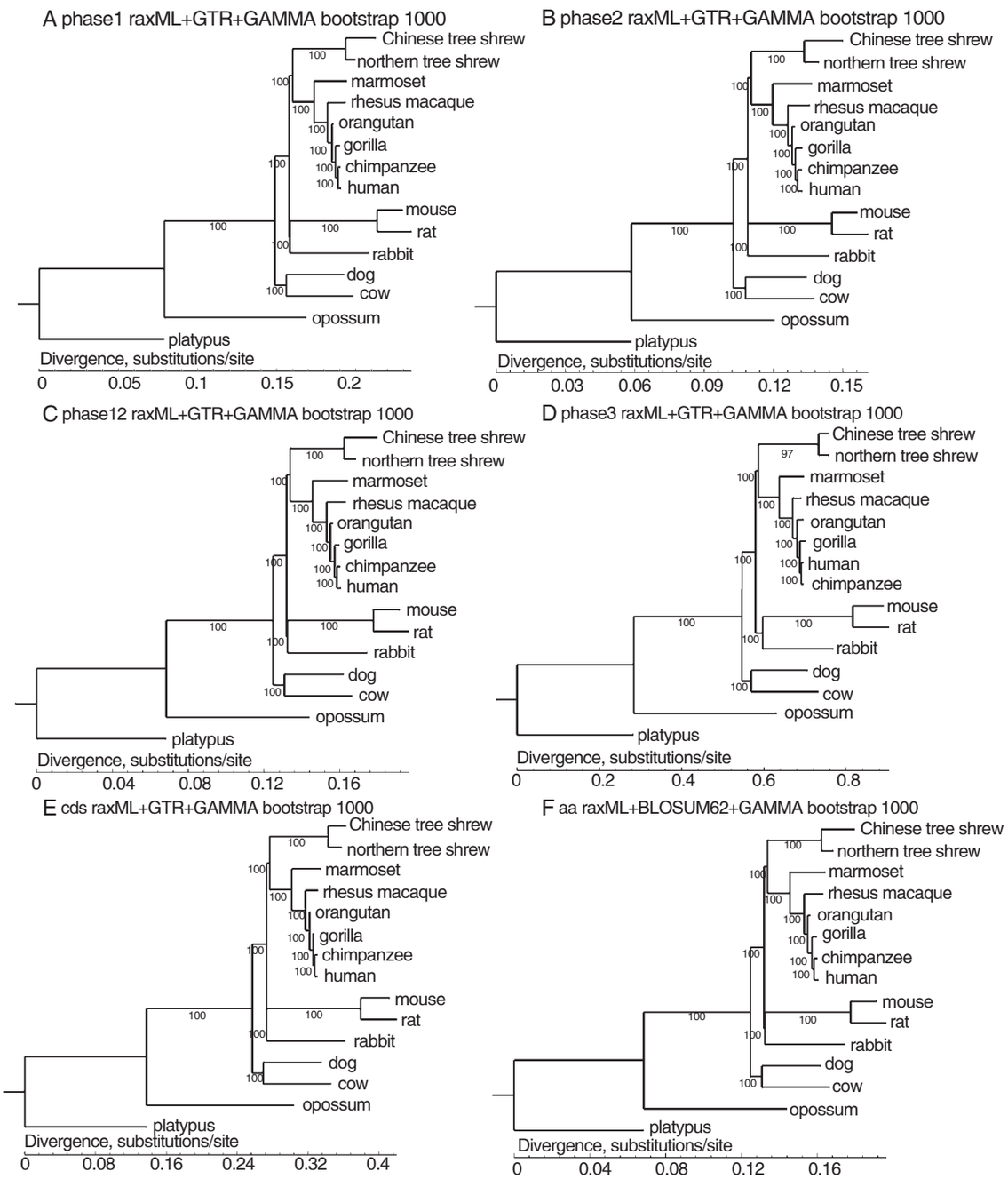



**图1–6　15个物种的系统发育树**

（A）第一位密码子序列构树结果；（B）第二位密码子序列构树结果；（C）第一、二位序列密码子构树结果；（D）第三位密码子序列构树结果；（E）CDS序列构树结果；（F）氨基酸序列构树结果[43]。

利用447个核基因重构37个物种的系统发育树，并联合物种树的最大假似然评估方法（maximum pseudolikelihood estimation of the species tree, MP-EST）和物种树的平均等级聚集评估方法（species tree estimation using average ranks of coalescence, STAR）对系统发育树进行更精确评估，显示树鼩与灵长类的亲缘关系最为接近。2013年2月，昆明动物研究所团队联合深圳华大基因，测定了一只来自云南的树鼩，并利用树鼩等15个哺乳动物（其中包括6个灵长类）的基因组数据，提取了2117个单拷贝基因重构系统发育树。结果表明，无论用基因编码序列还是蛋白质序列构树，树鼩均与灵长聚在一起，与灵长类亲缘最近（图1–6）[44]。

另外，2008年Hallström等人[45]利用Board发布的北树鼩基因组数据计算了树鼩与灵长类的分歧时间，结果提示树鼩大概在8650万年前与灵长类分开，而啮齿类与灵长类的分歧时间大概在8840万年前。在我们的研究中也得到了类似的结果，树鼩与灵长类的分歧时间大约发生在9090万年前，而啮齿类与灵长类的分歧时间大约发生在9640万年前（图1–7），两者皆说明了树鼩与灵长类密切的亲缘关系[43]。

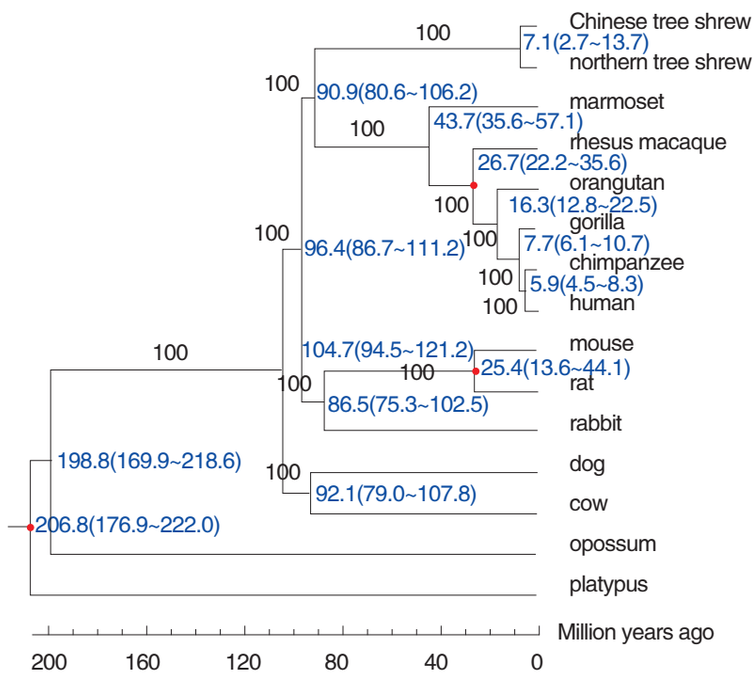



**图1–7　15个哺乳动物的分歧时间[43]**

## 第四节　结　语

综上所述，不同的研究分别利用线粒体基因序列和核基因序列数据进行系统进化分析，显示树鼩进化地位有很大的不同。线粒体数据倾向于树鼩作为啮齿类动物的近缘旁系群，与兔形目动物关系最为接近[22, 26, 31, 46]。核基因数据则倾向于支持树鼩归入灵长动物分支，但具体类群的聚类关系不同，有人认为树鼩是皮翼目动物猫猴的近缘旁系群[9, 14]，有人支持三者都属于灵长动物分支[15, 35]，也有人认为树鼩与啮齿动物的亲缘关系较近[36, 37, 47]。全基因组数据显示树鼩与灵长目动

物接近[43, 44]，但其精确定位有待于猫猴的全基因组序列来比较。

虽然分子遗传和形态证据的矛盾、分子遗传证据内部的矛盾导致最终呈现的树鼩分类地位的差异，但多数研究不排除树鼩与灵长类的亲缘关系。事实上，由于树鼩长期被认为是介于灵长类古老类型和现代灵长类之间的中间类型，树鼩在形态及分子遗传方面具有古老特征与更为进化的特征共存的特点。一些遗传特征保持与兔形目一致提示它们来源于共同的祖先，随后攀鼩目与灵长目的祖先进化出部分相同的形态特征[47～49]。因此，不论是用线粒体序列和核基因序列对树鼩进化分类地位的确认都是片面的。单独分析线粒体数据更多看到的是树鼩与兔形目相似的一面，而选择性分析不同的核基因或者一部分核基因片段也只是抓取到了树鼩进化过程中的某一个或某一时期的特征。因此，或许正如Janečka等[15]和Nie等[34]所指出，对灵长目动物的形态学和基因组进化的正确认识源于对其旁系群（猫猴、树鼩）的正确认识。要想获得对树鼩进化地位的全面认识，测定树鼩进化过程中近缘旁系群物种的全基因组应当是首先需要考虑的问题。

目前，基于树鼩全基因组数据构建的系统发育树、估算与灵长目动物的分歧时间，都支持树鼩与灵长类亲缘关系最近。树鼩与人类的亲缘性要高于目前广泛用于生物医药研究和动物模型建立的啮齿类动物，如小鼠和大鼠与人类的关系。这种近亲关系的确立，以及树鼩全基因组数据分析揭示出的其它遗传特性（参见第三章），不仅为进一步研究树鼩提供了重要基础数据，更重要的是为树鼩作为替代高成本、长周期的非人灵长类实验动物，成为新型的实验动物提供了坚实的支撑，这也为生物医药研究提供更具前景和经济有效的动物模型奠定夯实了理论基础。

【致谢】本章节早期版本发表于《动物学研究》［2013，34（2）：70–76］，入选本书时有删节与更新，并得到《动物学研究》版权授权。感谢蒋学龙研究员对于树鼩形态分类及其研究历史部分文字的把关审核。

## 参考文献

[1]Helgen KM, Wilson DE, Reeder DM. Order scandentia, mammal species of the World: a taxonomic and geographic reference (3rd). Maryland: Johns Hopkins University Press, 2005: 104-9.

[2]Sargis EJ. New views on tree shrews: the role of Tupaiids in primate supraordinal relationships. Evolutionary Anthropology: Issues, News, and Reviews, 2004, 13(2): 56-66.

[3]徐林，张云，梁斌，等．实验动物树鼩和人类疾病的树鼩模型研究概述．动物学研究，2013，34（2）：59–69.

[4]角建林，刘汝文，陈丽玲，等．树鼩资源的开发利用与标准化研究——我国实验动物资源建设发展战略探讨．中国比较医学杂志，2009，19（7）：73–8.

[5]彭燕章，叶智彰，邹如金，等．树鼩生物学．昆明：云南科技出版社，1991.

[6]Previc FH. The Dopaminergic mind in human evolution and history. Cambridge, New York, Melbourne, Madrid, Cape Town, Singapore, São Paulo, Delhi: Cambridge University Press, 2009.

[7]Shoshani J, Groves CP, Simons EL, et al. Primate phylogeny: morphological vs molecular results. Mol Phyl Evol, 1996, 5(1): 102-54.

[8]Olson LE, Sargis EJ, Martin RD. Phylogenetic relationships among treeshrews (Scandentia): A review and critique of the morphological evidence. J Mamm Evol, 2004, 11(1): 49-71.

[9]Murphy WJ, Eizirik E, O'Brien SJ, et al. Resolution of the early placental mammal radiation using Bayesian phylogenetics. Science, 2001, 294(5550): 2348-51.

[10]Clark WELG. On the brain of the tree-shrew (*Tupaia minor*). Proc Zool Soc Lond., 1924, 94(4): 1053-74.

[11]Novacek MJ. Mammalian phylogeny—shaking the tree. Nature, 1992, 356(6365): 121-5.

[12]Straus WL. The principles of classification and a classification of Mammals. By George Gaylord Simpson. Bull. Am. Mus. Nat. Hist. Am J Phys Anthropol, 1946, 4(2): 243-8.

[13]Simpson GG. The principles of classification and a classification of Mammals. B Am Mus Nat Hist, 1945, 85: 1-114.

[14]Madsen O, Scally M, Douady CJ, et al. Parallel adaptive radiations in two major clades of placental mammals. Nature, 2001, 409(6820): 610-4.

[15]Janecka JE, Miller W, Pringle TH, et al. Molecular and genomic data identify the closest living relative of primates. Science, 2007, 318(5851): 792-4.

[16]Arnason U, Adegoke JA, Bodin K, et al. Mammalian mitogenomic relationships and the root of the eutherian tree. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99(12): 8151-6.

[17]Olson LE, Sargis EJ, Martin RD. Intraordinal phylogenetics of treeshrews (Mammalia: Scandentia) based on evidence from the mitochondrial 12S rRNA gene. Mol Phyl Evol, 2005, 35(3): 656-73.

[18]王应祥．中国树鼩的分类研究．动物学研究，1987，8（3）：214–26．

[19]Roberts TE, Sargis EJ, Olson LE. Networks, trees, and treeshrews: assessing support and identifying conflict with multiple loci and a problematic root. Syst Biol, 2009, 58(2): 257-70.

[20]Roberts TE, Lanier HC, Sargis EJ, et al. Molecular phylogeny of treeshrews (Mammalia: Scandentia) and the timescale of diversification in Southeast Asia. Mol Phyl Evol, 2011, 60(3): 358-72.

[21]Krettek A, Gullberg A, Arnason U. Sequence analysis of the complete mitochondrial DNA molecule of the hedgehog, Erinaceus europaeus, and the phylogenetic position of the Lipotyphla. J Mol Evol, 1995, 41(6): 952-7.

[22]Arnason U, Gullberg A, Janke A. The mitochondrial DNA molecule of the *aardvark, Orycteropus afer*, and the position of the Tubulidentata in the eutherian tree. P Roy Soc B: Biol Sci, 1999, 266(1417): 339-45.

[23]Derchia AM, Gissi C, Pesole G, et al. The guinea-pig is not a rodent. Nature, 1996, 381(6583): 597-600.

[24]Rasmussen AS, Janke A, Arnason U. The mitochondrial DNA molecule of the hagfish (*Myxine glutinosa*) and vertebrate phylogeny. J Mol Evol, 1998, 46(4): 382-8.

[25]Zardoya R, Meyer A. The complete DNA sequence of the mitochondrial genome of a “living fossil”, the coelacanth (*Latimeria chalumnae*). Genetics, 1997, 146(3): 995-1010.

[26]Schmitz J, Ohme M, Zischler H. The complete mitochondrial genome of *Tupaia belangeri* and the phylogenetic affiliation of Scandentia to other eutherian orders. Mol Phyl Evol, 2000, 17(9): 1334-43.

[27]Lin Y-H, Waddell PJ, Penny D. Pika and vole mitochondrial genomes increase support for both rodent monophyly and glires. Gene, 2002, 294(1-2): 119-29.

[28]Waddell PJ, Shelley S. Evaluating placental inter-ordinal phylogenies with novel sequences including RAG1, gamma-fibrinogen, ND6, and mt-tRNA, plus MCMC-driven nucleotide, amino acid, and codon models. Mol Phyl Evol, 2003, 28(2): 197-224.

[29]Hudelot C, Gowri-Shankar V, Jow H, et al. RNA-based phylogenetic methods: application to mammalian mitochondrial RNA sequences. Mol Phyl Evol, 2003, 28(2): 241-52.

[30]Jow H, Hudelot C, Rattray M, et al. Bayesian phylogenetics using an RNA substitution model applied to early mammalian evolution. Mol Biol Evol, 2002, 19(9): 1591-601.

[31]Xu L, Chen S-Y, Nie W-H, et al. Evaluating the phylogenetic position of Chinese tree shrew (*Tupaia belangeri chinensis*) based on complete mitochondrial genome: implication for using tree shrew as an alternative experimental animal to primates in biomedical research. J Genet Genomics, 2012, 39(3): 131-7.

[32]Amrine-Madsen H, Koepfli KP, Wayne RK, et al. A new phylogenetic marker, apolipoprotein B, provides compelling evidence for eutherian relationships. Mol Phyl Evol, 2003, 28(2): 225-40.

[33]Müller S, Stanyon R, O’Brien PCM, et al. Defining the ancestral karyotype of all primates by multidirectional chromosome painting between tree shrews, lemurs and humans. Chromosoma, 1999, 108(6): 393-400.

[34]Nie WH, Fu BY, O’Brien PCM, et al. Flying lemurs—The “flying tree shrews”? Molecular cytogenetic evidence for a Scandentia-Dermoptera sister clade. BMC Biol, 2008, 6: 18.

[35]Killian JK, Buckley TR, Stewart N, et al. Marsupials and Eutherians reunited: genetic evidence for the *Theria*

*hypothesis* of mammalian evolution. Mamm Genome, 2001, 12(7): 513-7.

[36]Bailey WJ, Slightom JL, Goodman M. Rejection of the "flying primate" hypothesis by phylogenetic evidence from the epsilon-globin gene. Science, 1992, 256(5053): 86-9.

[37]Porter CA, Goodman M, Stanhope MJ. Evidence on mammalian phylogeny from sequences of exon 28 of the von Willebrand factor gene. Mol Phyl Evol, 1996, 5(1): 89-101.

[38]Kriegs JO, Churakov G, Jurka J, et al. Evolutionary history of 7SL RNA-derived SINEs in Supraprimates. Trends Genet, 2007, 23(4): 158-61.

[39]Nishihara H, Terai Y, Okada N. Characterization of novel Alu- and tRNA-related SINEs from the tree shrew and evolutionary implications of their origins. Mol Biol Evol, 2002, 19(11): 1964-72.

[40]Hallström BM, Janke A. Mammalian evolution may not be strictly bifurcating. Mol Biol Evol, 2010, 27(12): 2804-16.

[41]Meredith RW, Janečka JE, Gatesy J, et al. Impacts of the cretaceous terrestrial revolution and kpg extinction on mammal diversification. Science, 2011, 334(6055): 521-4.

[42]Lindblad-Toh K, Garber M, Zuk O, et al. A high-resolution map of human evolutionary constraint using 29 mammals. Nature, 2011, 478(7370): 476-82.

[43]Song S, Liu L, Edwards SV, et al. Resolving conflict in eutherian mammal phylogeny using phylogenomics and the multispecies coalescent model. Proc Natl Acad Sci USA, 2012, 109(37): 14942-7.

[44]Fan Y, Huang ZY, Cao CC, et al. Genome of the Chinese tree shrew. Nat Commun, 2013, 4: 1426.

[45]Hallström B, Janke A. Resolution among major placental mammal interordinal relationships with genome data imply that speciation influenced their earliest radiations. BMC Evol Biol, 2008, 8(1): 1-13.

[46]Adkins RM, Honeycutt RL. Molecular phylogeny of the superorder Archonta. Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 88(22): 10317-21.

[47]Allard MW, McNiff BE, Miyamoto MM. Support for interordinal eutherian relationships with an emphasis on primates and their Archontan relatives. Mol Phyl Evol, 1996, 5(1): 78-88.

[48]Liu FGR, Miyamoto MM, Freire NP, et al. Molecular and morphological supertrees for eutherien (placental) mammals. Science, 2001, 291(5509): 1786-9.

[49]Miyamoto MM. A Congruence study of molecular and morphological data for eutherian mammals. Mol Phyl Evol, 1996, 6(3): 373-90.



# 第二章

第一篇树鼩基础生物学
TREE SHREW BASIC BIOLOGY

Tree shrews

# 树鼩群体遗传多样性

许　凌　陈仕毅　姚永刚

## 第一节　前　言

树鼩作为一种新型且富有前景的实验动物，其研究将会受到较多的持续关注，清楚掌握现有树鼩群体的遗传多样性具有十分重要的意义。中国科学院昆明动物研究所早在20世纪70年代就成功开展了树鼩的人工饲养繁殖工作，但迄今为止还未能够建立一个类似于大小鼠的遗传背景清晰的近交品系，这极大地限制了树鼩作为实验动物在科学研究中的应用。加大对树鼩群体遗传多样性的研究，对于我们评估和可持续性利用这一遗传资源具有重要的意义。一方面，我们可以针对具有不同遗传型的树鼩分别开展品系创建，生产具有不同遗传背景的实验用品系，满足不同的研究需求。另一方面，通过对不同遗传型及其表型的研究，将为我们理解树鼩这一新型实验动物提供更多的基础数据，指导疾病模型创建工作和疾病机理的解析。本章节将介绍目前在树鼩群体遗传多样性和表型多样性方面的研究情况，以期为树鼩的合理利用与保护提供更多的依据。

## 第二节　遗传多样性概述

### 一、遗传多样性的概念

遗传多样性（genetic diversity）的概念可以分为广义和狭义两个层次。广义上的遗传多样性是指所有生物遗传信息的总和，而狭义上的遗传多样性则指在一定的单位范围内可遗传变异的多少，这个单位可以是一个物种、一个亚种、一个品种、一个群体，甚至一个个体。我们通常所说的遗传多样性则指种内不同群体之间或群体内个体间遗传变异的总和[1]。虽然人类在很早以前就对物种遗传多样性这一特性有所认识，然而在这方面开展系统性地研究则始于达尔文。《物种起

源》的第一章便是“在家养状况下的变异”，其中引用大量资料论证了栽培植物和家养动物种内丰富的显然是可遗传的变异，并称之为多样性。随后，由于孟德尔遗传规律的发现，加之数理统计被广泛使用，人们则开始研究一个群体内个体间的遗传变异规律，并逐渐形成了目前的群体遗传学。在1944年，Oswald Avery和其同事等在Frederick Griffith研究的基础上开展了体外的肺炎双球菌转化实验，证实遗传物质是DNA而非蛋白质，这一结果于1952年被Alfred Hershey和Martha Chase在T2噬菌体中进一步证明。随着DNA是生物遗传信息载体的发现，尤其是James D. Watson和Francis Crick于1953年提出DNA双螺旋模型理论之后，加上分子生物学技术的快速发展，对遗传多样性的认识和研究则逐步深入到分子水平，这主要包括蛋白质多样性和核苷酸多样性。

## 二、研究遗传多样性的主要指标

遗传多样性是指在一定单位范围内可遗传变异的多少，因此可采用一定的统计手段，依据不同的数学模型和参数估计方法，计算群体间或群体内个体间的遗传变异度，用于遗传多样性的度量。这些遗传多样度指标，在Masatoshi Nei于1987年撰写的专著*Molecular Evolutionary Genetics*中有较为详细的叙述，目前有较多的软件包可用于计算这些指标值，如Arlequin（http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin3/）和DnaSP（http://www.ub.edu/dnasp/）。根据所研究对象的范围不同，以及不同的研究侧重点，目前已有许多被普遍用于衡量遗传多样性的统计指标，但在实际使用时需要充分考虑它们的适用范围和统计学特征。这里我们对一些常见的遗传多样性指标（参见Nei[2]）进行简要介绍。

### （一）平均等位基因数（*Na*）

等位基因（allele）是指在同源染色体上占据相同位置（基因位点）的两个或多个不同形式的基因，是DNA突变的结果。等位基因是遗传多样性的重要表现形式，其数量的大小直接反映遗传变异的程度。然而，在实践研究中通常同时考虑多个基因位点，因此以平均等位基因数（*Na*）作为遗传多样性的度量指标。*Na*是指所有被检测基因位点的等位基因数量的平均值，其计算公式为：

$$Na = \sum_{i=1}^{n} Na_i / N$$

其中$Na_i$为第$i$个位点上的等位基因数，$N$为所测定的基因位点的数量。

### （二）群体观测杂合度（$Ho_i$）

当某一基因位点在群体中存在不同形式的等位基因时，对于二倍体生物的特定个体来说，该位点则具有纯合与杂合两种可能的基因型形式。在等位基因数量相同的情况下，如果杂合基因型的个体在群体中的比例越高，则说明该群体遗传多样性越丰富。杂合个体在群体中的比例用群体观测杂合度（$Ho_i$）指标来度量，其计算公式为：

$$Ho_i = Nh / N$$

其中$Nh$为实际观察到的杂合个体数量，$N$为总的观察样本数。

当同时观察多个基因位点时，可以使用$Ho_i$的平均值进行度量，即指各位点杂合度之和除以位点数。

### （三）群体期望杂合度（$He_i$）

在某一群体中，如果没对样本中杂合个体的比例进行实际地测量，则可通过等位基因频率间接去计算出该群体预期的杂合度大小，即群体期望杂合度（$He_i$）。当同时观察多个位点，且在每个位点上具有两个以上等位基因时，$He_i$简单的计算公式为：

$$He_i = 1 - \sum_{j=1}^{m_i} P_{ij}^2$$

其中$P_{ij}$为第$i$个位点上$j$等位基因的频率，$m_i$为第$i$个位点上等位基因的数量。

### （四）核苷酸多样度（$\pi$）

前面所述的平均等位基因数（$Na$）、群体观测杂合度（$Ho_i$）和群体期望杂合度（$He_i$）3个指标都是以基因位点为单位，以等位基因数量为指标进行遗传变异程度的度量。DNA是生物遗传的物质基础，因此从核苷酸水平上对遗传多样度进行度量则具有更高的准确性。核苷酸水平上的遗传变异程度主要以核苷酸多样度（$\pi$）指标进行度量，它是指在群体内两条随机选取的DNA序列间每个位点的核苷酸差异数，其计算公式为：

$$\pi = 2\sum_{i=1}^{n}\sum_{j=1}^{i-1} x_i x_j \pi_{ij}$$

其中$x_i$和$x_j$分别是$i^{th}$和$j^{th}$序列的频率，$\pi_{ij}$是每个位点上的核苷酸差异数，$n$是序列数量。

### （五）单倍型多样度（$h$）

与依据基因位点为度量单位一样，也可以以一段DNA序列为单位，以核苷酸的特定组合形式（单倍型）为指标，度量群体的遗传多样度水平。因此，除核苷酸多样度外，也可以使用单倍型多样度（$h$）指标度量核苷酸水平上的遗传变异程度。$h$的统计学定义为群体中随机提取的序列为相同单倍型的概率，其计算公式为：

$$h = (1 - \sum x_i^2) n / (n-1)$$

其中$x_i$是第$i$单倍型的频率，$n$是样本数。

## 三、研究遗传多样性的主要方法

生物遗传多样性的本质在于核苷酸水平上的差异，而这种差异则直接体现在表型性状上，如人类身高、皮肤颜色、植物花色与形状的多样性等。从生物学作用的一般规律看，由核苷酸序列的变化导致蛋白质氨基酸序列差异和蛋白质表达水平的差异，进而引起蛋白质功能和调控网络的改变，最后决定了个体间在繁殖率、生存力、行为方式等方面的多样性。因此，可以从性状的表型、蛋白质特征、核苷酸序列等不同层次上去度量生物的多样性，而其中蛋白质特征和核苷酸序列两个层次的变异则即通常所指的遗传多样性。随着分子生物学技术自身的快速发展，我们也可以从更精细的层次上去度量遗传多样性。

最早用于检测遗传多样性的分子方法是基于蛋白质的电泳技术，被广泛用于血液蛋白的研究。该技术主要依据蛋白质的净电荷和相对分子质量的差异把蛋白质分开，用于测定某一蛋白质位点的差异水平。随后由于DNA限制性内切酶的出现，基于限制性酶切片段长度多态性（restriction fragment length polymorphism, RFLP）是最早用于DNA水平多样性研究的方法。RFLP

方法的原理是，当位于限制性内切酶识别位点上的碱基发生变化后，可能不再被其相应的酶所识别，同时非酶切位点也可以由于碱基的变化而产生出一个新的识别序列，从而在被酶切后形成由不同大小DNA片段组成的特定模式。与RFLP同时期或具有相同特征的遗传多态性检测方法还包括随机扩增多态性DNA（random amplified polymorphic DNA, RAPD）和DNA单链构象多态性。尽管这些技术在遗传多样性研究中发挥重要作用，也曾被广泛应用于生物学研究的各个领域，但由于其遗传多样性检出水平较低、检测方法不够稳定等缺点，已逐步被其它方法所取代。目前，被广泛使用的遗传多样性检测技术主要包括微卫星多态性分析和DNA直接测序技术。

微卫星DNA（microsatellite DNA），又称短串联重复序列（short tandem repeats, STRs）或简单重复序列（simple sequence repeats, SSRs），是广泛分布于真核生物基因组中的一种特殊序列，主要由串联重复单元组成，每单元长度在1～10bp之间。微卫星DNA遍及整个基因组，具有数量多、分布广、多态性高、共显性遗传等特点。由于各位点上不同等位基因的重复单位数目是高度变异的，而且重复单位的序列也可能不完全相同，因此微卫星DNA显示出高度的多态性。由于微卫星位点序列简短，而且其两侧的序列多是相对保守的单拷贝序列，因而可根据某一单位点微卫星两侧的序列设计一对特异性PCR扩增引物，将其从基因组DNA中特异性地扩增出来，再经凝胶电泳分离扩增产物，通过比较其长短的变化程度判断多样度水平。微卫星DNA在分子生物学与遗传学研究中作为一种主要的分子标记技术，已被广泛应用于群体多态性、QTL定位、性状连锁分析、群体遗传结构分析及起源进化等研究领域。

自Frederick Sanger等[3]发明双脱氧链终止法进行DNA测序以来，基于单核苷酸多态性（single nucleotide polymorphism, SNP）的研究迅速被普及，在现代生物学研究中发挥着重要作用。SNP是指由单个核苷酸的变异所引起的DNA序列多态性，是可遗传的变异中最常见的一种，占所有已知多态性的90%以上。SNP在人类基因组中广泛存在，平均每500～1000个碱基对中就有1个，估计其总数可达300万个甚至更多。随着第二代高通量测序技术的应用，加上测序成本的逐渐降低，基于DNA序列直接测定的方法将越来越普遍地用于遗传多样性的研究中，并且是基于基因组水平的比较，近期的一些针对濒危动物如大熊猫[4]和家养动物[5, 6]的研究即是很好的例证。

## 第三节 攀鼩目动物的系统分类与地理分布

树鼩（tree shrew）在分类学上属于攀鼩目（Scandentia）。目前，攀鼩目一共包括树鼩科（Tupaiidae）和笔尾树鼩科（Ptilocercidae）2个科5个属。树鼩科下有南印树鼩属（*Anathana*）、细尾树鼩属（*Dendrogale*）、树鼩属（*Tupaia*）和菲律宾树鼩属（*Urogale*）4个属，而笔尾树鼩科只包含笔尾树鼩属（*Ptilocercus*）1个属（表2–1和图2–1）。尽管如此，其中关于南印树鼩属和菲律宾树鼩属在攀鼩目中的可靠分类学地位还有所争论，如有人认为应该把菲律宾树鼩属归类于树鼩属[7]。

表2-1 攀鼩目动物的分类学地位与地理分布

| 目 | 科 | 属 | 种 | 主要的地理分布 |
|---|---|---|---|---|
| Scandentia<br>攀鼩目 | Tupaiidae<br>树鼩科 | *Anathana*<br>南印树鼩属 | *A. ellioti* | 印度中南部（Waterhouse, 1850） |
| | | *Dendrogale*<br>细尾树鼩属 | *D. melanura* | 马来西亚（Thomas, 1892） |
| | | | *D. murina* | 柬埔寨、泰国、越南（Schlegel, 1843） |
| | | *Urogale*<br>菲律宾树鼩属 | *U. everetti* | 菲律宾（Thomas, 1892） |
| | | *Tupaia*<br>树鼩属 | *T. belangeri* | 东南亚地区（Wagner, 1841） |
| | | | *T. chrysogaster* | 印度尼西亚（Miller, 1903） |
| | | | *T. dorsalis* | 印度尼西亚、马来西亚（Schlegel, 1857） |
| | | | *T. glis* | 泰国、马来西亚、印度尼西亚（Diard, 1820） |
| | | | *T. gracilis* | 印度尼西亚、马来西亚（Thomas, 1893） |
| | | | *T. javanica* | 印度尼西亚（Horsfield, 1822） |
| | | | *T. longipes* | 印度尼西亚、马来西亚（Thomas, 1893） |
| | | | *T. minor* | 印度尼西亚、马来西亚、泰国（Günther, 1876） |
| | | | *T. moellendorffi* | 菲律宾（Matschie, 1898） |
| | | | *T. montana* | 婆罗洲（Thomas, 1892） |
| | | | *T. nicobarica* | 印度（Zelebor, 1869） |
| | | | *T. palawanensis* | 菲律宾（Thomas, 1894） |
| | | | *T. picta* | 文莱、印度尼西亚、马来西亚（Thomas, 1892） |
| | | | *T. splendidula* | 印度尼西亚（Gray, 1865） |
| | | | *T. tana* | 苏门答腊岛、婆罗洲（Raffles, 1821） |
| | Ptilocercidae<br>笔尾树鼩科 | *Ptilocercus*<br>笔尾树鼩属 | *P. lowii* | 印度尼西亚、马来西亚、泰国（Gray, 1848） |

目前地理区域分布最广的攀鼩目动物是中缅树鼩，亦称北树鼩（*Tupaia belangeri*），主要分布于东南亚、南亚地区，也是在我国南部地区分布的唯一现生树鼩。王应祥[8]分析了分布于我国范围内的中缅树鼩标本的外形数据和头骨数据，认为可把我国树鼩分为6个亚种，分别是：①滇西亚种（*T. belangeri chinensis*），国内分布于云南大部分地区，包括腾冲以南的云南西部、西南部、西双版纳地区以及云南北部和云贵高原；四川西南部的西昌地区和攀枝花市；国外主要分布于缅甸东部、泰国北部和老挝北部。②高黎贡山亚种（*T. belangeri gaoligongensis*），仅分布于云南西北部中缅边境高黎贡山泸水以北地区。③海南亚种（*T. belangeri modesta*），仅分布于海南岛。④滇南亚种（*T. belangeri yunalis*），分布于云南南部红河流域及其以东地区，包括红河州南部、勐腊（易武）、江城、云南东南部、文山州、云南中部无量山区和贵州西南部兴义地区，还可能包括广西西北部百色地区。⑤越北亚种（*T. belangeri tonquinia*），国内仅分布于广西西南部，国外见于越南北部。⑥瑶山亚种（*T. belangeri yaoshanensis*），分布于广西西北部大瑶山区，

也可能包括广西北部红水河以东的天峨、环江、河池、融水、融安等地区。然而，Helgen[9]只将中缅树鼩分为2个亚种，即*T. b. belangeri*和*T. b. chinensis*。因此，采用现代分子生物学技术，针对分布于这些地区的树鼩进行系统的研究，将有助于进一步阐明关于这些亚种分类问题的争议。

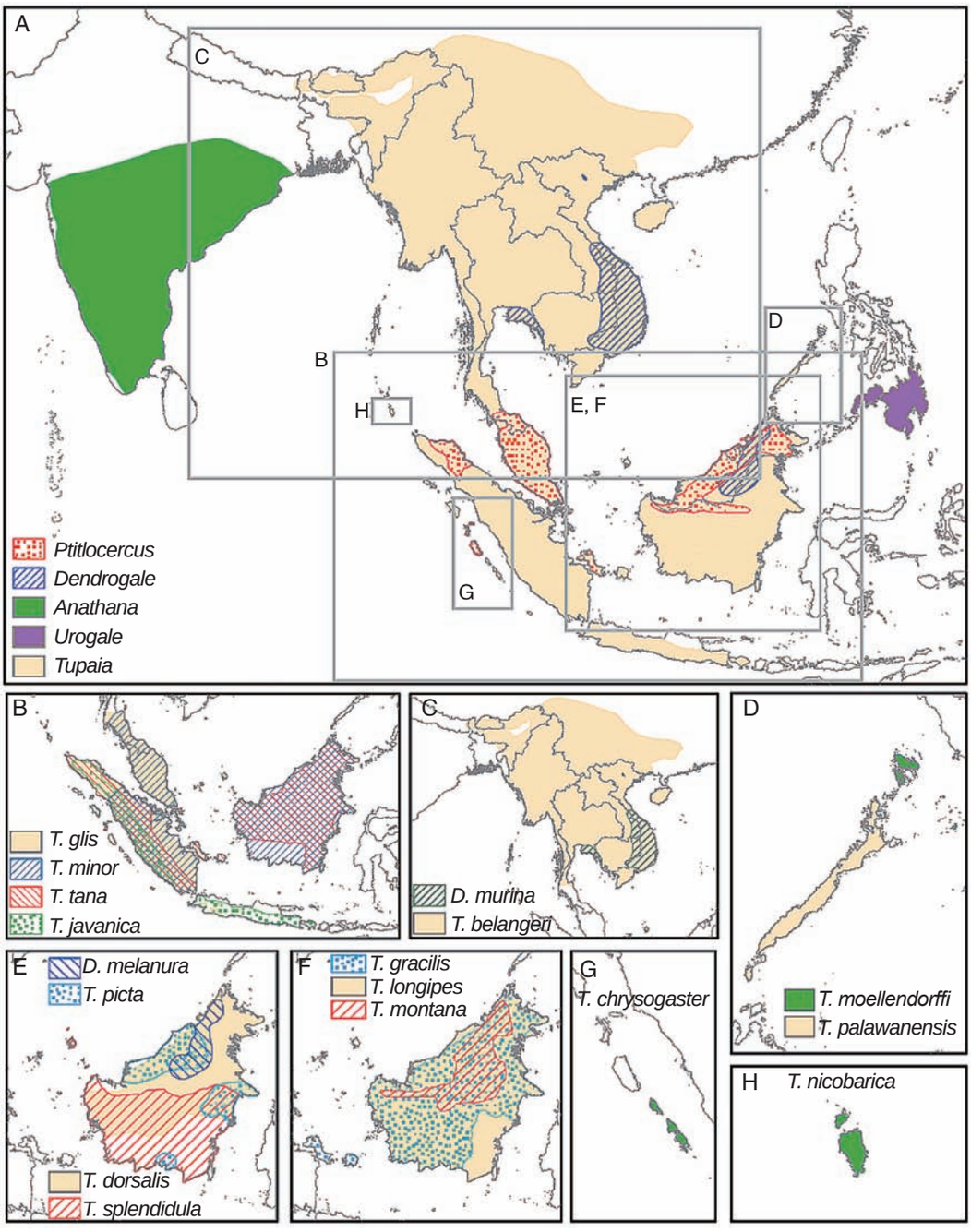



**图2–1　鞒鼩目动物的地理区域分布图**

（A）鞒鼩目下5个属的分布区域；（B–H）树鼩属（*Tupaia*）和细尾树鼩属（*Dendrogale*）下不同种的地理区域分布（经Elsevier许可，引自文献10）。

## 第四节 树鼩表型多态性

亚种（subspecies）是指具有地理分化特征的种群，在分类上与本种中其它亚种有可供区别的形态和生物学特征。亚种间表现出来的表型多态性可能是由于对特定生态环境适应性生存而导致的结果，主要反映了生态环境的多样性。王应祥[7]系统研究了中缅树鼩不同亚种间的表型差异，结果发现在毛色、体形大小、尾相对长度、眼眶大小、脑颅宽度等方面存在不同特征（表2-2）。从体形上看，瑶山亚种最大，而滇西亚种最小。同样，Wu等[11]通过对昆明近郊树鼩体重测量分析发现，同一种群内4～12月龄树鼩的雄性个体体重（133.16 ± 1.78）g显著高于雌性个体（118.16 ± 2.02）g，而随着月龄的增加这种性别间的差异程度逐渐降低，但雄性成体体重也要高于雌性［36～48月龄，（137 ± 3.57）g vs（130.87 ± 3.04）g］。

表2-2 树鼩各亚种与人工繁殖$F_1$代树鼩表型特征比较

| 参数指标 | 滇西亚种（*T. belangeri chinensis*） | 高黎贡山亚种（*T. belangeri gaoligongensis*） | 海南亚种（*T. belangeri modesta*） | 滇南亚种（*T. belangeri yunalis*） | 越北亚种（*T. belangeri tonquinia*） | 瑶山亚种（*T. belangeri yaoshanensis*） | 昆明动物研究所繁殖$F_1$代 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 体重（g） | 118.4 ± 1.4（80~204） | 137.1 ± 6.3（110~166） | 149.9 ± 3.8（120~180） | 135.0 ± 3.8（93~180） | 132.1 ± 5.4（104~158） | 133.6 ± 8.1（110~171） | 142.10 ± 10.41（123~167） |
| 体长（mm） | 167.9 ± 0.7（140~197） | 170.8 ± 2.5（160~185） | 177.4 ± 1.7（168~195） | 170.8 ± 1.8（155~190） | 177.1 ± 1.2（168~186） | 179.5 ± 4.3（160~200） | 175.10 ± 0.68（165~185） |
| 尾长（mm） | 168.5 ± 0.5（140~187） | 176.6 ± 2.4（161~178） | 157.5 ± 1.8（145~175） | 167.4 ± 1.7（147~182） | 156.9 ± 1.9（146~170） | 174.8 ± 2.0（165~180） | 175.60 ± 1.00（150~188） |
| 尾长/体长 | 100.7 ± 0.4（93.4~110.7） | 103.6 ± 1.0（100~113） | 88.6 ± 1.2（77~94） | 98.4 ± 1.1（87~109） | 88.6 ± 0.8（84~97） | 97.6 ± 2.0（90~106） | 98.27 ± 1.00（91~108） |
| 后足长（mm） | 41.1 ± 0.1（35~48） | 41.9 ± 0.6（38~45） | 41.9 ± 0.7（38~45） | 41.7 ± 0.5（34~47） | 42.4 ± 0.4（39~45） | 45.0 ± 0.8（40~48） | 38.70 ± 0.22（36~42） |
| 耳长（mm） | 15.2 ± 0.2（10~22） | 12.7 ± 0.5（10~16） | 15.4 ± 0.5（9~20） | 13.1 ± 0.6（8~18） | 12.7 ± 0.6（10~18） | 12.4 ± 0.5（11~15） | 15.10 ± 0.15（12~18） |
| 颅全长（mm） | 47.7 ± 0.2（45.0~50.7） | 49.2 ± 0.3（47.7~50.5） | 49.8 ± 0.2（48.8~53.0） | 47.8 ± 0.4（45.6~50.7） | 49.5 ± 0.3（47.9~51.8） | 52.2 ± 0.3（51.0~54.6） | — |
| 颅基长（mm） | 44.6 ± 0.1（42.0~47.8） | 45.7 ± 0.3（44.2~47.0） | 46.8 ± 0.2（44.6~48.1） | 44.7 ± 0.3（42.4~46.7） | 46.3 ± 0.3（44.6~47.8） | 48.4 ± 0.2（47.1~49.7） | — |
| 枕鼻长（mm） | 45.6 ± 0.1（42.5~48.8） | 46.7 ± 0.2（45.6~47.7） | 47.8 ± 0.2（46.8~50.5） | 46.0 ± 0.5（43.8~47.4） | 47.1 ± 0.4（44.5~48.4） | 50.4 ± 0.3（49.8~51.6） | — |
| 口盖长（mm） | 24.7 ± 0.1（22.3~27.6） | 25.5 ± 0.6（24.6~26.0） | 26.7 ± 0.2（24.3~28.9） | 25.1 ± 0.2（24.0~26.6） | 26.0 ± 0.3（24.5~26.8） | 27.6 ± 0.2（26.6~29.0） | — |

续表2-2

| 参数指标 | 滇西亚种 (*T. belangeri chinensis*) | 高黎贡山亚种 (*T. belangeri gaoligongensis*) | 海南亚种 (*T. belangeri modesta*) | 滇南亚种 (*T. belangeri yunalis*) | 越北亚种 (*T. belangeri tonquinia*) | 瑶山亚种 (*T. belangeri yaoshanensis*) | 昆明动物研究所繁殖$F_1$代 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 颧宽（mm） | 23.9 ± 0.1（21.9~26.9） | 25.1 ± 0.3（24.0~26.5） | 24.6 ± 0.2（23.2~25.9） | 24.2 ± 0.1（23.2~25.0） | 24.8 ± 0.2（23.9~26.1） | 25.8 ± 0.2（24.6~27.0） | — |
| 眶间宽（mm） | 13.1 ± 0.1（10.2~14.7） | 13.3 ± 0.2（11.9~14.2） | 13.6 ± 0.1（12.9~15.0） | 13.2 ± 0.1（12.1~14.0） | 13.7 ± 0.1（13.1~14.9） | 14.6 ± 0.1（14.2~15.5） | — |
| 脑颅宽（mm） | 18.9 ± 0.1（18.1~21.4） | 19.5 ± 0.1（18.9~20.2） | 19.2 ± 0.2（18.4 ± 19.8） | 19.0 ± 0.1（18.3~19.7） | 19.6 ± 0.1（19.2~20.2） | 19.9 ± 0.1（19.1~20.2） | — |
| 吻长（mm） | 20.7 ± 0.2（18.2~22.3） | 21.4 ± 0.2（20.4~22.4） | 22.6 ± 0.2（22.0~23.2） | 20.7 ± 0.2（19.8~21.8） | 21.8 ± 0.3（20.8~22.4） | 23.9 ± 0.3（22.5~24.2） | — |
| 上齿列（mm） | 24.1 ± 0.1（21.7~26.0） | 24.7 ± 0.2（23.9~26.1） | 26.0 ± 0.2（24.3~25.2） | 24.8 ± 0.2（23.4~26.2） | 25.6 ± 0.3（22.3~26.8） | 26.9 ± 0.1（26.2~27.5） | — |
| 听泡长（mm） | 9.0 ± 0.1（8.0~10.5） | 9.3 ± 0.2（8.5~10.0） | 9.4 ± 0.2（8.9~10.0） | 9.3 ± 0.2（8.8~10.4） | 9.5 ± 0.1（9.0~10.2） | 9.9 ± 0.1（9.5~10.4） | — |
| 眼眶长（mm） | 10.6 ± 0.1（9.5~11.0） | 11.9 ± 0.1（11.5~12.4） | 10.4 ± 0.1（9.9~10.9） | 11.4 ± 0.2（10.2~12.2） | 10.7 ± 0.1（9.8~11.1） | 11.1 ± 0.1（11.0~11.3） | — |

滇西亚种、高黎贡山亚种、海南亚种、滇南亚种、越北亚种、瑶山亚种的测量数据引自文献8。昆明动物研究所繁殖$F_1$代树鼩为活体测量，故而若干指标未测定。

于永梅等[12]对人工繁殖条件下中缅树鼩主要外貌特征的显隐性关系进行了研究，结果认为野生型毛色有季节性红斑、白腹、没有白眼圈、掌底肤色为肉色、耳朵不竖、圆形的尾尖、两侧乳房每对之间的连线分别与体轴线垂直。在野生状态下，不同亚种间也存在毛色等外形特征上的差异。滇西亚种的体背、体侧和尾背为均匀一致的橄榄绿或橄榄灰绿色，腹面多数污白色或为淡黄白色，肩纹灰白且较显著。高黎贡山亚种的体背和体侧为深暗多黑色，胸腹中央区乳黄或淡黄色，肩纹黄棕色。海南亚种的体背多灰绿色，下体胸腹中央毛区棕黄色，下腹和鼠鼷部灰棕色，幼体的肩纹稍微明显，但成体多不显著甚至缺乏。滇南亚种与滇西亚种相似，而与滇西亚种的不同在于体背多褐色，腰臀部多暗黑色且明显深于背部和体侧，肩纹灰白色且显著。越北亚种体背深褐黄色，腰臀部不深于背部和体侧而趋于同色，尾侧两道环绕尾缘的黑色环纹粗长而显著，肩纹呈黄棕色。瑶山亚种上体暗褐红色，胸腹部染黄色，中央线棕黄色。颊部、耳周和颈下侧棕褐色，颏、喉棕黄色，喉部常有焦褐色斑块，肛区和后肢下侧淡橙棕色，足背暗褐色。这些毛色和体色表型差异的遗传基础尚不明。

头骨形态学是传统动物学中的经典研究方法，在动物分类学地位、种间或种内关系以及生态特征等研究中发挥了重要的作用。朱万龙等[13]测定了分布于云南、贵州和广西地区的190个中缅树鼩的头骨形态特征，结果发现形变多集中在鼻腔和臼齿处，这可能与中缅树鼩栖息的气候和地理环境相关。经多维尺度分析发现不同地区的中缅树鼩头骨存在明显差异，可以将滇南、滇东南地区与滇西北、滇西南地区的中缅树鼩区分开来，而昆明地区位于整个多维尺度图的中间位置，提示该地区是联系云南南北两地的重要枢纽。对第二、第三下臼齿形态特征研究也发现，在分布于不同地理区域的树鼩群体间也存在显著差异。由于臼齿的差异主要反映食性的不同，因此认为中缅树鼩不同亚种或群体间在生物食性上可能也存在差异。

综上，我们可以看到，现生的树鼩不仅在亚种间，在同一亚种内不同地理群体间，甚至在群体内个体间都存在显著的表型特征差异，包括毛色、体长、体重等方面。这种表型特征上的差异是生物对自然环境长期适应的结果，也同时反映出它们在遗传基础上的多样性。目前用于科学研究中的树鼩还主要来自于野生群体，或者来自仅经过简单圈养的人工繁殖群体，个体间在表型性状和遗传基础上的一致性还较差，这不可避免地对科学研究结果的可靠性造成潜在的影响。随着树鼩作为新型实验动物逐步被应用于医学研究中，以野生树鼩为基础群，建立表型特征和遗传基础一致度高的近交系是目前面临的一个紧迫问题。

## 第五节 群体间遗传多样性

### 一、微卫星位点的分析

由于目前对树鼩基础生物学方面的研究相对来说还比较滞后，对整个基因组上微卫星位点的分布及其遗传特征的了解还不多，缺乏系统性的研究。Srikwan等[14]以普通树鼩（*T. glis*）为材料，开发了6个微卫星位点，并证实能用于中缅树鼩的检测。随后，Munshi-South[15]又开发了5个微卫星位点，在平原树鼩（*T. longipes*）和大树鼩（*T. tana*）群体中的等位基因数目为2～11个。李婧潇等[16]通过构建小片段插入文库，利用地高辛标记（AC）15序列作为探针，在中缅树鼩基因组中筛选到13个微卫星位点。由于树鼩基因组序列已经被测定[17]，我们将能更容易、更全面地得到全基因组水平上的微卫星位点，有利于开发出系列有效的微卫星标记。

基于微卫星位点标记，国内对中缅树鼩的遗传多态性进行了一些零星的研究，所涉及的样本主要是滇西亚种。何保丽等[18]对30只树鼩个体的11个微卫星位点进行了遗传检测，所选的11个微卫星DNA位点中，有9个具有高度多态性，2个微卫星DNA位点多态性较差。11个位点的平均等位基因数为2～12个，平均等位基因数为7.727。11个微卫星位点杂合度为0.242～0.801，平均值为0.615。各位点的多态信息含量为0.198～0.699，总体信息含量为0.518。黎家敏[19]基于9个微卫星位点对60只中缅树鼩的遗传多态性进行了研究，结果共检测到51个等位基因，平均等位基因数为5.6667，平均期望杂合度为0.7648（0.5042～0.7648），平均多态信息含量为0.7588。李婧潇等[16]采用这13个微卫星标记对32只中缅树鼩的遗传多态性进行了研究，结果发现平均等位基因数为5.92，平均期望杂合度为0.7894（0.5060～0.8646），平均多态信息含量值为0.7396（0.3740～0.8324）。这些研究结果均表明中缅树鼩具有较高的遗传多态性。然而，有一点需指出的是，这些研究中采用的技术方法对于识别检测的微卫星位点多态识别存在一定的判读偏差。为了解决这一问题，Liu和Yao[20]从中缅树鼩基因组DNA中选择了14个多态性微卫星基因座（表2–3），并用测序和微卫星测序的方法进行12个多态性微卫星基因座的检测（图2–2）。通过分析117只采自于云南省昆明周边的野生树鼩，发现微卫星位点TB2和TB10在中国树鼩中不存在多态性，其余的12个多态性微卫星基因座显示了较高的期望杂合度（0.616）（表2–3）。这些微卫星标记可以用于树鼩的个体识别和亲权鉴定分析。研究开发的这12个多态性微卫星基因座将有助于树鼩遗传多样性评估以及谱系示踪[20]。虽然目前对中缅树鼩微卫星已开展了一些研究，但缺乏对各亚种、各地理群体间遗传多态性的比较系统的研究，这将限制对这些遗传资源的保护与利用，

也是下一步工作需要集中解决的问题。

表2-3　117个中缅树鼩中微卫星多态性的遗传多样度

| Locus | Repeat element | *Na* | *Ne* | *Ho* | *He* | *PIC* |
|---|---|---|---|---|---|---|
| TB1 | （AAGAAA）n | 4 | 1.193 | 0.103 | 0.107 | 0.12 |
| TB2 | （AAG）n（GAGAAG）n | — | — | — | — | — |
| TB3 | （TAAA）n | 6 | 1.786 | 0.436 | 0.442 | 0.40 |
| TB6 | （AAAAC）n...（TTA）n | 6 | 2.226 | 0.537 | 0.553 | 0.46 |
| TB8 | [（A/G）TC（C/T）]n | 7 | 3.733 | 0.675 | 0.735 | 0.69 |
| TB9 | [（A/G）AAG]n | 7 | 3.256 | 0.709 | 0.696 | 0.65 |
| TB10 | （ATTT）n | — | — | — | — | — |
| TB12 | [T（T/C）（T/C）C]n（TC）n（TTTCCC）n | 20 | 7.517 | 0.607 | 0.871 | 0.86 |
| TB14 | [（A/G）AAG]n | 17 | 8.064 | 0.829 | 0.880 | 0.86 |
| TB15 | [T（T/C）C]n | 4 | 1.213 | 0.137 | 0.177 | 0.17 |
| TB16 | [（A/G）AAG]n | 7 | 3.041 | 0.675 | 0.674 | 0.62 |
| TB17 | （ATCT）n...（ATATA）n | 5 | 3.247 | 0.641 | 0.695 | 0.64 |
| TB18 | （TTTC）n | 18 | 10.47 | 0.838 | 0.908 | 0.90 |
| TB20 | （AAAAC）n | 4 | 2.897 | 0.607 | 0.658 | 0.59 |
| Average | — | 8.75 | 4.054 | 0.566 | 0.616 | 0.58 |

*Na*：观测到的等位基因数（observed number of alleles）；*Ne*：有效的等位基因数（effective number of alleles）；*Ho*：观测到的杂合度（observed heterozygosity）；*He*：预期的杂合度（expected heterozygosity）；*PIC*：多态性信息内容（polymorphism information content）。数据引自文献19。

## 二、线粒体DNA的研究

线粒体DNA（mitochondrial DNA, mtDNA）是胞内线粒体中的遗传物质。在哺乳动物中mtDNA呈双链环状，大小一般在15～18kb之间。一个线粒体中一般有多个mtDNA分子，与位于细胞核内的DNA有不同的演化起源。mtDNA具有母系遗传、缺乏重组、在每个细胞中具有高拷贝的特点，被广泛地应用群体遗传学、分子人类学和法医学等研究领域，为评估群体遗传多样度、重建群体历史动态、寻找人类群体之间差异和评价不同样本间的匹配程度的研究[21]。

对于树鼩群体遗传多样性的研究目前仅限于云南省昆明周边地区的野生树鼩mtDNA多态性的

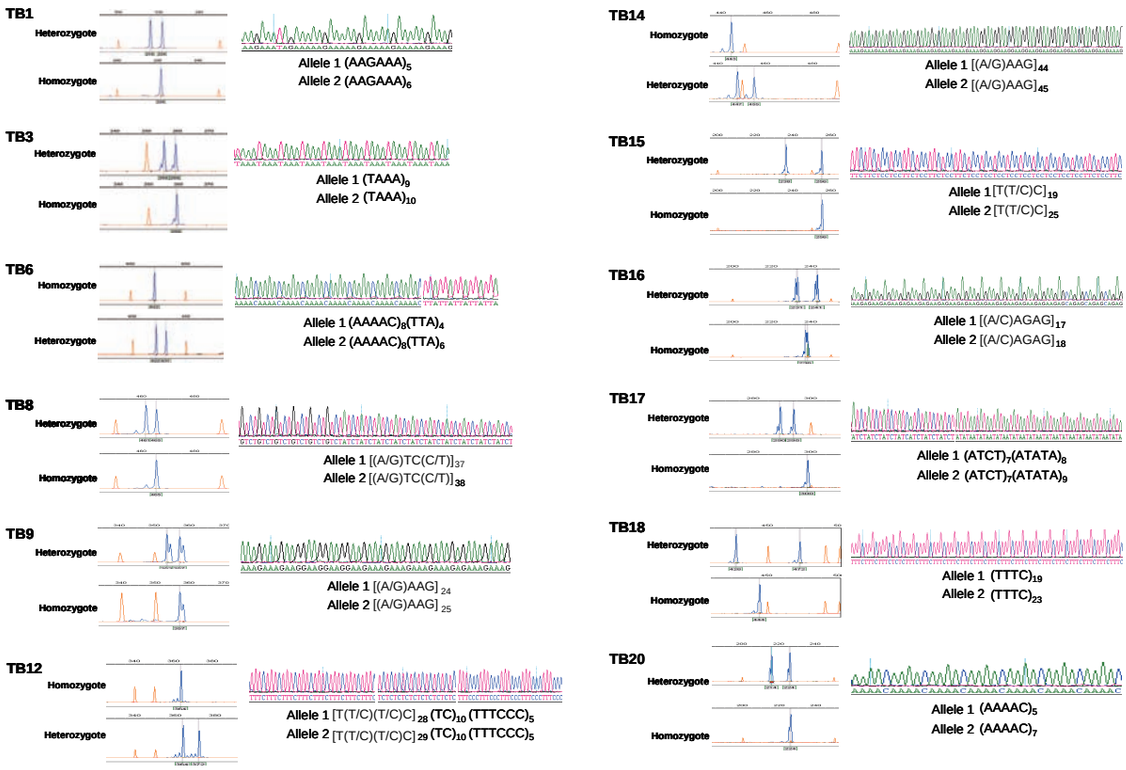



**图2–2　中缅树鼩微卫星基因座GeneScan图和测序图**

该图引自文献19。

报道。Chen等[22]通过分析80只采自于云南省昆明周边地区的野生树鼩mtDNA的多态性，结合GenBank中报道的2条北树鼩（*Tupaia belangeri*）序列比较后发现，在测定的604bp的mtDNA控制区片段中共检测到29个核苷酸变异，这些变异共界定了13种单倍型（haplotype；单倍型是单倍体基因型的简称，在遗传学上是指在同一染色体上可共同遗传的多个基因座上等位基因的组合，也可通俗地规定为若干个决定同一性状的紧密连锁的基因构成的基因型）。这些测定的树鼩个体表现出较高的群体遗传多样度（图2–3）。另外，发现昆明地区的树鼩与国外报道的2个北树鼩间存在较大的遗传分化，在所比较的mtDNA控制区序列片段之间的核苷酸替换数大

| | 1111111111 | 1111111111 | 111111111 | |
|---|---|---|---|---|
| | 5555555555 | 5555555555 | 555555555 | |
| | 4444444455 | 5666666666 | 777789999 | |
| | 1224557823 | 4334444678 | 003461566 | |
| | 9264671755 | 1120146763 | 019970801 | N |
| H1 | TGAGCCTCAA | CCTTGATGCT | ACCGAGTCA | 14 |
| H2 | ····–··T·· | ·····T· | ····· | 12 |
| H3 | ····–··T·· | ····A····· | ····· | 4 |
| H4 | ····–··T·· | ····A····· | ·····G | 3 |
| H5 | ····–··T·· | ····A·C···· | ·T····· | 30 |
| H6 | ····T··T·· | ····A·C···· | ·T····· | 1 |
| H7 | ····–··T·G | ····A·C···· | ·T····· | 3 |
| H8 | ····–··T·G | ····· | ····· | 1 |
| H9 | ····–·CT·· | ····· | ····· | 1 |
| H10 | ··G·–··T·· | ····A····· | ····· | 1 |
| H11 | ··G·–··T·· | ····AG···· | ····· | 2 |
| H12 | ·A··–··T·· | ····A···T· | ····· | 8 |
| H13 | A··A·A·TTG | TTACA··ATA | T·TACACT· | 2 |

**图2–3　mtDNA控制区片段的序列变异（604碱基），包含80中国树鼩和2个GenBank中已报道的北树鼩**

数据引自文献22。

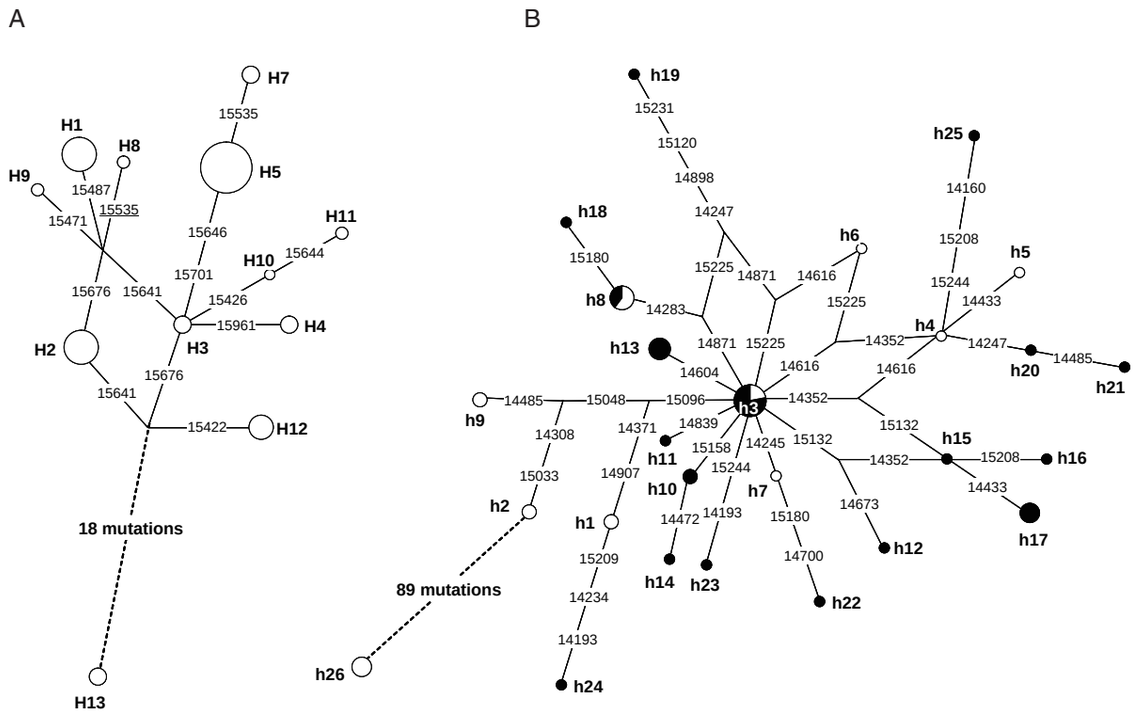



**图2–4　树鼩mtDNA控制区（A）和细胞色素b基因单倍型（B）的中介网络图**

实线和虚线上的标记指示核苷酸变异的位置。同一个分支上的多个变异的发生顺序是任意的。每个圆圈的面积与单倍型频率成正比。白色代表个体分别用于mtDNA控制区和细胞色素b基因序列变异分析。来自GenBank中报道的北树鼩细胞色素b基因序列被标记为黑色。该图引自文献22。

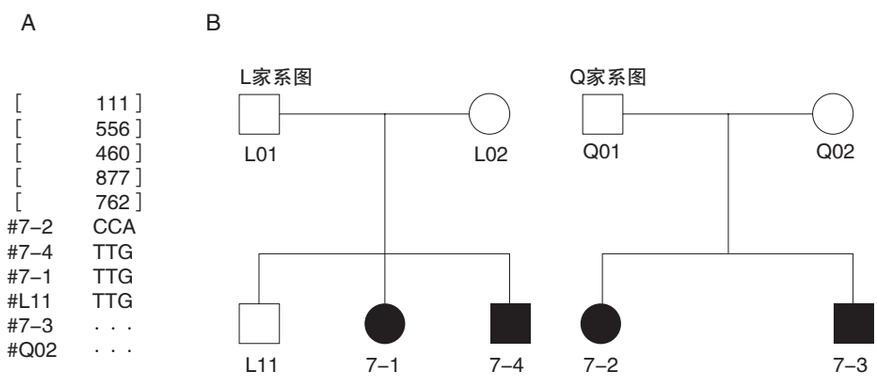



**图2–5　通过mtDNA控制区片段（604碱基）的序列变异鉴定两个家系来源的子代个体**

发生混淆的个体标记为黑色。通过测定L11、Q02、7–1、7–2、7–3、7–4个体，发现标记为7–1和7–4的个体属于L家系，拥有单倍型H2，而7–2和7–3属于Q家系，拥有单倍型H1（图2–3）。

于18个，远高于昆明地区树鼩群体内部不同单倍型之间的差异。进一步选择含有代表性的mtDNA控制区单倍型的17个昆明地区树鼩个体测定了细胞色素b基因片段（1134bp），结合前人报道的数据，构建中介网络图（median network）（图2–4）分析显示的结果，进一步支持mtDNA控制区序列数据反映出的群体内的变异情况和遗传差异[22]。

我们获得的这些mtDNA数据不仅可以用于评估树鼩群体的遗传多样度，同时也可用于实验用树鼩品系的母系来源鉴定工作。在我们近期开展的树鼩品系培育工作中，由于意外，导致L家系的2个子代个体和Q家系的4个个体发生混合。利用mtDNA这一母系遗传标记，我们可以很好地将两个家系的所有子代个体很好地区分开来（图2–5）。我们共检测了L家系和Q家系共6个样本，分别是L11、Q02、7–1、7–2、7–3、7–4，由于L家系的母本L02再次怀孕，未进行采样检测。依据母系遗传规律，子代个体L11应当与母本L02具有相同的mtDNA，因此与L11 mtDNA序列变异相同者则与L02相同，属于L家系，而与另一家系母本Q02相同者则属于Q家系。通过测定这些个体的mtDNA控制区的序列同时发现，L家系树鼩属于H2单倍型，而Q家系树鼩属于H1单倍型，这两种类型也是目前树鼩群体中的主要单倍型（图2–5）。

### 三、基于其它分子标记的研究

除微卫星位点和mtDNA等分子标记外，其它如生化基因位点、随机扩增长度多态等也作为遗传标记用于树鼩遗传多样性的研究。杨芳等[23]研究了30只中缅树鼩碳酸酐酶Car2、酯酶Es1、酯酶Es3、转铁蛋白Trf、碱性磷酸酶Akp1、肾过氧化氢酶Ce–2等6个生化基因位点的多态性，结果发现Car2和Es3两个位点没有多态性，而其它4个位点的等位基因从6～7个不等，平均等位基因数6.3，说明群体的遗传多态性较高。黎家敏[24]采用PCR技术对40条随机引物进行优化，筛选出能有效用于树鼩群体分析的RAPD位点，对48只树鼩个体的基因组DNA进行PCR扩增。20个扩增效果理想的RAPD引物在48个树鼩个体中共检测到113个位点，平均每个引物可扩增出5.65个位点，其中多态位点数为69个（占61.1%）。树鼩种群个体间的遗传相似系数平均为0.8307，个体间遗传距离在0.09～0.27之间，平均遗传距离为0.1693，雄性群体的遗传多态度（*Ho*）（0.1864）略高于雌性群体（0.1470），平均遗传多态度为0.1667。树鼩遗传多态度所占的比例在群体内为48.29%，而雌、雄群体间为51.71%。

## 第六节 树鼩群体遗传多样性研究和资源利用与保护

研究树鼩遗传多样性具有重要意义，可以通过其遗传多样度高低程度来反映该物种的濒危情况，并提出保护策略。另外，树鼩与灵长类的亲缘关系最密切（参见第一章），甚至有的生物学家将其直接归入低等灵长类动物的范畴。树鼩对许多病毒感染特性与人类相似，如易感染人类甲、乙、丙、丁肝炎病毒、轮状病毒、疱疹病毒、腺病毒、副黏病毒等[25]。以丙型肝炎为例，目前能感染该病毒的动物只有黑猩猩和树鼩。黑猩猩属于高濒危的灵长类动物，价格昂贵且十分稀少，所以采用黑猩猩大规模开展丙型肝炎动物模型的研究不可行，而且目前出于动物保护的考虑，欧美国家已经禁止并关停了相关黑猩猩用于疾病模型创建的实验室。因而，树鼩有望成为目前唯一能大规模开展丙型肝炎研究的实验动物，具有较为广阔的使用前景。

通过现有的树鼩遗传多样度的分析，我们发现树鼩群体具有较高的遗传多样度，这为我们开展树鼩品系培育无疑提供了丰富的种源和遗传基础。通过微卫星标记和母系mtDNA标记，我们可以很好地标记品系培育过程中的谱系关系，并评估近交系建立过程中的遗传杂合度。这些基础数据的累积，无疑为树鼩作为新型实验动物的遗传背景清晰的品系建立、种子资源保存以及疾病模型创建具有十分重要的意义。

【致谢】感谢昆明动物研究所吕莉和武勇同学在$F_1$代树鼩活体测量中提供的帮助。

## 参考文献

[1]施立明，贾旭，胡志昂．遗传多样性．北京：科学出版社，1993：99–113.

[2]Nei M. Molecular evolutionary genetics. New York: Columbia University Press, 1987.

[3]Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci USA, 1977, 74(12): 5463-7.

[4]Zhao S, Zheng P, Dong S, et al. Whole-genome sequencing of giant pandas provides insights into demographic history and local adaptation. Nat Genet, 2013, 45(1): 67-71.

[5]Xu X, Liu X, Ge S, et al. Resequencing 50 accessions of cultivated and wild rice yields markers for identifying agronomically important genes. Nat Biotechnol, 2011, 30(1): 105-11.

[6]Wang GD, Zhai W, Yang HC, et al. The genomics of selection in dogs and the parallel evolution between dogs and humans. Nat Commun, 2013, 4: 1860.

[7]Olson LE, Sargis EJ, Martin RD, et al. Phylogenetic relationships among treeshrews (Scandentia): A review and critique of the morphological evidence. J Mamm Evol, 2004, 11(1): 49-71.

[8]王应祥．中国树鼩的分类研究．动物学研究，1987，8（3）：213–30.

[9]Helgen KM, Wilson DE, Reeder DM. Order Scandentia, mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference (3rd). Maryland: Johns Hopkins University Press, 2005: 104-9.

[10]Roberts TE, Lanier HC, Sargis EJ, et al. Molecular phylogeny of treeshrews (Mammalia: Scandentia) and the timescale of diversification in Southeast Asia. Mol Phyl Evol, 2011, 60(3): 358-72.

[11]Wu X, Chang Q, Zhang Y, et al. Relationships between body weight, fasting blood glucose concentration, sex and age in tree shrews (*Tupaia belangeri chinensis*). J Anim Physiol An N, 2013, 97(6): 1179-88.

[12]于永梅，吴一迁，钱耕荪，等．中缅树鼩形态性状的遗传制约性初步研究．遗传，2004，26（4）：478–80.

[13]朱万龙，贾婷，黄春梅，等．中缅树鼩头骨及下臼齿几何形态与环境的关系．生态学报，2013，33（6）：1721–30.

[14]Srikwan S, Hufford K, Eggerf L, et al. Variable microsatellite markers for genotyping tree shrew, *Tupaia* and their potential use in genetic studies of fragmented populations. Science Asia, 2002, 28: 93-7.

[15]Munshi-South J, Wilkinson GS. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci in Bornean treeshrews (*Tupaia* spp.). Mol Ecol Notes, 2006, 6(3): 698-9.

[16]李婧潇，王新兴，王文广，等．中缅树鼩微卫星分子标记的筛选．中国实验动物学报，2011，19（4）：312–5.

[17]Fan Y, Huang Z-Y, Cao C-C, et al. Genome of the Chinese tree shrew, a rising model animal genetically related to primates. Nat Commun, 2013, 4: 1426.

[18]何保丽，沈培清，陈丽玲，等．树鼩微卫星DNA的多态性研究．中国实验动物学报，2009，17（2）：143–5.

[19]黎家敏，李海燕，李婧潇，等．中缅树鼩微卫星DNA的序列特征及其遗传多样性分析．第九届中国实验动物科学年会（2010新疆）论文集，2010.

[20]Liu X-H, Yao Y-G. Characterization of 12 polymorphic microsatellite markers in the Chinese tree shrew (*Tupaia belangeri chinensis*). Zool Res, 2013, 34(2): E62-8.

[21]Salas A, Bandelt HJ, Macaulay V, et al. Phylogeographic investigations: the role of trees in forensic genetics. Forensic Sci Int, 2007, 168: 1-13.

[22]Chen SY, Xu L, Lu LB, et al. Genetic diversity and matrilineal structure in Chinese tree shrews inhabiting Kunming, China. Zool Res, 2011, 32: 17-23.

[23]杨芳，何保丽，何永蜀，等．树鼩5个生化位点与11个微卫星标记位点的初步研究．昆明医学院学报，2010，5：8–11．

[24]黎家敏，李海燕，李婧潇，等．应用RAPD标记技术对树鼩遗传多样性的分析．中国比较医学杂志，2010，20（2）：34–40．

[25]徐林，张云，梁斌，等．实验动物树鼩和人类疾病的树鼩模型研究概述．动物学研究，2013，34（2）：59–69.



# 第三章

第一篇树鼩基础生物学
TREE SHREW BASIC BIOLOGY

Tree shrews

# 树鼩基因组测定与特点概述

范　宇　姚永刚

## 第一节 前　言

树鼩（*Tupaia belangeri*）是一种体形外貌与松鼠相似的小型哺乳动物，主要分布于南亚、东南亚及我国西南部。自20世纪80年代以来，树鼩作为动物模型在生物学方面的研究引起了广泛的关注[1]。其在生理解剖、神经发育、肝炎病毒感染、心理应激模式等方面与灵长类，甚至人类之间存在高度的相似性；同时，树鼩具有体形小、繁殖快、生殖周期短、寿命短、饲养成本低等特点，已被广泛应用于生物医学研究，被认为是可替代灵长类动物的新型实验动物[2~4]。然而，关于树鼩与灵长类动物的亲缘关系一直存在争议（详见第一章）：线粒体数据大部分支持树鼩是啮齿类动物的近缘旁系群，与兔形目动物关系最为接近[5~8]；而核基因数据多支持树鼩为灵长动物分支[9, 10]，也有人认为树鼩与啮齿动物的亲缘关系较近[11, 12]。除了树鼩进化地位颇具争议，其生理、生化、代谢等基础数据也很匮乏。针对这些亟待解决的问题，解析树鼩全基因组的重要性越发凸显，一方面可以从基因组比较的水平上阐明树鼩系统分类地位，了解树鼩的遗传特性，促进树鼩的生理、生化、代谢等方面的基础研究，形成更多的基础数据的积累。另一方面，根据树鼩基因组揭示的信息，可以指导相关树鼩动物模型的建立。通过树鼩动物模型的建立和推广，能推动树鼩广泛应用于疾病机理解析和生物医药的系统研究。

## 第二节 基因与基因组

基因是DNA或RNA分子上编码遗传信息的特定核苷酸序列，是控制生物性状的基本遗传单位。人们在生命科学不断发展的过程中加深对基因的认识。早在19世纪60年代，遗传学家孟德尔利用豌豆进行杂交实验，提出了生物的性状由遗传因子控制的观点，但这仅仅是一种逻辑推理的产物。20世纪初期，遗传学家摩尔根通过果蝇的遗传实验，认识到基因存在于染色体上，并且在

染色体上是呈线性排列，从而得出了染色体是基因载体的结论，为开启现代细胞遗传学的研究奠定了划时代的意义。1953年，沃森和克里克发现了DNA双螺旋结构，人们才真正认识了基因的本质，开启了分子生物学时代，使遗传的研究深入到分子层次。

基因组（genome）一词最早由德国汉堡大学H. 威克勒教授于1920年首创，用以表示真核生物从其亲代所继承的单套染色体，或称染色体组。更准确地说，基因组是指生物的整套染色体所含有的全部DNA序列。真核生物的基因组包括核基因组（也即我们通常所说的基因组）、线粒体基因组和叶绿体基因组（绿叶植物特有），而原核生物的基因组由细胞内的染色体、质粒DNA和转座子组成。除此之外，非独立生命形式的病毒颗粒也携带着遗传物质，称为病毒基因组。

自20世纪60年代以来，人们就已开始思考基因组序列如何编码生命的表型。由于各种技术的限制，对于基因组解析工作并未展开，直到Sanger测序技术的发明，全基因组的解析工作才正式启动和发展。2001年同期在*Nature*[13]和*Science*[14]发表的人类基因组图谱毋庸置疑地成为生命科学史上一个里程碑。目前，随着各种测序技术的迅猛发展，越来越多的物种基因组得到测定，这为我们理解生命之树、基因组结构与变异、常见和罕见疾病的遗传基础、个体化医学等带来了全新的视野、海量的数据信息以及观念方面的改变[15，16]。

## 第三节 树鼩基因组测序

### 一、中美测定的树鼩基因组整体质量比较

为了了解树鼩的基因组，美国国立卫生研究院（National Institutes of Health, NIH）将树鼩基因组计划列为“哺乳动物基因组计划（Mammalian Genome Project）”的一部分。2006年，美国Broad研究所首先公布了2X的不完整的北树鼩（northern tree shrew）基因组数据（http://www.ensembl.org/Tupaia_belangeri/Info/Index），其中连续无间断序列（contiguous non-gap sequences）占到了整个基因组序列长度的67%，虽然他们注释了15414个编码基因，但其中大约60%没有完整的开放阅读框架（表3–1）。Broad研究所公布的北树鼩基因组数据很不完整，故而产生的影响比较有限，并没有很好地推动树鼩的相关研究工作。

云南具有丰富的野生树鼩资源。中国科学院昆明动物研究所和国内相关单位早在20世纪中叶，就率先开展了树鼩驯养与人工繁殖工作，形成了很好的积累。为了加快树鼩用于疾病动物模型的研究进程，2013年我们（昆明动物研究所团队）联合华大基因研究院利用二代测序技术（Illumina/Solexa测序法）完成了一只来自云南的中缅树鼩（Chinese tree shrew）高质量的全基因组测序，总覆盖度高达79X，注释得到了22063个编码基因，其中21085个基因拥有完整的开放阅读框，占到了整个基因组序列长度的95.57%（表3–1）[17]。树鼩高质量基因组数据的解析，将有利于推动这一新型实验动物的研究与疾病模型创建。

表3–1　中美分别测定的树鼩基因组各项数据比较

（a）测序

| 个体 | 测序方法 | 覆盖度 | 连续无间断序列 |
|---|---|---|---|
| 中缅树鼩 | 二代测序 | 79.2X | 85% |
| 北树鼩 | Sanger测序 | 2X | 67% |

（b）组装

| 个体 | 重叠群（Contig*） | | | 支架（Scaffold*） | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | N50*（kb） | 最长（kb） | 大小（Gb） | N50（kb） | 最长（kb） | 大小（Gb） |
| 中缅树鼩 | 22 | 188 | 2.72 | 3656 | 19270 | 2.86 |
| 北树鼩 | 2.97 | 184 | 2.14 | 175 | 2509 | 3.67 |

（c）注释

| 个体 | 基因数目 | 完整ORF*数目 | 完整ORF（%） |
|---|---|---|---|
| 中缅树鼩 | 22063 | 21085 | 95.57 |
| 北树鼩 | 15414 | 6091 | 39.52 |

*重叠群（contig）：测序得到若干条reads，这些reads进行拼接，如果完全可以拼接起来，中间没有gap的序列称为contig，即连续的意思，如果中间有gap，但是可以知道gap的长度，这样的序列就叫作支架（scaffold），即脚手架（非连续）的意思。

*N50：把contig或scaffold从大到小排序，并对其长度进行累加，当累加长度达到总长度一半时，那一条contig或者scaffold的长度就叫作Contig N50和Scaffold N50。

*ORF：开放阅读框（open reading frame, ORF）是结构基因的正常核苷酸序列，从起始密码子到终止密码子的阅读框可编码完整的多肽链，其间不存在使翻译中断的终止密码子。

## 二、树鼩基因组测序与组装

我们联合华大基因研究院测定的树鼩的整个测序与组装的流程图（图3–1）。我们先将树鼩的基因组DNA随机打断，然后构建了19个插入片段大小不同的基因组配对文库（paired-end library），分别为170bp、350bp、500bp、800bp、2kbp、5kbp、10kbp、20kbp和40kbp，并利用Illumina/Solexa测序法完成了测序。作为第二代测序技术的一个代表，Illumina/Solexa测序法采用固相扩展法进行模板的准备。该技术概括起来就是利用边合成边测序（sequencing by synthesis）的原理，首先在片段的2个末端加上接头（adapter）。将接有接头的单链DNA种在玻璃板表面（表面拥有高密度的正、负链引物对，DNA片段变成单链后通过与玻璃板表面的引物碱基互补被一端“固定”住），然后进行桥连式PCR扩增（bridge amplification），反复30轮扩增，每个单分子得到了1000倍扩增，成为单克隆DNA簇。在进行每一个扩增反应过程中，带有不同荧光标记的4种核苷酸通过碱基配对原则参与化学合成反应，随后洗去没有参加合成反应的碱基，通过四色光激发从而读取荧光信号，接着切去荧光染料，暴露出3′–OH等待下一个合成反应的进行。对于构建的树鼩基因组的19个测序文库，共测序获得了365.46Gb的数据量，过滤掉低质量和重复的序列（reads），剩余253.45Gb的数据量用于树鼩基因组的组装。

在组装之前需要先对树鼩基因组进行一个简单的评估，这里采用的是k-mer深度分布图法[18]。k-mer深度分布图可以了解一个基因组大小、实际测序乘数、杂合率和重复序列含量等。k-mer就是一个长度为$k$的DNA序列，一般取$k$=17。将所有reads切成k-mer（$k$=17），一条长度为$L$的read上

能取出$L$-$K$+1个k-mer，将所有的k-mer进行数目统计并画分布图，基因组评估大小=k-mer总数目/k-mer深度期望。图3–2为树鼩的k-mer深度分布图，其中k-mer总数目=18076481727，k-mer深度期望=37，基因组评估大小为3.2Gb。

对树鼩基因组进行评估之后，正式地进入了组装阶段，这里采用SOAPdenovo[18]软件进行从头组装，主要原理是利用短序列比对，依靠reads序列之间的重叠（overlap）关系连接成初级的重叠群（contig），再逐级组装成高级的支架（scaffold）。树鼩基因组的测序与组装的数据如表3–2，这些数据表明我们获得了一个高质量的树鼩基因组序列。

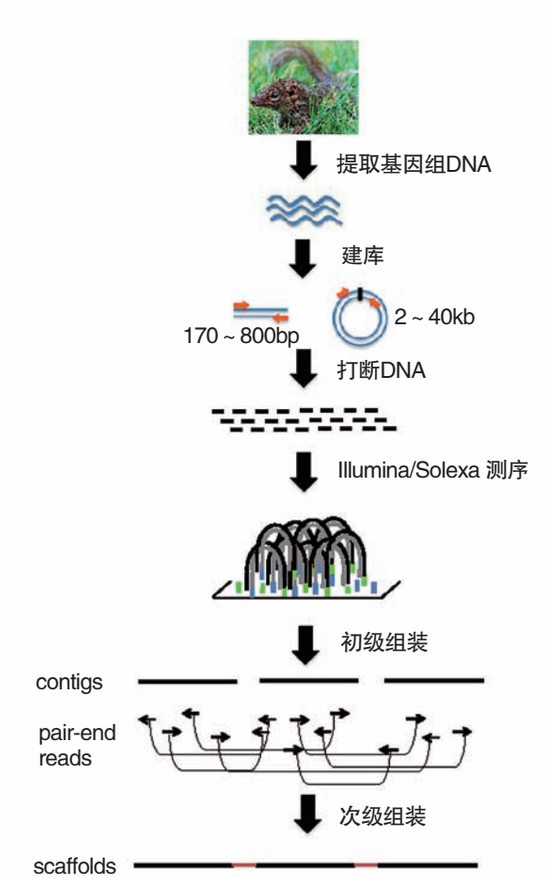



图3–1　树鼩基因组测序与组装的流程图

表3–2　树鼩基因组测序与组装数据

| 配对文库 | 插入片段大小 | 总数据量（Gb） | Reads长度（bp） | 序列覆盖度（Sequence coverage）（X） | 物理覆盖度（Physical coverage）（X） |
|---|---|---|---|---|---|
| Solexa reads | 170bp | 78.84 | 100 | 24.64 | 20.94 |
| | 500bp | 57.06 | 91 | 17.83 | 48.99 |
| | 800bp | 51.19 | 87 | 16.00 | 73.55 |
| | 2kb | 35.34 | 49 | 11.04 | 225.38 |
| | 5kb | 15.39 | 49 | 4.81 | 245.38 |
| | 10kb | 9.22 | 49 | 2.88 | 294.01 |
| | 20kb | 6 | 49 | 1.88 | 382.65 |
| | 40kb | 0.41 | 46 | 0.13 | 55.71 |
| 总数 | — | 253.45 | — | 79.20 | 1346.60 |

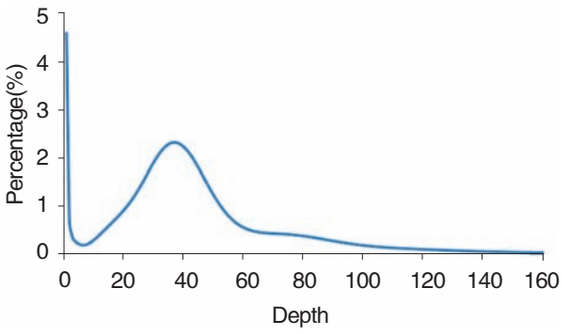



图3–2　树鼩的k–mer深度分布图

# 第四节 树鼩基因组的特点

## 一、树鼩的转座因子与分散重复序列

转座因子（transposable element）是原核生物与真核生物基因组中广泛存在的一类可移动、未知的遗传因子，它包括两类：一种是DNA的直接转座，称为DNA转座子；一种以RNA为中介进行转座，称为逆转录转座子（retrotransposon）。DNA转座子使用“剪切和粘贴”的转座机制：在转座酶的作用下，转座子从原位置切除下来并整合到新的位点。逆转录转座子使用“复制和粘贴”的转座机制：先借助转录形成RNA中间产物，再逆转录产生新的DNA拷贝，最后插入到基因组的其它位置而实现转座，而原位点的转座子保持不变。其中逆转录转座子可分为两类：LTR逆转座子、非LTR逆转座子。LTR逆转座子具有长末端重复序列（long terminal repeat, LTR），并具有中心蛋白编码区。在哺乳动物中最丰富的可移动元件是非LTR逆转座子，缺乏LTR。非LTR逆转座子中的大部分可归为两类中度重复顺序：长散在重复序列（long interspersed repeated sequences, LINE）和短散在重复序列（short interspersed repeated sequence, SINE），在人类基因组中广泛分布，大约占全基因组的33%。转座因子可以给基因组带来新的遗传物质，又可以启动或关闭某些基因，并常使基因组发生缺失、重复或倒位等DNA重排，与生物演化有密切的关系，并可能与个体发育、细胞分化有关。

在测定的树鼩基因组中，我们发现DNA转座子、LTR、SINE、LINE等转座因子所占比例大约为35%（表3–3和表3–4）。树鼩和其它几个物种的转座因子比例的主成分分析结果显示树鼩与灵长类与啮齿类都有较大差异，这可能跟树鼩的进化的独特性有关，提示其基因组中存在特定的转座因子（图3–3）。与其它灵长类不同的是，树鼩基因组中Alu/SINE元件的比例很小，仅有0.11%，而在人类基因组中Alu/SINE元件占有11.36%。目前对于Alu序列的功能了解得还不透彻，据推测主要与基因调控有关，如基因重排、CpG甲基化、hnRNA选择性剪切、结合转录因子和激素等。Alu元件的插入、删除和重组导致与许多先天性遗传疾病和癌症有关[19]。树鼩基因组中Alu/SINE元件如此之少可能与某些特殊调控机制相关，还有待于进一步研究。另外，树鼩基因组拥有另一个特异的转座因子——tRNA-derived/SINE（Tu–Ⅲ）元件在树鼩基因组中拥有百万级拷贝数，占整个基因组的14%，这个元件起源于tRNA，可能影响某些tRNA的二级结构[20]。树鼩基因组中这些转座因子分布的情况显示出其基因组进化过程中的某些特殊性和树鼩作为一个独立物种的独特性。

表3–3　6种哺乳动物各种转座因子的数目与百分比

| 转座因子类型 | 树鼩 | | 人 | | 猕猴 | | 小鼠 | | 大鼠 | | 狗 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 拷贝数 | 基因组百分比% | 拷贝数 | 基因组百分比% | 拷贝数 | 基因组百分比% | 拷贝数 | 基因组百分比% | 拷贝数 | 基因组百分比% | 拷贝数 | 基因组百分比% |
| SINE/Tu–Ⅲ | 1854765 | 14.33 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| LINE/L1 | 756525 | 9.34 | 831144 | 18.35 | 683463 | 11.42 | 818384 | 17.77 | 776312 | 19.01 | 845458 | 14.88 |

续表3-3

| 转座因子类型 | 树鼩 | | 人 | | 猕猴 | | 小鼠 | | 大鼠 | | 狗 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 拷贝数 | 基因组百分比% | 拷贝数 | 基因组百分比% | 拷贝数 | 基因组百分比% | 拷贝数 | 基因组百分比% | 拷贝数 | 基因组百分比% | 拷贝数 | 基因组百分比% |
| LTR/ERVL | 297613 | 2.39 | 488118 | 6 | 377608 | 3.84 | 472810 | 4.64 | 381787 | 3.71 | 293343 | 3.22 |
| DNA/hAT | 251060 | 1.18 | 285124 | 1.91 | 250455 | 1.31 | 257382 | 0.99 | 267001 | 1 | 263952 | 1.66 |
| DNA/TcMar | 179675 | 0.94 | 130815 | 1.45 | 108408 | 0.93 | 65632 | 0.29 | 68621 | 0.29 | 76337 | 0.65 |
| SINE/MIR | 177155 | 0.83 | 294277 | 1.64 | 246462 | 1.14 | 10628 | 0.05 | 11165 | 0.05 | 254409 | 1.42 |
| LTR/ERV1 | 148232 | 1.11 | 176672 | 3.14 | 148185 | 1.92 | 112942 | 1.1 | 156084 | 1.05 | 97517 | 1.04 |
| LINE/L2 | 130112 | 0.77 | 205917 | 1.85 | 186712 | 1.18 | 56857 | 0.28 | 53478 | 0.27 | 186192 | 1.42 |
| DNA/En-Spm | 66221 | 0.17 | 67973 | 0.22 | 41770 | 0.11 | 171360 | 0.48 | 185309 | 0.52 | 41604 | 0.12 |
| DNA/DNA | 43796 | 0.14 | 0 | 0 | 20403 | 0.06 | 0 | 0 | 0 | 0 | 23850 | 0.08 |
| LTR/ERVK | 37328 | 0.31 | 28213 | 0.37 | 44133 | 0.31 | 278629 | 4.4 | 230738 | 3 | 21750 | 0.06 |
| SINE/Alu | 33237 | 0.11 | 1097378 | 11.36 | 882807 | 7.79 | 499693 | 2.25 | 314869 | 1.32 | 88 | 0 |
| LTR/Gypsy | 29788 | 0.1 | 20855 | 0.11 | 35527 | 0.12 | 57386 | 0.17 | 68499 | 0.2 | 37176 | 0.15 |
| DNA/Sola | 29191 | 0.1 | 25407 | 0.1 | 15511 | 0.07 | 119518 | 0.45 | 140749 | 0.56 | 13038 | 0.05 |
| DNA/Maverick | 24748 | 0.07 | 16763 | 0.04 | 15114 | 0.04 | 59360 | 0.16 | 66515 | 0.18 | 14773 | 0.04 |
| SINE/B4 | 22228 | 0.06 | 97447 | 0.28 | 79367 | 0.18 | 311992 | 1.76 | 284608 | 1.6 | 136988 | 0.45 |
| DNA/MuDR | 18056 | 0.08 | 13428 | 0.08 | 9335 | 0.04 | 18119 | 0.06 | 17820 | 0.06 | 9306 | 0.03 |
| SINE/tRNA | 16461 | 0.04 | 909 | 0 | 20761 | 0.05 | 7788 | 0.02 | 8354 | 0.02 | 1079722 | 7.34 |
| LINE/Penelope | 15249 | 0.08 | 4809 | 0.01 | 3604 | 0.01 | 28471 | 0.09 | 26854 | 0.08 | 5166 | 0.03 |
| LINE/CR1 | 11698 | 0.07 | 13527 | 0.12 | 19877 | 0.11 | 1120 | 0.01 | 1274 | 0.01 | 22801 | 0.15 |

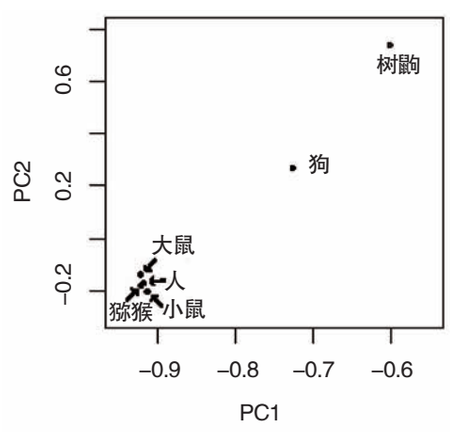



**图3-3　树鼩与其它5个哺乳动物转座因子比例的主成分分析图**
（数据来源表3-3）

表3–4　6种哺乳动物转座因子长度及其占基因组百分比

| 转座因子类型 | 树鼩 | | 人 | | 猕猴 | | 小鼠 | | 大鼠 | | 狗 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 拷贝数 | 基因组百分比% | 拷贝数 | 基因组百分比% | 拷贝数 | 基因组百分比% | 拷贝数 | 基因组百分比% | 拷贝数 | 基因组百分比% | 拷贝数 | 基因组百分比% |
| DNA | 76.6 | 2.7 | 102.4 | 3.3 | 80.1 | 2.58 | 63.7 | 2.3 | 66.8 | 2.5 | 68.3 | 2.7 |
| LINE | 295.2 | 10.3 | 543 | 17.5 | 395.4 | 12.77 | 495.3 | 18.2 | 529.5 | 19.5 | 418.6 | 16.54 |
| LTR | 113.1 | 4 | 257.2 | 8.3 | 192.7 | 6.22 | 283.9 | 10.4 | 220.8 | 8.1 | 114.7 | 4.5 |
| SINE | 527.2 | 18.8 | 349.4 | 11.3 | 279.2 | 9.02 | 166.7 | 6.1 | 144.6 | 5.3 | 226.7 | 8.9 |
| 其它 | 0.06 | 0.002 | 26.4 | 0.9 | 5.6 | 0.18 | 7.6 | 0.3 | 6.8 | 0.2 | 0.008 | 0 |
| 未知 | 0.9 | 0.03 | 4.8 | 0.2 | 2.7 | 0.09 | 43.7 | 1.6 | 50.7 | 1.9 | 1.1 | 0.04 |
| 总数 | 1001.90 | 35 | 1257.70 | 40.5 | 955.7 | 30.86 | 1017 | 37.4 | 978 | 36 | 822.8 | 32.5 |

## 二、蛋白质编码基因

对于树鼩基因组编码基因的预测，我们主要采取了同源预测和从头预测两种方法。其中，同源预测是数据库中小鼠和人的序列与树鼩基因组中进行比对得到，而从头预测则是利用Augustus和Genscan两款软件预测得到。将两部分数据整合过滤，可以得到了非冗余的一致性序列。最终，在树鼩基因组中一共得到了22063个编码基因，这与大多数哺乳动物的基因数目相近，其中21085个基因拥有完整的开放阅读框（ORF），占总数的95.57%，平均每个基因的编码区长度为1405bp，平均拥有7.54个外显子，其中外显子平均长度为186.23bp，内含子平均长度为4938bp。通过将小鼠、大鼠和树鼩的蛋白质序列与人同源蛋白比对，可以看出人与树鼩的蛋白质相似度要高于啮齿类（图3–4），进一步说明树鼩与灵长类关系更近。

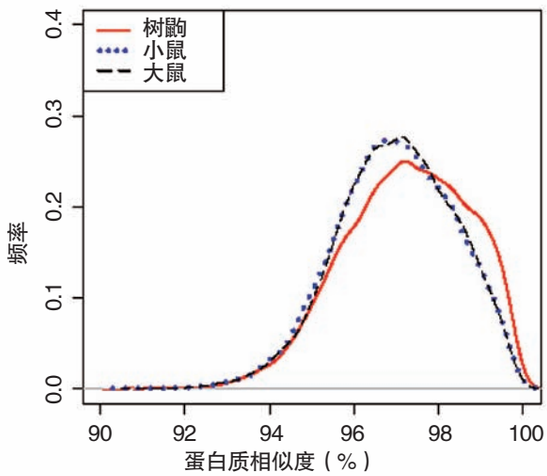



图3–4　树鼩、小鼠、大鼠与人的同源蛋白相似度比较

## 三、非编码RNA

非编码RNA是指不编码蛋白质的RNA。其中包括rRNA、tRNA、snRNA、snoRNA和microRNA等多种已知功能的RNA，还包括未知功能的RNA。这些RNA的共同特点是都能从基因组上转录而来，但是不翻译成蛋白，在RNA水平上行使各自的生物学功能。非编码RNA从长度上来划分可以分为3类：小于50nt，包括microRNA、siRNA、piRNA；50～500nt，包括rRNA、tRNA、snRNA、snoRNA等；大于500nt，包括长的mRNA-like的非编码RNA、长的不带polyA尾巴的非编码RNA等。

miRNA (microRNA)，是一类21～23nt的小RNA，其前体大概是70～100nt左右，形成标准的stem结构，加工后成为21～23nt的单链RNA。microRNA的作用机制是与mRNA互补，让mRNA沉默或者降解。

tRNA (transferRNA)，转运RNA，是具有携带并转运氨基酸功能的一类小分子核糖核酸，它们可以译读61个密码子。

rRNA (ribosome RNA)，核糖体RNA，是最多的一类RNA，它与蛋白质结合而形成核糖体，其功能是作为mRNA的支架，使mRNA分子在其上展开，实现蛋白质的合成。rRNA占RNA总量的82%左右。真核生物的rRNA分4类：5SrRNA、5.8SrRNA、18SrRNA和28SrRNA。

snoRNA (small nucleolar RNA)，小核仁RNA，最初发现它们的生物功能是用来修饰rRNA的。小核仁RNA可以分为几种类型。其中，CD-box snoRNA可以对RNA的碱基进行甲基化修饰的。HACA-box snoRNA可以对RNA的碱基进行甲尿嘧啶化修饰。

表3–5列出了树鼩基因组中几个关键的非编码RNA的分布情况。其中miRNA的拷贝数有550个，而人的基因组中有至少1424个拷贝，树鼩相对于人miRNA数目较少。snoRNA的数目在树鼩基因组中数目较多，有1692个拷贝数，而在人类基因组中大概只有300个[21]。对于如此分布意义和这些非编码RNA的作用需要进一步功能实验才能更好地诠释。

表3–5　树鼩基因组中的非编码RNA分布

| 类　型 | | 拷贝数 | 平均长度（bp） | 总长度（bp） | 基因组百分比 |
|---|---|---|---|---|---|
| miRNA | | 550 | 90.20 | 49615 | 0.001734 |
| tRNA | | 306 | 77.06 | 23580 | 0.000824 |
| rRNA | rRNA | 206 | 135.30 | 27872 | 0.000974 |
| | 18S | 22 | 211.36 | 4650 | 0.000162 |
| | 28S | 123 | 147.77 | 18176 | 0.000635 |
| | 5.8S | 3 | 85.33 | 256 | 0.000009 |
| | 5S | 58 | 82.59 | 4790 | 0.000167 |
| snoRNA | snoRNA | 1692 | 117.84 | 199393 | 0.006967 |
| | CD–box | 281 | 90.63 | 25468 | 0.000890 |
| | HACA–box | 331 | 135.04 | 44697 | 0.001562 |
| | scaRNA | 39 | 133.54 | 5208 | 0.000182 |
| | splicing | 998 | 121.63 | 121384 | 0.004242 |

## 第五节　树鼩基因组的进化

自20世纪中叶，随着分子生物学的不断发展，进化研究也进入了分子进化研究水平，并建立了一套依赖于核酸、蛋白质序列信息的理论和方法。随着基因组测序计划的实施，基因组的巨量信息对若干生物领域重大问题的研究提供了有力的帮助，分子进化研究再次成为生命科学中最引人注目的领域之一。这些重大问题包括：遗传密码的起源、基因家族的扩张、基因组结构的形成

与演化、生物进化与分歧时间等。分子进化研究目前更多的是集中在分子序列上，但随着越来越多生物基因组的测序完成，从基因组水平上探索进化奥秘，将开创进化研究的新天地。

基因家族（gene family），是来源于同一个祖先，由一个基因通过基因重复而产生两个或更多的拷贝而构成的一组基因，它们在结构和功能上具有明显的相似性，编码相似的蛋白质产物，同一家族基因可以紧密排列在一起，形成一个基因簇，但多数时候，它们是分散在同一染色体的不同位置，或者存在于不同的染色体上的，各自具有不同的表达调控模式。

基因家族在不同基因组之间的进化稳定性与其在物种中的功能作用是密切相关的。一些基因在进化过程中比较稳定，很少有基因重复和丢失；但基因重复和丢失在另一些基因的进化过程中则经常发生，特别是某些基因家族表现出扩张特征时，通常为适应性进化所驱动，达尔文正选择被认为是基因家族扩张的主要动力。例如嗅觉受体、犁鼻器受体、苦味受体等在进化过程中都受到正选择的作用，使得一些物种在某些功能上存在明显的选择优势[22]。

为了得到树鼩的扩张和收缩基因家族，我们首先利用TreeFam 7.0[23]软件定义出人、小鼠、猴子和树鼩4个物种的基因家族，共获得了19037个基因家族，然后利用CAFE2.1[24]软件对4个物种的基因家族成员进行统计分析，最后在树鼩基因组中一共发现了162个基因家族存在明显扩张（表3–6）和62个基因家族存在收缩（表3–7）。其中树鼩的免疫球蛋白λ轻链（immunoglobulin lambda variable, *IGLV*）基因家族存在明显的扩张，拥有67个拷贝，而人类基因组中只有36个拷贝（图3–5）。免疫球蛋白由两条相同的轻链和两条相同的重链所组成，是一类重要的免疫效应分子；由高等动物免疫系统淋巴细胞产生的蛋白质，经抗原的诱导可以转化为抗体。因结构不同可分为IgG、IgA、IgM、IgD和IgE 5种，多数为丙种球蛋白。可溶性免疫球蛋白存在于体液中，参与体液免疫；膜型免疫球蛋白是B淋巴细胞抗原受体。Ig分子的基本结构是由4肽链组成的，即由2条相同的分子量较小的轻链（L链）和2条相同的分子量较大的重链（H链）组成的。L链与H链是由二硫键连接形成一个四肽链分子，称为Ig分子的单体，是构成免疫球蛋白分子的基本结构。树鼩*IGLV*基因家族可能在一定选择压力下得到了扩张，使它在限制或促进病原体的清除方面存在明显的优势。

对于树鼩基因组中的这些发生扩张和收缩的基因家族，具体的生物学功能阐述有待进一步的研究。但这种基因家族的进化模式，无疑提示树鼩作为一个独立物种的遗传特异性。

**表3–6　树鼩基因组中的基因扩张名录**

| 基因名 | 基因数目 | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 树鼩 | 人 | 猕猴 | 小鼠 | 大鼠 | 狗 |
| *OLFR1013* | 4 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| *OR10C1*; *OR6N2* | 5 | 0 | 0 | 2 | 3 | 0 |
| *OR8J3* | 8 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| *OR8K5* | 7 | 1 | 0 | 5 | 2 | 0 |
| *AP001803.1*; *OLFR1009* | 4 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| *OR5L1*; *OR5L2* | 8 | 2 | 1 | 2 | 2 | 1 |
| *OR5M8* | 3 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| *OR13H1*; *OR8U8* | 4 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| *OLFR478*; *OLFR484*; *OLFR502*; *OR5P2* | 13 | 1 | 1 | 19 | 19 | 0 |
| *OR13A1*; *OR13G1* | 13 | 1 | 1 | 15 | 17 | 0 |
| *OR10AG1* | 15 | 1 | 0 | 3 | 4 | 0 |
| *OR11G2* | 8 | 0 | 0 | 7 | 5 | 1 |

续表3-6

| 基因名 | 基因数目 | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 树鼩 | 人 | 猕猴 | 小鼠 | 大鼠 | 狗 |
| *OR13C4*; *OR2S2* | 5 | 0 | 1 | 2 | 2 | 1 |
| *OR13C3*; *OR13D1* | 8 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| *AC089987.2*; *OR4E2*; *OR8S1* | 5 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| *OR4P1P*; *OR4P4* | 8 | 2 | 1 | 1 | 2 | 0 |
| *OR4C6* | 9 | 1 | 0 | 2 | 3 | 0 |
| *OLFR140*; *OR4C13* | 5 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| *OR4A47* | 7 | 0 | 1 | 1 | 1 | 3 |
| *OR4C15* | 10 | 1 | 0 | 18 | 20 | 0 |
| *OR4K1*; *OR4K14*; *OR4K3*; *OR4L1* | 9 | 1 | 0 | 2 | 1 | 0 |
| *OR2AJ1*; *OR2M3*; *OR2T2*; *OR2T27* | 7 | 0 | 0 | 1 | 2 | 0 |
| *ZFP39*; *ZNF157*; *ZNF180*; *ZNF182*; *ZNF208*; *ZNF25*; *ZNF271*; *ZNF3*; *ZNF300*; *ZNF420*; *ZNF717*; *ZNF84* | 20 | 1 | 1 | 6 | 2 | 0 |
| *RPL21*; *RPL37A* | 8 | 1 | 1 | 1 | 4 | 0 |
| *RPL21* | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| *RPL21* | 138 | 1 | 4 | 22 | 31 | 0 |
| *KPNA2* | 9 | 1 | 2 | 1 | 1 | 1 |
| *AC004086.1*; *C8ORF45*; *MAN1A2*; *RPL6* | 176 | 1 | 4 | 2 | 4 | 1 |
| *RPL31* | 53 | 0 | 13 | 8 | 21 | 1 |
| *RPL31* | 6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| *AC139099.2*; *RPL23A* | 8 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| *AC004034.1*; *RPL23A* | 17 | 2 | 13 | 8 | 7 | 1 |
| *RPL23A* | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| *RPS3A* | 50 | 1 | 3 | 3 | 3 | 1 |
| *RPL7*; *RPS3A* | 27 | 0 | 1 | 2 | 3 | 0 |
| *RPL7* | 37 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| *RPL7* | 8 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| *C12ORF70*; *RPL7* | 9 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| *OR1J1*; *OR1J2*; *OR1J4* | 11 | 2 | 0 | 14 | 17 | 0 |
| *OR1L1*; *OR1L3*; *OR1L4*; *OR1L6*; *OR1L8*; *OR1Q1* | 9 | 6 | 2 | 4 | 4 | 0 |
| *OLR1361*; *OR1F1*; *OR1G1*; *OR1J2* | 5 | 1 | 0 | 3 | 3 | 0 |
| *OLFR24*; *OLR1361*; *OR1G1*; *OR1N1*; *OR1N2*; *OR7C1* | 8 | 0 | 1 | 3 | 2 | 0 |
| *AC006271.1*; *OLFR867*; *OR7D4* | 11 | 2 | 0 | 3 | 3 | 0 |
| *OR1A1*; *OR1A2* | 8 | 2 | 0 | 2 | 2 | 0 |
| *OR6T1* | 4 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| *OR6C2* | 6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| *OR6C65*; *OR6C70*; *OR6C75*; *OR6C76* | 10 | 3 | 0 | 5 | 5 | 0 |
| *TAAR1*; *TAAR2*; *TAAR4*; *TAAR5*; *TAAR6*; *TAAR8*; *TAAR9* | 15 | 4 | 2 | 15 | 14 | 0 |
| *OR51F1*; *OR51I2*; *OR51Q1* | 8 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 |
| *OR51A4*; *OR51A7* | 7 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| *OR51B2*; *OR51B4*; *OR51B5*; *OR51B6* | 6 | 4 | 1 | 3 | 5 | 0 |
| *OR51F2* | 3 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| *OR52I1*; *OR52I2* | 3 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| *OR56A3* | 5 | 1 | 0 | 2 | 1 | 2 |
| *OR52B4* | 6 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| *RPS16* | 5 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| *OLR1078*; *OR7A10*; *OR7A17*; *OR7A2P*; *OR7A5* | 100 | 3 | 0 | 7 | 9 | 1 |
| *OR7G1*; *OR7G2*; *OR7G3* | 11 | 1 | 0 | 5 | 8 | 0 |
| *OR7A17* | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| *OR7A10*; *OR7A17*; *OR7C1* | 8 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| *OR2A1*; *OR2A42*; *OR2A5* | 6 | 2 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| *OR2A2* | 14 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 |

续表3–6

| 基因名 | 基因数目 | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 树鼩 | 人 | 猕猴 | 小鼠 | 大鼠 | 狗 |
| *HNRNPC*; *HNRNPCL1*; *RALYL* | 6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| *AC087441.2*; *HMGN1*; *RP11-115M6.4*; *RP11-386M24.2* | 19 | 4 | 5 | 1 | 1 | 1 |
| *HMGN2*; *HMGN4* | 18 | 2 | 14 | 2 | 2 | 1 |
| *DDX10* | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| *TCRA* | 6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| *NA* | 6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| *VPREB2* | 11 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| *NA* | 7 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| *NA* | 7 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| *IGLV4-3*; *VPREB1*; *VPREB2*; *VPREB3* | 9 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| *NA* | 7 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| *TCRB*; *V-TCR* | 13 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| *TCRB* | 6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| *TRBV12-3* | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| *NA* | 3 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| *VPREB1*; *VPREB2* | 16 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| *CASR*; *GPRC6A*; *OR2Z1*; *RAP1GDS1*; *VMN2R26*; *ZNF558* | 21 | 1 | 1 | 20 | 61 | 1 |
| *VMN2R26* | 53 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| *RPS26* | 12 | 1 | 2 | 2 | 6 | 0 |
| *PPIA* | 8 | 0 | 4 | 0 | 0 | 0 |
| *AC013283.3*; *NRG2*; *PPIA*; *PPIAL4A*; *PPIAL4B*; *PPIAL4C*; *PPIAL4G* | 23 | 5 | 16 | 4 | 4 | 1 |
| *RPL5* | 28 | 1 | 1 | 1 | 3 | 0 |
| *RPL5* | 6 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| *RPS24* | 21 | 0 | 4 | 1 | 2 | 1 |
| *RPS24* | 6 | 1 | 0 | 2 | 2 | 0 |
| *NA* | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| *ACTL9*; *MA2* | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| *NSA2* | 8 | 1 | 1 | 1 | 4 | 1 |
| *NSA2* | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| *AC023157.1*; *IFITM1*; *IFITM3* | 11 | 1 | 6 | 6 | 2 | 0 |
| *RPL27* | 12 | 1 | 1 | 2 | 4 | 1 |
| *HMGB3* | 5 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| *HMGB3* | 6 | 1 | 1 | 1 | 2 | 0 |
| *HMGB1*; *HMGB1L10*; *HMGB2*; *HMGB3* | 70 | 1 | 4 | 4 | 12 | 1 |
| *HMGB1*; *HMGB2*; *HMGB3* | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| *PCDHGA1*; *PCDHGA10*; *PCDHGA5* | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| *PCDHB10*; *PCDHB14*; *PCDHB16*; *PCDHB18*; *PCDHB3*; *PCDHB7*; *PCDHB8*; *PCDHB9* | 6 | 3 | 1 | 3 | 2 | 0 |
| *AC100778.1*; *RPL17* | 14 | 1 | 6 | 4 | 5 | 1 |
| *RPL30* | 11 | 0 | 1 | 6 | 3 | 1 |
| *UBE2L3* | 14 | 1 | 2 | 2 | 1 | 1 |
| *SLC25A4*; *SLC25A5*; *SLC25A6* | 7 | 3 | 2 | 3 | 5 | 1 |
| *FAM136A* | 6 | 1 | 2 | 1 | 1 | 1 |
| *RPS15A* | 19 | 1 | 5 | 3 | 7 | 0 |
| *DNAJA1* | 16 | 1 | 1 | 1 | 2 | 1 |
| *DNAJB3*; *DNAJB6* | 4 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 |
| *C2ORF77*; *EEF1A*; *EEF1A1* | 14 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| *EEF1A1*; *EEF1AL3* | 12 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| *EEF1A*; *EEF1A1*; *EEF1AL3*; *TEF1* | 21 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| *EEF1A1*; *EEF1AL3* | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| *RPL9* | 20 | 0 | 3 | 2 | 8 | 1 |

续表3-6

| 基因名 | 基因数目 | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 树鼩 | 人 | 猕猴 | 小鼠 | 大鼠 | 狗 |
| *NCL* | 11 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| *NCL* | 9 | 1 | 1 | 1 | 2 | 0 |
| *HNRNPA2B1* | 9 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 |
| *NCL* | 17 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| *NCL* | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| *MDN1* | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| *RPS12* | 15 | 1 | 5 | 6 | 10 | 1 |
| *SMD2*; *SNRPD2* | 10 | 1 | 4 | 3 | 1 | 1 |
| *RPL19* | 8 | 1 | 2 | 1 | 2 | 1 |
| *ADAM20*; *ADAM25* | 6 | 0 | 0 | 8 | 1 | 0 |
| *GEMIN8* | 5 | 1 | 1 | 1 | 2 | 1 |
| *RPL32*; *RPL32-PS* | 15 | 1 | 10 | 3 | 7 | 1 |
| *RPS2* | 4 | 0 | 3 | 0 | 2 | 0 |
| *RPS2* | 3 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 |
| *MORF4L1*; *MORF4L2* | 6 | 1 | 1 | 1 | 2 | 1 |
| *CXORF48*; *CXorf48* | 9 | 1 | 1 | 1 | 2 | 0 |
| *RPS19* | 11 | 1 | 1 | 3 | 5 | 0 |
| *HSPA1*; *HSPA8* | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| *HSA2*; *HSPA8* | 7 | 1 | 1 | 1 | 3 | 1 |
| *RPS18* | 10 | 5 | 5 | 3 | 5 | 1 |
| *BTF3* | 7 | 1 | 2 | 1 | 2 | 0 |
| *YBX1* | 4 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| *HSP90AA1*; *HSP90AB1*; *HSP90AB4P* | 5 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| *RPL26*; *RPL26L1* | 14 | 2 | 6 | 4 | 5 | 1 |
| *CTAGE1*; *CTAGE5* | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| *RPS4*; *RPS4X*; *RPS4Y1*; *RPS4Y2* | 11 | 3 | 3 | 4 | 5 | 1 |
| *SSB* | 6 | 1 | 1 | 1 | 2 | 1 |
| *RPSA* | 4 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| *RPSA* | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| *CACYBP* | 9 | 1 | 2 | 1 | 1 | 1 |
| *RPS20* | 11 | 1 | 4 | 2 | 3 | 1 |
| *GAPDH* | 7 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| *GAPDH* | 7 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| *ATP5H* | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 |
| *ATP5H* | 12 | 1 | 2 | 4 | 1 | 3 |
| *RPL36A*; *RPL36AL* | 21 | 1 | 7 | 3 | 4 | 1 |
| *GOLGA2* | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| *TPT1* | 11 | 1 | 4 | 2 | 2 | 1 |
| *RPL4* | 5 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| *ATP5C1* | 4 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 |
| *RPL15* | 13 | 1 | 1 | 4 | 4 | 1 |
| *RADIL*; *RPS8* | 8 | 1 | 4 | 4 | 4 | 1 |
| *FTH1*; *FTHL17*; *FTMT* | 6 | 2 | 1 | 7 | 4 | 0 |
| *FTH1* | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| *RPL36* | 9 | 1 | 3 | 5 | 8 | 1 |
| *RPL35* | 10 | 1 | 2 | 3 | 6 | 1 |
| *IFNW1* | 6 | 0 | 0 | 14 | 0 | 0 |
| *GVIN1* | 4 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 |
| *GCSH* | 7 | 1 | 2 | 1 | 1 | 0 |
| *RPL18* | 9 | 1 | 7 | 1 | 3 | 1 |

表3–7　树鼩基因组中的基因收缩名录

| 基因名 | 基因数目 | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 树鼩 | 人 | 猕猴 | 小鼠 | 大鼠 | 狗 |
| *OR10C1*; *OR12D2*; *OR12D3*; *OR5V1* | 2 | 13 | 2 | 11 | 7 | 0 |
| *OR5H1*; *OR5H2*; *OR5H6* | 1 | 3 | 2 | 6 | 13 | 0 |
| *ZFP112*; *ZNF155*; *ZNF222*; *ZNF223*; *ZNF224*; *ZNF226*; *ZNF227*; *ZNF229*; *ZNF233*; *ZNF234*; *ZNF235*; *ZNF284*; *ZNF285*; *ZNF45* | 2 | 13 | 6 | 10 | 5 | 0 |
| *AC022415.4*; *CTD-3105H18.13*; *ZNF101*; *ZNF124*; *ZNF136*; *ZNF14*; *ZNF20*; *ZNF433*; *ZNF439*; *ZNF440*; *ZNF441*; *ZNF442*; *ZNF443*; *ZNF490*; *ZNF491*; *ZNF555*; *ZNF556*; *ZNF563*; *ZNF564*; *ZNF57*; *ZNF627*; *ZNF669*; *ZNF699*; *ZNF700*; *ZNF709*; *ZNF763*; *ZNF791*; *ZNF823*; *ZNF844*; *ZNF878* | 2 | 30 | 10 | 60 | 10 | 0 |
| *Z95704.2*; *ZNF100*; *ZNF107*; *ZNF117*; *ZNF138*; *ZNF195*; *ZNF254*; *ZNF257*; *ZNF273*; *ZNF429*; *ZNF43*; *ZNF430*; *ZNF431*; *ZNF479*; *ZNF492*; *ZNF493*; *ZNF506*; *ZNF626*; *ZNF66*; *ZNF675*; *ZNF676*; *ZNF679*; *ZNF680*; *ZNF681*; *ZNF682*; *ZNF708*; *ZNF716*; *ZNF724P*; *ZNF726*; *ZNF730*; *ZNF736*; *ZNF85*; *ZNF92*; *ZNF98* | 0 | 34 | 9 | 12 | 2 | 0 |
| *ZNF121*; *ZNF266*; *ZNF426*; *ZNF559*; *ZNF560*; *ZNF561*; *ZNF562*; *ZNF778*; *ZNF812*; *ZNF846* | 1 | 10 | 3 | 5 | 5 | 0 |
| *ZNF141*; *ZNF738* | 0 | 2 | 1 | 3 | 1 | 0 |
| *PRSS27*; *PRSS29P*; *PRSS8*; *TPSAB1*; *TPSG1* | 1 | 5 | 4 | 10 | 10 | 1 |
| *EPHA3*; *EPHA4*; *EPHA5*; *EPHA6* | 0 | 4 | 3 | 4 | 4 | 0 |
| *AC007319.1*; *AC011466.2*; *AC025260.1*; *AC073548.2*; *AC092067.1*; *AC118138.1*; *AL023807.2*; *AL136115.1*; *AL161915.1* | 0 | 9 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| *AC015802.3*; *AC055717.1*; *AC118344.2*; *AL442003.3*; *AL953897.1*; *C14orf165*; *CTD-2117L12.1*; *RP11-382J12.1*; *RP11-863K10.7*; *TIGD1L2* | 0 | 10 | 13 | 0 | 0 | 0 |
| *OR6C6*; *OR6C70* | 0 | 2 | 1 | 9 | 16 | 0 |
| *RP11-631M21.2*; *RP11-683L23.1*; *TUBB*; *TUBB2A*; *TUBB2B*; *TUBB2C*; *TUBB3* | 1 | 12 | 7 | 4 | 4 | 1 |
| *TUBA1A*; *TUBA1B* | 0 | 2 | 1 | 2 | 2 | 1 |
| *TUBA1C*; *TUBA3C*; *TUBA3D*; *TUBA3E* | 0 | 4 | 1 | 2 | 2 | 1 |
| *AC005336.2*; *AD000685.1*; *CYP4F12*; *CYP4F2*; *CYP4F8* | 1 | 4 | 4 | 6 | 8 | 1 |
| *AL662832.2*; *HLA-A*; *HLA-B*; *HLA-C*; *HLA-E*; *HLA-F*; *HLA-G*; *PATR-A* | 3 | 41 | 10 | 26 | 22 | 0 |
| *CD1A*; *CD1B*; *CD1D*; *CD1E* | 0 | 4 | 4 | 2 | 1 | 1 |
| *IGHV1OR15-5*; *VSIG7* | 0 | 2 | 2 | 0 | 1 | 0 |
| *SSX1*; *SSX2*; *SSX2B*; *SSX3*; *SSX4*; *SSX4B*; *SSX5*; *SSX6*; *SSX9* | 1 | 9 | 5 | 10 | 0 | 1 |
| *RP3-461P17.14*; *SPINLW1*; *WFDC6*; *WFDC8* | 0 | 4 | 3 | 4 | 2 | 0 |
| *AL136981.1*; *ANKRD26*; *ANKRD26P1*; *ANKRD7*; *NCRNA00164* | 1 | 4 | 1 | 5 | 1 | 0 |
| *A26C1B*; *AC012414.2*; *AC022616.1*; *BX072566.3*; *POTEB*; *POTEC*; *POTED*; *POTEE*; *POTEG*; *POTEH*; *POTEI*; *POTEJ*; *POTEM* | 0 | 13 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| *ANKRD18A*; *ANKRD18B*; *ANKRD20A1*; *ANKRD20A2*; *ANKRD20A3*; *ANKRD20A4*; *ANKRD62*; *AP006565.1* | 0 | 8 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| *CR769776.2* | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 2 |
| *RGL4* | 0 | 1 | 7 | 0 | 0 | 0 |
| *RBMXL2*; *RBMY1A1*; *RBMY1B*; *RBMY1D*; *RBMY1E*; *RBMY1F*; *RBMY1J* | 0 | 7 | 0 | 7 | 3 | 1 |
| *RP11-1286E23.12*; *RP11-1286E23.13*; *RP11-1286E23.14*; *RP11-1286E23.15*; *RP11-1286E23.16*; *RP11-1286E23.17*; *RP11-1286E23.5*; *RP11-1286E23.6*; *RP11-1286E23.7*; *RP11-1286E23.8*; *RP11-1396O13.11*; *RP11-1396O13.4*; *RP11-1396O13.5*; *RP11-1396O13.7*; *RP11-1396O13.8*; *RP11-1396O13.9*; *USP17*; *USP17L1P*; *USP17L2*; *USP17L3*; *USP17L4*; *USP17L5*; *USP17L6P*; *USP17L7*; *USP17L8* | 1 | 25 | 2 | 4 | 0 | 0 |

续表3–7

| 基因名 | 基因数目 | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 树鼩 | 人 | 猕猴 | 小鼠 | 大鼠 | 狗 |
| *AC005702.2*; *AC053481.2*; *TBC1D26*; *TBC1D28*; *TBC1D3*; *TBC1D3B*; *TBC1D3C*; *TBC1D3F*; *TBC1D3G*; *TBC1D3H* | 0 | 10 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| *AC100808.7*; *KRTAP4-12*; *KRTAP4-14*; *KRTAP4-3*; *KRTAP4-4*; *KRTAP4-5*; *KRTAP4-6*; *KRTAP4-7*; *KRTAP4-9*; *KRTAP9-1*; *KRTAP9-2*; *KRTAP9-3*; *KRTAP9-4*; *KRTAP9-6*; *KRTAP9-7*; *KRTAP9-8*; *KRTAP9-9* | 0 | 17 | 5 | 20 | 5 | 0 |
| *KRTAP12-1*; *KRTAP12-3*; *KRTAP12-4* | 0 | 3 | 1 | 3 | 1 | 1 |
| *LILRA1*; *LILRA2*; *LILRA3*; *LILRA4*; *LILRA6*; *LILRB1*; *LILRB2*; *LILRB3*; *LILRB5* | 0 | 9 | 3 | 5 | 2 | 0 |
| *TAS2R13*; *TAS2R19*; *TAS2R20*; *TAS2R50* | 0 | 4 | 8 | 15 | 17 | 1 |
| *FGF11*; *FGF12*; *FGF14* | 0 | 3 | 4 | 4 | 3 | 1 |
| *SLC22A24*; *SLC22A25*; *SLC22A9* | 0 | 3 | 0 | 6 | 4 | 1 |
| *HIST1H2AB*; *HIST1H2AC*; *HIST1H2AD*; *HIST1H2AE*; *HIST1H2AG*; *HIST1H2AH*; *HIST1H2AI*; *HIST1H2AJ*; *HIST1H2AK*; *HIST1H2AL*; *HIST1H2AM*; *HIST2H2AA3*; *HIST2H2AA4*; *HIST3H2A*; *SMCHD1* | 4 | 14 | 12 | 15 | 11 | 0 |
| *TMSB15A*; *TMSB4Y*; *TMSL3*; *TMSL4* | 0 | 4 | 3 | 3 | 1 | 2 |
| *TCEAL3*; *TCEAL5*; *TCEAL6* | 0 | 3 | 3 | 3 | 1 | 2 |
| *HIST1H1B*; *HIST1H1C*; *HIST1H1D*; *HIST1H1E* | 0 | 4 | 4 | 4 | 1 | 0 |
| *ATP5G1* | 0 | 1 | 3 | 1 | 4 | 1 |
| *OAS1* | 0 | 1 | 2 | 8 | 8 | 0 |
| *PRAME*; *PRAMEF1*; *PRAMEF10*; *PRAMEF11*; *PRAMEF12*; *PRAMEF13*; *PRAMEF14*; *PRAMEF15*; *PRAMEF16*; *PRAMEF17*; *PRAMEF18*; *PRAMEF19*; *PRAMEF2*; *PRAMEF20*; *PRAMEF21*; *PRAMEF22*; *PRAMEF3*; *PRAMEF5*; *PRAMEF6*; *PRAMEF7*; *PRAMEF8*; *PRAMEF9* | 1 | 22 | 6 | 72 | 12 | 0 |
| *NPM1* | 0 | 1 | 1 | 0 | 7 | 1 |
| *EBF1*; *EBF2*; *EBF3* | 0 | 3 | 1 | 3 | 3 | 0 |
| *COX6C* | 0 | 1 | 3 | 1 | 1 | 3 |
| *AHCY* | 0 | 1 | 2 | 1 | 3 | 1 |
| *PNMA2*; *PNMA3*; *PNMA5* | 0 | 3 | 1 | 3 | 3 | 0 |
| *RPL14* | 0 | 1 | 1 | 1 | 4 | 2 |
| *SPDYE1*; *SPDYE2*; *SPDYE3*; *SPDYE4*; *SPDYE6* | 0 | 5 | 0 | 2 | 1 | 0 |
| *LRRC37A*; *LRRC37A2*; *LRRC37A3*; *LRRC37B* | 0 | 4 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| *NA* | 0 | 0 | 2 | 9 | 2 | 0 |
| *CTNNA1*; *CTNNA2*; *CTNNA3* | 0 | 3 | 3 | 3 | 1 | 1 |
| *FAM127A*; *FAM127B*; *FAM127C* | 0 | 3 | 1 | 3 | 0 | 3 |
| *IFNA1*; *IFNA10*; *IFNA13*; *IFNA14*; *IFNA16*; *IFNA17*; *IFNA2*; *IFNA21*; *IFNA4*; *IFNA5*; *IFNA6*; *IFNA7*; *IFNA8*; *IFNW1* | 3 | 14 | 14 | 8 | 4 | 12 |
| *AC008132.13*; *LL22NC03-31F3.9*; *POM121L4P*; *POM121L7* | 0 | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| *PILRA*; *PILRB* | 0 | 2 | 0 | 2 | 4 | 0 |
| *TCEB2* | 0 | 1 | 1 | 2 | 1 | 0 |
| *CKS1B*; *CKS2* | 0 | 2 | 3 | 2 | 4 | 1 |
| *OXCT1*; *OXCT2* | 0 | 2 | 2 | 3 | 0 | 0 |
| *CBWD1*; *CBWD2*; *CBWD3*; *CBWD5*; *CBWD6* | 0 | 5 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| *FBL* | 0 | 1 | 1 | 2 | 1 | 0 |
| *CTAG1A*; *CTAG1B*; *LAGE3* | 0 | 3 | 1 | 4 | 2 | 0 |

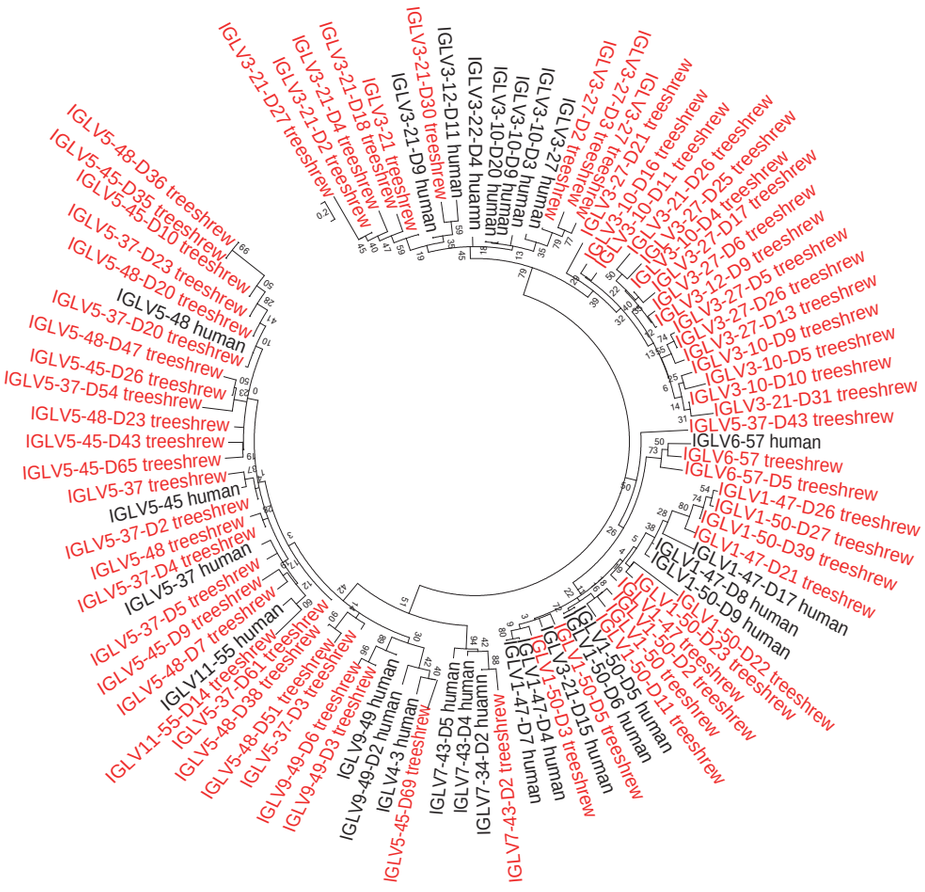



**图3–5　树鼩*IGLV*基因家族扩张**

通过TreeBest（http://treesoft.sourceforge.net/treebest.shtml）软件构建邻接（Neighbor–joining）树，可靠性通过1000次bootstrap重复估计，数字代表节点的支持率。

## 第六节　树鼩的功能基因

功能基因是指细胞内具有生物学功能的基因，这里介绍的树鼩功能基因主要是在分子水平上的研究，旨在解读一些树鼩的遗传学特性，为树鼩进一步生物学功能研究与动物模型创建提供指示性信息。

### 一、树鼩的假基因

假基因是指源于功能基因但已失去活性的基因，有沉默的假基因，也有可以转录的假基因。产生假基因的原因很多，如编码序列出现提前终止突变，或者插入和缺失某些核苷酸使mRNA移码，造成翻译中途停止或异常延伸，合成无活性的蛋白质。假基因化一般被认为是功能退化的标志，大多数假基因产生是由于选择压力放松，产生大量突变导致编码框破坏成为假基因。但也有

研究显示，假基因可以在基因表达调控过程中发挥重要的作用，如*PTEN*假基因可以调控*PTEN*基因的表达[25]。

假基因的鉴定，主要是利用人的编码序列比对到树鼩基因组上，提取对应的同源基因序列，如果这个基因出现了提前终止或移码突变，且不存在基因组组装错误，就被认为是假基因。在树鼩基因组中我们一共鉴定了144个假基因（表3–8）。其中尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶1（NADPH oxidase 1, *NOX1*）基因，编码序列出现了提前终止突变。*NOX1*主要在结肠上表达，在前列腺、子宫和血管平滑肌细胞（VSMC）也有少量表达，*NOX1*是NADPH氧化酶电压门控质子通道的催化亚基之一，可以调控细胞内氧化自由基水平，并且在对抗酸的细胞防御中起到重要作用。它的假基因化很可能减少动脉壁中氧化自由基的水平，降低树鼩一些心血管病的发病率。

*MC5R*基因（黑素皮质素–5受体）是黑素皮质素受体家族的一员，广泛存在于组织中，包括大脑、骨骼肌、皮肤等组织，对胞内环状单磷酸腺苷（cAMP）浓度的增加产生应答，与肥胖相关，*MC5R*的假基因化可能引起皮脂分泌减少[26]，这可能是树鼩毛发不够光滑的原因。另外*MC5R*还与骨骼肌脂肪酸氧化相关，其假基因化还引起骨骼肌脂肪酸氧化过程减缓[27]。

*EPHB2*属于生促红素人肝细胞（erythropoiet in-producing hepatoma cell line, Eph）受体家族，与其配体Ephrin-B之间的信号传递介导了许多重要的生理过程，在胚胎形成、神经元的迁移定向、轴突路径导引、血管形成等方面有着重要的作用。

目前，对于这些假基因的影响我们还仅停留在推测的层次，具体会产生怎样的生物学功能改变还需要进一步研究。树鼩基因组中出现的这些假基因现象，为我们带来一系列的有趣的问题：为什么这些基因可在树鼩体内丢失？树鼩自身有无其它的代偿机制来弥补这些基因的功能？这些假基因是否对应于树鼩的某些未知的生物学功能？这些问题可望在未来实现树鼩转基因操作后得到解答。

**表3–8　树鼩基因组中假基因一览表**

| 基因简称 | KEGG分类功能注释 | 突变形式 |
|---|---|---|
| *FASTKD2* | — | 移码突变 |
| *BCL2L12* | — | 移码突变 |
| *EMR3* | 信号分子与互作（Signaling molecules and interaction） | 移码突变 |
| *KIF12* | 细胞运动（Cell motility） | 移码突变 |
| *PRR5-ARHGAP8* | — | 移码突变 |
| *PCSK4* | 蛋白质折叠、分选与降解（Folding, sorting and degradation）；酶家族（Enzyme families） | 移码突变 |
| *KRT28* | 细胞运动（Cell motility） | 移码突变 |
| *OR9K2* | 感觉系统（Sensory system）；信号分子与互作（Signaling molecules and interaction） | 移码突变 |
| *OR5B3* | 感觉系统（Sensory system）；信号分子与互作（Signaling molecules and interaction） | 移码突变 |
| *C18orf26* | — | 提前终止突变 |
| *PVRIG* | — | 移码突变 |
| *SPTBN5* | 细胞运动（Cell motility） | 移码突变 |
| *MC5R* | 信号分子与互作（Signaling molecules and interaction） | 移码突变 |
| *OR2D3* | 感觉系统（Sensory system）；信号分子与互作（Signaling molecules and interaction） | 提前终止突变 |
| *AC022762.1* | — | 移码突变 |
| *AC111177.1* | — | 移码突变 |

续表3-8

| 基因简称 | KEGG分类功能注释 | 突变形式 |
|---|---|---|
| *OR56B4* | 感觉系统（Sensory system）；信号分子与互作（Signaling molecules and interaction） | 提前终止突变 |
| *OR52N5* | 感觉系统（Sensory system）；信号分子与互作（Signaling molecules and interaction） | 移码突变 |
| *OR51J1* | — | 移码突变和提前终止突变 |
| *ARMCX3* | — | 移码突变和提前终止突变 |
| *MPO* | 运输与分解（Transport and catabolism） | 移码突变 |
| *PXDNL* | — | 提前终止突变 |
| *OR11G2* | 感觉系统（Sensory system）；信号分子与互作（Signaling molecules and interaction） | 移码突变 |
| *OR5B17* | 感觉系统（Sensory system）；信号分子与互作（Signaling molecules and interaction） | 移码突变 |
| *HLA-DRB1* | 免疫系统（Immune system）；运输与分解（Transport and catabolism）；免疫系统疾病（Immune system diseases）；信号分子与互作（Signaling molecules and interaction）；感染性疾病（Infectious diseases）；心血管疾病（Cardiovascular diseases）；代谢性疾病（Metabolic diseases） | 提前终止突变 |
| *CCDC102B* | — | 移码突变和提前终止突变 |
| *KMO* | 氨基酸代谢（Amino acid metabolism） | 移码突变 |
| *ASPM* | — | 提前终止突变 |
| *OR10R2* | 感觉系统（Sensory system）；信号分子与互作（Signaling molecules and interaction） | 提前终止突变 |
| *DMBT1* | 消化系统（Digestive system） | 移码突变和提前终止突变 |
| *ZSWIM1* | — | 提前终止突变 |
| *HNRNPH2* | 转录（Transcription） | 移码突变和提前终止突变 |
| *TRMT2B* | — | 移码突变和提前终止突变 |
| *NOX1* | 免疫系统（Immune system）；发育（Development）；运输与分解（Transport and catabolism） | 移码突变 |
| *TNFSF13B* | 免疫系统（Immune system）；免疫系统疾病（Immune system diseases）；信号分子与互作（Signaling molecules and interaction） | 移码突变 |
| *SLC38A5* | — | 移码突变和提前终止突变 |
| *PGPEP1L* | — | 移码突变 |
| *IGLV4-69* | — | 提前终止突变 |
| *AC117834.1* | — | 移码突变 |
| *SH2D2A* | 信号转导（Signal transduction） | 提前终止突变 |
| *TTC23* | — | 移码突变 |
| *GPR112* | 信号分子与互作（Signaling molecules and interaction） | 移码突变 |
| *PPM1N* | — | 移码突变 |
| *MCC* | — | 提前终止突变 |
| *AC011537.1* | — | 移码突变 |
| *OR6V1* | 感觉系统（Sensory system）；信号分子与互作（Signaling molecules and interaction） | 移码突变 |

续表3-8

| 基因简称 | KEGG分类功能注释 | 突变形式 |
|---|---|---|
| *CTD-3074O7.11* | — | 移码突变 |
| *ARMCX4* | — | 移码突变 |
| *PGAM4* | 能量代谢（Energy metabolism）；糖代谢（Carbohydrate metabolism） | 移码突变 |
| *RYBP* | DNA复制与修复（Replication and repair） | 移码突变 |
| *NACA2* | — | 提前终止突变 |
| *ZNF260* | — | 移码突变 |
| *RP11-468E2.1* | — | 提前终止突变 |
| *RP11-480I12.4* | — | 移码突变 |
| *TRAF6* | 神经系统（Nervous system）；免疫系统（Immune system）；发育（Development）；运输与分解（Transport and catabolism）；Cancers；蛋白质折叠、分选与降解（Folding, sorting and degradation）；信号转导（Signal transduction）；感染性疾病（Infectious diseases） | 移码突变和提前终止突变 |
| *PHF16* | — | 移码突变 |
| *ACCN2* | 信号分子与互作（Signaling molecules and interaction） | 移码突变 |
| *ATP7B* | — | 移码突变 |
| *PSD4* | 运输与分解（Transport and catabolism） | 移码突变 |
| *RTN2* | — | 移码突变 |
| *NECAB3* | — | 移码突变 |
| *HCFC1R1* | — | 提前终止突变 |
| *ITIH5* | — | 移码突变 |
| *AMHR2* | 信号分子与互作（Signaling molecules and interaction）；酶家族（Enzyme families）；信号转导（Signal transduction） | 移码突变 |
| *PSMC1* | 蛋白质折叠、分选与降解（Folding, sorting and degradation） | 移码突变和提前终止突变 |
| *TTC19* | — | 移码突变 |
| *ACCS* | — | 移码突变 |
| *C1RL* | — | 移码突变 |
| *STON2* | — | 移码突变 |
| *ALS2CR12* | — | 提前终止突变 |
| *FRRS1* | — | 提前终止突变 |
| *PEX10* | 运输与分解（Transport and catabolism） | 移码突变 |
| *KRT4* | 细胞运动（Cell motility） | 移码突变 |
| *RAVER2* | — | 移码突变 |
| *DNALI1* | 细胞运动（Cell motility）；神经退行性疾病（Neurodegenerative diseases） | 移码突变 |
| *ANKK1* | — | 移码突变 |
| *PTPN7* | 信号转导（Signal transduction） | 移码突变 |
| *SLC16A11* | 膜运输（Membrane transport） | 移码突变 |
| *NIPAL4* | — | 移码突变和提前终止突变 |
| *ZNF541* | — | 提前终止突变 |
| *KCNH6* | 信号分子与互作（Signaling molecules and interaction） | 移码突变 |
| *DNAJC4* | 蛋白质折叠、分选与降解（Folding, sorting and degradation） | 移码突变 |
| *OR4C3* | 感觉系统（Sensory system）；信号分子与互作（Signaling molecules and interaction） | 提前终止突变 |
| *LCK* | 免疫系统（Immune system）；发育（Development）；免疫系统疾病（Immune system diseases）；信号分子与互作（Signaling molecules and interaction）；酶家族（Enzyme families） | 移码突变 |
| *DNAH11* | — | 移码突变 |
| *CCDC28A* | — | 移码突变 |

续表3-8

| 基因简称 | KEGG分类功能注释 | 突变形式 |
|---|---|---|
| *EXOC7* | 内分泌系统（Endocrine system） | 移码突变 |
| *ZNF677* | 转录（Transcription） | 移码突变 |
| *C20orf24* | — | 提前终止突变 |
| *ISM2* | — | 提前终止突变 |
| *DCDC5* | — | 移码突变 |
| *SPINT1* | — | 移码突变 |
| *DCBLD1* | — | 移码突变 |
| *HELT* | — | 移码突变 |
| *KIAA0586* | — | 移码突变和提前终止突变 |
| *HTR3A* | 信号分子与互作（Signaling molecules and interaction） | 移码突变 |
| *TP73* | 神经系统（Nervous system）；转录（Transcription）；感染性疾病（Infectious diseases）；细胞生长与凋亡（Cell growth and death） | 提前终止突变 |
| *KLHDC1* | — | 移码突变 |
| *DSG4* | — | 移码突变 |
| *ARHGEF18* | — | 移码突变 |
| *MORF4L2* | DNA复制与修复（Replication and repair） | 移码突变 |
| *FAM63A* | — | 提前终止突变 |
| *MYCT1* | — | 移码突变 |
| *TRMT1L* | — | 移码突变 |
| *ROS1* | 信号分子与互作（Signaling molecules and interaction）；酶家族（Enzyme families）；信号转导（Signal transduction） | 提前终止突变 |
| *ZNF644* | — | 移码突变 |
| *RBMX* | 转录（Transcription） | 提前终止突变 |
| *USP33* | 蛋白质折叠、分选与降解（Folding, sorting and degradation）；酶家族（Enzyme families） | 移码突变 |
| *MRPS18A* | — | 移码突变 |
| *FOXP3* | 信号分子与互作（Signaling molecules and interaction） | 移码突变和提前终止突变 |
| *TAF1C* | 转录（Transcription） | 移码突变和提前终止突变 |
| *CDK11A* | 转录（Transcription）；酶家族（Enzyme families） | 提前终止突变 |
| *INTS1* | 转录（Transcription） | 移码突变 |
| *AKT1S1* | — | 移码突变 |
| *RBMS1* | — | 移码突变 |
| *CDKN1B* | 癌症（Cancers）；感染性疾病（Infectious diseases）；细胞生长与凋亡（Cell growth and death） | 移码突变 |
| *CABIN1* | — | 移码突变 |
| *C2orf73* | — | 提前终止突变 |
| *EPHB2* | 发育（Development）；信号分子与互作（Signaling molecules and interaction）；酶家族（Enzyme families） | 移码突变 |
| *TNFSF18* | 信号分子与互作（Signaling molecules and interaction） | 移码突变 |
| *CKMT1A* | 氨基酸代谢（Amino acid metabolism） | 移码突变 |
| *HIF1AN* | — | 移码突变 |
| *VSIG1* | — | 移码突变 |
| *BBC3* | 感染性疾病（Infectious diseases）；神经退行性疾病（Neurodegenerative diseases）；细胞生长与凋亡（Cell growth and death） | 提前终止突变 |
| *ZBTB7B* | 转录（Transcription）；蛋白质折叠、分选与降解（Folding, sorting and degradation） | 移码突变 |
| *C14orf37* | — | 移码突变 |

续表3–8

| 基因简称 | KEGG分类功能注释 | 突变形式 |
|---|---|---|
| *OTUB1* | 蛋白质折叠、分选与降解（Folding, sorting and degradation）；酶家族（Enzyme families） | 提前终止突变 |
| *CASR* | 信号分子与互作（Signaling molecules and interaction） | 移码突变 |
| *DROSHA* | 蛋白质翻译（Translation） | 移码突变 |
| *SLC4A9* | — | 移码突变 |
| *NCALD* | — | 移码突变 |
| *WNK1* | 酶家族（Enzyme families） | 移码突变 |
| *ZNF623* | — | 移码突变 |
| *C9orf174* | — | 移码突变 |
| *DNHD1* | — | 移码突变和提前终止突变 |
| *CUL7* | 蛋白质折叠、分选与降解（Folding, sorting and degradation） | 移码突变和提前终止突变 |
| *ZNF135* | 转录（Transcription） | 移码突变 |
| *ARHGAP5* | 免疫系统（Immune system）；细胞通信（Cell communication） | 移码突变 |
| *MYT1* | — | 移码突变 |
| *TUBA1C* | 运输与分解（Transport and catabolism）；细胞运动（Cell motility）；感染性疾病（Infectious diseases）；细胞通信（Cell communication） | 移码突变 |
| *DAZAP2* | — | 移码突变 |
| *DDIT3* | 转录（Transcription）；蛋白质折叠、分选与降解（Folding, sorting and degradation）；信号转导（Signal transduction） | 移码突变 |
| *C12orf28* | — | 移码突变 |
| *CLEC5A* | 信号分子与互作（Signaling molecules and interaction） | 移码突变 |

“—”表示暂无KEGG分类功能注释信息。

## 二、树鼩特有的缺失基因

通过与人、猕猴和小鼠基因组共线性比较，发现树鼩有11个基因特异缺失（表3–9）。其中，前列腺转谷氨酰胺酶（prostate-specific transglutaminase 4, *TGM4*）是一种精液蛋白，参与精液凝块的形成或分解，在精子竞争中起到重要作用[28, 29]。松弛肽/胰岛素样家族肽受体1（relaxin/insulin-like family peptide receptor 1, *RXFP1*），是卵泡刺激素和黄体生成素的受体。卵泡刺激素是垂体分泌的可以刺激精子生成和卵子成熟的一种激素，与黄体生成素统称促性腺激素，具有促进卵泡发育成熟作用，与黄体生成素一起促进雌激素分泌，在男女两性体内都是很重要的激素之一，调控着发育、生长、青春期性成熟以及生殖相关的一系列生理过程。作用于卵巢，人卵泡刺激素促进卵泡颗粒层细胞增生分化，促进整个卵巢长大；作用于睾丸曲细精管可促进精子形成[30]。*TGM4*和*RXFP1*基因的缺失很有可能与树鼩单配偶交配系统有关[4, 31]。当然，我们需要更多的实验数据来证实这种推测。同样，对于树鼩基因组中其它缺失的基因功能是什么，也是非常值得深究的问题。

表3–9　树鼩基因组中11个缺失基因

| 基因简写 | 基因名 | KEGG分类功能注释 |
|---|---|---|
| *CLEC9A* | C–type lectin domain family 9, member A | — |
| *C1orf110* | chromosome 1 open reading frame 110 | — |

续表3–9

| 基因简写 | 基因名 | KEGG分类功能注释 |
|---|---|---|
| *RXFP1* | relaxin / insulin–like family peptide receptor 1 | 信号分子与互作（Signaling molecules and interaction） |
| *TGM4* | transglutaminase 4 (prostate) | — |
| *CPNE7* | copine Ⅶ | — |
| *TOP1MT* | topoisomerase (DNA) Ⅰ, mitochondrial | DNA复制与修复（Replication and repair） |
| *SLC17A9* | solute carrier family 17, member 9 | 膜转运（Membrane transport） |
| *PLD4* | phospholipase D family, member 4 | — |
| *PRIC285* | peroxisomal proliferator–activated receptor A–interacting complex 285 kDa protein | — |
| *TRIM34* | tripartite motif containing 34 | 蛋白质折叠、分选与降解（Folding, sorting and degradation） |
| *DDX58* | DEAD (Asp–Glu–Ala–Asp) box polypeptide 58 | 免疫系统（Immune system） |

“—”表示暂无KEGG分类功能注释信息。假基因鉴定首先通过blast比对获得人、猕猴、小鼠和树鼩的4个物种的两两同源基因对，然后以人染色体基因顺序为参考，建立4个物种的基因共线性列表，并将不在共线性区域的同源基因移除。根据共线性基因列表，若连续3个基因A、B、C在人、猕猴和小鼠均存在，而树鼩中只存在A、C，则认为B基因可能缺失。

## 三、树鼩与灵长类特有的共同基因

通过与人、猕猴和小鼠基因组的比较分析与人工筛查，我们在树鼩基因组中发现存在28个树鼩与灵长类特有的共同基因（表3–10），这些基因可能是树鼩和灵长类的共同祖先在一定的选择压力下产生的，意味着新功能的出现，是树鼩与灵长类共同进化的产物。其中包括NKG2D（natural kill cell receptor D）配体ULBP（UL16 binding protein）家族成员，它在感染、癌症和自身免疫疾病中可以激活天然杀伤细胞和T细胞，以调节相应的免疫识别和免疫反应[32]。在人类基因组中NKG2D配体的编码基因由*ULBP*基因家族和*MIC*（MHC class Ⅰ-related chain）组成，而在小鼠中NKG2D配体编码基因是由*ULBP*基因家族和*MILL*（MHC Ⅰ like leukocyte）基因家族组成，缺失了*MIC*基因[33]。树鼩与人相似，拥有一个*MIC*家族基因和6个*ULBP*基因家族成员（图3–6），而且*MIC*基因家族一般认为只存在于灵长类[34]，这些都提示了树鼩拥有与人类类似的免疫清除体系，这很有可能是树鼩与灵长类共同进化的结果。

*APOBEC*3基因家族编码的酶是一类具有抗逆转录病毒的蛋白，其主要的抗病毒机制是能够从病毒单链DNA的腺嘌呤或胞嘧啶上脱氨基使之分别变为黄嘌呤或尿嘧啶，从而产生对病毒致死的G→A高突变现象。人类淋巴细胞内的免疫蛋白质APOBEC3会与艾滋病病毒制造的特殊蛋白质Vif结合，从而难以发挥免疫作用，使人体在艾滋病病毒面前缺乏免疫力，但鼠及大多数灵长类的*APOBEC3*蛋白却不能被HIV的Vif识别，这是导致HIV不感染其它动物的一个主要原因[35]。APOBEC3基因家族是哺乳动物特有的，在小鼠中只有一个拷贝，而在灵长类中发生特异的扩张[36]，比如人有7个拷贝，在树鼩的基因组中检测到至少5个拷贝，与灵长类相似（图3–7）。树鼩基因组中的这些与灵长类动物特有的共同基因的发现，一方面提示树鼩与灵长类的较近的起源，同时对于采用树鼩来用于替代某些非人灵长类动物实验，提供了较为直接的遗传依据。

表3-10　28个树鼩与灵长类特有的共同基因

| 基因简写 | 基因名 | KEGG分类功能注释 |
|---|---|---|
| *AC103810.1* | Uncharacterized proteincDNA FLJ60005, moderately similar to Homo sapiens pleckstrin homology domain containing, family M member 1, mRNA | — |
| *APOBEC3G* | apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3G | 免疫系统（Immune system） |
| *CLC* | Charcot-Leyden crystal protein | 信号分子与互作（Signaling molecules and interaction） |
| *CSH2* | chorionicsomatomammotropin hormone 2 | 信号转导（Signal transduction） |
| *DHRS4L2* | dehydrogenase / reductase (SDR family) member 4 like 2 | — |
| *FOLR3* | folate receptor 3 (gamma) | — |
| *H2BFM* | H2B histone family, member M | 免疫系统（Immune system）；DNA复制与修复（Replication and repair） |
| *KRTAP10-6* | keratin associated protein 10-6 | — |
| *LEUTX* | leucine twenty homeobox | — |
| *MRGPRX4* | MAS-related GPR, member X4 | 信号分子与互作（Signaling molecules and interaction） |
| *OR1A2* | olfactory receptor, family 1, subfamily A, member 2 | 感觉系统（Sensory System）；信号分子与互作（Signaling molecules and interaction） |
| *OR2T29* | olfactory receptor, family 2, subfamily T, member 29 | 感觉系统（Sensory System）；信号分子与互作（Signaling molecules and interaction） |
| *OR4A5* | olfactory receptor, family 4, subfamily A, member 5 | 感觉系统（Sensory System）；信号分子与互作（Signaling molecules and interaction） |
| *OR4C16* | olfactory receptor, family 4, subfamily C, member 16 | 感觉系统（Sensory System）；信号分子与互作（Signaling molecules and interaction） |
| *OR4F16* | olfactory receptor, family 4, subfamily F, member 16 | 感觉系统（Sensory System）；信号分子与互作（Signaling molecules and interaction） |
| *OR4Q3* | olfactory receptor, family 4, subfamily Q, member 3 | 感觉系统（Sensory System）；信号分子与互作（Signaling molecules and interaction） |
| *OR5M8* | olfactory receptor, family 5, subfamily M, member 8 | 感觉系统（Sensory System）；信号分子与互作（Signaling molecules and interaction） |
| *OR7D4* | olfactory receptor, family 7, subfamily D, member 4 | 感觉系统（Sensory System）；信号分子与互作（Signaling molecules and interaction） |
| *OR8B2* | olfactory receptor, family 8, subfamily B, member 2 | 感觉系统（Sensory System）；信号分子与互作（Signaling molecules and interaction） |
| *PYDC1* | PYD (pyrin domain) containing 1 | 生物体系统（Organismal Systems）；免疫系统（Immune system） |
| *RASA4B* | RAS p21 protein activator 4B | — |
| *S100A7L2* | S100 calcium binding protein A7-like 2 | — |
| *SIGLEC9* | sialic acid binding Ig-like lectin 9 | 信号分子与互作（Signaling molecules and interaction） |
| *TRBV20OR9-2* | T cell receptor beta variable 20 / OR9-2 (non-functional) | — |

续表3–10

| 基因简写 | 基因名 | KEGG分类功能注释 |
|---|---|---|
| *TRBV21OR9-2* | T cell receptor beta variable 21 / OR9–2 (non–functional) | — |
| *UGT2B28* | UDP glucuronosyltransferase 2 family, polypeptide B28 | 多糖合成与代谢（Glycan Biosynthesis and Metabolism）；异源物质降解与代谢（Xenobiotics Biodegradation and Metabolism）；脂类代谢（Lipid Metabolism）；辅因子与维生素代谢（Metabolism of Cofactors and Vitamins）；糖代谢（Carbohydrate Metabolism） |
| *ULBP2* | UL16 binding protein 2 | 免疫系统（Immune system） |
| *ZNF433* | zinc finger protein 433 | 转录（Transcription） |

“—”表示暂无KEGG分类功能注释信息。树鼩与灵长类特有的共同基因鉴定首先通过blast比对获得人、猕猴、小鼠和树鼩的同源基因，然后以人染色体基因顺序为参考，建立4个物种的基因共线性列表，并将不在共线性区域的同源基因移除。挑选出在人、猕猴和树鼩中存在，在小鼠中不存在的基因作为候选基因，并将所有候选基因进行人工检查，确定只在灵长类中存在的基因认为是树鼩与灵长类特有的共同基因。

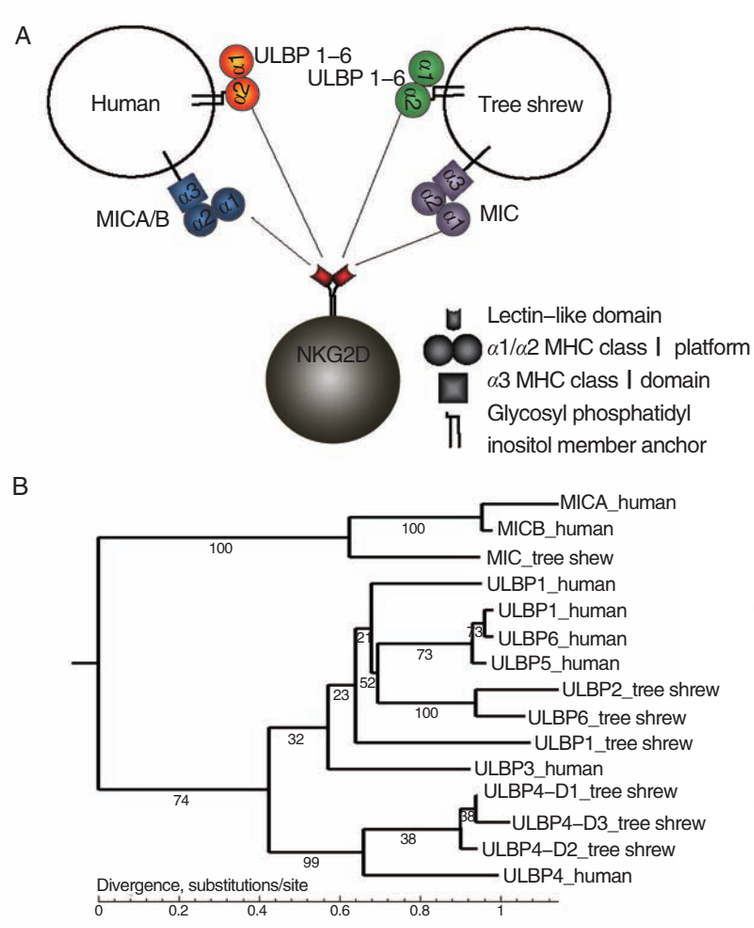



**图3–6　树鼩与人的NKG2D配体**

（A）ULBP和MIC与NKG2D相互作用；（B）人与树鼩*MIC*和*ULBP*基因家族的系统发育树。通过TreeBest（http://treesoft.sourceforge.net/treebest.shtml）软件构建邻接（Neighbor–joining）树，可靠性通过1000次bootstrap重复估计，数字代表节点的支持率。

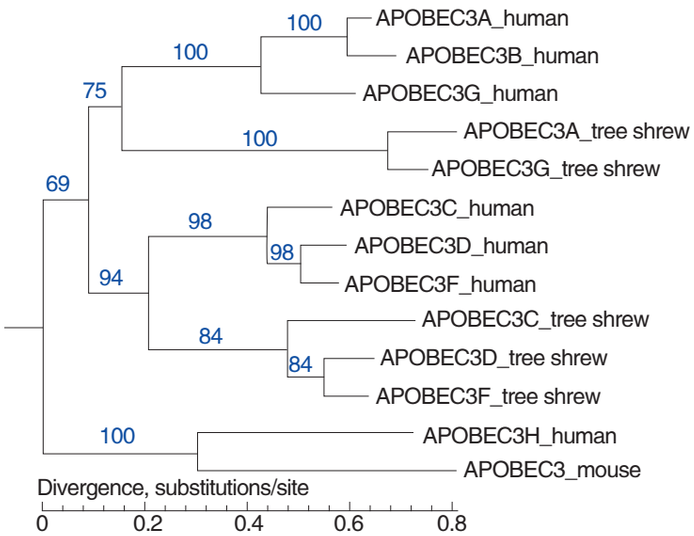



**图3–7 *APOBEC3*基因家族的系统发育树**

通过TreeBest（http://treesoft.sourceforge.net/treebest.shtml）软件构建邻接（Neighbor–joining）树，可靠性通过1000次bootstrap重复估计，数字代表节点的支持率。

## 四、树鼩的神经系统基因

### （一）抑郁症相关基因

抑郁症是一种常见的心境障碍，可由各种原因引起，以显著而持久的心境低落为主要临床特征，且心境低落与其处境不相称，严重者可出现自杀念头和行为。多数病例有反复发作的倾向，每次发作大多数可以缓解，部分可有残留症状或转为慢性。

多项研究表明树鼩是重要的研究抑郁症的候选模型[37, 38]，因此对于树鼩抑郁症相关基因的研究十分必要，有助于解析抑郁症的致病机理和树鼩抑郁症动物模型的创建。神经递质转运蛋白对神经传递起着重要作用，抑制其活性可以起到抗抑郁的作用。在树鼩基因组中，一共有23个神经递质转运蛋白基因（表3–11），与人的数目一致，其中只有*SLC6A9*［solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, glycine), member 9］基因在树鼩分支发生了快速进化（图3–8），其余基因在树鼩中都高度保守。这些完整和保守的神经递质转运蛋白为研究树鼩的抑郁症模型和评估抗抑郁药提供了很好的遗传基础。

表3–11 树鼩、小鼠与人的神经递质转运蛋白序列一致性比较

| 基因简写 | 基因名 | 树鼩与人一致性（identity）% | 小鼠与人一致性（identity）% |
|---|---|---|---|
| *SLC17A6* | solute carrier family 17 (sodium–dependent inorganic phosphate cotransporter), member 6 | 98.61 | 97.42 |
| *SLC17A7* | solute carrier family 17 (sodium–dependent inorganic phosphate cotransporter), member 7 | 97.03 | 98.7 |
| *SLC17A8* | solute carrier family 17 (sodium–dependent inorganic phosphate cotransporter), member 8 | 95.45 | 93.03 |
| *SLC18A1* | solute carrier family 18 (vesicular monoamine), member 1 | 83.82 | 82.25 |

续表3–11

| 基因简写 | 基因名 | 树鼩与人一致性（identity）% | 小鼠与人一致性（identity）% |
|---|---|---|---|
| *SLC18A2* | solute carrier family 18 (vesicular monoamine), member 2 | 92.07 | 92.41 |
| *SLC18A3* | solute carrier family 18 (vesicular acetylcholine), member 3 | 94.37 | 94.13 |
| *SLC1A1* | solute carrier family 1 (neuronal / epithelial high affinity glutamate transporter, system Xag), member 1 | 92.08 | 90.08 |
| *SLC1A2* | solute carrier family 1 (glial high affinity glutamate transporter), member 2 | 90.36 | 94.9 |
| *SLC1A3* | solute carrier family 1 (glial high affinity glutamate transporter), member 3 | 97.56 | 96.38 |
| *SLC1A6* | solute carrier family 1 (high affinity aspartate / glutamate transporter), member 6 | 88.25 | 90.3 |
| *SLC1A7* | solute carrier family 1 (glutamate transporter), member 7 | 92.96 | 92.32 |
| *SLC29A1* | solute carrier family 29 (nucleoside transporters), member 1 | 91.42 | 79.87 |
| *SLC29A2* | solute carrier family 29 (nucleoside transporters), member 2 | 91.78 | 89.04 |
| *SLC29A3* | solute carrier family 29 (nucleoside transporters), member 3 | 78.98 | 73.89 |
| *SLC29A4* | solute carrier family 29 (nucleoside transporters), member 4 | 90.53 | 90.95 |
| *SLC32A1* | solute carrier family 32 (GABA vesicular transporter), member 1 | 98.47 | 98.67 |
| *SLC6A1* | solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, GABA), member 1 | 94.18 | 98 |
| *SLC6A11* | solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, GABA), member 11 | 95.75 | 94.15 |
| *SLC6A12* | solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, betaine / GABA), member 12 | 86.63 | 87.79 |
| *SLC6A2* | solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, noradrenalin), member 2 | 96.03 | 94.27 |
| *SLC6A3* | solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, dopamine), member 3 | 89.66 | 93.49 |
| *SLC6A4* | solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, serotonin), member 4 | 95.56 | 92.09 |
| *SLC6A5* | solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, glycine), member 5 | 91.76 | 94.1 |
| *SLC6A9* | solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, glycine), member 9 | 90.11 | 95.49 |

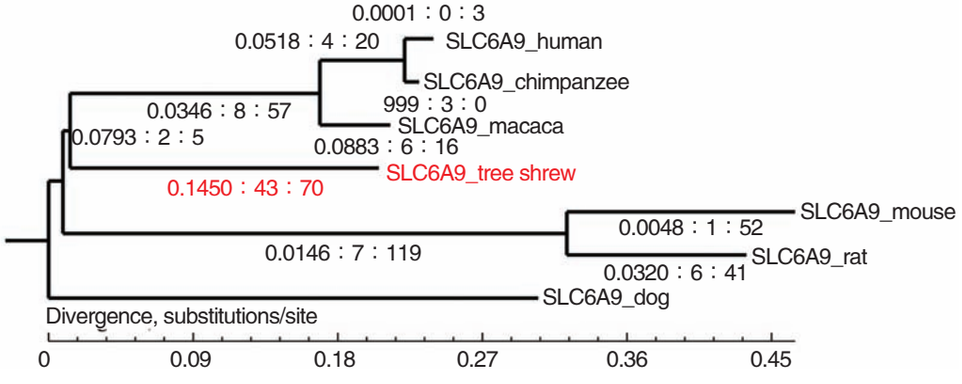



**图3–8　*SLC6A9*基因在树鼩分支发生了快速进化，支长为dS（synonymous substitution rate）比例，分支上的数字表示dN/dS：N：S**

## （二）老年痴呆症相关基因

阿尔茨海默病（Alzheimer's disease, AD），即老年痴呆症，是一种进行性发展的致死性神经退行性疾病，目前尚无有效的治愈措施。AD的病理特征为脑内含有淀粉样斑块、神经纤维缠结和特异位置神经元和突触消失。临床表现为认知和记忆功能不断恶化，日常生活能力进行性减退，并有各种神经精神症状和行为障碍[39]。据估计至2050年，全球年龄大于80岁的老年人将达到3.7亿，其中50%的人将患上AD，这不仅给病人带来极大的痛苦和不便，也会引发很多社会问题[40]。随着人口老龄化的进程，AD患病人数和社会负担的不断增加，AD的研究将会成为热点领域之一。随着中国社会老龄化的进程，中国将会有数百万的AD患者，AD将会成为我国不可忽视的社会和卫生问题[41]。

正确有效的AD动物模型能够全面展现该病的病理发展过程及其对应的临床表征[42]。不过现有的啮齿类AD动物模型存在较多的缺陷和不足。由于树鼩是灵长类动物的近亲，用于AD动物模型创建有较大潜力。近年来也有不少研究，对树鼩是否能作为理想和有效的AD模型进行探讨[43]。

对于AD的发病机制有很多假说，其中比较经典的说法是β–淀粉样蛋白前体蛋白（amyloid β-protein precursor, APP）偏离正常生理途径，错误降解成β–淀粉样蛋白（amyloid β–protein, Aβ）及Tau的高度磷酸化[44, 45]。我们对树鼩的经典AD病理通路的6个基因进行了比较分析研究，发现树鼩序列除*MAPT*外都很保守，与人的一致性很高（表3–12），用6个基因联合构建的系统发育树显示，树鼩的这条通路整体进化关系与灵长类最为密切（图3–9），这进一步提示我们可以利用树鼩来建立AD动物模型。进一步检测KEGG中AD通路的基因，发现大部分基因在树鼩中都高度保守，其中6个基因可能发生了快速进化，分别是*MME*、*ATP5O*、*TNF*、*NDUFA1*、*NDUFA7*和*NDUFB4*，可能使其产生独特的功能变化。这些基础数据无疑为树鼩AD模型的创建提供了遗传基础。

表3–12　树鼩、小鼠与人在AD经典病理通路中6个基因一致性比较

| 基因名 | 树鼩与人一致性（identity）% | 小鼠与人一致性（identity）% |
|---|---|---|
| *APP* | 97.52 | 97.66 |
| *BACE1* | 97.60 | 96.19 |
| *BACE2* | 92.34 | 89.65 |
| *PSEN1* | 96.96 | 93.75 |
| *PSEN2* | 98.19 | 95.93 |
| *MAPT* | 76.23 | 73.00 |

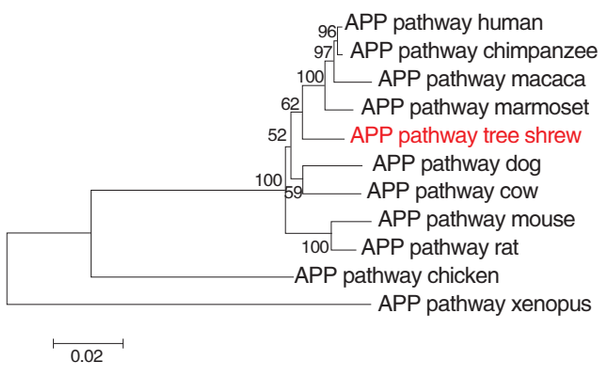



**图3–9　AD经典病理通路中6个基因联合构树结果**
通过TreeBest（http://treesoft.sourceforge.net/treebest.shtml）软件构建邻接（Neighbor–joining）树，可靠性通过1000次bootstrap重复估计，数字代表节点的支持率。

### （三）自闭症相关基因分析

自闭症（autism），又称自闭症或孤独性障碍（autistic disorder）等，是广泛性发育障碍（pervasive developmental disorder, PDD）的代表性疾病。孤独症的患病率报道不一，一般认为约为儿童人口总数的0.02%～0.05%，男女比例约为3∶1～4∶1，女孩症状一般较男孩严重[46]。目前，孤独症的病因还不完全清楚，但目前的研究表明，某些危险因素可能同孤独症的发病相关。引起孤独症的危险因素可以归纳为：遗传、感染与免疫和孕期理化因子刺激[47]。

为了更好地研究孤独症的发病机制与治疗手段，研究人员开发了大鼠等实验动物模型[48]。由于大鼠等啮齿类动物与人的亲缘关系比较远，自闭症发病机制、相关神经通路及药物靶点信息都与灵长类有一定差距，并不是研究自闭症的最佳模型。而猕猴等灵长类动物价格昂贵，实验周期长，同样不利于自闭症研究的快速展开。树鼩体形小，繁殖快，生殖周期短，饲养成本低，与灵长类的亲缘关系近，而且已经在精神类疾病模型中有很好的研究基础[37, 38]，可作为一个非常有前景的研究自闭症的候选实验动物。

Ras/ERK（extracellular signal-regulated kinase）信号通路是丝裂原活化蛋白激酶家族（mitogen-activated protein kinases, MAPKs）成员，对神经前体细胞的生成、神经脊的形成和发育、突触信号传递，以及意识、学习和记忆能力的形成有重要作用。此外Ras/ERK信号通路还参与介导神经细胞死亡。近年来，诸多研究证实Ras/ERK信号通路异常是数种智力发育异常综合征发病的原因[49]。我们针对这个通路中一些重要的基因进行了深入的研究（表3–13），发现这些基因在树鼩中除了TSC2（tuberous sclerosis 2，结节性脑硬化2）基因可能发生了快速进化外，其余都高度保守，与人的基因相比，平均遗传差异小于5%，这也提示了树鼩有望用于创建研究自闭症的新模型。

表3–13　树鼩与人的智力发育异常相关基因的蛋白一致性比较

| 基因名 | 疾　病 | 基因功能 | 树鼩与人一致性（identity）% |
|---|---|---|---|
| *FMR1* | 脆性X综合征（Fragile X syndrome） | 转译抑制因子（Translational repressor） | 97 |
| *TSC1* | 结节性硬化症（Tuberous sclerosis complex） | mTOR抑制剂 | 92 |
| *TSC2* | 结节性硬化症（Tuberous sclerosis complex） | mTOR抑制剂 | 86 |
| *PTEN* | 错构瘤肿瘤综合征（PTEN hamartoma syndrome）（ASD with macrocephaly） | PI3K/mTOR信号抑制剂 | 100 |
| *NF1* | 一型神经纤维瘤病（Neurofibromatosis type Ⅰ） | Ras GAP | 99 |
| *MECP2* | 特综合征（Rett's syndrome） | 转译抑制因子（Translational repressor） | 94 |
| *UBE3A* | 天使人综合征（Angelman's syndrome） | E3泛素连接酶（E3 ubiquitin ligase） | 97 |
| *CACNA1C* | 蒂莫西氏综合征（Timothy's syndrome） | L型电压门控钙通道（Cav1.2） | 93 |
| *NLGN3* | 家族性孤独症（Familial ASD） | 突触黏附（Synaptic adhesion） | 99 |
| *NLGN4* | 家族性孤独症（Familial ASD） | 突触黏附（Synaptic adhesion） | 98 |
| *NRXN1* | 家族性孤独症（Familial ASD） | 突触黏附（Synaptic adhesion） | 99 |
| *SHANK3* | 家族性孤独症（Familial ASD） | PSD支架（scaffolding） | 93 |

表中基因名录来源参见文献49。

### （四）视觉系统基因

与很多灵长类相似，树鼩拥有很好的视觉系统[3]，很适合眼科研究，尤其是近视[50]。为了提供更好的树鼩视觉系统遗传数据，我们分析了树鼩基因组中209个视觉系统相关基因。除了两个光感受器基因*OPN1MW*［opsin 1 (cone pigments), medium-wave-sensitive］和*OPN1MW2*［opsin 1 (cone pigments), medium-wave-sensitive 2］缺失，其余基因在树鼩中均存在且与人的基因序列一致性较高。*OPN1MW*和*OPN1MW2*都是中波长感光蛋白，决定物种是三元色还是二元色视觉的关键基因，一般只存在于高等灵长类[51]，树鼩的这一基因缺失正好说明其与低等灵长类一样，是一个二元色视觉物种。

另外，*RH1*（rod photoreceptor rhodopsin）基因在树鼩分支发生了快速进化（图3–10）。*RH1*是视网膜上视杆细胞（主导暗视觉，相对于视锥细胞的色视觉）暗视觉感受器基因，可以调节夜间视力，其快速进化可能与树鼩的昼行性相关。将树鼩与其它几个物种的RH1蛋白序列对齐，可以看到树鼩RH1蛋白上有一个特异的常染色体显性视网膜色素变性（autosomal dominant retinitis pigmentosa, ADRP）相关的突变P.45 F>C（图3–11）。ADRP是视网膜感光细胞和色素上皮细胞变性导致夜盲和进行性视野缺损的一类眼底遗传病，树鼩RH1蛋白P.45 F>C突变很可能引起相关功能的退化。

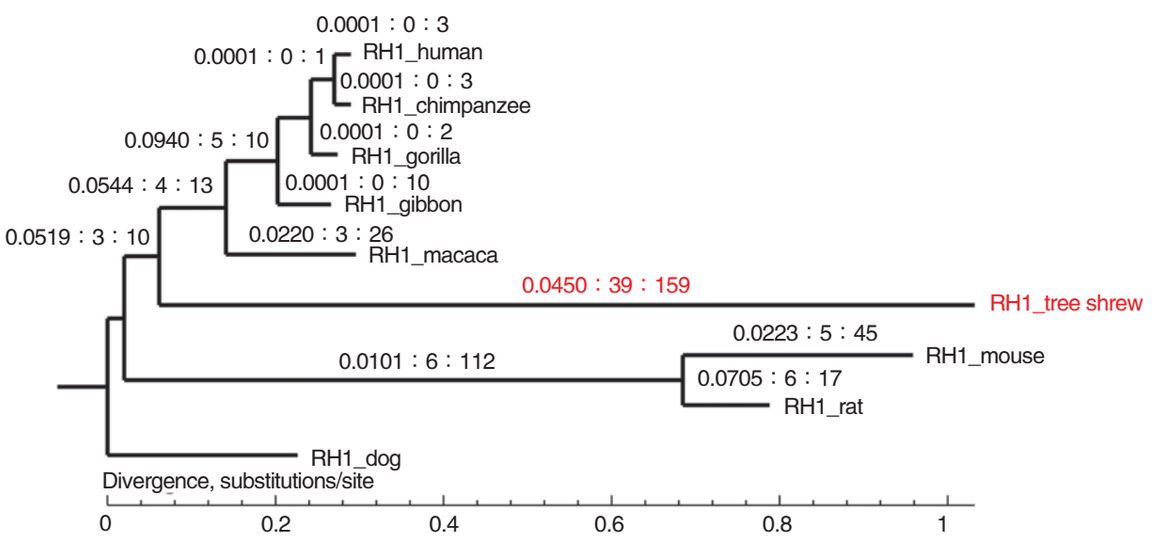



**图3–10　树鼩*RH1*基因发生了快速进化，支长为dS（synonymous substitution rate）比例，分支上的数字表示dN/dS : N : S**

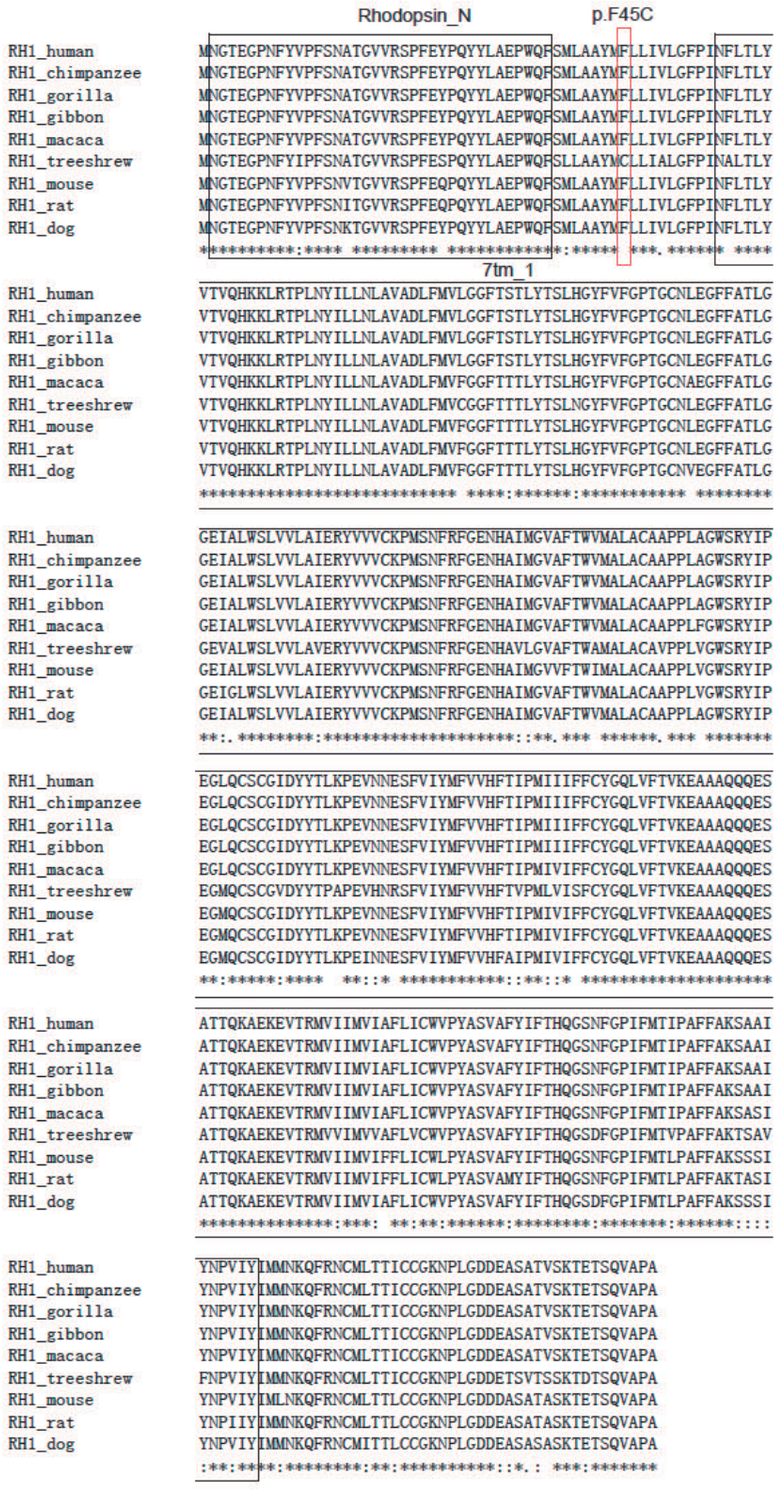



**图3–11　树鼩等9个物种RH1蛋白序列比较**

树鼩有一个特异的ADRP相关突变P.45 F>C。

## 五、树鼩的免疫系统基因

### （一）树鼩的MHC基因

主要组织相容性复合体（major histocompatibility complex, MHC），是存在于大部分脊椎动物基因组中的一个基因家族，在各种自身免疫疾病和感染性疾病的免疫应答和敏感性起到重要作用[52, 53]。人类的MHC命名人类白血球抗原（human leukocyte antigen, HLA）。编码HLA抗原的基因由多基因座组成，称为HLA基因复合体，位于第6对染色体短臂（6p21.3），共3400kb，目前在这个区域已发现237个功能基因。虽然不同个体、不同种属的MHC结构不同，但其编码的分子在化学结构、组织分布及功能上均十分相近，可以分成三类：即Ⅰ类分子、Ⅱ类分子和Ⅲ类分子；其编码基因也相应地分成三类。Ⅰ类和Ⅱ类分子是结构相似的细胞膜表面糖蛋白，除作为移植抗原外，还与抗原递呈及某些疾病相关。Ⅲ类分子包括c2、c4、b因子和肿瘤坏死因子等多种可溶性蛋白质，相互间差别很大，与Ⅰ类和Ⅱ类分子在结构和功能上相关性很小。

目前，在树鼩基因组已确定了220个MHC基因结构与序列，与人类相比，树鼩拥有相对保守的基因顺序和结构（图3–12）。其中，树鼩拥有4个MHC类型Ⅰ基因和一个MIC（MHC class Ⅰ-related chain），其中一个MHC类型Ⅰ基因位与人类*HLA-A*座位具有共线性关系。通过人、小鼠和树鼩MHC类型Ⅰ的基因树比较可以看出，树鼩MHC类型Ⅰ基因属于旁系独立扩张（图3–13）。

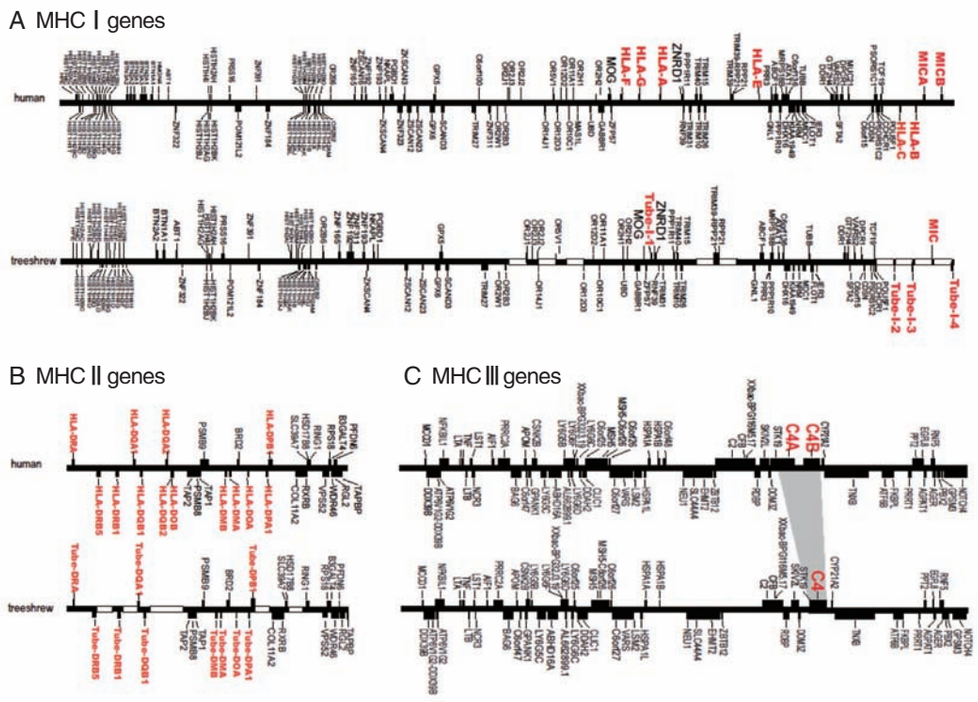



**图3–12　树鼩与人的MHC共线性关系**

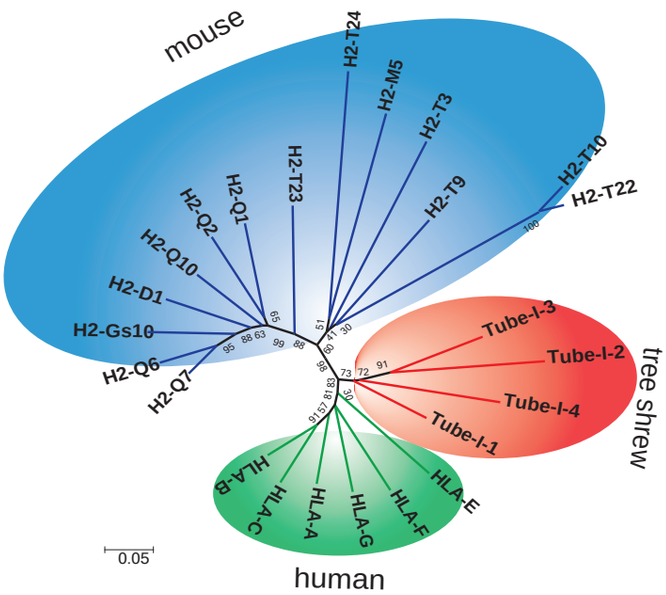



**图3–13　人、树鼩和小鼠的MHC类型Ⅰ基因树**

通过TreeBest（http://treesoft.sourceforge.net/treebest.shtml）软件构建邻接（Neighbor–joining）树，可靠性通过1000次bootstrap重复估计，数字代表节点的支持率。

树鼩基因组中可以找到13个MHC类型Ⅱ基因，包括典型的类型Ⅱ基因（*HLA-DP*、*HLA-DQ*、*HLA-DR*）和非典型类型Ⅱ基因（*HLA-DM*和*HLA-DO*），且与人的同源基因具有高度的一致性。树鼩*MHC*类型Ⅲ基因无论在基因数还是基因顺序上都是保守性最好的。唯一的区别是人与小鼠均有两个*C4*拷贝，而树鼩只有一个（图3–14）。

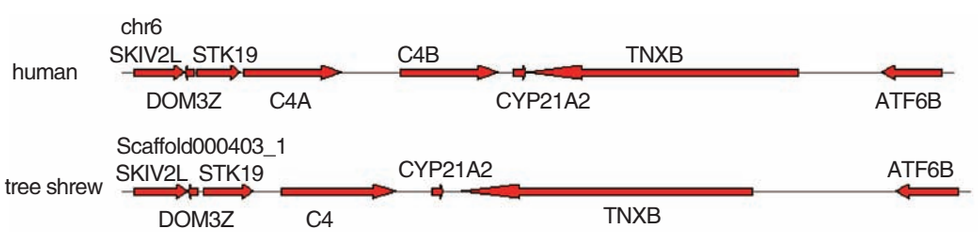



**图3–14　树鼩与人的*C4*基因共线性关系**

## （二）HBV与HCV感染相关基因

乙型肝炎病毒（hepatitis B virus，HBV）是一种DNA病毒，可以引起人类急、慢性肝炎的DNA病毒，简称HBV。全球每年大约600000人死于乙型肝炎病毒[54]，严重影响着人类的健康。另一感染性疾病丙型肝炎病毒（hepatitis C virus，HCV）也同样影响着人类的健康。很多报道显示，树鼩可以感染人的HBV[55～61]和HCV[62～67]，是研究病毒型肝炎和肝细胞癌（hepatocellular carcinoma，HCC）[58，67]的重要动物模型。

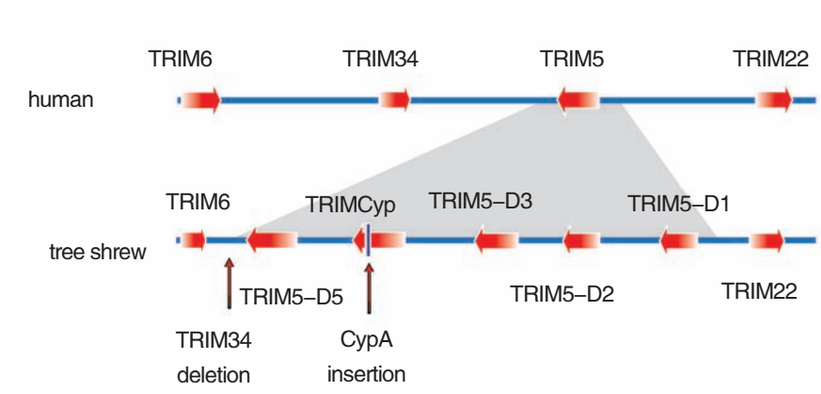



**图3–15　树鼩与人的TRIM基因簇共线性关系**

HBV是一个逆转录病毒，通过RNA的逆转录完成复制[68]。*TRIM*基因家族均具有抑制逆转录复制的作用，其中*TRIM22*被报道可以抑制HBV的活性[69]。而*TRIM5*作为一个抑制逆转录复制的宿主因子[70]，在树鼩基因组中拥有5个串联重复拷贝，其中4个有完整的开放阅读框架，树鼩的一个*TRIM5*拷贝存在一个CypA（亲环蛋白A）逆转录插入，形成TrimCyp嵌合体，这种现象仅发生在少数灵长类中[71, 72]，可能拥有重要作用。*TRIM6*、*TRIM34*、*TRIM22*与*TRIM5*均位于*TRIM*基因簇，均具有抑制逆转录复制的作用，而树鼩缺失了*TRIM34*这个基因，这也许可以通过*TRIM5*的扩张得到补偿（图3–15）。

树鼩的HCV感染通路中（图3–16），大多数基因与人的基因具有高度的一致性，只有视黄

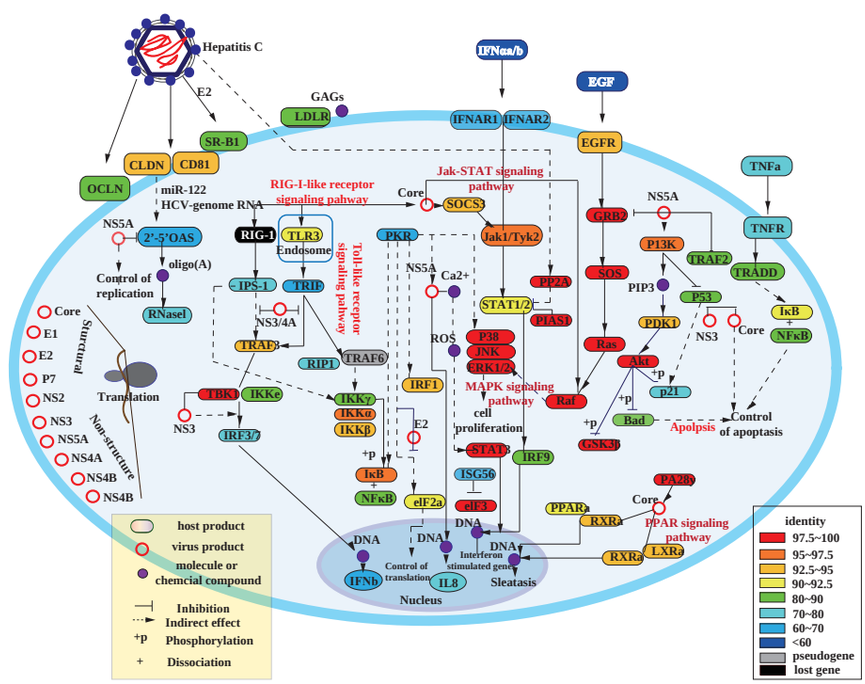



**图3–16　人和树鼩HCV感染途径相关基因的遗传差异**

酸（维甲酸）诱导基因蛋白Ⅰ（*RIG–Ⅰ*）基因缺失和肿瘤坏死因子受体相关因子6（human tumor necrosis factor receptor-associated factor 6, *TRAF6*）假基因化。其中，MAVS-NF-κB这一重要信号通路中拥有很低的遗传多样性，可能说明树鼩与灵长类在防疫肝炎病毒的系统中发生了趋同进化。DDX58是细胞内识别病毒双链RNA的一种受体，是MAVS信号通路引发转导级联反应的重要蛋白，调节干扰素的产生[73]。*TRAF6*是一个泛素连接酶（ubiquitin-ligase），当它被激活的时候，会在自身和其它蛋白上产生短小蛋白链。因此*TRAF6*作为一个开关，能够决定在细胞内开启何种信号，在HCV感染过程中可以激活NF-κB信号通道。*DDX58*基因的缺失和*TRAF6*假基因化可能中断HCV有效感染的免疫应答。目前，我们正针对这两个重要基因的缺失开展实验，试图阐明其缺失后功能替代机制和调控网络。

## 六、树鼩的代谢系统基因

### （一）酒精代谢相关基因

人类通常被认为是唯一能定期摄入酒精的动物，但是科学家发现马来西亚的羽尾树鼩（*Ptilocercus lowii*）依靠一种相当于啤酒的饮食生活，而且可能已经这样生活了长达5500万年之久。树鼩被认为与所有现存灵长类动物的最晚近共同祖先非常相似，这增加了人类对酒精的敏感可能是一种进化特征的可能性。马来西亚的羽尾树鼩以玻淡棕榈（bertam palm）花蕾的花蜜为食。它的花蜜发酵产生了多达3.8%的酒精。这种棕榈树终年以一种复杂的时间表产生花蜜，这看上去是为了让树鼩的授粉作用最大化。Frank Wiens及其同事摄像记录了树鼩常规的夜间进食时段，并跟踪了用无线电标记的树鼩的运动，从而估计它们的酒精摄入量。尽管按照人类的标准，一只树鼩在任何一个夜晚都有36%的酒醉的可能性，但科学家们没有观察到这种动物的任何酒醉的迹象。进一步对毛发的生物标记物的分析证实了这种动物的高酒精摄入量，这让提示树鼩非常可能拥有一种有效地降解酒精的生物化学路径[74]。

乙醇脱氢酶（alcohol dehydrogenase, ADH）大量存在于人和动物肝脏、植物及微生物细胞之中，是一种含锌金属酶，具有广泛的底物特异性。在人和哺乳动物体内，乙醇脱氢酶与乙醛脱氢酶（acetaldehyde dehydrogenase, ALDH）构成了乙醇脱氢酶系，参与体内乙醇代谢。*ALDH2*是酒精耐受性的关键基因，这个基因的突变可能造成酒精耐受性的显著变化[75]。

在树鼩的7个*ADH*基因家族成员中（表3–14和图3–17），与其它灵长类相比缺少了2个*ADH1*亚家族成员，而多了一个灵长类中不存在的*ADH6*基因，与小鼠相比多了一个*ADH5*基因，这个基因在小鼠中变成了假基因，并且少了一个*ADH6*亚家族成员。总体来说，树鼩的*ADH*基因家族分布介于小鼠与灵长类之间，与两者都有相似处，但又都有不同，这种特殊的分布情况可能意味着树鼩酒精代谢的特异性。进一步的遗传操作实验可望回答这个问题。另外，树鼩的*ALDH2*基因中存在许多

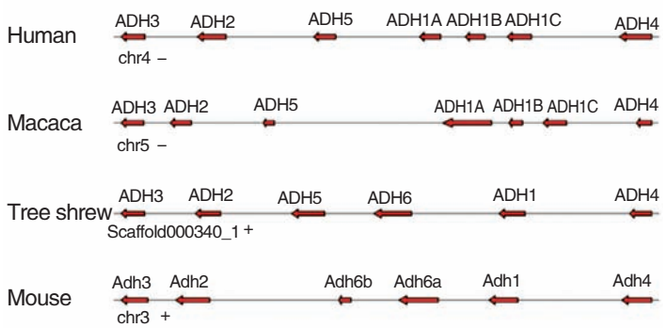



**图3–17 *ADH*基因家族在4种哺乳动物基因组中的共线性关系**

特异的变异位点（图3–18），也有可能与树鼩特异的酒精代谢系统相关。

表3–14　*ADH*和*ALDH*基因家族在4种哺乳动物中成员分布情况

| 基因家族 | 人（个） | 猕猴（个） | 树鼩（个） | 小鼠（个） |
|---|---|---|---|---|
| *ADH1* | 3 | 3 | 1 | 1 |
| *ADH2* | 1 | 1 | 1 | 1 |
| *ADH3* | 1 | 1 | 1 | 1 |
| *ADH4* | 1 | 1 | 1 | 1 |
| *ADH5* | 1 | 1 | 1 | 假基因 |
| *ADH6* | 缺失 | 缺失 | 1 | 2 |
| *ADHFE1* | 1 | 1 | 1 | 1 |
| *ALDH*家族 | 18 | 18 | 18 | 20 |

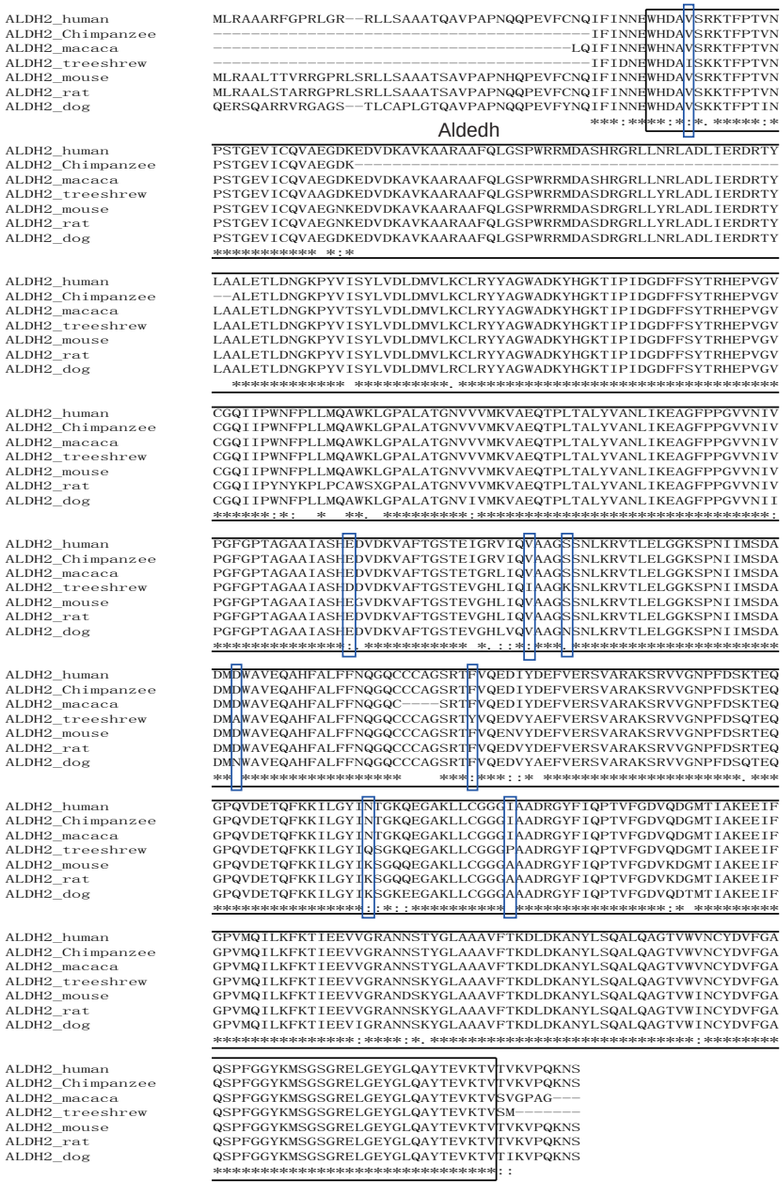



**图3–18　树鼩等7个物种的*ALDH2*蛋白序列对比**

其中框出来的氨基酸位点是树鼩特异的变异位点。

### （二）脂肪代谢相关基因

有研究表明，树鼩乳汁中的脂肪含量较高[76]，这也许跟树鼩一些特异的脂肪代谢与合成相关，因此我们对38个来自KEGG（京都基因与基因组百科全书）数据库[77]中脂类代谢与合成通路基因进行研究，其中发现3个在树鼩中可能发生快速进化的基因，分别是木糖醇脱氢酶基因（xylitol dehydrogenase, *XDH*），乙酰辅酶A羧化酶α基因（acetyl-CoA carboxylase alpha, *ACACA*）和脂肪酸合成酶基因（fatty acid synthase, *FASN*）。其中*XDH*是乳汁脂类分泌所必需的一个因子，乳腺细胞中的脂肪合成后，最初是储存于细胞内的脂滴中，这些脂滴通过*XDH*等多个蛋白的介导，从细胞中分泌进入乳汁[78]。ACACA和FASN都是脂肪酸合成的重要酶类，FASN是脂肪酸合成酶，负责乙酰CoA和丙二酸CoA合成一种长链软脂酸的所有催化步骤，*FASN*基因的表达直接影响脂肪酸合成酶的多寡，对控制动物体脂沉积具有重要意义，而且有研究表明*FASN*基因可以影响人乳[79]与牛乳脂肪率，特别是与牛乳中特有的丰富短链脂肪酸显著相关[80]。这几个基因的快速进化很可能与树鼩乳汁中的脂肪含量较高有关，具体有着怎样的联系还需要进一步的功能研究来证实。

### 七、树鼩运动系统相关基因

在野外生存的树鼩，为了四处觅食，躲避天敌，每天的运动量都很大，而且非常擅于跳跃，拥有比较发达的运动系统，所以我们想要了解究竟是哪些基因与树鼩这一特性相关。我们在人类生物学反应及信号通路数据库（reactome）[81]中寻找到55个有关肌肉收缩（muscle contraction）的基因，在树鼩基因组中进行研究，发现其中5个基因可能发生了快速进化。分别是：原肌球蛋白调节蛋白1（tropomodulin 1, *TMOD1*），是细肌丝中与肌动蛋白的结合蛋白[82]；肌球蛋白结合蛋白C2（myosin binding protein C, fast type, *MYBPC2*），可以调控心肌收缩力[83]；波形丝蛋白（vimentin, *VIM*），是一种很重要的中间丝蛋白，广泛表达于间叶组织，维持细胞的完整性，参与细胞的应激反应[84]；肌钙蛋白C2（troponin C type 2, *TNNC2*），钙离子结合蛋白多基因家族的成员，在肌肉收缩时起关键作用[85]；辅肌动蛋白2（actinin, alpha 2, *ACTN2*），是肌动蛋白结合蛋白家族，辅肌动蛋白家族一共有4个基因（*ACTN1*、*ACTN2*、*ACTN3*和*ACTN4*），其中*ACTN2*和*ACTN3*存在于骨骼肌细胞内，维持着肌纤维的有序排列并调节肌纤维的收缩，被认为与运动爆发力强弱有关[86]。这些基因大多与肌肉收缩和运动性能相关，其快速进化很可能使树鼩具有更好的跳跃性，从而适应野外生存环境。

## 第七节 树鼩药物靶点基因

药物靶点是指药物在体内的作用结合位点，包括基因位点、受体、酶、离子通道、核酸等生物大分子。现代新药研究与开发的关键首先是寻找、确定和制备药物筛选靶——分子药靶。迄今已发现作为治疗药物靶点的总数约500个，其中受体尤其是G–蛋白偶联的受体（GPCR）靶点占绝大多数，另还有酶、抗菌、抗病毒、抗寄生虫药的作用靶点[87]。合理化药物设计（rational drug design）可以依据生命科学研究中所揭示的包括酶、受体、离子通道、核酸等潜在的药物作用靶

位，或其内源性配体以及天然底物的化学结构特征来设计药物分子，以发现选择性作用于靶点的新药。

## 一、树鼩细胞色素P450（CYP）家族

细胞色素P450（cytochromeP450，CYP450）为一类亚铁血红素——硫醇盐蛋白的超家族，它参与内源性物质和包括药物、环境化合物在内的外源性物质的代谢。细胞色素P450是药物代谢、活化和相互作用的重要酶类，而且对细胞因子和体温调节都有重要影响[88]。

目前，树鼩基因组中发现了56个细胞色素P450基因，分列18个基因家族中，在人和小鼠的基因组中分别有57个和92个，其中*CYP2*家族在小鼠中发生明显扩张，而人与树鼩数目相似（表3–15）。树鼩细胞色素P450家族基因无论从数目还是同源性上均与人类相似，暗示了树鼩可以用于药物毒理分析。

表3–15　人、树鼩和小鼠的细胞色素P450个亚家族基因分布情况

| *CYP*基因家族 | 人数目 | 树鼩数目 | 小鼠数目 |
|---|---|---|---|
| *CYP1* | 3 | 3 | 3 |
| *CYP2* | 16 | 20 | 46 |
| *CYP3* | 4 | 1 | 9 |
| *CYP4* | 12 | 10 | 12 |
| *CYP5* | 1 | 1 | 1 |
| *CYP7* | 2 | 2 | 2 |
| *CYP8* | 2 | 2 | 2 |
| *CYP11* | 3 | 3 | 3 |
| *CYP17* | 1 | 1 | 1 |
| *CYP19* | 1 | 1 | 1 |
| *CYP20* | 1 | 1 | 1 |
| *CYP21* | 1 | 1 | 2 |
| *CYP24* | 1 | 1 | 1 |
| *CYP26* | 3 | 3 | 3 |
| *CYP27* | 3 | 3 | 2 |
| *CYP39* | 1 | 1 | 1 |
| *CYP46* | 1 | 1 | 1 |
| *CYP51* | 1 | 1 | 1 |
| 总数 | 57 | 56 | 92 |

## 二、树鼩肝炎药靶基因

从关于病毒性肝炎的介绍中，我们可以了解到病毒性肝炎严重危害着人类的健康，对于病毒性肝炎的预防与治疗同样也相当重要，因此我们需要筛选和研究更多抗肝炎药物。树鼩可以感染人的HBV和HCV[62~67]，是研究抗肝炎药物的优秀候选模型。

首先，我们开展了树鼩肝炎药物靶点基因的研究，进而了解树鼩进行抗肝炎药物筛选是否具有遗传合理性。在DrugBank[89]中检索到42个肝炎药物靶点基因，比如HCV蛋白酶抑制剂博赛泼维（Boceprevir）的靶点基因MAVS（mitochondrial antiviral signaling protein），可以抑制HBV复制的阿德福韦酯（adefovir dipivoxil）靶点基因P蛋白、AK2（adenylate kinase 2）等。我们对树鼩的这

些基因进行研究后发现，这些基因均具有高度保守性，与人的同源基因相比平均遗传多样性仅为5%，相比小鼠等常用实验动物更具有遗传方面的优势。但是，我们也发现树鼩神经肽S受体1基因（neuropeptide S receptor 1, *NPSR1*）缺失了药靶结构域（domain）7tm–1（图3–19）。*NPSR1*是氟烷（halothane）药物的靶点基因，在肝炎治疗中主要起到麻醉镇痛的作用，其药靶结构域可能影响了药物的作用。其余靶点基因均有完整的药靶结构域。这些基础性遗传数据对于指导利用树鼩是开展相关的抗肝炎药物筛选具有重要的参考意义。

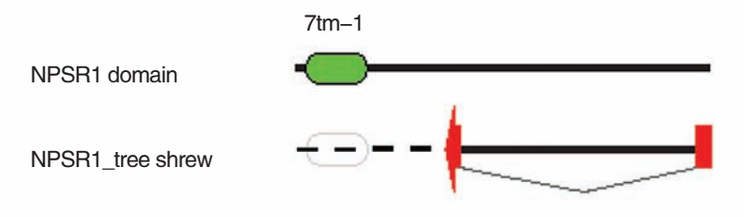



**图3–19　树鼩*NPSR1*缺失了7tm–1结构域**

## 第八节　树鼩转录组学研究

转录组（transcriptome）广义上指某一生理条件下，细胞内所有转录产物的集合，包括信使RNA、核糖体RNA、转运RNA及非编码RNA；狭义上指所有mRNA的集合。蛋白质是行使细胞功能的主要承担者，蛋白质组是细胞功能和状态的最直接描述，转录组成为研究基因表达的主要手段，转录组是连接基因组遗传信息与生物功能的蛋白质组的必然纽带，转录水平的调控是目前研究最多的，也是生物体最重要的调控方式。

转录组测序的研究对象为特定细胞或组织在某一功能状态下所能转录出来的所有RNA的总和，主要包括mRNA和非编码RNA。转录组研究是基因功能及结构研究的基础和出发点，通过新一代高通量测序，能够全面快速地获得某一物种特定组织或器官在某一状态下的几乎所有转录本序列信息，已广泛应用于基础研究、临床诊断和药物研发等领域。

### 一、树鼩转录组测序

为了更好地了解树鼩一些组织或器官的基因转录和表达信息，我们利用二代测序完成了中缅树鼩7个组织的转录组测序工作，共得到81.8Gb的数据量，909.3M条reads，其中54.7%可以比对到树鼩基因组中（表3–16），可以覆盖到全基因组12%的区域。这些数据通过进一步的分析和基因组关联分析，可为之后研究树鼩及建立重要的实验动物模型提供至关重要的信息。

表3–16　转录组测序数据

| 样品 | Read长度/bp | 插入片段大小/bp | 原始数据量/Mb | 过滤后数据量/Mb | Read数目/Mb | 比对到基因组的Read数/Mb |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 肾 | 90_90 | 204 | 12898.71 | 12296.72 | 136.6 | 67 |
| 胰腺 | 90_90 | 195 | 12135.19 | 11339.24 | 126 | 64.2 |
| 心 | 90_90 | 201 | 9652.02 | 9198.58 | 102.2 | 34.2 |
| 肝 | 90_90 | 189 | 12920.52 | 12509.34 | 138 | 74.4 |

续表3–16

| 样品 | Read长度/bp | 插入片段大小/bp | 原始数据量/Mb | 过滤后数据量/Mb | Read数目/Mb | 比对到基因组的Read数/Mb |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 脑 | 90_90 | 196 | 12435.88 | 12044.31 | 133.8 | 77.2 |
| 睾丸 | 90_90 | 195 | 12985.29 | 12514.11 | 139 | 87.4 |
| 子宫 | 90_90 | 207 | 12491.37 | 11934.96 | 132.6 | 92.8 |

## 二、树鼩基因表达信息

转录组测序的重要应用就是可以直接获得基因的表达信息。基因表达量的计算一般使用的是RPKM法（reads per kb per million reads）[90]，其计算公式为：

$$RPKM=\frac{10^6 C}{NL/10^3}$$

其中*RPKM*为基因的表达量，则*C*为唯一比对到该基因的reads数，*N*为唯一比对到基因组的总reads数，*L*为该基因编码区的碱基数。RPKM法能消除基因长度和测序量差异对计算基因表达的影响，计算得到的基因表达量可直接用于比较不同样品间的基因表达差异。

树鼩的基因集利用RPKM法检测了各个组织的表达信息，其中有19949个基因检测到了表达，占总基因数的90%。基于各组织的*RPKM*值，进一步对树鼩的各组织进行了主成分分析（principal component analysis, PCA），获得了各组织的表达模式差异（图3–20），并且参照Audic S.等人的差异基因检测方法[91]，得到了树鼩的两两组织间的差异表达基因（图3–21）。所有差异表达基因都加以GO（Gene Ontology）功能注释和KEGG通路注释，并进行GO功能和KEGG通路富集分析，这样可以更具体的看到各组织间的在生物学功能、生化代谢途径和信号转导途径上的表达模式差异。在每个组织中均有3000多个GO功能条目（term）显著富集和250个左右的KEGG通路（pathway）显著富集，比如肝组织中有很多药物代谢和一些免疫方面基因高表达，而在脑组织中很多表达量高的基因显著富集在一些阿尔茨海默症、帕金森氏病等神经性退行疾病。这些数据都为后期树鼩用于相关动物模型的建立提供了重要遗传依据。下一步针对特定树鼩疾病模型动物开展转录组分析，并与正常动物进行比较分析，将有望揭示更多的疾病发生发展过程中基因表达谱变化情况。

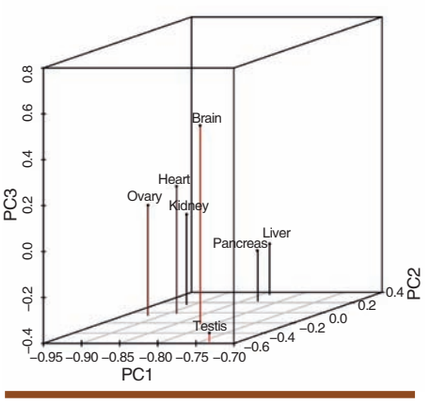



图3–20　树鼩7个组织主成分分析

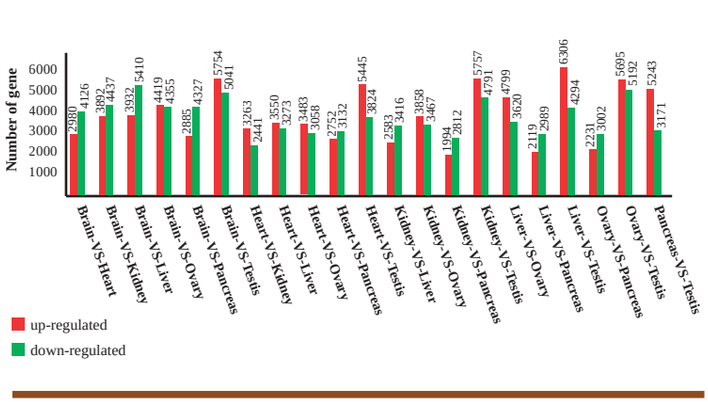



图3–21　树鼩7个组织的差异表达基因统计

## 第九节 树鼩基因组数据库的开发

随着各种大规模、高通量实验技术的不断发展与应用，基因组测序已经成为新时代生命科学研究的基本手段，越来越多物种的基因组信息逐一被解读，海量的生物学数据正源源不断地从世界各地的生物学实验室、研究所以及公司等机构产生出来。复杂而多层次的生物学数据和信息的产出量已经达到年均PB（petabyte，相当于1024个terabyte）的量级，并且还在超指数增长。传统的研究方式已经来不及迅速消化这些新数据，有必要采用有效的方法对这些海量数据进行管理和维护更新，以便进一步处理、分析和利用，这就需要建立数据库——生物信息学数据库。

目前，已有大量的公共数据库系统可供世界范围内的研究者使用，提供数据登录和查询等多项功能，但是在针对特定物种的生物信息学分类和分析方面仍然有待进一步开发，并且这些公共数据库在内容、数据综合和检索途径上不能完全满足实际研究的需要。因此建立二级数据库已经成为一个研究热点。二级数据库（secondary database）是根据研究任务的需要，通过搜索、查询已知数据库的信息，进行加工、整理和系统化，构建成专用的数据库。现在一些专业数据库正在科学交流中发挥重要作用，如拟南芥信息资源TAIR（The Arabidopsis Information Resource）[92]、水稻基因组序列数据库RGP（Rice Genome Research Program）[93]、家蚕基因组数据库SilkDB（Silkworm Genome Database）[94]、猕猴数据库RhesusBase[95]等。这些物种基因组数据库的搭建为许多非生物信息工作人员提供了方便，大大地推动了这些物种的研究进展。

树鼩基因组草图已经完成，为研究人员提供了大量的基础数据，更多关于树鼩基因功能、药物靶点、医学模型等研究正在如火如荼地进行中。然而，普通研究人员难以高效地利用这海量的树鼩基因组数据，这阻碍了很多研究的进程。如何让研究者能方便地访问到树鼩基因组的数据资源，获得对树鼩基因功能研究有用的信息或线索，是目前迫切需要解决的问题。我们正在整合树鼩基因组相关数据，构建一个信息含量丰富、使用方便、分析工具齐全的树鼩基因组数据库，使得非生物信息学专业的人员能更好地了解和利用树鼩基因组学数据。

针对研究实际需求，我们的树鼩基因组数据设计了3个功能模块组成：检索模块、数据分析模块、数据传送模块。在检索模块中，我们提供了“一站式”检索功能，这里用户可以浏览到所有的基因信息，包括基因名、基因的位置、基因的序列和对应的蛋白质序列、同源基因、基因的功能注释、基因的表达信息等，而且链接到相应的数据库，可以获取进一步的信息。在数据分析模块，我们提供了一些基本的分析工具，有常规分析用得比较多程序，比如Blast[96]、Muscle[97]、PAML[98]、GeneWise[99]等，也有自主编写的一些小程序，如序列提取软件（ExtractSeq）和基于PAML编写的正选择分析流程（positive selection analysis pipeline, PASP）等。在数据传送模块，用户可以下载想要的树鼩基因组数据，也可以下载分析结果或将结果传送到用户的电子邮箱中。目前，树鼩基因组数据库（www.treeshrewdb.org）已经对外开放并优化测试中，相信这个数据库发布后将十分方便科研人员获取树鼩基因组数据，为树鼩生物学研究提供一个有利的平台。

## 第十节 展 望

树鼩基因组测序完成为我们从基因水平认识树鼩的生命本质提供了基本的遗传资料，为正在进行的树鼩功能基因组学研究，揭示每个基因在生命活动中的具体功能提供了一个全景范围内的资料。通过对树鼩基因组的解析，我们一方面可以更好地理解树鼩的遗传特性，同时也对树鼩作为一个非常有前景的新型实验动物的应用能提供更多的启示。

目前，中国科学院昆明动物所的团队正在致力于树鼩各种疾病模型的创建，树鼩基因组信息对这些工作无疑具有很好的指导意义。未来我们将对各种树鼩疾病模型开展深入研究，对相关疾病组织进行深度转录组测序，寻找在疾病组织与正常组织的表达模式的差异，更好地了解发病机理。另外，我们的团队正在开展树鼩近交系繁殖和选育工作。在不久的将来，我们会挑选一些培育的品系个体开展基因组重测序工作，比较不同品系种群内的个体遗传差异，评估近交系遗传背景的稳定性、一致性，为树鼩品系创制与推广工作做出更多的贡献。

【致谢】树鼩基因组测定工作得到中国科学院动物模型与人类疾病机理重点实验室各位研究人员的技术和智力支持，原文发表于*Nature Communications*（2013；2013，4：1426），入选本书时若干重叠内容有更新和拓展。

### 参考文献

[1]徐林，张云，梁斌，等．实验动物树鼩和人类疾病的树鼩模型研究概述．动物学研究，2013，34（2）：59–69.

[2]Cao J, Yang EB, Su JJ, et al. The tree shrews: adjuncts and alternatives to primates as models for biomedical research. J Med Primatol, 2003, 32(3): 123-30.

[3]Robert Hubrecht, James Kirkwood. The UFAW hanbook on the care and management of laboratory and other research animals (8th). Chicester: John Wiley and Sons Ltd, 2010: 262-75.

[4]彭燕章，叶智彰，邹如金，等．树鼩生物学．昆明：云南科技出版社，1991.

[5]Adkins RM, Honeycutt RL. Molecular phylogeny of the superorder Archonta. Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 88(22): 10317-21.

[6]Schmitz J, Ohme M, Zischler H. The complete mitochondrial genome of *Tupaia belangeri* and the phylogenetic affiliation of scandentia to other eutherian orders. Mol Biol Evol, 2000, 17(9): 1334-43.

[7]Arnason U, Gullberg A, Janke A. The mitochondrial DNA molecule of the aardvark, Orycteropus afer, and the position of the Tubulidentata in the eutherian tree. Proc Biol Sci, 1999, 266(1417): 339-45.

[8]Xu L, Chen SY, Nie WH, et al. Evaluating the phylogenetic position of Chinese tree shrew (*Tupaia belangeri chinensis*) based on complete mitochondrial genome: implication for using tree shrew as an alternative experimental animal to primates in biomedical research. J Genet Genomics, 2012, 39(3): 131-7.

[9]Janecka JE, Miller W, Pringle TH, et al. Molecular and genomic data identify the closest living relative of primates. Science, 2007, 318(5851): 792-4.

[10]Killian JK, Buckley TR, Stewart N, et al. Marsupials and Eutherians reunited: genetic evidence for the Theria hypothesis of mammalian evolution. Mamm Genome, 2001, 12(7): 513-7.

[11]Porter CA, Goodman M, Stanhope MJ. Evidence on mammalian phylogeny from sequences of exon 28 of the von

Willebrand factor gene. Mol Phylogenet Evol, 1996, 5(1): 89-101.
[12]Allard MW, McNiff BE, Miyamoto MM. Support for interordinal eutherian relationships with an emphasis on primates and their Archontan relatives. Mol Phylogenet Evol, 1996, 5(1): 78-88.
[13]Lander ES, Linton LM, Birren B, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. Nature, 2001, 409(6822): 860-921.
[14]Venter JC, Adams MD, Myers EW, et al. The sequence of the human genome. Science, 2001, 291(5507): 1304-51.
[15]Lander ES. Initial impact of the sequencing of the human genome. Nature, 2011, 470(7333): 187-97.
[16]Genome KCoS. Genome 10K: a proposal to obtain whole–genome sequence for 10000 vertebrate species. J Hered, 2009, 100(6): 659-74.
[17]Fan Y, Huang ZY, Cao CC, et al. Genome of the Chinese tree shrew. Nat Commun, 2013, 4: 1426.
[18]Li R, Zhu H, Ruan J, et al. De novo assembly of human genomes with massively parallel short read sequencing. Genome Res, 2010, 20(2): 265-72.
[19]Deininger PL, Batzer MA. Alu repeats and human disease. Mol Genet Metab, 1999, 67(3): 183-93.
[20]Nishihara H, Terai Y, Okada N. Characterization of novel Alu- and tRNA-related SINEs from the tree shrew and evolutionary implications of their origins. Mol Biol Evol, 2002, 19(11): 1964-72.
[21]Esteller M. Non-coding RNAs in human disease. Nat Rev Genet, 2011, 12(12): 861-74.
[22]Nei M, Niimura Y, Nozawa M. The evolution of animal chemosensory receptor gene repertoires: roles of chance and necessity. Nat Rev Genet, 2008, 9(12): 951-63.
[23]Li H, Coghlan A, Ruan J, et al. TreeFam: a curated database of phylogenetic trees of animal gene families. Nucleic Acids Res, 2006, 34(Database issue): D572-80.
[24]Hahn MW, De Bie T, Stajich JE, et al. Estimating the tempo and mode of gene family evolution from comparative genomic data. Genome Res, 2005, 15(8): 1153-60.
[25]Poliseno L, Salmena L, Zhang J, et al. A coding-independent function of gene and pseudogene mRNAs regulates tumour biology. Nature, 2010, 465(7301): 1033-8.
[26]Thiboutot D, Sivarajah A, Gilliland K, et al. The melanocortin 5 receptor is expressed in human sebaceous glands and rat preputial cells. J Invest Dermatol, 2000, 115(4): 614-9.
[27]An JJ, Rhee Y, Kim SH, et al. Peripheral effect of alpha-melanocyte-stimulating hormone on fatty acid oxidation in skeletal muscle. J Biol Chem, 2007, 282(5): 2862-70.
[28]Brillard-Bourdet M, Rehault S, Juliano L, et al. Amidolytic activity of prostatic acid phosphatase on human semenogelins and semenogelin-derived synthetic substrates. Eur J Biochem, 2002, 269(1): 390-5.
[29]Balk SP, Ko YJ, Bubley GJ. Biology of prostate-specific antigen. J Clin Oncol, 2003, 21(2): 383-91.
[30]Bathgate RA, Ivell R, Sanborn BM, et al. International Union of Pharmacology LVII: recommendations for the nomenclature of receptors for relaxin family peptides. Pharmacol Rev, 2006, 58(1): 7-31.
[31]Munshi-South J, Emmons LH, Bernard H. Behavioral monogamy and fruit availability in the large treeshrew (*Tupaia tana*) in Sabah, Malaysia. J Mammal, 2007, 88(6): 1427-38.
[32]Eagle RA, Trowsdale J. Promiscuity and the single receptor: NKG2D. Nat Rev Immunol, 2007, 7(9): 737-44.
[33]Cerwenka A, Bakker AB, McClanahan T, et al. Retinoic acid early inducible genes define a ligand family for the activating NKG2D receptor in mice. Immunity, 2000, 12(6): 721-7.
[34]Steinle A, Groh V, Spies T. Diversification, expression, and gamma delta T cell recognition of evolutionarily distant members of the MIC family of major histocompatibility complex class I-related molecules. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95(21): 12510-5.
[35]Sheehy AM, Gaddis NC, Malim MH. The antiretroviral enzyme APOBEC3G is degraded by the proteasome in response to HIV-1 Vif. Nat Med, 2003, 9(11): 1404-7.
[36]Harris RS, Liddament MT. Retroviral restriction by APOBEC proteins. Nat Rev Immunol, 2004, 4(11): 868-77.
[37]Meyer U, Van Kampen M, Isovich E, et al. Chronic psychosocial stress regulates the expression of both GR and MR mRNA in the hippocampal formation of tree shrews. Hippocampus, 2001, 11(3): 329-36.

[38]Fuchs E, Flugge G. Social stress in tree shrews: effects on physiology, brain function, and behavior of subordinate individuals. Pharmacol Biochem Behav, 2002, 73(1): 247-58.

[39]Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. Science, 2002, 297(5580): 353-6.

[40]Suh YH, Checler F. Amyloid precursor protein, presenilins, and alpha-synuclein: molecular pathogenesis and pharmacological applications in Alzheimer's disease. Pharmacol Rev, 2002, 54(3): 469-525.

[41]洪震．我国近年阿尔茨海默病流行病学研究现状与展望．老年医学与保健，2005，11（4）：195–8.

[42]Epis R, Gardoni F, Marcello E, et al. Searching for new animal models of Alzheimer's disease. Eur J Pharmacol, 2010, 626(1): 57-63.

[43]Pawlik M, Fuchs E, Walker LC, et al. Primate-like amyloid-beta sequence but no cerebral amyloidosis in aged tree shrews. Neurobiol Aging, 1999, 20(1): 47-51.

[44]Kim D, Tsai LH. Bridging physiology and pathology in AD. Cell, 2009, 137(6): 997-1000.

[45]Ballatore C, Lee VM, Trojanowski JQ. Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders. Nat Rev Neurosci, 2007, 8(9): 663-72.

[46]Wingate M, Mulvihill B, Kirby RS, et al. Prevalence of autism spectrum disorders—Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 14 sites, United States, 2008. MMWR Surveill Summ, 2012, 61(3): 1-19.

[47]Persico AM, Bourgeron T. Searching for ways out of the autism maze: genetic, epigenetic and environmental clues. Trends Neurosci, 2006, 29(7): 349-58.

[48]Markram K, Rinaldi T, La Mendola D, et al. Abnormal fear conditioning and amygdala processing in an animal model of autism. Neuropsychopharmacology, 2008, 33(4): 901-12.

[49]Kelleher RJ 3rd, Bear MF. The autistic neuron: troubled translation? Cell, 2008, 135(3): 401-6.

[50]McBrien NA, Norton TT. Prevention of collagen crosslinking increases form-deprivation myopia in tree shrew. Exp Eye Res, 1994, 59(4): 475-86.

[51]Dulai KS, Von Dornum M, Mollon JD, et al. The evolution of trichromatic color vision by opsin gene duplication in New World and Old World primates. Genome Res, 1999, 9(7): 629-38.

[52]Benacerraf B. Genetic regulation of the interaction of immunocompetent cells. Nihon Ketsueki Gakkai Zasshi, 1981, 44(7): 1256-62.

[53]Fernando MM, Stevens CR, Walsh EC, et al. Defining the role of the MHC in autoimmunity: a review and pooled analysis. PLoS Genet, 2008, 4(4): e1000024.

[54]World Health Organization (who. int). Hepatitis B Key Facts. Fact sheet No. 204 Revised August 2008. [updated July 2012] Available from http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/.

[55]Walter E, Keist R, Niederost B, et al. Hepatitis B virus infection of *Tupaia* hepatocytes in vitro and in vivo. Hepatology, 1996, 24(1): 1-5.

[56]苏建家，严瑞琪，甘友全．成年树鼩实验感染乙型肝炎病毒的研究．中华病理学杂志，1987，16（2）：103–5.

[57]Yan RQ, Su JJ, Huang DR, et al. Human hepatitis B virus and hepatocellular carcinoma. Ⅰ. Experimental infection of tree shrews with hepatitis B virus. J Cancer Res Clin Oncol, 1996, 122(5): 283-8.

[58]Yan RQ, Su JJ, Huang DR, et al. Human hepatitis B virus and hepatocellular carcinoma. Ⅱ. Experimental induction of hepatocellular carcinoma in tree shrews exposed to hepatitis B virus and aflatoxin B1. J Cancer Res Clin Oncol, 1996, 122(5): 289-95.

[59]Kock J, Nassal M, MacNelly S, et al. Efficient infection of primary *Tupaia* hepatocytes with purified human and woolly monkey hepatitis B virus. J Virol, 2001, 75(11): 5084-9.

[60]Dandri M, Burda MR, Zuckerman DM, et al. Chronic infection with hepatitis B viruses and antiviral drug evaluation in uPA mice after liver repopulation with *Tupaia* hepatocytes. J Hepatol, 2005, 42(1): 54-60.

[61]Yan H, Zhong G, Xu G, et al. Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus. Elife, 2012, 1: e00049.

[62]Xie ZC, Riezu-Boj JI, Lasarte JJ, et al. Transmission of hepatitis C virus infection to tree shrews. Virology, 1998,

244(2): 513-20.

[63]Zhao X, Tang ZY, Klumpp B, et al. Primary hepatocytes of *Tupaia belangeri* as a potential model for hepatitis C virus infection. J Clin Invest, 2002, 109(2): 221-32.

[64]Guitart A, Riezu-Boj JI, Elizalde E, et al. Hepatitis C virus infection of primary *Tupaia* hepatocytes leads to selection of quasispecies variants, induction of interferon-stimulated genes and NF-kappaB nuclear translocation. J Gen Virol, 2005, 86(Pt 11): 3065-74.

[65]Barth H, Cerino R, Arcuri M, et al. Scavenger receptor class B type Ⅰ and hepatitis C virus infection of primary *Tupaia* hepatocytes. J Virol, 2005, 79(9): 5774-85.

[66]Xu X, Chen H, Cao X, et al. Efficient infection of tree shrew (*Tupaia belangeri*) with hepatitis C virus grown in cell culture or from patient plasma. J Gen Virol, 2007, 88(Pt 9): 2504-12.

[67]Amako Y, Tsukiyama-Kohara K, Katsume A, et al. Pathogenesis of hepatitis C virus infection in *Tupaia belangeri*. J Virol, 2010, 84(1): 303-11.

[68]Miller RH, Robinson WS. Common evolutionary origin of hepatitis B virus and retroviruses. Proc Natl Acad Sci USA, 1986, 83(8): 2531-5.

[69]Gao B, Duan Z, Xu W, et al. Tripartite motif-containing 22 inhibits the activity of hepatitis B virus core promoter, which is dependent on nuclear-located RING domain. Hepatology, 2009, 50(2): 424-33.

[70]Sebastian S, Luban J. TRIM5alpha selectively binds a restriction-sensitive retroviral capsid. Retrovirology, 2005, 2: 40.

[71]Ribeiro IP, Menezes AN, Moreira MA, et al. Evolution of cyclophilin A and TRIMCyp retrotransposition in New World primates. J Virol, 2005, 79(23): 14998-5003.

[72]Newman RM, Hall L, Kirmaier A, et al. Evolution of a TRIM5-CypA splice isoform in Old World monkeys. PLoS Pathog, 2008, 4(2): e1000003.

[73]Sumpter R Jr, Loo YM, Foy E, et al. Regulating intracellular antiviral defense and permissiveness to hepatitis C virus RNA replication through a cellular RNA helicase, RIG-I. J Virol, 2005, 79(5): 2689-99.

[74]Wiens F, Zitzmann A, Lachance MA, et al. Chronic intake of fermented floral nectar by wild treeshrews. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105(30): 10426-31.

[75]Chen CH, Budas GR, Churchill EN, et al. Activation of aldehyde dehydrogenase-2 reduces ischemic damage to the heart. Science, 2008, 321(5895): 1493-5.

[76]D' Souza F, Martin RD. Maternal behaviour and the effects of stress in tree shrews. Nature, 1974, 251(5473): 309-11.

[77]Kanehisa M, Goto S. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. Nucleic Acids Res, 2000, 28(1): 27-30.

[78]Wang W, Lv N, Zhang S, et al. Cidea is an essential transcriptional coactivator regulating mammary gland secretion of milk lipids. Nat Med, 2012, 18(2): 235-43.

[79]Maningat PD, Sen P, Rijnkels M, et al. Gene expression in the human mammary epithelium during lactation: the milk fat globule transcriptome. Physiol Genomics, 2009, 37(1): 12-22.

[80]Morris CA, Cullen NG, Glass BC, et al. Fatty acid synthase effects on bovine adipose fat and milk fat. Mamm Genome, 2007, 18(1): 64-74.

[81]Matthews L, Gopinath G, Gillespie M, et al. Reactome knowledgebase of human biological pathways and processes. Nucleic Acids Res, 2009, 37(Database issue): D619-22.

[82]Gokhin DS, Lewis RA, McKeown CR, et al. Tropomodulin isoforms regulate thin filament pointed-end capping and skeletal muscle physiology. J Cell Biol, 2010, 189(1): 95-109.

[83]Kooij V, Holewinski RJ, Murphy AM, et al. Characterization of the cardiac myosin binding protein-C phosphoproteome in healthy and failing human hearts. J Mol Cell Cardiol, 2013, 60: 116-20.

[84]Clarke EJ, Allan V. Intermediate filaments: vimentin moves in. Curr Biol, 2002, 12(17): R596-8.

[85]Bottinelli R, Reggiani C. Human skeletal muscle fibres: molecular and functional diversity. Prog Biophys Mol Biol, 2000, 73(2-4): 195-262.

[86]Yang N, MacArthur DG, Gulbin JP, et al. ACTN3 genotype is associated with human elite athletic performance. Am J Hum Genet, 2003, 73(3): 627-31.

[87]Jakobsson PJ, Thoren S, Morgenstern R, et al. Identification of human prostaglandin E synthase: a microsomal, glutathione-dependent, inducible enzyme, constituting a potential novel drug target. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96(13): 7220-5.

[88]Guengerich FP. Cytochrome p450 and chemical toxicology. Chem Res Toxicol, 2008, 21(1): 70-83.

[89]Knox C, Law V, Jewison T, et al. DrugBank 3.0: a comprehensive resource for 'omics' research on drugs. Nucleic Acids Res, 2011, 39(Database issue): D1035-41.

[90]Mortazavi A, Williams BA, McCue K, et al. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. Nat Methods, 2008, 5(7): 621-8.

[91]Audic S, Claverie JM. Detection of eukaryotic promoters using Markov transition matrices. Comput Chem, 1997, 21(4): 223-7.

[92]Huala E, Dickerman AW, Garcia-Hernandez M, et al. The Arabidopsis Information Resource (TAIR): a comprehensive database and web-based information retrieval, analysis, and visualization system for a model plant. Nucleic Acids Res, 2001, 29(1): 102-5.

[93]Lawrence CJ, Seigfried TE, Brendel V. The maize genetics and genomics database. The community resource for access to diverse maize data. Plant Physiol, 2005, 138(1): 55-8.

[94]Duan J, Li R, Cheng D, et al. SilkDB v2.0: a platform for silkworm (*Bombyx mori*) genome biology. Nucleic Acids Res, 2010, 38(Database issue): D453-6.

[95]Zhang SJ, Liu CJ, Shi M, et al. RhesusBase: a knowledgebase for the monkey research community. Nucleic Acids Res, 2013, 41(Database issue): D892-905.

[96]Kent WJ. BLAT—the BLAST-like alignment tool. Genome Res, 2002, 12(4): 656-64.

[97]Edgar RC. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. Nucleic Acids Res, 2004, 32(5): 1792-7.

[98]Yang Z. PAML 4: phylogenetic analysis by maximum likelihood. Mol Biol Evol, 2007, 24(8): 1586-91.

[99]Birney E, Clamp M, Durbin R. GeneWise and Genomewise. Genome Res, 2004, 14(5): 988-95.



# 第四章

第一篇树鼩基础生物学
TREE SHREW BASIC BIOLOGY

Tree shrews

# 树鼩主要组织相容性复合物（MHC）的研究

张喜鹤　郑永唐

## 第一节 前　言

主要组织相容性复合体（major histocompatibility complex, MHC）是一组紧密连锁的基因群，其编码的蛋白由于能够引起快速而强烈的排斥反应而称为主要组织相容性抗原（major histocompatibility antigen）。MHC由Zinkerna和Doherty在1974年首次发现[1]，Townsend等[2]在1982年证实了T淋巴细胞对病毒的识别是通过MHC分子结合短的病毒肽段并表达于细胞表面，而不是识别全长病毒分子。Bjorkman等[3]于1987年解析了MHC Ⅰ类分子的结构，发现MHC Ⅰ类分子是通过其表面沟槽结合抗原肽段，随后的研究阐明了多肽与MHC结合的基本特征。在随后的几十年中，MHC基因及其编码分子的结构、功能、遗传学特性和免疫学特性等被越来越多研究所阐明。现在我们知道MHC分子在天然免疫和固有免疫的调节和应答中都起十分重要的作用。对各种模式动物MHC的研究，促进了针对不同疾病动物模型的建立、各种疾病进程的研究、细菌及病毒特性的分析以及各种药物和疫苗的研发等。本章将结合我们的研究工作，介绍树鼩MHC的研究进展及树鼩MHC Ⅰ类和Ⅱ类基因及分子的特征。

## 第二节 MHC基因和分子的结构及功能

在高等哺乳动物中，根据编码分子的结构、功能和分布的不同，MHC可分为MHC Ⅰ类、Ⅱ类和Ⅲ类基因。MHC Ⅰ类和Ⅱ类基因编码蛋白的主要功能是递呈抗原：不同的MHC分子分别结合外源性或内源性的肽段而形成抗原肽–MHC复合物，并表达于细胞表面，将抗原肽递呈给T淋巴细胞，从而启动相应的免疫应答。MHC Ⅲ类分子为免疫相关分子，不直接参与抗原递呈。

## 一、MHC基因及分子结构

### （一）MHC Ⅰ类基因及分子结构

MHC Ⅰ类基因包含8个外显子，编码的蛋白称为MHC Ⅰ类分子，又称为α链或重链，相对分子质量为45000，是跨膜糖蛋白。结合了β2微球蛋白后的MHC Ⅰ类分子又称为MHC Ⅰ a类分子，在人体内指HLA-A、HLA-B和HLA-C这三种经典的MHC分子。根据在细胞上位置的不同，α链可分为3个区域：胞外区、跨膜区和胞内区。胞外区包含α1、α2和α3三个结构域，其中α1和α2结构域各有4个β折叠片和1个α螺旋参与形成抗原结合槽：β折叠片位于结合槽底部、α螺旋作为侧边形成的抗原肽结合槽位于MHC分子的顶部中央。MHC Ⅰ类分子可以通过结合槽识别并结合消化后的内源性小肽段，长度通常为8～13个氨基酸。α3结构域的主要功能是结合β2微球蛋白，稳定MHC分子（图4–1A）。β2微球蛋白不是由MHC基因群编码的分子，而是由其它染色体上的基因编码的可溶性蛋白，在MHC分子中称为轻链。α链和β2微球蛋白在内质网中相遇并结合，经过糖基化等修饰形成成熟MHC分子。β2微球蛋白并不直接参与抗原递呈，但是在维持MHC Ⅰ类分子的稳定性及细胞定位上起重要作用。研究表明，β2微球蛋白缺失时，MHC Ⅰ类分子不能表达于细胞表面[4, 5]。跨膜区穿过细胞膜的脂双层，起固定MHC Ⅰ类分子的作用。胞内区的主要功能是参与细胞信号的转导。除α1和α2结构域外，MHC Ⅰ类分子的其它区域都很保守。

MHC Ⅰ类分子分布极为广泛，几乎表达于所有有核细胞的表面，但在不同的组织细胞中表达量有显著差异：表达量最高的为外周血淋巴细胞、淋巴结、胸腺和脾脏等免疫细胞和器官；表达量较少的有神经细胞和滋养层细胞等[4]。MHC分子的表达随着微环境变化而表现出很大的差异：在有抗原肽或细胞因子如TNF-α和IFN-γ存在时，表达量会显著上升[5, 6]。

MHC Ⅰ b类分子包括由MHC基因编码的除经典MHC分子外的其它MHC分子以及其它基因

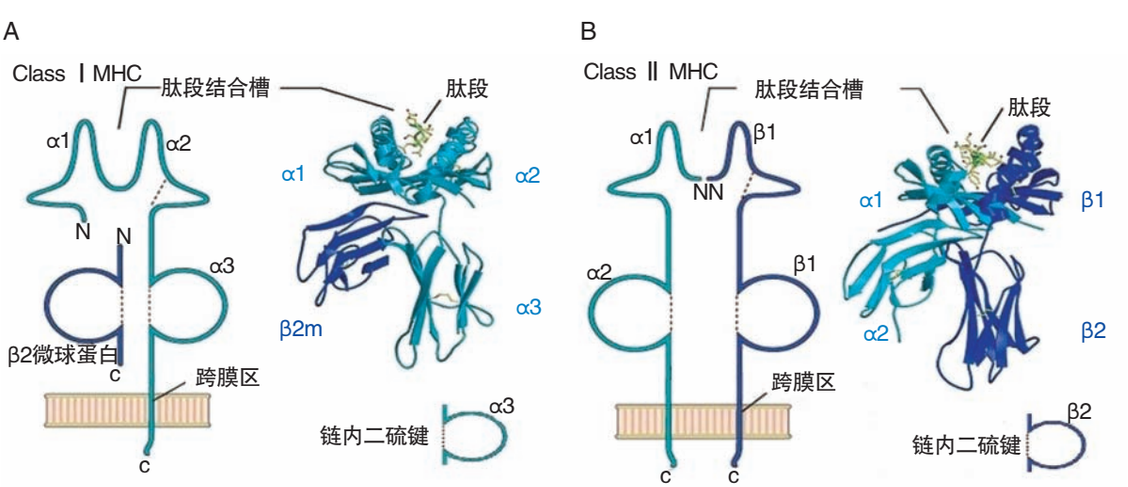



**图4–1　MHC分子的结构**

（A）MHC Ⅰ类分子的结构：α1和α2结构域共同形成抗原肽结合槽（peptide–binding cleft），α3结构域可结合β2微球蛋白。分子内部在α2和α3结构域各形成一个二硫键。跨膜区将分子锚定在细胞膜上，胞内区起信号转导和调节作用。（B）MHC Ⅱ类分子的结构：α1和β1形成抗原肽结合槽，分子内部在α2、β1和β2结构域各有一个二硫键，跨膜区将分子锚定在细胞膜上，胞内区起信号转导和调节作用。

座编码的在某些方面与MHC类似的分子，如人体内的HLA-E、HLA-F、HLA-G、MICA、MICB和CD1家族等分子。这些分子在结构、同源性或者功能上与经典MHC分子有相似性。HLA-E、HLA-F和HLA-G分子虽然为非经典MHC分子，在免疫调节中同样起重要作用：如HLA-E结合的受体为自然杀伤细胞（NK）的凝集素抑制性受体NK94/CDG2，可激活或抑制NK细胞的杀伤活性；HLA-G的一个显著特征是具有多种异构体，到目前为止共报道了6种HLA-G的剪接异构体，分别命名为HLA-G1–HLA-G6，这些异构体可直接或间接地调节体内免疫反应[7]。HLA-G分子的表达有组织特异性，通常表达于妊娠过程中相关的组织和细胞如胚胎、羊膜内皮细胞等，正常人的胸腺、胰岛和角膜等也有表达，其表达也受到各种细胞因子的调控，如IL-10、IL-2和IFN-γ等。

### （二）MHC Ⅱ类基因及分子结构

MHC Ⅱ类基因具有很高的多态性和基因位点数目。人体内的MHC Ⅱ类基因包括HLA-DR、HLA-DP和HLA-DQ以及HLA-DM、HLA-DO等基因，而且这些基因存在多个拷贝，因此一个个体内可表达几个甚至十几个MHC Ⅱ类分子。MHC Ⅱ类基因编码2条相似的跨膜糖蛋白：α链和β链。α链的相对分子质量约为34000，β链的相对分子质量约为29000，二者通过非共价结合并经过修饰形成成熟的MHC Ⅱ类分子。这2条链都包含胞外区、跨膜区和胞内区三部分（图4–1B）。2条链的胞外区分别包含α1、α2和β1、β2结构域。在分子顶部，α1和β1各贡献1个α螺旋形成抗原肽结合槽的2个侧壁，结合槽的底部则由折叠片支撑。MHC Ⅱ类分子的多态性主要体现在α1和β1两个结构域，所以抗原肽结合槽的构型因编码基因的不同而有所差异。α2和β2参与结合$CD4^+$ T细胞表面的受体分子，这2个结构域相对比较保守。与MHC Ⅰ类分子一样，MHC Ⅱ类分子的抗原结合特异性不强，每个分子可与多种抗原肽结合。两者结合肽段的不同主要体现在以下两个方面：①MHC Ⅰ类分子结合的肽段大约为8～13个氨基酸，而MHC Ⅱ类分子的抗原结合槽的两头是开放的，可结合的肽段的长度能达到8～30个氨基酸残基；②MHC Ⅰ类分子抗原肽结合槽中的氨基酸与抗原肽段的结合通过氢键和疏水作用，而MHC Ⅱ类分子与抗原肽通过形成氢键而结合。除此之外，MHC Ⅱ类分子的分布不如MHC Ⅰ类分子广泛，主要表达在抗原递呈细胞表面，包括树突状细胞（DC）、B细胞和巨噬细胞（macrophages）等[4, 5, 8]，精子细胞和某些活化的T细胞也会表达MHC Ⅱ类分子。

### （三）MHC Ⅲ类基因和分子结构

这群基因为免疫相关基因，编码的分子不直接参与抗原递呈，但是与机体的免疫调节和免疫应答密切相关。这个基因群编码的蛋白主要包括某些补体分子如C4A、C4B等以及肿瘤坏死因子（TNF-α、TNF-β）、热休克蛋白70（HSP70）、抗原肽转运物（TAP）和巨大多功能蛋白酶（LMP）等免疫相关分子，还包括一些与免疫无关的基因如21羟化酶（*CYP21*）等（图4–2）[5, 8]。

虽然不直接参与经典的抗原递呈，这些分子可直接或间接地参与免疫清除和免疫调节过程。补体分子不仅参与炎症反应，在获得性免疫和天然免疫应答的启动和调控过程中也起重要的作用。如C4A是一种过敏毒素，作为炎性介质可与其受体结合，促发胞内信号，诱导吞噬细胞和粒细胞等释放活性氧，发生脱颗粒，趋化多种免疫细胞，调节免疫反应。TNF-α与许多炎症性疾病进程相关，也可通过多种机制杀伤肿瘤细胞。LMP和TAP是与抗原肽加工和转运密切相关的分子：LMP是存在于胞浆内的大分子蛋白质水解复合物，为含有4个圆环的中空圆柱体，含有7个α亚单位和7个β亚单位，其主要功能是将大肽段降解为6～30个氨基酸的小肽段；TAP包含TAP1和

TAP2两个亚基，其主要功能为将细胞质中的肽段以ATP依赖的形式转移到内质网，在内质网中组装完成的MHC分子可识别这些小肽段，并将其转运至细胞膜，启动免疫反应[7]。

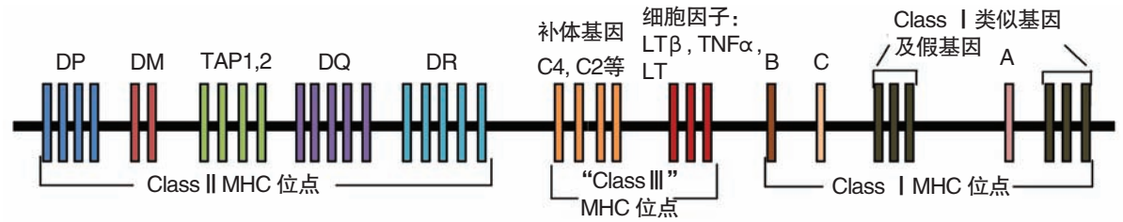



**图4–2　人MHC基因座位图谱**

## 二、MHC Ⅰ和Ⅱ类分子的功能

### （一）参与对抗原的处理和呈递

MHC分子的主要功能是识别、结合抗原，并将抗原递呈给相应的T淋巴细胞而启动下游免疫反应。病毒等内源性的抗原被蛋白酶体消化成小肽段后通过TAP运输到内质网中，在这里嵌合到装配成熟的MHC Ⅰ类分子的抗原结合槽中。MHC Ⅰ类分子的抗原结合槽中含6个口袋，编号分别为A–F，其结合的多肽中某些氨基酸侧链会插入到相应的口袋中，这些氨基酸残基称为锚定残基。锚定残基分2类：初级锚定残基和次级锚定残基。初级锚定残基通常为N端的第2位或第3位氨基酸和C末端的氨基酸残基，其锚定能力较强；其余的锚定残基为次级锚定残基，其结合力较弱。正是由于锚定残基的限制作用，使得MHC分子可以识别某一类多肽，增加了其对抗原的递呈能力。由于MHC Ⅰ类分子的α2和α3结构域存在多态性，使得不同的MHC分子可以识别不同类型的多肽。抗原肽–MHC复合物经过高尔基体的进一步加工后以囊泡的形式运输到细胞表面被$CD8^+$ T淋巴细胞识别，从而启动下游免疫反应。

细菌等外源性抗原被巨噬细胞通过胞饮作用、巨吞饮作用、受体介导的内吞作用、内化以及吞噬作用等摄入体内，并在MⅡC（MHC class Ⅱ compartment）中被降解成抗原肽或被转运到溶酶体降解成小肽段再运回内体形成晚期内体，然后与MHC Ⅱ类分子结合（在有的组织中MHC Ⅱ类分子在溶酶体与肽段结合），通过高尔基体加工后转运到细胞膜，被$CD4^+$ T淋巴细胞识别。MHC Ⅱ类分子与抗原肽的结合是不可逆的，并且非常牢固，这可以保护抗原肽段不被降解，同时也能防止细胞外蛋白的干扰。MHC Ⅰ类分子递呈内源性抗原，Ⅱ类分子递呈外源性抗原并不是绝对的，有时MHC Ⅱ类

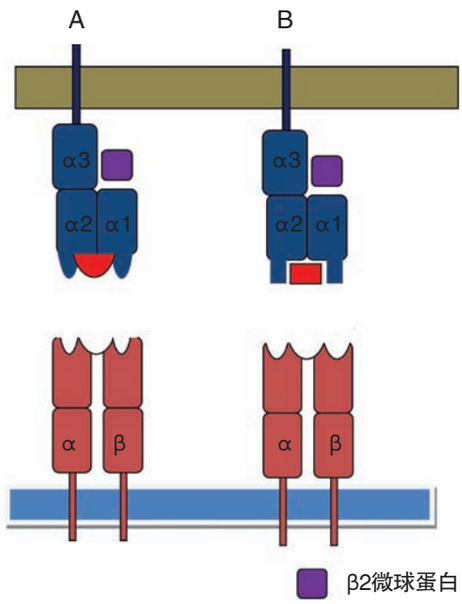



**图4–3　MHC Ⅰ类分子递呈抗原示意图**

经过消化的抗原肽通过锚定残基紧密结合在抗原肽结合槽的口袋中，被转运到细胞表面与T淋巴细胞上的T细胞受体（TCR）结合。（A）抗原肽–MHC复合物与TCR相互作用，T细胞被激活。（B）抗原肽–MHC复合物不能与TCR相互作用，T细胞不被激活。

分子也可以递呈内源性抗原，而外源性的抗原也能被MHC Ⅰ类分子识别并递呈给$CD8^+$ T细胞，称为交叉递呈（图4–3）[5，9，10]。

### （二）参与T细胞的分化和发育

造血祖细胞产生自骨髓并迁入胸腺，在胸腺内最终分化为成熟的T细胞。T细胞在成熟过程中会经历阴性选择和阳性选择2个过程。胸腺内T细胞的发育分为3个主要阶段：双阴性、双阳性和单阳性阶段。在双阳性阶段，细胞增殖停止，T细胞受体（TCR）α位点重排，重排后的α基因编码的产物与TCRβ结合生成新的TCR。新合成的TCR中只有与胸腺上皮细胞表面的MHC Ⅰ类和Ⅱ类分子结合该T细胞才能存留，而不能识别MHC的细胞会启动凋亡程序，这个过程称为阳性选择；成为单阳性的淋巴细胞在相应配体的引导下会从胸腺皮质区迁入髓质区，进入胸腺髓质的$CD8^+$/$CD4^+$ T细胞如果能与胸腺中的巨噬细胞和DC等抗原递呈细胞表面的抗原肽–MHC复合物结合，则该细胞也会发生凋亡，称为阴性选择。通过这两个选择过程，大约95%的T淋巴细胞最终被清除，存活T淋巴细胞可以结合自身MHC分子而不会识别自身抗原，形成自身耐受（图4–4）[4，8]。

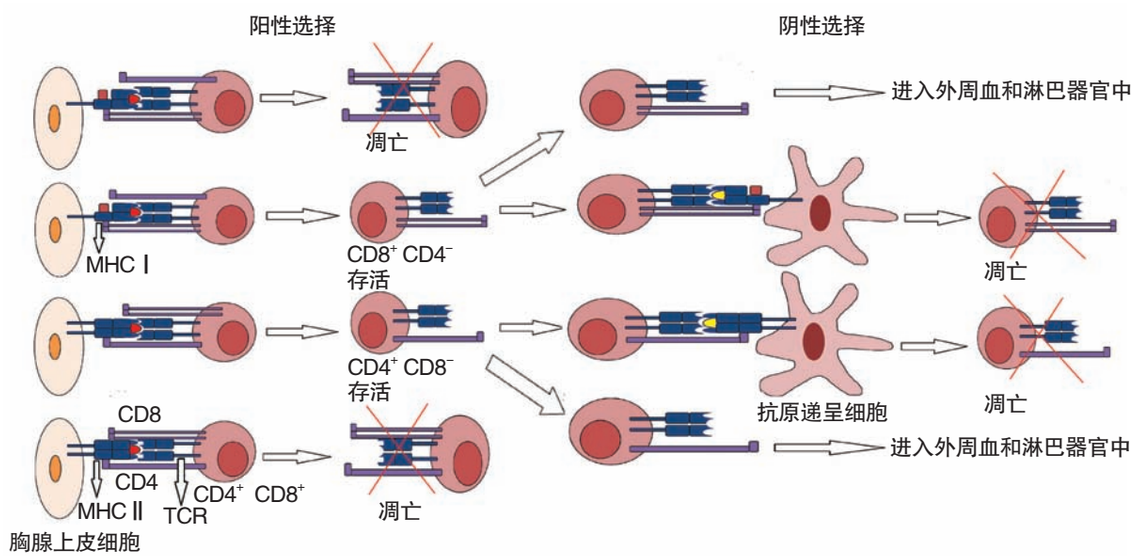



**图4–4　MHC介导的T细胞的阳性选择和阴性选择**

在胸腺皮质内，双阳性的细胞通过阳性选择获得自身MHC限制性。在胸腺髓质内，单阳性的细胞通过阴性选择获得自身抗原耐受性。通过这两种选择得到的单阳性T淋巴细胞具有不同的功能，且都能识别自身MHC分子并对自身抗原耐受。成熟的T细胞最终进入全身行使正常功能。

### （三）参与调节自然杀伤细胞活性

自然杀伤细胞（nature killer cell, NK）是淋巴细胞的一个亚群，具有强烈的细胞毒活性。NK细胞通过在细胞表面表达多种受体来实现自我调控，已经证明其细胞表面的受体有数十种之多。这些受体按功能可分为两大类：活化性受体和抑制性受体。MHC Ⅰ类分子为NK细胞抑制性受体的配体。在正常情况下，细胞表面的MHC Ⅰ类分子能特异性地结合NK细胞表面的抑制性受体，

传导抑制性信号，抑制NK细胞活化，保护正常细胞免于被NK细胞攻击。而在非正常状态如病毒感染时，NK细胞会被激活。NK细胞的活化有3种模式，其中的一种称为“missing-self”模式：如HIV等病毒能下调MHC Ⅰ类分子在细胞表面的表达，抑制性信号减弱，导致NK细胞活化，清除被感染的靶细胞（图4–5）[5，11，12]。

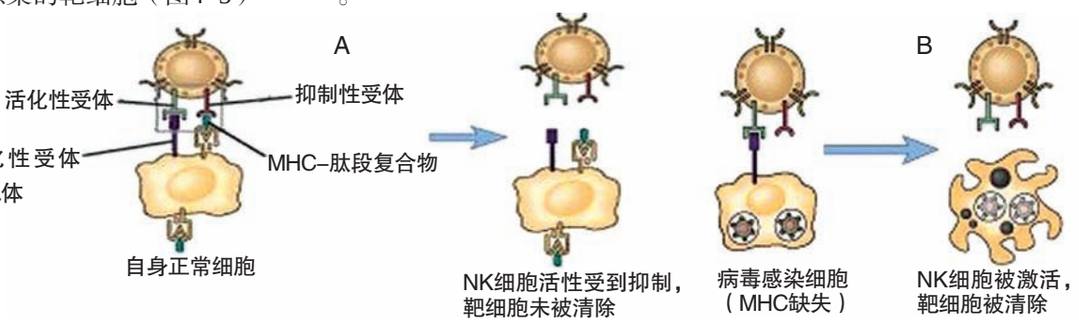



**图4–5　MHC介导的NK细胞对靶细胞的耐受和杀伤**

（A）靶细胞表面表达NK细胞抑制性受体的配体MHC Ⅰ类分子，可抑制NK细胞的活化；（B）靶细胞表面的MHC Ⅰ类分子缺失，抑制性信号减弱，NK细胞活化，靶细胞被清除。

## 第三节　树鼩MHC的结构

### 一、树鼩MHC Ⅰ类基因及分子结构

树鼩MHC基因的研究报道非常少。我们最近扩增出了树鼩MHC Ⅰ类基因的全长等位基因，命名为Tube-W+（数字），使得树鼩MHC Ⅰ类基因的全长等位基因数目达到了21个[13]。树鼩MHC Ⅰ类基因也包含8个外显子和7个内含子，编码区全长为1074bp，外显子1～8的长度分别为：63bp、267bp、276bp、276bp、105bp、33bp、48bp和3bp（图4–6）。由于基因数较少且没有经过

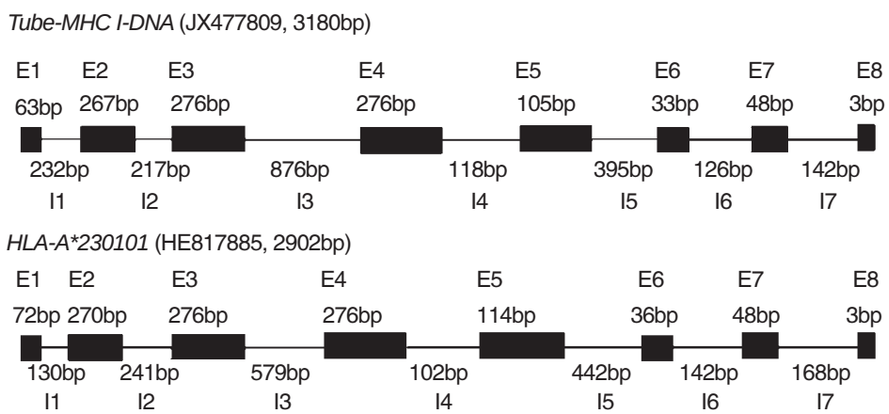



**图4–6　树鼩和人MHC基因结构对比图（经Elsevier许可，引自文献13）**

树鼩MHC Ⅰ类基因与HLA Ⅰ相同，都具有8个外显子和7个内含子。不同的是树鼩MHC Ⅰ类基因第2、5和6外显子分别比HLA Ⅰ类基因短了3bp、9bp和3bp。

系统的命名，尚不能确定树鼩MHC Ⅰ类基因的具体位点数目。树鼩MHC Ⅰ类基因的α2和α3区域多态性较高，而其它区域的多态性相对较低。通过序列比对我们还发现，树鼩MHC Ⅰ类分子的4个半胱氨酸位点分别位于100、163、202和258位，这几个位点非常保守，而且与*HLA-A02*中半胱氨酸位点所处的位置相同。半胱氨酸的作用是形成二硫键，维持并稳定分子的空间结构，这说明这些分子可能与经典的MHC分子具有相似的空间结构。除此之外，我们还发现$CD8^+$ T细胞结合位点和糖基化位点都非常保守（图4–7）。与HLA Ⅰ类基因相比，树鼩MHC基因的第2、5和6外显子

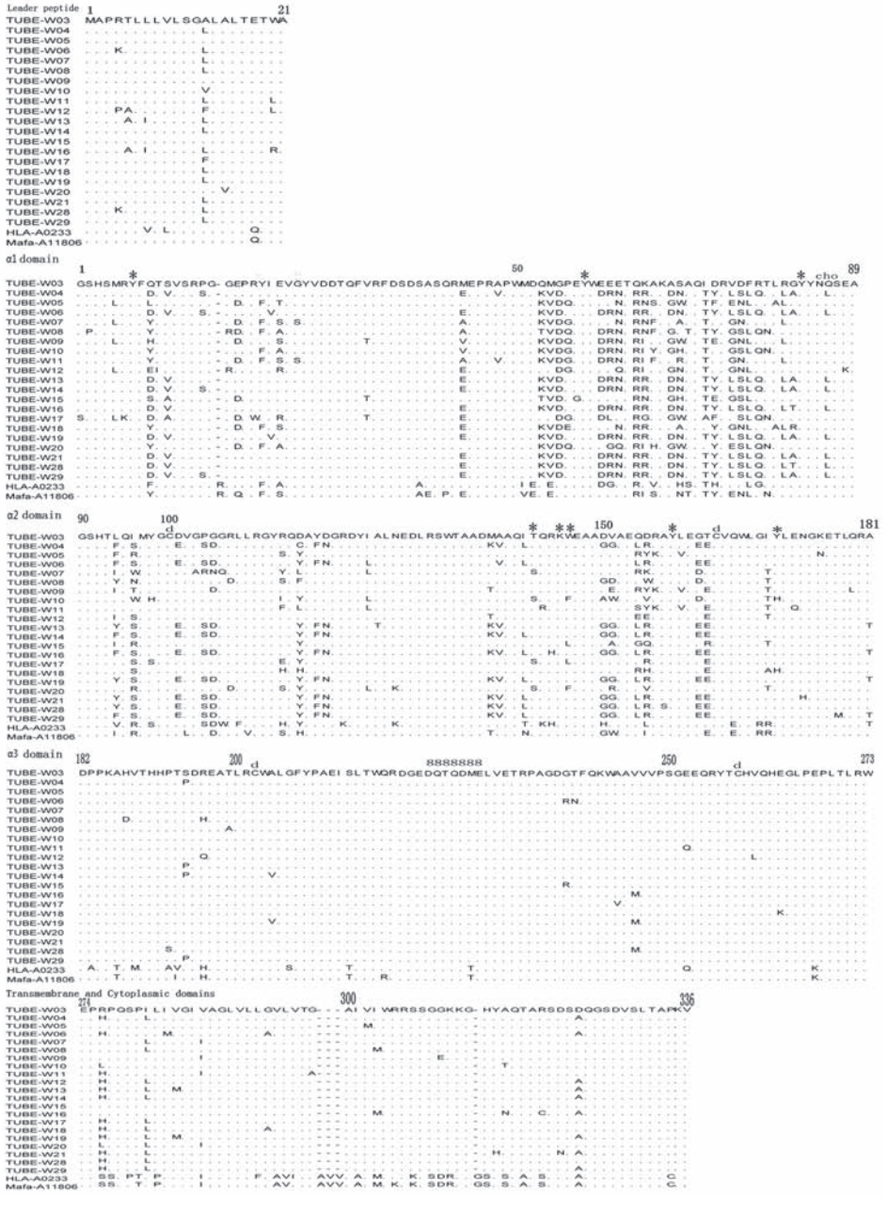


**图4–7　树鼩和人及猕猴的氨基酸序列对比图（经Elsevier许可，引自文献13）**

比对显示树鼩MHC Ⅰ类分子有5个氨基酸缺失，分别位于α2结构域、跨膜区和胞内区。半胱氨酸位点、$CD8^+$ T细胞结合位点和糖基化位点与高等灵长类相比所处位置相同，而且非常保守。树鼩基因序列号见表4–2，*HLA-A*0233* (AF140506.1)，*Mafa-A*11806* (FM246489)。

分别少了3bp、9bp和3bp，导致其编码的蛋白有5个氨基酸缺失。其中一个氨基酸的缺失位于第2外显子的第17位，这个氨基酸位于抗原肽结合槽底部的β1折叠片和β2折叠片之间，其主要功能为支撑抗原肽结合槽，不属于抗原结合的重要位点，其缺失可能对该分子的功能影响较小。

有研究表明MHC分子会从细胞膜上脱落下来形成可溶性的MHC分子，而MHC分子从细胞膜上脱落的能力因不同的基因而不同。我们知道跨膜区决定MHC分子在细胞膜上锚定的强度。与*HLA-A02*相比，在树鼩MHC分子中我们发现在跨膜区有3个氨基酸缺失。这3个氨基酸的缺失是否对树鼩MHC Ⅰ类分子锚定细胞膜的能力有影响还有待进一步的研究。以*HLA-A02*为模板，构建的*Tube-W05*的三维模型显示，虽然有5个氨基酸的差别，模拟的树鼩MHC Ⅰ类分子的三维结构与*HLA-A02*是相同的（图4–8）。树鼩基因组测序显示整个MHC区域的结构与人相比虽然有差异，但还是比较保守的，如本书第三章图3–12所示，在HLA-A、F和G对应的区域发现了1个等位基因，在HLA-B和C对应的区域发现了3个MHC Ⅰ类基因，但是在HLA-E对应的区域未能发现树鼩MHC的等位基因（图3–12）。

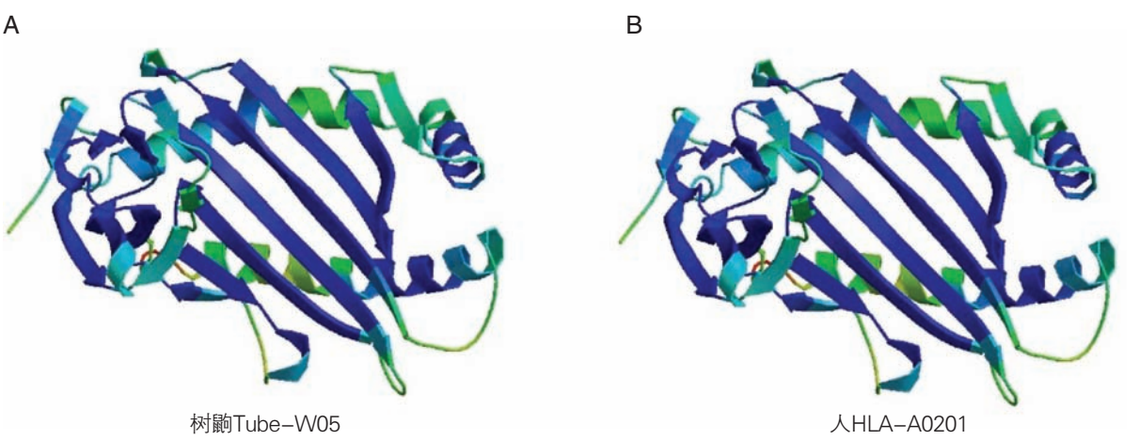



**图4–8　人和树鼩MHC Ⅰ类分子三维模拟图**

选择性剪接是生物体增加蛋白多样性的一个重要机制，在许多基因中都有选择性剪接存在。在免疫系统中剪接体更是普遍存在。在灵长类动物中，以下几种MHC Ⅰ类基因的剪接异构体已有报道：缺失外显子3、缺失外显子4、缺失外显子2–4和缺失外显子3–4。不同形式的剪接体对免疫反应有不同的影响，甚至起相反的作用，例如He等[6]就提出可溶性的HLA分子可与全长分子竞争T细胞受体（TCR），而可溶性的HLA分子结合到TCR上可限制全长HLA分子的信号传导能力。在研究中我们发现树鼩MHC存在不同形式的剪接异构体（图4–9）。我们发现了3个剪接异构体*Tube-W23*、*Tube-W24*和*Tube-W25*。其中*Tube-W23*和*Tube-W24*具有相同的剪接形式：第2外显子的前109个碱基被选择性切掉，这导致第2外显子中产生了1个终止密码子，该蛋白不能表达。在*Tube-W25*中，第4外显子的前87个碱基被切掉，这个选择性剪接异构体没有产生终止密码子。

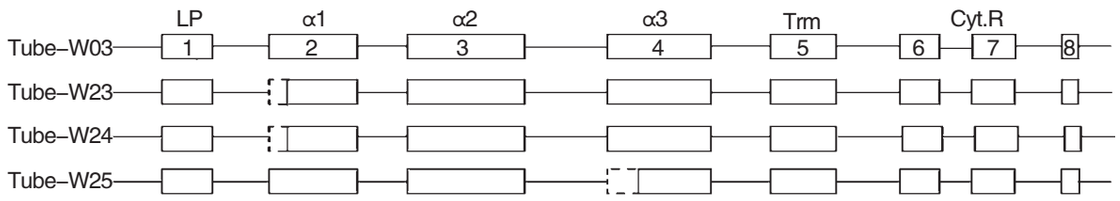



**图4–9　树鼩MHC Ⅰ类基因选择性剪接体示意图（经Elsevier许可，引自文献13）**

图中实线所示方框为各个外显子，虚线所示为被选择性切掉的部分，*Tube–W03*为全长参照基因。

## 二、树鼩MHC Ⅱ类基因及分子结构

MHC Ⅱ类基因比较复杂，多态性很高。关于树鼩MHC Ⅱ类基因的研究比较少。Oppel等扩增了29个*MHC DRB*基因的第2外显子，命名为Tube-DRB+数字。该研究报道*Tube-DRB 1*与灵长类同源性很高。如表4–1所示，与*Tube-DRB 1*相似度最高的10个物种全部属于灵长类，而*Tube-DRB 2*、*DRB 3*和*DRB 4*基因与灵长类和啮齿类动物的同源性都很高。氨基酸序列比对显示树鼩*MHC DRB*基因的第2外显子长度与其它哺乳动物相同也具有较高的多态性（图4–10）[14]。树鼩基因组测序显示，在1只树鼩体内发现了10个MHC Ⅱ类基因，与人相比这些基因分别位于HLA-DR、DP、DQ、DM和DO位点（图3–12）。这些数据表明树鼩MHC Ⅱ类基因在基因组上的排列方式与人相似，也说明这些基因存在多拷贝。

表4–1　树鼩MHC DRB基因与其它物种同源性比较（引自文献14）

| | DRB1 | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Rank | Species | | (sub-) Order | Accession number | Max score |
| 1 | Rhesus macaque | *Macaca mulatta* | Primates | AF031262 | 268 |
| 2 | Japanese macaque | *Macaca fuscata* | Primates | AB253349 | 267 |
| 3 | Gray mouse lemur | *Microcebus murinus* | Primates | EU137096 | 265 |
| 4 | Fat–tailed dwarf lemur | *Cheirogaleus medius* | Primates | EF194232 | 265 |
| 5 | Crab–eating macaque | *Macaca fascicularis* | Primates | AM086031 | 263 |
| 6 | Greater bamboo lemur | *Hapalemur simus* | Primates | AB078261 | 261 |
| 7 | Brown lemur | *Eulemur fulvus fulvus* | Primates | AB078321 | 261 |
| 8 | Stump–tailed macaque | *Macaca arctoides* | Primates | AF173350 | 261 |
| 9 | Pig–tailed macaque | *Macaca nemestrina* | Primates | GU130518 | 257 |
| 10 | Human | *Homo sapiens* | Primates | AF028588 | 255 |

| | DRB2 | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Rank | Species | | (sub-) Order | Accession number | Max score |
| 1 | Moose | *Alces alces* | Ruminants | X83284 | 235 |
| 2 | Finless porpoise | *Neophocaena phocaenoides* | Cetacea | EF056478 | 230 |
| 3 | Rhesus macaque | *Macaca mulatta* | Primates | AY487263 | 230 |
| 4 | Human | *Homo sapiens* | Primates | EU071689 | 228 |
| 5 | Water vole | *Arvicola terrestris* | Rodents | EF660500 | 228 |
| 6 | Owl monkey | *Aotus nancymaae* | Primates | AY563213.2 | 224 |
| 7 | Giant panda | *Ailuropoda melanoleuca* | Carnivora | DQ019977 | 224 |
| 8 | Short–finned pilot whale | *Globicephala macrorhynchus* | Cetacea | AB164227 | 224 |
| 9 | Irrawaddy dolphin | *Orcaella brevirostris* | Cetacea | AB164223 | 224 |
| 10 | Dall's porpoise | *Phocoenoides dalli* | Cetacea | EU698954 | 224 |

续表4–1

| | DRB3 | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Rank | Species | | (sub-) Order | Accession number | Max score |
| 1 | Long–tailed giant rat | *Leopoldamys sabanus* | Rodents | EU543234 | 198 |
| 2 | California mouse | *Peromyscus californicus* | Rodents | AY219808 | 198 |
| 3 | Pig–tailed macaque | *Macaca nemestrina* | Primates | GU130524 | 185 |
| 4 | Rhesus macaque | *Macaca mulatta* | Primates | GQ266324 | 185 |
| 5 | Japanese macaque | *Macaca fuscata* | Primates | AB253353 | 185 |
| 6 | Common bottlenose dolphin | *Tursiops truncatus* | Cetacea | AB302051 | 183 |
| 7 | Yellow–necked mouse | *Apodemus flavicollis* | Rodents | AY699766 | 183 |
| 8 | Cactus mouse | *Peromyscus eremicus* | Rodents | AY219823 | 183 |
| 9 | Sperm whale | *Physeter catodon* | Cetacea | AB164208 | 183 |
| 10 | Indo–Pacific bottlenose doidolphin | *Tursiops aduncus* | Cetacea | EF507870 | 178 |

| | DRB4 | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Rank | Species | | (sub-) Order | Accession number | Max score |
| 1 | Spotted souslik | *Spermophilus suslicus* | Rodents | AJ003232 | 167 |
| 2 | Norway rat | *Rattus norvegicus* | Rodents | EU734808 | 154 |
| 3 | Yellow–necked mouse | *Apodemus flavicollis* | Rodents | EU734809 | 154 |
| 4 | Striped mouse | *Rhabdomys pumilio* | Rodents | EU999168 | 154 |
| 5 | Cattle | *Bos indicus x Bos taurus* | Ruminants | M81261 | 154 |
| 6 | Wood mouse | *Apodemus sylvaticus* | Rodents | EU722402 | 150 |
| 7 | Gray mouse lemur | *Microcebus murinus* | Primates | EF569195.2 | 145 |
| 8 | Long–tailed giant rat | *Leopoldamys sabanus* | Rodents | AY699726 | 124 |
| 9 | Common marmoset | *Callithrix jacchus* | Primates | AY626204 | 111 |

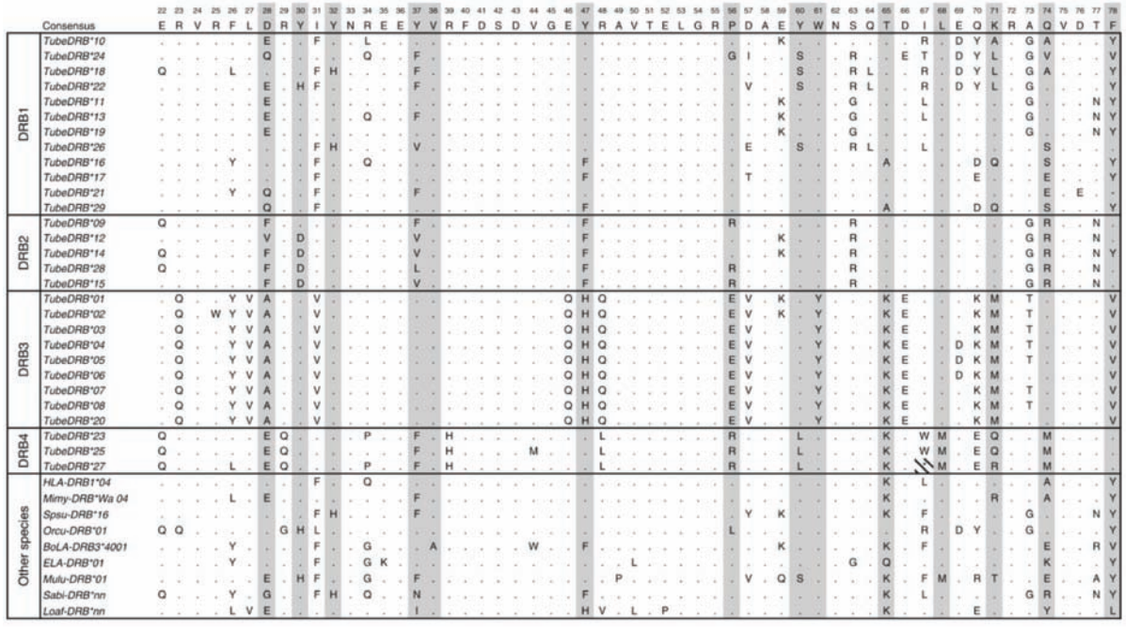



**图4–10　树鼩MHC DRB分子与其它物种比对图（引自文献14）**

## 第四节 树鼩MHC基因的遗传学特点

### 一、多态性

MHC是迄今为止发现的多态性最高的基因复合体。通常基因的等位基因数目一般不超过10个，而MHC的等位基因数目远大于此，如HLA Ⅰ和Ⅱ类基因加起来可达几千个。有报道指出，在一只恒河猴体内发现的等位基因数目就达到了7个，而随着研究的深入和物种进化，仍然不断有新的等位基因被发现[15]。不同的物种，甚至同一物种不同的基因座位维持基因多样性的方式也是不同的。例如在人的一个个体中，只能表达2个HLA-A基因和2个HLA-B基因，但是不同个体间这2个基因座位表达相同基因的概率很小，从而能维持整个群体MHC基因的多样性。恒河猴则采用不同的策略维持基因的多样性：在一个恒河猴个体中，由于基因复制情况的存在，每个恒河猴MHC（Mamu Ⅰ）类基因通常都能达到6～8个，最多的可达到10多个。

MHC基因高度多态性具有重要的意义：由于MHC分子的主要功能是递呈抗原，而高度的多态性和多样性使这个群体或物种能应付各种各样的病原的威胁，有利于该群体或该物种的生存和延续。在近现代医学中，MHC基因的多态性为器官移植带来了巨大的挑战：由于该分子高度的多态性，在器官移植中很难找到具有完全相同的MHC基因的个体，而具有不同MHC等位基因的个体间的器官移植会发生强烈的排斥反应。

我们曾在一只树鼩个体中发现了5个MHC Ⅰ类基因，统计发现这些等位基因出现的概率很低：除个别基因外，大多数基因出现的概率小于0.125（表4–2）[13]。非同义突变和同义突变的比值（dN/dS）通常被用来证明某个基因经过何种选择：dN/dS＞1说明该基因或基因的某个区域经历过正选择；dN/dS=1表明存在中性选择；dN/dS＜1在说明存在负选择。树鼩MHC Ⅰ类基因的抗原结合区（ABS）的dN/dS值为1.5（$P$=0.067），而非ABS区的dN/dS值为0.4（$P$=0.061），说明树鼩MHC Ⅰ类基因的ABS区经历过正选择[13, 16]。树鼩的肽段结合区共有543bp，我们分析发现其中的170个位点展现出单核苷酸多态性（SNPs），多态性位点占ABS区的31%；而在非肽段结合区（外显子4～8）的465个位点中，只找到了57个SNPs位点，只占该区的12.15%。ABS区的$\pi$值（0.1）是全长序列$\pi$值（0.065）的1.5倍。以上研究表明，树鼩MHC Ⅰ类基因具有较高的多态性和多样性。

在灵长类和很多哺乳动物中，MHC Ⅱ类基因存在普遍的复制现象。Oppelt等[14]在一只树鼩体内最多发现了8个Tube-DRB基因，表明这个位点的基因存在复制。基因组测序也发现在一只树鼩体内共发现10个MHC Ⅱ基因，表明不只Tube-DRB基因，其它基因也可能存在复制。在所有的Tube-DRB位点中，Tube-DRB 1的多态性最高且经历过正选择，其dN/dS值达到了4.131。除此之外，将所有的等位基因放到一起分析，dN/dS值达到了2.041。同时分析还发现，所有的非抗原结合区都经受负选择（表4–3）[14, 16, 17]。共显性是指一对等位基因同为显性表达，MHC基因编码的分子都能表达在细胞膜上。共显性极大地增加了MHC分子表型的多态性，有利于个体对抗原肽的识别从而增加了该个体存活的概率。树鼩MHC Ⅰ类和Ⅱ类基因都为共显性表达。综上所述，同经典的MHC一样，树鼩MHC Ⅰ类和Ⅱ类基因都具有较高基因多态性。

表4–2　树鼩MHC Ⅰ基因出现频率（经Elsevier许可，引自文献13）

| Alleles name | Accession No. | Number of animals | Frequency* |
|---|---|---|---|
| *Tube-W03* | JQ325033 | 3/16 | 0.188 |
| *Tube-W04* | JQ325034 | 4/16 | 0.250 |
| *Tube-W05* | JQ325035 | 5/16 | 0.313 |
| *Tube-W06* | JQ325036 | 4/16 | 0.250 |
| *Tube-W07* | JQ325037 | 1/16 | 0.063 |
| *Tube-W08* | JQ325038 | 1/16 | 0.063 |
| *Tube-W09* | JQ325039 | 2/16 | 0.125 |
| *Tube-W10* | JQ325040 | 2/16 | 0.125 |
| *Tube-W11* | JQ325041 | 1/16 | 0.063 |
| *Tube-W12* | JQ325042 | 2/16 | 0.125 |
| *Tube-W13* | JQ325043 | 2/16 | 0.125 |
| *Tube-W14* | JQ325044 | 1/16 | 0.063 |
| *Tube-W15* | JQ325045 | 1/16 | 0.063 |
| *Tube-W16* | JQ325046 | 1/16 | 0.063 |
| *Tube-W17* | JQ325047 | 1/16 | 0.063 |
| *Tube-W18* | JQ325048 | 1/16 | 0.063 |
| *Tube-W19* | JQ325049 | 1/16 | 0.063 |
| *Tube-W20* | JQ325050 | 1/16 | 0.063 |
| *Tube-W21* | JQ325051 | 1/16 | 0.063 |
| *Tube-W28* | JQ756395 | 1/16 | 0.063 |
| *Tube-W29* | JQ756396 | 1/16 | 0.063 |

*在计算基因频率时，考虑到遗传因素，一个家系中只计算了亲代，子代没有计算在内。

表4–3　树鼩MHC DRB基因非同义替换和同义替换的比值

| | dN | dS | dN/dS | *p* | *Z* |
|---|---|---|---|---|---|
| ABS *N*=15 | | | | | |
| *DRB1* | 0.252 ± 0.051 | 0.061 ± 0.051 | 4.131 | 0.013 | 2.508 |
| *DRB2* | 0.078 ± 0.031 | 0.159 ± 0.069 | 0.491 | 0.243 | –1.174 |
| *DRB3* | 0.000 ± 0.0 | 0.056 ± 0.038 | 0.000 | 0.129 | –1.527 |
| *DRB4* | 0.018 ± 0.018 | 0.075 ± 0.085 | 0.240 | 0.516 | –0.652 |
| All alleles | 0.345 ± 0.042 | 0.169 ± 0.049 | 2.041 | 0.005 | 2.828 |
| Non–ABS *N*=42 | | | | | |
| *DRB1* | 0.074 ± 0.019 | 0.080 ± 0.022 | 0.925 | 0.866 | –0.169 |
| *DRB2* | 0.013 ± 0.009 | 0.045 ± 0.025 | 0.289 | 0.226 | –1.216 |
| *DRB3* | 0.016 ± 0.008 | 0.045 ± 0.022 | 0.356 | 0.197 | –1.298 |
| *DRB4* | 0.021 ± 0.012 | 0.046 ± 0.031 | 0.457 | 0.472 | –0.721 |
| All alleles | 0.095 ± 0.018 | 0.186 ± 0.036 | 0.511 | 0.036 | –2.123 |

引自文献14。

## 二、单倍型遗传

单倍型（haplotype）遗传是指连锁在一条染色体上的等位基因在遗传过程中作为一个完整的遗传单位由亲代传给子代，很少发生同源染色体间的交换。我们知道在高等哺乳动物中，MHC复合体是一组紧密连锁的基因群，其遗传属于单倍型遗传。

通过对树鼩家系的研究，我们发现树鼩MHC Ⅰ类基因的遗传遵循单倍型遗传，子代的基因都

是从亲代以单倍型的形式进行遗传的。例如在家系2中，在子代个体中检测到的*Tube-W16*和*Tube-W17*是从亲代母本中遗传而来（表4–4）[13]。Oppelt等[14]在家系研究中鉴定了14个单体型，而在遗传研究中发现树鼩MHC DRB基因是以单倍型的形式进行遗传的（图4–11）。

表4–4　树鼩MHC Ⅰ基因家系研究（经Elsevier许可，引自文献13）

| Familial number | Animal code | Relationship | Alleles | |
|---|---|---|---|---|
| Family 1 | F01 | Father | *Tube-W03* | *Tube-W04* |
| | | | *Tube-W05* | *Tube-W06* |
| | M01 | Mother | *Tube-W05* | *Tube-W06* |
| | | | *Tube-W07* | *Tube-W23* |
| | S01 | Offspring | *Tube-W03* | *Tube-W04* |
| | | | *Tube-W07* | *Tube-W23* |
| Family 2 | F02 | Father | *Tube-W05* | *Tube-W06* |
| | | | *Tube-W10* | *Tube-W12* |
| | | | *Tube-W13* | |
| | M02 | Mother | *Tube-W05* | *Tube-W06* |
| | | | *Tube-W11* | *Tube-W16* |
| | | | *Tube-W17* | |
| | S02 | Offspring | *Tube-W05* | *Tube-W06* |
| | | | *Tube-W16* | *Tube-W17* |

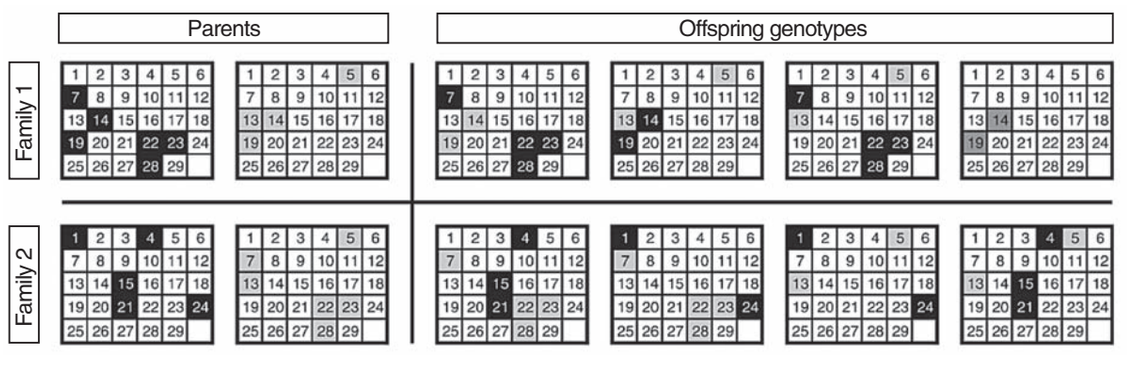



**图4–11　树鼩MHC DRB基因家系研究（引自文献14）**

以黑色或灰色显示的基因表明该基因在该个体中出现，未标注颜色的表明该基因未检测到。

## 三、连锁不平衡

连锁不平衡（linkage disequilibrium）是指某些等位基因间比其它等位基因间更多或更少地连锁在一起。MHC基因间存在强烈的连锁不平衡，即某个单元型出现的频率与该单元型中各个等位基因出现频率的乘积有较大差别。一般认为连锁不平衡出现的原因是某些组合的单倍型更具有适应性而被优先选择，在免疫相关的基因中连锁不平衡是普遍存在的。在树鼩的家系研究中我们发现*Tube-W05*和*Tube-W06*总是连锁出现，且出现的概率很高，表明树鼩MHC Ⅰ类基因存在连锁不

平衡[13]。在树鼩的MHC DRB基因的家系研究中*Tube-DRB 5*和*Tube-DRB 13*在两个家系中都是存在于一个单元型中，说明这两个基因很可能是紧密连锁（图4–11）[14]。

## 第五节 结语与展望

MHC是免疫系统中最复杂、最具多态性的一组基因。其由一组紧密连锁的基因座组成。该基因编码的蛋白参与抗原递呈、抑制或激活NK细胞以及参与T淋巴细胞的选择。MHC基因在灵长类和模式动物如小鼠等物种中研究较多。到目前为止，已经从人体内分离出将近7000个MHC等位基因，恒河猴也有1000多个，而针对树鼩MHC的研究刚刚起步。作为一种新兴的模式动物，且由于树鼩在进化上的特殊地位，使得树鼩在许多领域如神经、压力、肿瘤、病毒以及视力方面有研究特色和优势[18～21]。尤其在病毒方面的研究已经较多，如甲型肝炎病毒、乙型肝炎病毒、轮状病毒、单纯疱疹病毒和登革热病毒等都可以感染树鼩[22～26]。但是针对树鼩MHC的研究很少，这必将限制树鼩作为模型动物在疾病和感染方面的研究。

我们通过研究发现，树鼩MHC Ⅰ类基因具有和灵长类相似的结构：都有8个外显子和7个内含子。除第2、5和6外显子有3bp、9bp和3bp的缺失外，其余的外显子长度与人和恒河猴相同。树鼩MHC Ⅰ类基因具有较高多态性，并且经历过正选择。家系研究表明树鼩MHC Ⅰ类基因存在连锁不平衡并且以单元型的方式进行遗传。氨基酸序列比对显示，半胱氨酸位点、糖基化位点和$CD8^+$ T细胞结合位点等都出现在与灵长类相同的位置，并且非常保守，表明树鼩MHC Ⅰ类分子可能具备MHC分子的经典功能。我们还发现树鼩MHC Ⅰ类基因存在选择性剪接。在MHC Ⅱ类分子中，Tube-DRB 1与灵长类动物相似度最高，而Tube-DRB 2、DRB 3和DRB 4基因除了与灵长类具有较高的相似度外，与啮齿类动物的同源性也很高。树鼩MHC Ⅱ类基因还存在复制情况，尤其是Tube-DRB基因。

综上所述，树鼩MHC基因与灵长类相似，但也有差别，还有很多未阐明的问题需要进一步研究。研究表明人乙肝病毒可以感染树鼩[27]，却不能感染高等非人灵长类动物，MHC作为抗原递呈的重要分子与乙肝在树鼩中的感染及疾病进程是否有某些联系？如果有联系，是什么机制导致树鼩可以感染HBV？与灵长类相比，树鼩MHC Ⅰ类分子的跨膜区缺失3个氨基酸，这是否会影响分子在膜上的锚定？树鼩体内可溶的MHC分子是否比人要多？鉴于MHC分子与人相似，那么树鼩中与MHC相互作用的TCR和KIR的结构与灵长类相比是否也相似或者相同呢？这些问题都亟待进一步的研究来回答。

### 参考文献

[1]Zinkerna RM, Doherty PC. Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic lhoriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system. Nature, 1974, 248(5450): 701-2.

[2]Townsend ARM, Skehel JJ. Influenza-A sppecific cyto-toxic T-cell clones that do not recognize viral glycoproteins. Nature, 1982, 300(5893): 655-7.

[3]Bjorkman PJ, Saper MA, Samraoui B, et al. Structure of the human class-I histocompatibility antigen, HLA-A2. Nature, 1987, 329(6139): 506-12.

[4]谭壮生，等．免疫毒理学．北京：北京大学医学出版社，2011：54–60．
[5]Abbas AK, Lichtman AH, et al. Cellular and molecular immunology (5th). Philadelphia: W. B. Saunders Company, 2005: 65-79.
[6]He X, Le J. Alternative splicing of HLA class Ⅰ transcripts induced by IFN-gamma and TNF in fibroblasts: release of soluble HLA class Ⅰ heavy chain and an associate protein. Cell Immunol, 1995, 162(1): 159-68.
[7]曹雪涛，等．免疫学前沿进展．北京：人民卫生出版社，2009：177–90．
[8]章晓联，等．医学免疫学．武汉：武汉大学出版社，2008：99–106．
[9]Pamela AW, Peter C. The quality control of MHC class Ⅰ peptide loading. Curr Opin Cell Biol, 2008, 20(6): 624-31.
[10]Williams AP, Peh CA, Purcell AW, et al. Optimization of the MHC class Ⅰ peptide cargo is dependent on tapasin. Immunity, 2002, 16(4): 509-20.
[11]Storkus WJ, Salter RD, Alexander J, et al. Class Ⅰ-induced resistance to natural killing: identification of nonpermissive residues in HLA-A2. Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 88(14): 5989-92.
[12]Kaufman DS, Schoon RA, Leibson PJ. Role for major histocompatibility complex class Ⅰ in regulating natural killer cell-mediated killing of virus-infected cells. Proc Natl Acad Sci USA, 1992, 89(17): 8337-41.
[13]Zhang XH, Dai ZX, Zhang GH, et al. Molecular characterization, balancing selection, and genomic organization of the tree shrew (*Tupaia belangeri*) MHC class Ⅰ gene. Gene, 2013, 522(2): 147-55.
[14]Oppelt C, Wutzler R, Von Holst D. Characterisation of MHC class Ⅱ DRB genes in the northern tree shrew (*Tupaia belangeri*). Immunogenetics, 2010, 62(9): 613-22.
[15]Otting N, Heijmans CM, Noort RC, et al. Unparalleled complexity of the MHC class Ⅰ region in rhesus macaques. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102(5): 1626-31.
[16]考夫曼，谢尔，艾哈迈德．感染性疾病免疫学．朱立平，等译．北京：化学工业出版社，2005：73．
[17]Aguilar A, Roemer G, Debenham S, et al. High MHC diversity maintained by balancing selection in an otherwise genetically monomorphic mammal. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101(10): 3490-4.
[18]Konerding WS, Brunke J, Schehka S, et al. Is acoustic evaluation in a non-primate mammal, the tree shrew, affected by context? Anim Cogn, 2011, 14(6): 787-95.
[19]Lazic SE. Modeling hippocampal neurogenesis across the lifespan in seven species. Neurobiol Aging, 2012, 33(8): 1664-71.
[20]Li Y, Qin X, Cui J, et al. Proteome analysis of aflatoxin B1-induced hepatocarcinogenesis in tree shrew (*Tupaia belangeri chinensis*) and functional identification of candidate protein peroxiredoxin Ⅱ. Proteomics, 2008, 8(7): 1490-501.
[21]Meyer U, Van Kampen M, Isovich E, et al. Chronic psychosocial stress regulates the expression of both GR and MR mRNA in the hippocampal for-mation of tree shrews. Hippocampus, 2001, 11(3): 329-36.
[22]Albrecht M, Darai G, Flugel RM. Analysis of the genomic termini of *Tupaia* herpes virus DNA by restriction mapping and nucleotide sequencing. J Virol, 1985, 56(2): 466-74.
[23]Darai G, Schwaier A, Komitowski D, et al. Experimental infection of *Tupaia belangeri* (tree shrews) with herpes simplex virus types 1 and 2. J Infect Dis, 1978, 137(3): 221-6.
[24]Glebe D, Aliakbari M, Krass P, et al. Pre-s1 antigen-dependent infection of *Tupaia* hepatocyte cultures with human hepatitis B virus. J Virol, 2003, 77(17): 9511-21.
[25]Pang QF, Liu JC, Wan XB, et al. Experimental infection of adult *Tupaia belangeri yunalis* with human rotavirus. Chin Med J (Engl), 1983, 96(2): 85-94.
[26]Tong Y, Zhu Y, Xia X, et al. *Tupaia* CD81, SR-BI, claudin-1, and occludin support hepatitis C virus infection. J Virol, 2011, 85(6): 2793-802.
[27]Wang Q, Schwarzenberger P, Yang F, et al. Experimental chronic hepatitis B infection of neonatal tree shrews (*Tupaia belangeri chinensis*): a model to study molecular causes for susceptibility and disease progression to chronic hepatitis in humans. J Virol, 2012, 9: 170.



第五章

第一篇树鼩基础生物学
TREE SHREW BASIC BIOLOGY

Tree shrews

# 树鼩病毒限制因子TRIM5α/TRIMCyp的研究

母　丹　郑永唐

## 第一节　病毒限制因子TRIM5α

病毒感染危害宿主的健康、生存以及繁衍，为抵抗病毒，宿主自身进化出不同的免疫机制，包括传统分类的天然免疫和获得性免疫。此外，参与免疫防御的还有专门针对病毒的“固有免疫”（intrinsic immunity）[1]。固有免疫不依赖于释放的细胞因子，也不特定发生于某种免疫细胞内，而是直接采取组成性表达能够直接限制病毒的蛋白质（即病毒限制因子，restriction factor）的方式，对病毒复制的某个或多个阶段发挥限制作用。

人免疫缺陷病毒Ⅰ型（human immunodeficiency virus type 1, HIV-1）是人获得性免疫缺陷综合征（acquired immunodeficiency syndrome）的主要致病原，为慢病毒属中逆转录病毒的一种，在宿主细胞中的复制过程包括病毒吸附细胞、病毒进入细胞、病毒RNA逆转录、逆转录产物整合入宿主基因组、病毒基因转录翻译、病毒蛋白与遗传物质包装成病毒粒子、出壳成熟。目前发现，HIV-1在宿主细胞中复制的不同阶段受到一系列固有免疫的宿主因子的限制，包括TRIM5α/TRIMCyp、APOBEC3、Tetherin/BST2、SAMHD1和MX2[2~7]等。TRIM5α是被研究最多也最透彻的病毒限制因子。TRIM5α为三重基序（tripartite motif, TRIM）家族的成员，其名称源自*TRIM5*基因编码的蛋白由RING、B-box2、coiled-coil三个结构域（统称为RBCC结构域）组成。

### 一、宿主限制因子TRIM5α的发现

HIV-1的宿主范围较窄，只限于人和黑猩猩[8]。HIV-1能有效地进入旧大陆猴如恒河猴或非洲绿猴的细胞，却在逆转录阶段前受到限制，不能形成有效感染[9, 10]。这种物种特异性限制HIV-1的作用可能靶向进入细胞的病毒衣壳蛋白，导致病毒逆转录产物的减少，提示有某种限制因子在其中发挥作用。这种因子被称为慢病毒敏感因子（lentivirus susceptibility factor-1, Lv1），其限制作用具有饱和性，即在大量病毒的存在或被其它病毒感染后的限制能力大大减低直至饱和[11, 12]。2004年，Sodroski实验室运用cDNA文库筛选的方法，在恒河猴肺成纤维细胞中克隆鉴定出能有效限制HIV-1复制的*TRIM5*基因，证明了该基因编码的TRIM5α蛋白是导致旧大陆猴不能感染HIV-1的

主要原因[3]。TRIM5α的发现揭示了旧大陆猴中Lv1的本质[13]。

## 二、*TRIM5*基因及其转录本结构

*TRIM5*基因位于*TRIM*家族基因聚集的染色体上，毗邻*TRIM6*、*TRIM34*和*TRIM22*等基因。*TRIM5*由8个外显子和7个内含子组成，其编码的具有限制逆转录病毒能力的异构体蛋白TRIM5α由第2外显子到第8外显子组成，为*TRIM5*最长的剪接异构体。其中，第2外显子编码RING结构域和B-box2结构域，第2外显子到第4外显子编码coiled-coil结构域，第7外显子与第8外显子编码C末端的B30.2（也称为PRYSPRY）结构域。第5和6外显子则编码连接RBCC和B30.2的Linker2区域（L2）（图5–1A）。除了TRIM5α、*TRIM5*还编码至少5种剪接异构体，包括TRIM5γ、TRIM5δ、TRIM5ε、TRIM5κ和TRIM5ι，这些剪接体的剪接模式见图5–1B。TRIM5γ、TRIM5δ、TRIM5κ和TRIM5ι不仅不能限制HIV-1的复制，并且其过表达会引起TRIM5α限制能力的极大降低，提示这些选择性剪接异构体在体内表达量的多少能够调控TRIM5α的限制能力。此外，*TRIM5*选择性剪接异构体的存在也提供了人为限制TRIM5α活性的实验技术手段。

## 三、TRIM5α各个结构域的功能

TRIM5α的每个结构域都有重要的功能：RING结构域具有E3连接酶的活性，能介导自身的泛素化；B-box结构域和L2共同参与TRIM5α的高级聚合结构体的形成；coiled-coil结构域介导TRIM5α低聚体的形成，亦有文献报告coiled-coil序列上氨基酸的变化能调节TRIM5α限制逆转录病毒的特异性；细胞质小体的位置会影响TRIM5α限制病毒的能力，而细胞质小体定位需要L2的参与[15]；B30.2结构域能够特异性地与不同逆转录病毒的衣壳蛋白结合，从而使TRIM5α对逆转录病毒的限制具有物种特异性（species-specific），如人的TRIM5α（huTRIM5α）可限制N型鼠白血病病毒（N-MLV）但不能限制HIV-1、B型鼠白血病病毒（B-MLV）、猫免疫缺陷病毒（FIV）以及马传染病贫血病毒（EIAV），而恒河猴的TRIM5α（rhTRIM5α）可以限制HIV-1和FIV而不限制猴免疫缺陷病毒（SIVmac）[3，16～19]。

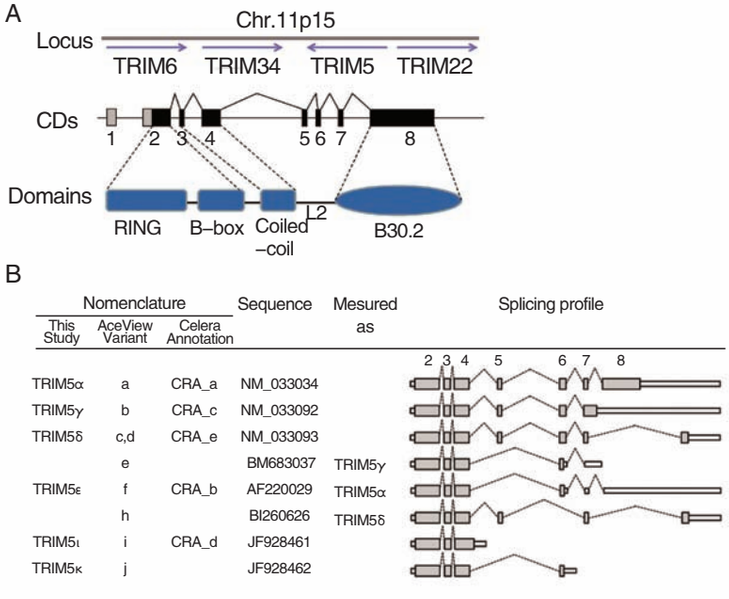



**图5–1　人*TRIM5*结构及其编码的选择性剪接异构体（B改编自文献14）**

（A）人*TRIM5*基因所在位置、转录本结构以及蛋白结构；（B）人*TRIM5*基因选择性剪接异构体的结构。

## 四、TRIM5α mRNA的组织分布

基因的组织分布提示其在宿主中所发挥的潜在功能。对人TRIM5α和恒河猴TRIM5α组织分布的研究显示，TRIM5α广泛分布于宿主的各种组织器官中。无论在人还是在恒河猴中，TRIM5α都在免疫器官组织如淋巴结、脾脏、外周血和胃肠道黏膜中以及生殖系统中表达较高，而在神经系统和泌尿系统中表达较低[20, 21]。在干扰素、病毒或者非特异性刺激剂（如佛波脂、离子霉素）的处理下，人TRIM5α和恒河猴TRIM5α的mRNA水平显著提高[21, 22]。TRIM5α的组织表达分布与其在免疫抵御中所发挥的限制病毒功能相吻合。

## 五、TRIM5α限制逆转录病毒的可能机制

TRIM5α限制HIV-1的特点是造成病毒逆转录产物的大幅度减少。针对TRIM5α限制逆转录病毒机制的研究首先发现，TRIM5α通过其C端的B30.2结构域特异性地与病毒衣壳结合，运用B-box2和L2区域将自身形成六聚体包裹在HIV-1衣壳上，利用自身泛素化提前衣壳蛋白的解离，从而抑制HIV-1逆转录产物的产生[18, 23]（图5–2A）。蛋白酶体抑制剂可恢复HIV-1逆转录产物的产生，却仍然不能恢复2LTR的产生以及不能逆转TRIM5α对HIV-1的限制，提示TRIM5α对逆转录产物入核或者整合起限制作用[24, 25]（图5–2B）。此外，TRIM5α也可以以不依赖B30.2结构域的方式通过降解病毒的Gag蛋白从而限制HIV-1病毒粒子的产生和释放[3, 26~28]。

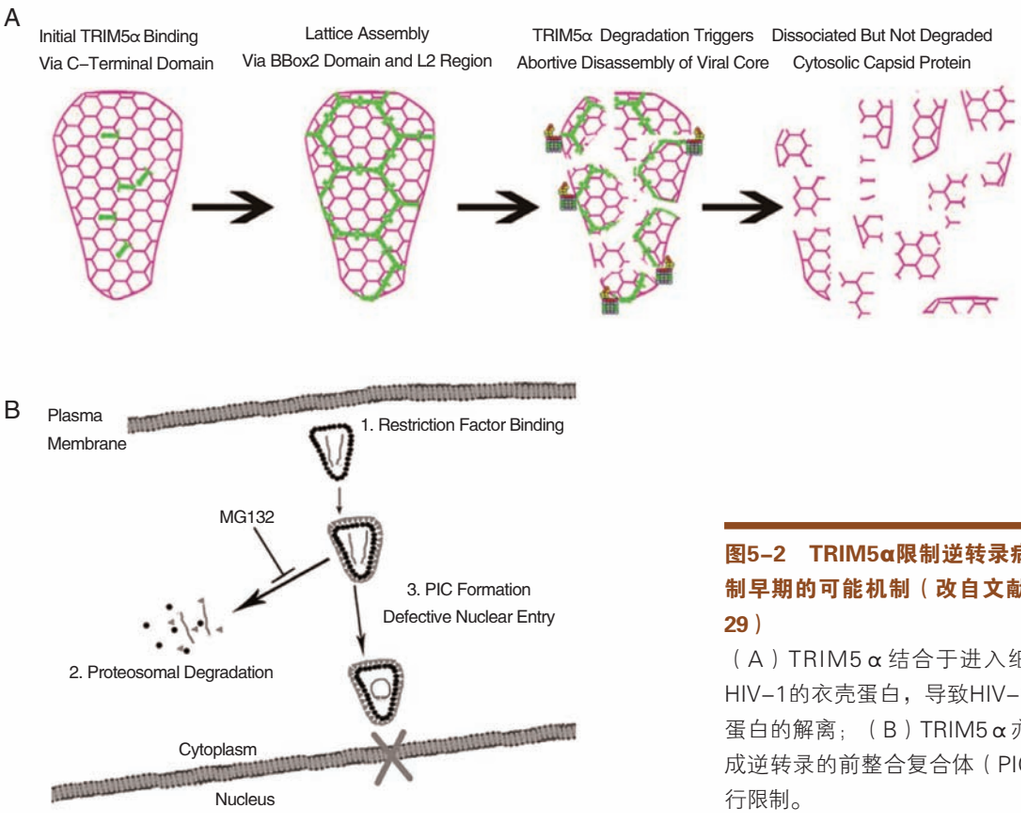



**图5–2 TRIM5α限制逆转录病毒复制早期的可能机制（改自文献25和29）**

（A）TRIM5α结合于进入细胞的HIV–1的衣壳蛋白，导致HIV–1衣壳蛋白的解离；（B）TRIM5α亦对完成逆转录的前整合复合体（PIC）进行限制。

## 六、TRIM5α以物种特异性的方式限制逆转录病毒

不同物种来源的TRIM5α对不同的逆转录病毒有不一样的限制活性，称为限制能力的物种特异性。比如人和大部分新大陆猴的TRIM5α不能限制HIV-1，而大部分旧大陆猴的TRIM5α可以限制HIV-1（表5–1）。具有识别病毒衣壳能力的TRIM5α C端的B30.2结构域对物种特异性起到绝大部分的贡献，特别是B30.2结构域中V1部分，其氨基酸位点的改变可导致限制活性的改变[17]。比如，将huTRIM5α的第332位精氨酸突变为脯氨酸，能够使没有限制HIV-1能力的TRIM5α获得限制能力[30]；而将第336位酪氨酸突变为丙氨酸或者赖氨酸，可使huTRIM5α获得限制B-MLV、SIV和HIV-2的能力[31]。除了B30.2结构域，其它3个结构域以及L2区域某些氨基酸的改变，也能引起限制活性的变化[32～35]。

表5–1　TRIM5α限制逆转录病毒的物种特异性

| Source of TRIM5α | HIV–1 | HIV–2 | SIVmac239 | SIVagmtan | FIV | EIAV | N–MLV | B–MLV |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 人（*Homo sapiens*） | - | - | - | - | - | + | + | – |
| 黑猩猩（*Pan troglodytes verus*） | - | - | - | - | ND | ND | + | – |
| 猩猩（*Pongo pygmaeus abelii*） | - | - | - | - | ND | ND | + | – |
| 恒河猴（*Macaca mulatta*） | + | + | - | + | + | + | + | – |
| 食蟹猴（*Macaca fascicularis*） | + | + | - | ND | ND | ND | ND | – |
| 非洲绿猴（*Cercopithecus aethiops*） | + | + | + | - | + | + | + | – |
| 松鼠猴（*Saimiri boliviensis boliviensis*） | - | ND | + | + | ND | ND | - | – |
| 绢毛猴（*Saguinus labiatus*） | - | ND | + | + | - | ND | - | – |
| 蜘蛛猴（*Ateles geoffroyi*） | + | ND | + | + | ND | ND | - | – |
| 牛（*Bos taurus*） | + | + | + | ND | ND | + | + | – |
| 兔（*Lepus europaeus*） | + | + | + | ND | + | + | + | – |

“+”表示限制；“–”表示不限制；“ND”表示没有实验数据。

## 七、*TRIM5*的进化特征

*TRIM5*基因广泛存在于灵长类、鼠、狗、牛、猪等哺乳类动物中，而不存在于禽类，提示该基因为哺乳类所特有，起源于900万～1800万年前[20]。*TRIM5*基因进化活跃且复杂，在不同物种中经历过基因重复、基因丢失、假基因化以及逆转座子插入等现象。有近1/3哺乳类动物的*TRIM5*发生了基因重复事件，比如牛有5个拷贝，小鼠有3个拷贝，大鼠有8个拷贝，狗、熊猫、海豚等丢失了*TRIM5*基因，猫只有1个拷贝，但是由于假基因化不表达完整的TRIM5α开放阅读框（ORF）[20，36，37]（图

5–3）。此外，*TRIM5*基因为亲环素A（*cyclophilin A, CypA*）基因产生的逆转座子插入的“热点（hotspot）”，在新大陆猴和旧大陆猴中，*CypA*至少4次独立地插入*TRIM5*基因座或基因下游，随之产生了一系列转录本水平、蛋白水平乃至功能水平的变化（详见第二节）。值得注意的是，同许多免疫相关基因一样，*TRIM5*基因在漫长的进化中经历了强大的正向选择作用（positive selection）[38]，特别是*TRIM5*中具有与病毒衣壳相结合能力的B30.2结构域，包含着一段13个氨基酸长度的正向选择位点集中区[16]。

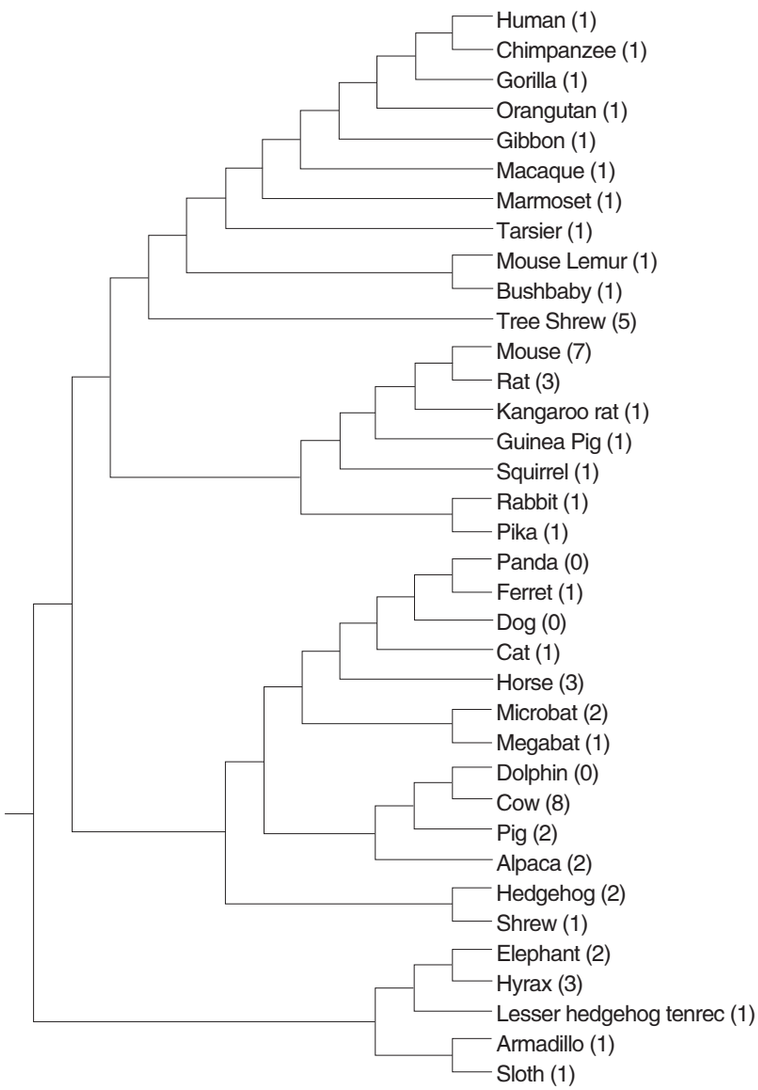



**图5–3　*TRIM5*在不同哺乳类动物中的基因拷贝数**

## 八、TRIM5α参与天然免疫通路

2011年Pertel等[39]研究发现，TRIM5α除了能够直接限制逆转录病毒，还能作为模式识别受体引发抗病毒天然免疫反应，激活信号转导通路和抗病毒细胞因子的表达（图5–4）。TRIM5α通

过具有E3连接酶活性的RING结构域形成K63位的泛素链，与E2结合酶UBC13-UEV1A作用，激活转化生长因子β-激活激酶1（TAK1）复合体的自身磷酸化，进而激活下游的AP-1和NF-κB信号通路。这一活性在逆转录病毒衣壳与TRIM5α结合时加强，即TRIM5α能作为病毒的模式识别受体（PRR）启动天然免疫信号通路。综上，TRIM5α具有双重功能，既可以直接结合病毒衣壳发生限制逆转录病毒作用，也可以通过参与天然免疫信号转导从而启动抗病毒天然免疫反应。

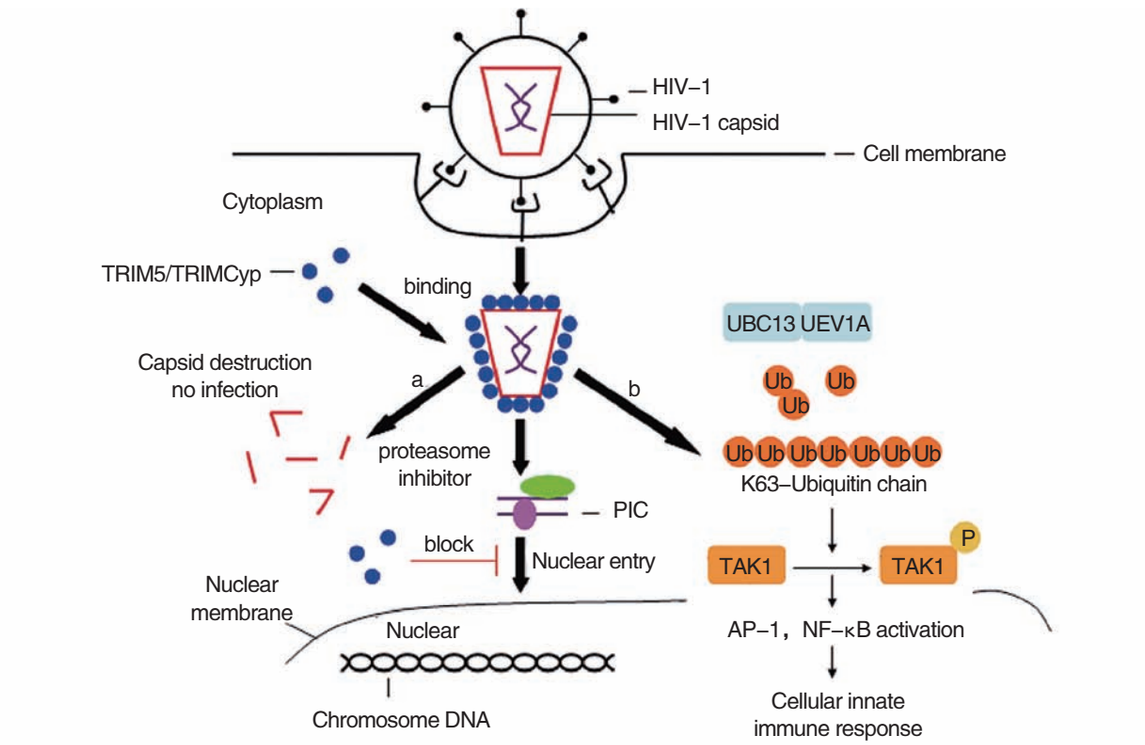



**图5–4　TRIM5α在抗病毒免疫中的双重功能（改自文献40）**

## 第二节　病毒限制因子TRIMCyp

### 一、亲环素A及其逆转座子

亲环素A是一种广泛存在于自然界的细胞质遍在蛋白质，高度保守，具有肽脯氨酰顺反异构酶的活性，催化富含脯氨酸的蛋白质折叠，在一系列生物学过程中发挥重要作用[41，42]。CypA在HIV-1进入人的T细胞后对HIV-1复制也起着重要辅助作用[43～46]，相反，在非洲绿猴和恒河猴的细

胞中却能帮助TRIM5α限制HIV-1的复制[47～49]。CypA的RNA在细胞中大量存在，导致其频繁地发生逆转座。逆转座是基因转录为RNA之后，以RNA为中介逆转录为无内含子的cDNA，cDNA通过LINE-1的介导插到其它基因的座位上的现象，而完成逆转座的cDNA则称为逆转座子。逆转座子活跃地存在于大多数物种的基因组中，影响基因组的组成和进化。迄今发现在人类中，CypA的逆转座子数目居于众多非核糖体基因逆转座子的第2位，有63个之多[50]。在一些物种中，*CypA*通过LINE-1的介导逆转座作用插入到*TRIM5*基因座上，形成*TRIM-cyclophilin A*（*TRIMCyp*）融合基因，选择性地剪接转录翻译后产生TRIMCyp融合蛋白。目前，在灵长类动物中已发现3种不同模式的*TRIMCyp*融合基因，虽然*CypA*在这些*TRIM5*基因座上插入的位置不同，但是插入的CypA结构一致，均包括截断的5端非编码区（5′UTR）、完整且无内含子的编码区、完整的3′UTR、加尾信号、poly（A）尾以及加工型假基因的标志——7～21bp的目标位点重复（terminal site duplication, TSD）[51]。

## 二、灵长类动物TRIMCyp

### （一）鹰猴TRIMCyp

新大陆猴中的鹰猴（*Aotus trivirgatus*）是最先被发现表达TRIMCyp的灵长类物种[52，53]。在鹰猴中，*CypA*插入*TRIM5*基因的第7内含子中，导致*TRIM5*在转录时选择性地将第2外显子至第7外显子与CypA cDNA剪接在一起，而舍弃第8外显子。鹰猴*TRIMCyp*（*omTRIMCyp*）经翻译后形成了由RING、B-box2、coiled-coil和CypA 四个结构域的TRIMCyp融合蛋白。由于CypA有与HIV-1病毒衣壳结合的能力，故能代替B30.2结构域与进入细胞的HIV-1衣壳结合，再由RBCC结构域发挥限制病毒的效应。因此，鹰猴即使缺乏TRIM5α，也能由TRIMCyp执行限制HIV-1的功能。目前，研究发现鹰猴模式的*TRIMCyp*只存在于夜猴属的4个种里，分别为带领夜猴（*Aotus infulatus*）、阿市夜猴（*A. azarae*）、鹰猴（*A. trivirgatus*）和鬼夜猴（*A. lemurinus*），而在另外15个属的新大陆猴中均未发现*TRIMCyp*的存在[54]。由于夜猴属所属的青猴亚科与其亲缘关系最近的卷尾猴亚科分开的时间大约在2200万年前，夜猴属进化辐射成各个种的时间大约在450万年前，故可推测*omTRIMCyp*的形成是在2200万年之后，450万年之前。

### （二）北平顶猴TRIMCyp

2007年，我们及其它研究人员在旧大陆猴猕猴属的巽他平顶猴（*Macaca nemestrina*）、北平顶猴（*M. leonina*）和熊猴（*M. assamensis*）中也发现了另外一种模式的*TRIMCyp*的存在，命名为*npmTRIMCyp*（northern pig-tailed macaque *TRIMCyp*）[55～57]。与此同时，同属猕猴属的印度恒河猴（*M. mulatta*）、食蟹猴（*M. fascicularis*）和狮尾猴（*M. silenus*）中也被发现存在*npmTRIMCyp*。与*omTRIMCyp*的形成相似，*npmTRIMCyp*的产生也是由于*TRIM5*基因座上插入了CypA逆转座子，但不同的是，*npmTRIMCyp*中CypA插入的位置是在*TRIM5*第8外显子下游的3′末端非翻译区（3′UTR），并且翻译形成的TRIMCyp融合蛋白由TRIM5的第2外显子至第6外显子融合CypA逆转座子形成，缺失第7和8外显子编码的氨基酸。与omTRIMCyp能限制HIV-1的能力不同，大部分旧大陆猴中表达的npmTRIMCyp不能限制HIV-1，而部分食蟹猴表达的npmTRIMCyp能限制HIV-1，表现出限制的物种特异性（具体见下文）。相比*omTRIMCyp*的产生时间，*npmTRIMCyp*形成较晚，形成于600万年之后，200万年之前[58]。

### （三）TRIMCypA3

2013年，Malik团队[59]通过生物信息学和进化分析的方法，对灵长类物种基因组进行筛查，发现了另外2种*CypA*逆转座于*TRIM5*的模式，并将之命名为*TRIMCypA3*和*TRIMCypA4*。*TRIMCypA3*中的*CypA*插入位置在*TRIM5*下游15kb处的*TRIMP1*基因座上，能形成*TRIMCyp*融合转录本，为第3种*TRIMCyp*融合基因模式。*TRIMCypA4*中*CypA*插入位置在*TRIM5*下游更远处（约99kb处）的*TRIM6*基因中，但是无法在相应物种中检测到融合的转录本，故不能称之为*TRIMCyp*融合基因。*TRIMCypA3*的转录本结构与*omTRIMCyp*一样，由*TRIM5*的第2外显子至第7外显子与CypA逆转座子组成，而蛋白结构与omTRIMCyp和npmTRIMCyp都一样，由RBCC和CypA结构域组成。但是，*TRIMCypA3*由于CypA结构域的提前终止密码子变为了假基因。经推测，*TRIMCypA3*产生于4300万年。功能实验发现，用所推测出的4300万年前刚形成的具有完整ORF的TRIMCypA3拥有广谱的抗病毒活性，能限制HIV-1、HIV-2、SIV、FIV等逆转录病毒。然而，TRIMCypA3的抗病毒活性在其形成后的1300万年后丧失，这有可能是导致*TRIMCypA3*的选择压力丧失并成为假基因的原因[59]。

综上，*CypA*在灵长类中至少4次独立地插入*TRIM5*或*TRIM5*下游的基因中，这在进化上是一种非常罕见的现象。3种不同模式的*TRIMCyp*的独立形成和进化揭示了在宿主与病毒千百万年的相互竞争中所产生的一种趋同进化现象，提示*TRIMCyp*可能不是随机产生的，而很有可能是在病毒侵染的压力下宿主的病毒限制因子*TRIM5*招募而来。

### （四）TRIMCyp限制逆转录病毒的可能机制

TRIMCyp能够限制逆转录病毒，得益于具有结合病毒衣壳能力的CypA结构域，以及*TRIM5*的3个效应结构域：RING、B-box2和coiled-coil结构域。研究证明CypA的疏水区可以与HIV-1衣壳蛋白N端的L4/5直接结合，帮助HIV-1在人类细胞中的有效复制，这一结合作用能被CypA的竞争拮抗剂CsA阻断，亦能通过改变HIV-1衣壳蛋白L4/5的第90位脯氨酸及邻近氨基酸进行抑制[46，60～62]。*CypA*通过逆转座插入*TRIM5*基因后编码的完整CypA结构域保留了其结合HIV-1及其它逆转录病毒衣壳蛋白如FIV、SIVagm的能力[60]，故即使取代了特异性与病毒衣壳结合的B30.2结构域，依旧能指引TRIMCyp与病毒结合，使其余3个效应结构域发挥限制病毒的能力[19]。环孢霉素（cyclosporine，CsA）作为CypA的拮抗剂，能够破坏CypA与衣壳之间的结合，从而逆转病毒被TRIMCyp限制的局面[52，53，63]。另一方面，CypA的重要性还体现在将其它物种的TRIM5α或者TRIM家族的其它蛋白的RBCC结构域人为地与CypA融合后，产生的蛋白能够限制HIV-1等逆转录病毒[64～67]，这也为合成新型限制因子提供了策略。

TRIMCyp以与TRIM5α相似的机制限制HIV-1的复制。TRIMCyp也能加速HIV-1衣壳蛋白的解离，限制逆转录产物的产生，在病毒感染2小时后便不能被CsA逆转。人工合成的TRIM1-CypA、TRIM18-CypA和TRIM19-CypA虽然不能限制逆转录产物的产生，但是会极大地减少2LTR（逆转录产物整合标志）的产生，提示TRIMCypA在整合阶段也对病毒发挥了限制作用。另外，同TRIM5α一样，TRIMCyp也是以物种特异性的方式对逆转录病毒进行限制（表5–2）。对TRIMCyp限制病毒的能力影响最显著的是CypA结构域的第66、69和143位氨基酸：鹰猴TRIMCyp可以限制HIV-1、FIV和SIVagm，不限制HIV-2、SIVmac和EIAV。其CypA结构域第69位突变后的DH可以限制HIV-1，并且限制HIV-2的能力增强[68]；旧大陆猴中4种猴的TRIMCyp由于很可能源于共同祖先，故导致这几种猴的TRIMCyp有相似的限制病毒范围和能力（表5–2）。如恒河猴、平顶猴和

北平顶猴TRIMCyp都不限制HIV-1和SIVmac，但都限制HIV-2。食蟹猴TRIMCyp进化出了至少2种等位基因，其主要等位基因可以限制HIV-1而不限制HIV-2，恰恰相反，次要等位基因限制HIV-2而不限制HIV-1。限制HIV-1和HIV-2与否的能力皆为CypA结构域的氨基酸序列决定，少数氨基酸的变异即可引起蛋白质高级结构的效应环发生构象变化，导致限制能力的改变。旧大陆猴的原始CypA在69位为精氨酸，结合HIV-2的能力很弱，而旧大陆猴中所有4个物种的TRIMCyp皆为组氨酸，能够很好地结合HIV-2的能力从而限制HIV-2。原始CypA和食蟹猴TRIMCyp主要等位基因的第69位为天冬氨酸，CypA能结合HIV-1并限制HIV-1，而恒河猴、平顶猴和北平顶猴TRIMCyp以及食蟹猴TRIMCyp次要等位基因的第69位为天冬酰胺，这一突变使TRIMCyp失去了结合和限制HIV-1的能力。另外，CypA结构域的第143位氨基酸若由谷氨酸突变为赖氨酸后，结合HIV-2 CA的亲和力也被削弱。此外，第54位氨基酸的单突变（H54R）能改变食蟹猴TRIMCyp限制HIV-1和FIV的能力[69]。正如TRIM5α的B30.2结构域在与外界病原体的博弈下多样化，旧大陆猴TRIMCyp的CypA结构域也在选择压力下进化出不同等位基因以与病毒或其它病原抗衡。

表5–2　TRIMCyp限制逆转录病毒的物种特异性

| Source of TRIMCyp | HIV–1 | HIV–2 | SIVmac | SIVagm | SIVsm | FIV | EIAV | N–MLV |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| omTRIMCyp模式 | | | | | | | | |
| 鹰猴（*Aotus trivirgatus*） | + | - | - | + | ND | + | - | - |
| npmTRIMCyp模式 | | | | | | | | |
| 恒河猴（*Macaca mulatta*） | - | + | - | ND | + | + | - | - |
| 食蟹猴（*Macaca fascicularis*） | | | | | | | | |
| 主要等位基因 | + | - | - | + | ND | + | ND | ND |
| 次要等位基因 | - | + | - | ND | ND | | ND | ND |
| 平顶猴（*Macaca nemestrina*） | - | + | - | + | ND | + | ND | ND |
| 巽他平顶猴（*Macaca leonina*） | - | + | - | ND | ND | + | ND | ND |
| 熊猴（*Macaca assamensis*） | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND |
| TRIMCypA3模式 | | | | | | | | |
| | - | - | ND | ND | ND | - | ND | ND |

“+”表示限制；“–”表示不限制；“ND”表示没有实验数据。

## 第三节　树鼩*TRIM5*的研究

### 一、树鼩*TRIM5*基因及其转录本结构

通过对树鼩全基因组的分析，我们发现树鼩一共有5个*TRIM5*基因拷贝（图5–5）。树鼩*TRIM5*的基因重复事件发生在树鼩与其它物种分化之后，表明此基因重复事件是树鼩物种独立产生（图5–5）。同人*TRIM5*和猴*TRIM5*在染色体上的位置一样，树鼩*TRIM5*也与*TRIM6*、*TRIM22*毗

邻，但是不同的是，树鼩中*TRIM34*缺失，其原因可能是因为其功能被重复的*TRIM5*拷贝所替代。由图5–5亦可知，树鼩*TRIM5*的5个拷贝不是由1次重复事件发生而得到，而是由3次的重复事件所产生。

树鼩的5个*TRIM5*基因拷贝中，有4个拷贝可以编码完整的TRIM5α（另1个拷贝为*TRIMCyp*基因，详见下文），并均表现出经典的结构域构成，即第2外显子到第8外显子编码了RING、B-box、coiled-coil和B30.2结构域。这4种TRIM5α的序列同源性约为70%。RING和B-box结构域较为保守，而coiled-coil和B30.2结构域以及连接这2个结构域的L2序列有较大变异，显示出基因重复之后各个*TRIM5*拷贝快速进化导致的差异。

## 二、树鼩*TRIM5*的组织分布和功能

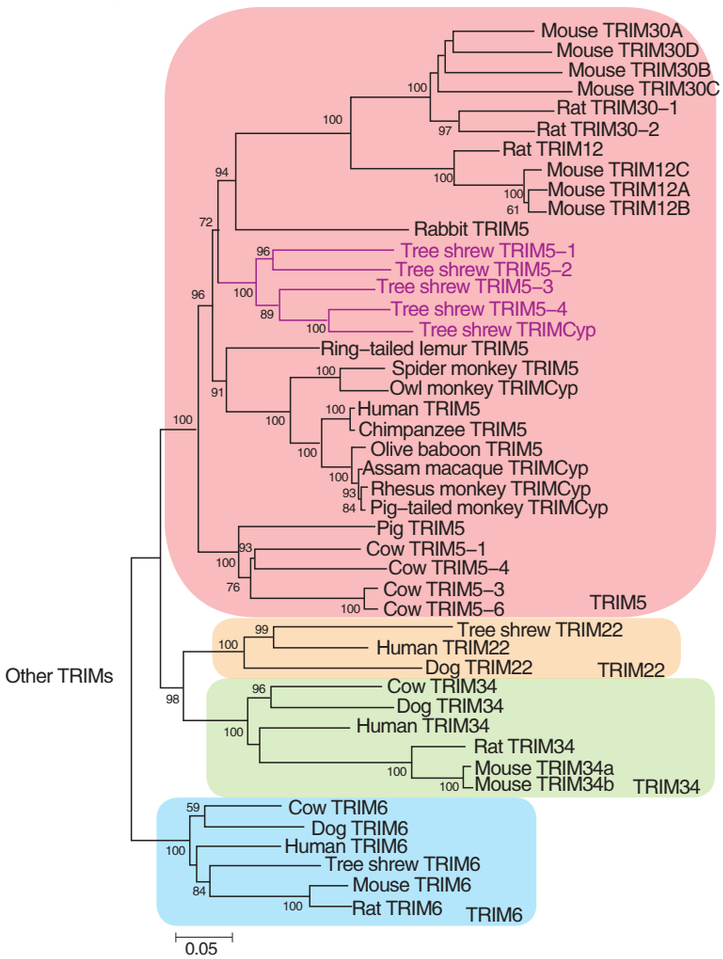



**图5–5　树鼩*TRIM5*基因组结构及其系统发育树**

用哺乳类的各代表物种*TRIM5*所构建的Neighbor–joining（NJ）树，以*TRIM22/34/6*为外群。TRIM5–1、TRIM5–2、TRIM5–3、TRIM5–4分别为第三章图3–15中的TRIM5–D5、TRIM5–D1、TRIM5–D2、TRIM5–D3。

### （一）树鼩*TRIM5*的组织分布

我们选取其中一个TRIM5α（由*TRIM5-1*编码）作为代表，用于研究树鼩TRIM5α的组织分布和功能。24种树鼩组织如心、肺、脾、肝、肾、外周血等从一只健康的雄性树鼩中分离。荧光实时定量PCR实验结果表明，TRIM5α mRNA广泛地表达于各个组织中，在淋巴组织如淋巴结、肠道黏膜、外周血中表达最高，提示树鼩TRIM5α在免疫系统中发挥较重要的作用（图5–6）。这种表

达模式与恒河猴TRIM5α相似[21]。另外，树鼩TRIM5α在心脏中表达量也较高，提示树鼩TRIM5α可能有其它方面的功能。相对而言，在神经器官和生殖系统中的表达量较低。

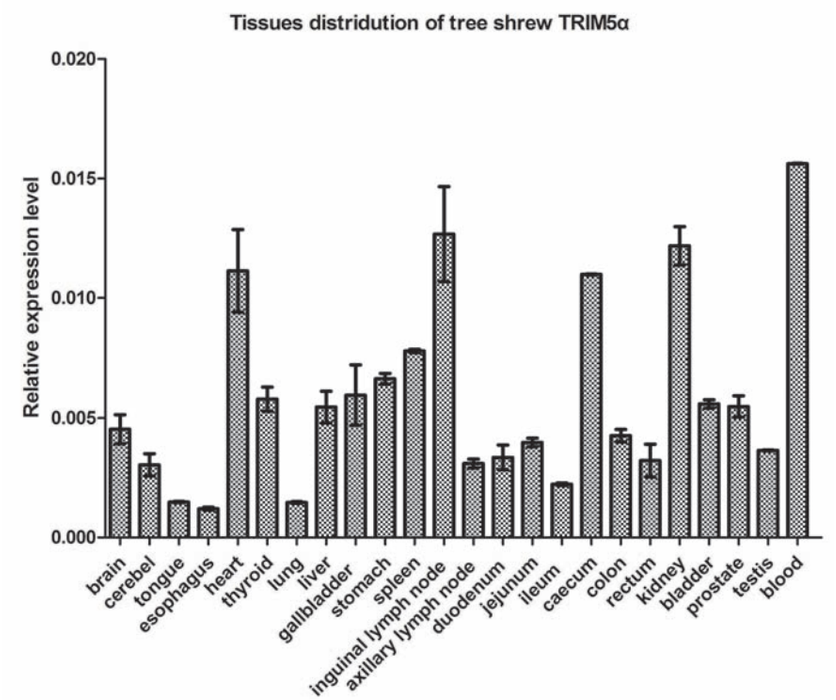



**图5-6　树鼩TRIM5-1 mRNA的组织分布**

## （二）树鼩TRIM5-1不能限制HIV-1的产生释放

研究发现rhTRIM5α能通过降解Gag蛋白来阻止HIV-1的释放以及降低HIV-1病毒颗粒的感染能力，而huTRIM5α不能限制HIV-1病毒颗粒的释放[28]。因此，我们通过HIV-1释放实验来检测树鼩TRIM5α（TRIM5-1）是否能限制HIV-1。HIV-1R3A为既能感染表达CXCR4的细胞，又能感染表达CCR5的细胞的双嗜性病毒，pNL4-R3Anef+为HIV-1R3A的表达质粒。我们在树鼩TRIM5-1的C末端终止密码子后面接上HA蛋白标签，将之连接入真核表达载体pLPCX，得到pLPCX-tsTRIM5α-

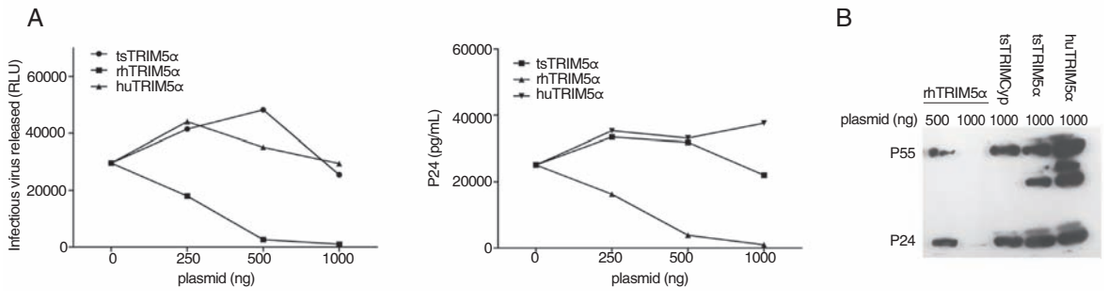



**图5-7　树鼩TRIM5α（TRIM5-1）不能限制HIV-1的产生释放**

（A）树鼩TRIM5α（TRIM5-1）对新产生的HIV-1颗粒的感染力和数量没有影响；（B）Western blot检测细胞中HIV-1 p24抗原。

HA。将pNL4-R3Anef+与pLPCX-tsTRIM5α-HA共同瞬时转染293T细胞，48小时后收取细胞培养上清，同时裂解细胞提取蛋白质。同时，用pLPCX-rhTRIM5α-HA作为阳性对照，用pLPCX-huTRIM5α-HA作为阴性对照。HIV-1病毒粒子的产生包括Gag蛋白的水解形成成熟蛋白p24的步骤，故通过检测培养上清和细胞中HIV-1 p24能分析HIV-1的产生和释放，另外亦通过将转染上清感染指示细胞TZM-bl来检测HIV-1病毒粒子的感染力。结果显示，与此前的报道一致，rhTRIM5α降解Gag蛋白从而减少HIV-1的产生。树鼩TRIM5-1则与阴性对照的人TRIM5α一样，均不能抑制HIV-1的产生和释放（图5–7）。

## 第四节 树鼩*TRIMCyp*的研究

### 一、树鼩*TRIMCyp*形成模式

由上述研究可以看到，宿主与外界病原体斗争引起的协同进化导致宿主一方的基因进化更复杂更多样化。*TRIM5*在漫长的进化历史中，或采取基因重复，或采取招募CypA逆转座子形成有限制能力的TRIMCyp的手段来对抗病原。但现今的研究主要集中于灵长类动物中，为具体了解整个哺乳类中*TRIM5*基因的进化，我们对哺乳类共36个已公布全基因组序列的物种的*TRIM5*基因进行分析。结果我们发现，仅在树鼩这种与灵长类亲缘关系最近的物种中，存在*TRIM5*既发生基因重复，又有CypA逆转座子插入的现象（图5–8）。

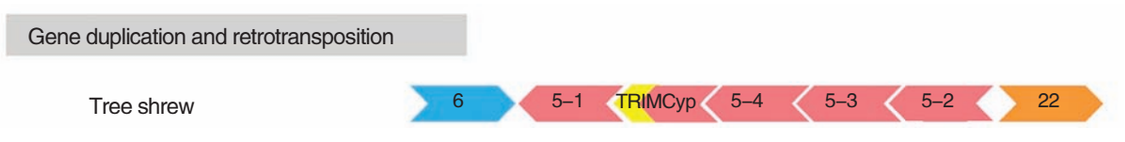



**图5–8 树鼩*TRIMCyp*基因模式示意图**

由于基因组序列的不完全，不能准确地定位*CypA*在*TRIM5*基因座上插入的具体位置，于是我们提取了树鼩DNA进行PCR扩增测序。用设计在*TRIM5*第6外显子的正向引物和第8外显子的反向引物，我们得到了2条大小不一的条带（图5–9A）。经测序，1.1kb左右的产物为*TRIM5*第6外显子到第8外显子的片段；2kb的产物则为含有CypA cDNA序列的*TRIM5*第6外显子到第8外显子片段。序列分析表明*CypA*插入于*TRIM5*第8外显子的前端，与之前研究报道的3种*TRIMCyp*中CypA位置均不一致，提示在树鼩*CypA*插入*TRIM5*的事件独立于其它物种*TRIMCyp*的产生。插入的CypA序列含有明显的逆转座子的标志，如插入位点的TSD“ATTGT”，残留的部分CypA 5′UTR序列以及3′端的polyA尾（图5–9B）。另外，由于碱基突变，CypA的起始密码子“ATG”变为“TTG”，并且CypA序列中含有多个提前终止密码子。

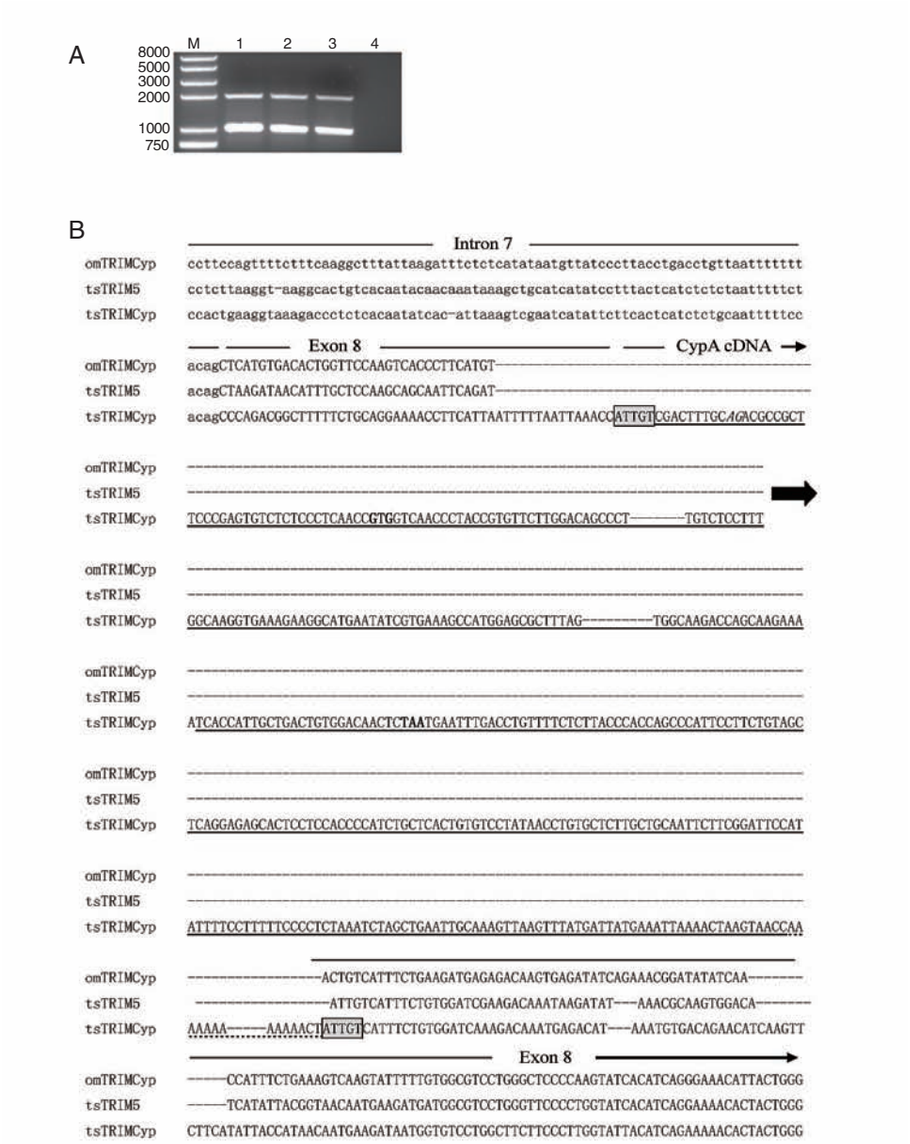



**图5–9　树鼩*CypA*在*TRIM5*基因上的插入位置**

（A）用设计在*TRIM5*第6和8外显子的引物扩增出*TRIM5*和*TRIMCyp*的片段；（B）树鼩*CypA*插入*TRIM5*的第8外显子前端。下划线部分为*CypA*插入区域，圆点标记的碱基为CypA cDNA的polyA尾，灰色框中为TSD序列。tsTRIM5：树鼩*TRIM5* DNA；tsTRIMCyp：树鼩*TRIMCyp* DNA。

*TRIMCypA4*因移码突变而假基因化，亦检测不到其融合转录本[59]。由于树鼩*TRIMCyp*存在多个提前终止密码子，我们继而检测树鼩是否有其转录本的表达。用设计于*TRIM5* 5′UTR和CypA末端的引物，我们从树鼩全血RNA中扩增得到了1.5kb左右的产物，经测序，产物为*TRIMCyp*的cDNA，表明树鼩*TRIMCyp*被顺利表达（图5–10），证实树鼩*TRIMCyp*为融合基因（我们命名为*tsTRIMCyp*）。*tsTRIMCyp*融合基因转录翻译后的蛋白由*TRIM5*的第2外显子到第7外显子与CypA cDNA编码的RING、B-box2、coiled-coil和CypA四个结构域组成。与DNA水平的测序结果一致，

tsTRIMCyp cDNA的CypA部分不仅包含若干个提前终止密码子，并且有移码突变，导致CypA结构域的序列与其它*TRIMCyp*差异很大，同时*tsTRIMCyp*提前终止。

综上所述，在树鼩中，*TRIM5*基因发生重复之后，*CypA*经LINE-1所介导的逆转座作用插入*TRIM5*的其中一个拷贝上的第8外显子前端，形成*TRIMCyp*融合基因。树鼩*TRIMCyp*的产生独立于前3种模式的*TRIMCyp*，这4种*TRIMCyp*模式在存在物种、基因结构、剪接模式和蛋白结构的异同见图5–11。

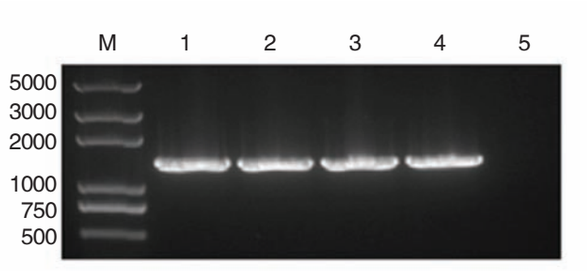



**图5–10　树鼩*TRIMCyp*被表达**

树鼩TRIMCyp cDNA的检测。M：marker；泳道1～4：4只树鼩的TRIMCyp cDNA；泳道5：水。

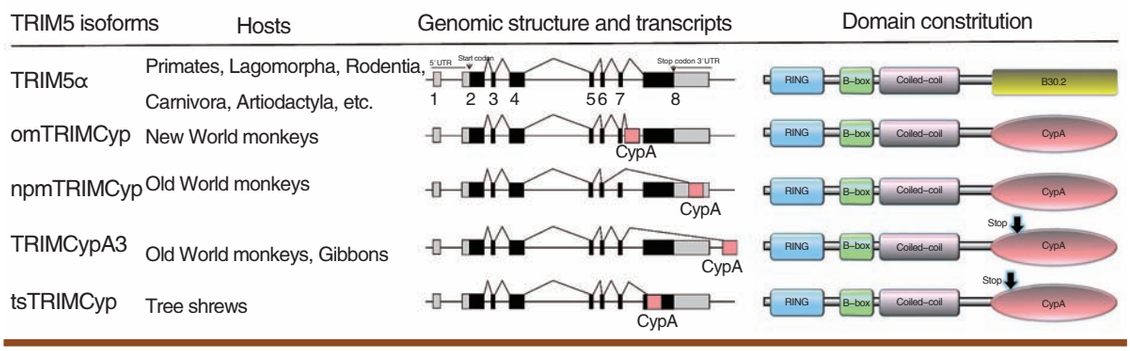



**图5–11　4种不同模式*TRIMCyp*的比较**

以TRIM5α为对照，4种不同模式*TRIMCyp*在物种分布、基因结构、转录本结构和蛋白结构上的比较。转录本示意图中灰色部分代表TRIM5α的非编码区，黑色部分代表TRIM5α的编码区，红色区域为CypA插入序列。黑色箭头代表序列中第一个提前终止密码子。

## 二、树鼩*TRIMCyp*在攀鼩目与灵长目/皮翼目分化后产生并固定

已发布的北树鼩基因组和中缅树鼩基因组中都能检测到*CypA*插入*TRIM5*基因座的现象，并且我们随机挑选的4只树鼩都存在tsTRIMCyp转录本，因此我们猜测*tsTRIMCyp*可能在树鼩种群中固定了下来。为检测*tsTRIMCyp*是否固定于树鼩，我们采集了来自于昆明郊外随机捕获的68只树鼩的DNA，经特异性引物PCR扩增发现，每一只树鼩都同时存在*TRIMCyp*和*TRIM5*，提示*TRIMCyp*融合基因形成后在树鼩中固定下来（图5–12A）。

为了检测*TRIMCyp*融合基因产生的时间，我们对攀鼩目的近亲进行*CypA*插入*TRIM5*与否的检验。研究报道，攀鼩目（Scandentia）与灵长目（Primates）和皮翼目（Dermoptera）进化关系最近，统归于真统兽总目（Euarchonta），但是这三者之间的相互关系尚处争议中[70]。这里，我们选取了小懒猴（原猴亚目，更接近原始灵长类）（*Nycticebu spygmaeus*）和马来西亚飞狐猴（*Galeopteru svariegatus*），分别代表灵长目和皮翼目。结果显示，在小懒猴和马来西亚飞狐猴所提取的DNA中扩增得到不含*CypA*插入的*TRIM5*第6外显子到第8外显子片段（图5–12B）。另外，对已公布基因组的原猴亚目如鼠狐猴（*Microcebus murinus*）和丛猴（*Otolemur Garnettii*）进行检

查，亦未在*TRIM5*上发现*CypA*的插入。这表明，*CypA*逆转座于*TRIM5*这一事件，发生于攀鼩目与灵长目/皮翼目分化后。

## 三、树鼩*TRIMCyp*的组织分布

所用组织为检测TRIM5-1 mRNA的同一只树鼩的相同组织。结果可见，树鼩TRIMCyp mRNA在各个组织中均有分布，但在免疫组织中表达量最高，特别是最重要的二级免疫器官脾脏和外周血，在黏膜免疫组织如十二指肠、直肠等表达量也较高；在神经系统、生殖系统等组织中表达量最少（图5–13）。这提示树鼩TRIMCyp在免疫系统中发挥重要作用。另外，树鼩*TRIM5-1*和*TRIMCyp*的分布并不完全一致，提示两者在功能上有所分化，各有发挥。

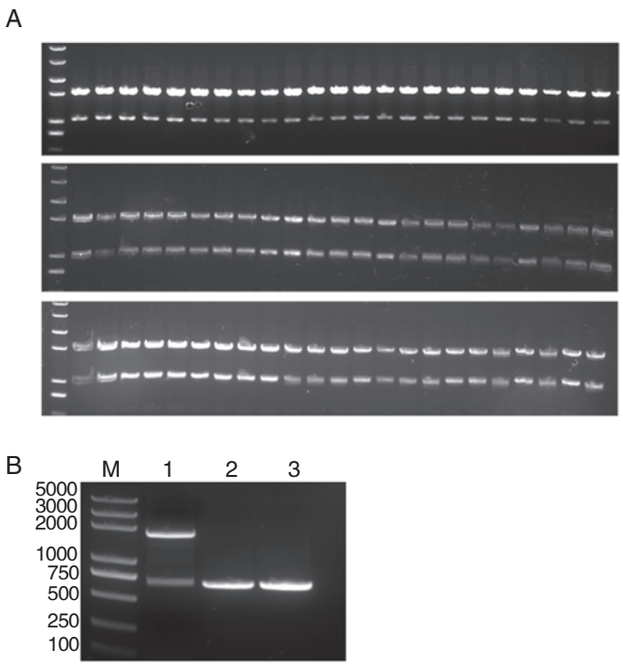



**图5–12　树鼩*TRIMCyp*在攀鼩目与灵长目/皮翼目分化后产生并固定**
（A）在随机抽取的68只树鼩中均检测到树鼩*TRIMCyp*的存在；（B）树鼩*TRIMCyp*在攀鼩目与灵长目/皮翼目分化后产生。M：marker；1：树鼩；2：小懒猴；3：马来西亚飞狐猴。

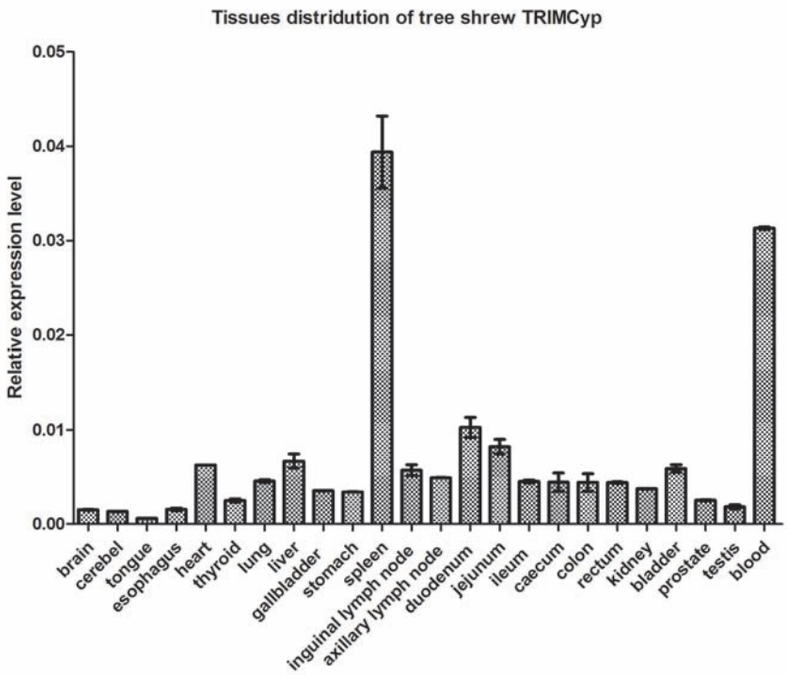



**图5–13　树鼩TRIMCyp mRNA的组织分布**

## 四、树鼩*TRIMCyp*的RBCC结构域与*TRIM5*的RBCC结构域所受选择压力不同

病毒和宿主因子的相互作用促使两者共同进化，在基因水平上发生大量非同义突变。某些对自身有利的突变固定下来，以适应外界环境的需要，是为正向选择。对于一个基因而言，经历正向选择意味着在进化历程中对某一因素的适应，有时也意味着某些新功能的产生。对于限制因子来说，正选择发生的位点多集中在与病原体相互作用的位置，例如，TRIM5α中大多数正选择位点坐落于与HIV-1衣壳相作用的B30.2结构域，尤其在B30.2的V1环形成了由13个氨基酸组成的“patch”[16，38]。除了B30.2结构域，也有研究发现coiled-coil结构域中也有若干氨基酸经历了正向选择，而这些氨基酸与TRIM5α特异性限制病毒的能力相关[33]。另外，许多物种如猕猴、鼠、牛等的*TRIM5*都经历了正向选择，提示这一基因对宿主适应环境的重要性[36，71]。这里，我们检测了树鼩*TRIMCyp*和4个具有完整ORF的*TRIM5*基因是否也经历了正向选择。由于*TRIM5*的B30.2结构域进化速率快，可能对分析结果造成偏差，故舍去第8外显子，选择编码RBCC结构域的第2外显子到第7外显子进行分析[36]。由表5–3可见，只有*TRIMCyp*的RBCC结构域经历了正向选择（$P<0.001$），而4个拷贝的*TRIM5*都没有明显的正向选择标志，这表明树鼩*TRIMCyp*与其同源的4个*TRIM5*基因所受选择压力在进化历程中已不一致，提示*TRIMCyp*融合基因在形成后有与*TRIM5*不同的新功能产生，而这种功能可能就是导致其在种群中固定下来的原因。对受正向选择位点的分析显示可能的位点分部于各个结构域，其中coiled-coil结构域和连接coiled-coil和CypA结构域的L2是*tsTRIMCyp*中受正选择位点最多的区域（表5–3）。可以明显看到，受正选择的位点coiled-coil结构域和L2区域中各自形成了2个“patch”，分别为第173～189位氨基酸和第264～282位氨基酸，提示这2个区域对tsTRIMCyp的功能起到重要作用。

表5–3　检测树鼩*TRIM5/TRIMCyp*基因的正向选择

| Foreground Branches | 2ΔlnL | P–value | Positively Selected Sites (BEB analysis) |
|---|---|---|---|
| *TRIM5-1* | 0 | *P*=0.995 | 170L |
| *TRIM5-2* | 1.605636 | *P*>0.1 | 191S　259L　266P |
| *TRIM5-3* | 0 | *P*=0.995 | 78R |
| *TRIM5-4* | 0 | *P*=0.995 | — |
| *TRIMCyp* | 18.22523 | ***P* < 0.001** | 8N　173C　177S<br>189L　264T　276I<br>**277L**　279E　282E |

amino acids with Bayesian posterior possibilities of >0.9 are shown in bold.

## 五、树鼩*TRIMCyp*不能限制HIV–1和SIVmac

据文献报道，omTRIMCyp和npmTRIMCyp以物种特异性的方式限制逆转录病毒，如omTRIMCyp和食蟹猴DK型TRIMCyp能限制HIV-1，但平顶猴TRIMCyp却不能。而假基因化的*TRIMCypA3*融合基因在4300万年前刚形成时，对大部分逆转录病毒都有限制作用[52，53]。TRIMCyp限制HIV-1的机制不完全清楚，但有研究表明，TRIMCyp能在HIV-1进入细胞后整合入细胞基因组之前对其发生限制，导致逆转录产物大量减少[19，72]。这里，我们检测树鼩TRIMCyp是否有限制HIV-1和SIVmac的能力。首先，我们检测在病毒复制早期，tsTRIMCyp是否能发挥限制作用。

我们使用了可表达绿色荧光蛋白（green fluorescent protein, GFP）的HIV-1和SIVmac的假病毒（pseudoviruses）：HIV-1-GFP和SIVmac-GFP。假病毒的包装由3种质粒（HIV-1：pCMVΔR8.2、pMD2.G、Trip-GFP；SIVmac：pSIV3+、pMD2.G、Trip-GFP）共同转染于293T细胞中得到，在感染细胞时只能进行单轮复制，不可再包装释放病毒粒子感染其它细胞。tsTRIMCyp被连入真核表达载体pLPCX，并在C末端加上HA蛋白标签，得到pLPCX-tsTRIMCyp-HA真核表达质粒。pLPCX-tsTRIMCyp-HA被稳定转染于猫肾细胞（CRFK）中，另设稳定转染空载体pLPCX的CRFK为阴性对照，稳定转染pLPCX-omTRIMCyp-HA的CRFK为阳性对照。图5–14A表明稳定转染细胞中目的基因的表达量相似（图5–14A）。用HIV-1-GFP和SIVmac-GFP分别感染3种稳定转染细胞，结果显示，omTRIMCyp能限制HIV-1，而tsTRIMCyp与空载体一样，不能限制HIV-1。另外，tsTRIMCyp也不能限制SIVmac（图5–14B）。

此外，我们也检测tsTRIMCyp是否能限制HIV-1的产生释放。将pNL4-R3Anef+（编码双嗜性HIV-1）与pLPCX-tsTRIMCyp-HA共同转染239T细胞。同样的，这里仍然用pLPCX-rhTRIM5α-HA作为阳性对照，pLPCX-huTRIM5α-HA为阴性对照。转染48小时后收集上清，将一部分上清感染

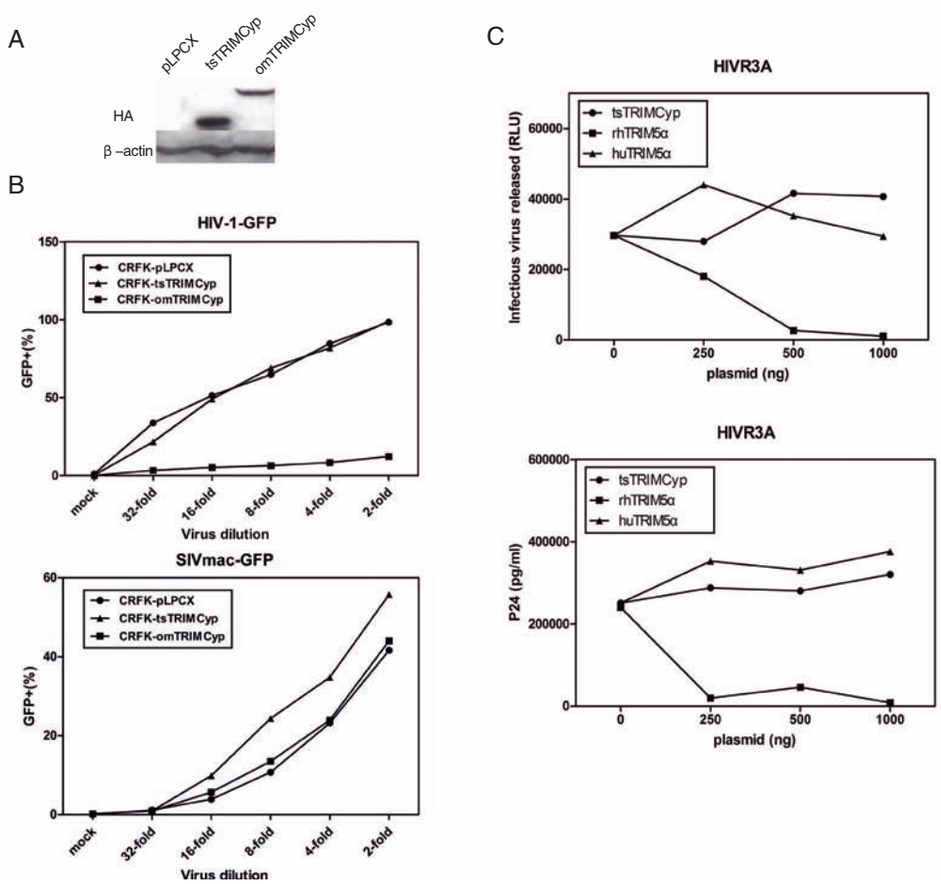



**图5–14　树鼩TRIMCyp不能限制HIV–1和SIVmac**

（A）Western blot检测稳定转染CRFK细胞中tsTRIMCyp与omTRIMCyp的表达；（B）tsTRIMCyp不能限制HIV–1–GFP和SIVmac–GFP；（C）tsTRIMCyp不能限制HIV–1的产生释放。

TZMbl细胞检测释放的HIV-1病毒粒子的感染能力，另一部分上清用于检测p24浓度，并检测转染细胞中HIV-1的Gag和p24蛋白含量。实验结果表明tsTRIMCyp同tsTRIM5-1一样，都不能抑制HIV-1R3A的产生释放（图5–14C）。

综上，tsTRIMCyp不能限制HIV-1和SIVmac。然而，我们也不能排除tsTRIMCyp限制其它病毒的可能。

## 六、树鼩*TRIMCyp*参与天然免疫调控

虽然tsTRIMCyp不能限制HIV-1和SIVmac，但其在树鼩种群中的固定、在进化中经受正向选择以及在免疫系统中的高表达均提示tsTRIMCyp在免疫系统中可能发挥作用。研究报道，TRIM5所属的TRIM家族共有近百成员，其中许多成员有参与天然免疫反应、调控免疫通路的功能。例

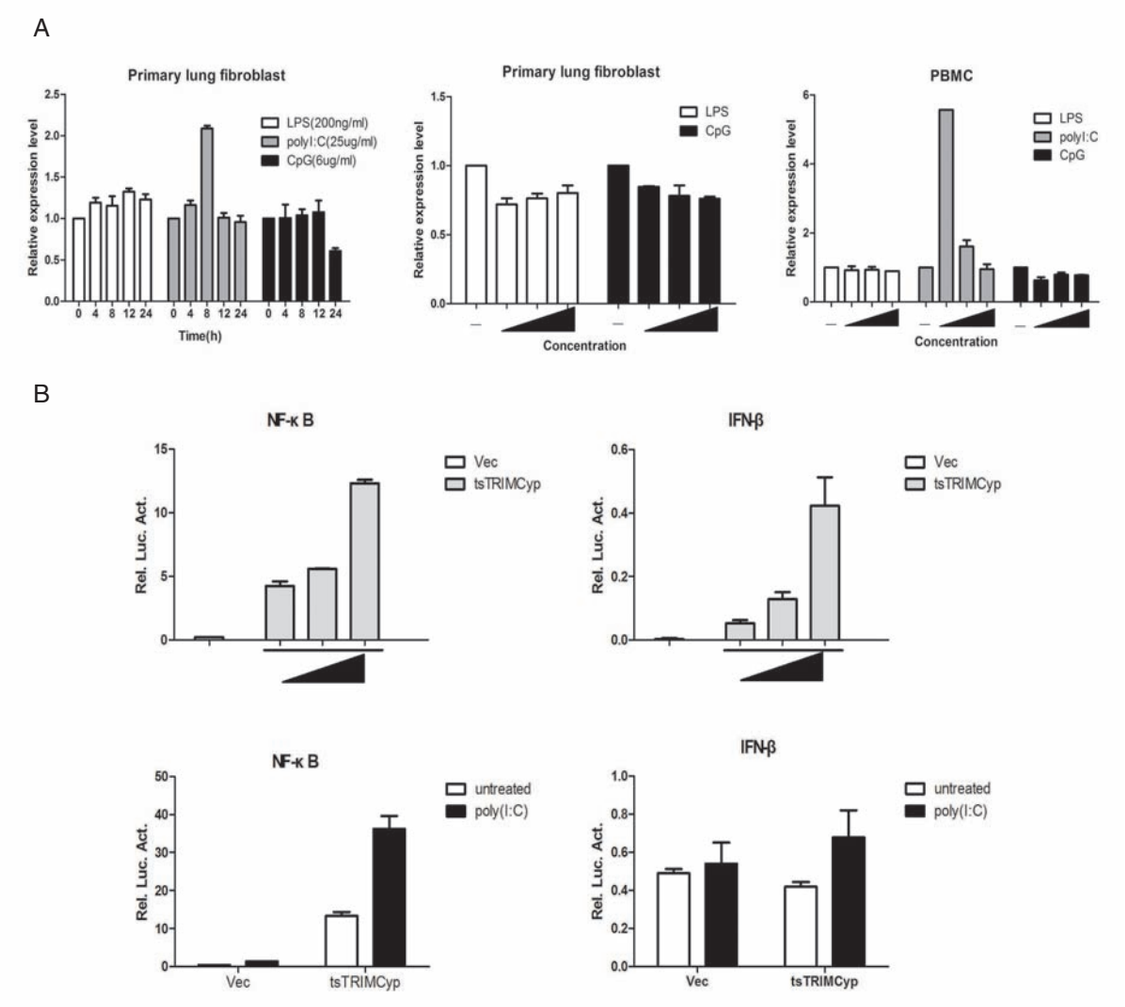



**图5–15　树鼩TRIMCyp参与天然免疫应答**

（A）TLR3的刺激剂poly（I:C）能刺激树鼩的肺成纤维原代细胞和树鼩PBMC中tsTRIMCyp表达量的上调；（B）tsTRIMCyp以剂量依赖的方式激活NF–κB或IFN–β，并且能增强poly（I:C）激活NF–κB或IFN–β的作用。

如，TRIM25泛素化RIG-I，从而介导Ⅰ型干扰素的产生，正向调节抗病毒免疫[72]；TRIM5在染色体上的邻居TRIM22降解TAB2从而负调控TRAF6激活的NF-κB通路[73]；TRIM30α（TRIM5在小鼠上的同源基因）降解TAB2和TAB3而负调控TLR介导的NF-κB激活[74]；huTRIM5α激活TAK1复合体的自身磷酸化，从而激活下游的AP-1和NF-κB信号通路[39]。因此，我们检测了树鼩TRIMCyp是否能参与天然免疫应答。

首先，我们用Tol样受体（Toll-like receptors，TLR）的刺激剂刺激树鼩肺成纤维原代细胞（primary lung fibroblast）和外周血单核细胞（PBMC），刺激不同时间后检测TRIMCyp的表达量是否有变化。结果表明，TLR4的刺激剂LPS和TLR9的刺激剂CpG都不能明显地使tsTRIMCyp表达量上调，而TLR3的刺激剂poly（I:C）能在一定剂量和刺激时间下使得tsTRIMCyp大量上调（图5–15A），提示tsTRIMCyp在TLR3所介导的天然免疫应答中起一定作用。随后，我们检测了tsTRIMCyp能否激活天然免疫通路中重要的转录因子NF-κB和Ⅰ型干扰素（IFN-β）。使用表达荧光素酶的NF-κB应答元件的质粒或IFN-β启动子质粒与不同剂量的tsTRIMCyp共同转染293或Hela细胞。结果发现，tsTRIMCyp能以剂量依赖的方式激活NF-κB或IFN-β，并且能增强poly（I:C）激活NF-κB或IFN-β的作用，表明tsTRIMCyp既能单独激活NF-κB或IFN-β，又能在poly（I:C）或单链RNA病毒介导NF-κB或IFN-β的激活作用中起正调控作用（图5–15B）。tsTRIMCyp参与天然免疫应答的具体机制还需进行进一步研究。

## 第五节 结语与展望

*TRIM5*基因编码的TRIM5α蛋白首先作为阻碍病毒跨物种传播屏障的一个重要组成因子，向我们揭露了它神秘的面纱。随后，深入的研究展露出*TRIM5*不仅在固有免疫防御也在进化中的重要地位。在免疫方面，TRIM5α除了能直接对逆转录病毒进行结合并限制，更能作为病毒的模式识别受体参与天然免疫通路；在进化方面，*TRIM5*基因经受的包括强烈的正向选择、频繁的CypA插入和基因拷贝数变化等事件，为研究古病毒与宿主免疫的共同进化作用（co-evolution）提供了素材和线索。TRIM5α让我们更深入地了解了机体免疫和宿主基因进化，但与之伴随而来的是更多的科学问题需要研究，比如，不同物种中的TRIM5α在天然免疫上的作用和参与的信号通路是否一样？TRIM5α限制HIV-1前整合复合体的机制是什么？TRIM5α是否还有其它功能？如何利用具有强大限制能力的TRIM5α和TRIMCyp进行基因治疗或疫苗设计，以期预防和治疗艾滋病等疾病？

树鼩*TRIM5*是哺乳类动物*TRIM5*基因中比较独特的一支，因为它既经历了基因重复，又受到CypA逆转录子的插入进而产生了融合蛋白tsTRIMCyp，这种现象在其它物种中尚没有发现。那么，这样一种独特的现象背后是什么样的选择压力在推动？是否与防御古病毒的感染有关？tsTRIMCyp为什么会提前终止但是仍然能够激活NF-κB和IFN-β？tsTRIMCyp在TLR3通路中具体起到什么作用、有没有相互作用的蛋白？tsTRIM5-1和tsTRIMCyp不能限制HIV-1等病毒，那么另外3个TRIM5拷贝是否能对逆转录病毒进行限制？树鼩TRIM5α和TRIMCyp的同时表达会对彼此的功能造成什么影响？这一系列问题的解决将有助于我们更深入地了解宿主面对病毒感染产生的变化与采取的策略，也助于反向了解古病毒的感染与进化，提供利用现代科技手段限制病毒复制的思路。

【致谢】施鹏研究员、杨晖副研究员、刘丰亮博士以及朱家武、郑宏毅、田仁荣博士生参与了树鼩TRIM5α/TRIMCyp的研究工作，特此感谢。

## 参考文献

[1]Bieniasz PD. Intrinsic immunity: a front-line defense against viral attack. Nat Immunol, 2004, 5 (11): 1109-15.

[2]Yap MW, Nisole S, Lynch C, et al. Trim5alpha protein restricts both HIV-1 and murine leukemia virus. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101 (29): 10786-91.

[3]Stremlau M, Owens CM, Perron MJ, et al. The cytoplasmic body component TRIM5alpha restricts HIV-1 infection in Old World monkeys. Nature, 2004, 427 (6977): 848-53.

[4]Laguette N, Sobhian B, Casartelli N, et al. SAMHD1 is the dendritic- and myeloid-cell-specific HIV-1 restriction factor counteracted by Vpx. Nature, 2011, 474 (7353): 654-7.

[5]Freed EO. HIV-1 and the host cell: an intimate association. Trends Microbiol, 2004, 12 (4): 170-7.

[6]Goujon C, Moncorgé O, Bauby H, et al. Human MX2 is an interferon-induced post-entry inhibitor of HIV-1 infection. Nature, 2013, 502 (7472): 559-62.

[7]Romani B, Engelbrecht S, Glashoff RH. Antiviral roles of APOBEC proteins against HIV-1 and suppression by Vif. Arch Virol, 2009, 154 (10): 1579-88.

[8]Gao F, Bailes E, Robertson DL, et al. Origin of HIV-1 in the chimpanzee Pan troglodytes troglodytes. Nature, 1999, 397436-41.

[9]Munk C, Brandt SM, Lucero G, et al. A dominant block to HIV-1 replication at reverse transcription in simian cells. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99 (21): 13843-8.

[10]Riri Shibata, Sakai H, Kawamura M, et al. Early replication block of human immunodeficiency virus type 1 in monkey cells. J Gen Virol, 1995, 762723-30.

[11]Cowan S, Hatziioannou T, Cunningham T, et al. Cellular inhibitors with Fv1-like activity restrict human and simian immunodeficiency virus tropism. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99 (18): 11914-9.

[12]Owens CM, Yang PC, Gottlinger H, et al. Human and simian immunodeficiency virus capsid proteins are major viral determinants of early, postentry replication blocks in simian cells. J Virol, 2003, 77 (1): 726-31.

[13]Hatziioannou T, Perez-Caballero D, Yang A, et al. Retrovirus resistance factors Ref1 and Lv1 are species-specific variants of TRIM5alpha. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101 (29): 10774-9.

[14]Battivelli E, Migraine J, Lecossier D, et al. Modulation of TRIM5alpha activity in human cells by alternatively spliced TRIM5 isoforms. J Virol, 2011, 85 (15): 7828-35.

[15]Lukic Z, Campbell EM. The cell biology of TRIM5alpha. Curr HIV/AIDS Rep, 2012, 9 (1): 73-80.

[16]Sawyer SL, Wu LI, Emerman M, et al. Positive selection of primate TRIM5alpha identifies a critical species-specific retroviral restriction domain. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102 (8): 2832-7.

[17]Nakayama EE, Miyoshi H, Nagai Y, et al. A specific region of 37 amino acid residues in the SPRY (B30.2) domain of African green monkey TRIM5alpha determines species-specific restriction of simian immunodeficiency virus SIVmac infection. J Virol, 2005, 79 (14): 8870-7.

[18]Stremlau M, Perron M, Lee M, et al. Specific recognition and accelerated uncoating of retroviral capsids by the TRIM5alpha restriction factor. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, 103 (14): 5514-9.

[19]Diaz-Griffero F, Vandegraaff N, Li Y, et al. Requirements for capsid-binding and an effector function in TRIMCyp-mediated restriction of HIV-1. Virology, 2006, 351 (2): 404-19.

[20]Sawyer SL, Emerman M, Malik HS. Discordant evolution of the adjacent antiretroviral genes TRIM22 and TRIM5 in mammals. PLoS Pathog, 2007, 3 (12): e197.

[21]汤霞，戴正喜，夏厚军，等．恒河猴TRIM5α的组织分布及不同刺激促进PBMC中TRIM5α转录水平的上调．动物学研究，2009，30（4）：354–60．

[22]Sakuma R, Mael AA, Ikeda Y. Alpha interferon enhances TRIM5alpha-mediated antiviral activities in human and rhesus monkey cells. J Virol, 2007, 81 (18): 10201-6.

[23]Chatterji U, Bobardt MD, Gaskill P, et al. Trim5alpha accelerates degradation of cytosolic capsid associated with productive HIV-1 entry. J Biol Chem, 2006, 281 (48): 37025-33.

[24]Wu X, Anderson JL, Campbell EM, et al. Proteasome inhibitors uncouple rhesus TRIM5alpha restriction of HIV-1 reverse transcription and infection. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, 103 (19): 7465-70.

[25]Anderson JL, Campbell EM, Wu X, et al. Proteasome inhibition reveals that a functional preintegration complex intermediate can be generated during restriction by diverse TRIM5 proteins. J Virol, 2006, 80 (19): 9754-60.

[26]Black LR, Aiken C. TRIM5alpha disrupts the structure of assembled HIV-1 capsid complexes in vitro. J Virol, 2010, 84 (13): 6564-9.

[27]Javanbakht H, Yuan W, Yeung DF, et al. Characterization of TRIM5alpha trimerization and its contribution to human immunodeficiency virus capsid binding. Virology, 2006, 353 (1): 234-46.

[28]Sakuma R, Noser JA, Ohmine S, et al. Rhesus monkey TRIM5alpha restricts HIV-1 production through rapid degradation of viral Gag polyproteins. Nat Med, 2007, 13 (5): 631-5.

[29]Sastri J, Campbell EM. Recent insights into the mechanism and consequences of TRIM5alpha retroviral restriction. AIDS Res Hum Retroviruses, 2011, 27 (3): 231-8.

[30]Yap MW, Nisole S, Stoye JP. A single amino acid change in the SPRY domain of human Trim5alpha leads to HIV-1 restriction. Curr Biol, 2005, 15 (1): 73-8.

[31]Diaz-Griffero F, Perron M, McGee-Estrada K, et al. A human TRIM5alpha B30.2/SPRY domain mutant gains the ability to restrict and prematurely uncoat B-tropic murine leukemia virus. Virology, 2008, 378 (2): 233-42.

[32]Diaz-Griffero F, Kar A, Perron M, et al. Modulation of retroviral restriction and proteasome inhibitor-resistant turnover by changes in the TRIM5alpha B-box 2 domain. J Virol, 2007, 81 (19): 10362-78.

[33]Maillard PV, Ecco G, Ortiz M, et al. The specificity of TRIM5alpha-mediated restriction is influenced by its coiled-coil domain. J Virol, 2010, 84 (11): 5790-801.

[34]Nakayama EE, Nakajima T, Kaur G, et al. A naturally occurring single amino acid substitution in human TRIM5alpha linker region affects its anti-HIV-1 activity and susceptibility to HIV-1 infection. AIDS Res Hum Retroviruses, 2013, 29(6): 919-24.

[35]Sastri J, O'Connor C, Danielson CM, et al. Identification of residues within the L2 region of rhesus TRIM5alpha that are required for retroviral restriction and cytoplasmic body localization. Virology, 2010, 405 (1): 259-66.

[36]Tareen SU, Sawyer SL, Malik HS, et al. An expanded clade of rodent *Trim5* genes. Virology, 2009, 385 (2): 473-83.

[37]McEwan WA, Schaller T, Ylinen LM, et al. Truncation of TRIM5 in the Feliformia explains the absence of retroviral restriction in cells of the domestic cat. J Virol, 2009, 83 (16): 8270-5.

[38]Liu HL, Wang YQ, Liao CH, et al. Adaptive evolution of primate TRIM5alpha, a gene restricting HIV-1 infection. Gene, 2005: 362109-16.

[39]Pertel T, Hausmann S, Morger D, et al. TRIM5 is an innate immune sensor for the retrovirus capsid lattice. Nature, 2011, 472 (7343): 361-5.

[40]曹光，刘丰亮，张高红，等．灵长类动物中TRIMCyp融合基因模式及对逆转录病毒复制的限制机制．动物学研究，2012，33（1）：99–107.

[41]Cordaux R, Batzer MA. The impact of retrotransposons on human genome evolution. Nat Rev Genet, 2009, 10 (10): 691-703.

[42]Han JS, Boeke JD. LINE-1 retrotransposons: modulators of quantity and quality of mammalian gene expression? BioEssays, 2005, 27 (8): 775-84.

[43]Braaten D, Franke EK, Luban J. Cyclophilin A is required for the replication of group M human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and simian immunodeficiency virus SIV(CPZ)GAB but not group O HIV-1 or other primate immunodeficiency viruses. J Virol, 1996, 70 (7): 4220-7.

[44]Barrten D, Franke EK, Luban J. Cyclophilin A is required for an early step in the life cycle of human immunodeficiency

virus type 1 before the initiation of reverse transcription. J Virol, 1996, 70 (6): 3551-60.
[45]Braaten D, Luban J. Cyclophilin A regulates HIV-1 infectivity, as demonstrated by gene targeting in human T cells. EMBO J, 2001, 20 (6): 1300-9.
[46]Zander K, Sherman MP, Tessmer U, et al. Cyclophilin A interacts with HIV-1 Vpr and is required for its functional expression. J Biol Chem, 2003, 278 (44): 43202-13.
[47]Berthoux L, Sebastian S, Sokolskaja E, et al. Cyclophilin A is required for TRIM5alpha-mediated resistance to HIV-1 in Old World monkey cells. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102 (41): 14849-53.
[48]Keckesova Z, Ylinen LM, Owers GJ. Cyclophilin A renders human immunodeficiency virus type 1 sensitive to Old World monkey but not human TRIM5alpha antiviral activity. J Virol, 2006, 80 (10): 4683-90.
[49]Stremlau M, Song B, Javanbakht H, et al. Cyclophilin A: an auxiliary but not necessary cofactor for TRIM5alpha restriction of HIV-1. Virology, 2006, 351 (1): 112-20.
[50]Zhang Z, Harrison PM, Liu Y, et al. Millions of years of evolution preserved: a comprehensive catalog of the processed pseudogenes in the human genome. Genome Res, 2003, 13 (12): 2541-58.
[51]Buzdin A, Gogvadze E, Lebrun MH. Chimeric retrogenes suggest a role for the nucleolus in LINE amplification. FEBS Lett, 2007, 581 (16): 2877-82.
[52]Nisole S, Lynch C, Stoye JP, et al. A Trim5-Cyclophilin A fusion protein found in owl monkey kidney cells can restrict HIV-1. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101 (36): 13324-8.
[53]Sayah DM, Sokolskaja E, Berthoux L, et al. Cyclophilin A retrotransposition into TRIM5 explains owl monkey resistance to HIV-1. Nature, 2004, 430 (6999): 569-73.
[54]Ribeiro IP, Menezes AN, Moreira MA, et al. Evolution of Cyclophilin A and TRIMCyp retrotransposition in New World primates. J Virol, 2005, 79 (23): 14998-5003.
[55]曹光，佴文惠，刘丰亮，等．熊猴存在TRIM5/TRIMCyp杂合子基因型．动物学研究，2011，32（1）：40–9.
[56]Kuang YQ, Tang X, Liu FL, et al. Genotyping of TRIM5 locus in northern pig-tailed macaques (*Macaca leonina*), a primate species susceptible to Human Immunodeficiency Virus type 1 infection. Retrovirology, 2009, 6: 58.
[57]Liao CH, Kuang YQ, Liu HL, et al. A novel fusion gene, TRIM5-Cyclophilin A in the pig-tailed macaque determines its susceptibility to HIV-1 infection. AIDS, 2007, 21 (Suppl 8): S19-S26.
[58]Newman RM, Hall L, Kirmaier A, et al. Evolution of a TRIM5-CypA splice isoform in Old World monkeys. PLoS Pathog, 2008, 4 (2): e1000003.
[59]Malfavon-Borja R, Wu LI, Emerman M, et al. Birth, decay, and reconstruction of an ancient TRIMCyp gene fusion in primate genomes. Proc Natl Acad Sci USA, 2013, 110 (7): E583-92.
[60]Lin TY, Emerman M. Cyclophilin A interacts with diverse lentiviral capsids. Retrovirology, 2006, 3 (70): 70.
[61]Hatziioannou T, Perez-Caballero D, Cowan S, et al. Cyclophilin interactions with incoming human immunodeficiency virus type 1 capsids with opposing effects on infectivity in human cells. J Virol, 2005, 79 (1): 176-83.
[62]Towers GJ, Hatziioannou T, Cowan S, et al. Cyclophilin A modulates the sensitivity of HIV-1 to host restriction factors. Nat Med, 2003, 9 (9): 1138-43.
[63]Wilson SJ, Webb BL, Ylinen LM, et al. Independent evolution of an antiviral TRIMCyp in rhesus macaques. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105 (9): 3557-62.
[64]Yap MW, Dodding MP, Stoye JP. Trim-Cyclophilin A fusion proteins can restrict human immunodeficiency virus type 1 infection at two distinct phases in the viral life cycle. J Virol, 2006, 80 (8): 4061-7.
[65]Schaller T, Ylinen LM, Webb BL, et al. Fusion of Cyclophilin A to Fv1 enables cyclosporine-sensitive restriction of human and feline immunodeficiency viruses. J Virol, 2007, 81 (18): 10055-63.
[66]Dietrich I, Macintyre A, McMonagle E, et al. Potent lentiviral restriction by a synthetic feline TRIM5-Cyclophilin A fusion. J Virol, 2010, 84 (17): 8980-5.
[67]Neagu MR, Ziegler P, Pertel T, et al. Potent inhibition of HIV-1 by TRIM5-Cyclophilin fusion proteins engineered from human components. J Clin Invest, 2009, 119 (10): 3035-47.
[68]Price AJ, Marzetta F, Lammers M, et al. Active site remodeling switches HIV specificity of antiretroviral TRIMCyp.

Nat Struct Mol Biol, 2009, 16 (10): 1036-42.

[69]Ylinen LM, Price AJ, Rasaiyaah J, et al. Conformational adaptation of Asian macaque TRIMCyp directs lineage specific antiviral activity. PLoS Pathog, 2010, 6 (8): e1001062.

[70]Olson LE, Sargis EJ, Martin RD. Phylogenetic relationships among treeshrews (Scandentia) a review and critique of the morphological evidence. J Mamm Evol, 2004, 11 (1): 49-71.

[71]Si Z, Vandegraaff N, O'Huigin C, et al. Evolution of a cytoplasmic tripartite motif (TRIM) protein in cows that restricts retroviral infection. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, 103 (19): 7454-9.

[72]Gack MU, Shin YC, Joo CH, et al. TRIM25 RING-finger E3 ubiquitin ligase is essential for RIG-I-mediated antiviral activity. Nature, 2007, 446 (7138): 916-20.

[73]Qiu H, Huang F, Xiao H, et al. TRIM22 inhibits the TRAF6-stimulated NF-κB pathway by targeting TAB2 for degradation. Virol Sin, 2013, 28 (4): 209-15.

[74]Shi M, Deng W, Bi E, et al. TRIM30alpha negatively regulates TLR-mediated NF-kappa B activation by targeting TAB2 and TAB3 for degradation. Nat Immunol, 2008, 9 (4): 369-77.



# 第六章

第一篇树鼩基础生物学
TREE SHREW BASIC BIOLOGY

Tree shrews

# 树鼩肿瘤相关基因介绍

涂 秋 李 媛 赵旭东

## 第一节 前 言

肿瘤研究是最重要的生物医学研究领域之一，动物模型作为研究肿瘤发生发展机制、探索新的治疗手段及药物开发的有效工具而被广泛应用。树鼩是目前我国正努力研究和推广的新型实验动物，昆明动物研究所完成的树鼩高覆盖率基因组测序发现，树鼩基因组含约22063个蛋白编码基因，接近人类基因数目，其中28个基因以前被认为是灵长类特有基因；并通过全基因组水平比较证实了树鼩是与灵长类亲缘关系最近的物种[1]。此外，树鼩个体大小与大鼠相似，繁殖较快，较好地结合了以前常用的啮齿类及灵长类动物模型的优点。

肿瘤的发生与原癌基因、抑癌基因等肿瘤相关基因的异常关系密切，肿瘤相关基因在不同物种间的功能和作用机制可能会有所差异。与人类亲缘关系越近的动物，其相关基因的功能和作用机制可能就越相近，生物学特性也更相似，应该能更好地模拟人类肿瘤的特征。本章中我们将对树鼩的肿瘤相关基因进行分析，并与经典的模式动物小鼠进行比较，为树鼩作为一种新型肿瘤动物模型提供进一步的依据和参考。

## 第二节 树鼩肿瘤相关基因比较分析

### 一、肿瘤相关基因来源及比较方法

首先将Sanger数据库（http://cancer.sanger.ac.uk/cancergenome/projects/census/）Cancer gene census（截至2013年9月）中的507个人类常见的肿瘤相关基因纳入统计及随后的比对范围；为保证所选取的基因有足够的覆盖度，又在cosmic（http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/browse/tissue）数据库中查找乳腺癌、脑胶质瘤、肝癌、肺癌、宫颈癌等19种常见肿瘤中变异率排在前20位的基

因。经过比较，这些排在前20位的基因绝大部分已包含在前述507个肿瘤相关基因中，仅有7个基因例外（分别是*AFF3*、*MECOM*、*PTCH1*、*RUNX1T1*、*SMAD4*、*FAM123B*、*HNF1A*），将这7个基因也纳入统计，因此最终纳入比较的基因总数为514个。

随后，从NCBI数据库中查找人和小鼠肿瘤相关基因的编码序列（coding DNA sequence，CDS）；在NCBI（http://www.ncbi.nlm.nih.gov/）和Ensemble（http://asia.ensembl.org/）数据库中查找树鼩这些基因对应的CDS序列并在NCBI上对以上序列进行同源性比对分析。

## 二、同源性比对结果

通过比对，发现514个基因中，在小鼠和树鼩中都有的同源基因共479个，树鼩中有但小鼠没有的基因有10个，分别是*ZNF331*、*ZNF384*、*ZNF521*、*FCRL4*、*KIAA1549*、*C2orf44*、*CLTCL1*、*SSX1*、*FLJ27352*、*CRLF2*。在可比较的479个基因中，小鼠–人基因CDS同源性平均值为87%，树鼩–人基因CDS同源性平均为90%。479个基因中，有402个基因在树鼩–人之间的同源性高于小鼠–人的同源性，占所有可比对基因的84%；有30个基因，树鼩–人之间同源性与小鼠–人之间同源性相似，占所有可比对基因的6%；仅有47个基因，树鼩–人同源性低于小鼠–人同源性，占所有可比对基因的10%。在402个树鼩与人同源性较高的基因中，差异值≥5%的基因共有149个，这149个基因的信息及简单介绍列表如下：

表6–1　树鼩–人同源性高于小鼠–人同源性的基因简介

| 基因名称 | 小鼠–人CDS同源性（%） | 树鼩–人CDS同源性（%） | 同源性差异（%） | 基因功能简介 |
|---|---|---|---|---|
| *CDKN2A* (*ARF*) | 72 | 95 | 23 | 调控细胞周期，抑制MDM2活性，促进P53激活，进一步激活P21,使cyclin–CDK复合物失活，从而减缓细胞周期从G1期至S期的过渡 |
| *CDKN2A* (*INK4a*) | 77 | 95 | 18 | 在细胞周期的调控中起重要作用，减缓细胞周期从G1期至S期的过渡；抑制肿瘤，尤其是黑色素瘤、咽部鳞细胞癌、食道癌等肿瘤 |
| *MLL2* | 73 | 88 | 15 | 组蛋白–赖氨酸 N–甲基转移酶，其突变与成管神经细胞瘤及Kabuki Syndrome有关 |
| *AKAP9* | 76 | 89 | 13 | 与PKA的二型调节亚基结合，使PKA全酶留在细胞内 |
| *FANCF* | 66 | 78 | 12 | 核孔复合物的必要组成原件，DNA修复，维护染色体的稳定性 |
| *TP53* | 80 | 92 | 12 | 调控细胞周期，维持基因组稳定性，DNA损伤修护，促进细胞凋亡，抑制肿瘤生长，抑制肿瘤血管生成 |
| *LCX* (*TET1*) | 70 | 82 | 12 | 促进DNA去甲基化，促进5mC向5hmC、5hmC向5fC及5fC向5caC的转换 |
| *LIFR* | 79 | 91 | 12 | 调控细胞的增殖、分化及存活，抑制乳腺癌的转移 |
| *BRCA1* | 73 | 84 | 11 | DNA双链断裂及错配修复，调控其它基因的表达，在胚胎发育中起重要作用，抑制肿瘤 |
| *IL6ST* | 79 | 90 | 11 | 调控与细胞因子有关的信号转导 |
| *LHFP* | 84 | 95 | 11 | 脂肪瘤HMGIC的易位搭档基因 |
| *MDM2* | 81 | 92 | 11 | 负调控P53；E3泛素连接酶 |
| *BRCA2* | 71 | 81 | 10 | DNA双链断裂及错配修复，调控其它基因的表达，在胚胎发育中起重要作用，抑制肿瘤 |
| *BUB1B* | 80 | 90 | 10 | 影响纺锤体检查点的功能；抑制促后期复合物APC的形成，延迟分裂后期的开始；确保染色体正确的分离 |

续表6-1

| 基因名称 | 小鼠-人CDS同源性（%） | 树鼩-人CDS同源性（%） | 同源性差异（%） | 基因功能简介 |
|---|---|---|---|---|
| *DAXX* | 77 | 87 | 10 | 调控细胞周期及细胞凋亡 |
| *TNFRSF17* | 73 | 83 | 10 | 参与B细胞发育及自身免疫应答；激活NF-κB、JNK通路 |
| *POT1* | 79 | 89 | 10 | 调控端粒的长度；抑制染色体末端的错误重组及染色体不稳定性及染色体的不正常分离 |
| *BCL3* | 82 | 91 | 9 | 转录激活，与NF-κB形成回路，调控NF-κB在胞核中的位置 |
| *CCNE1* | 79 | 88 | 9 | 调控细胞分裂G1期至S期的过渡 |
| *ERCC4* | 81 | 90 | 9 | DNA损伤修复中起核酸内切酶作用 |
| *IL2* | 76 | 85 | 9 | 调节白细胞活性；对T细胞的生长、增殖、分化是必需的；免疫应答反应 |
| *TET2* | 72 | 81 | 9 | DNA甲基化的激活；促进5mC向5hmC转换；在髓样肿瘤中起作用 |
| *LRIG3* | 84 | 93 | 9 | 调节胚胎发育时期面部及耳内形态的形成 |
| *MLLT2* (*AFF1*) | 76 | 85 | 9 | 与急性白血病的发病有关 |
| *MYCN* | 83 | 92 | 9 | 对脑的正常发育是必需的；与多种肿瘤发病有关，尤其是神经瘤 |
| *NBS1* | 78 | 87 | 9 | DNA双链断裂修复；调节MRN蛋白复合物的活性 |
| *NFE2L2* | 82 | 91 | 9 | 调控细胞抗氧化酶的表达，从而具有抗氧化反应功能 |
| *SETBP1* | 84 | 93 | 9 | 与Schinzel-Giedion综合征有关；其突变可引发非典型慢性髓系白血病 |
| *SIL* | 80 | 89 | 9 | 调控细胞有丝分裂从G2期至M期，调控细胞存活 |
| *BCL10* | 84 | 92 | 8 | 激活NF-κB；诱导细胞凋亡 |
| *BRIP1* | 80 | 88 | 8 | BRCA1的双链断裂修复；卵巢癌中起抑癌基因的作用 |
| *CCDC6* | 86 | 94 | 8 | 抑癌基因，与甲状腺乳头状癌发病密切相关 |
| *CD74* | 81 | 89 | 8 | MHC class Ⅱ的形成及转运 |
| *D10S170* (*CCDC6*) | 86 | 94 | 8 | 抑癌基因，与甲状腺乳头状癌发病密切相关 |
| *EVI1* | 87 | 95 | 8 | 调控胚胎的发育，细胞的增殖、分化及凋亡；参与造血过程 |
| *FANCC* | 78 | 85 | 8 | 延迟细胞凋亡的开始；促进DNA损伤的同源重组修复；其突变引发Fanconi anemia |
| *GATA1* | 83 | 91 | 8 | 调节红细胞及巨核细胞的发育；增强a-血影蛋白的表达 |
| *GOLGA5* | 83 | 91 | 8 | 运输小泡的牵引及对接 |
| *IL21R* | 73 | 81 | 8 | 负责转导IL21的促生长信号，在B、T、NK细胞的增殖分化中都发挥重要作用 |
| *Kras* | 90 | 98 | 8 | 起分子开关的作用，调控细胞生长途径；与多种肿瘤发病相关（肺癌、结直肠癌、胰腺癌等） |
| *WAS* | 83 | 91 | 8 | 将血细胞表面的信号传递到肌动蛋白细胞骨架 |
| *XPA* | 84 | 92 | 8 | DNA损伤修复 |
| *LMO2* | 82 | 90 | 8 | 调节血细胞的发育；维持血细胞前体细胞在非成熟状态；在造血过程中起着关键作用 |
| *MDS1* | 87 | 95 | 8 | 调控细胞增殖、分化及凋亡；在造血过程中也发挥重要作用 |
| *PMS1* | 81 | 89 | 8 | DNA错配修复 |
| *PRF1* | 75 | 83 | 8 | 穿孔素，参与细胞溶解及免疫系统的调节 |
| *SH2B3* | 76 | 84 | 8 | 细胞因子信号通路的重要负调控因子；在造血过程中起着关键作用 |
| *ATF1* | 86 | 93 | 7 | 调控细胞生长、生存；能与cAMP效应元件结合，调控PKA激活的基因的表达 |
| *BCL11B* | 88 | 95 | 7 | 转录抑制因子；其易位与B-cell恶性肿瘤有关 |
| *CD274* | 75 | 82 | 7 | 抑制机体免疫系统功能 |
| *CHEK2* (*CHK2*) | 83 | 90 | 7 | 调控细胞分裂；DNA损伤修复 |
| *CEP1* | 83 | 90 | 7 | 调控细胞周期及胞质分裂；中心体的成熟 |
| *DDX10* | 86 | 93 | 7 | 在RNA二级结构的改变、核及线粒体的拼接、核糖体核剪接体的组装等一系列生物过程中起作用 |
| *ELL* | 79 | 86 | 7 | RNA聚合酶Ⅱ延伸因子；促进转录 |

续表6-1

| 基因名称 | 小鼠-人CDS同源性（%） | 树鼩-人CDS同源性（%） | 同源性差异（%） | 基因功能简介 |
|---|---|---|---|---|
| *EML4* | 89 | 92 | 7 | 当被间变性淋巴瘤激酶剪切时与癌症发生有关 |
| *ETV6* | 88 | 95 | 7 | 调控基因的表达，调控发育及血细胞的成熟；与白血病、纤维瘤等疾病发病有关 |
| *FCGR2B* | 73 | 80 | 7 | 调控B-cell产生的抗体；诱导细胞凋亡；免疫复合物的吞噬作用 |
| *GNAS* | 86 | 93 | 7 | G蛋白a亚基的激活子 |
| *IL7R* | 74 | 81 | 7 | 调控淋巴细胞的增殖与分化 |
| *TNFRSF14* | 69 | 76 | 7 | 参与T细胞的激活 |
| *TPM3* | 89 | 96 | 7 | 调控肌纤维的收缩；调节细胞骨架，维护细胞结构 |
| *TRIM33* | 89 | 96 | 7 | 转录辅阻遏物；E3泛素连接酶，促进SMAD4的泛素化 |
| *LYL-1* | 80 | 87 | 7 | 在血管成熟及造血过程中起作用 |
| *MSF* | 86 | 93 | 7 | 调节胞质分离；调控细胞的增殖；抑制肿瘤生长 |
| *MSH2* | 87 | 93 | 7 | DNA错配修复 |
| *NDRG1* | 86 | 93 | 7 | 阻滞细胞生长，促进细胞分化、成熟；参与应激反应、激素反应 |
| *NIN* | 81 | 88 | 7 | 维持中心体的功能；在上皮细胞微管的定位和锚定中起重要作用 |
| *NUP214* | 79 | 86 | 7 | 核孔复合物的重要元件；维护正常的核-质转运 |
| *SDHB* | 86 | 93 | 7 | 在线粒体内的能量转换过程中起关键作用 |
| *SDHC* | 84 | 91 | 7 | 在三羧酸循环、氧化磷酸化过程中起重要作用 |
| *ARID2* | 89 | 95 | 6 | 通过核受体促进配体依赖的转录活性 |
| *ATRX* | 86 | 92 | 6 | 染色质重塑；调控核基质与染色质间的联系；调控间期基因的表达 |
| *DDB2* | 82 | 88 | 6 | DNA紫外损伤修复；核苷酸切除修复；组蛋白H3/H4的泛素化 |
| *ECT2L* | 80 | 86 | 6 | 鸟嘌呤核苷酸转换因子（GEF） |
| *FANCD2* | 81 | 87 | 6 | DNA同源重组修复 |
| *FANCG* | 79 | 85 | 6 | 授予机体潮霉素B及丝裂霉素C抗性 |
| *FOXO1A* | 88 | 94 | 6 | 通过胰岛素信号通路调控糖异生及肝糖原的分解过程；负调控脂肪形成过程 |
| *HOXD13* | 86 | 92 | 6 | 在多细胞生物的形态发生过程中起重要作用 |
| *LAF4* | 85 | 91 | 6 | 组织特异的核转录因子，调控淋巴的发育及淋巴瘤发生 |
| *TERT* | 72 | 78 | 6 | 维持端粒长度；抑制染色体的错误链接及降解 |
| *TRIP11* | 83 | 89 | 6 | 高尔基体带状组织的组装和维护 |
| *ZRSR2* | 82 | 88 | 6 | 剪接因子，在mRNA前体的剪接和剪接体的组装中起作用 |
| *MSH6* | 85 | 91 | 6 | DNA错配识别及修复 |
| *MTCP1* | 92 | 98 | 6 | 与成熟T细胞的增殖及白血病生成有关 |
| *MYB* | 86 | 92 | 6 | 转录激活因子；调控造血祖细胞的增殖与分化 |
| *MYST4* | 87 | 93 | 6 | 对组蛋白进行乙酰化修饰 |
| *NACA* | 90 | 96 | 6 | 阻止非分泌多肽进入内质网 |
| *PDE4DIP* | 83 | 89 | 6 | 分离cAMP依赖的信号通路元件到高尔基体 |
| *PLAG1* | 90 | 96 | 6 | 调控细胞的增殖、转化；调控基因的表达；其异常表达可引发多形性腺瘤、脂肪瘤等 |
| *PMS2* | 80 | 86 | 6 | DNA错配修复 |
| *POU5F1* | 85 | 91 | 6 | 对维持未分化的胚胎干细胞的自我更新至关重要；可作为未分化细胞的Marker |
| *PRKAR1A* | 88 | 94 | 6 | 蛋白激酶A（PKA）的调节亚基之一 |
| *PTPN11* | 87 | 93 | 6 | 蛋白酪氨酸磷酸酶，调控细胞生长、分化、分裂周期及致癌性转化等；其突变可引发急性髓性白血病等疾病 |
| *RAD51L1* | 86 | 92 | 6 | DNA同源重组修复；其过表达可造成细胞周期G1期延迟、细胞凋亡等 |
| *RNF43* | 84 | 90 | 6 | E3泛素连接酶，负调控Wnt信号通路 |
| *RUNDC2A* | 84 | 90 | 6 | 通过PX-domain促进细胞膜的联系；促进蛋白分选 |

续表6-1

| 基因名称 | 小鼠-人CDS同源性（%） | 树鼩-人CDS同源性（%） | 同源性差异（%） | 基因功能简介 |
|---|---|---|---|---|
| *SET* | 91 | 97 | 6 | 抑制核小体的乙酰化；增强腺病毒基因组DNA的复制；抑制凋亡 |
| *TNFRSF6* | 69 | 75 | 6 | 死亡受体，介导细胞程序性死亡 |
| *AF1Q* | 88 | 93 | 5 | 在白血病中与多个易位搭档基因发生融合，对白血病的发病起关键作用 |
| *ASXL1* | 81 | 86 | 5 | 转录调控；维甲酸受体的辅助激活剂 |
| *AXIN1* | 83 | 88 | 5 | 负调控Wnt信号通路；诱导凋亡 |
| *CD273* | 79 | 84 | 5 | 通过抑制细胞周期的进程及细胞因子的产生来抑制T-cell的增殖 |
| *CD79B* | 76 | 81 | 5 | 对B细胞抗原受体的表达和功能是必需的 |
| *CDK4* | 87 | 92 | 5 | 调控细胞周期G1期至S期；磷酸化视网膜细胞瘤蛋白Rb |
| *CEBPA* | 91 | 96 | 5 | 调控瘦素基因的表达；参与血细胞的分化、成熟过程 |
| *DDIT3* | 87 | 92 | 5 | 在内质网应激时诱导细胞周期停滞、细胞凋亡；转录调控；抑制Wnt信号通路；参与细胞炎症反应 |
| *ELF4* | 82 | 87 | 5 | 激活CSF2、IL3、IL8、PRF1等基因的转录；影响NK细胞的发育与功能；调节天然免疫；在$CD8^+$的细胞中诱导细胞周期停滞 |
| *FANCE* | 75 | 80 | 5 | DNA交联修复；对FANCC的核累积是必需的；为FA复合物和FANCD2之间提供关键桥梁 |
| *FIP1L1* | 86 | 91 | 5 | 在mRNA的加工中起着重要作用，为mRNA加PolyA尾巴 |
| *FNBP1* | 86 | 91 | 5 | 调节细胞骨架，促进细胞膜的内凹及小管的形成；促进actin的聚合，促进膜管形成内吞囊泡 |
| *FSTL3* | 82 | 87 | 5 | 抑制激活素A/B、BMP2-及MSDT-诱导的信号；抑制碎骨细胞的分化，促进骨形成；促进造血祖细胞的分化 |
| *GOPC* | 86 | 91 | 5 | 胞内蛋白质的运输及降解 |
| *HIP1* | 85 | 90 | 5 | 诱导细胞凋亡；在网格蛋白介导的内吞作用和蛋白运输中起作用；调节AMPA受体在神经系统中的运输；在结直肠癌和前列腺癌中高表达 |
| *HOXA13* | 91 | 96 | 5 | 调控基因的表达；在胚胎发育的早期，控制身体器官的形成；尤其是泌尿系统、生殖系统及四肢的发育 |
| *IKZF1* | 89 | 94 | 5 | 在造血系统中起关键作用，其缺失可引发淋巴性白血病；在急性B淋巴细胞白血病中起抑癌基因作用 |
| *JAK2* | 89 | 94 | 5 | 促进细胞生长及增殖；调控造血干细胞分化成血细胞；涉及多条信号通路，把细胞外信号传递到细胞核 |
| *JAK3* | 81 | 86 | 5 | 调控Ⅰ型细胞因子受体介导的胞内信号转导；与STAT家族相互作用，调控信号转导及基因的转录；还与免疫细胞的激活有关 |
| *JAZF1* | 92 | 97 | 5 | 转录阻遏物；其变异增加患前列腺癌、二型糖尿病、子宫内膜间质肉瘤等疾病的风险 |
| *KIF5B* | 90 | 95 | 5 | 调控线粒体和溶酶体在细胞内的正常分布 |
| *KIT* | 83 | 88 | 5 | 在调控细胞生存、增殖、分化；调控造血过程；干细胞维持；配子发育；肥大细胞的发育、迁移及功能等过程中都发挥重要作用 |
| *KTN1* | 86 | 91 | 5 | 驱动蛋白受体；参与驱动蛋白介导的囊泡的运动 |
| *LCP1* | 89 | 94 | 5 | 微丝结合蛋白；参与T细胞激活；调控细胞表面IL2RA、CD25、CD69的表达 |
| *TAF15* | 88 | 93 | 5 | 在RNA聚合酶Ⅱ介导的转录起始复合物TFIID的组成元件 |
| *TCL1A* | 70 | 75 | 5 | 增强AKT1、AKT2、AKT3的磷酸化及活化；促进AKT1的核转移；促进细胞增殖及存活；稳定线粒体膜电位 |
| *TNFAIP3* | 84 | 89 | 5 | 抑制NF-κB的活性；抑制TNF介导的细胞凋亡；具有泛素连接酶及去泛素化酶的功能；参与细胞因子介导的免疫及炎症反应 |
| *TPR* | 88 | 93 | 5 | 直接与核孔复合物的元件相互作用，调控mRNA及一些蛋白的核输出 |

续表6-1

| 基因名称 | 小鼠-人CDS同源性（%） | 树鼩-人CDS同源性（%） | 同源性差异（%） | 基因功能简介 |
|---|---|---|---|---|
| *WT1* | 85 | 90 | 5 | 在细胞生长、分化、凋亡中发挥重要作用；作为转录因子调控多个靶基因的表达，包括EPO等；在mRNA的代谢和剪接中也发挥作用；抑制肿瘤 |
| *WWTR1* | 88 | 93 | 5 | 转录辅激活物，作用于Hippo下游，在控制器官大小、通过限制增殖促进凋亡抑制肿瘤等过程中发挥关键性作用 |
| *ZNF278* | 90 | 95 | 5 | 在染色质组装及转录抑制中发挥重要作用 |
| *LMO1* | 91 | 96 | 5 | 转录调控因子，调控神经细胞系基因的表达；其突变与急性T淋巴细胞白血病有关 |
| *MAML2* | 84 | 89 | 5 | NOTCH蛋白的转录辅激活物；增强NOTCH诱导的HES1的转录 |
| *MDM4* | 85 | 90 | 5 | 抑制p53或p73介导的细胞周期停滞及细胞凋亡；抑制MDM2的降解 |
| *MET* | 86 | 91 | 5 | 通过与HGF结合，将细胞外基质信号转导胞质；调控包括增殖、存活、形态发生等多个生物过程 |
| *MLL* | 88 | 93 | 5 | 组蛋白甲基转移酶，在早期发育及造血过程中发挥作用；调控染色质的修饰 |
| *MLLT7* (*FOXO4*) | 88 | 93 | 5 | 作用于胰岛素信号通路，调控其下游基因表达；负调控细胞周期；增强胚胎干细胞中蛋白酶体的活性 |
| *MYD88* | 80 | 85 | 5 | 天然免疫反应中作为Toll-like受体及IL-1受体信号通路的接头蛋白 |
| *NCOA1* | 89 | 94 | 5 | 类固醇及核激素受体的转录辅激活物；乙酰化组蛋白，使其下游基因更易转录 |
| *NOTCH2* | 87 | 92 | 5 | 作为Jagged1、Jagged2、Delta1等的受体调控细胞命运决定；与RBPJ/RBPSUH形成转录激活复合物激活基因的转录；调控细胞的增殖、分化及凋亡；参与骨骼重塑及血液发生 |
| *NTRK1* | 85 | 90 | 5 | 通过调控交感神经及神经元的增殖、分化及存活，影响中枢神经及外周神经的发育和成熟 |
| *NUMA1* | 82 | 87 | 5 | 影响细胞有丝分裂过程中纺锤体的形成和组织；核基质的组成元件 |
| *PDGFRB* | 83 | 88 | 5 | 细胞膜受体，将细胞外信号转导细胞内；在胚胎发育、细胞增殖、存活、分化、趋药性、迁移等过程中发挥必要作用；影响平滑肌细胞的迁移；影响血管的发育 |
| *PML* | 77 | 82 | 5 | 转录因子，肿瘤抑制因子；调控p53对致癌信号的反映其表达与细胞周期相关 |
| *PSIP2* | 90 | 95 | 5 | 参与神经干细胞的分化及神经发生；参与晶体上皮细胞基因的调控；促进晶体上皮细胞向纤维细胞分化；在应激反应中起保护作用 |
| *RET* | 83 | 88 | 5 | 参与多个细胞过程，包括细胞增殖、分化、迁移，神经导航等；磷酸化PTK2/FAK1；在肾及肠道神经系统的正常发育中起关键作用 |
| *ROS1* | 83 | 88 | 5 | 生长及分化因子的受体；在多个肿瘤细胞系中高表达，可能与这些肿瘤的发生有关 |
| *RPL22* | 89 | 94 | 5 | 核糖体蛋白，60s亚基的组成元件 |
| *SS18* | 91 | 96 | 5 | 染色体重塑复合物SWI/SNF的组成元件 |
| *FH* | 87 | 92 | 5 | 催化延胡索酸转变为苹果酸 |
| *C15orf55* | 77 | 82 | 5 | 与青少年中线器官癌密切相关 |

## 三、树鼩–人同源性比小鼠–人同源性高10%以上的基因介绍

### （一）*CDKN2A*

*CDKN2A*（cyclin-dependent kinase inhibitor），细胞周期依赖性激酶抑制基因，属于细胞周期依赖性激酶抑制因子基因家族，是一种重要的抑癌基因，具有调节细胞增殖与凋亡的作用。*CDKN2A*的选择性剪切形成两个不同的剪接体：*INK4a*和*ARF*，它们的主要区别在于1号外显子不同，其中*INK4a*包含1α、2、3三个外显子，而*ARF*则包含外显子1β、2、3，两者分别编码两个不同的抑癌蛋白，一是细胞周期依赖性激酶抑制蛋白p16INK4a，二是可变读框蛋白p14ARF（小鼠中为p19ARF）。

p16INK4a能与cyclinD竞争性结合CDK4和CDK6，从而抑制CDK4和CDK6的激酶活性，使pRB不被磷酸化，并抑制下游转录因子的活性，如E2F1等，阻止细胞分裂从G1期进入S期，从而抑制细胞增殖；因此p16INK4a在cyclinD-CDK4/CDK6-pRB-E2F1细胞周期调解途径中起负调控作用，*p16INK4a*基因的突变或蛋白的失活会导致cyclinD-CDK4/CDK6-pRB-E2F1调节途径的失控，使细胞过度增殖而导致肿瘤。

p14ARF（小鼠为p19ARF）对细胞周期的调控主要是通过抑制*MDM2*介导的p53蛋白的降解起作用的；p14ARF抑制MDM2活性，促进p53激活，进一步激活p21，使cyclin-CDK复合物失活，从而减缓细胞周期从G1期进入S期；*p14ARF*基因的突变或蛋白的失活会导致MDM2-p53-p21-cyclin-CDK调节途径的失控，导致p53功能缺失，最终使细胞过度增殖而导致肿瘤。

研究发现，在多种肿瘤中发现*p16INK4a/p14ARF*基因的变异，主要表现为纯合缺失和突变；包括黑色素瘤、膀胱癌、胃癌、宫颈癌、食管癌、胶质母细胞瘤、甲状腺癌等；图6–1显示的是

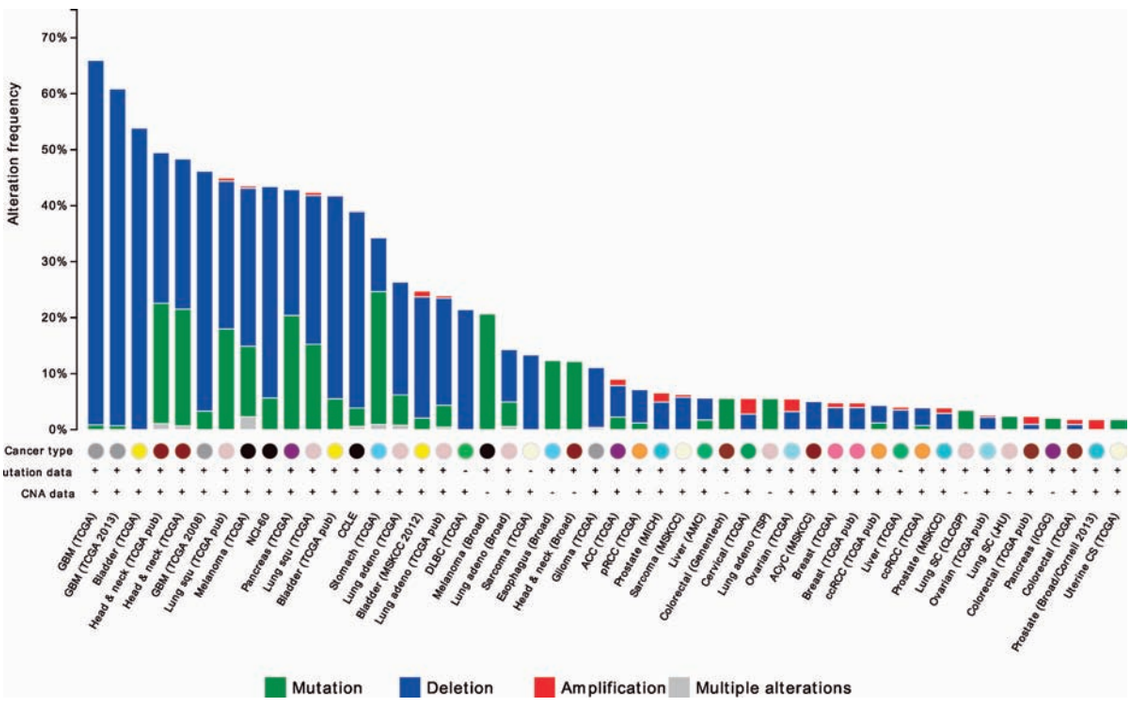



**图6–1 *CDKN2A*基因在肿瘤中的变化情况**

来自TCGA，生成日期2014–6。

TCGA数据库统计的*CDKN2A*基因在肿瘤中变化情况，在60%胶质母细胞瘤、54%膀胱癌、28%黑色素瘤、27%头颈部鳞细胞癌、26.6%肺鳞癌、22%胰腺癌、20%肺腺癌等中表现为缺失；而在23.7%胃腺癌、21.5%头颈部鳞细胞癌、20.7%黑色素瘤、20.4%胰腺癌、18%肺鳞细胞癌等中表现为突变。

### （二）*MLL2*

*MLL2*，即myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia，该基因编码的蛋白为组蛋白赖氨酸甲基转移酶，可以特异地使组蛋白H3的第4位赖氨酸甲基化；它还是ASCOM复合物的组成元件，参与β球蛋白及雌激素受体基因的转录调控。

研究表明，*MLL2*与多种疾病相关；其可以通过破坏染色质的调节，参与淋巴瘤的生成[2]；在2/3的歌舞伎综合征（Kabuki syndrome）中都有*MLL2*功能缺失[3]；*MLL2*的突变还与髓母细胞瘤的形成有关[4]；同时，TCGA数据库的资料显示，*MLL2*的突变与多种肿瘤相关，如图6–2所示，在26%膀胱尿路上皮瘤、22.5%黑色素瘤、20.2%肺鳞细胞癌、17%胃腺癌及头颈部鳞细胞癌、15%结直肠腺癌等中都有*MLL2*的突变，说明*MLL2*在这些肿瘤的发病过程中都起到一定的作用。

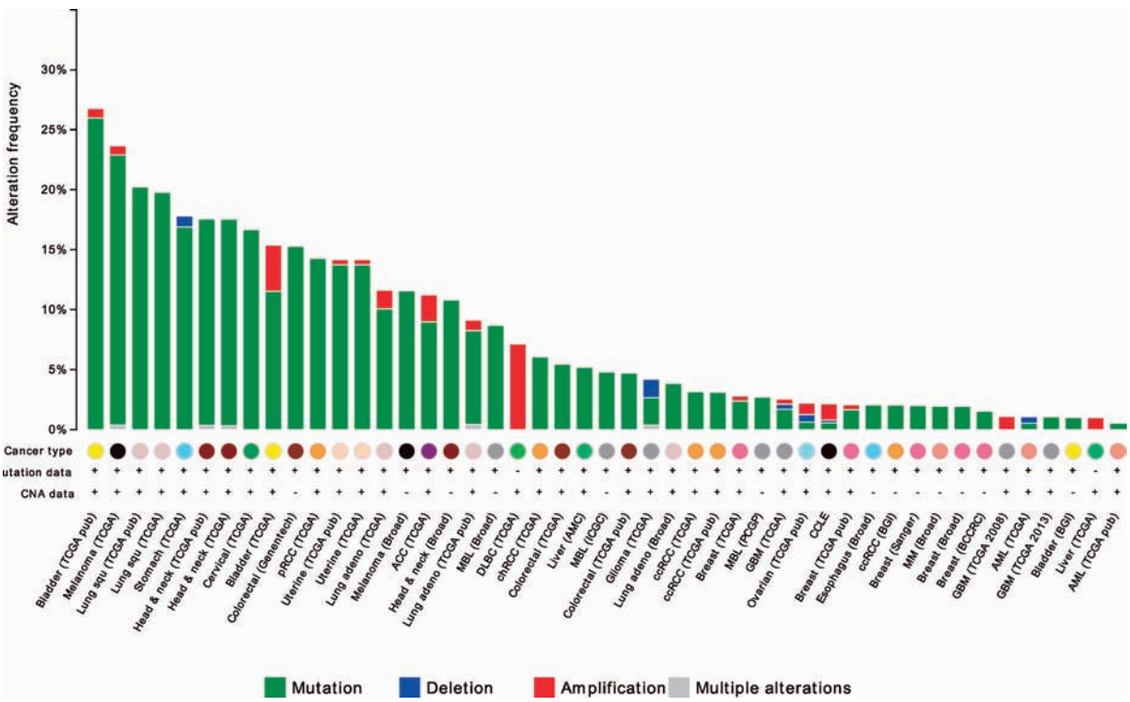



**图6–2　*MLL2*基因在肿瘤中的变化情况**
来自TCGA，生成日期2014–6。

### （三）*AKAP9*

*AKAP9*，即A-kinase anchor protein 9，其编码的蛋白属于AKAPs家族，其主要功能是通过与蛋

白激酶A（PKA）的二型调节亚基结合，使PKA全酶均匀地分布在细胞内；*AKAP9*的选择性剪切形成两种不同剪接体，分别定位于中心体和高尔基体上，能与多个信号通路中的蛋白相互作用，如Ⅱ型蛋白激酶A、丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶N、蛋白磷酸化酶1/2a、蛋白激酶C-epsilon、磷酸二酯酶4D3等。同时*AKAP9*还能与CALM2、CALM1、FNBP1、KvLQT1、PRKAR2A、PKN1、TRIP10等[5]相互作用。

在*AKAP9*条件性敲除小鼠中的研究发现，*AKAP9*纯合突变体小鼠存活率低；小鼠体内脂肪及体重减少；造血功能异常；雌性小鼠牙齿形态异常，雄性小鼠骨盆带骨骼发育异常；这些研究表明*AKAP9*在小鼠的发育中起着重要作用。TCGA数据库的资料显示*AKAP9*还与一些肿瘤的发生有关，如图6–3所示，在13.2%黑色素瘤、12%子宫体内膜腺瘤、11.5%膀胱尿路上皮瘤、10%结直肠腺瘤、8%肺腺癌等中存在*AKAP9*突变；而在一些肿瘤中又表现为扩增，如6.4%多形性胶质瘤、5.9%胃腺癌、5.7%头颈部鳞细胞癌等。

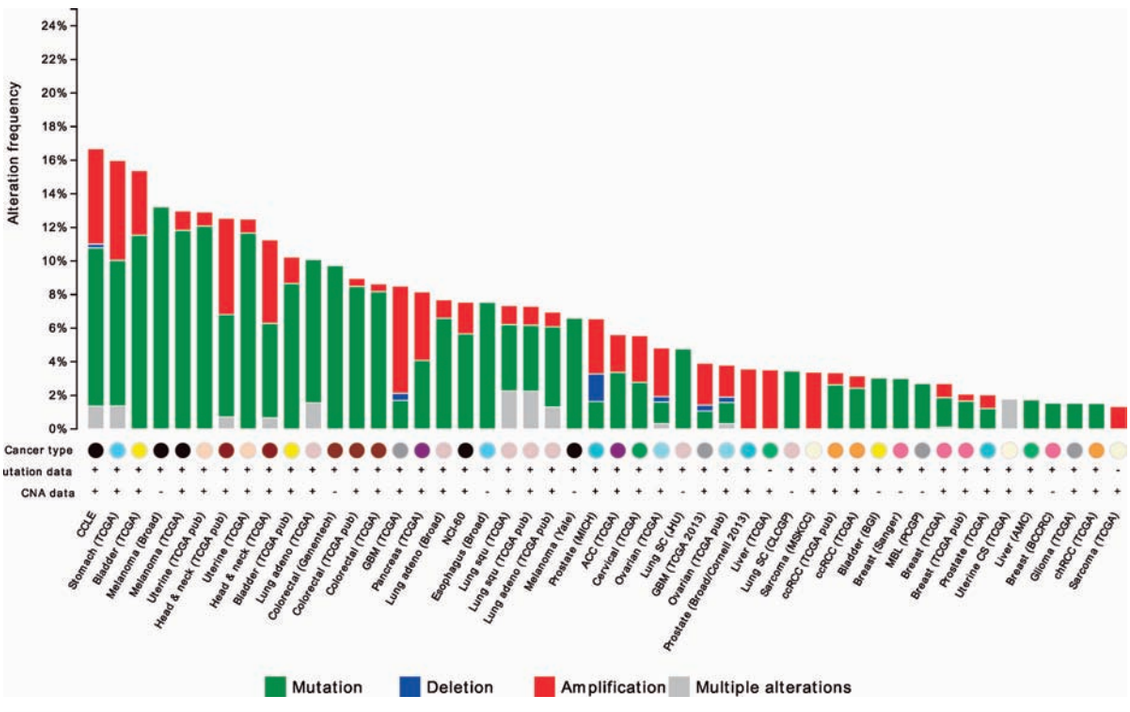



**图6–3　*AKAP9*基因在肿瘤中的变化情况**

来自TCGA，生成日期2014–6。

### （四）*FANCF*

*FANCF*即Fanconi anemia group F protein，属于范康尼贫血（Fanconi anemia）FA基因亚型，能与FA基因家族的其它成员相互作用，包括*FANCC*、*FANCG*、*FANCA*、*FANCE*等[6]，这种相互作用对于FA复合物的稳定性及核定位是必要的；FANCF还具有DNA损伤或复制后修复及细胞周期监测点的功能。

*FANCF*可使所有骨髓元素变得紊乱，从而引发贫血、白细胞减少、血小板减少等病症；它还

与心脏、肾脏、四肢的畸形及皮肤色素的变化有关；也是恶性肿瘤的诱因之一；如图6–4，TCGA数据库资料显示，*FANCF*基因在5.4%前列腺癌、3.3%腺囊癌、2%肉瘤及卵巢浆液性囊腺癌中都有扩增；在3.8%膀胱尿路上皮肿瘤、1.7%腺囊癌中表现为缺失。

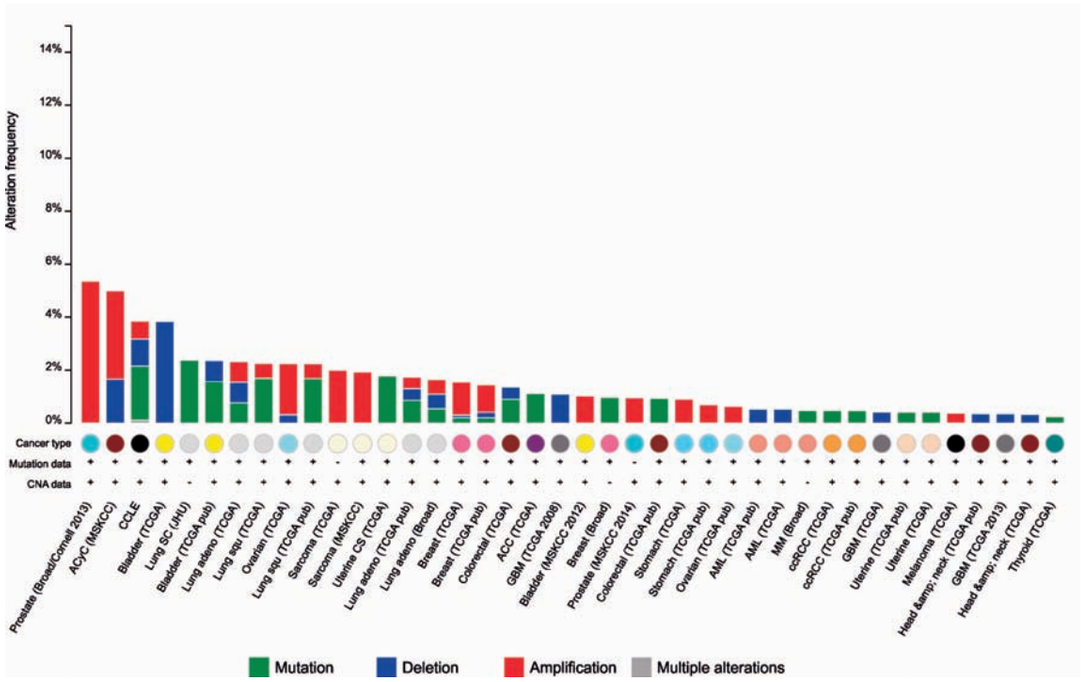



**图6–4　*FCNCF*基因在肿瘤中的变化情况**
来自TCGA，生成日期2014–6。

### （五）*TP53*

*TP53*是一个非常重要的抑癌基因，在多细胞生物体中有着重要作用，其主要功能有调控细胞周期、维护基因组稳定性、DNA损伤修复、促进细胞凋亡、抑制肿瘤的形成、抑制肿瘤血管形成等。*TP53*基因的突变失活与多种肿瘤的发生密切相关，在超过50%的人类恶性肿瘤中均存在*TP53*基因的突变，包括肝癌、乳腺癌、膀胱癌、胃癌、结肠癌、前列腺癌、软组织肉瘤、卵巢癌、脑瘤、淋巴细胞肿瘤、食道癌、肺癌、成骨肉瘤等。*TP53*在各种肿瘤中的突变率有一定的差异，如图6–5所示，TCGA的统计结果显示，*TP53*突变率较高的肿瘤包括：94%卵巢浆液性囊腺癌、80.9%肺鳞细胞癌、73%头颈部鳞细胞癌、64%胰腺癌、54%乳腺癌、52%结直肠癌、53%脑胶质瘤、48%膀胱癌、38%前列腺癌、44%肺腺癌、44%胃腺癌、28%子宫内膜癌等。

### （六）*LCX*

*LCX*即leukemia-associated protein with a CXXC domain，又名*TET1*（ten-eleven translocation methylcytosinedioxygenase 1），该基因编码的蛋白是生物体内的一种α-酮戊二酸（α-KG）和$Fe^{2+}$依赖的双加氧酶，在靠近C的一端拥有一个催化结构域，该结构域具有3个金属离子（$Fe^{2+}$）和1

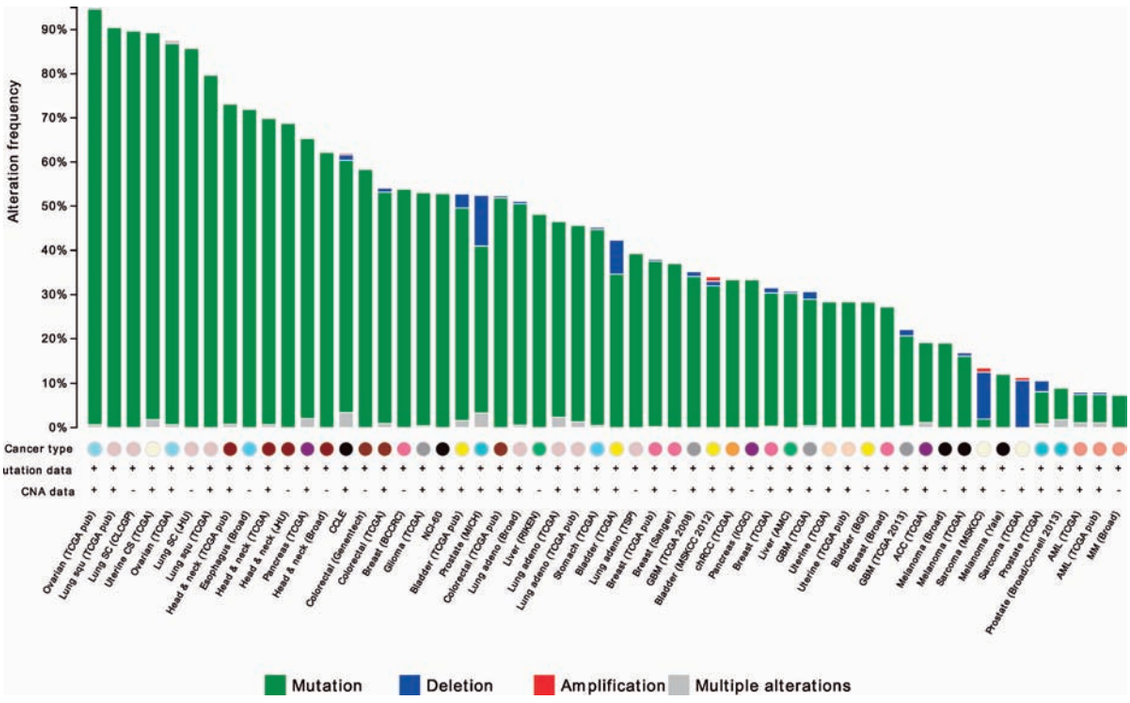



**图6–5 *TP53*基因在肿瘤中的变化情况**

来自TCGA，生成日期2014–6。

个α-KG的结合位点，催化结构域前还有一段富含半胱氨酸区，TET蛋白可以催化5–甲基胞嘧啶（5-mC）转化为5–羟甲基胞嘧啶（5-hmC）[7]，是DNA去甲基化过程中的一种重要的酶；此外*TET1*对于维持干细胞的多能性有重要作用，*TET1*及催化生成的5-hmC在干细胞中对基因表达具有双重调节作用，一方面促进全能性基因的转录，另一方面还抑制了发育调节基因的表达，两种作用有效保证了干细胞状态的保持。

研究表明，*TET1*基因的突变可以引起多种肿瘤尤其是造血系统肿瘤。如图6–6所示，TCGA数据库的资料显示，在11%结直肠腺癌、9.6%子宫体内膜腺瘤、8.4%黑色素瘤、6.9%小细胞肺癌、6.4%胃腺癌等中都检测到*TET1*基因的突变。

### （七）*LIFR*

*LIFR*，全称leukemia inhitory factor receptor alpha，是一种白血病抑制因子受体，又名CD118。该基因编码的蛋白参与形成的受体复合物可介导调控白血病抑制因子，并进一步地参与细胞的分化、增殖等过程。例如，在干细胞增殖中，*LIFR*是一种十分重要的分子，在一些与干细胞增殖密切相关的疾病（如血管瘤）中，*LIFR*也有重要功能。

如图6–7所示，来自TCGA的统计资料表明，扩增和变异是*LIFR*基因变化的两种主要形式，超过17%的小细胞肺癌中，*LIFR*都发生了突变；而在肉瘤、子宫颈癌等肿瘤中，*LIFR*的变异以扩增为主。

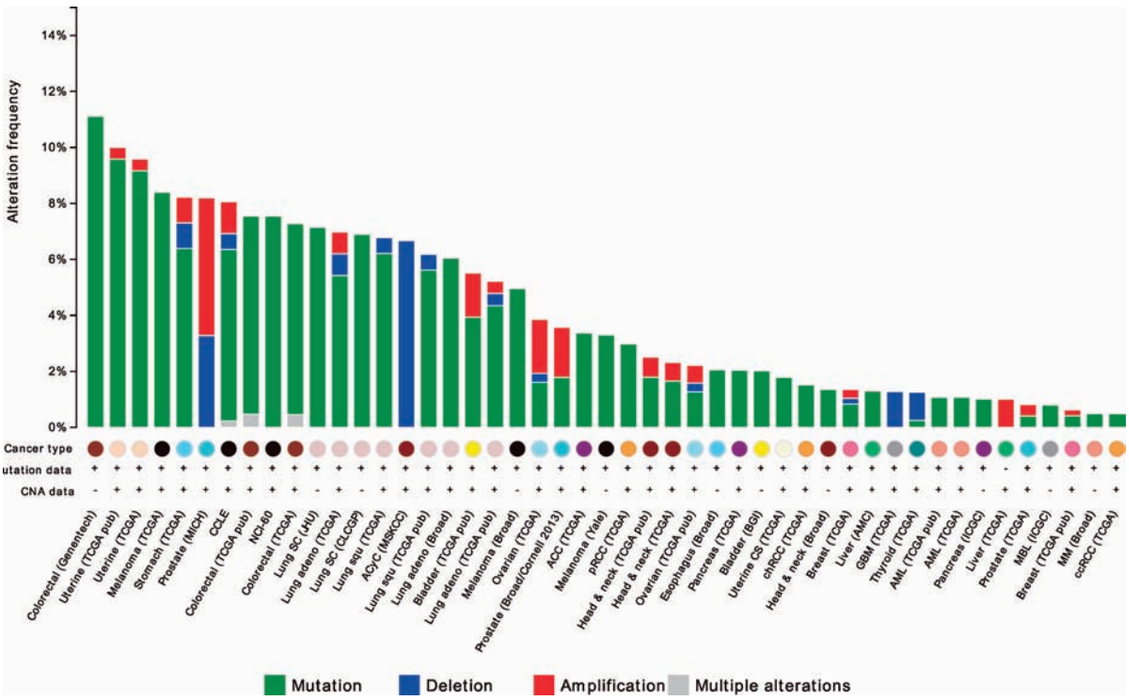



**图6–6　*LCX*基因在肿瘤中的变化情况**

来自TCGA，生成日期2014–6。

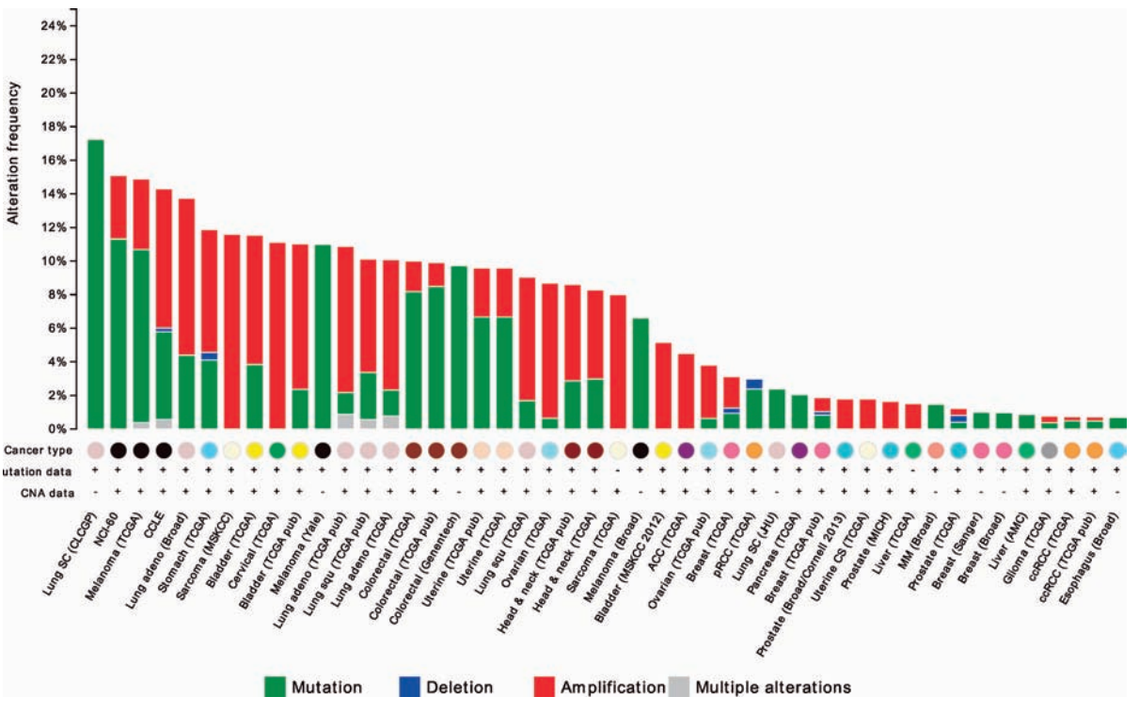



**图6–7　*LIFR*基因在肿瘤中的变化情况**

来自TCGA，生成日期2014–6。

### （八）*BRCA1*

*BRCA1*，即breast cancer 1，是一个抑癌基因，在DNA损伤修复中发挥功能。*BRCA1*参与识别并修复DNA双链断裂，对维持染色体稳定和遗传信息的正确性具有十分重要的意义。*BRCA1*的突变对于肿瘤发生尤其是乳腺癌的发生影响重大，约20%的遗传性乳腺癌患者发生*BRCA1*的突变[8]。此外，*BRCA1*的突变与卵巢癌的发生也有重要关联[9]。TCGA中的统计显示，*BRCA1*在肿瘤中的变异方式以突变为主。

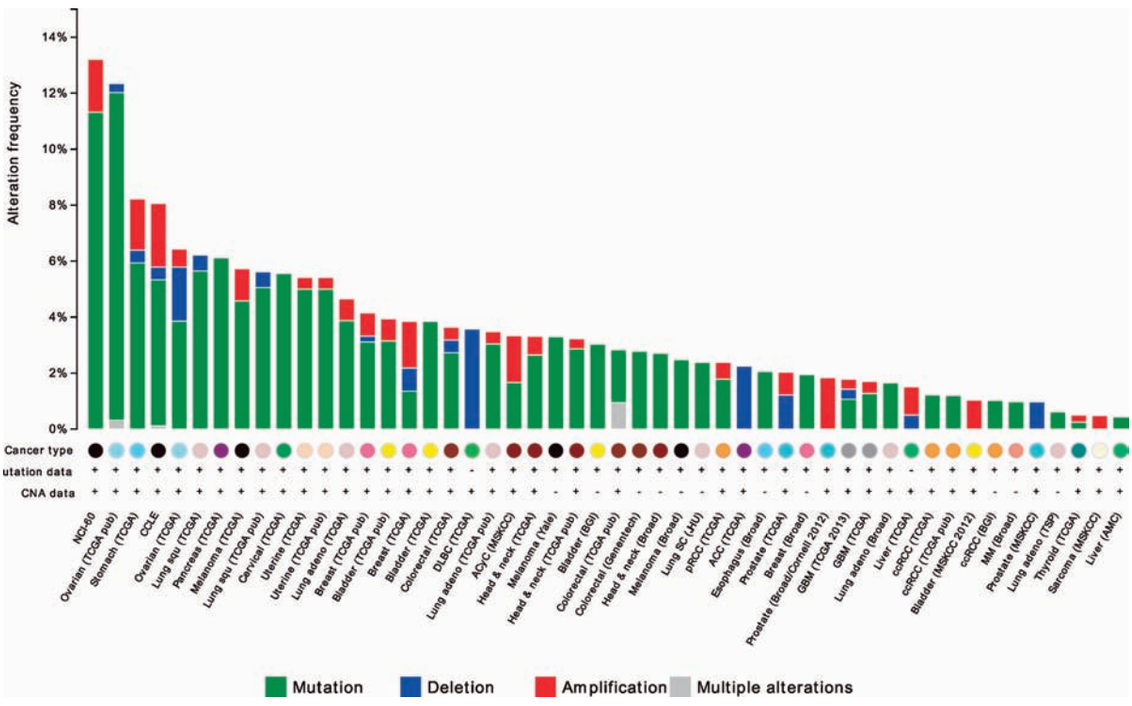



**图6–8 *BRCA1*基因在肿瘤中的变化情况**
来自TCGA，生成日期2014–6。

### （九）*IL6ST*

*IL6ST*又名糖蛋白130（glycoprotein 130），是一个跨膜蛋白，在帮助蛋白质正确折叠及配体结合中发挥作用，并通过配体—受体间的相互作用介导胞内信号转导过程。*IL6ST*参与多条重要肿瘤信号通路，如JAK、Ras等。由于*IL6ST*在信号转导、传递中的重要作用，因此*IL6ST*的正常与否，与疾病尤其是肿瘤的发生发展关系密切。目前，已在肺癌、肝癌、乳腺癌、子宫颈癌等肿瘤中发现*IL6ST*的异常表达。通过TCGA的统计结果可见，*IL6ST*在肿瘤中发生删除、突变、扩增等多种变异，在前列腺癌中超12%的肿瘤都发现有*IL6ST*的变异。

### （十）*LHFP*

*LHFP*全称lipoma HMGIC fusion partner，即脂肪瘤高速泳动蛋白融合伴侣基因，位于13q脂肪瘤染色体畸变区域。*LHFP*作为高速泳动蛋白的易位伴侣基因，与染色体畸变导致的脂肪瘤发生相

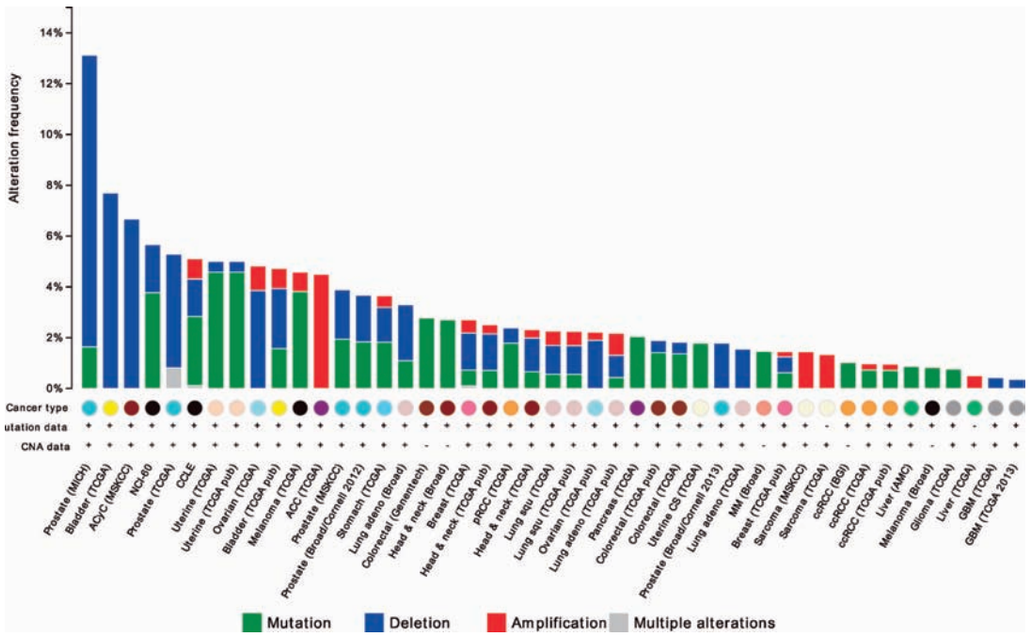



**图6–9　*IL6ST*基因在肿瘤中的变化情况**

来自TCGA，生成日期2014–6。

关。*LHFP/HMGIC*融合共同编码3个DNA结合区域，通过与DNA小沟结合，影响转录复合物的形成[10]。如图6–10中TCGA的统计数据显示，*LHFP*在多种肿瘤中也有较高的变异率，如在前列腺癌中，超过14%的前列腺癌中检测到*LHFP*的变异。

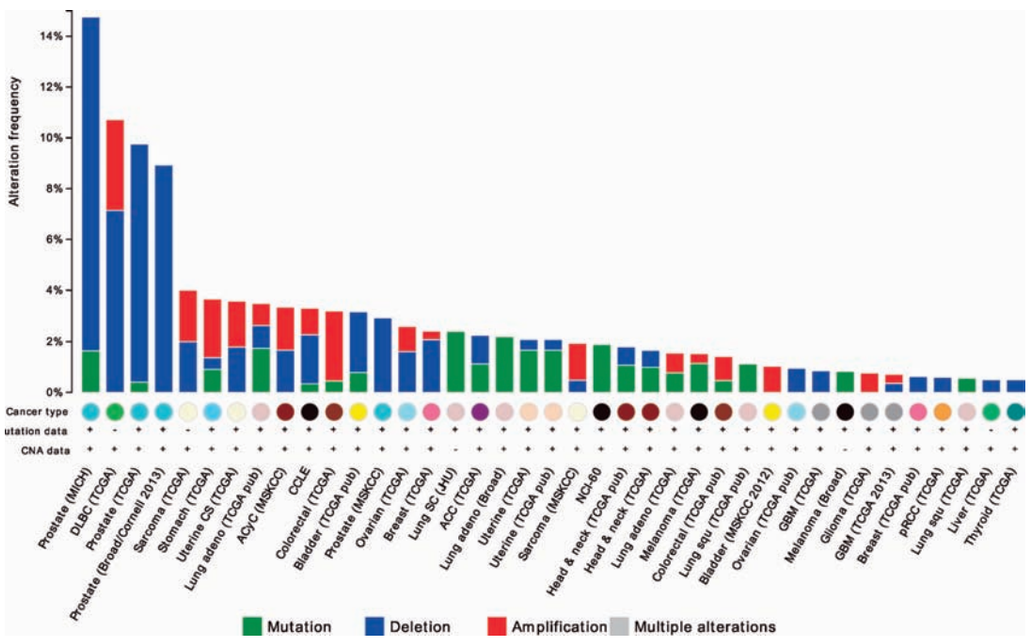



**图6–10　*LHFP*基因在肿瘤中的变化情况**

来自TCGA，生成日期2014–6。

## （十一）*MDM2*

*MDM2*即小鼠双微小体癌基因2（murine double minute 2），最初从含双微体的小鼠自转化细胞系3T3-DM中克隆得到；*MDM2*的一个重要功能是作为E3泛素连接酶，识别p53蛋白的N端反式激活结构域（TAD），从而抑制*TP53*的转录活性，因此*MDM2*是抑癌基因*TP53*的重要负调控因子；同时*MDM2*也能促进RB1蛋白的降解；诱导DAXX蛋白的泛素化及降解，抑制DAXX介导的细胞凋亡。

研究发现*MDM2*癌基因在多种肿瘤中表现为突变或扩增，如软组织肉瘤、骨肉瘤和胶质瘤等；而且*MDM2*突变与*TP53*突变不共存，*MDM2*扩增与肿瘤转移密切相关，因此*MDM2*癌基因的变化对阐明肿瘤发病机理以及转移机理具有重要意义。TCGA数据库的统计也显示*MDM2*在多个肿瘤中都出现扩增的情况，包括27%肉瘤、13.2%脑胶质瘤、11.5%膀胱尿路上皮瘤、9.3%肺腺癌、6.7%肾上腺皮质癌、5.4%子宫颈肉瘤、4%黑色素瘤、3.9%乳腺癌、3.9%卵巢癌等。

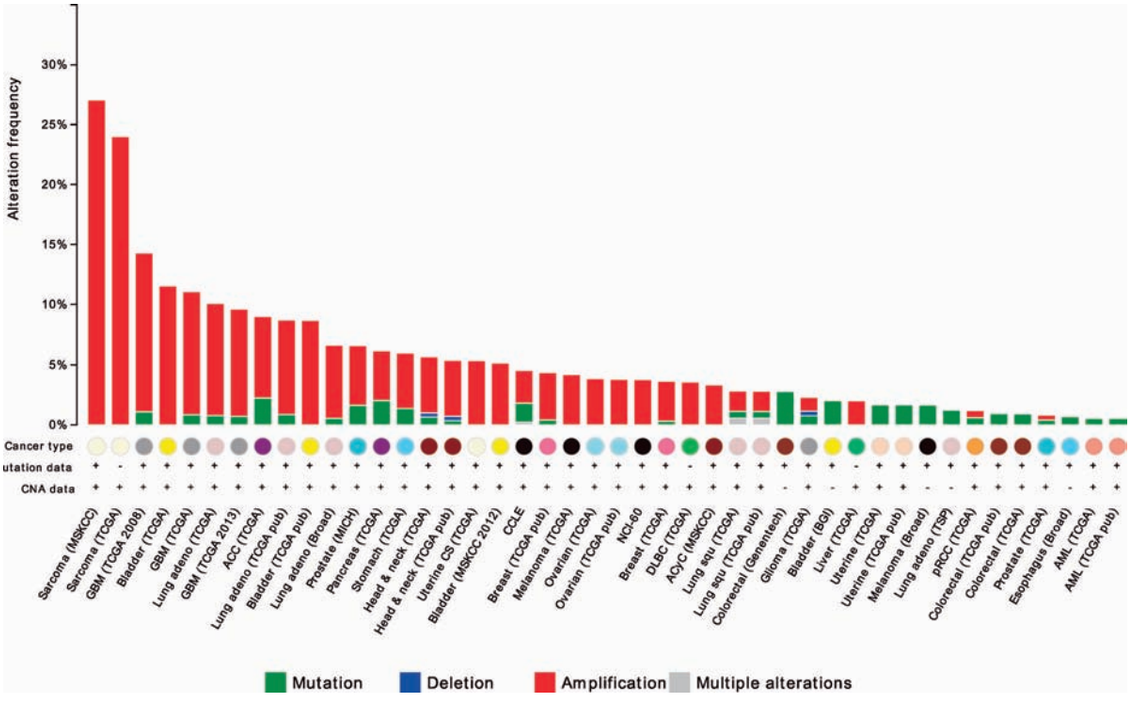



**图6–11 *MDM2*基因在肿瘤中的变化情况**

来自TCGA，生成日期2014–6。

## （十二）*BRCA2*

*BRCA2*（breast cancer 2, early onset）是继*BRCA1*后1994年发现的又一个乳腺癌相关基因；其主要功能是参与DNA损伤修复，当DNA损伤时（如DNA双链断裂），*BRCA2*与DNA单链结合，并与重组酶RAD51直接相互作用，使RAD51替代DNA单链上的复制酶RPA，并通过抑制ATP的水解，增加RAD51-ssDNA的稳定性，从而促进DNA的同源重组修复。

*BRCA2*是一个抑癌基因，目前已发现上百种突变，*BRCA2*的突变将提高肿瘤发病的几率，

*BRCA2*基因突变者，患乳腺癌和卵巢癌的风险分别是50%～85%和10%～20%；除了遗传性乳腺癌和卵巢癌，如图6–12所示，TCGA数据库的显示，*BRCA2*基因突变还与其它多种肿瘤有关，如11.5%膀胱尿路上皮瘤、11.6%黑色素瘤、10%子宫内膜癌、6.9%结直肠腺癌等；同时在一些肿瘤中*BRCA2*基因又表现为缺失，如11.5%前列腺腺癌、7.1%弥漫型大B细胞淋巴瘤、4%肉瘤、3.8%膀胱尿路上皮瘤等。

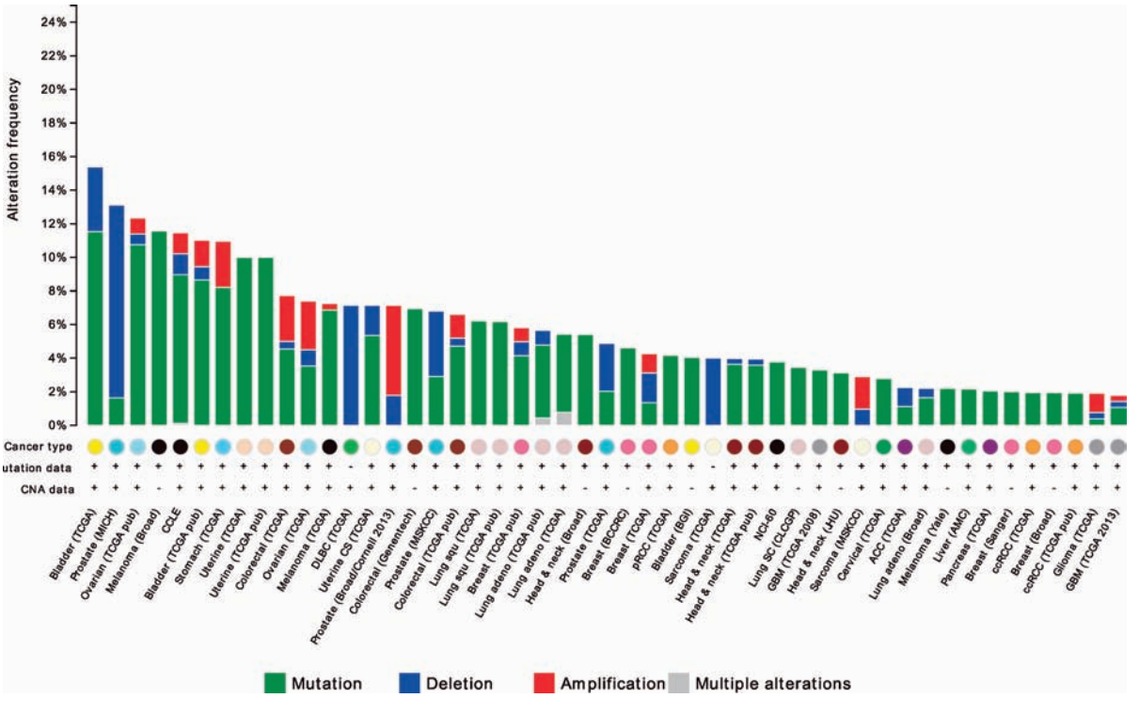



**图6–12　*BRCA2*基因在肿瘤中的变化情况**
来自TCGA，生成日期2014–6。

## （十三）*BUB1B*

BUB1B是由*BUB1B*基因编码的有丝分裂检查点丝/苏氨酸蛋白激酶BUB1β[12]，位于着丝粒上，主要功能有：①影响纺锤体检查点的功能；②抑制促后期复合物APC的形成，延迟分裂后期的开始；③确保染色体正确的分离。*BUB1B*影响纺锤体检查点的功能已在多种肿瘤中被发现。*BUB1B*的缺失或过表达与染色体的不稳定性密切相关，并因此可能促进肿瘤的发生及发展。Ding Y等[11]发现，在体内体外沉默胶质瘤中的*BUB1B*基因都能抑制脑瘤起始细胞的增殖；Grabsch H等[12]发现，在68%的胃癌中存在*BUB1B*的高表达，*BUB1B*的过表达是以一种依赖细胞增殖的方式来促进胃癌；在乳腺癌中也发现了*BUB1B*的过表达[13]。而在另一些肿瘤中发现了*BUB1B*的突变或缺失，部分人直肠癌中就存在*BUB1B*的突变。图6–13显示的是TCGA数据库中*BUB1B*在肿瘤中的变化情况，*BUB1B*在多个肿瘤中都有缺失或突变，如14.3%弥漫性大B淋巴癌、7.1%子宫肉瘤、3.6%前列腺癌、3.1%肺腺癌等中表现为缺失；在4.4%黑色素瘤、3.9%肺腺癌、3.8%膀胱癌、3.4%肺鳞癌中则表现为突变。

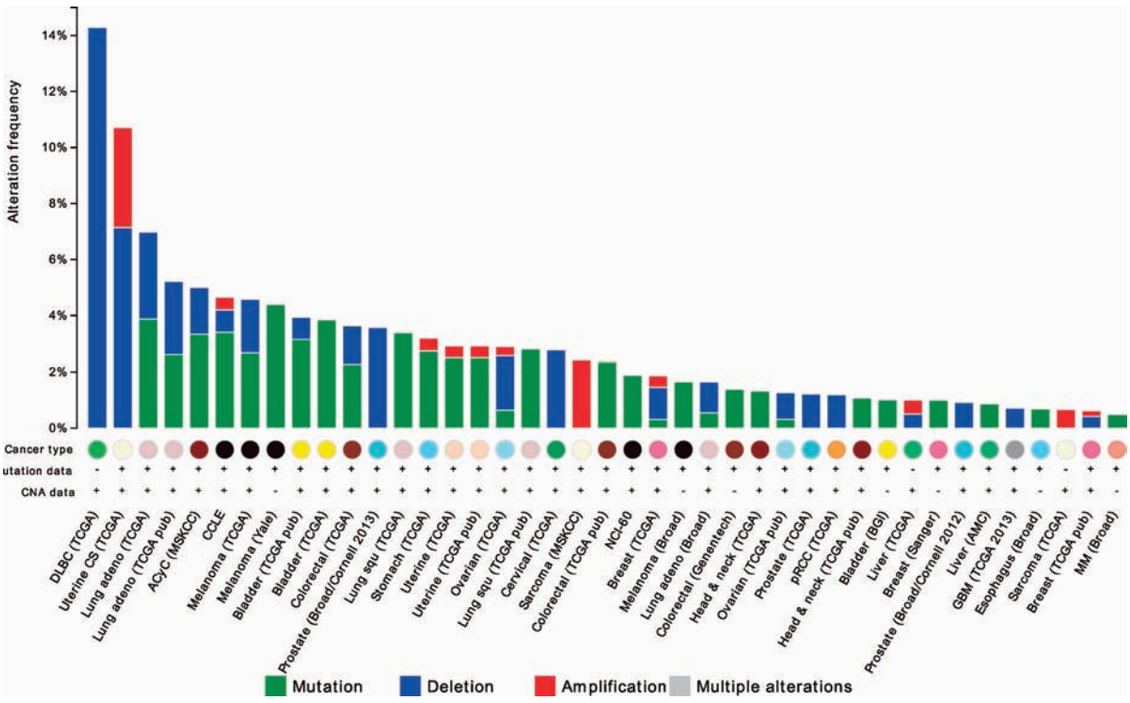



**图6–13 *BUB1B*基因在肿瘤中的变化情况**

来自TCGA，生成日期2014–6。

### （十四）*DAXX*

*DAXX*又叫死亡相关蛋白6（death-associated protein 6），因其在胞质中与死亡受体Fas相互作用而被发现，能与多种蛋白发生相互作用，如凋亡抗原Fas、着丝粒蛋白C、转录因子ETS1及PML-NBs等；DAXX是一个多功能蛋白，主要在细胞周期调控及细胞凋亡中发挥作用，*DAXX*与着丝粒异染色质复合物结合维持细胞的S期，*DAXX*的不表达使得S期细胞功能紊乱，出现含有两个核的细胞；*DAXX*还能与另一个着丝粒复合物CENP-C相互作用在细胞分裂的间期起作用。

*DAXX*另一个主要功能是调控细胞凋亡，当Fas与其配体结合时，*DAXX*被激活，进一步激活JNK信号通路上游的ASK1激酶，ASK1激活JNK-c-JUK信号通路调节压力诱导的细胞凋亡；*DAXX*能与TGF-β Ⅱ型受体的C端相结合，当TGF-β与其Ⅱ型受体结合时，*DAXX*被磷酸化，进而激活ASK1 MAPK通路，调控细胞凋亡；同时*DAXX*也可以激活MAP2K3/6促进凋亡。

研究发现，*DAXX*在肿瘤中也发挥一定的作用，Pan等[14]发现在人卵巢上皮瘤中*DAXX*高表达，*DAXX*的高表达促进卵巢癌细胞的增殖、迁移及放疗与化疗的抵抗；如图6–14所示，来自TCGA的统计显示，除了卵巢癌外，*DAXX*在其它肿瘤中也起到一定作用，如在6.1%胰腺癌、4.5%肾上皮腺癌、4.1%黑色素瘤、3.8%膀胱癌、3.3%子宫颈癌等中都存在*DAXX*突变，而在5.3%黑色素瘤、4.8%卵巢浆液性囊腺癌、3.6%弥漫性大B细胞淋巴瘤、2.6%肺腺癌、2.5%肝癌中表现为扩增。

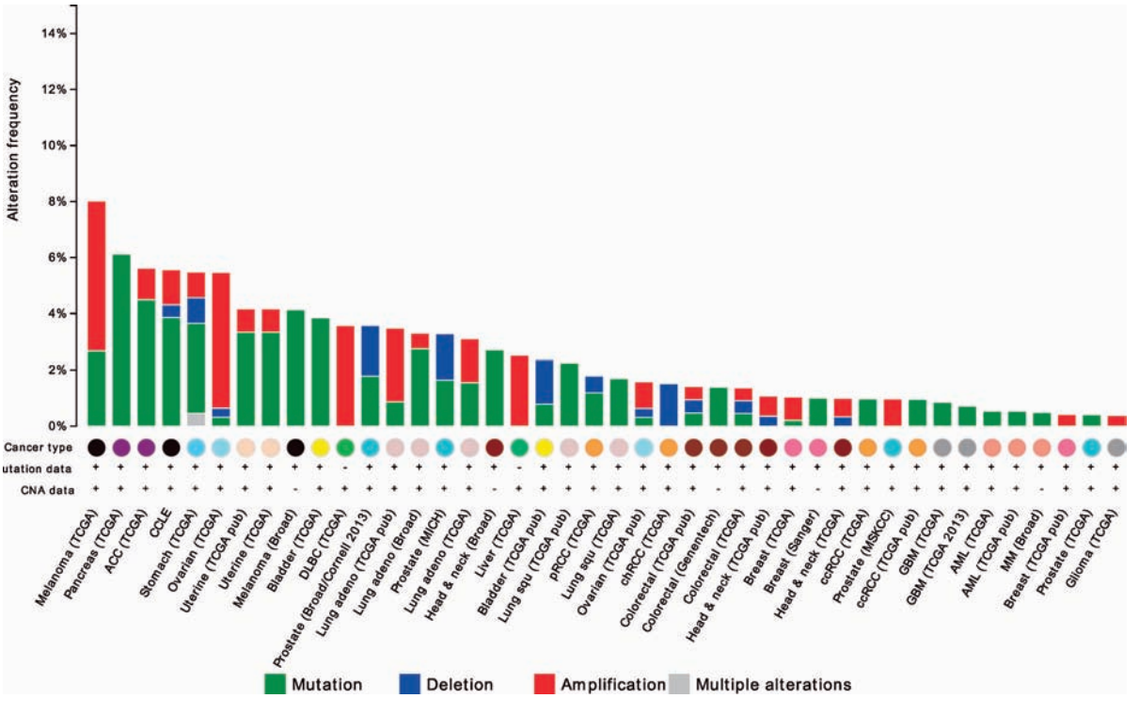



**图6–14　*DAXX*基因在肿瘤中的变化情况**
来自TCGA，生成日期2014–6。

### （十五）*TNFRSF17*

*TNFRSF17*（tumor necrosis factor receptor superfamily member 17），属于TNF受体家族，主要在成熟B细胞中表达，在B淋巴细胞的发育及自身免疫应答中发挥重要作用；*TNFRSF17*能特异的与TNF家族成员TNFSF13B结合，从而激活NF-κB及MAPK8/JNK信号通路[15]；*TNFRSF17*还能与TRAF家族的其它成员结合，进行细胞信号转导维持细胞存活及增殖。

目前关于*TNFRSF17*在肿瘤中的作用的研究较少，其具体作用还不清楚。根据TCGA数据库的统计，*TNFRSF17*在多种肿瘤都有扩增，但是比率较低，包括4.5%乳腺癌、3.8%膀胱癌、3.6%弥漫性大B细胞淋巴瘤、2.7%肉瘤、2%胰腺癌等，提示*TNFRSF17*在这些肿瘤中可能充当癌基因的作用。

### （十六）*POT1*

*POT1*即protection of telomeres protein 1，其编码的蛋白POT1属于端粒末端结合蛋白家族；POT1是端粒保护蛋白复合物shelterin的组成元件，shelterin能与端粒重复序列TTAGGG结合，进而调节端粒的长度，防止染色体末端的异常重组、灾难性的染色体不稳定性及染色体的分离异常等。POT1可与ACD（adrenocortical dysplasia）形成异源二聚体，通过增加端粒酶的持续合成能力，促进端粒的延长。

研究发现，POT1转录表达的升高可能与胃癌的形成及发展有关[16]；*POT1*的突变还与慢性淋巴细胞白血病相关[17]；Robles E等[18]发现携带*POT1*基因特异突变的人们极有可能形成遗传性黑色

素瘤，并发现一些其它的家族性癌症，如白血病和脑肿瘤等也携带*POT1*遗传性突变，即*POT1*基因的失活突变有可能不仅是黑色素瘤，也是其它癌症发病的诱因之一。

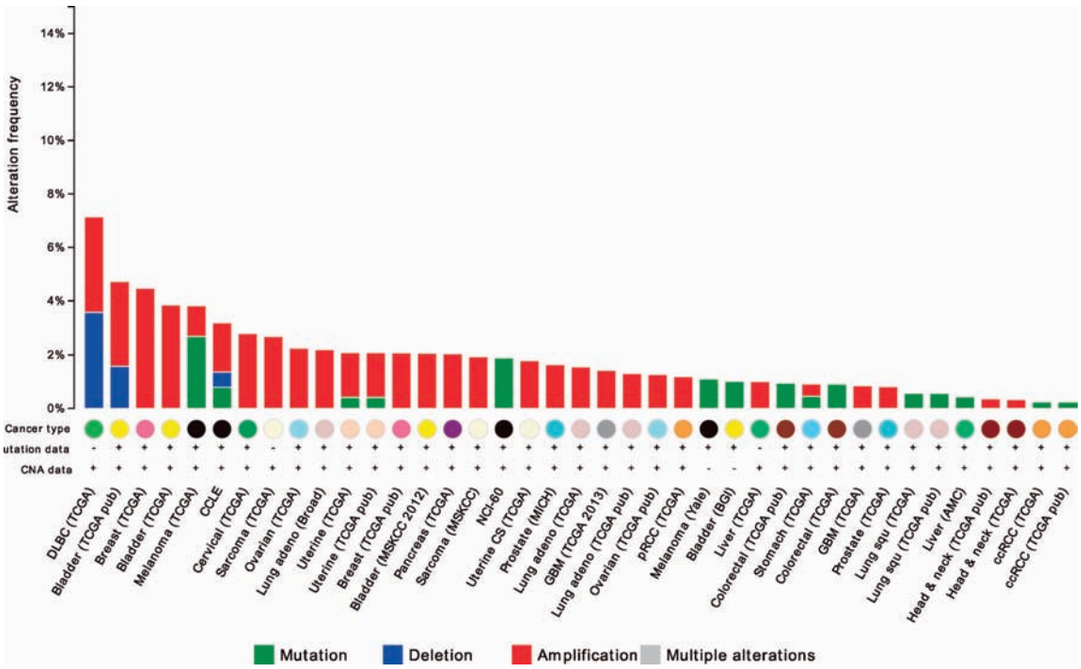



**图6–15　*TNFRSF17*基因在肿瘤中的变化情况**

来自TCGA，生成日期2014–6。

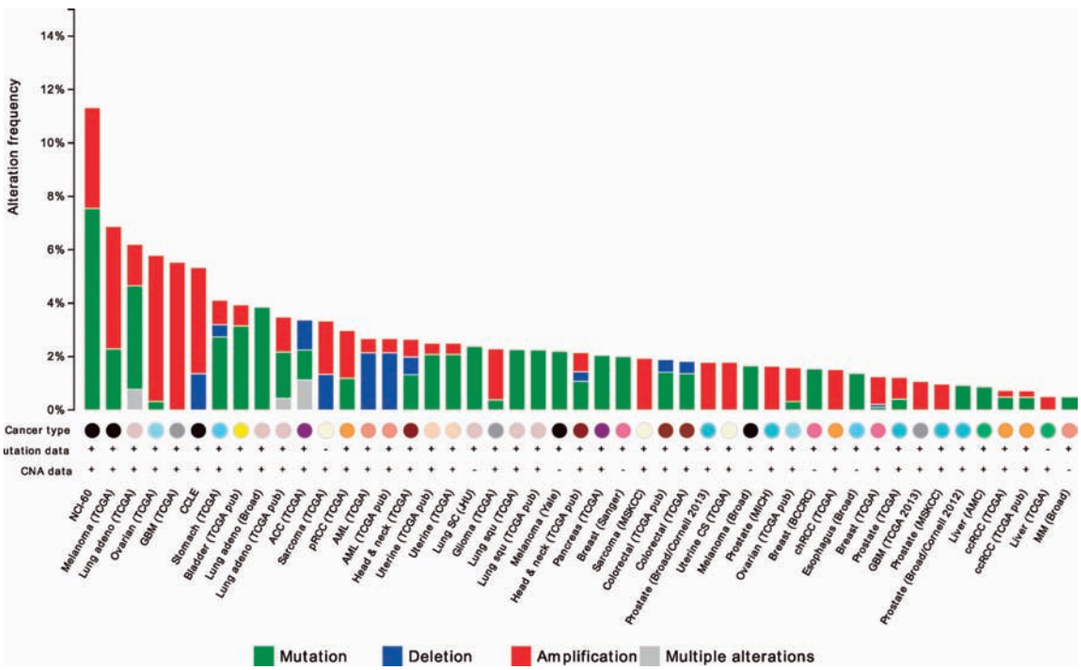



**图6–16　*POT1*基因在肿瘤中的变化情况**

来自TCGA，生成日期2014–6。

## 四、树鼩特有同源基因介绍

仅在树鼩中有的同源基因共有10个，分别是*ZNF331*、*ZNF384*、*ZNF521*、*FCRL4*、*KIAA1549*、*C2orf44*、*CLTCL1*、*SSX1*、*FLJ27352*、*CRLF2*。

### （一）*ZNF331*

锌指蛋白331基因（zinc finger protein 331 gene, *ZNF331*）与甲状腺肿瘤、胃癌的发生有密切关系。染色体19q13区易位引起的甲状腺肿瘤，可能是由于易位造成了*ZNF331*基因的功能丧失所导致。而*ZNF331*的表达能显著降低胃癌细胞系的细胞增殖能力，阻滞细胞周期的运行，抑制细胞的迁移和侵染能力[19]。这些研究表明*ZNF331*基因很有可能是一个新的抑癌基因，它的表达或突变对肿瘤的发生发展有重要影响。

图6–17所示为TCGA数据库中*ZNF331*在肿瘤中的变异情况，*ZNF331*在肿瘤中的变异情况较为复杂，在7.6%黑色素瘤、3.4%小细胞肺癌中表现为突变，在7.1%膀胱癌、5%腺囊瘤、5.4%子宫肉瘤、4.1%胰腺癌中表现为扩增，而在3.4%低级别脑胶质瘤中表现为缺失，提示*ZNF331*在不同肿瘤中的功能可能不尽相同。

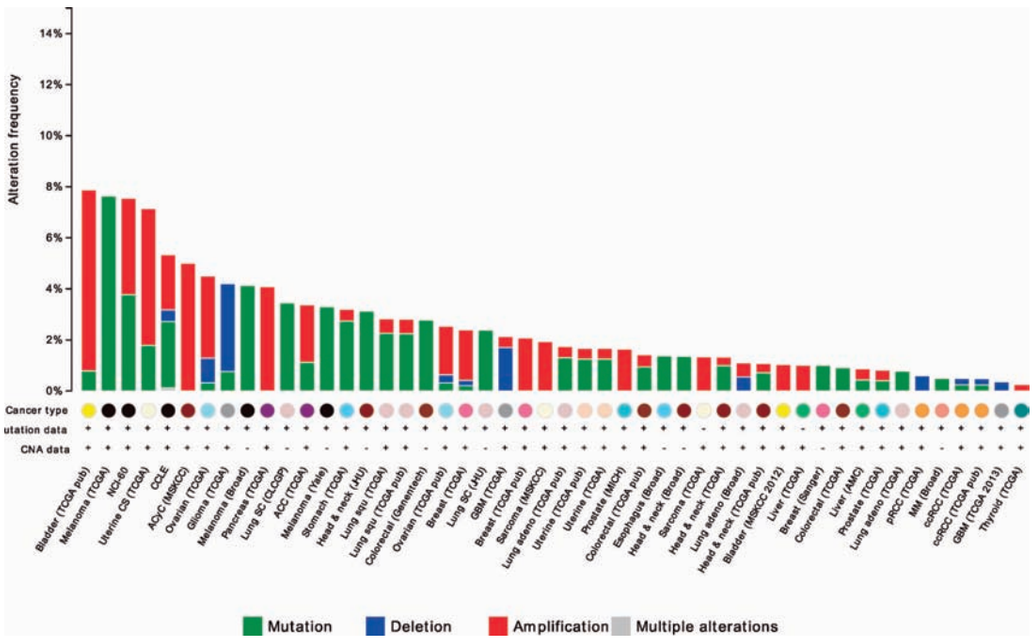



**图6–17 *ZNF331*基因在肿瘤中的变化情况**
来自TCGA，生成日期2014–6。

### （二）*ZNF521*

锌指蛋白521基因（zinc finger protein521 gene, *ZNF521*）编码的蛋白质为C2H2型锌指蛋白，包含30个锌指结构域，参与BMP信号通路，能与smad-1、smad-4结合，进入细胞核调控靶基因的表达[20]。*ZNF521*在多种组织中广泛分布，尤其是在脑组织中含量丰富，在小脑中高表达，与脑肿瘤（如成神经管细胞瘤）的发生密切相关[21]。研究表明*ZNF521*在成神经管细胞瘤中的过表达可显

著增加该细胞类群的增殖能力，并能增加愈伤组织中细胞的迁移性，即*ZNF521*对细胞具有促生长、致瘤性的效应[21]。鉴于*ZNF521*在成神经管细胞瘤中的显著作用，该基因可能作为治疗成神经管细胞瘤的靶点。此外，*ZNF521*在B淋巴性急性白血病中有不同的功能，研究发现*ZNF521*通过C端作用于早期B细胞因子1（early B-cell factor-1, EBF1）并抑制B淋巴细胞的发育[22]。

图6–18所示为TCGA数据库统计的*ZNF521*在肿瘤中的变异情况，*ZNF521*在肿瘤中的变化主要以突变、扩增为主，在27.6%小细胞肺癌、9.3%肺腺癌、8.2%胃腺癌、6.2%肺鳞癌、6.9%结直肠癌中表现为突变；在6.4%卵巢浆液性囊腺癌、3.6%弥漫型大B细胞淋巴瘤、4.1%胰腺癌中表现为扩增；说明*ZNF521*在肿瘤中的作用可能较为多样化。

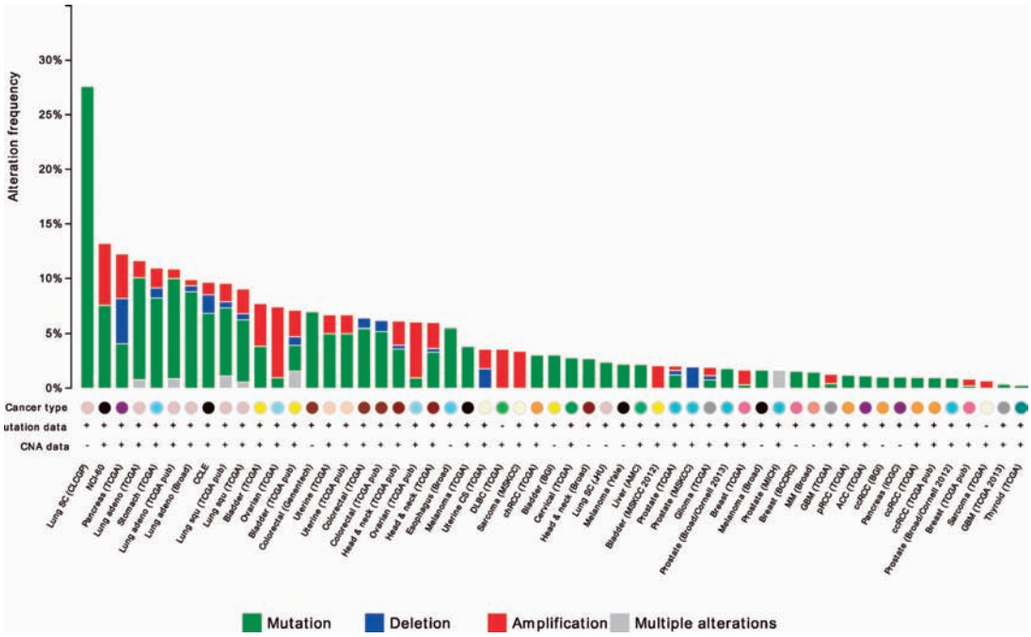



**图6–18 *ZNF521*基因在肿瘤中的变化情况**

来自TCGA，生成日期2014–6。

### （三）*ZNF384*

锌指蛋白384基因（zinc finger protein384 gene, *ZNF384*）定位于染色体12p13，参与骨的新陈代谢和精子发生等过程，并与白血病的发生有关[23]。*ZNF384*主要通过参与BMP/smad信号通路，实现其相关生理功能：骨形态发生蛋白（BMP）是转化生长因子超家族（TGF-β）的成员，通过与细胞膜表面的BMP受体结合后，与受体底物smad一起将信号从细胞表面传导至细胞核内[24]，*ZNF384*在此过程中发挥调控功能。

在肿瘤发生中，整合素（integrin）作为一类膜镶嵌糖蛋白，介导细胞表面受体的信号传递，是与肿瘤的侵袭与转移关系最密切的黏附分子之一。整合素功能的缺失与急性白血病有关，*ZNF384*作为整合素信号通路的一个效应分子，参与了急性白血病的发生。进一步的研究发现，*ZNF384*能在急性成淋巴细胞性白血病中与*TAF15*发生基因融合[25]。

除白血病外，TCGA数据库的统计结果显示*ZNF384*在多个肿瘤中都出现扩增或突变的情况，如图6–19所示，*ZNF384*在10%卵巢癌、5.7%脑胶质瘤、3.6%子宫肉瘤、3.8%膀胱癌、3.3%前列腺

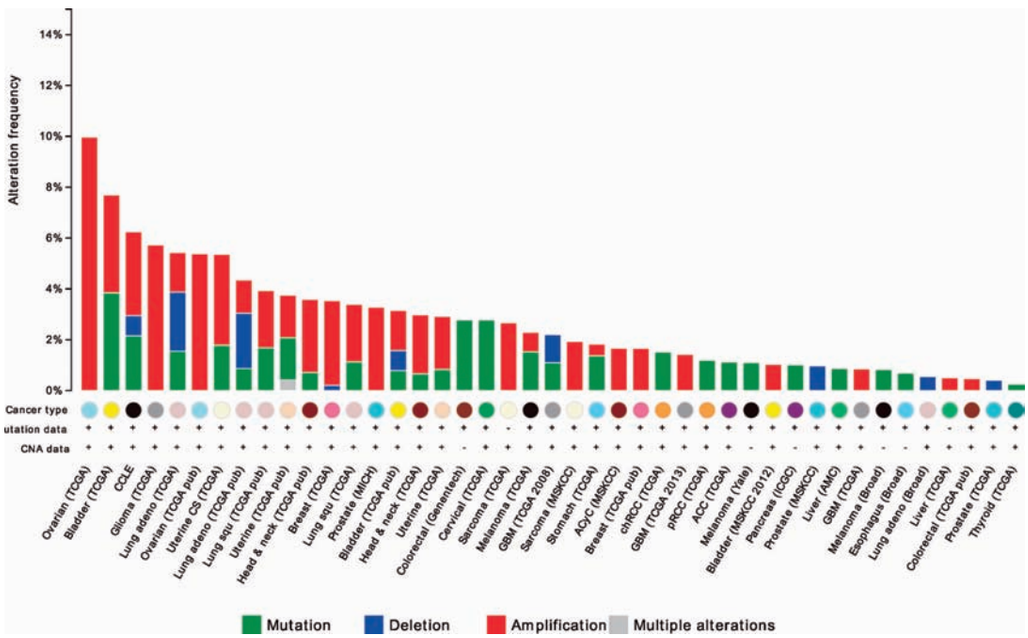



**图6–19　*ZNF384*基因在肿瘤中的变化情况**
来自TCGA，生成日期2014–6。

癌、3.3%乳腺癌等肿瘤中表现为扩增。

### （四）*FCRL4*

*FCRL4*（Fc receptor-like protein 4），其编码的蛋白是聚集于1号染色体上Fc受体样糖蛋白之一，属于免疫球蛋白受体家族，具有4个胞外C2免疫球蛋白结构域，这个结构域是跨膜的、胞质的结构域，含有3个免疫受体抑制motif；因此*FCRL4*可以抑制B细胞受体信号通路，在B细胞介导的免疫反应中发挥作用。

研究表明，含有*FCRL4*基因的染色体畸变与非霍奇金淋巴瘤和多发性骨髓瘤密切相关；此外，来自TCGA数据库的资料显示，*FCRL4*基因在多种肿瘤中都出现了扩增或突变的情况，如图6–20所示，在15%肝癌、11.6%乳腺癌、11.6%肺腺癌、6.7%肉瘤、6.4%卵巢浆液性囊腺癌、5.5%膀胱癌中表现为扩增；而在6.9%小细胞肺癌、5.7%黑色素瘤、4%头颈部鳞细胞癌中则为突变。

### （五）*KIAA1549*

*KIAA1549*编码的蛋白属于UPF0606蛋白家族；含有*KIAA1549*基因的染色体畸变与纤维性星形细胞瘤有关；而且在多例纤维性星形细胞瘤中发现*KIAA1549*能与*BRAF*癌基因发生融合，Hawkins C等[26]在60%的星形细胞瘤中检测到*KIAA1549-BRAF*融合，而且这种融合导致了Ras/MAPK信号通路的持续性激活，从而诱导细胞的转化。

除星形细胞瘤外，TCGA数据库的统计结果显示*KIAA1549*在多个肿瘤中都出现扩增或突变的情况，如图6–21所示，*KIAA1549*在10.7%黑色素瘤、9.7%结直肠腺癌、7.9%肺鳞癌、7.1%小细胞肺癌、5.9%胃腺癌等中表现为突变；在10%卵巢浆液性囊腺癌、6.1%黑色素瘤、3.6%子宫肉瘤中表现为扩增。

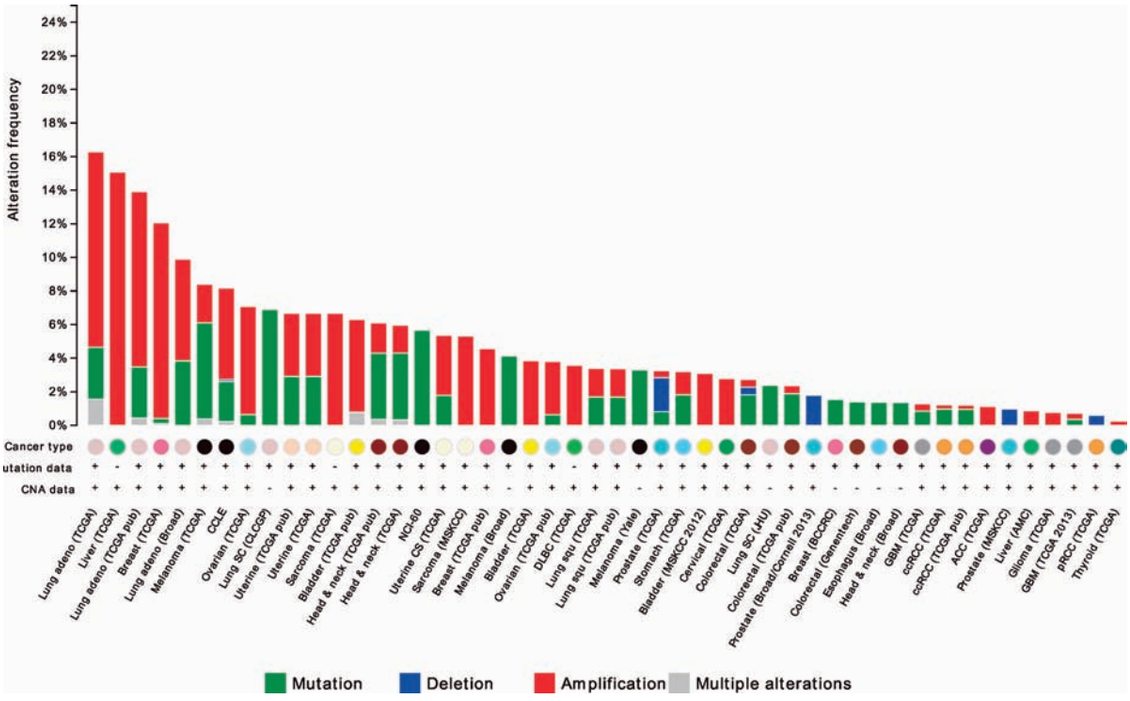



**图6–20 *FCRL4*基因在肿瘤中的变化情况**

来自TCGA，生成日期2014–6。

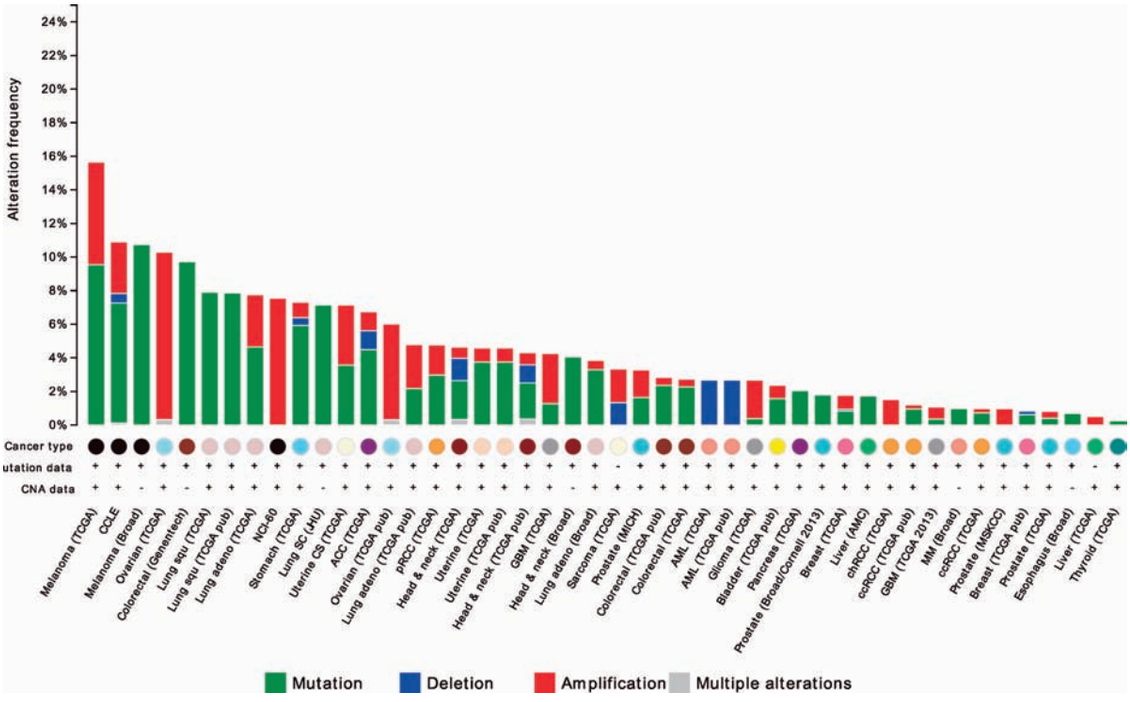



**图6–21 *KIAA1549*基因在肿瘤中的变化情况**

来自TCGA，生成日期2014–6。

### （六）*CLTCL1*

*CLTCL1*即clathrin，heavy chain-like 1，属于网格蛋白重链基因家族，其编码的蛋白是网格蛋白三脚蛋白复合体的重要组成部分，在被膜小泡的形成过程中发挥重要作用；*CLTCL1*变异与脑膜瘤、DiGeorge综合征及velo-cardio-facial综合征有关。

TCGA数据库的统计显示，*CLTCL1*在肿瘤中的情况较为复杂，但主要以突变和扩增为主，如图6–22所示，7.9%子宫体内膜癌、5.6%宫颈鳞状细胞癌和内膜腺癌、5%黑色素瘤、3.8%肺腺癌、3.6%子宫肉瘤、3.2%结直肠腺癌中为突变；而在7.1%子宫肉瘤、5.3%肉瘤、3.9%卵巢浆液性囊腺癌中为扩增；在3.8%膀胱癌、3.3%前列腺癌中又表现为缺失。

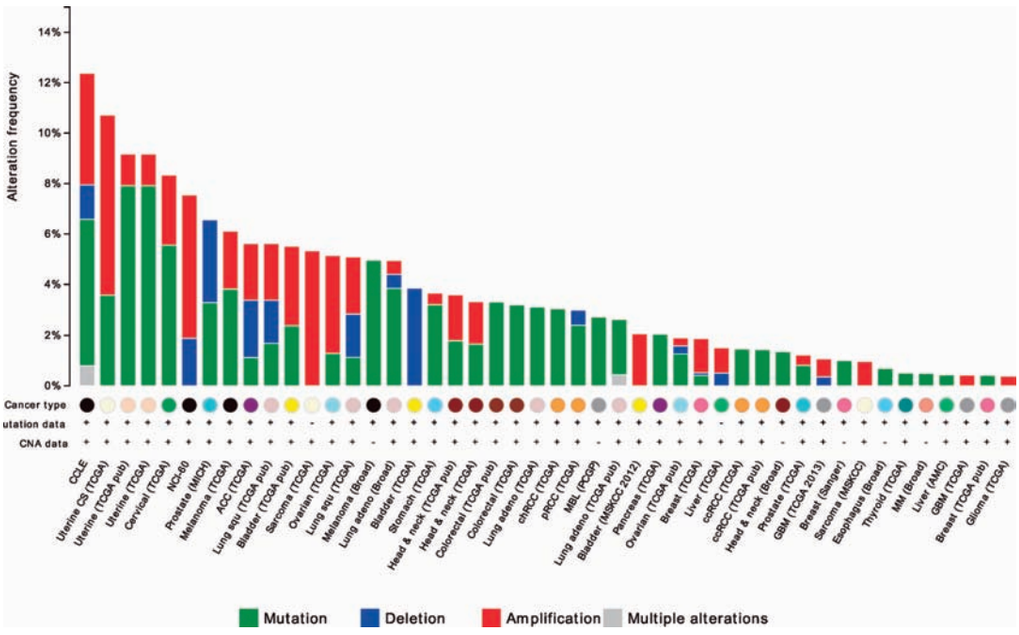



**图6–22　*CLTCL1*基因在肿瘤中的变化情况**
来自TCGA，生成日期2014–6。

### （七）*SSX1*

*SSX1*即synovial sarcoma，X breakpoint 1，该基因编码的蛋白属于高度同源的SSX断点蛋白；通常起转录抑制因子的作用；能在癌症患者中引起自发的体液和细胞免疫反应；*SSX1*是癌症疫苗免疫治疗的潜在靶标之一；*SSX1*基因的突变可引发滑膜肉瘤。

TCGA数据库统计结果显示，*SSX1*基因在多种肿瘤中都有变化；在7.1%子宫肉瘤、7.1%卵巢浆液性囊腺癌、4.9%前列腺癌、4.7%肉瘤中表现为扩增；而在部分宫颈鳞状细胞癌和内膜腺癌、头颈部鳞细胞癌、胰腺癌中为缺失；在小部分黑色素瘤、小细胞肺癌、子宫内膜癌中检测到*SSX1*基因的突变，可见*SSX1*基因在肿瘤中的作用较为多样化。

### （八）*C2orf44*

*C2orf44*（WD repeat-containing protein），含有2个WD重复序列，还含有一个coiled-coil结构域，*C2orf44*在某些肿瘤中可以与别的基因形成融合基因而起作用；Lipson D等[27]发现在结直肠癌

中*C2orf44*基因可以与*ALK*基因融合成*C2orf44-ALK*，这种融合会造成ALK激酶的过表达。此外，如图6–24所示，TCGA数据库的统计显示，*C2orf44*基因在肿瘤中既有突变也有扩增，如膀胱癌、子宫内膜癌等，说明*C2orf44*基因在肿瘤中可能发挥双重作用。

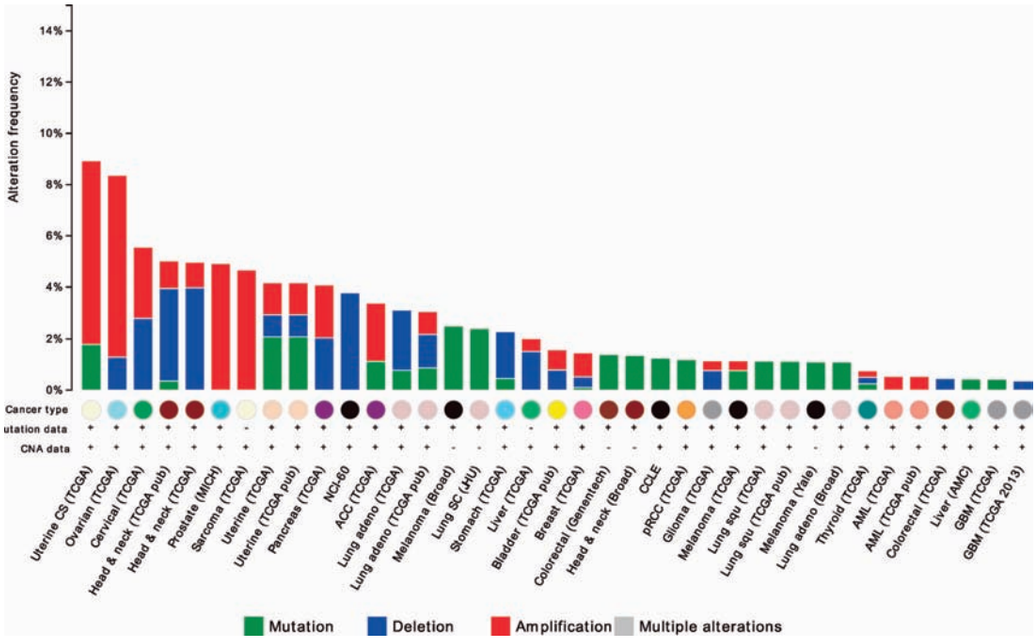



**图6–23　*SSX1*基因在肿瘤中的变化情况**

来自TCGA，生成日期2014–6。

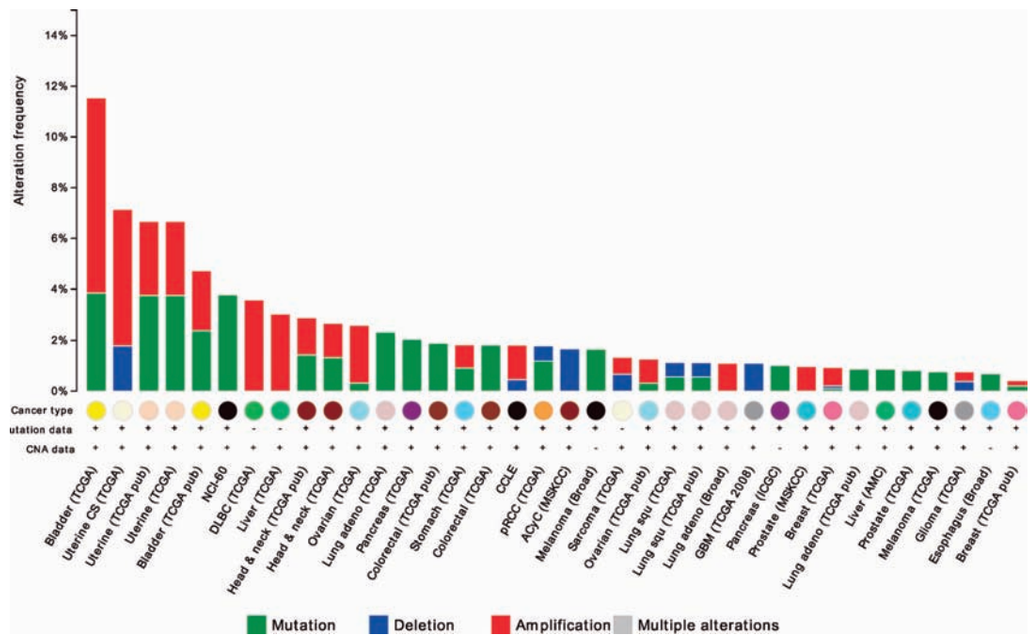



**图6–24　*C2orf44*基因在肿瘤中的变化情况**

来自TCGA，生成日期2014–6。

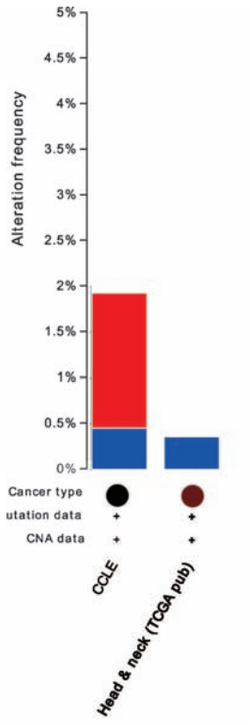



**图6–25　*C15orf65*基因在肿瘤中的变化情况**
来自TCGA，生成日期2014–6。

### （九）*FLJ27352*

*FLJ27352*又叫*C15orf65*（chromosome 15 open reading frame 65），目前对该基因的研究还较少，因此能查到的关于*C15orf65*的功能及其相关的疾病的信息很少。TCGA数据库统计结果显示，*C15orf65*只在两种肿瘤中变异，如图6–25所示，分别是头颈部鳞细胞癌和CCLE，该基因在肿瘤中的作用还有待于进一步研究。

### （十）*CRLF2*

*CRLF2*即cytokine receptor-like factor 2，其主要功能是作为胸腺基质淋巴细胞生成素（TSLP）的受体，其编码的蛋白与TSLP及IL7R结合形成复合物，激活STAT3和STAT5，从而刺激细胞的增殖；也能激活Jak2信号；与造血系统的发育有关[28]。如图6–26所示，来自TCGA数据库的统计结果显示，*CRLF2*基因在弥漫型大B细胞淋巴瘤、头颈部鳞细胞癌、胃腺癌中以缺失为主，而在卵巢浆液性囊腺癌、肉瘤、膀胱癌等中又以扩增为主。

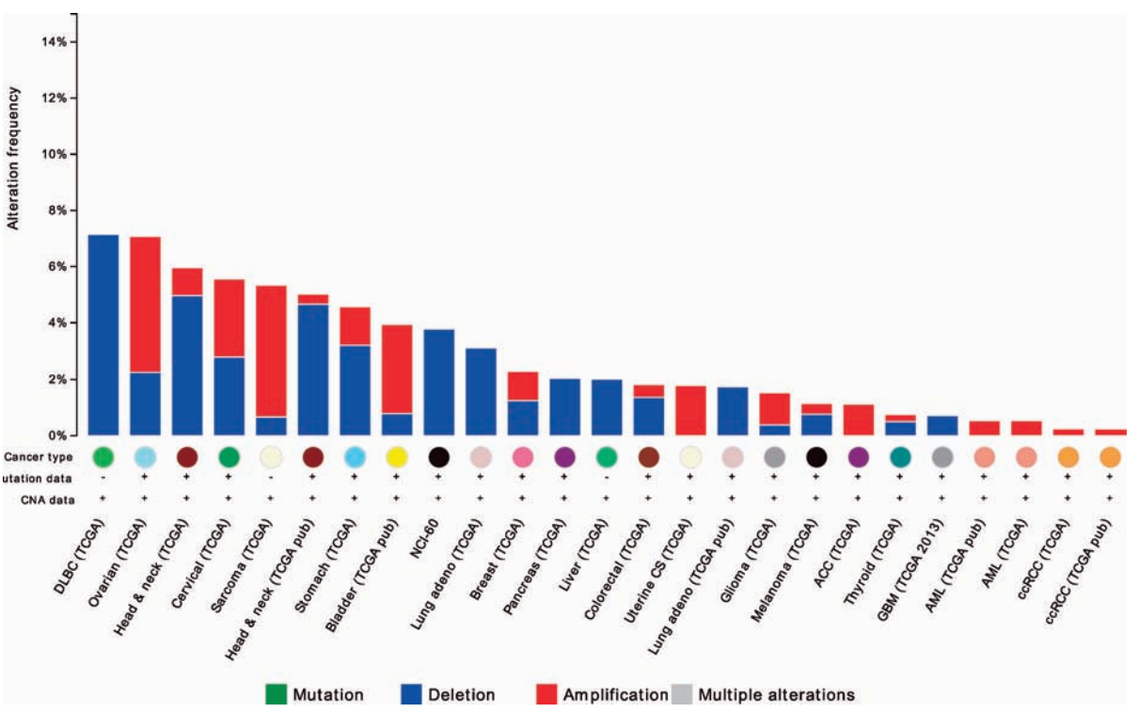



**图6–26　*CRLF2*基因在肿瘤中的变化情况**
来自TCGA，生成日期2014–6。

## 五、树鼩特有同源基因及树鼩–人同源性较高的肿瘤相关基因信号通路聚类分析

经查询KEGG数据库（http://www.genome.jp/kegg/）pathway in cancer中肿瘤相关的主要信号通路（PI3K-AKT、p53、JAK-STAT、Ras、MAPK、mTOR、ErbB、TNF、Toll-like receptor、PPAR、Wnt、Notch、TGF-β、VEGF、HIF、NF-Kb），并将上文中149个人–树鼩同源性较高（≥5%）的基因及树鼩特有的10个同源基因对应到各信号通路中，发现以上基因主要集中于p53、PI3K-AKT等信号通路中，现将聚合了≥5个基因的肿瘤信号通路列表如下：

表6–2　树鼩–人同源性较高肿瘤相关基因在主要肿瘤信号通路中的聚合

| 树鼩–人与小鼠–人同 源基因同源性差异值 / 信号通路 | ≥15% | 10%～15% | 5%～10% | 合计（个） |
|---|---|---|---|---|
| PI3K–AKT Pathway | | | IL2, Kras, IL7R, PDGFRB, KIT, MET, JAK2, JAK3 | 8 |
| p53 pathway | CDKN2A | TP53, MDM2 | CCNE, CHK2, DDB2, CDK4, MDM4 | 8 |
| JAK–STAT pathway | | LIFR, IL6ST | IL2, IL21R, IL7R, JAK2, JAK3 | 7 |
| Ras pathway | | | Kras, PTPN11, PDGFRB, KIT, MET | 5 |

从表6–2可见，PI3K-AKT信号通路、p53信号通路、JAK-STAT信号通路、Ras信号通路中集合了较多的基因（基因数≥5），这些基因在上述4个信号通路中的具体位置及相互关系如图6–27～6–30所示：

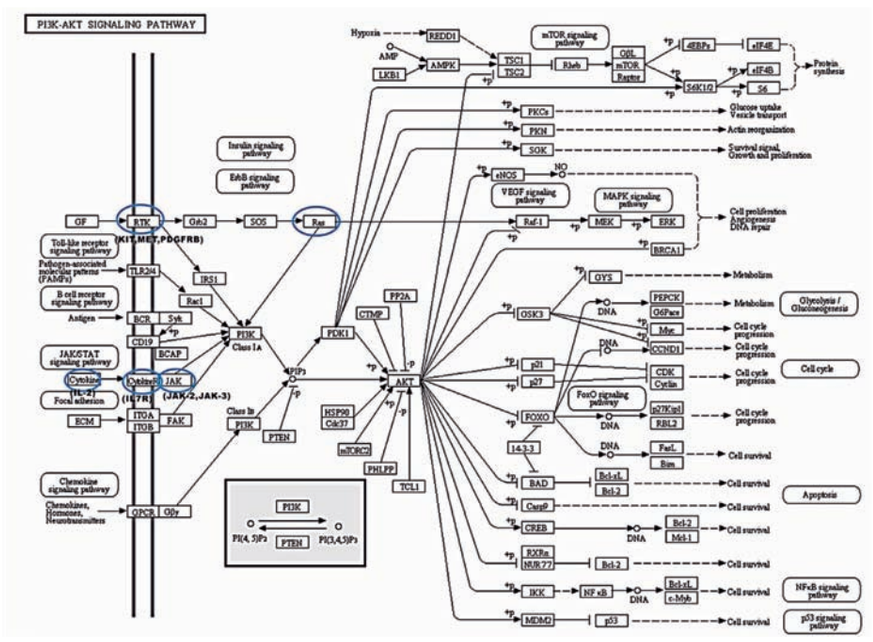
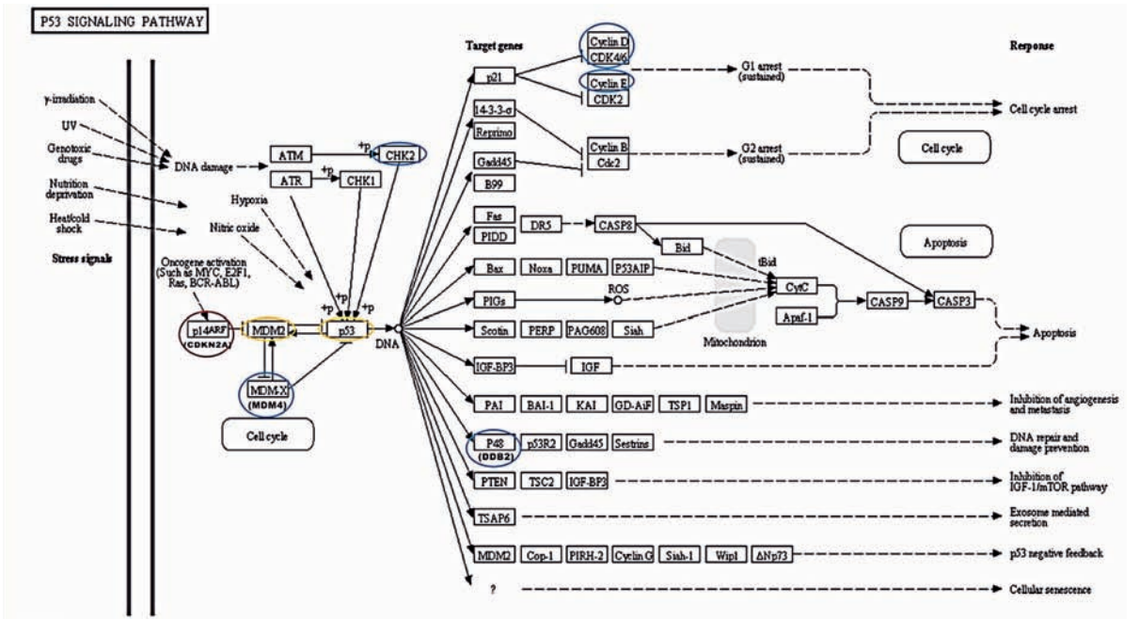



**图6–27　树鼩–人同源性较高的肿瘤相关基因在PI3K–AKT信号通路中示意图**

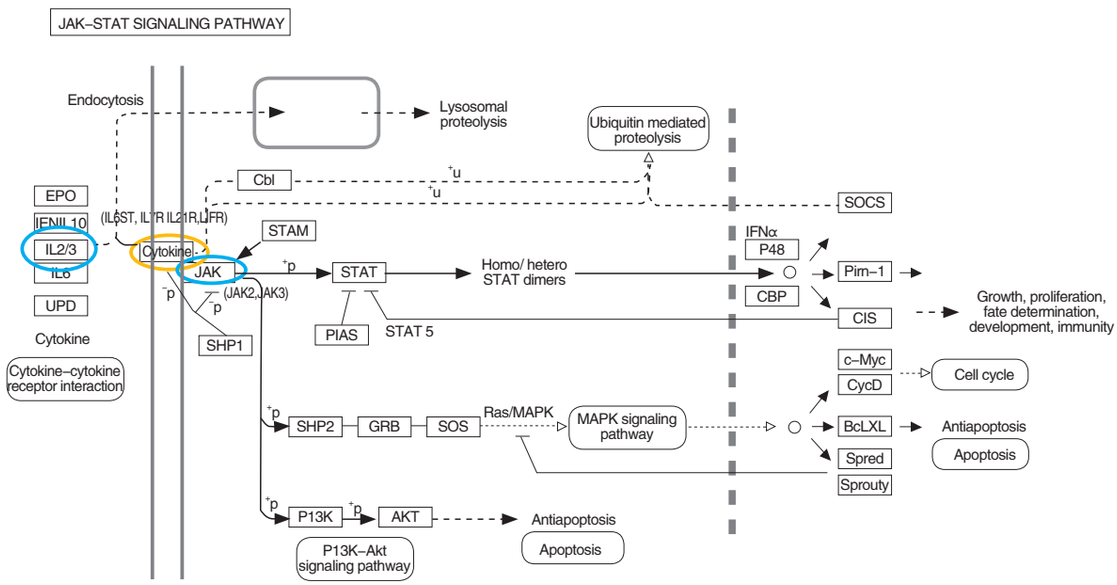
（信号通路图自KEGG）




同源性差异值为≥15%　10%≤同源性差异值<15%　5%≤同源性差异值<10%

**图6–28　树鼩–人同源性较高的肿瘤相关基因在p53信号通路中示意图**

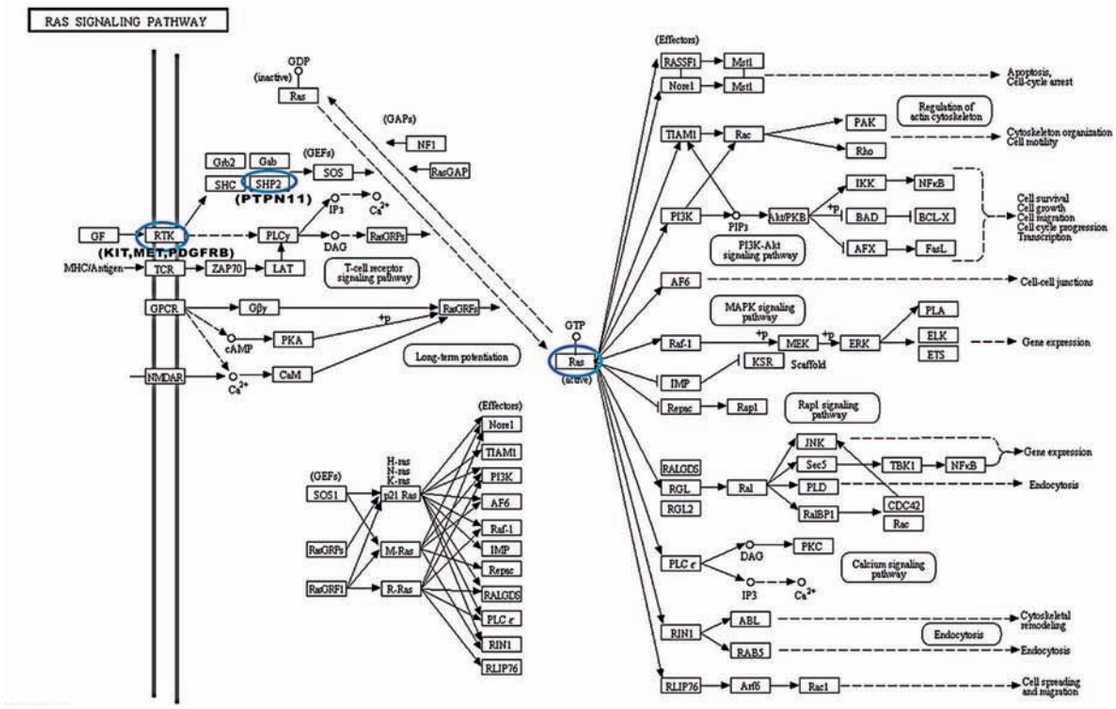
（信号通路图自KEGG）




同源性差异值为≥15%　10%≤同源性差异值<15%　5%≤同源性差异值<10%

**图6–29　人–树鼩同源性较高的肿瘤相关基因在JAK–STAT信号通路中示意图**

（信号通路图自KEGG）




同源性差异值为≥15%　10%≤同源性差异值<15%　5%≤同源性差异值<10%

**图6–30　树鼩–人同源性较高的肿瘤相关基因在RAS信号通路中示意图**

（信号通路图自KEGG）

树鼩–人同源性较高的肿瘤相关基因在以上重要的信号通路中处在信号通路上游或信号通路网络的中枢节点上，这些基因如果发生改变将深刻影响下游基因及整条信号通路。树鼩–人同源性较高的基因在这些信号通路中比较集中，因此树鼩能更加忠实地模拟人类中PI3K-AKT、p53等重要肿瘤信号通路，所以在建立涉及这些信号通路的肿瘤模型时树鼩应是更理想的选择。这些信号通路相关的肿瘤类型详见表6–3。

**表6–3　重要肿瘤信号通路相关的常见肿瘤类型**

| 信号通路 | 肿瘤类型 |
|---|---|
| PI3K–AKT pathway | 结直肠癌、胰腺癌、白血病、黑色素瘤、前列腺癌、子宫内膜癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌等 |
| p53 pathway | 脑胶质瘤、结直肠癌、胰腺癌、白血病、黑色素瘤、前列腺癌、子宫内膜癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、甲状腺瘤、基底细胞癌、膀胱癌等 |
| Ras pathway | 脑胶质瘤、结直肠癌、食管癌、白血病、非小细胞肺癌、乳腺癌、胰腺癌、大肠癌、肌肉瘤、卵巢癌、肝癌等 |
| JAK–STAT pathway | 胰腺癌、白血病、骨髓增殖性瘤、肝癌、乳腺癌、卵巢癌、非小细胞肺癌、胃癌、甲状腺瘤等 |

通过对筛选的肿瘤相关基因进行人、小鼠、树鼩三物种间的同源性比对及肿瘤信号通路聚类分析，已对树鼩中较有优势的肿瘤相关基因及相应的信号通路有了一定认识，这为下一步构建树鼩不同肿瘤模型时，选择合适的基因及模型构建策略提供了依据。

## 第三节 肿瘤动物模型情况概述

肿瘤研究离不开肿瘤动物模型，选择合适的动物构建模型，能较好地模拟人体中肿瘤的发生情况，有利于研究工作的开展。随着对肿瘤相关基因认识的不断加深，啮齿类动物模型逐渐显现出一些局限性，因此寻找并建立新的动物模型是一件十分重要且迫切的事情。树鼩体形尺寸适中，生殖周期较短，存在自发性肿瘤的情况，其诱发性肿瘤模型的构建也陆续获得成功，在实践中已被证明是一种较为理想的肿瘤动物模型，现就树鼩肿瘤模型的构建情况做一简单概述：

从20世纪60年代起，已有了关于树鼩自发性肿瘤病例的报道[29]。树鼩自发性肿瘤能在多个系统和器官中发生，包括生殖系统、造血系统、消化系统、乳腺、肺、膀胱等[29～32]。树鼩自发性肿瘤的形态特征和病理结果与人类肿瘤相似[32]，为研究人类肿瘤提供了很好的素材。然而树鼩自发性肿瘤模型存在发生率偏低、发病原因不明等缺点，并且肿瘤自发性树鼩的获得具有偶然性和不可预见性，这为系统研究树鼩肿瘤模型带来极大的不便。因此，构建诱发性树鼩肿瘤模型十分必要。早期诱发性树鼩肿瘤模型研究较为集中的是树鼩肝癌模型，采用黄曲霉素诱导、HBV感染或者二者协同作用的方法已成功构建树鼩肝癌模型[33～35]。近年来，采用慢病毒感染等方法构建的树鼩其它模型（如乳腺癌和脑胶质母细胞瘤模型等）也陆续获得成功。

## 第四节 结语与展望

动物模型是肿瘤研究的重要工具之一，由于树鼩在进化上更接近人，其肿瘤相关基因与人类基因的同源性优于啮齿类动物。随着树鼩分类地位的确定、树鼩重要性的逐渐显现和树鼩基因组等一系列重要工作取得突破性进展，相信未来在树鼩肿瘤动物模型构建及其在肿瘤研究中的应用等方面将会获得进一步发展。

但是，树鼩的发展遇到一些瓶颈，如树鼩专用实验试剂（如抗体）的缺乏，使树鼩的应用受到极大限制；树鼩实验品系建立工作有待完善，标准化实验树鼩对于保证实验结果的稳定性和研究工作的质量具有十分重要的意义；树鼩基础研究资料的匮乏，也使前期树鼩动物模型构建工作进展缓慢。如果能克服上述局限，树鼩在肿瘤研究中将会有更广阔的前景。

### 参考文献

[1]Fan Y, Huang ZY, Cao CC, et al. Genome of the Chinese tree shrew. Nat Commun, 2013, 4: 1426.
[2]Morin RD, Mendez-Lago M, Mungall AJ, et al. Frequent mutation of histone-modifying genes in non-Hodgkin

lymphoma. Nature, 2011, 476(7360): 298-303.
[3]Ng SB, Bigham AW, Buckingham KJ, et al. Exome sequencing identifies MLL2 mutations as a cause of Kabuki syndrome. Nat Genet, 2010, 42(9): 790-3.
[4]Jones DT, Jäger N, Kool M, et al. Dissecting the genomic complexity underlying medulloblastoma. Nature, 2012, 488(7409): 100-5.
[5]Larocca MC, Shanks RA, Tian L, et al. AKAP350 interaction with cdc42 interacting protein 4 at the Golgi apparatus. Mol Biol Cell, 2004, 15(6): 2771-81.
[6]Léveillé F, Blom E, Medhurst AL, et al. The Fanconi anemia gene product FANCF is a flexible adaptor protein. J Biol Chem, 2004, 279(38): 39421-30.
[7]Tahiliani M, Koh KP, Shen Y, et al. Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. Science, 2009, 324(5929): 930-5.
[8]Balmaña J, Diez O, Rubio IT, et al. BRCA in breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines. Ann Oncol, 2011, 22(Suppl 6): vi31-4.
[9]Balmaña J, Diez O, Rubio I, et al. BRCA in breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines. Ann Oncol, 2010, 21(Suppl 5): v20-2.
[10]Petit MM, Schoenmakers EF, Huysmans C, et al. LHFP, a novel translocation partner gene of HMGIC in a lipoma, is a member of a new family of LHFP-like genes. Genomics, 1999, 57(3): 438-41.
[11]Ding Y, Hubert CG, Herman J, et al. Cancer-Specific requirement for BUB1B/BUBR1 in human brain tumor isolates and genetically transformed cells. Cancer Discov, 2013, 3(2): 198-211.
[12]Grabsch H, Takeno S, Parsons WJ, et al. Overexpression of the mitotic checkpoint genes BUB1, BUBR1, and BUB3 in gastric cancer—association with tumour cell proliferation. J Pathol, 2003, 200(1): 16-22.
[13]Myrie KA, Percy MJ, Azim JN, et al. Mutation and expression analysis of human BUB1 and BUB1B in aneuploid breast cancer cell lines. Cancer Lett, 2000, 152(2): 193-9.
[14]Pan WW, Zhou JJ, Liu XM, et al. Death domain-associated protein DAXX promotes ovarian cancer development and chemoresistance. J Biol Chem, 2013, 288(19): 13620-30.
[15]Shu HB, Johnson H. B cell maturation protein is a receptor for the tumor necrosis factor family member TALL-1. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97(16): 9156-61.
[16]Kondo T, Oue N, Yoshida K, et al. Expression of POT1 is associated with tumor stage and telomere length in gastric carcinoma. Cancer Res, 2004, 64(2): 523-9.
[17]Ramsay AJ, Quesada V, Foronda M, et al. POT1 mutations cause telomere dysfunction in chronic lymphocytic leukemia. Nat Genet, 2013, 45(5): 526-30.
[18]Robles-Espinoza CD, Harland M, Ramsay AJ, et al. POT1 loss-of-function variants predispose to familial melanoma. Nat Genet, 2014, 46(5): 478-81.
[19]Sander TL, Stringer KF, Maki JL, et al. The SCAN domain defines a large family of zinc finger transcription factors. Gene, 2003, 310: 29-38.
[20]韩瑞，周燕，王舒阳，等．Zfp521在大鼠骨髓间充质干细胞向神经元分化过程中的表达变化及意义．中国病理生理杂志，2012，28（2）：326–31.
[21]Spina R, Filocamo G, Iaccino E, et al. Critical role of zinc finger protein 521 in the control of growth, clonogenicity and tumorigenic potential of medulloblastoma cells. Oncotarget, 2013, 4(8): 1280.
[22]Mega T, Lupia M, Amodio N, et al. Zinc finger protein 521 antagonizes early B-cell factor 1 and modulates the B-lymphoid differentiation of primary hematopoietic progenitors. Cell Cycle, 2011, 10(13): 2129-39.
[23]Janssen H, Marynen P. Interaction partners for human ZNF384/CIZ/NMP4—zyxin as a mediator for p130CAS signaling? Exp Cell Res, 2006, 312(7): 1194-204.
[24]陈旭，顾恒．基底细胞癌中肿瘤相关信号通路研究进展．国际皮肤性病学杂志，2011，37（1）：33–7.
[25]Quist KB, Thorsen J, Zeller B, et al. Identification of the TAF15-ZNF384 fusion gene in two new cases of acute lymphoblastic leukemia with a t (12; 17)(p13; q12). Cancer Genet, 2011, 204(3): 147-52.

[26]Hawkins C, Walker E, Mohamed N. et al. BRAF-KIAA1549 fusion predicts better clinical outcome in pediatric low-grade astrocytoma. Clin Cancer Res, 2011, 17(14): 4790-8.

[27]Lipson D, Capelletti M, Yelensky R, et al. Identification of new ALK and RET gene fusions from colorectal and lung cancer biopsies. Nat Med, 2012, 18(3): 382-4.

[28]Reche PA, Soumelis V, Gorman DM, et al. Human thymic stromal lymphopoietin preferentially stimulates myeloid cells. J Immunol, 2001, 167(1): 336-43.

[29]Elliot OS, Elliot MW, Lisco H. Breast cancer in a tree shrew (*Tupaia glis*). Nature, 1966, 211(5053): 1105.

[30]Brack M. Malignant Leydig cell tumour in a *Tupaia belangeri*: case report and literature review of male genital tumours in non-human primates. Lab Anim, 1988, 22(2): 131-4.

[31]Brack M. Spontaneous tumours in tree shrews (*Tupaia belangeri*): population studies. J Comp Pathol, 1998, 118(4): 301-16.

[32]Xia HJ, Wang CY, Zhang HL, et al. Characterization of spontaneous breast tumor in tree shrews (*Tupaia belangeri chinensis*). Zool Res, 2012, 33(1): 55-9.

[33]Li Y, Wan DF, Su JJ, et al. Differential expression of genes during aflatoxin B(1)-induced hepatocarcinogenesis in tree shrews. World J Gastroenterol, 2004, 10(4): 497-504.

[34]Su JJ, Ban KC, Li Y, et al, Alteration of p53 and p21 during hepatocarcinogenesis in tree shrews. World J Gastroenterol, 2004, 10(24): 3559-63.

[35]Reddy JK, Svoboda DJ, Rao MS. Induction of liver tumors by aflatoxin B1 in the tree shrew (*Tupaia glis*), a nonhuman primate. Cancer Res, 1976, 36(1): 151-60.

# 第七章

第一篇树鼩基础生物学
TREE SHREW BASIC BIOLOGY

Tree shrews

## 树鼩的脑形态

李明泓　马原野

神经系统是动物机体上最重要的系统之一。树鼩在进化上的一些特点，在神经系统也得到了很好的体现，实际上，动物的神经系统就是物竞天择的产物。本章拟从进化和特化的角度，对树鼩的神经系统进行比较神经生物学方面的讨论。

## 第一节　树鼩脑的大体形态

像所有哺乳动物的脑一样，树鼩的脑由颅骨及3层脑膜紧紧包被。树鼩的颅骨具有一个特点，就是颅骨相对较薄，类似小鼠的颅骨。

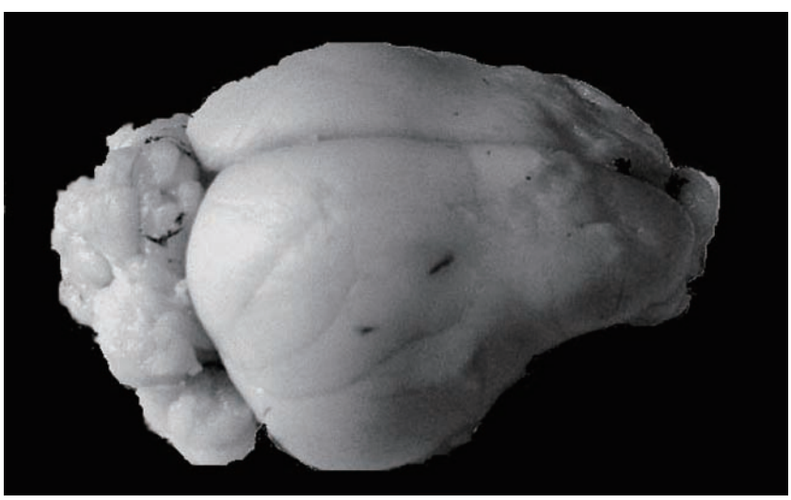


图7-1　树鼩脑的外部形态

树鼩脑的大体形态：脑重约有3g，体积大约3mL，与类似体重的非灵长类哺乳动物，如大鼠的脑相比，其神经系统的高度发达显而易见。从动物的背面看，树鼩的脑呈卵圆形，额部较狭窄，枕颞部较宽；枕部皮层向后接小脑，但未像灵长类的大脑皮层那样覆盖小脑前叶，仅刚刚覆盖住位于中脑上的上丘和下丘。从侧面观，一个显著的特点是颞部皮层发育较好，呈三角形，类似于灵长类的颞叶形态，但还没有外

侧裂出现。同食虫类相比，树鼩的嗅球结构相对较小，这个发展趋势在灵长类的系统发育中也存在。从腹面观，一个显著的特点就是视交叉结构的体积相当大。视束纤维发自视网膜上的神经节细胞，视束和视交叉尺寸的变大，表明树鼩视网膜可能具有更多的视网膜神经节细胞，进而表明树鼩具有发达的视觉。

脑的沟回是大脑皮层在颅腔内有限的空间中高度发育而导致的折叠。折叠的结果是大脑皮层表面积的增加。沟回的多少往往反映了大脑皮层发育程度的高低。绝大多数灵长类动物的大脑皮层都具有沟回，在类人猿中，沟回的模式变得很复杂。但在一些原猴类的动物，如懒猴，则沟回相应较简单。树鼩的脑皮层为少沟回皮层，除梨状沟较为明显外，无其它明显可见的沟裂。但若同食虫类相比，因为新皮层的发育，将梨状沟下推，使得梨状沟位置更靠近腹侧，这个现象说明树鼩的新皮层较食虫类的发达。

沿纵裂切开树鼩的脑，在内侧面上可见体积很大的上丘，其上被大脑皮层的枕部所覆盖上丘结构几乎占据了整个中脑的背侧。上丘是中脑上和视觉相关的重要脑结构，在非灵长类哺乳动物中，视网膜上发出的大多数视神经纤维投射到上丘（在大鼠，约60%的纤维投射到上丘，而在人不到1%），转换一个突触后，再从上丘投射到丘脑枕结节。同发达的视交叉一样，树鼩发达的上丘结构也与其发达的视觉有关。

## 第二节 树鼩脑的演化

动物脑的大小和动物身体的大小是相关的。通常体形较大，体重较重的动物，其脑的绝对重量也较大。但这并不说明其中枢神经系统发达。所以在研究脑的演化时，我们通常采用一个相对的度量值，即脑重体重比来描述脑进化的程度。

关于脑重与体重的关系，Von Bonin[1]得出了下列的经验公式：

$E=KS^r$

公式中，$E$为脑重，$S$为体重，$r$为经验指数。在哺乳类中，有的作者取其值为0.66，也有的取0.56，但$K$值的大小均能反映动物的演化水平。

据我们的研究，野生树鼩（*Tupaia belangeri chinensis*）的平均体重为（102 ± 19）g，脑重为（3.331+0.23）g，根据Bonin公式，并取$r$值为0.66，树鼩的$K$值为0.14。

从$K$值看，鼠的为0.04，兔的为0.07，猫的为0.13[2]。树鼩的$K$值均大于鼠及兔的，而同猫的近似。$K$值的大小除能反映动物脑的演化水平外，也反映动物的智力水平。Livesy指出，犬鼠的$K$值为0.04，兔的为0.07，猫的为0.13，在完成复杂的任务中，兔比鼠强，而猫又比兔强[2]。

在脊椎动物脑的演化过程中，皮层下结构在进化中，总体来说变化不大，而变化最大的部分是大脑皮层。大脑皮层的发育分两个地方进行，其一是嗅皮层，其二是海马结构，这两个结构上产生的皮质分别朝上或朝下发育。从海马发育的皮层将原来的古皮质结构挤向脑干，成了所谓的边缘系统。越高等的动物，其脑皮层所占的比例也越大。Stephen[3]在灵长类及食虫类大脑皮层比较研究的基础上，比较了一些灵长类、食虫类和树鼩新皮质增加的程度，并与一个设想的、典型的具有相同体积的基本食虫类（basic insectivores）的脑进行比较，其结果是，树鼩的新皮层大约

为基本食虫类的6倍，略低于狐猴科动物，而海马的发育情况则较懒猴的为好。

Diamond在比较不同哺乳动物新皮质与旧皮质的比例时，也得到了树鼩的进化地位远比食虫类，乃至啮齿类的为高的结论[4]。Wong的研究也表明树鼩的新皮质已经分化得相当好[5]。

除大脑皮质外，树鼩小脑发育也较好。近年来，利用免疫学的概念和方法对树鼩的小脑进行比较形态学的研究，研究表明，小脑发育树鼩比啮齿类和兔形目更接近灵长类[6]。其实早在20世纪60年代，Haines就指出，树鼩小脑后叶的发育甚至比婴猴（*Galago*）的还好[7]。

从生理情况看，树鼩具有高度发达的视觉，具有灵长类的某些视觉特征，而嗅觉系统则相对退化，这种变化，同灵长类进化的方向是一致的。这些变化对动物的昼行性行为是有帮助的，因为在昼行性动物中，视觉信息比嗅觉信息更有信息量，传递更快。而视觉信息中，一个是视觉的高空间分辨率，另一个是色觉对动物的生存是很重要的，前者使得动物能看见细小的物体，后者使得动物易于区分物体的前景和背景，也利于动物对物体的识别。尤其利于动物对食物的寻觅和食物性质的鉴别，比如根据果实的颜色来辨别果实是否成熟。综上所述，树鼩在脑重体重比、新皮质的发育、视觉发达、嗅觉退化等方面，都介于灵长类和食虫类之间，且更偏向于灵长类。

## 第三节 树鼩脑中一些特化较大的结构

### 一、树鼩脑的皮层下结构

在树鼩中脑上一个最显著的特点就是体积很大的上丘结构，其平均直径可达3mm。同上丘相比，和听觉相关的下丘则显得发育较差。

上丘是中脑上的视觉中枢。在灵长类动物，上丘的体积一般大于下丘，这是灵长类视觉高度发达的结果。

一些研究表明树鼩的上丘具有分层结构[8, 9]。电生理学的研究也表明，不同深度的神经元对视觉刺激的反应模式也不相同。上丘发出的纤维上行至丘脑枕结节后，枕结节和视觉皮层的连接模式变得较为复杂，不同的亚区连接不同区域的视皮层。除到V1外，有些区域直接和V2等较高等级的视皮层连接[10]。这种复杂的连接模式在丘脑枕结节和颞叶的连接上也能反映出来[11]。另外，树鼩脑上也存在着另外一条所谓的视觉皮质下通路，这条通路起自视网膜，视网膜的信息传至中脑的上丘，经丘脑枕结节至杏仁核[12]。这条通路的一个特点就是能在意识水平之下处理非精细的视觉信息，对于动物非自觉地、下意识地规避危险很重要。

树鼩的外侧膝状体发育特别好，可分为背核和腹核两个部分。两个核相比较，背核的体积较大。在背核的前端，分层现象并不显著，但后部的分层现象则十分明显。Clark认为，树鼩的外侧膝状体属于高等哺乳类的类型[13]。

内侧膝状体它是丘脑上一个重要的听觉中枢。与外侧膝状体不同，内侧膝状体很难分出次级结构。关于树鼩外膝体，内膝体的特点，我们将在后边讨论。

下丘脑：下丘脑位于靠近第三脑室的间脑基底部，垂体从下丘脑腹侧伸出。下丘脑位于大脑与脑干之间，与大脑和脑干存在着复杂的联系。下丘脑的主要功能是维持动物身体内环境的稳定。树鼩下丘脑的功能与树鼩的心理活动有很大关系。在持续社会应激的状态下，树鼩下丘脑分

泌过多促肾上腺皮质激素（ACTH），ACTH引起肾上腺皮质类固醇激素分泌增加，最后影响肾功能，导致树鼩死于尿中毒。

## 二、大脑及大脑皮层

哺乳动物的大脑皮层最直接地反映了脑的演化。一些学者将哺乳动物的大脑皮层分为3种类型，一种是类啮齿类皮层型，一种是类普通哺乳类型，还有一种是类灵长类型[14]。树鼩的大脑皮层同食虫类相比，其发育程度高于食虫类。从上面观，树鼩的大脑呈卵圆形，前部狭小，后部则相当大，尤以顶、枕、颞部的皮层发育较好。树鼩大脑皮层为平滑，少沟回的皮层，但显微观察表明，其皮层具有沟回的雏形，即部分区域的脑组织具有皮层折叠现象。一些研究表明，这种现象发生在一般体感区与颗粒状皮层区的结合部。

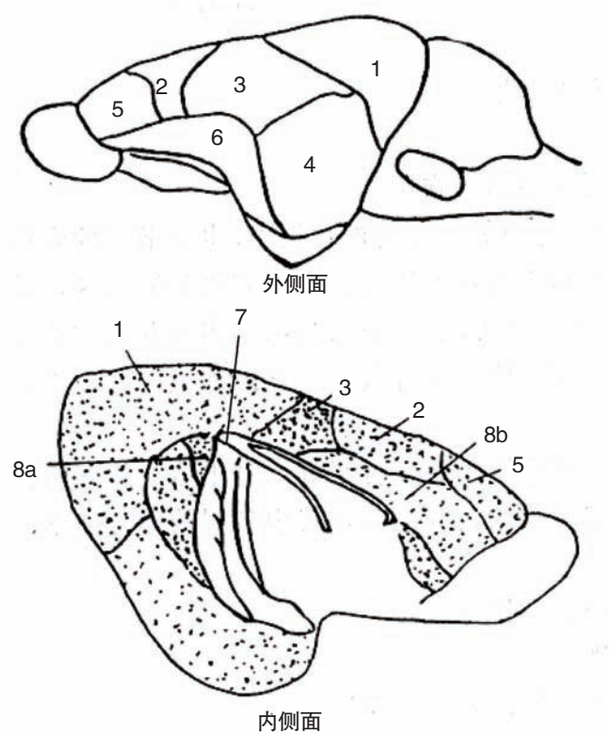



**图7–2　树鼩大脑皮层的分区**

1：视皮层区；2：贝兹细胞区；3：顶区；4：颞区；5：额区；6：岛叶区；7：胼胝体压部后区；8：扣带回上区。

动物的脑皮层是具有不相同结构的层状神经组织。在哺乳动物中，典型的大脑皮层由不同形态的6个细胞层所构成，它们分别称为：①分子层；②外颗粒层；③外锥体层；④内颗粒层；⑤内锥体层；⑥多形细胞层。在脑的不同区域，这6个细胞层所占的比例是不同的。据Clark（1924）的分类方法和脑细胞构筑不同，将树鼩大脑皮层分为下列几个区：①视皮层区；②贝兹细胞区；③顶区；④颞区；⑤额区；⑥岛叶区；⑦胼胝体压部后区；⑧扣带回上区。上述各区在皮层上的具体分布，参看图7–2。

视皮层区：此区与灵长类的Brodmann 17区在细胞构筑上很相似，其特征是有一条着色较浅的“带”，实为内含较少细胞的细胞层。此条带中含有神经纤维，以及一个边界清楚的内颗粒层。视皮层区的厚度平均为1.29mm。一些研究从视皮层的锥体细胞形态和分布的特征入手，对灵长类和树鼩进行了比较，发现两者的情况是相反的，表明了树鼩和灵长类的差异[15]。

贝兹细胞区：此区实际上相当于灵长类的运动皮层，其特征就是在内锥体层中存在大锥体细胞，由于此区的存在，使得分子层和锥体层显得较薄。此区的边缘比较清楚，皮层厚度平均为1.12mm。一些形态学研究发现，树鼩在各个运动皮层的组织结构上，不具有灵长类动物特有的模式，但就单一的运动皮层来看，同大鼠等在进化上关系更远的物种相比，还是同灵长类的有着相似性[16]。

顶区：此区的特征是分子层和锥体层所处的位置较深，内颗粒层发育较好。在此区中锥体皮层发育较好，在内颗粒层中也有散在的锥体细胞。同贝兹细胞区和视区相比，顶区的边界相对不

很清楚。它前邻贝兹细胞区，后邻视区，但并未与此二区直接接触。因为在其边界上，有一个特殊细胞构筑的皮层带，这个带的特点是内颗粒层不清楚，而锥体层发育较好。顶区和颞区的分界相当模糊，两个区域的细胞构筑有一个过渡过程。整个皮层的厚度为1.43mm。

颞区：此区的内颗粒层发育很好，且锥体层细胞排列也比上述几个区的排列地更整齐。内锥体细胞层内的锥体细胞发育很好，且更整齐。但在颞区腹侧，内颗粒层发育较差。此区范围内还可见到一些大细胞。此区的细胞构筑与灵长类Brodmann 20区的相似。此区的厚度平均为1.48mm。

额区：此区的特征是分子层较深，内颗粒层呈散在状态，所以很难确定此区的边界。内颗粒层中缺乏大细胞。这个区域和灵长类额叶的细胞构筑差别较大，在灵长类，额叶皮层具有较厚的内颗粒皮层，这是动物是否具有前额叶的明显标志。树鼩的额叶缺乏颗粒层，这是它区别于灵长类的一个特征。此区后邻贝兹细胞区，前至额极。额区的边界不同于顶颞区的边界，比较清楚，细胞构筑较为均一。不易划分亚区。Remple MS等对树鼩额顶叶的连接模式进行了研究，发现树鼩这块皮层的连接模式类似于原猴类的连接模式，而不同于其它非灵长类哺乳类[17]。

岛叶区：此区的位置在系统发育中和灵长类岛叶的位置相符合。此区内颗粒层发育较好，而锥体层相对较薄。并含有一些小细胞。皮层平均厚度1.23mm。

胼胝体压部后区：此区面积很小，与极度发育的颗粒层和锥体层的缺失为特征。此区和Brodmann的同名区的特征相符合。此区接近海马结构，且向腹后方突向胼胝体压部，并延伸至新皮层区域。

胼胝体周缘区：此区缺乏明确的颗粒层。故只可辨认出3层结构，即分子层、锥体细胞层和多形细胞层。可分为两个亚区，即前亚区和后亚区。在前亚区，锥体层发育较后亚区为好。这个区域的一些部分被发育很好的视皮层所遮盖。

## 第四节 树鼩脑功能解剖

上边我们从形态学的角度讨论了树鼩的脑，下边我们将从功能的角度来讨论树鼩的脑。从功能上看，中枢神经系统的功能可以分为感觉功能、运动功能和高级神经活动功能。在感觉功能中，可以再划为视觉功能、听觉功能、体感功能、嗅觉功能和味觉功能等。

### 一、视觉系统

在树鼩神经生理学研究中，视觉方面的研究是最多的。主要是因为树鼩具有发达的视觉，具有一些灵长类动物的视觉特征，很多学者从系统演化的观点来进行研究。

树鼩的视觉：树鼩具有较大的眼睛，眼球近圆形，眼球外侧部分弧度较大。除外侧部分外，都由不透明的巩膜所包被，视神经从眼球内侧面离开眼球。眼球前面是角膜，通过角膜可看到圆形的虹膜，树鼩的瞳孔始终为一圆形。眼球的最后侧为布满了视锥视杆细胞的视网膜。

树鼩是一种昼行性动物，在黑暗的环境中，树鼩基本丧失了视觉辨别能力。在黑暗环境中，树鼩除丧失视觉外，行为上表现为十分安静和顺从，由于树鼩视网膜上具有视锥细胞，因而具有分辨出红、黄、绿色调的能力，但和灵长类的完全三色觉相比，还是具有一定差距。由于树鼩运

动，跳跃，需要具有高时间分别率的视觉，研究发现，在树鼩视网膜神经节细胞上已经产生了适应高时间分辨率的视觉机制[18]。

树鼩的眼球不像灵长类那样移向颜面前方，而仍位于头颅两侧。但是，一些研究表明，树鼩已初步具有双眼视觉或立体视觉。树鼩双眼视觉及色觉的产生，是树鼩视觉发达的一个重要证据。

树鼩的视觉通路：视神经纤维离开眼球入颅后，进入位于脑腹侧的视交叉；在视交叉中，一些纤维交叉至对侧视束中，另一些则沿同侧视束上行，然后至丘脑上一个重要的视觉信息处理核团，丘脑外膝体上。树鼩和其它哺乳动物的这条视觉路径是很相似的。在树鼩中，视束的同侧纤维和对侧纤维在外膝体中的投射情况是不同的。Campbell首先注意到外膝体靠近视束的地方具有第6层板状结构，其后，另外一些学者证实了Campbell的发现[19]。用放射自显影方法，对外膝体分层情况进行研究，如果规定靠近视束的为第l层，则来自对侧眼的纤维投射至第2、3、4和6层，而同侧眼的视觉纤维投射至第1、5层。在类人猿中，对侧眼的纤维投射到第1、4、6层，而同侧眼投射至第2、3、5层。在原猴类，第1、5、6层接受对侧纤维，第2、3、4层接受同侧视束纤维。Kaas等（1972；1978）提出，在haplorhine灵长类中，外膝体的基本层数为4层，即靠近视束的两个巨细胞层和位于较深处的2个小细胞层，而每层又可细分为2层。因而，看上去总数似乎为6层，而实际上仍然是4层。他指出，外边的巨细胞层靠近视束的一层和深处的小细胞层接受来自对侧眼的纤维，而中间的两层则接受同侧眼的纤维[20，21]。同Campbell一样，Kaas认为树鼩背侧外膝体的层状结构与灵长类相比是不同的[20，21]。

在树鼩视觉皮质功能的研究中，Damond发现，树鼩有一个高度定位的原始视觉皮质。对视觉刺激起反应的皮质范围相当大，占了皮层的大部分区域[4]。损伤树鼩的这部分皮质时，没有发现在食虫类、灵长类和啮齿类等动物上所看见的视觉障碍。但如果切除视区Ⅰ、Ⅱ则使树鼩对视觉模式的学习发生严重缺陷[4]。

关于动物的视觉模式，可以分为两大类型：第一种为非灵长类动物所具有，这种模式在非灵长类哺乳类、鸟类、两栖类、爬行类、鱼类中都可发现。另外一种类型为灵长类所特有，其特征之一是视网膜纤维大量投射到同侧上丘。但是，一些学者认为树鼩不尽其然，故树鼩的视觉模式接

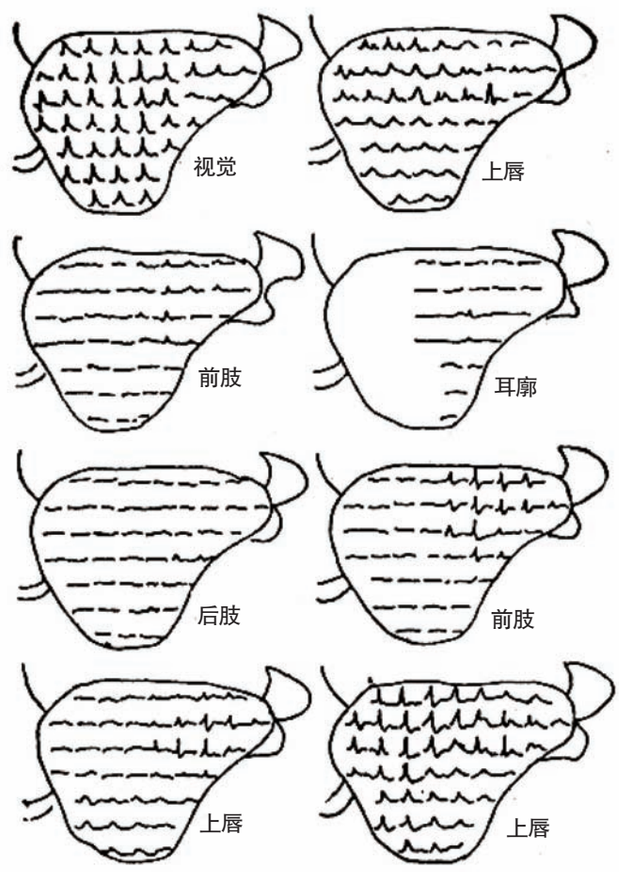



**图7–3　树鼩不同躯体部位给予体感觉刺激的诱发电位和对视觉刺激的诱发电位在大脑皮层上的分布**

近第一种类型。实际上，灵长类视皮层的很多特点，树鼩都不具备，而这些特点中的一些甚至连猫都具备。

从上述的研究结果看，树鼩具有发达的视觉系统，这是意见比较一致的。然而，一些证据表明，树鼩的视觉模式不同于灵长类，而与非灵长类哺乳类相似。正是这些观点，支持了树鼩既非灵长类，也非食虫类，是于哺乳类中一个独立的分类阶元。

## 二、听觉系统

树鼩具有类似灵长类的耳廓。近年来，对树鼩听觉生理特征的研究也有一些报道[22~24]。这些研究主要集中在树鼩的次级听觉中枢和更高级的听觉中枢上。对其听觉特征的研究Peterson等比较了树鼩与灵长类听觉反应的异同[22]。

从耳蜗神经发出的上行纤维入脑后，大部分纤维在脑桥下段交叉至对侧，构成外侧丘系上行，少数纤维不交叉，沿同侧外侧丘系上行。外侧丘系的纤维分两路，其中一路上行至下丘中央核，再由中央核向前中央核，内侧膝状体腹核投射纤维。另外，下丘中央核还向下投射纤维，其中一部分进入外侧丘系。外侧丘系核又发出纤维至中央核，另一部分则形成下行的运动束。另外一路外侧丘系纤维投射至内侧膝状体背核。外侧丘系将纤维投射至内侧膝状体。

Casseday等指出：听觉的上行纤维在低位中枢至丘脑核团间的径路和猫的十分相似。然而，两种动物从丘脑核团至听皮质的径路则有差异。在猫的听皮质中，周缘皮质还可细分为不同的区域，而树鼩则不然。另外，从猫内膝体发出至听皮质的纤维同Casseday等在树鼩中发现的也不一样。但是，值得指出的是听区周缘皮质和中央皮质之间有差别，在两种动物中都已发现[23]。

猫和树鼩的下位听觉中枢向丘脑的上行投射径路十分相似，但也有一些区别。在猫中，下丘中央核的纤维在内膝体中继后，投向中央皮质AⅠ区。内膝体背部区域和丘脑后核并没有接受下丘发出的纤维，这两个相似之点十分重要。

丘脑上的主要听觉中枢为丘脑内膝体，内膝体可细分为一些形态上有差别的亚区，即巨细胞亚区、腹亚区、背亚区和尾区[23]。

Oliver等对树鼩内膝体的划分与前者有所不同。其背侧亚区除包括Casseday的背亚区外。尚包括丘脑后核，而腹亚区包括Cssseday的腹侧和尾侧区域[24]。

树鼩的听觉及其传导径：听觉投射区位于颞部皮层前中部。据Oliver等，树鼩的初级听皮质位于嗅沟背侧，其细胞构筑特点是在皮层的Ⅰ、Ⅱ、Ⅳ层中，有很多小型神经元。各细胞层之间的界限显得模糊不清。除初级皮质外，较高级的听皮质称为听觉联合皮质。此区皮质的细胞构筑不同于初级听皮质，而与高级视觉皮质相似[24]。

Oliver等利用生理和解剖的方法，研究了树鼩初级听皮质对不同频率声音刺激的反应。他们发现，较高频率的音频刺激往往在听皮质的较前部分诱发出诱发电位，而较低频率的信号则在较后侧诱发出电位[25]。

## 三、体感系统

体感觉主要传导身体各部的触觉、温度觉、震动觉、本体感觉和痛觉等。

来自树鼩体内外环境的各种刺激因子，对机体各处特异性分布的各类感觉器进行特异作用。感受器将这些信息转换成一个电化学交替变换的过程，以神经冲动的方式，经脊神经和脑神经的向心纤维传导至中枢神经系统。中枢神经系统则对这些信息进行分析处理，并做出相应的反应。

体感觉信息一般有几种处理方式：①最简单的处理中枢位于脊髓中，形成所谓的反射弧。切断树鼩的脊髓中段，对其下肢给予电击，会引起被电击的下肢迅速回缩，而对侧肢体迅速伸张。②另一些信息则沿上行传导纤维传至各中枢核群，最后达到大脑皮质这个最高级中枢，这些上行到高级中枢的神经活动被整合为高级中枢有意识和无意识的活动。

树鼩的Clarke柱在脊髓的胸段和腰段都可见到，其接受由背根进入脊髓的纤维，并发出纤维至小脑，形成脊髓小脑束，这种传导方式在猫及猕猴中都已发现[26]。除脊髓小脑束外，另外一个非常主要的体感觉传导束就是脊髓丘脑束，体感觉信息经此束传至丘脑，丘脑初步整合这些信息后，将信息再传至皮层体感区。

据Albright等[26]，在树鼩，背根纤维进入脊髓后，不仅从一个平面进入Clarke柱。在纤维进入脊髓平面的上下方，均可发现有纤维进入Clarke柱。这种现象在脊髓的胸段下部以及腰部尾巴段均可发现。另一种现象就是所有纤维都在比其进入脊髓的平面为高的地方进入Clarke柱。

在图7–4中，大脑体感皮层上每一个点所能接收的身体各部分的刺激示于图中的“变形动物”上，其中深色部分表示诱发电位幅度较大，即反应较强，灰色部分示诱发电位反应较小。

## 四、树鼩的锥体和锥体外运动系

树鼩是一种运动十分敏捷的动物，能在平地和树上、墙头迅速奔跑、跳跃。这和它发育较好的运动系统有关。

哺乳动物的运动控制主要通过两条控制径路完成的，第一是锥体运动系，第二是锥体外运动系。在进化上，锥体外系出现较早，其许多基本结构在哺乳动物以下的脊椎动物中已经出现，而锥体系是在皮层结构高度发育的哺乳动物中才获得很好发展。锥体外系的功能是调节具有反射性质的简单，刻板运动，而锥体系则与运动起始和精细运动有关。在灵长类中，手指和面部表情肌的精细随意运动都与锥体系有关。锥体外系包括大脑皮质、基底神经节，间脑核群、中脑、脑桥和延髓等结构以及一些径路，如各级之间的反馈环路、皮质红核束、红核脊髓束等。锥体外系把冲动从皮质和其它核群传向脊髓，其间要经过许多神经元和多突触的径路。与此相反，锥体系则直接把皮质的冲动传向脑干和脊髓，它包括大脑皮质和皮质延髓束、皮质脑桥束和皮质脊髓束等。

对树鼩运动系的研究大多集中在

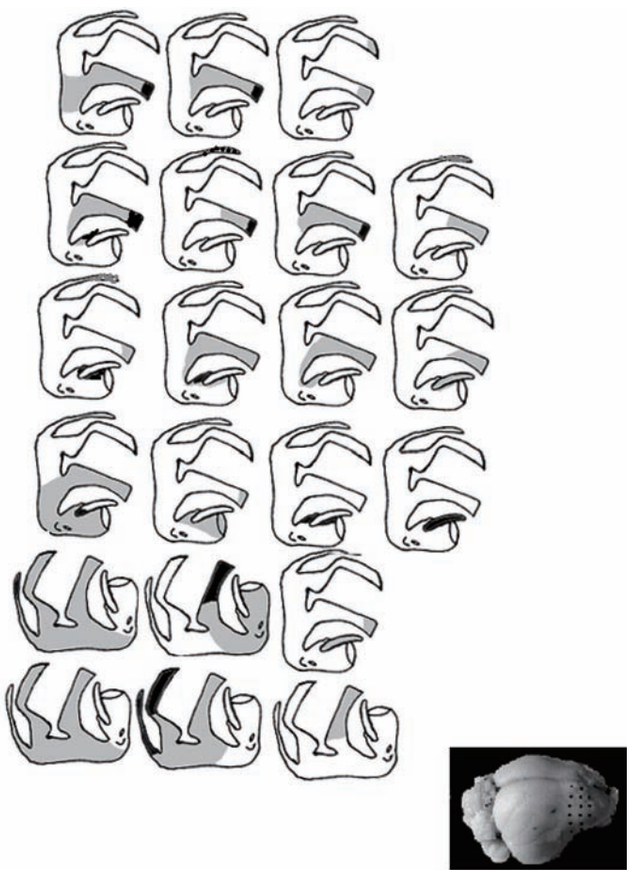


**图7–4　刺激树鼩身体不同部位，在大脑体感皮层不同区域记录到的诱发电位情况**

变形动物上，黑色部分表示诱发电位较大的区域，灰色部分表示诱发电位较小的区域。

锥体系[27]。脊髓灰质前角的运动神经元受上位中枢的控制。上位中枢控制着前角运动神经元的输出，也控制着肌肉的运动。锥体束神经元的胞体位于大脑皮层运动区中，所发出的轴突经由内囊和大脑脚等结构终止于脑干的各个水平，且把这些径路称为皮质脑桥束和皮质延髓束。另外一些纤维则终止于脊髓灰质，我们把这些纤维称为皮质脊髓束。在大多数哺乳类中，多数皮质脊髓束纤维在延髓的锥体盘中交叉至对侧，并沿脊髓背索、外侧索和腹索下行，直至脊髓灰质。而一些未交叉的纤维则沿同侧的背索、外侧索和腹索下行。在不同目级分类阶元的哺乳动物中，皮质脊髓束的走向是有区别的。

树鼩锥体束在大脑皮质中的起源已用解剖学方法进行了研究，其结果表明，Clarke所命名的贝兹细胞区、岛叶区和顶区前部都具有锥体束神经元的胞体，而贝兹细胞区是锥体束的主要起源区域[28]。各区的分划详见前文。

Lende用电刺激皮层的方法找到的树鼩皮质运动区与解剖学上发现的贝兹细胞区是吻合的[29]。Jane和Shrivcr讨论了树鼩的锥体束走向。他们发现，未交叉的皮质脑干束纤维除投射至三叉神经中脑核附近的中脑导水管周边灰质外，还投射至中脑网状结构、红核和脑桥核。延髓外锚和内侧网状结构均接受双侧皮质脊髓束的投射。但网状结构中，外侧网状结构主要接受对侧纤维的投射，而内侧网状结构主要接受同侧纤维投射。皮质延髓束的对侧纤维都终止于三叉神经感觉核，而下橄榄核则接受同侧纤维。迄今的研究尚未发现皮质延髓束直接终止于脑神经运动核。锥体束还终止于孤束核和对侧楔状核以及薄核。在锥体交叉中，大多数皮质脊髓束交叉至对侧的背索中，少部分纤维未交叉，在同侧背索中下行，还有少数纤维交叉后，沿外侧索和腹索下行，但这个现象在脊髓的C0水平以下已不能分辨。同侧背索中的纤维数量虽然不多，但在脊髓胸段仍可发现。皮质脊髓束只终止于脊髓灰质的后角和中间部分。脊髓前角中的运动神经元，其树突伸至脊髓灰质后角和中部，可能在这些区域和皮质脊髓束进行突触联系[28，30，31]。一些学者认为，树鼩的锥体束行程方式不像灵长类，而像其它哺乳类[30，32]。

树鼩锥外系研究得比较清楚的是红核脊髓束[33]。这条径路与有袋类、灵长类和其它胎盘哺乳类的相似，起源于中脑红核。这束纤维在下行过程中于大脑脚腹侧交叉至对侧，经对侧脑干的腹外侧下降。在脊髓中，这束纤维移至外侧索的背部下行至脊髓尾段。红核脊髓束终止于灰质中的Rexed Ⅴ～Ⅶ层。红核中部和背中部的纤维主要投射至脊髓颈段。红核外侧和腹外侧发出的纤维主要投射至脊髓腰段。Murray认为，由于树鼩的皮质脊髓束至脊髓腰段，故红核脊髓束在控制树鼩的后肢运动中起着主要的作用[33]。

总体来看，树鼩神经系统在进化上，具有一些接近灵长类神经系统的“先进”特征，但更多的还是一些“特化”的特征。至于这些特化产生的原因，目前不甚清楚。在神经生物学的研究中，其具有一些不可替代的优势，是较好的动物模型。

## 参考文献

[1]Bonin V. Brain-weight and body-weight of mammals. J Gene Psycho, 1937, 16(2): 379-89.

[2]Livesey PJ. A consideration of the neural basis of intelligent behavior: comparative studies. Behav Sci, 1970, 15(2): 164-70.

[3]Stephen H, Andy OJ. Quantitative comparative neuro-anatomy of primates: an attempt at a phylogentic interpretation. Ann Ny Acad Sci, 1969, 167: 370-87.

[4]Diamond IT. Evolution of neocortex. Science, 1969, 164(3877): 251-62.

[5]Wong P, Kaas JH, Architectonic subdivisions of neocortex in the tree shrew (*Tupaia belangeri*). Anat Rec (Hoboken),

2009, 292(7): 994-1027.
[6]Sillitoe RV, Malz CR, Rockland K, et al. Antigenic compartmentation of the primate and tree shrew cerebellum: a common topography of zebrin Ⅱ in *Macaca mulatta* and *Tupaia belangeri*. J Anat. 2004, 204(4): 257-69.
[7]Haines DE. The cerebellum of *Galago* and *Tupaia* Ⅰ. Corpus cerebelli and flocculonodular lobe. Behav Evol, 1969, 2: 377-414.
[8]Allman J. Laminar origin of Projection from the superficial layers of the superior colliculs in the tree shrew (*T. glis*). Brain Res, 1979, 173(1): 1-12.
[9]Casagranda VA. Superior colliculus of the tree shrew. Science, 1972, 177(4047): 444-7.
[10]Lyon DC, Jain N, Kaas JH. The visual pulvinar in tree shrews Ⅱ. Projections of four nuclei to areas of visual cortex. J Comp Neurol, 2003, 467(4): 607-27.
[11]Chomsung RD, Petry HM, Bickford ME. Ultrastructural examination of diffuse and specific tectopulvinar projections in the tree shrew. J Comp Neurol, 2008, 510(1): 24-46.
[12]Day-Brown JD, Wei H, Chomsung RD, et al. Pulvinar projections to the striatum and amygdala in the tree shrew. Front Neuroanat, 2010, 4: 143.
[13]Clark WE. On the brain of the tree shrew. Proc Zool Soc Land, 1924, 94(4): 1053-74.
[14]Colombo JA, Fuchs E, Härtig W, et al. “Rodent-like” and “primate-like” types of astroglial architecture in the adult cerebral cortex of mammals: a comparative study. Anat Embryol (Berl), 2000, 201(2): 111-20.
[15]Elston GN, Elston A, Casagrande V, et al. Areal specialization of pyramidal cell structure in the visual cortex of the tree shrew: a new twist revealed in the evolution of cortical circuitry. Exp Brain Res, 2005, 163(1): 13-20.
[16]Remple MS, Reed JL, Stepniewska I, et al. Organization of frontoparietal cortex in the tree shrew (*Tupaia belangeri*). Ⅰ. Architecture, microelectrode maps, and corticospinal connections. J Comp Neurol, 2006, 497(1): 133-54.
[17]Remple MS, Reed JL, Stepniewska I, et al. The organization of frontoparietal cortex in the tree shrew (*Tupaia belangeri*): Ⅱ. Connectional evidence for a frontal-posterior parietal network. J Comp Neurol, 2007, 501(1): 121-49.
[18]Lu HD, Petry HM. Temporal modulation sensitivity of tree shrew retinal ganglion cells. Vis Neurosci, 2003, 20(4): 363-72.
[19]Campbell CB, Jane JA, Yashon D. The retinal projections of the tree shrew and hedgehog. Brain Res, 1967, 5(3): 406-18.
[20]Kaas J, Hall WC. Visual cortex of the tree shrew. Brain Res, 1972, 42(2): 491-6.
[21]Kaas J, Hall WC. Patterns of retinal terminations and laminar organization of the lateral geniculate nucleus of primates. J Comp Neur, 1978, 182(3): 517-54.
[22]Peterson EA. Auditory responses in tree shrews and primates. J Aud Res, 1968, 8: 345-55.
[23]Cassday JH. Auditory pathways to the cortex in *Tupaia glis*. J Comp Neur, 1976, 166(3): 303-40.
[24]Oliver DL, Hall WC. The medial geniculate body of the tree shrew, *Tupaia glis* Ⅰ. Cytoarchitecture and midbrain connections. J Comp Neur, 1978, 182(3): 423-58.
[25]Oliver DL, Merzenich MM, Roth GL, et al. Tonolopic organization and connections of primary auditory cortex in the tree shrew. Anat Rec, 1976, 184: 491.
[26]Albright BC, Haines DE. Dorsal root afferents to clarke’s column from hindlimb cord levels in *Tupaia* and *Galago*. Brain Behave Evol, 1975, 10(4-5): 274-89.
[27]Campbell CBG. The nervous system of the Tupaiidae: its bearing on phyletic relationships. New York: Springer US, 1980: 219-42.
[28]Jane JA. The origin of the corticospinal tract of the tree shrew with observations on its brain stem and spinal terminations. Behav Evol, 1969, 1: 160-82.
[29]Lende RA. Cortical localization in the tree shrew. Brain Res, 1970, 18(1): 61-75.
[30]Jane JA. Pyramidal tract. A comparison of two prosimian primates. Science, 1965, 147(3654): 153-55.
[31]Shriver JE, Noback CR. Cortical projections to the lower stem and spinal cord in tree threw. J Comp Neur, 1967, 130(1): 25-54.
[32]Campbell CBG. The relationships of the tree shrews: The evidence of the nervous system. Evolution, 1966, 20(3): 276-81.
[33]Murray HM. The rubrospinal tract of the tree shrew. Brain Res, 1976, 116(2): 317-22.



# 第八章

第一篇树鼩基础生物学
TREE SHREW BASIC BIOLOGY

Tree shrews

# 树鼩脑活体$T_2$加权MRI立体定位图谱

代建昆　雷　皓

## 第一节　前　言

树鼩（*Tupaia belangeri*）是现存的最接近灵长类的动物，被提议作为灵长类在生物医学研究中的替代品[1]。把树鼩用作神经科学实验动物具有优越条件。首先，树鼩的中枢神经系统发育良好，前额叶有所发育，大脑重量与体重的比值很高，甚至比人还高[2]。其次，在人类精神和神经疾病的模拟方面（心理应激、抑郁症、老年痴呆），树鼩较传统啮齿类模式动物而言存在潜在优势[3]。最近的树鼩全基因序列分析[4]证实了树鼩与灵长类亲缘关系最为接近，该研究在树鼩中鉴定了28个被认为灵长类特有的功能性基因。此外，树鼩还具备作为模式动物的条件：成年个体体形小、繁殖周期和生命周期短、养殖成本低廉等。这些资料表明，树鼩可以作为理想的神经科学研究用的实验动物。

磁共振成像（magnetic resonance imaging, MRI）技术广泛运用于人和动物的大脑研究，然而迄今为止，鲜有人利用该技术开展树鼩大脑的研究，可查文献仅两篇：Ohl F等[5]和Wang S等[6]。目前尚缺树鼩脑MRI定位图谱。本文结合现有的基于染色的树鼩脑立体定位图谱[7]，在MRI $T_2$加权像上标注树鼩（*Tupaia belangeri chinensis*）脑内主要核团和白质结构，旨在为今后利用MRI研究树鼩大脑内结构提供解剖学指南。

## 第二节　$T_2$加权MRI树鼩大脑核团与白质结构标定

### 一、动物准备与数据采集

本文使用7只成年雄性树鼩［购买于昆明医科大学动物所，体重（120 ± 18）g］，构建高分辨率树鼩脑$T_2$加权图像模板。动物使用腹腔内注射10%水合氯醛麻醉，剂量为400mg/kg。成像过程

中进行实时呼吸监控，并使树鼩的体温维持在（36 ± 1）℃。活体$T_2$加权实验均在Biospec 7T/20cm动物磁共振成像仪（Bruker，德国）上完成。

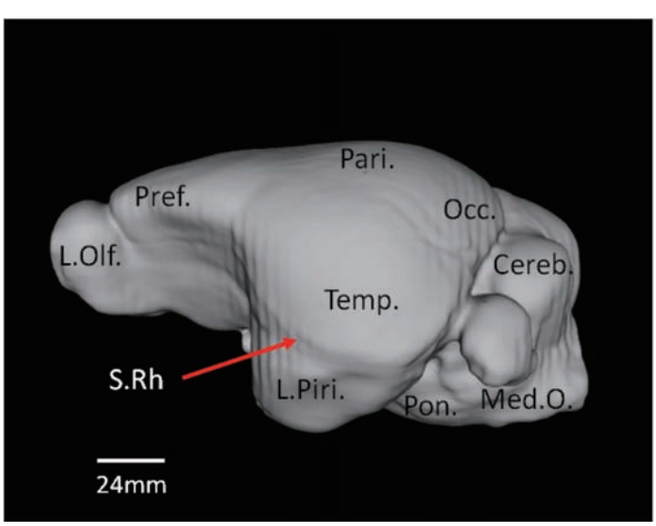
$T_2$成像采用RARE（rapid acquisition with refocused echoes）序列。成像参数为：重复时间（TR）=6900ms，回波时间（TE）=12ms，RARE因子=8，视野（FOV）=30mm×30mm，矩阵大小（Matrix）=256×256，层厚=0.5mm，累加次数=12。单个树鼩花费的采集时间为44分钟，分辨率为0.12mm×0.12mm×0.5mm。

## 二、数据处理

$T_2$加权像使用ANTs（advanced normalization tools）软件[8]进行后续处理。首先，人工地将图像中非脑组织区域去除，接着对信号强度进行无参数非均一性矫正[9]，然后每个数据插值成立方体体素，插值后的分辨率为0.12mm×0.12mm×0.12mm。选取一个有代表性的树鼩图像（冠状面图像两侧比较对称）作为初始模板，将其余6只树鼩的脑图像配准到该模板空间上，配准方法为：先使用刚性配准，然后用微分同胚非线性配准。配准后，将初始模板与配准后的6个图像进行算术平均，得到一个新的模板。接着，将所有的7个图像都用前面提到的配准方法配准到新的模板空间中，最后将7个配准到新模板空间的数据进行算术平均，得到最终的模板图像。

## 三、树鼩脑MRI的表面解剖

根据文献[7]中的树鼩脑的大体解剖，我们在由平均模板计算出来的树鼩大脑表面图上进行粗略的划分和标注。从外侧面看（图8–1），树鼩大脑的额叶与嗅叶、额叶与颞叶、额叶与顶叶、颞叶与顶叶、颞叶与枕叶的界线较为清晰，颞叶与梨状叶被嗅沟分开，脑桥、延髓和小脑的边界也清晰可见，但顶叶与枕叶的界线不清晰。从背侧看（图8–2），大脑纵裂十分明显，将大脑分为左右两侧。从腹侧看（图8–3），除了嗅叶、梨状叶、脑桥、延髓外和小脑，视交叉和脑垂体也清晰可见。额叶、顶叶、枕叶和颞叶一起构成树鼩大脑的新皮层。




| | | |
|---|---|---|
| Cereb. | cerebellum | 小脑 |
| Ch. O. | chiasma optic | 视交叉 |
| L. F. | longitudinal fissure | 大脑纵裂 |
| L. Olf. | lobus olfactory | 嗅叶 |
| L. Pir. | lobus piriformis | 梨状叶 |
| Med. O. | medulla oblongata | 延髓 |
| Occ. | occipital region | 枕叶区 |
| Pari. | parietal region | 顶叶区 |
| Pit. | pituitaria | 脑垂体 |
| Pref. | prefrontal region | 前额区 |
| Pon. | pons | 脑桥 |
| S. Rh. | sulcus rhinalis | 嗅沟（嗅裂） |
| Temp. | temporal region | 颞叶区 |

**图8–1　树鼩大脑MRI三维重建左侧面视图**

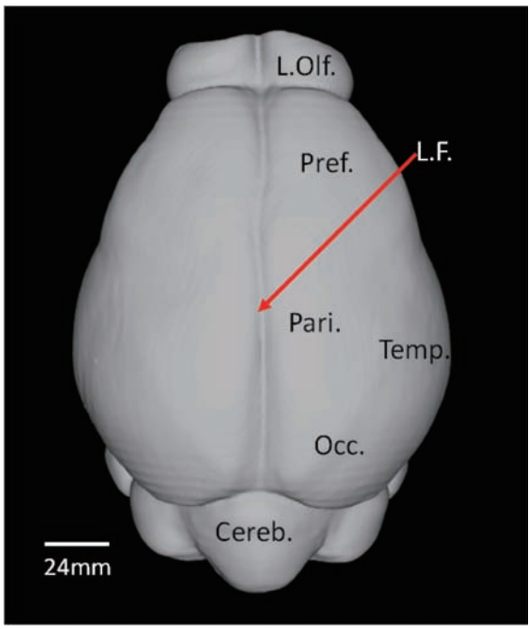



图8–2　树鼩脑MRI三维重建背侧视图

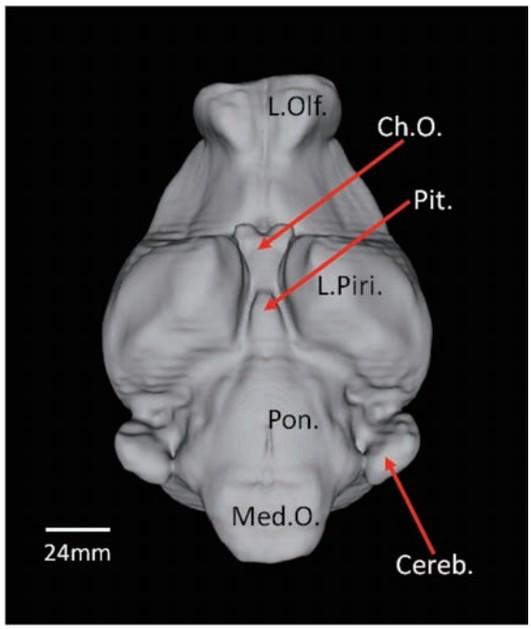



图8–3　树鼩脑MRI三维重建腹侧视图

## 四、主要核团和白质结构标注

本文选取了13片具有代表意义冠状面图像进行标注，如图8–4所示。

核团：

### （一）纹状体

纹状体是基底神经节的重要组成部分，包括壳核、尾核和苍白球。如图8–4C至图8–4G所示，尾核位于侧脑室与内囊之间，苍白球与壳核位于内囊外侧。从图像上看，尾核的$T_2$信号强度最大，壳核稍微次之，苍白球明显较暗，苍白球与壳核的边界明显。如图8–4H所示，尾核一直向后延伸，呈长条状。内囊将尾核（caudate nuclei）和壳核（putamen nuclei）明显的分开，呈现出灵长类和其它高等哺乳动物类脑纹状体的主要形态特征[10]。从形态和神经化学特性来看，树鼩的纹状体和灵长类的纹状体惊人地相似，但是与啮齿类显著不同[10]。尾核、壳核和苍白球的三维形态如图8–5所示。

### （二）杏仁核和海马

杏仁核（amygdala）和海马（hippocampus）是边缘系统的重要组成部分。如图8–4D至图8–4G所示，树鼩的杏仁核较大，位于梨状叶的内侧、视束的腹外侧、壳核和苍白球的腹侧，与海马部分毗邻。如图8–4F至图8–4J所示，树鼩的海马也较大且分化良好，呈层状结构，体积约为160mm$^3$[6]。海马结构的边界清晰，边界的主要标志结构为：视束、胼胝体等。杏仁核海马的三维形态如图8–6所示。

### （三）视觉相关核团

树鼩的视觉高度发达，与视觉相关的核团也发育良好。如图8–4I和图8–4J所示，外侧膝状体（lateral geniculate nuclei）位于视束内侧、内侧膝状体背侧，与丘脑后结节呈互补之势。如图8–4I所示，丘脑后结节（pulvinar）位于外侧膝状体内侧。如图8–4K和图8–4L所示，树鼩的上丘分化良好，呈层状。外侧膝状体、丘脑后结节和上丘的三维形态如图8–7所示。

### （四）听觉相关核团

内侧膝状体（medial geniculate nuclei）和下丘与听觉相关。如图8–4I和图8–4J所示，内侧膝状体较大，呈椭圆形。如图8–4M所示，下丘位于上丘腹侧，下丘不及上丘（图8–4K和图8–4L）分化良好，表明树鼩的听觉不如视觉发达。内侧膝状体和下丘的三维形态如图8–8所示。

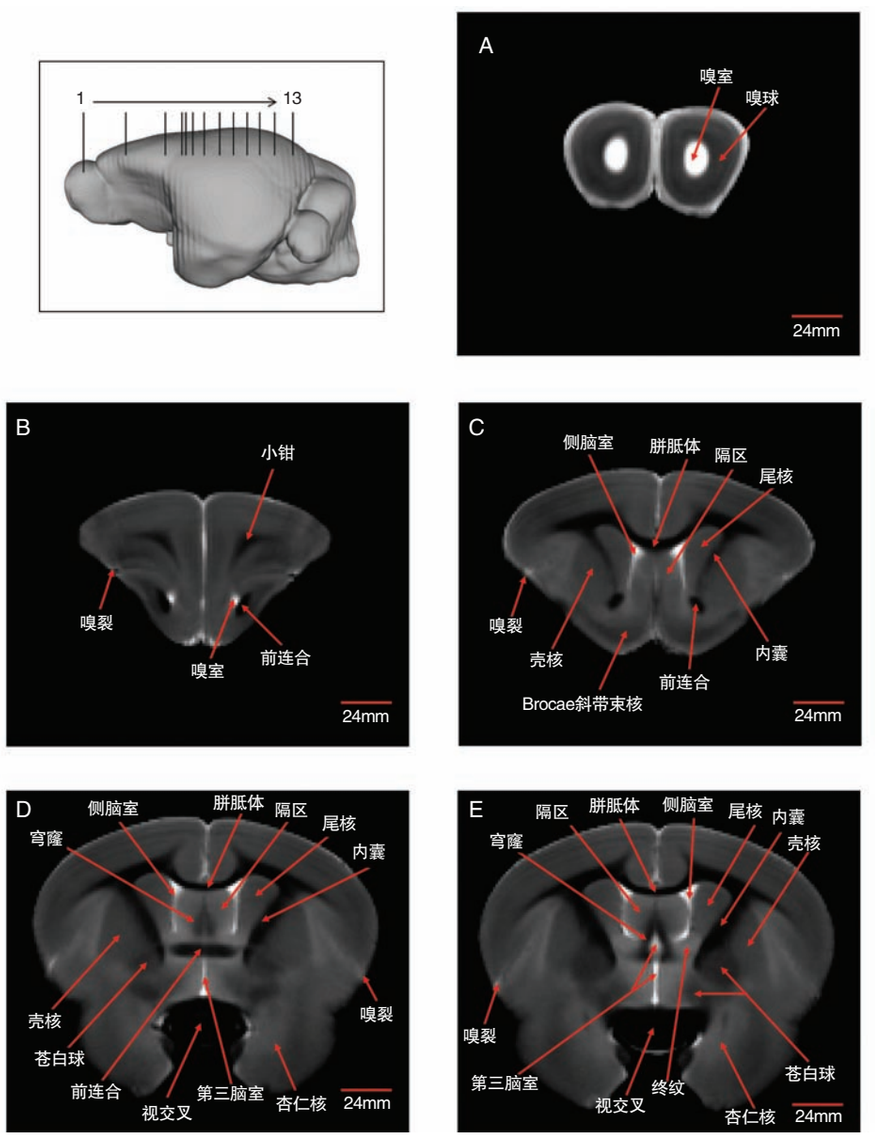



**图8–4（a） 13片具有代表意义的冠状面$T_2$图像**

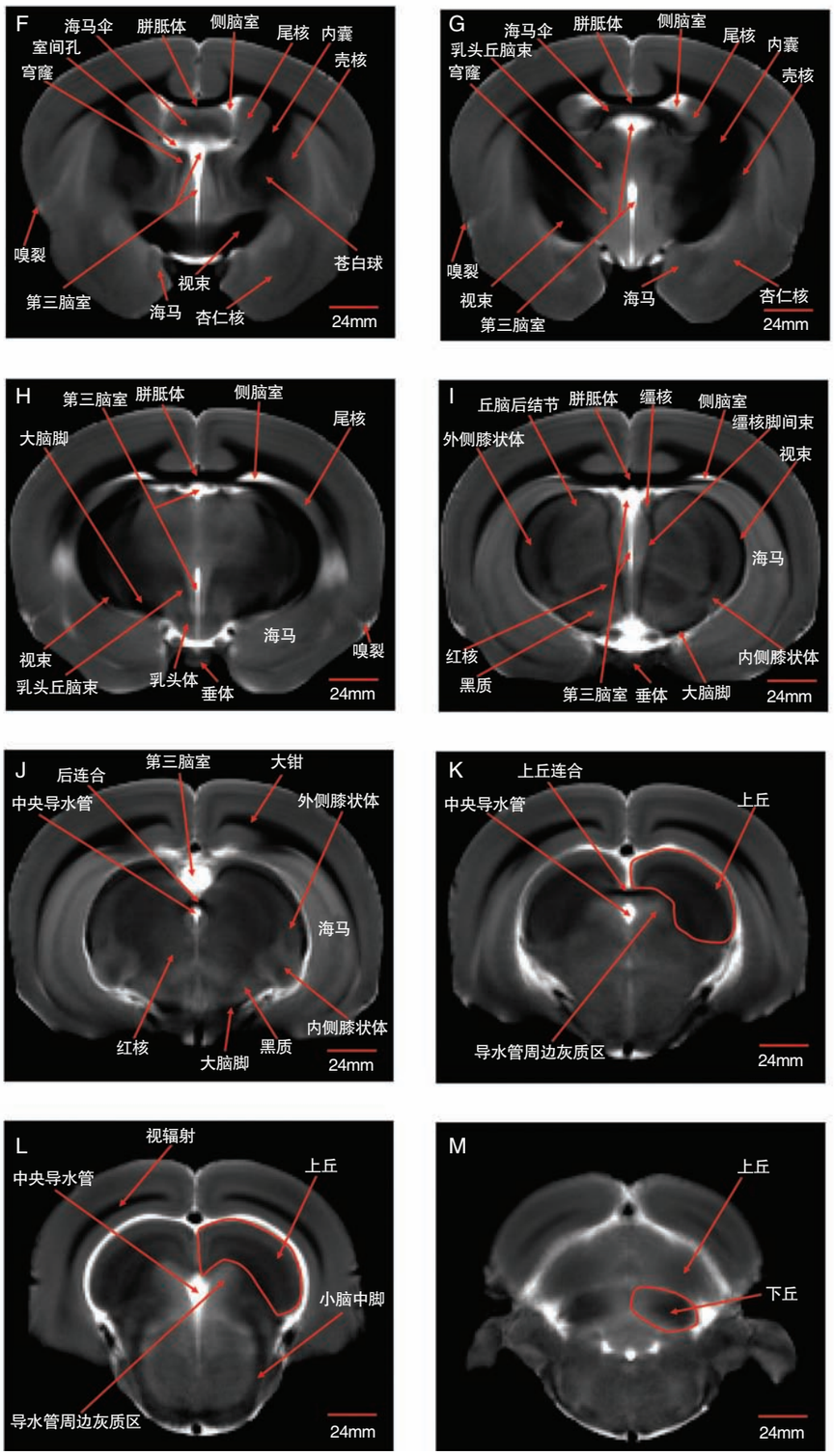



**图8–4（b） 13片具有代表意义的冠状面$T_2$图像**

### （五）其它核团

如图8-4C至图8-4E所示，隔区（septal area）位于左右侧脑室（lateral ventricle）之间。如图8-4E所示，终纹（stria terminal）位于隔区腹侧、穹窿外侧、内囊和苍白球内侧。如图8-4C所示，Brocae斜带束核（nucleus fasciculi diagonalis Brocae）的$T_2$信号较周边区域较弱。如图8-4I和图8-4J所示，黑质（substantia nigra）位于内侧膝状体腹内侧、大脑脚背侧。如图8-4I和图8-4J所示，红核（nucleus ruber）位于黑质背侧、缰核脚间束外侧，$T_2$信号较黑质弱。如图8-4H和图8-4I所示，垂体（hypophysis）位于最腹侧。如图8-4I所示，缰核（habenular nucleus）位于背侧第三脑室外侧。如图8-4K和图8-4L所示，导水管周边灰质区（periaqueductal gray）位于中央导水管四周，$T_2$信号较背侧和外侧组织而言较强。如图8-4H所示，乳头体（mamillary body）位于小丘脑、垂体的背侧。

### （六）白质结构

树鼩的视觉系统发达，有粗大的视交叉（optic chiasma）和视束（optic tract）（图8-4D至图8-4G），视束延续至外侧膝状体时（图8-4I），变得细长，紧贴外侧膝状体外侧和海马内侧。图8-4L中的视辐射是根据David H. Hubel的工作[11]标注的。如图8-4B至图8-4D所示，树鼩的前连合（anterior commissure）较为粗大，联系两侧嗅球，联系两侧颞叶部分纤维在$T_2$图像上难以辨别。如图8-4C至图8-4J所示，胼胝体（corpus callosum）位于皮层下方连结左右大脑。胼胝体膝部的纤维弯向前，连结两侧额叶的前部称为小钳（minor forceps）（图8-4B）。胼胝体压部纤维弯向后连结两侧枕叶，称为大钳（major

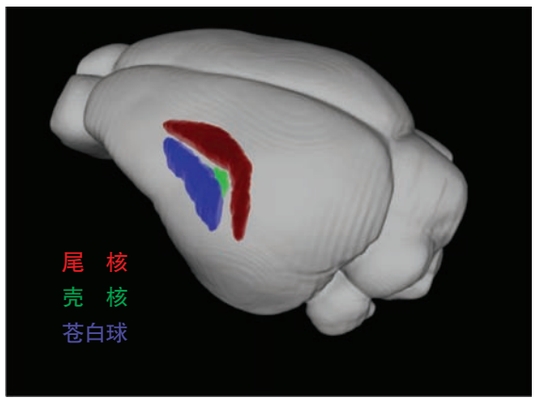



**图8-5　纹状体的三维显示**
红色为尾核，蓝色为壳核，绿色为苍白球。

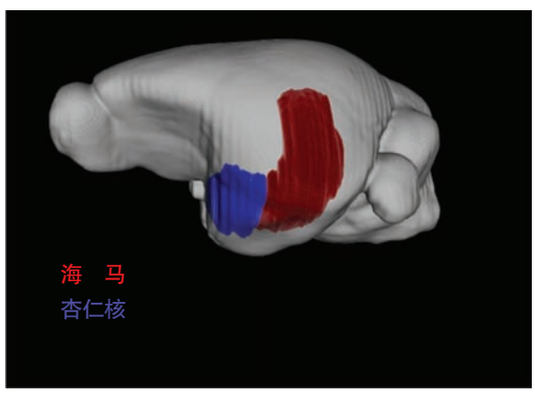



**图8-6　海马和杏仁核的三维显示**
红色为海马，蓝色为杏仁核苍白球。

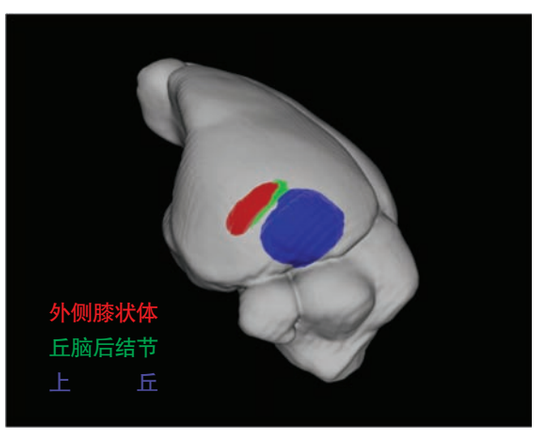



**图8-7　视觉相关核团的三维显示**
红色为外侧膝状体，蓝色为上丘，绿色为丘脑后结节。

forceps）（图8–4J）。如图8–4C至图8–4G所示，内囊（internal capsule）位于尾核和壳核之间，从前到后逐渐变宽。穹窿（fornix）是由海马经海马伞（fimbria hippocampus）（图8–4F和图8–4G）至下丘脑乳头体的白质纤维束。如图8–4D和图8–4E所示，两侧穹窿在隔区靠近，接着分开延续下去（图8–4F和图8–4G）。如图8–4G和图8–4H所示，乳头丘脑束（mamillothalamic tract）是连接丘脑和乳头体的白质束。如图8–4I所示，缰核脚间束将位于大脑背侧的缰核与腹侧的脚间核联系在一起。如图8–4H至图8–4J所示，大脑脚位于黑质腹外侧并紧贴黑质。如图8–4J所示，后连合位于第三脑室和中央导水管之间，连接左右脑，树鼩的后连合明显比前连合（图8–4D）小。如图8–4K所示，上丘连合位于中央导水管背侧，连接左右上丘。如图8–4L所示，小脑中脚也清晰可辨。

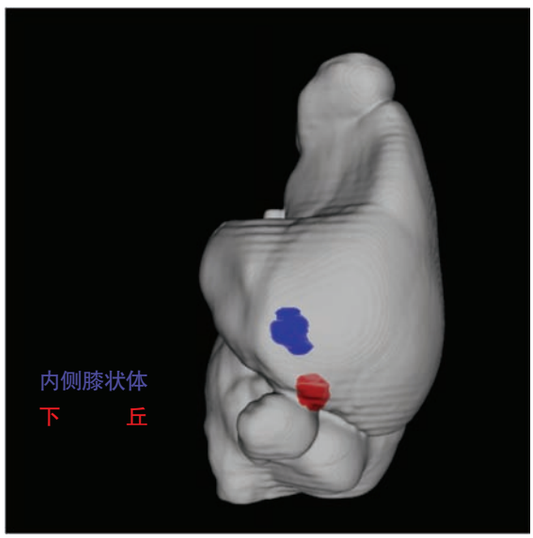



**图8–8　听觉相关核团的三维显示**
红色为下丘，蓝色为内侧膝状体。

**表8–1　中英文名称对照**

| 中文名称 | 英文名称 |
|---|---|
| Brocae氏斜带束核 | nucleus fasciculi diagonalis Brocae |
| 苍白球 | globus pallidus |
| 侧脑室 | lateral ventricle |
| 大脑脚 | cerebral peduncle |
| 大钳 | forceps major |
| 导水管周边灰质区 | periaqueductal gray |
| 第三脑室 | 3rd ventricle |
| 隔区 | septal area |
| 海马 | hippocampus |
| 海马伞 | fimbria of the hippocampus |
| 黑质 | substantia nigra |
| 红核 | nucleus ruber |
| 后连合 | posterior commissure |
| 缰核 | habenular nucleus |
| 缰核脚间束 | tractus habenulointerpeduncularis |
| 壳核 | putamen nucleus |
| 脑垂体 | hypophysis |
| 内侧膝状体 | medial geniculate nucleus |
| 内囊 | internal capsule |
| 胼胝体 | corpus callosum |
| 前连合 | anterior commissure |
| 穹窿 | fornix |

续表8-1

| 中文名称 | 英文名称 |
|---|---|
| 丘脑后结节 | pulvinar |
| 乳头丘脑束 | mammillothalamic tract |
| 乳头体 | mammillary body |
| 上丘 | superior colliculus |
| 上丘连合 | commissure of the superior colliculus |
| 视交叉 | optic chiasm |
| 视束 | optic tract |
| 室间孔 | interventricular foramen |
| 外侧膝状体 | lateral geniculate nucleus |
| 尾核 | caudal nucleus |
| 下丘 | inferior colliculus |
| 小脑中脚 | middle cerebellar peduncles |
| 小钳 | forceps minor |
| 杏仁核 | amygdala |
| 嗅裂 | sylvian fissure |
| 嗅球 | olfactory bulb |
| 嗅室 | olfactory ventricle |
| 中央导水管 | aqueduct |
| 终纹 | stria terminal |

## 第三节 结 语

磁共振成像（magnetic resonance imaging, MRI）是一种非介入、无辐射、分辨率高的探测技术，在大脑研究方面，结合不同的成像序列，MRI能从多种角度描述大脑信息，如：常规的$T_1$和$T_2$加权成像能提供高分辨率、组织对比度良好的结构图像。

本文利用$T_2$加权MRI提供的组织对比，标注树鼩脑内主要核团和白质结构。树鼩是现存的、可利用的、最接近灵长类的动物，鉴于树鼩在生物医学研究的应用前景，尤其是在模拟人类神经性疾病（如抑郁症、老年痴呆）方面的重要作用，基于MRI的研究势必会在今后展开，我们提供的核团和白质结构标记，能为今后的研究工作提供数字化的MRI影像树鼩大脑解剖结构定位。

### 参考文献

[1]Cao J, Yang EB, Su JJ, et al. The tree shrews: adjuncts and alternatives to primates as models for biomedical research. J Med Primatol, 2003, 32(3): 123-30.

[2]彭燕章，叶智章，邹如金，等．树鼩生物学．云南：云南科技出版社，1991．

[3]徐林，张云，梁斌，等．实验动物树鼩和人类疾病的树鼩模型研究概述．动物学研究，2013，34（2）：59–89.

[4]Fan Y, Huang ZY, Cao CC, et al. Genome of the Chinese tree shrew. Nat Commun, 2013, 4: 1426.

[5]Ohl F, Michaelis T, Fujimori H, et al. Volumetric MRI measurements of the tree shrew hippocampus. J Neurosci Methods, 1999, 88(2): 189-93.

[6]Wang S, Shan D, Dai J, et al. Anatomical MRI templates of tree shrew brain for volumetric analysis and voxel-based morphometry. J Neurosci Methods, 2013, 220(1): 9-17.

[7]杨文光．中缅树鼩脑立体定位图谱．南宁：广西科学技术出版社，1990．

[8]Avants BB, Tustison NJ, Song G, et al. A reproducible evaluation of ANTs similarity metric performance in brain image registration. Neuroimage, 2011, 54(3): 2033-44.

[9]Sled JG, Zijdenbos AP, Evans AC. A non-parametric method for automatic cor-rection of intensity non-uniformity in MRI data. IEEE Trans Med Imaging, 1998, 17: 87-97.

[10]Rice MW, Roberts RC, Melendez-Ferro M, et al. Neurochemical characterization of the tree shrew dorsal striatum. Front Neuroanat, 2011, 5: 53.

[11]Hubel DH. An autoradiographic study of the retino-cortical projections in tree shrew (*Tupaia glis*). Brain Res, 1975, 96(1): 41-50.



# 第九章 Tree shrews

# 树鼩脑结构的演化与行为

第一篇 树鼩基础生物学
TREE SHREW BASIC BIOLOGY

孟肖路　李勇辉　隋　南

## 第一节 前　言

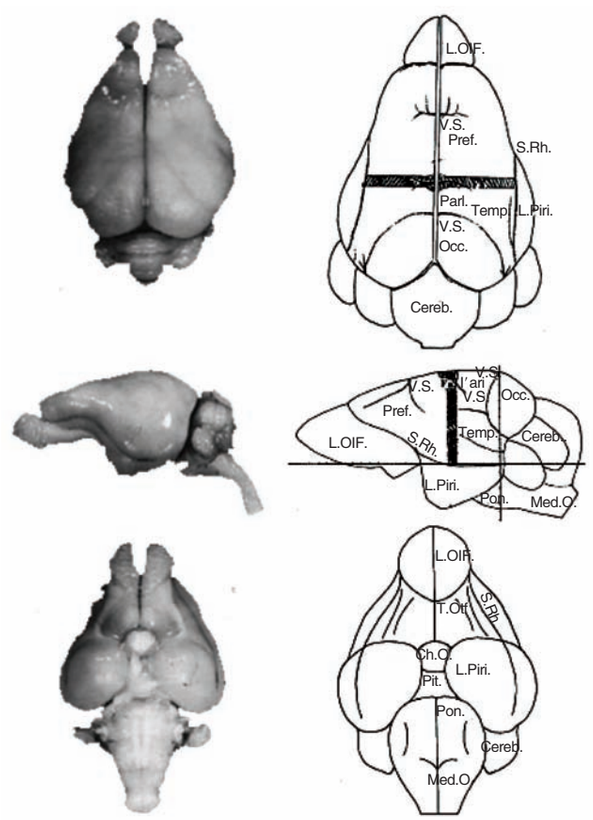
脑结构和功能的改变是动物长期演化的产物，是复杂行为变化的物质基础。在物种演化过程中，脑与行为的关系是相互依存的，动物的行为改变与脑的演化也有直接关系。从单细胞动物到人类，神经系统从无到有，从低级到高级，行为的发展也从简单过渡到复杂。行为和环境的改变可以选择性地影响脑的结构和功能。例如，鱼类在水中的生存环境相对简单，活动范围相对局限，因而小脑或大脑都小；而哺乳动物要应对更复杂的陆地生存环境，除了感觉运动需要协调以外，还需要更多的认知技能，因而小脑和新皮层相对更发达。某些特异的行为还能促进特殊脑区的发展。例如，在探索周围环境时，浣熊更经常使用前肢，因而前肢在新皮层脑的触觉代表区所占面积极大；而长鼻浣熊则更多使用鼻子探索，因而新皮层触觉代表区面积很小，但鼻触觉代表区却很大。

了解模式动物的行为，进而解读复杂行为背后的脑机制，是探究动物模型的基本出发点。这有助于我们理解脑与行为演化的相互关系。研究动物脑与行为的最终目的，是为了深入理解人脑。从演化的观点来看，动物种系越接近，脑与行为就越具相似性。但是，并非物种演化等级越高，越适合作为模式动物。作为模式动物，处在不同演化地位的动物各有优劣。低等动物的优势是繁殖周期短、成本低、被了解多以及实验操作方便等，缺点是生物特征与人类差别较大。高等动物与人类的差异性小，如非人灵长类，与人类行为相关性高，缺点是繁殖周期长、成本高、实验操作困难等[1]。因此，选择合适的模式动物是脑与行为研究的关键。树鼩是灵长类的近缘动物，大脑较发达，前额叶皮层相对完善，海马比例也较大，脑–体比重（brain-to-body weight ratio）在哺乳动物中最大，有较强的认知能力[2]。树鼩体重与大鼠相当，有较大的运动灵活性。同时，它们的明视觉敏锐，有较强的颜色识别能力[3]。另外，树鼩对环境变化或应激刺激非常敏感。最新的研究证据表明，树鼩的基因组和释放的应激相关激素与灵长类类似[4]。因此，树鼩作为模式动物具有潜在优势。

# 第二节 脑结构、功能及其演化

## 一、脑外观的基本形态和结构

树鼩的脑由3层脑膜及较薄颅骨包被。颅骨呈半透明状，柔韧性较好。从外观上看，树鼩的脑呈椭圆状，前部略窄，枕颞部较宽；枕部皮层向后接小脑前叶，但未覆盖小脑前叶；颞皮层较为突显，已类似于灵长类的颞叶形态（图9–1）[29]。顶、枕、颞等叶较为发达，除梨状沟较为明显外，显微镜下以皱褶为主。小脑则较为发达，特别是后叶优于婴猴。视交叉的体积相当大，可能与树鼩视觉演化有关。




| | | |
|---|---|---|
| Cereb. | cerebellum | 小脑 |
| F.a. | frontal agranular region | 额叶无颗粒皮质层 |
| L.OIF. | lobus olfatorius | 嗅叶 |
| L.Piri. | lobus piriformis | 梨状叶 |
| Med.O. | medulla oblongata | 延髓 |
| Occ. | occipital region | 枕区 |
| Pari. | parietal region | 顶区 |
| Pit. | pituitaria | 脑垂体 |
| Pref. | prefrontal region | 前额区 |
| Pon. | pons | 脑桥 |
| S.Rh. | sulcus rhinalis | 嗅沟 |
| Temp. | temporal region | 颞叶 |
| Ch.O. | chiasma optic | 视交叉 |
| V.S. | Venae superior | 大脑上静脉 |

**图9–1 树鼩脑的外观形态及结构**

资料改编自：http://brainmuseum.org/specimens/scandentia/treeshrew/index.html及文献29。

树鼩的大脑皮层可分为：前额区、中央脑区、顶区、颞区、枕区。大脑新皮质占皮层面积的59%，新旧皮层比率略低于狐猴，远高于啮齿类。在额区，前额皮层略占优势，与高级脑功能演化有关，如工作记忆、认知控制或决策等行为。此外，树鼩海马/全脑体积比（6.2 ± 0.2）%，比啮

齿类（7.2 ± 0.3）%更接近人类（0.85 ± 0.11）%；树鼩杏仁核/海马体积比（41 ± 1）%显著大于啮齿类（20 ± 3）%，更接近于灵长类（0.67%）。这些结果提示，树鼩可能比大、小鼠更适合于情感、记忆以及社会应激相关的研究[5]（图9–2）。

树鼩树栖的生活习性及灵巧的活动，促进了运动和视觉系统的演化。与灵长类相比，树鼩的上丘异常大，而且分层更明确。初级视皮层上锥体细胞的分支类型与灵长类动物类似，其分支和棘突比婴猴和狨猴多[6]。树鼩的初级视觉皮层也含有顺序排列的朝向性选择柱，与灵长类类似，但啮齿类则没有类似的结构区分[7]。树鼩以视觉导向为主，视网膜上以锥体细胞占96%，因而属昼行动物。在黑暗中会丧失辨别力，并表现为安静和顺从。

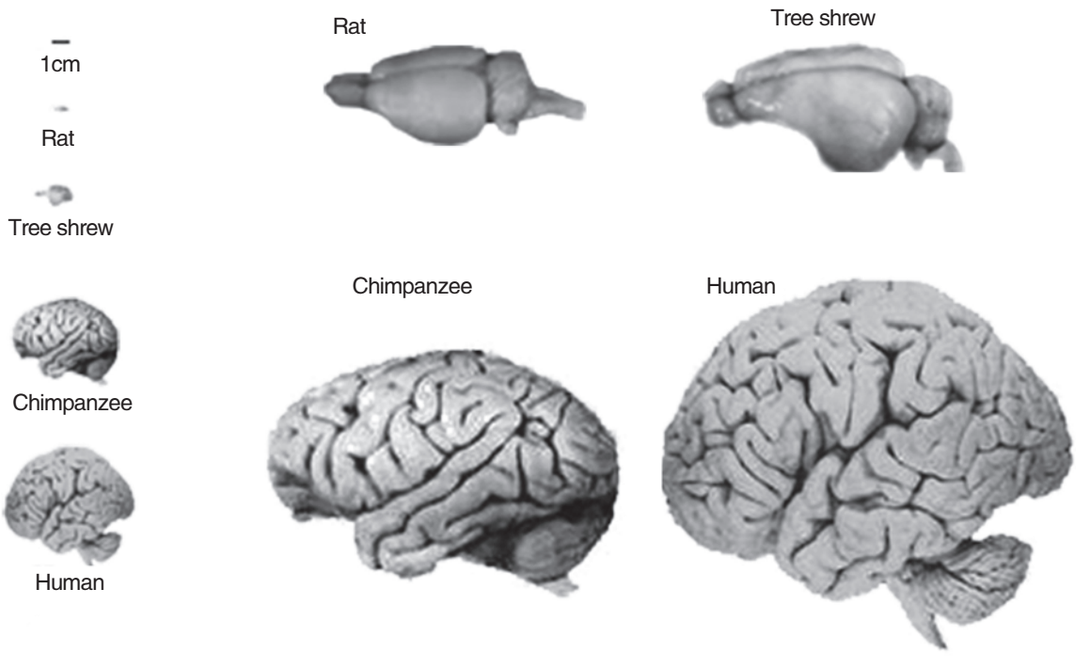



**图9–2　树鼩与部分哺乳类动物脑外观的比较**

改编自：http://learningshark.com/WebDocs/Psych%20Brain%20Gifs/Brain%20Comparison%206%20Species.jpg.

## 二、树鼩脑的演化地位

从种系发生的观点来看，脑的发展与分化程度是演化的明显标志。主要表现为：脑–体重比的增长；大脑新皮质随机能的发展而发生形态上的分区；前额皮层所占总皮层的比率及其与丘脑核团双向联系的密切程度[2]。

脑–体重比是衡量脑的演化的重要指标。树鼩的大脑表面虽无明显沟回，但脑–体重比为1∶62，与人类1∶46接近，远大于啮齿目脑–体重比，如小鼠脑–体重比为1∶96。图中列举了几种脑体重比在1∶41～1∶56之间的动物（图9–3）[8]。因此，树鼩在演化地位上接近于灵长类。

前额叶皮层早在哺乳类就开始分化出来，到高等灵长类才发展较好，而到人类时其结构和功

能复杂化达到高峰[9]。另有研究显示，已知兔、黑猩猩、人前额区所占比率分别为：3%、16%、29%，而树鼩则达到为15%，仅次于黑猩猩[2]。

新皮质在脑容量中的比率（volume fraction of neocortex, Fneo）是衡量脑进化程度的另一个重要标志。与食虫目（16 ± 6）%相比，树鼩的Fneo约为35%，更接近于灵长类（74 ± 5）%（图9–4）[10]。

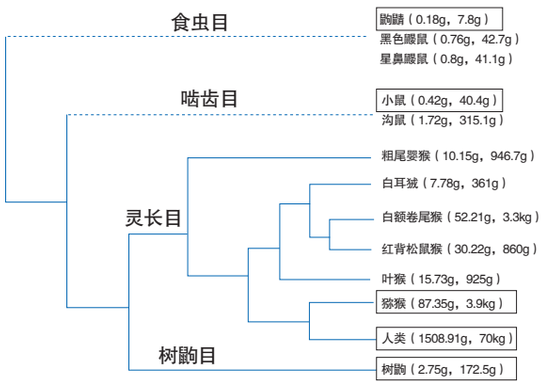



**图9–3　树鼩及其它物种的脑、体均重数据比较**
改编自文献8。

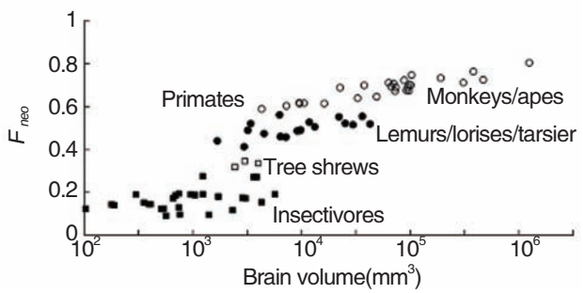



**图9–4　树鼩与其它物种的新皮质容量占脑总容量比率的比较**
资料来自文献10。

## 第三节　感知觉及相关行为

动物通过感觉器官认识周围环境。动物感知觉的演化在生存及探索环境方面起着重要作用。树鼩属半树栖的昼行动物，生存环境和习性促进其演化出适合自身的感觉器官，如较好的视觉系统和运动协调性等，但其嗅觉和听觉系统并没有呈现突出的特点。

### 一、视　觉

树鼩擅攀援，活动灵活，以昆虫和果实为食，在觅食及躲避危险过程中，逐渐演化出敏锐的视觉和颜色辨别能力。树鼩发达的视上丘及丘脑也是在这个过程中逐渐形成的[3]。与灵长类相比，树鼩的上丘相对较大，而且分层明确。初级视皮层上锥体细胞的分支类型与灵长类动物类似，其分支和棘突比婴猴和猕猴多[6]。树鼩的初级视觉皮层也含有顺序排列的朝向性选择柱，与灵长类类似，但是大鼠没有类似的结构及形态分布[7]。因此，树鼩的视觉系统与灵长类更接近，是研究人类视觉相关行为的较好的模式动物。

颜色辨别有利于动物更好地区分环境线索，利用这些线索来识别食物或危险信号，增强其生存能力。因此，颜色辨别能力是演化地位的标志之一。基于视锥细胞的颜色辨别，视敏度高，但对明暗变化不敏感。食虫类多为夜行性动物，视网膜以视杆细胞为主，对明暗变化敏感，但视敏度差，没有颜色辨别能力。树鼩为昼行性动物，视网膜以锥形细胞为主（占96%）[11]，颜色识别能力较强，但仅有黄和蓝两种感光细胞，为二原色动物，比啮齿类等更接近于人类。有研究表

明，在白、黑、绿、蓝4种光环境中，树鼩对蓝光和绿光反应敏感[12]。我们实验室也发现，在操作性条件反射训练过程中，树鼩对带颜色的压杆敏感，可促进其完成学习任务；另外，树鼩偏爱黄色和蓝色物体（图9–5）。

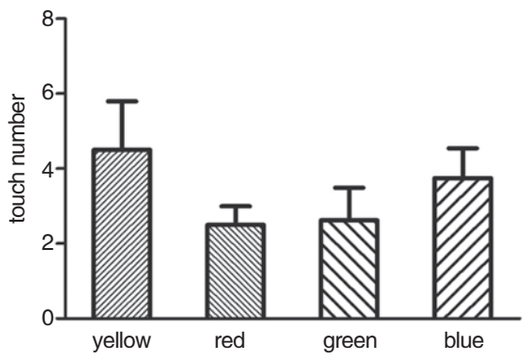



**图9–5　树鼩对不同颜色物体的趋近次数**

树鼩视网膜仅含有4%的视杆细胞，因此，它在夜间的光敏度很低。这也是树鼩日间活动较多的一个主要原因。在饲养过程中，我们也发现树鼩在夜间活动较少，仅有少量的饮食饮水活动。因此，树鼩在各种行为检测过程中需保证足够的光度。

树鼩的树栖生活及跳跃式运动促进了其立体视觉和深度知觉的发展，同时也促进了其纹状体的演化。纹状体主要与运动和认知功能相关。与啮齿类动物不同，树鼩的纹状体与灵长类相似，其尾状核和壳核由内囊隔开。而啮齿类尾状核和壳核分界不清[13]。

## 二、痛觉与行为

早在20世纪80年代，马原野等发现树鼩在给予电击后，初期表现出挣扎现象，继续电击后，挣扎现象逐渐消失，存在着应激镇痛效应[14]。出现这种效应的原因可能是在应激过程中，伴有内源性阿片类物质的大量释放，进而使痛阈逐渐上升。

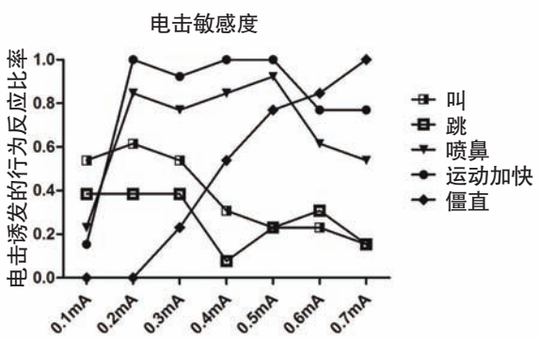



**图9–6　树鼩对不同强度电击的敏感度**

在测量树鼩对电击敏感性时，我们发现0.2mA出现喷鼻、运动加快等反应，0.3mA出现僵直反应，0.5mA僵直行为稳定，喷鼻和快速运动减少（图9–6）；当电击强度升至1.2mA时，逃跑行为减少，并伴有嘶叫，3.0mA后则呆滞不动。我们推测，树鼩对低强度电击产生的痛觉是敏感的，但随着强度增加，可能出现了明显的应激镇痛现象，与马原野等人的研究结果一致[14]。

树鼩显著的应激镇痛现象可能与阿片受体的类型与分布有关。大鼠研究显示，应激可以导致海马、前额叶和下丘脑内μ阿片受体的变化，而μ阿片受体与痛觉密切相关[15]。张庆余等发现，树鼩脑内仅有μ阿片受体，而猕猴脑内μ受体、δ受体和κ受体均有，与人类相似[16]。树鼩所表现出来的明显应激镇痛现象可能与内源性阿片类物质及μ阿片受体有关。树鼩的阿片类受体的分布特征为研究痛觉的机制提供了一个新的模型。

## 三、嗅觉和听觉

嗅觉是动物维持生存的最古老的感觉。对于低等哺乳动物，嗅觉是个体获取环境信息的主要方式，嗅叶所占脑皮层的比例也相当大。而高等动物的嗅觉功能逐渐退化。因此，嗅叶的退化

程度也能反映动物的演化地位。与食虫目比较而言，树鼩的嗅觉相对退化，嗅叶占大脑的比例也相对较小。但嗅觉对树鼩的生存仍然起重要作用，它通过臭腺分泌的物质来标记领地，通过嗅觉识别其它动物的标记痕迹，从而避免不必要的冲突。在野外观察中，常可以看到某些树鼩沿一定的路径在彼此标记；这可能与腺体分泌物涂在路径周围物体上有关。在实验室条件下，笼养树鼩在自己的居住环境中，也会通过腺体分泌物或者粪便标记领地。饲养两周后，树鼩笼内四壁和攀援用支架上通常粘有黄棕色分泌物。我们也观察到，将两只树鼩放入同一睡盒后，将其中一只树鼩的空睡盒（经过两周居住并被标记的睡盒）与之口对口摆放，树鼩会自动钻入自己标记过的睡盒。这些现象表明嗅觉信息仍然是树鼩感受环境变化的重要方式。

听觉对哺乳动物的生存至关重要，特别是对夜行性动物而言，听觉信息是动物识别周围环境变化的主要途径。毛细胞是感受声波刺激的器官，毛细胞数目的多少代表对声音刺激的敏感程度。已有的研究表明，树鼩的外毛细胞约5000个，内毛细胞1400多个，毛细胞的缺失率为0.53%，比啮齿类的豚鼠（0.8%）低。作为声音传导的重要器官耳蜗的回数及基底膜的长度在一定程度上反映听觉的演化地位，树鼩的耳蜗螺旋是3回多，介于豚鼠（4回）与人类（2.5回）之间，基底膜的长度13mm比豚鼠（21mm）短[2]；这些特征都在一定程度说明树鼩的听觉功能相对退化。我们也发现，在噪音刺激与频闪光刺激作用下，树鼩对噪音刺激的应激反应较弱。

## 第四节 学习与记忆

脑–体重比及前额叶皮质的优势，为树鼩的认知能力奠定了基础。树鼩灵活的前爪、敏锐的视觉及颜色辨别能力为学习记忆提供了有利条件。在自然环境下，树鼩的认知或学习记忆行为不易被观察到。在实验室环境中，Abbas Khani等对新颖物体辨别学习的研究显示，树鼩连续进行物体识别训练后，很快学会辨别熟悉或新颖的物体[17, 18]。匡培梓等（1984）采用学习辨别箱，对树鼩视觉辨别学习能力与海马机能关系进行研究，训练树鼩学会辨别大圆和小圆后，电损毁双侧海马后进行测试，发现原来习得的辨别反应正确率下降，表明海马是辨别学习的关键脑区[30]。

在操作性条件训练过程中我们发现，树鼩在1小时内就能学会压杆获取糖水的行为，学会后可以至少维持5周，表现出很快的学习速率和稳定的记忆。我们用蔗糖水为奖赏物比较了树鼩和大鼠操作性条件反射形成的速度和稳定性，发现树鼩可以在更短的时间内学会稳定的操作性行为（图9–7）。通过经典条件反射模式，我们进一步考察了树鼩正性、负性情绪学习的情况，以吗啡（1mg/kg）的奖赏效应为无条件刺激，在带有红色条纹的训练箱内注射吗啡进行了训练，经过4次训练后，树鼩对吗啡匹配的环境能形成明显的条件性位置偏爱，而该浓度的吗啡大鼠不能形成条件性位置偏爱（图9–8）。此外，我们还发现经一次强电击（1.5mA）后，树鼩对电击环境能形成非常显著的条件性位置回避行为，并且能保持1月以上（图9–9）。在经历7天不可逃避、不可控足部电击训练后，树鼩呈现出在可逃避环境中的逃避失败现象，这种习得性无助行为能够维持至少2周（图9–10）。王静等人研究显示，树鼩经过5次诱捕获训练后，能形成很好的回避诱捕的记忆[19]。这些结果表明树鼩具有很好的快速的学习和稳定的记忆保持能力。Ohl等人用23孔洞板（5个带有颜色标记的孔洞内放入杏仁）进行视–空间学习检测，发现树鼩在1～2次训练后就能很快学会快速找到食物。结果还提示，树鼩还可能具备更高级的线索抽象提取能力[20]。目前，对于树鼩

认知灵活性、预期行为、冲动性或行为决策等认知功能的研究尚没有相关报道，可以预期树鼩可以在高级认知功能的研究中能发挥重要的作用。

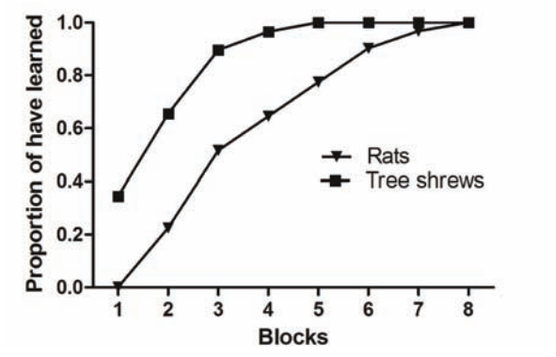



图9–7　树鼩与大鼠操作性条件反射训练学习速率的比较

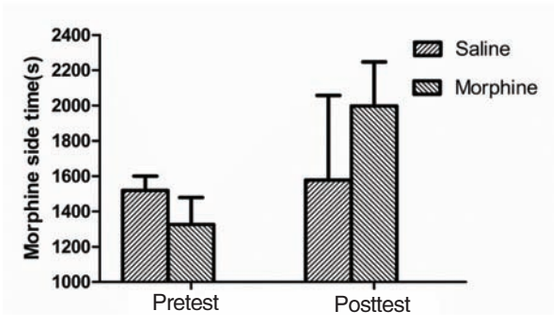



图9–8　树鼩注射吗啡（1mg/kg）能形成条件性位置偏爱

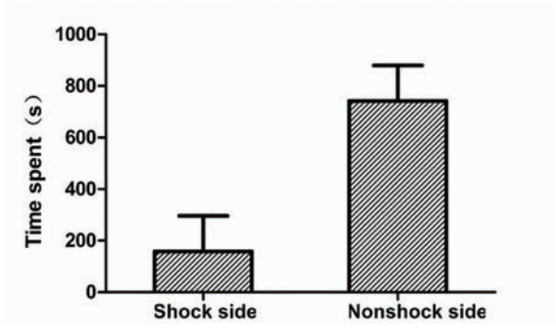



图9–9　树鼩对电击环境形成条件性位置回避

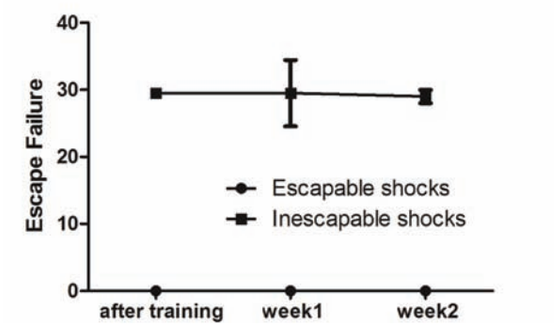



图9–10　树鼩对不可逃避电击刺激的记忆保持时间

树鼩的学习记忆能力与其相对发达的海马和前额叶皮层相关。灵长类的前额叶皮层可能与工作记忆的调控有关，而海马可能更多地调控空间或陈述性记忆。有研究表明，与大鼠相比，树鼩在慢性社会应激后，表现出记忆损伤长时间的持续。大鼠身上所表现出来的记忆受损会随着糖皮质激素的复原而逐渐减弱，而树鼩记忆损伤可以在应激结束后持续8～10周，不受糖皮质激素水平的影响[21]。这可能是因为慢性社会应激导致了海马锥体神经元结构改变，抑制了齿状回的神经再生，从而导致记忆能力受损[22]。

## 第五节 应激及情绪行为

应激反应和情绪活动是动物普遍存在的本能反应。在生存竞争中，应激反应和情绪体验有助于动物回避周围的危险，或提高适应环境的能力。例如，机体受到各种有害刺激时，促肾上腺皮质激素和糖皮质激素释放增多，并引起一系列全身反应以抵抗有害刺激；动物在受到捕食者威胁时，往往会因为恐惧情绪而逃避，或者使用咆哮等愤怒情绪来吓退捕食者等。

树鼩对环境变化和危害事件反应敏感。我们还发现，树鼩对电击、频闪光等物理性刺激反应强烈。将树鼩置于穿梭箱内，用0.7mA的弱电刺激足底，树鼩表现出跳跃、撞击四壁、来回穿梭逃避电击等行为。多次经历不可控、不可逃避的电击刺激后，树鼩表现出穿梭次数下降、逃避失败或放弃逃脱，即习得性无助行为。

树鼩对外界环境的变化极为敏感。外界不确定性刺激或陌生环境，容易使树鼩产生焦虑、抑郁样行为，例如，拒饮绝食。在实验室环境中也表现得极为明显。我们的研究结果表明，树鼩对陌生环境适应很慢，即使多次暴露于与居住环境相似的环境，其觅食动机仍然会被抑制（图9–11）。Abbas Khani等对新颖物体辨别学习模式，发现新环境的应激会影响动物的物体辨别学习能力[17, 18]，Ohl等人也发现单次社会应激就可以抑制树鼩的空间学习能力[20]。

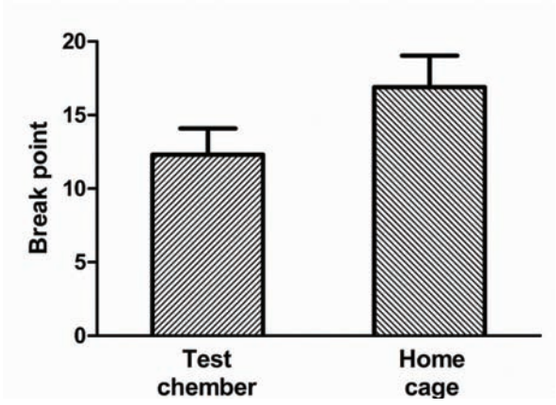



**图9–11 树鼩在居住环境与新环境的觅食动机比较**

树鼩具有较强的领地意识，因此对社会争斗反应敏感。我们研究表明，两只雄性树鼩处于同一笼中，会为争夺领地而发生争斗。经历多次打斗后，失败者会出现糖水偏爱水平下降或觅食动机降低等行为，表现为快感缺失和动机缺乏等抑郁样行为反应。Fuchs等人也发现，经历多次社会争斗应激后，树鼩表现出自发活动下降、领地标记行为减少、修饰行为减少及睡眠节律失调等抑郁样行为[23]。

树鼩高应激反应可能与下丘脑–垂体–肾上腺轴（HPA轴）与海马活动调控有关。HPA轴活性增强，使糖皮质激素分泌增多，以动员机体参与应对应激。而糖皮质激素过多，可对海马神经元造成毒性作用。已有结果发现，慢性社会应激使树鼩HPA轴活性功能持续亢进，导致海马容积下降[23]，海马萎缩的比率与人类过度应激的状况相似（10%～15%）[24]。在应激相关受体活动的基因调控方面，树鼩的与人类的相似度达90%～98%，而大鼠仅在80%左右，包括糖皮质激素、促肾上腺皮质激素释放激素（CRF）及α-2A肾上腺素等受体[25]。同时，树鼩糖皮质激素以皮质醇为主，与人类相同，这些特征提升了树鼩作为研究应激反应机制的模式动物的可能性[4]。

## 第六节 昼夜节律

树鼩是昼行动物，主要在白天活动，活动的起始与栖息地昼夜长短相符，具有明显的昼夜节律。光照对其昼夜节律具有重要作用。松果体与光照和周期相关。松果体分泌的褪黑激素在调控树鼩昼夜节律方面具有很重要作用。研究显示，社会应激可以使被攻击动物晨尿中褪黑激素急速上升，伴有快速眼动比率下降，睡眠时间减少，导致昼夜节律的改变[26]。

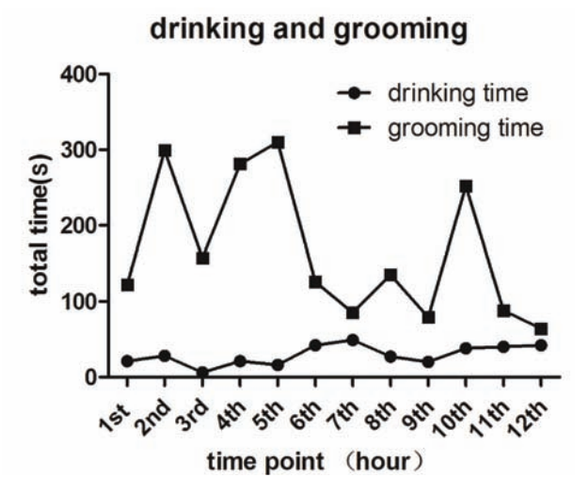



**图9–12 树鼩光周期期间的活动性**

树鼩每天的活动节律呈双峰型，清晨后和黄昏前的2～3个小时为活动高峰期。我们实验室发现树鼩修饰行为也表现出双峰型（图9–12）。昼夜节律紊乱尤其是光周期的缩短严重影响树鼩的行为。还有研究显示，与16小时光照相比，低光照8小时可以导致机体紊乱，能量摄入不足。但是血浆内瘦素（leptin）与褪黑激素没有明显变化[27]。

视交叉上核（suprachiasmatic nucleus, SCN）在维持机体昼夜节律活动中起重要作用。SofroniewMv等[31]发现SCN通过视网膜获得光信息并准确地将其传给动物的昼夜活动节律调节系统，使其接受光导引，从而使动物活动同步于自然昼夜环境[28]。树鼩SCN如何与视网膜上的视锥细胞相互作用调节昼夜节律的机制目前尚不明确。

### 参考文献

[1]Xu L, Zhang Y, Liang B, et al. Tree shrews under the spot light: emerging model of human diseases. Zool Res, 2013, 34(2): 59-69.

[2]杨文光，罗裕群，张沧人，等．中缅种树鼩脑的研究．广西医科大学学报，1990，7（1）：22–6.

[3]Ranc V, Petruzziello F, Kretz R, et al. Broad characterization of endogenous peptides in the tree shrew visual system. J Proteomics, 2012, 75(9): 2526-35.

[4]Michaelis T, De Biurrun G, Watanabe T, et al. Gender-specific alterations of cerebral metabolites with aging and cortisol treatment. J Psychiatr Res, 2001, 35(4): 231-7.

[5]Wang S, Shan D, Dai J, et al. Anatomical MRI templates of tree shrew brain for volumetric analysis and voxel-based morphometry. J Neurosci Meth, 2013, 220(1): 9-17.

[6]Caspi A, Sugden K, Moffitt TE, et al. Influence of life stress on depression: moderation by a polymorphism in the 5-HTT gene. Science, 2003, 301(5631): 386-9.

[7]Cryan JF, O'Leary OF, Jin SH, et al. Norepinephrine-deficient mice lack responses to antidepressant drugs, including

selective serotonin reuptake inhibitors. P Natl Acad Sci USA, 2004, 101(21): 8186-91.
[8]Herculano-Houzel S. Coordinated scaling of cortical and cerebellar numbers of neurons. Front Neuroanat, 2010, 4: 12.
[9]徐林，蔡景霞．树鼩大脑前额叶皮质结构和功能．动物学研究，1989，10（S1）：167–72.
[10]Yang LM, Hu B, Xia YH, et al. Lateral habenula lesions improve the behavioral response in depressed rats via increasing the serotonin level in dorsal raphe nucleus. Behav Brain Res, 2008, 188(1): 84-90.
[11]Foelix RF, Kretz R, Rager G. Structure and postnatal development of photoreceptors and their synapses in the retina of the tree shrew (*Tupaia belangeri*). Cell Tissue Res, 1987, 247(2): 287-97.
[12]Winter C, Vollmayr B, Djodari-Irani A, et al. Pharmacological inhibition of the lateral habenula improves depressive-like behavior in an animal model of treatment resistant depression. Behav Brain Res, 2011, 216(1): 463-5.
[13]Rice MW, Roberts RC, Melendez-Ferro M, et al. Neurochemical characterization of the tree shrew dorsal striatum. Front Neuroanat, 2011, 5: 53.
[14]马原野，田云芬，蔡景霞．树鼩应激镇痛的研究．动物学研究，1986，7（4）：317–24.
[15]Vollmayr B, Bachteler D, Vengeliene V, et al. Rats with congenital learned helplessness respond less to sucrose but show no deficits in activity or learning. Behav Brain Res, 2004, 150(1): 217-21.
[16]张庆余，范晓娜，曹毅．正常猕猴与树鼩神经系统和免疫系统组织中大麻素与阿片受体的表达．动物学研究，2011，32（1）：31–9.
[17]Khani A, Rainer G. Recognition memory in tree shrew (*Tupaia belangeri*) after repeated familiarization sessions. Behav Process, 2012, 90(3): 364-71.
[18]周志华，韩咏竹．抑郁症动物模型的研究进展．安徽医学，2008，2（29）：211–3.
[19]王静，周启心，吕龙宝，等．社会竞争失败病因学的抑郁症树鼩模型．动物学研究，2012，33（1）：92–8.
[20]Ohl F, Oitzl MS, Fuchs E. Assessing cognitive functions in tree shrews: visuo-spatial and spatial learning in the home cage. J Neurosci Meth, 1998, 81(1-2): 35-40.
[21]Ohl F, Fuchs E. Differential effects of chronic stress on memory processes in the tree shrew. Cognitive Brain Res, 1999, 7(3): 379-87.
[22]Magarinos AM, McEwen BS, Flugge G, et al. Chronic psychosocial stress causes apical dendritic atrophy of hippocampal CA3 pyramidal neurons in subordinate tree shrews. J Neurosci, 1996, 16(10): 3534-40.
[23]Morris J, Smith K, Cowen P, et al. Covariation of activity in habenula and dorsal raphe nuclei following tryptophan depletion. Neuroimage, 1999, 10(2): 163-72.
[24]Lupien SJ, De Leon M, De Santi S, et al. Cortisol levels during human aging predict hippocampal atrophy and memory deficits. Nat Neurosci, 1998, 1(1): 69-73.
[25]Fuchs E. Social stress in tree shrews as an animal model of depression: an example of a behavioral model of a CNS disorder. Cns Spectrums, 2005, 10(3): 182-90.
[26]Hikosaka O. The habenula: from stress evasion to value-based decision-making. Nat Rev Neurosci, 2010, 11(7): 503-13.
[27]Zhang L, Zhu W, Wang Z. Role of photoperiod on hormone concentrations and adaptive capacity in tree shrews, *Tupaia belangeri*. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol, 2012, 163(3-4): 253-9.
[28]苏兆虞．损毁视交叉上核对树鼩（*Tupaia Belangeri*）近似昼夜运动性活动节律的影响．四川生理科学杂志，1989，3：125.
[29]杨文光．中缅树鼩、广西猕猴脑立体定位图谱．南宁：广西科学技术出版社，1990：4–5.
[30]匡培梓，张武田，蔡景霞，等．树鼩视觉辨别能力的测量方法．生理心理学第三节学术讨论会论文集，1984：67–70.
[31]Sofroniew M, Weindl A. Vertebrate circadian systems. Berlin: Springer Berlin Heidelberg, 1982: 75-86.



# 第十章

第一篇树鼩基础生物学
TREE SHREW BASIC BIOLOGY

Tree shrews

# 树鼩情绪相关脑区肽能神经元分布

倪荣军　舒愉棉　罗鹏昊　周江宁

众所周知，与情绪相关的脑区主要包括边缘系统、内侧前额叶和下丘脑等[1~3]，本章重点描述树鼩下丘脑、内侧前额叶、扣带回皮层、杏仁核、海马、隔区、终纹床核等前脑区的解剖结构，以及加压素、催产素、血管活性肠肽、促肾上腺皮质激素释放激素、神经肽Y等肽能神经元在这些前脑区的分布特点。

## 第一节　树鼩情绪相关脑区的解剖结构

### 一、下丘脑（hypothalamus）

下丘脑是调节情绪、应激、摄食、节律、性别分化等重要认知功能和行为的中枢系统[4]。下丘脑位于大脑腹部、丘脑下方，从头端到尾端一般可分为三部分：视交叉或视前区、结节区和乳头体区[4, 5]。图10-1所示下丘脑从头端到尾端的连续冠状切面：

#### （一）视交叉或视前区（chiasmatic or preoptic region）

包括视上核、视交叉上核、室旁核等结构。

视上核（supraoptic nucleus, SON）紧密包围着视束，在尼氏染色中能看到着色很深的月牙状或长条状区域，含有许多大细胞，前后轴长约2.9mm。视上核分布在视束两端（背部、外侧、腹外侧），在结节部的视交叉后视上核则分布在视束背部和内侧。

视交叉上核（suprachiasmatic nucleus, SCN）位于视交叉上方、第三脑室底部两侧，呈椭圆形的区域，尼氏染色稍深，前后轴长约0.7mm。

室旁核（paraventricular nucleus, PVN）顾名思义，位于第三脑室旁侧，沿着第三脑室中部和上部，尼氏染色较深，含有许多大细胞和小细胞，故分为大细胞部和小细胞部，下丘脑室旁核冠

状切面呈羽翼样形状，前后约1.2mm。

### （二）结节区（tuberal region）

包括下丘脑背内侧核、下丘脑腹内侧核、弓状核等结构。

下丘脑背内侧核（dorsomedial hypothalamic nucleus, DMH）位于下丘脑背部、第三脑室顶部附近，尼氏染色切片上未见明显边界。

下丘脑腹内侧核（ventromedial hypothalamic nucleus, VMH）位于下丘脑腹部、第三脑室旁，尼氏染色显示细胞较为密集，但无明显边界。

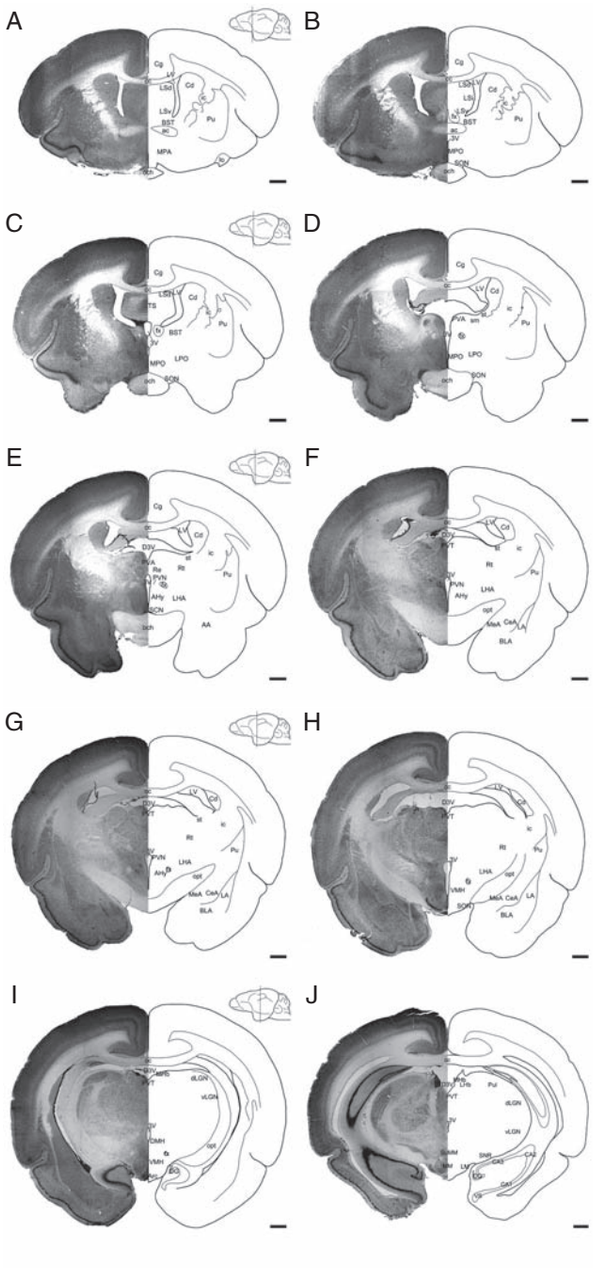



**图10–1　中缅树鼩下丘脑从头端到尾端的核团结构示意图（A–J）**
左半侧为尼氏染色图，右半侧为脑结构图，中央插图为脑侧视图。标尺：1mm（A–J）。（字母缩写详见附录）

弓状核（arcuate hypothalamic nucleus, Arc）位于第三脑室底部、下丘脑腹部边缘，尼氏染色显示细胞较为密集。

### （三）乳头体区（mamillary region）

包括乳头体核、乳头上核等结构。

乳头体核（mamillary nucleus, MN）位于下丘脑后部、大脑腹部，形状如乳头样突起。乳头体核又细分为乳头体内侧核和外侧核，尼氏染色显示细胞呈不均匀分布。

乳头上核（supramamillary nucleus, SuM）位于乳头体核背部，同样分为内侧核和外侧核。

## 二、内侧前额叶（medial prefrontal cortex）和扣带回皮层（cingulate cortex）

前额叶和扣带回是认知、记忆、情绪、决策、社会等级等重要的调节中枢[6~9]。

前额叶和扣带回与其它相邻皮层连接紧密，在尼氏染色和AChE染色图中无明显的分界线。

内侧前额叶（medial prefrontal cortex, mPFC）位于大脑前额背部内侧，靠近双侧大脑半球中线。（图10–2A）

扣带回皮层（cingulate cortex, Cg）根据位置分为前扣带回皮层和后扣带回皮层，位于胼胝体背内侧，靠近双侧大脑半球中线。（图10–1）

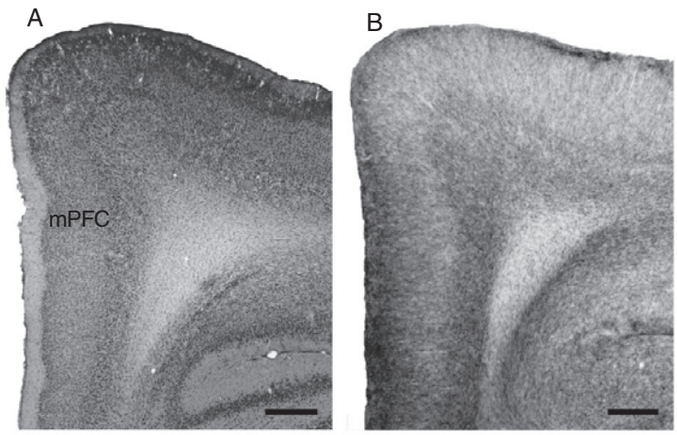



**图10–2　中缅树鼩内侧前额叶（mPFC）尼氏染色（A）和乙酰胆碱酯酶染色（B）图**
标尺：500 μm（A、B）。

## 三、杏仁核体（amygdala）

如图10–1和图10–3所示，杏仁核体位于大脑腹部外侧、梨状皮层内侧和视束之间，参与恐惧、应激、焦虑、情绪记忆固化等过程[10~12]。Flugge等（1994）对中缅树鼩杏仁核体和其中的单胺能受体分布进行了详细的研究，把杏仁核体分为8个主要的分区：杏仁前区、外侧嗅束核、杏仁中央核、杏仁内侧核、杏仁外侧核、基底核（大细胞部和小细胞部）、基底附核和杏仁皮质，在解剖上与灵长类比较相似。杏仁前区（anterior amygdaloid area, AA）与无名质之间无明显的边界，尼氏染色较淡，细胞排列紧密，头尾端长3.2mm，无乙酰胆碱酯酶（AChE）阳性结构；外侧嗅束核前后0.7mm，AChE阳性染色强烈；杏仁中央核前后1.1mm，近似球形，AChE染色微弱，

因AChE阳性纤维束围绕着中央核，其外侧和腹侧边界明显；杏仁内侧核前后1.4mm，位于视束腹外侧，与杏仁前区无明显边界，中度AChE染色；杏仁外侧核前后2mm，冠状切面上近似三角形结构，其背部顶端位于壳核和屏状核之间，背外侧与外囊相连，中度到强烈的AChE染色；杏仁基底核前后2.3mm，是AChE染色最深的部位。

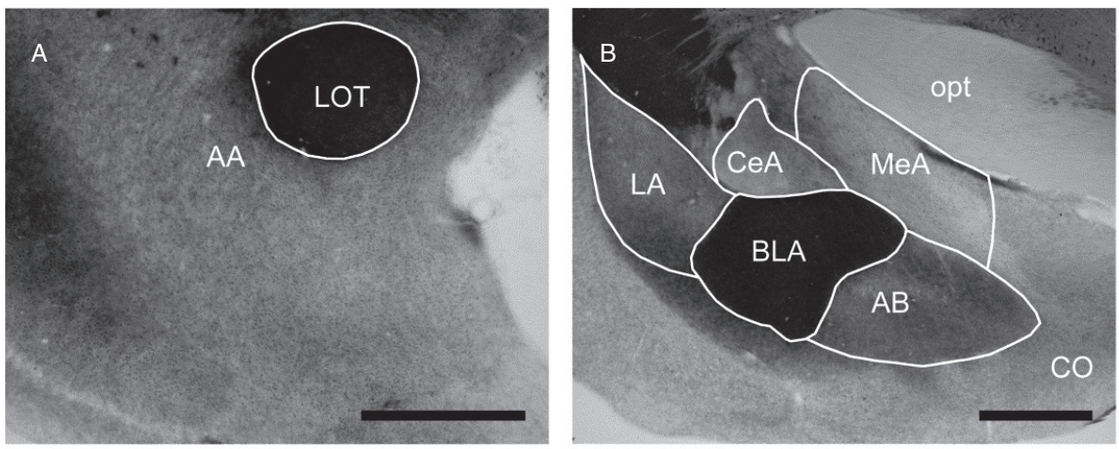



**图10–3　中缅树鼩杏仁核体前部（A）和中部（B）中乙酰胆碱酯酶染色图**
白线为部分核团轮廓示意图，标尺：1000 μm（A、B）。（字母缩写详见附录）

## 四、海马结构（hippocampal formation）

海马作为大脑边缘系统中非常重要的结构之一，参与了学习、空间记忆、焦虑、应激等过程[14~16]，因形状似“海马”而得名。Jeanine等（2003）描述了中缅树鼩的海马形状如“C”，位于新皮层之下，与相比大鼠，海马长轴倾斜约70°，在冠状切面上观察到海马腹部结构先于背部出现，这与啮齿类正好相反。如图10–4所示，海马结构一般分为齿状回、海马本体和下托[18]。

齿状回（dentate gyrus, DG）齿状回形状如箭镞，尖端指向内侧，齿状回的两端靠近CA3一端。由分子层、颗粒细胞层和多形细胞层构成。

海马本体（hippocampus proper, Hipp）是海马的主要结构，可分为CA3、CA2和CA1三个分区。在海马前端，这3个区域是相连接的整体；在海马中部，齿状回包裹着CA3区，从而把CA3从CA2和CA1中分离开来，在尼氏染色中CA2和CA1之间分界不明显；在海马后部可见齿状回内侧有明显的沟回结构，且向内卷，CA3结构慢慢消失。海马本体由起层、锥体层、透明层、辐射层和腔隙层等层状结构组成。

下托（subiculum, SUB）根据位置可分为背部下托（dorsal subiculum, DS）和腹部下托（ventral subiculum, VS）。腹部下托先于背部下托出现，下托与CA1区和皮层相连接。在尼氏染色图片中，可见下托中的细胞密度低于齿状回的颗粒细胞层和海马锥体层的细胞密度，但高于其它分层。

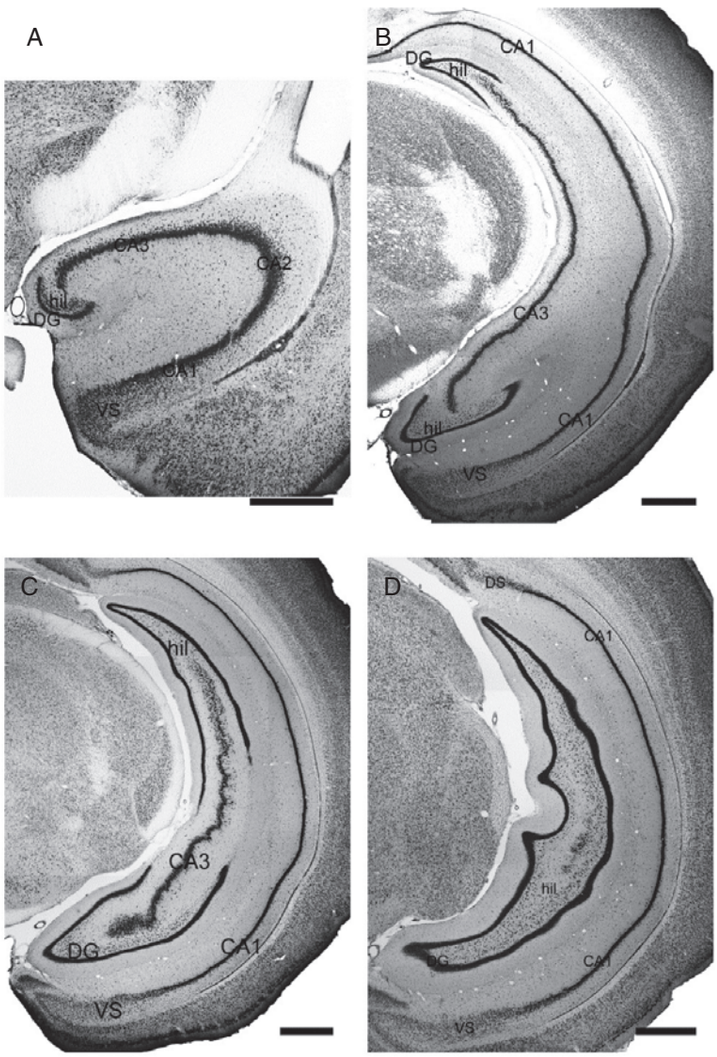



**图10–4　中缅树鼩海马结构从头端到尾端的尼氏染色图（A–D）**
标尺：1mm（A–D）。（字母缩写详见附录）

## 五、隔区（septal region）

隔区位于左右侧脑室之间、胼胝体下方，与胼胝体有明显界限。隔区分为三角隔核、内侧隔核和外侧隔核，外侧隔核又分为背部、中间部和腹部。

三角隔核（triangular septal nucleus, TS）位于隔核后部中央位置，尼氏染色较深。

内侧隔核（medial septal nucleus, MS）位于隔核腹部内侧。

外侧隔核（lateral septal nucleus, LS）紧靠侧脑室，背部位于侧脑室内侧、胼胝体腹侧，中间部位于侧脑室中部内侧，腹部位于侧脑室腹侧根部。

## 六、终纹床核（bed nucleus of the stria terminalis）

终纹床核（bed nucleus of the stria terminalis, BST）位于侧脑室下方、前连合和内囊周围，分

前部和后部。

终纹床核前部位于侧脑室下方、前连合背侧、外侧和腹侧，尼氏染色切片上与前连合界限明显，细胞分布均匀。

终纹床核后部位于侧脑室下方、内囊内侧，呈狭长结构。

## 第二节 树鼩情绪相关脑区中肽能神经元分布

哺乳动物脑内含有多种肽能神经元，如加压素、催产素、促肾上腺皮质激素释放激素、血管活性肠肽、神经肽Y等，它们在脑内分布各有特点，通过各自的受体，参与调节抑郁和焦虑等情绪行为、社会行为、节律行为、成瘾行为、摄食行为等[19~23]。大量研究结果显示，这些神经多肽或其受体的水平发生异常变化或紊乱都会引起相应的行为异常或疾病[24~27]。同样，在树鼩脑内也分布着这些肽能神经元，它们发挥着不同的行为效应，共同协调完成动物对环境的适应。

### 一、加压素神经元在情绪相关脑区中分布

#### （一）前　言

在哺乳动物中枢神经系统中，加压素调节着许多动物行为，如亲代抚育、配偶选择、性行为、等级支配、攻击行为和情绪相关的行为[28，29]。加压素是下丘脑产生的一种多肽，主要由下丘脑室旁核、视上核和视交叉上核合成[30，31]，从这些核团发出的投射纤维穿过正中隆起到垂体后叶，参与调节下丘脑–垂体–肾上腺轴的活动[32，33]。此外，加压素阳性细胞和纤维在视交叉上核中也存在[34]，视交叉上核发出的加压素阳性纤维穿过下丘脑室旁下带延伸至室旁核[35，36]，这种投射关系被认为是许多激素节律性的结构基础。然而，不容忽视的是，人类昼行夜伏，而由夜行性动物获得的实验数据应该在昼行性动物上进行验证[37]。加压素也在终纹床核、杏仁核、下丘脑视前区和下丘脑前区中产生[32，38]。在大鼠脑内，从终纹床核和杏仁内侧核到外侧隔核的加压素阳性纤维投射已有研究报道[39，40]。而外侧隔核加压素神经纤维分布具有性别差异，即雄性较雌性具有更多的神经纤维分布，也是脊椎动物大脑性别差异中最稳定的特性之一，参与调节复杂社会行为和情绪相关行为等[29，41，42]。加压素是通过其受体来发挥作用的，加压素受体是G蛋白偶联型受体，有多种亚型：V1R（或V1a）、V2R和V3R（或V1b）[43]。V1R存在于大鼠肝脏、血管平滑肌细胞、肾髓质等外周组织中，以及海马、杏仁中央核、背外侧隔核、下丘脑外侧区、视交叉上核、下丘脑背内侧核、下丘脑腹内侧核、弓状核、孤束核、下橄榄核等脑组织中；V2R在成年大鼠肾脏中表达，在新生脑组织内也有mRNA的表达；V3R在大多数脑垂体促肾上腺皮质素细胞中表达，也在脑组织和肾脏、胸腺、心脏、肺、脾脏、子宫等外周组织中表达[43，44]。

#### （二）结果与讨论

有报道显示树鼩的下丘脑室旁核、视上核、外侧核、穹窿周核和脑脚袢等存在加压素能神经元[45，46]。我们发现加压素能神经元和纤维在树鼩下丘脑及其它脑区有大量分布，特别是下丘脑室

旁核、视上核和视交叉上核（图10–5）[47]。通过上述加压素能神经元和纤维在树鼩脑内分布特性的研究，显示加压素在树鼩脑内的分布与其它哺乳类动物基本一致[32, 33]。在下丘脑中，加压素能神经元主要集中在室旁核和视上核，且多数为大细胞性的神经元（图10–6）。室旁核头端处于背侧第三脑室的附近，含有少量阳性细胞；而在室旁核中部，加压素能神经元的数目沿第三脑室激增；室旁核尾端位于第三脑室背侧边缘，并且向两侧水平展开，加压素能神经元主要集中于室旁核外侧，内侧只有少量的阳性神经元。在视上核内，加压素能神经元在视束背侧、背外侧和/或腹外侧边缘聚集成团。在后交叉视上核中，一组深染细胞沿下丘脑腹侧面分布在视束背部或内侧边缘。除此之外，视交叉上核是下丘脑中又一处高密度表达加压素的脑区，根据细胞大小应为小细胞性的神经元（图10–7）。在视交叉上核头端，少数加压素能神经元处于视交叉背侧，随着冠状切面位置向后推移，视交叉上核背侧和内侧有更多成团的加压素能神经元，从而在视交叉上核内侧和背侧形成一个中心无加压素能神经元的空心壳结构。在视交叉上核尾端，加压素能神经元则绕在空心壳的背侧、内侧和腹侧形成弓状分布。我们证明了树鼩的视交叉上核含有小细胞性加压素能神经元及其纤维。然而，Yuqun Luo等（1995）报道树鼩视交叉上核中并未发现加压素能神经元，而我们的结果与Weindl等（1981）和Sofroniew等（1981）报道的结果一致。另外，在树鼩视交叉上核中有深染的加压素细胞和浅染的纤维，而在啮齿类和人类的视交叉上核中细胞和纤维都非常密集[49, 50]，可能视交叉上核中加压素纤维在不同物种中分布不同，因为视交叉上核是节律中枢，所以也可能是由于取材时间的差异造成的，还需要进一步验证。除室旁核、视上核和视交叉上核外，下丘脑附属区域也散布中度染色的分泌型大细胞加压素能神经元，如下丘脑前区、下丘脑外侧区、穹窿周核及终纹床核，从室旁核、视上核和视交叉上核发出的加压素能神经纤维穿过这些核团。此外，阳性胞体还散布于下丘脑其它核团，如下丘脑内侧视前区、外侧视前区、室周核和室旁下带，且在下丘脑背内侧核有极少量加压素能神经元胞体。除下丘脑区域外，加压素能神经元也分布在穹窿、侧脑室和内囊周围的终纹床核、终纹以及位于视束腹外侧的杏仁内侧核。有意思的是，杏仁内侧核不仅含有浅染小细胞，也发现了深染大细胞。杏仁内侧核中加压素免疫反应阳性细胞分布特点有所不同。没有接受过任何处理（如秋水仙素）的树鼩的杏仁内侧核中偶尔也能观察到加压素阳性细胞，而用秋水仙素预处理的大鼠才能在杏仁内侧核中观察到大量加压素细胞[51]，猴的杏仁内侧核中加压素能神经元细胞数量远低于秋水仙素预处理大鼠[33]，而在裸鼹鼠和人类的杏仁内侧核则完全缺乏加压素细胞[52, 53]。因此，树鼩杏仁内侧核的加压素分布特性与猴和人类有相似之处，且能够观察到的加压素能神经元既有大细胞也有小细胞，这与只能在该区域观察到小细胞的大鼠杏仁内侧核可能是不同的[51]。啮齿类在终纹缺乏加压素阳性细胞[49]，而树鼩中则被检测出加压素阳性细胞，这个结果和之前猴子中的报道结论是相同的[38, 54]。

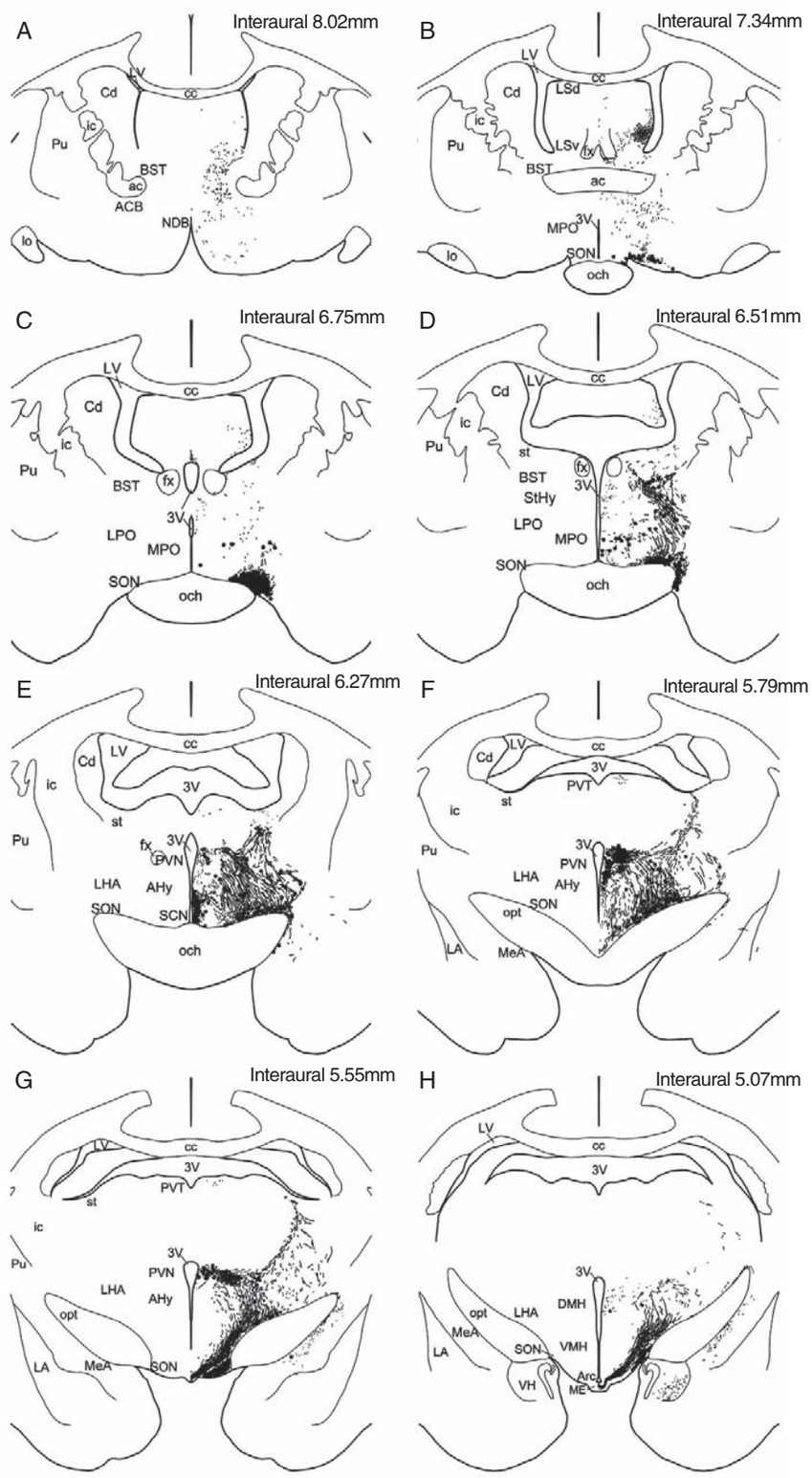



**图10–5　加压素阳性神经元和纤维在树鼩下丘脑及其它脑区从前到后的分布示意图（不包括大脑皮层结构）**

左半侧为脑区命名，右半侧为加压素免疫阳性反应区域。圆点表示阳性细胞体，线条表示阳性纤维，圆点和线条的密度反映阳性染色的相对密度。（字母缩写详见附录）[47]

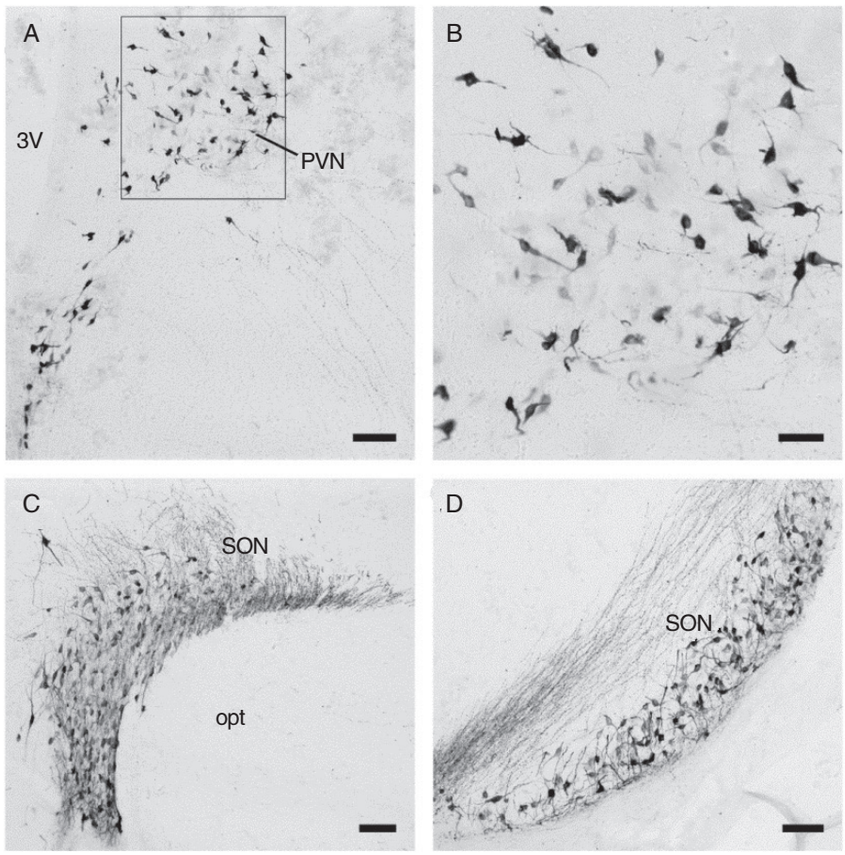



**图10–6 （A）加压素阳性神经元和纤维在下丘脑室旁核（PVN）中的分布；（B）A图中线框内放大图；加压素阳性神经元和纤维在下丘脑视上核（SON，C）和后交叉视上核（D）中的分布**

标尺：（A、C、D）100 μm；（B）40 μm。

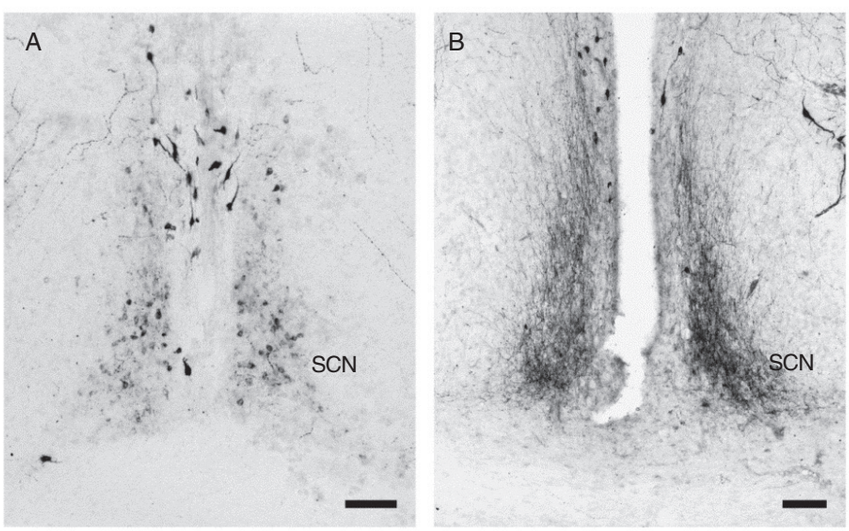



**图10–7 加压素阳性神经元和纤维在树鼩（A）和大鼠（B）中下丘脑室视交叉上核（SCN）中的分布**

标尺：（A、B）100 μm。

加压素能神经纤维在下丘脑及其它脑区都有分布并形成网络。首先，所有加压素能神经纤维含有均一尺寸的膨体（直径约1～2μm）。在下丘脑中，高密度的中等直径神经纤维从室旁核和视上核向正中隆起投射并穿过其内区，而正中隆起外区也含有低密度的细纤维。其次，室旁核含有向终纹背外侧延伸的粗神经纤维。而在下丘脑前区和外侧区中，有一束中等直径纤维起源于视上核，沿着背侧拱起的弓形轨迹穿过内囊向终纹延伸。此外，细和/或中等直径加压素能神经纤维也在下丘脑内侧视前区和外侧视前区有分布。沿着第三脑室，视交叉上核中浅染的纤维向背侧延伸进入室旁下带和室周核，然后进入室旁核。在下丘脑外区域，细纤维在终纹床核、斜角带核、腹侧海马和缰外侧核均能观察到。在终纹床核前部、前连合背侧，许多纤维似乎向腹外侧隔核投射。在终纹床核后部，这些纤维向背侧终纹投射，然后向外侧投射进入杏仁核。在检测的每一只雄性树鼩样本的腹外侧隔核中都能检测到密集成簇的细加压素能神经纤维，而在检测的5只雌性样本中中只有一例发现在腹外侧隔核有低密度细纤维，而其它雌性样本该区域几乎不含阳性纤维。在大鼠脑内，外侧隔核和缰外侧核受终纹床核和杏仁内侧核神经支配[39，40]。因此，树鼩加压素系统的其它部分例如终纹床核可能部分代替了杏仁内侧核缺失的加压素能神经元的功能。有意思的是，加压素免疫特性在树鼩腹外侧隔核具有性别二态性：在雄性的腹外侧隔核中能检测到高密度的加压素阳性纤维，而在雌性中则极少或不存在。斑鬣犬中获得的实验结果与上述相反，其腹外侧隔核中加压素阳性纤维密度没有性别差异[32]。隔核加压素能神经支配在父性行为包括幼崽理毛、保护、接触和衔回等有重要作用[55]。外侧隔核在金黄地鼠侧翼标记行为中起关键作用[56]。此外，腹侧海马的加压素阳性纤维是由杏仁内侧核中加压素细胞发出并且穿过杏仁核–海马过渡区投射过来的，这一结构联系通过腹侧海马处注射逆向追踪剂得以证明[39]。

### （三）结语与展望

这些数据证实了加压素能神经细胞和纤维在树鼩下丘脑及其它脑区的定位以及神经支配的联系。结果显示，树鼩下丘脑的加压素分布与人类和啮齿类相似，但这些神经肽在杏仁核的免疫反应活性与在啮齿类上观察的不一致。目前仍不清楚树鼩脑内加压素分布与其生理和行为过程有何关联，未来需要进一步精细调控加压素能神经环路的兴奋或抑制来研究其对树鼩等级行为、攻击行为等的影响，以及揭示加压素通过其受体来发挥作用的分子机制，并比较其与灵长类和啮齿类加压素能系统的异同。

## 二、催产素神经元在情绪相关脑区中分布

### （一）前　言

中枢神经系统中的神经肽——催产素在灵长类和啮齿类动物中的分布已有极为详尽的研究[45，57]。与加压素一样，催产素同样在亲代抚育、配偶选择、性行为、等级支配和情绪调节等行为中起重要作用[29，58]。在哺乳类动物研究中发现，催产素主要由下丘脑室旁核和视上核合成，而从这些核团发出的催产素免疫阳性纤维穿过正中隆起投射到垂体后叶[33，59]。此外，催产素也能够由终纹床核、杏仁核和下丘脑前区等产生[32，38]。催产素的神经递质功能是通过其受体来介导的，催产素受体在子宫、乳腺等外周组织以及脑组织中表达，由于加压素和催产素对催产素受体有相似的亲和性，故催产素受体可以认为是神经垂体素的非选择性受体[43]。

## （二）结果与讨论

有报道显示树鼩的下丘脑室旁核和视上核存在大量催产素能神经元[45，46]。除了这些核团，我们观察到下丘脑其它区域和其它脑区也散在着一些催产素阳性细胞和纤维。催产素免疫阳性神经元和纤维在树鼩下丘脑及其它脑区的分布如图10–8所示[47]。根据催产素细胞和纤维在树鼩下丘脑的分布特性可知催产素在树鼩下丘脑中的分布与其它已报道哺乳类动物一致[33，59]。催产素细胞主要集中在下丘脑室旁核和视上核（图10–9）。下丘脑室旁核的两端含有少量催产素细胞，而在室旁核中部，高密度的催产素细胞分布于沿着第三脑室分布，且更靠近脑室背侧顶端。在视上核中，大量催产素阳性神经元沿下丘脑腹侧表面环绕视束的背侧、外侧和内侧分布。在视交叉上核中没有发现催产素阳性神经元，位于视交叉上核内侧和背侧方向的下丘脑室旁下带中发现有中等数量催产素阳性神经元（图10–10）。除以上提及区域，催产素阳性细胞还分布于下丘脑其它区域，诸如穹窿周核、下丘脑前区、下丘脑外侧区、内侧视前核、外侧视前核、下丘脑室周核以及下丘脑背内侧核。在下丘脑外区域也含有催产素细胞，如位于侧脑室腹侧的终纹床核和终纹处含有少量阳性细胞。然而，在下丘脑背内侧核和终纹中只是偶尔能够观察到催产素阳性细胞的存在，这可能是由于取材前动物没有用秋水仙素处理的缘故。

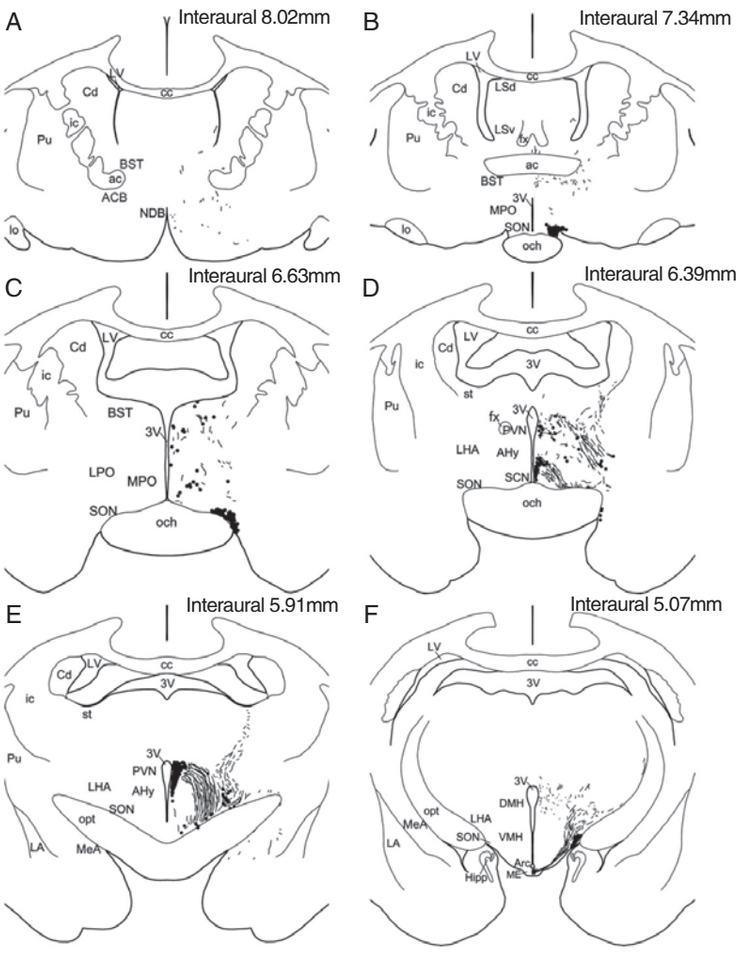



**图10–8　催产素阳性神经元和纤维在树鼩下丘脑及其它脑区从前到后的分布示意图（不包括大脑皮层结构）**

左半侧为脑区命名，右半侧为催产素免疫阳性反应区域。圆点表示阳性细胞体，线条表示阳性纤维，圆点和线条的密度反映阳性染色的相对密度。（字母缩写详见附录）[47]

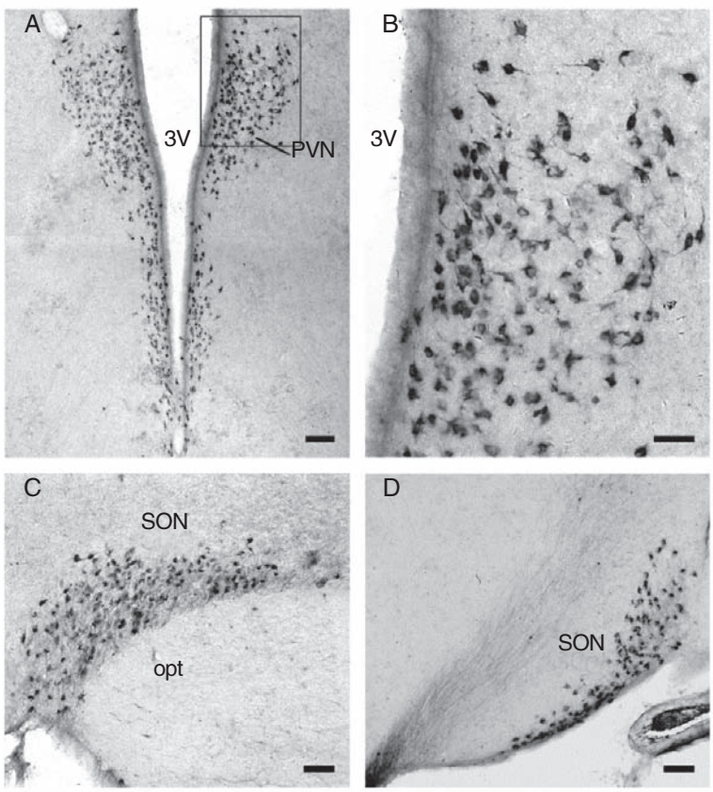



**图10–9 （A）催产素阳性神经元和纤维在下丘脑室旁核（PVN）中的分布；（B）A图中线框内放大图；催产素阳性神经元和纤维在下丘脑视上核（SON, C）和后交叉视上核（D）中的分布**

标尺：（A、C、D）100 μm；（B）40 μm。

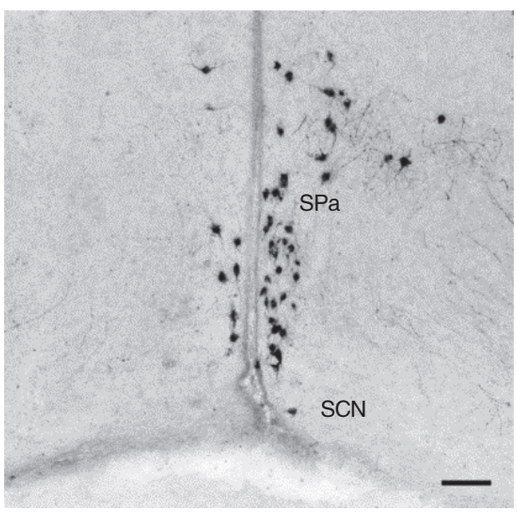



**图10–10 催产素阳性神经元和纤维在树鼩下丘脑室旁下带（SPa）中的分布**

标尺：50 μm。

从下丘脑视上核发出的中等直径催产素神经纤维与从下丘脑室旁核发出的纤维汇合并向腹侧正中隆起和背外侧终纹投射。中等密度的中等直径催产素神经纤维可见于穹窿周核、下丘脑前区、下丘脑外侧区、内侧视前核、外侧视前核、下丘脑室周核以及下丘脑背内侧核。其次，少量催产素阳性纤维可见于伏核、终纹床核、终纹和杏仁核皮层后外侧区。树鼩和大鼠在下丘脑外区域催产素的免疫反应阳性也存在一些差异。例如，同样在杏仁内侧核，树鼩只有稀疏的催产素阳性纤维，而大鼠既有阳性纤维又有阳性细胞[59]。另外，啮齿类在终纹未检测到催产素阳性细胞[59]。而树鼩终纹含有催产素细胞，和猴中的研究结果是相近的[38，54]。

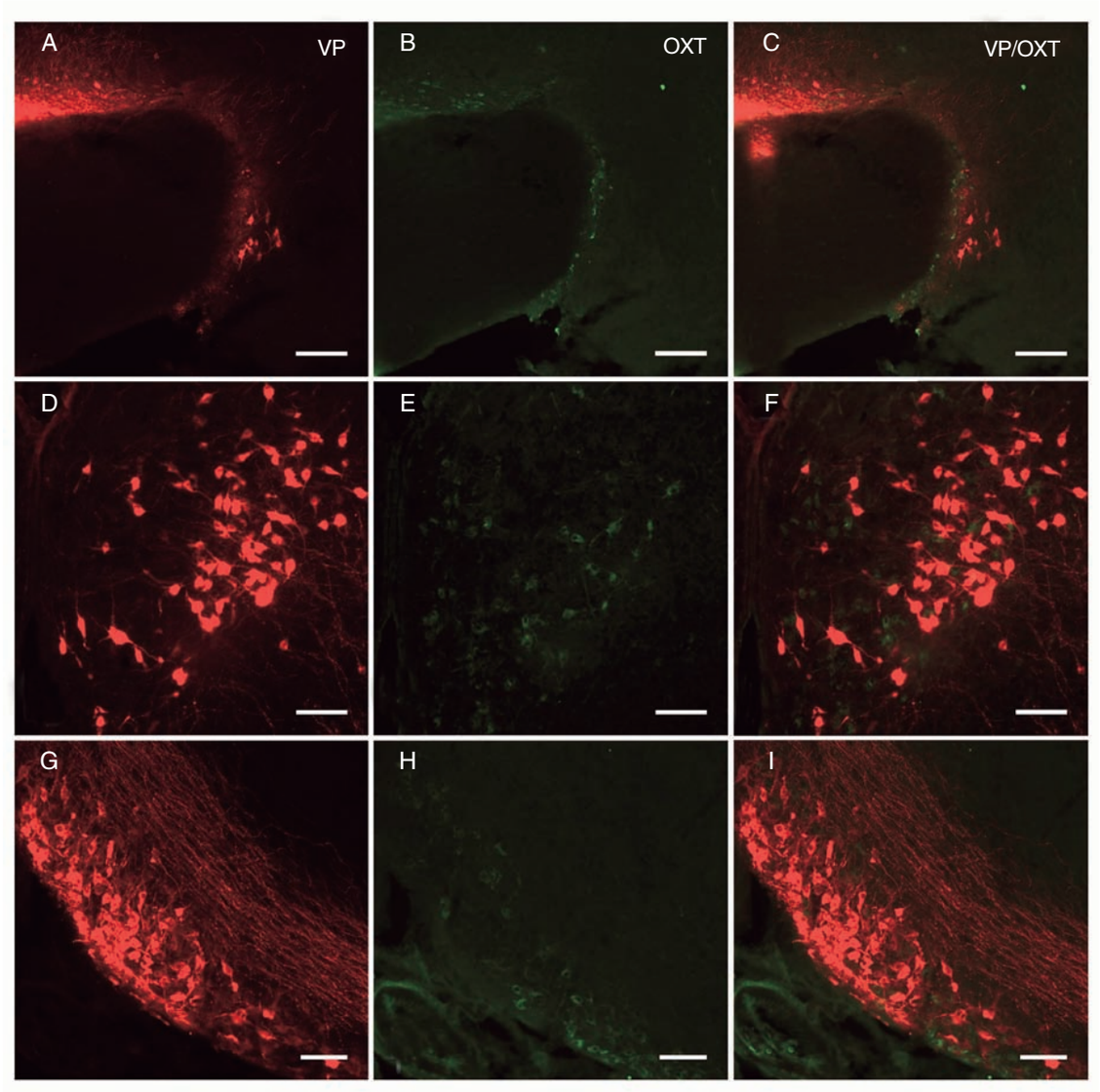



**图10–11 （A）加压素和催产素在下丘脑视上核（SON, A–C）、室旁核（PVN, D–F）和交叉后视上核（G–I）中不共存。（A、D、G）加压素荧光染色（红色）在视上核、室旁核和交叉后视上核中的分布。（B、E、H）催产素荧光染色（绿色）在视上核、室旁核和交叉后视上核中的分布。（C、F、I）加压素和催产素荧光染色双标在视上核、室旁核和交叉后视上核中的分布**

标尺：（A–C）200 μm；（D–I）100 μm。

尽管单独观察加压素或者催产素能神经元和纤维会发现其在下丘脑室旁核和视上核中分布基本重叠，但同时使用抗加压素和催产素抗体荧光双标共染发现在下丘脑室旁核和视上核中并没有表现加压素和催产素共标的神经元存在（图10–11）。另外，加压素能神经元胞体明显比催产素能神经元胞体大一些。加压素与催产素无共表达的现象意味着，在正常树鼩脑内下丘脑室旁核和视上核处二者是由不同神经元产生的，并且有趣的是，在结构上这两种不同的肽能神经元并未有明显区域边界，而是混处同一区域，而这一现象同已报道的其它物种样本结果一致[59，60]。

### （三）结语与展望

我们了解了催产素能神经元和纤维在树鼩下丘脑及其它脑区的定位分布以及神经支配。虽然关于啮齿类和灵长类脑内催产素的研究报道很多，然而，目前仍不清楚树鼩脑内催产素的分布与其生理和行为过程有何关联，对于树鼩脑内加压素和催产素受体的基因序列及多肽结构也不清楚，催产素及其受体如何调节树鼩复杂的社会行为（如社会等级行为、亲社会行为、求偶行为等）更是需要回答的问题。

## 三、促肾上腺皮质激素释放激素神经元在情绪相关脑区中分布

### （一）前　言

促肾上腺皮质激素释放激素是一个41个氨基酸组成的多肽类神经递质[61]。促肾上腺皮质激素释放激素参与调控应激、焦虑、抑郁、酒精依赖行为等[62～64]。哺乳动物中，促肾上腺皮质激素释放激素主要在下丘脑室旁核小细胞性神经元中合成[65]，参与应激过程中下丘脑–垂体–肾上腺轴的活化[66]，这是通过促肾上腺皮质激素释放激素刺激垂体释放促肾上腺皮质激素，促肾上腺皮质激素再刺激肾上腺释放皮质激素（如糖皮质激素），糖皮质激素又可以反过来抑制促肾上腺皮质激素释放激素的产生[67]。此外，原位杂交的方法发现大鼠的视上核中含有促肾上腺皮质激素释放激素mRNA的表达，当毁损室旁核后，视上核中促肾上腺皮质激素释放激素mRNA的表达上升，这可能是代偿性的作用，说明视上核能够承担室旁核促肾上腺皮质激素释放激素神经元损毁后的部分功能[68]。此外，在终纹床核、杏仁中央核、中缝背核、蓝斑和大脑皮层中均有促肾上腺皮质激素释放激素阳性细胞和纤维存在[69，70]。

促肾上腺皮质激素释放激素需要其受体才能发挥效应，中枢神经系统内促肾上腺皮质激素释放激素受体主要分布在新皮层、嗅球和海马皮层，其次在隔核和杏仁核也有大量表达，在下丘脑内侧核、室旁核和正中隆起等神经分泌核团中表达量一般比较低，在脑垂体中有中度表达[71]。促肾上腺皮质激素释放激素受体可以分为：CRFR1和CRFR2两种亚型。Chalmers等（1995）研究发现CRFR1和CRFR2在核酸水平上的同源性达到70%。啮齿类中，CRFR1主要在新皮层、小脑和感觉中继结构中高表达，在垂体前和中叶中能稳定检测到CRFR1的表达；而CRFR2在外侧隔核、下丘脑腹内侧区和脉络丛中高表达，在嗅球、杏仁核体、下丘脑室旁核和视上核、下丘以及中脑五羟色胺相关脊核中中度表达，CRFR2还明显表达于终纹床核、海马结构和下丘脑前区和外侧区，但是在垂体中表达水平很低，所以CRFR1可能是主要的神经内分泌垂体CRF受体[72]。其实CRFR2有3种剪接变体：CRFR2α、CRFR2β和CRFR2γ。在啮齿类中，CRFR2α只存在于脑内，尤其是下丘脑、外侧隔核和嗅球中；CRFR2β似乎存在于中枢和外周中，尤其是心脏和骨骼肌中最高[73]，与啮齿类不同的是，人的CRFR2α和CRFR2β在外周器官和中枢神经系统中共表达[74]；目

前CRFR2γ只在人中发现，且只在脑中表达[75]。

关于树鼩的促肾上腺皮质激素释放激素及其受体已有少量研究报道。Kozicz等（2008）通过35天慢性社会心理应激模型，研究应激对树鼩下丘脑室旁核和杏仁中央核中促肾上腺皮质激素释放激素的影响，令人奇怪的是发现室旁核中，促肾上腺皮质激素释放激素阳性神经元数目和杏仁中央核中促肾上腺皮质激素释放激素阳性纤维密度都是降低的。然而，14天的社会应激后，从属雄性大鼠室旁核中促肾上腺皮质激素释放激素mRNA表达水平上升[76]，社会应激对室旁核中促肾上腺皮质激素释放激素的研究结果在不同动物中可能会截然相反，具体机制还不清楚。Palchaudhuri等（1998，1999）关于树鼩CRFR1和CRFR2的研究结果显示，树鼩的CRFR氨基酸序列与人的相似度比啮齿类高，CRFR1主要在脑垂体和脑内表达量高，如杏仁核体、大脑皮层、嗅球和脑干等，CRFR2在脑和外周组织中都有表达，且CRFR2α和CRFR2β在脑内共表达，但是在外周组织不共表达。

### （二）结果与讨论

图10–12所示树鼩下丘脑及其它脑区促肾上腺皮质激素释放激素的分布图，详细描述了促肾上腺皮质激素释放激素的分布特点。树鼩下丘脑促肾上腺皮质激素释放激素神经元主要集中分布在下丘脑室旁核中，且沿着第三脑室分布。室旁核头端和尾端的促肾上腺皮质激素释放激素阳性神经元较少，而室旁核中部阳性神经元最密集，室旁核腹侧和外侧较内侧阳性细胞更多（图10–13）。在下丘脑视上核的背侧、背外侧及腹外侧也有一些促肾上腺皮质激素释放激素神经元分布，这些暂存的促肾上腺皮质激素释放激素在应激等特殊条件下才释放出去。除此之外，下丘脑视前区、下丘脑前区、外侧区、下丘脑室旁下带也有散在的阳性细胞的分布（图10–14）。树鼩下丘脑中促肾上腺皮质激素释放激素的分布与啮齿类和灵长类下丘脑中的分布结果相似[70，79]。下丘脑外其它脑区，如终纹床核中发现很多促肾上腺皮质激素释放激素神经元分布，终纹床核前部的促肾上腺皮质激素释放激素阳性细胞主要分布在前连合背侧核腹侧周围，后部的阳性细胞主要分布在内囊内侧附近和穹窿周围。但是杏仁基底核和外侧核却没有发现促肾上腺皮质激素释放激素阳性神经元，这与Kozicz等（2008）的研究结果基本一致，但是同样未经秋水仙素处理的猴脑中，在杏仁基底核和外侧核中检测到许多促肾上腺皮质激素释放激素阳性神经元存在[69]。在经秋水仙素处理的大鼠脑中，杏仁中央核也发现有大量促肾上腺皮质激素释放激素阳性神经元[80]。大脑皮层也发现很多促肾上腺皮质激素释放激素阳性神经元分布，如内侧前额叶和扣带回皮层（图10–15）。在大脑皮层中的促肾上腺皮质激素释放激素主要分布在大脑皮层的Ⅱ、Ⅲ层，且这些神经元基本都是中间神经元，胞体比较小，多为双极投射神经元，并且顶树突垂直于硬脑膜表面。

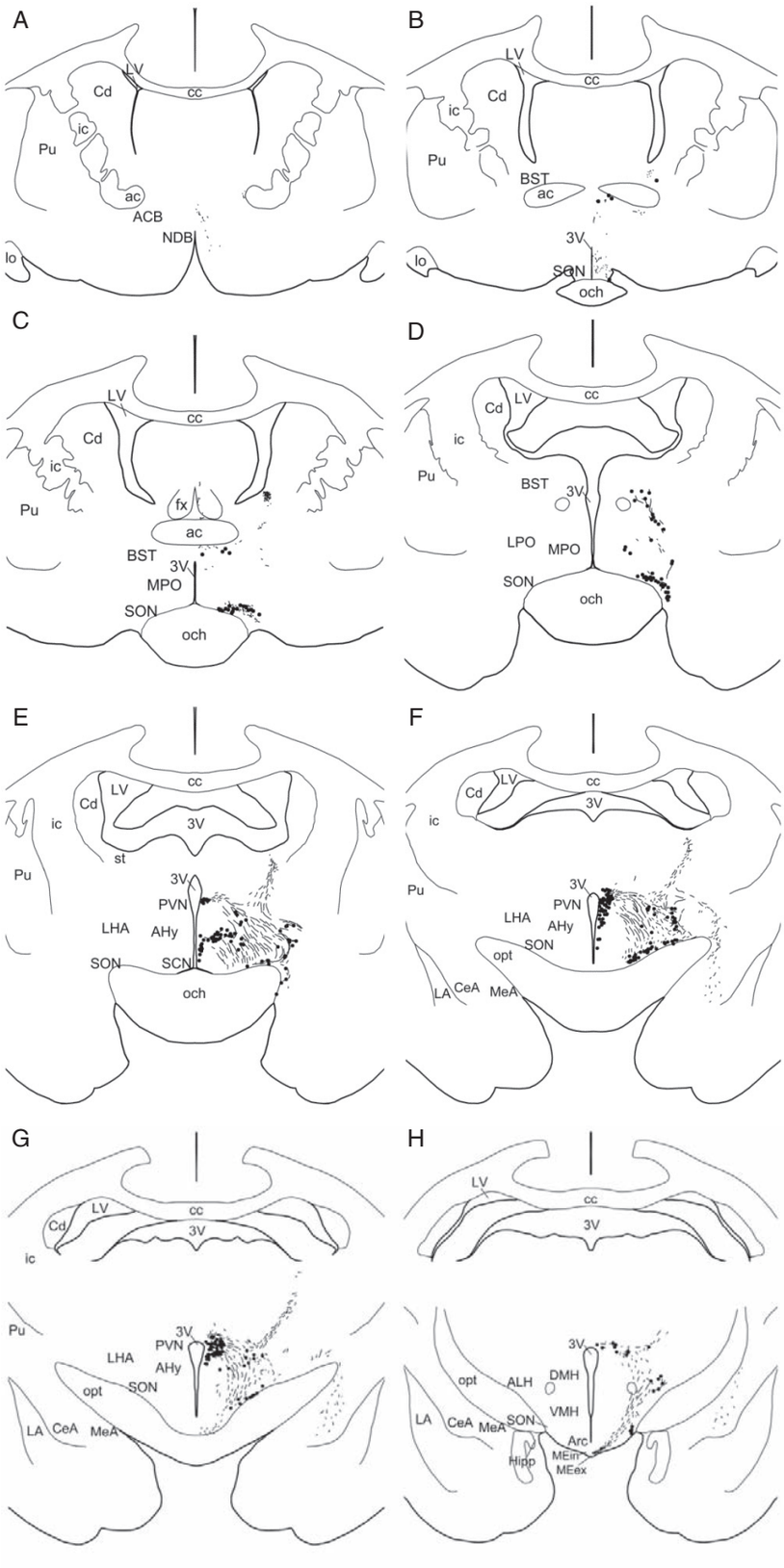



**图10–12　促肾上腺皮质激素释放激素阳性神经元和纤维在树鼩下丘脑及其它脑区从前到后的分布示意图（不包括大脑皮层结构）**

左半侧为脑区命名，右半侧为促肾上腺皮质激素释放激素免疫阳性反应区域。圆点表示阳性细胞体，线条表示阳性纤维，圆点和线条的密度反映阳性染色的相对密度。（字母缩写详见附录）

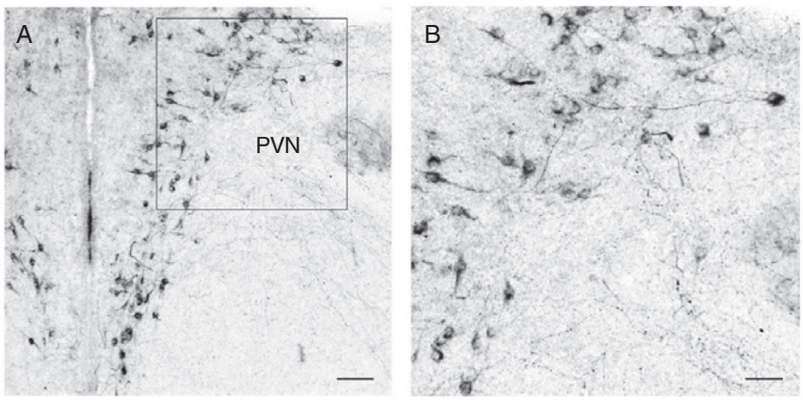



**图10–13 （A）促肾上腺皮质激素释放激素阳性神经元和纤维在下丘脑室旁核（PVN）中的分布；（B）A图中线框内放大图**
标尺：（A）100 μm；（B）50 μm。

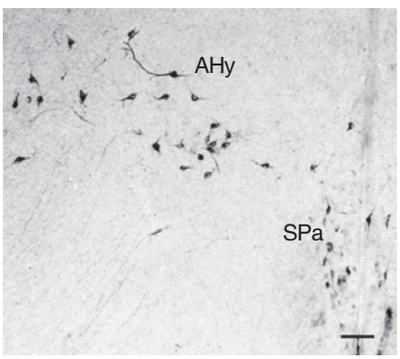



**图10–14 促肾上腺皮质激素释放激素阳性神经元和纤维在树鼩下丘脑室旁下带和下丘脑前区中的分布**
标尺：100 μm。

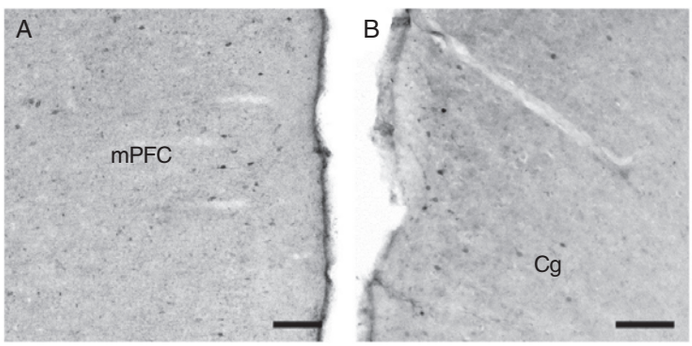



**图10–15 促肾上腺皮质激素释放激素阳性神经元和纤维在树鼩内侧前额叶（mPFC）和扣带回皮层（Cg）中的分布**
标尺：（A、B）100 μm。

促肾上腺皮质激素释放激素阳性神经纤维广泛分布于下丘脑室旁核、视上核、视前区、下丘脑前区、外侧区、下丘脑室旁下带和正中隆起等，从室旁核和视上核发出的神经纤维投射到腹侧正中隆起，这是重要的下丘脑–垂体系统。下丘脑室旁核和视上核间有大量纤维联系。下丘脑外其它脑区也有神经纤维的分布，如终纹床核、斜角带核、杏仁核体、大脑皮层等。终纹床核密集成簇的阳性神经纤维主要集中在前连合周围或侧脑室腹侧，这与树鼩中的研究结果基本一致[81]。斜角带核中纤维沿着大脑腹侧边缘呈线性投射。促肾上腺皮质激素释放激素阳性神经纤维主要存在于杏仁核中央区，杏仁核其它区分布很少。

### （三）结语与展望

虽然我们对树鼩脑内促肾上腺皮质激素释放激素神经肽在下丘脑及其它脑区内的分布做了详细描述，但是促肾上腺皮质激素释放激素如何调节树鼩的生理和行为过程，还需进一步研究。树鼩下丘脑室旁核和杏仁核中促肾上腺皮质激素释放激素在慢性社会心理应激后的表达水平都明显下降[81]，这与其它哺乳动物中的研究结果都不一致[76, 82]，其中的机制机理仍未知。促肾上腺皮质激素释放激素作为重要的应激和情绪调节子，对树鼩应激反应和情绪等调节机制是非常有趣的问题。

## 四、血管活性肠肽神经元在情绪相关脑区中分布

### （一）前　言

血管活性肠肽是含有28个氨基酸的多肽，最初是从猪胃肠道中分离发现的，之后其多肽序列也在其它哺乳类动物中得到鉴定[83～85]。血管活性肠肽广泛分布于哺乳类动物的嗅前核、大脑皮层、杏仁核、终纹床核和视交叉上核[86，87]，其调节动物多种生理功能，如昼夜节律及神经元同步性、领地攻击行为以及加压素和催产素释放等[23，25，88，89]。

### （二）结果与讨论

我们已经详细研究了树鼩下丘脑及其它脑区血管活性肠肽的分布[47]。在树鼩下丘脑中，只在视交叉上核中发现大量血管活性肠肽阳性细胞的存在（图10–16）。在视交叉上核头端，少量血管活性肠肽阳性细胞成团分布于视交叉背侧，而更多的血管活性肠肽神经元成簇聚集在邻近视交叉的背侧和远离视交叉的视交叉上核外侧（图10–17）。与加压素能神经元在视交叉上核的分布不同，血管活性肠肽阳性细胞主要成簇聚集在腹侧和外侧，这与人类和啮齿中的结果相似[50，90]。最近研究发现血管活性肠肽及其受体介导个体视交叉上核神经元节律和神经元间同步[25]。有趣的是，树鼩的视交叉上核形状异于啮齿类和人类的椭圆形[34，90]，且其内外侧轴、背腹轴和前后轴的三维大小分别为200 μm、600 μm、700 μm，与之相对应的，大鼠视交叉上核大小则为300 μm、300 μm、700 μm[90]，而人类视交叉上核加压素亚核体积为0.25mm$^3$[34]。

下丘脑外区域血管活性肠肽阳性细胞则主要散落于大脑皮层，如内侧前额叶和扣带回皮层（图10–18）。血管活性肠肽阳性神经元在内侧前额叶皮层均有分布，主要以双极神经元为主，且具有卵形胞体和垂直指向软脑膜表面的顶树突，然而，只有极少量的血管活性肠肽阳性神经元存在于扣带回皮层中。此外，血管活性肠肽阳性细胞也存在于杏仁核基底核和外侧核（图10–19），以及海马的齿状回等区域。树鼩杏仁内侧核、终纹床核和外侧隔核却没有检测到血管活性肠肽阳性神经元，这与大鼠和小鼠中的研究结果不同[86]。

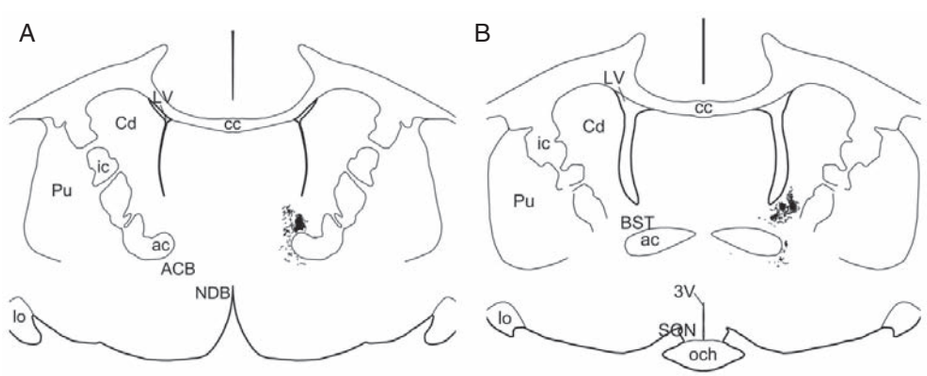



**图10–16（a）　血管活性肠肽阳性神经元和纤维在树鼩下丘脑及其它脑区从前到后的分布示意图（不包括大脑皮层结构）**

左半侧为脑区命名，右半侧为血管活性肠肽免疫阳性反应区域。圆点表示阳性细胞体，线条表示阳性纤维，圆点和线条的密度反映阳性染色的相对密度。（字母缩写详见附录）

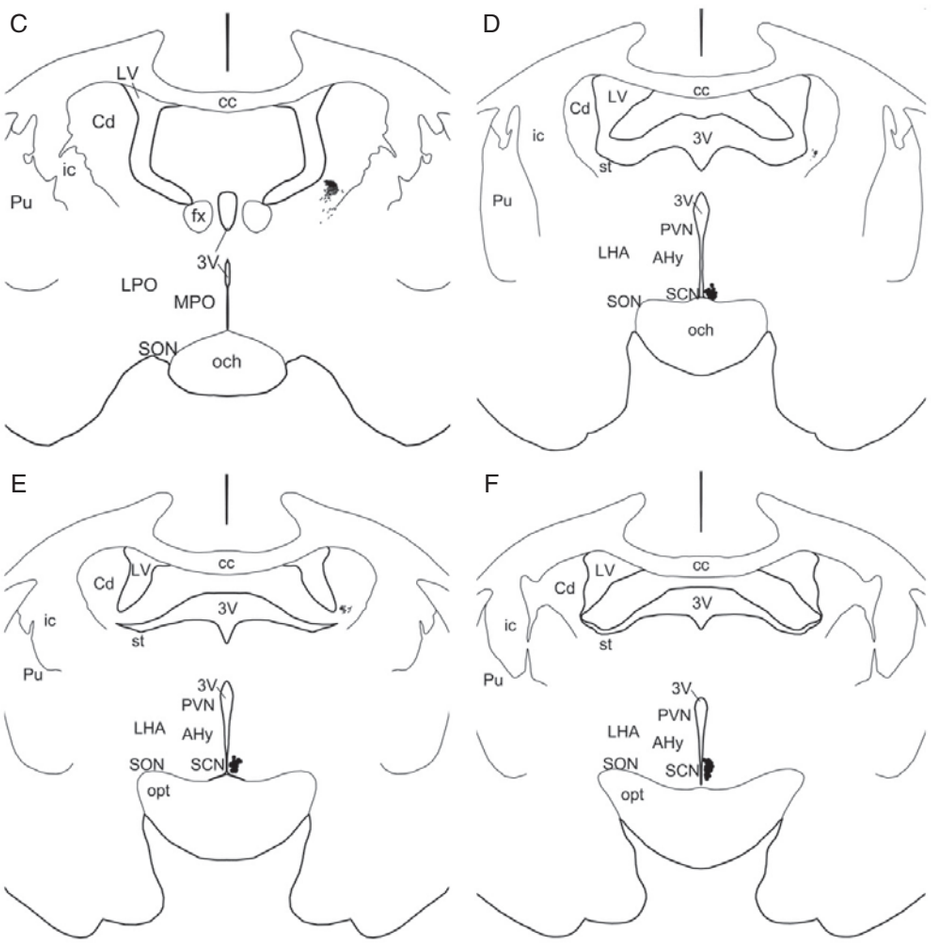



**图10–16（b） 血管活性肠肽阳性神经元和纤维在树鼩下丘脑及其它脑区从前到后的分布示意图（不包括大脑皮层结构）**

左半侧为脑区命名，右半侧为血管活性肠肽免疫阳性反应区域。圆点表示阳性细胞体，线条表示阳性纤维，圆点和线条的密度反映阳性染色的相对密度。（字母缩写详见附录）

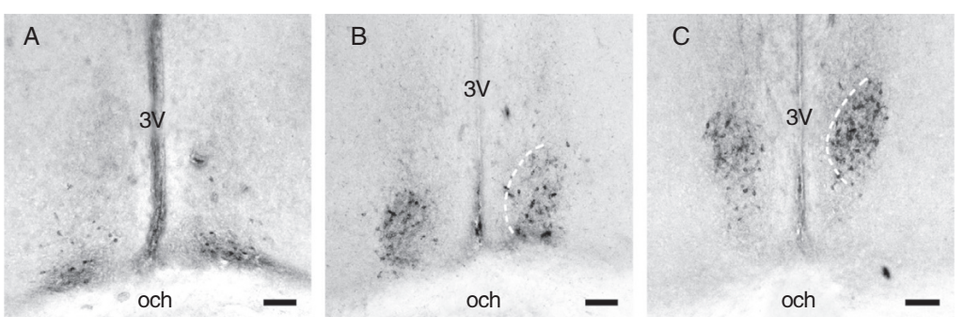



**图10–17 血管活性肠肽阳性神经元和纤维在下丘脑视交叉上核（SCN）头端（A）、中间（B）、尾端（C）的分布**

标尺：（A–C）100 μm[47]。

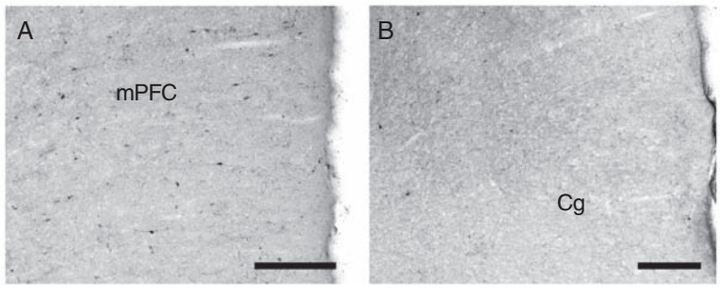



**图10–18　血管活性肠肽阳性神经元和纤维在树鼩内侧前额叶（mPFC）和扣带回皮层（Cg）中的分布**
标尺：（A、B）200 μm。

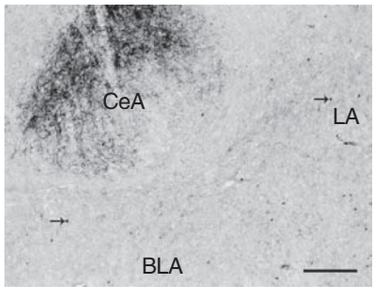



**图10–19　血管活性肠肽阳性神经元和纤维在杏仁核中央核（CeA）、基底核（BLA）和外侧核（LA）中的分布**
标尺：（A–C）200 μm。

血管活性肠肽神经纤维广泛分布于视交叉上核、杏仁核体和海马中。相比于杏仁核其它亚区，杏仁中央核含有大量密集的神经纤维束，并且内侧纤维丛较密集，而外侧较疏松。另外，在终纹床核也含有密集的血管活性肠肽神经纤维，这些位于终纹床核头端的深染纤维最初出现在前连合内侧，再往后些，这些纤维位于侧脑室腹侧方向、环绕前连合，在终纹床核尾端，纤维密集丛则主要可见于侧脑室腹外侧方向。

尽管树鼩杏仁中央核和终纹床核中含有的高密度血管活性肠肽纤维的来源尚不能确定，但在大鼠脑中血管活性肠肽网路投射的研究已经比较清楚，通过损伤及逆行示踪等方法的研究发现，杏仁中央核中大部分纤维可能起源于乳头上核区和相邻外侧下丘脑[91]，而终纹床核外侧背面亚区的血管活性肠肽神经纤维来源于中脑导水管周围灰质和中缝核[92，93]。海马中只有齿状回有血管活性肠肽阳性细胞，而啮齿类除海马齿状回外，海马辐射层CA1及CA3中也有血管活性肠肽细胞分布[86]。

### （三）结语与展望

树鼩是昼行性动物，与灵长类相似，而与夜行性动物啮齿类不同，所以树鼩可以替代昂贵的灵长类作为新的节律模型动物或节律相关新药的动物在体实验，以帮助人类更好地认识节律活动。而视交叉上核是昼夜节律调节的重要中枢，其中的加压素和血管活性肠肽能神经元调节树鼩昼夜节律活动的机制还不清楚，所以还有很多工作需要做。

## 五、神经肽Y神经元在情绪相关脑区中分布

### （一）前　言

神经肽Y最初由猪脑中提取和鉴定而来，是一种含36个氨基酸的多肽[94]，广泛分布于大鼠、猴子和人类脑中[95～97]。神经肽Y的进化高度保守[98]，这意味着其在脊椎动物的生理和行为过程中发挥着不可或缺的功能。在哺乳动物的嗅觉系统、大脑皮层、海马、基底核、杏仁核、中隔、下丘脑和丘脑均检测到含有神经肽Y的神经元[96，99，100]。神经肽Y对应激反应[101]、情绪加工[102]、节律控制[103]和癫痫控制[104]起着重要作用。此外，下丘脑中的神经肽Y是重要的促进食欲的神经肽，在

摄食及能量平衡中起调节作用[105，106]。已有报道显示树鼩松果体和外侧膝状体腹侧核存在神经肽Y免疫阳性反应[107，108]。

## （二）结果与讨论

我们的结果显示，神经肽Y分布在情绪相关脑区中，如海马、杏仁核、隔区、终纹床核和下丘脑等。

1. 海　马

神经肽Y阳性细胞和纤维散在分布于整个海马中（图10–20）。神经肽Y阳性细胞零星散布于齿状回、安蒙氏角CA1与CA3区，在齿状回多形细胞层则散落分布着中等数量的神经肽Y阳性细胞，而颗粒细胞层和分子层鲜有神经肽Y阳性细胞。在CA3中，大量神经肽Y阳性细胞位于辐

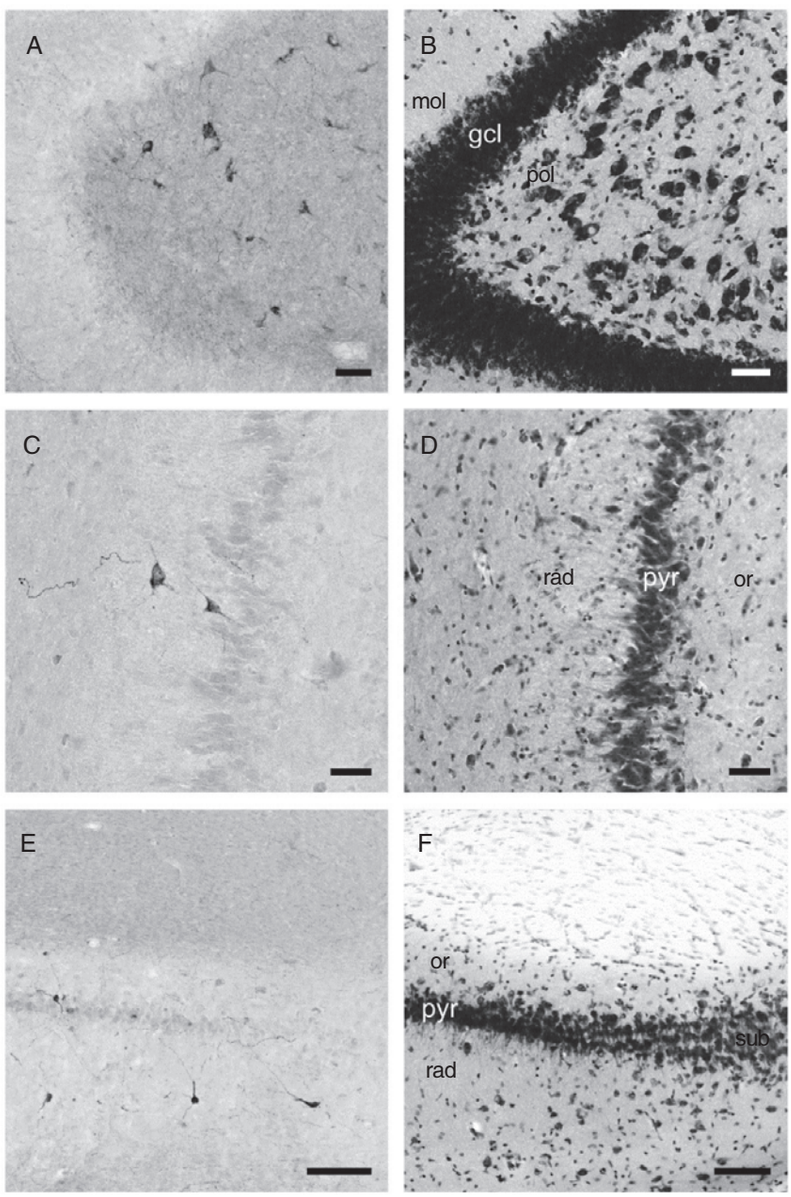



**图10–20　神经肽Y阳性神经元和纤维在海马齿状回各层（A）、CA3各层（C）和CA1各层（E）中的分布，右侧为左侧免疫组化染色（A、C、E）相对应的尼氏染色图片（B、D、F）**
标尺：（A–D）50 μm；（E–F）100 μm。（字母缩写详见附录）

射层，而极少见于透明层、起层和腔隙层，有时会出现于椎体细胞层，但并非出现于椎体样细胞中。另外，阳性神经元也少见于腔隙分子层。在CA1中，稀疏的神经肽Y阳性神经元散布于辐射层、起层和椎体细胞层。

神经肽Y阳性神经纤维分布在齿状回、CA3与CA1区。齿状回的分子层含有密集的神经肽Y阳性纤维，与其相比颗粒层鲜有免疫阳性反应纤维，而多形层含有中等密度的神经肽Y阳性纤维。我们观察到在齿状回多形层中有神经肽Y神经元发出少量纤维，穿过颗粒层再进入分子层。中度染色的神经肽Y阳性纤维存在于安蒙氏角的辐射层和起层中，而浅染神经纤维分布在腔隙层和椎体细胞层。

树鼩海马结构中神经肽Y阳性细胞和纤维的分布特点与大鼠、猴和人海马中的研究发现是相似的[109，110]。大部分神经肽Y细胞位于树鼩海马起层、辐射层和多形细胞层，正如大鼠和猴海马中的结果一样[110]。然而，神经肽Y的分布存在脑区差异，在未经秋水仙素预处理的树鼩海马中检测到许多神经肽Y阳性神经元，而只能在秋水仙素预处理的猴海马中才能观察到大量的阳性细胞[96，110]。神经肽Y阳性纤维在树鼩、大鼠和猴海马齿状回、CA3、CA1中的分布结果是相似[96，110]。

2. 杏仁核体、隔核和视前区

杏仁核体中发现散落着许多神经肽Y阳性细胞和大量神经纤维（图10–21）。少数零星神经肽Y阳性细胞沿视束散布于杏仁内侧核，而杏仁中央核边缘含有极少的阳性神经元。此外，基底核和外侧核中的神经肽Y阳性细胞多于内侧核和中央核，而中等数量的阳性神经元则散布于杏仁核周围大脑皮层。许多神经肽Y阳性细胞和纤维存在于隔核和视前区中（图10–22和图10–23）。罕有神经肽Y阳性细胞发现于腹外侧隔核。中度神经肽Y阳性细胞分布在终纹床核外侧区，位于侧脑室腹部、沿着内囊分布；而在终纹床核内侧区观察到极少量的阳性神经元，位于前连合周围（图10–23）。大量的神经肽Y阳性神经元也散落分布在侧脑室腹外侧的终纹中。然而，在斜角带核和视前区中并没有看到任何神经肽Y阳性细胞体。

中等密度的神经肽Y阳性纤维可见于杏仁内侧核、基底核、外侧核和杏仁核周围大脑皮层，而鲜有阳性纤维分布于中央核中。在中央核、基底核和外侧核中阳性纤维密度的差异将中央核的外侧和底部界线勾勒出来。背外侧隔核和海马隔核含有散在的少量神经肽Y阳性纤维。高密度神经肽Y阳性纤维存在于腹外侧隔核、终纹床核和终纹。中度阳性纤维存在于斜角带核和视前区。

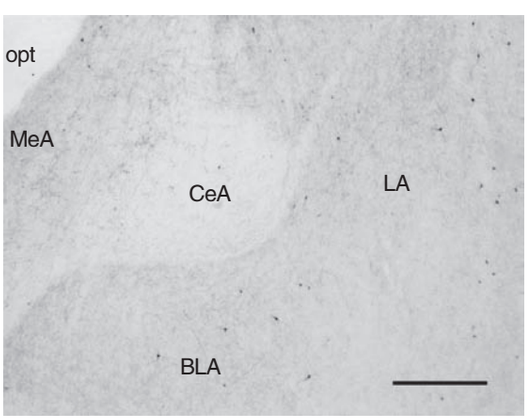



**图10–21　神经肽Y阳性神经元和纤维在杏仁内侧核（MeA）、中央核（CeA）、外侧核（LA）和基底核（BLA）**

标尺：500 μm。

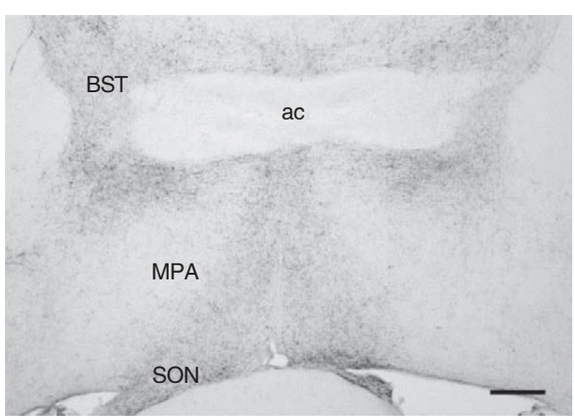



**图10–22　神经肽Y阳性神经元和纤维在终纹床核（BST）和视前区中的分布**

标尺：500 μm。

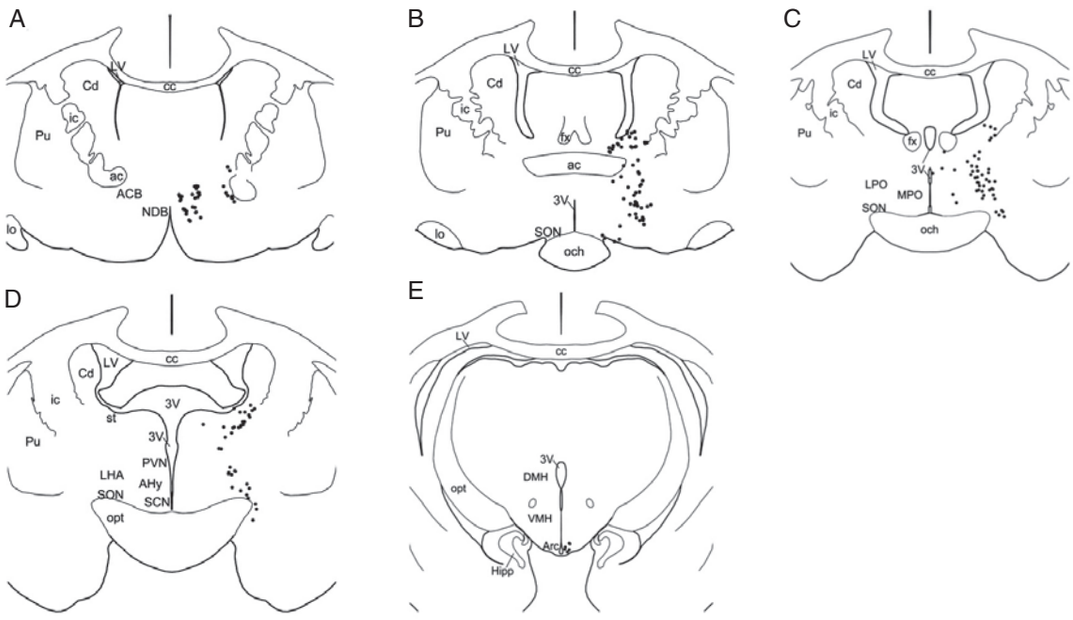



**图10–23　神经肽Y阳性神经元和纤维在树鼩下丘脑及其它脑区从前到后的分布示意图（不包括大脑皮层结构）**

左半侧为脑区命名，右半侧为神经肽Y免疫阳性反应区域。圆点表示阳性细胞体，圆点的密度反映阳性细胞的相对密度。（字母缩写详见附录）

树鼩杏仁中央核、基底核、外侧核和杏仁核周围灰质皮层中的神经肽Y阳性神经元和纤维的分布特征与大鼠和猴中报道的相似[99, 111]。然而，不同之处在于大鼠杏仁中央核并不存在神经肽Y阳性神经元[99]。而神经肽Y阳性神经元在树鼩外侧隔核和终纹床核中的分布与大鼠和猴中的报道相似，而在秋水仙素预处理的大鼠外侧隔核中却含有大量的神经肽Y阳性细胞[96, 99]。此外，大鼠和猴斜角带核和视前区中也存在少量的阳性细胞[96, 99]，而树鼩脑中这些核团并没有发现阳性细胞的存在。

3. 下丘脑

下丘脑前部区域中，中等密度神经肽Y阳性神经纤维存在于视上核和视交叉上核，在视上核中沿着视束背外侧边缘分布，而在视交叉上核中则位于视交叉背侧。下丘脑室旁核中含有高密度的神经肽Y阳性神经纤维，但是没有神经肽Y阳性神经元存在（图10–24）。在室旁核头端，轻度染色的纤维成簇沿着第三脑室分布；接下来，高密度的神经肽Y阳性纤维沿着第三脑室急剧的增加。高密度神经肽Y免疫阳性反应也出现在室旁核尾端外侧部，室旁核后部存在深度纤维染色，靠近第三脑室背部边缘且向两侧展开。下丘脑前部核团中，神经肽Y阳性神经元只散落分布在外

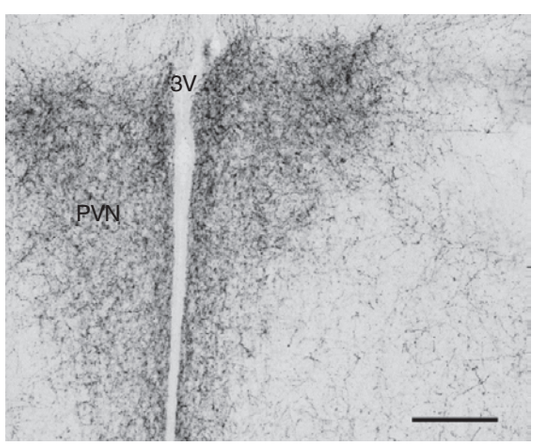



**图10–24　神经肽Y阳性纤维在下丘脑室旁核（PVN）中的分布**

标尺：200 μm。

侧区，外侧区还含有中度神经肽Y阳性神经纤维，这些纤维和室旁核之间有投射关系。

在下丘脑结节区，高密度的神经肽Y阳性纤维位于下丘脑背内侧核和腹内侧核。背内侧核背侧部中散落着少量神经肽Y阳性纤维，而中度到高密度的纤维在腹侧部被检测到。在腹内侧核中，高密度的神经肽Y阳性纤维成簇集中于中央部位，然而，低度到中度阳性纤维位于腹内侧核中央外侧壳部。高密度的神经肽Y阳性细胞发现于弓状核中，位于第三脑室腹侧和大脑腹侧边缘（图10–25）。大部分神经元集中在弓状核的腹内侧核腹外侧部，弓状核含有高密度神经肽Y阳性神经纤维，这些神经纤维向腹侧和外侧投射。

在下丘脑乳头体区中，神经肽Y阳性细胞在乳头上核和乳头体核中缺乏，而密度不均一的阳性纤维却存在（图10–26）。乳头上核内侧和外侧中可见中等密度的阳性纤维，然而，乳头体核中几乎不存在神经肽Y阳性纤维。

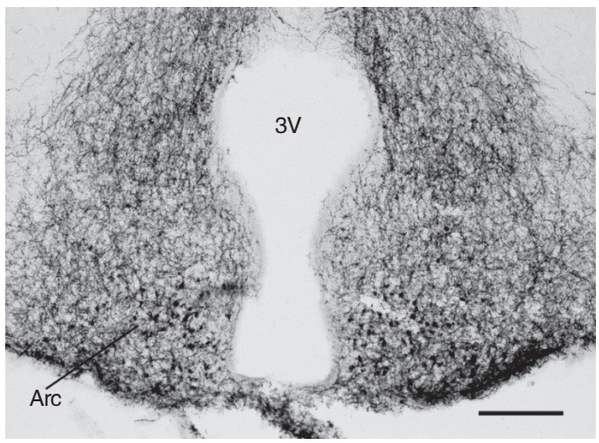



**图10–25　神经肽Y阳性纤维在下丘脑弓状核（Arc）中的分布**
标尺：200 μm。

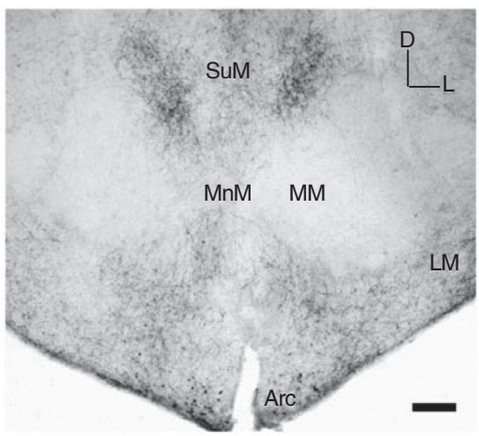



**图10–26　神经肽Y阳性纤维在下丘脑乳头体区中的分布**
标尺：200 μm。（字母缩写详见附录）

神经肽Y阳性神经元存在于树鼩下丘脑外侧区和弓状核，这与啮齿类和猴中的研究结果相似[99, 111]。在树鼩下丘脑其它区域并没有检测到阳性细胞，然而，在秋水仙素预处理的大鼠下丘脑除了外侧区和弓状核中含有阳性细胞，也存在于乳头上核、内侧视前区、室周核和室旁核中[99]。Smith等（1985）在秋水仙素预处理的猴脑中，发现神经肽Y阳性神经元也存在于下丘脑弓状核、视上核、背内侧核和室旁核中。

神经肽Y阳性神经纤维几乎覆盖整个树鼩下丘脑区，纤维密度不均一，尤其是室旁核最为密集。有研究显示下丘脑弓状核中的神经肽Y神经元直接投射到下丘脑室旁核中[112, 113]。与树鼩下丘脑其它核团阳性神经纤维的分布不同，乳头体核中几乎不存在神经肽Y阳性纤维，这与其它哺乳动物中鉴定的结果相似[111, 114]。

4. 内侧前额叶和扣带回皮层

神经肽Y免疫染色在树鼩大脑皮层内呈层状分布，神经肽Y阳性神经元散落分布在Ⅰ层到Ⅵ层，尤其是Ⅴ层和Ⅵ层。皮层内神经肽Y阳性神经元多为双极或多级神经元，其顶树突没有固定的投射方向，但多向皮层表面投射。如在内侧前额皮层和扣带回皮层，都发现许多神经肽Y阳性

细胞存在（图10–27）。神经肽Y阳性神经纤维在皮层的各层均能看到，非均一分布，但是无法判断这些错综复杂的神经纤维来源于哪个神经元。在皮层中，神经肽Y阳性细胞和纤维的分布与大鼠和人中的报道是一致的[99, 115]。

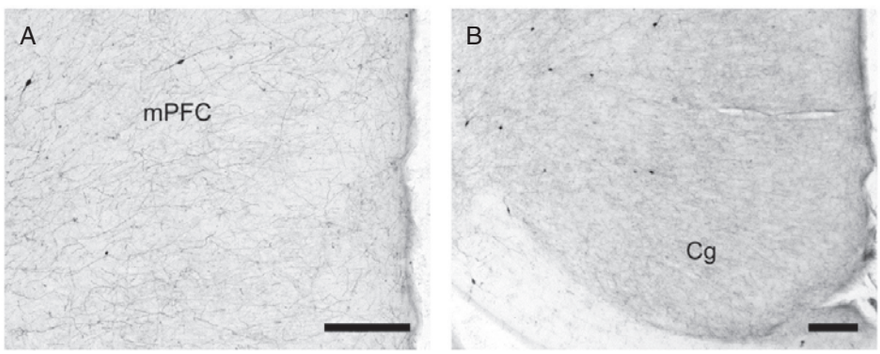



**图10–27　神经肽Y阳性细胞和纤维在树鼩内侧前额叶（mPFC）和扣带回皮层（Cg）中的分布**
标尺：（A、B）200μm。

### （三）结语与展望

董丽等（2012）对编码树鼩神经肽Y的前体序列和灵长类的相应序列进行比对，发现同源性高达96.9%[116]，在神经肽Y系统进化树中，树鼩与灵长类亲缘关系较近，故可以通过树鼩的神经肽Y相关研究来深入了解其在灵长类中的作用和机制。Zambello等（2010）的研究结果则提示神经肽Y系统在转录水平上受到慢性社会心理应激的影响，而氟西汀可阻止应激的这些效应发生，此外，大鼠和树鼩对慢性应激的反应存在明显差异[117]，这提示神经肽Y参与树鼩应激反应，究竟是脑内哪些脑区参与这个过程，神经肽Y神经环路如何调节应激反应等仍不清楚。

## 附录：

**附表10–1　英文缩略词表**

| | | |
|---|---|---|
| 3V | 3rd ventricle | 第三脑室 |
| AA | anterior amygdaloid area | 杏仁前区 |
| AB | accessory basal nucleus | 基底副核 |
| ac | anterior commissure | 前连合 |
| Arc | arcuate hypothalamic nucleus | 弓状核 |
| ACB | nucleus accumbens | 伏核 |
| AHy | anterior hypothalamus | 下丘脑前区 |
| BLA | basolateral amygdaloid nucleus | 杏仁基底核 |
| BST | bed nucleus of the stria terminalis | 终纹床核 |
| CA | cornu ammonis | 安蒙氏角 |
| cc | corpus callosum | 胼胝体 |
| Cd | caudate | 尾核 |
| CeA | central amygdaloid nucleus | 杏仁中央核 |
| CeL | central amygdaloid nucleus, lateral division | 杏仁中央核外侧部 |
| CeM | central amygdaloid nucleus, medial division | 杏仁中央核内侧部 |
| Cg | cingulate cortex | 扣带回皮质 |

续附表10-1

| | | |
|---|---|---|
| CO | cortical nuclei of the amygdala | 杏仁皮质 |
| CRF | corticotropin-releasing factor | 促肾上腺皮质激素释放激素 |
| D3V | dorsal 3rd ventricle | 背侧第三脑室 |
| DG | dentate gyrusof the hippocampus | 海马齿状回 |
| dLGN | dorsal lateral geniculate nucleus | 外侧膝状体背侧核 |
| DMH | dorsomedial hypothalamic nucleus | 下丘脑背内侧核 |
| DS | dorsal subiculum | 背部下托 |
| fx | fornix | 穹窿 |
| gcl | granular cell layer | 颗粒细胞层 |
| hil | hilus of the dentate gyrus | 齿状回门 |
| Hipp | hippocampus proper | 海马 |
| ic | internal capsule | 内囊 |
| LA | lateral amygdaloid nucleus | 杏仁外侧核 |
| LHA | lateral hypothalamic area | 下丘脑外侧区 |
| LHb | lateral habenular nucleus | 缰外侧核 |
| LM | lateral mammillary nucleus | 乳头体外侧核 |
| lo | lateral olfactory tract | 外侧嗅束 |
| LOT | nucleus of the lateral olfactory tract | 外侧嗅束核 |
| LPO | lateral preoptic area | 外侧视前区 |
| LS | lateral septal nucleus | 外侧隔核 |
| LSd | lateral septal nucleus, dorsal part | 背外侧隔核 |
| LSi | lateral septal nucleus, intermediate part | 中部外侧隔核 |
| LSv | lateral septal nucleus, ventral part | 腹外侧隔核 |
| LV | lateral ventricle | 侧脑室 |
| MeA | medial amygdaloid nucleus | 杏仁内侧核 |
| ME | median eminence | 正中隆起 |
| MEex | median eminence, external zone | 正中隆起外区 |
| MEin | median eminence, internal zone | 正中隆起内区 |
| MHb | medial habenular nucleus | 缰内侧核 |
| MM | medial mammillary nucleus | 乳头体内侧核 |
| MN | mammillary nucleus | 乳头体核 |
| MnM | medial mammillary nucleus, median part | 乳头体内侧核中央部 |
| mol | molecular cell layer | 分子细胞层 |
| MPA | medial preoptic area | 内侧视前区 |
| mPFC | medial prefrontal cortex | 内侧前额叶 |
| MPO | medial preoptic nucleus | 内侧视前核 |
| MS | medial septal nucleus | 内侧隔核 |
| NDB | nucleus of the diagonal band of Broca | 斜角带核 |
| och | optic chiasm | 视交叉 |
| opt | optic tract | 视束 |
| or | stratum oriens | 起层 |
| OT | oxytocin | 催产素 |
| PaA | anterior paraventricular hypothalamic nucleus | 下丘脑室旁核前部 |
| PaD | dorsal paraventricular hypothalamic nucleus | 下丘脑室旁核背部 |
| PaL | lateral paraventricular hypothalamic nucleus | 下丘脑室旁核外侧部 |
| PaM | medial paraventricular hypothalamic nucleus | 下丘脑室旁核内侧部 |

续附表10–1

| | | |
|---|---|---|
| PaP | posterior paraventricular hypothalamic nucleus | 下丘脑室旁核后部 |
| PaV | ventral paraventricular hypothalamic nucleus | 下丘脑室旁核腹侧部 |
| Pe | periventricular hypothalamic nucleus | 下丘脑室周核 |
| pol | polymorph cell layer | 多形细胞层 |
| Pu | putamen | 壳核 |
| Pul | pulvinarnucleus of the thalamus | 丘脑枕 |
| PVA | paraventricular thalamic nucleus, anterior part | 丘脑室旁核前部 |
| PVN | paraventricular nucleus of the hypothalamus | 下丘脑室旁核 |
| PVT | paraventricular nucleus of the thalamus | 丘脑室旁核 |
| pyr | stratum pyramidale | 锥体层 |
| rad | stratum radiatum | 辐射层 |
| Re | reuniens thalamic nucleus | 丘脑连结核 |
| Rt | reticular thalamic nucleus | 丘脑网状核 |
| SCN | suprachiasmatic nucleus | 视交叉上核 |
| SHi | septohippocampal nucleus | 海马隔核 |
| sm | stria medullaris of the thalamus | 丘脑髓纹 |
| SNR | substantia nigra, reticular part | 黑质网状部 |
| SPa | subparaventricular zone of the hypothalamus | 下丘脑室旁下带 |
| SON | supraoptic nucleus | 视上核 |
| st | stria terminalis | 终纹 |
| StHy | striohypothalamic nucleus | 下丘脑纹核 |
| SUB | subiculum | 海马下托 |
| SuM | supramammillary nucleus | 乳头上核 |
| SuML | supramammillary nucleus, lateral part | 乳头上核外侧区 |
| SuMM | supramammillary nucleus, medial part | 乳头上核内侧区 |
| TS | triangular septal nucleus | 三角隔核 |
| VH | ventral hippocampus | 腹侧海马 |
| VIP | vasoactive intestinal polypeptide | 血管活性肠肽 |
| vLGN | ventral lateral geniculate nucleus | 外侧膝状体腹侧核 |
| VMH | ventromedial hypothalamic nucleus | 下丘脑腹内侧核 |
| VP | vasopressin | 加压素 |
| VS | ventral subiculum | 腹部下托 |

## 参考文献

[1]Davidson RJ, Putnam KM, Larson CL. Dysfunction in the neural circuitry of emotion regulation—a possible prelude to violence. Science, 2000, 289(5479): 591-4.

[2]Hartley CA, Phelps EA. Changing fear: the neurocircuitry of emotion regulation. Neuropsychopharmacology, 2010, 35(1): 136-46.

[3]Phillips ML, Drevets WC, Rauch SL, et al. Neurobiology of emotion perception Ⅱ: Implications for major psychiatric disorders. Biol Psychiat, 2003, 54(5): 515-28.

[4]Aminoff MJ, Boller F, et al. Handbook of clinical neurology: Amsterdam: Elsevier, 2003.

[5]George P, et al. The human nervous system. New York: Academic Press, 1990.

[6]Rushworth MF, Behrens TE. Choice, uncertainty and value in prefrontal and cingulate cortex. Nat Neurosci, 2008, 11(4): 389-97.

[7]Etkin A, Egner T, Kalisch R. Emotional processing in anterior cingulate and medial prefrontal cortex. Trends Cogn Sci,

2011, 15(2): 85-93.
[8]Fincham JM, Anderson JR. Distinct roles of the anterior cingulate and prefrontal cortex in the acquisition and performance of a cognitive skill. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, 103(34): 12941-6.
[9]Wang F, Zhu J, Zhu H, et al. Bidirectional control of social hierarchy by synaptic efficacy in medial prefrontal cortex. Science, 2011, 334(6056): 693-7.
[10]Pelletier JG, Pare D. Role of amygdala oscillations in the consolidation of emotional memories. Biol Psychiat, 2004, 55(6): 559-62.
[11]Davis M. The role of the amygdala in fear and anxiety. Annu Rev Neurosci, 1992, 15: 353-75.
[12]Berretta S. Cortico-amygdala circuits: role in the conditioned stress response. Stress, 2005, 8(4): 221-32.
[13]Flugge G, Ahrens O, Fuchs E. Monoamine receptors in the amygdaloid complex of the tree shrew (*Tupaia belangeri*). J Comp Neurol, 1994, 343(4): 597-608.
[14]Akirav I. The role of cannabinoids in modulating emotional and non-emotional memory processes in the hippocampus. Front Behav Neurosci, 2011, 5: 34.
[15]Jarrard LE. On the role of the hippocampus in learning and memory in the rat. Behav Neural Biol, 1993, 60(1): 9-26.
[16]Engin E, Treit D. The role of hippocampus in anxiety: intracerebral infusion studies. Behav Pharmacol, 2007, 18(5-6): 365-74.
[17]Keuker JI, Rochford CD, Witter MP, et al. A cytoarchitectonic study of the hippocampal formation of the tree shrew (*Tupaia belangeri*). J Chem Neuroanat, 2003, 26(1): 1-15.
[18]Martin J. Lymbic system and cerebral circuits for emotions, learning, and memory (3rd). New York: McGraw-Hill Companies, 2003: 382.
[19]Lee MC, Schiffman SS, Pappas TN. Role of neuropeptides in the regulation of feeding behavior: a review of cholecystokinin, bombesin, neuropeptide Y, and galanin. Neurosci Biobehav Rev, 1994, 18(3): 313-23.
[20]Meyer-Lindenberg A, Domes G, Kirsch P, et al. Oxytocin and vasopressin in the human brain: social neuropeptides for translational medicine. Nat Rev Neurosci, 2011, 12(9): 524-38.
[21]Rotzinger S, Lovejoy DA, Tan LA. Behavioral effects of neuropeptides in rodent models of depression and anxiety. Peptides, 2010, 31(4): 736-56.
[22]Schank JR, Ryabinin AE, Giardino WJ, et al. Stress-related neuropeptides and addictive behaviors: beyond the usual suspects. Neuron, 2012, 76(1): 192-208.
[23]Vosko AM, Schroeder A, Loh DH, et al. Vasoactive intestinal peptide and the mammalian circadian system. Gen Comp Endocrinol, 2007, 152(2-3): 165-75.
[24]Wang SS, Kamphuis W, Huitinga I, et al. Gene expression analysis in the human hypothalamus in depression by laser microdissection and real-time PCR: the presence of multiple receptor imbalances. Mol Psychiat, 2008, 13(8): 786-99.
[25]Aton SJ, Colwell CS, Harmar AJ, et al. Vasoactive intestinal polypeptide mediates circadian rhythmicity and synchrony in mammalian clock neurons. Nat Neurosci, 2005, 8(4): 476-83.
[26]Chen XN, Meng QY, Bao AM, et al. The involvement of retinoic acid receptor-alpha in corticotropin-releasing hormone gene expression and affective disorders. Biol Psychiat, 2009, 66(9): 832-9.
[27]Lukas M, Toth I, Reber SO, et al. The neuropeptide oxytocin facilitates pro-social behavior and prevents social avoidance in rats and mice. Neuropsychopharmacology, 2011, 36(11): 2159-68.
[28]Stein DJ. Oxytocin and vasopressin: social neuropeptides. CNS Spectr, 2009, 14(11): 602-6.
[29]Neumann ID, Landgraf R. Balance of brain oxytocin and vasopressin: implications for anxiety, depression, and social behaviors. Trends Neurosci, 2012, 35(11): 649-59.
[30]George JM. Immunoreactive vasopressin and oxytocin: concentration in individual human hypothalamic nuclei. Science, 1978, 200(4339): 342-3.
[31]Fliers E, Swaab DF, Pool CW, et al. The vasopressin and oxytocin neurons in the human supraoptic and paraventricular nucleus; changes with aging and in senile dementia. Brain Res, 1985, 342(1): 45-53.

[32]Rosen GJ, De Vries GJ, Villalba C, et al. Distribution of vasopressin in the forebrain of spotted hyenas. J Comp Neurol, 2006, 498(1): 80-92.

[33]Caffe AR, Van Ryen PC, Van Der Woude TP, et al. Vasopressin and oxytocin systems in the brain and upper spinal cord of Macaca fascicularis. J Comp Neurol, 1989, 287(3): 302-25.

[34]Swaab DF, Fliers E, Partiman TS. The suprachiasmatic nucleus of the human brain in relation to sex, age and senile dementia. Brain Res, 1985, 342(1): 37-44.

[35]Kalsbeek A, Teclemariam-Mesbah R, Pevet P. Efferent projections of the suprachiasmatic nucleus in the golden hamster (*Mesocricetus auratus*). J Comp Neurol, 1993, 332(3): 293-314.

[36]Dai J, Swaab DF, Buijs RM. Distribution of vasopressin and vasoactive intestinal polypeptide (VIP) fibers in the human hypothalamus with special emphasis on suprachiasmatic nucleus efferent projections. J Comp Neurol, 1997, 383(4): 397-414.

[37]Bao AM, Meynen G, Swaab DF. The stress system in depression and neurodegeneration: focus on the human hypothalamus. Brain Res Rev, 2008, 57(2): 531-53.

[38]Wang Z, Moody K, Newman JD, et al. Vasopressin and oxytocin immunoreactive neurons and fibers in the forebrain of male and female common marmosets (*Callithrix jacchus*). Synapse, 1997, 27(1): 14-25.

[39]Caffe AR, Van Leeuwen FW, Luiten PG. Vasopressin cells in the medial amygdala of the rat project to the lateral septum and ventral hippocampus. J Comp Neurol, 1987, 261(2): 237-52.

[40]De Vries GJ, Buijs RM. The origin of the vasopressinergic and oxytocinergic innervation of the rat brain with special reference to the lateral septum. Brain Res, 1983, 273(2): 307-17.

[41]Goodson JL, Bass AH. Social behavior functions and related anatomical characteristics of vasotocin/vasopressin systems in vertebrates. Brain Res Brain Res Rev, 2001, 35(3): 246-65.

[42]De Vries GJ, Panzica GC. Sexual differentiation of central vasopressin and vasotocin systems in vertebrates: different mechanisms, similar endpoints. Neuroscience, 2006, 138(3): 947-55.

[43]Burbach JP, Luckman SM, Murphy D, et al. Gene regulation in the magnocellular hypothalamo-neurohypophysial system. Physiol Rev, 2001, 81(3): 1197-267.

[44]Ostrowski NL, Lolait SJ, Bradley DJ, et al. Distribution of V1a and V2 vasopressin receptor messenger ribonucleic acids in rat liver, kidney, pituitary and brain. Endocrinology, 1992, 131(1): 533-5.

[45]Sofroniew MV, Weindl A, Schrell U, et al. Immunohistochemistry of vasopressin, oxytocin and neurophysin in the hypothalamus and extrahypothalamic regions of the human and primate brain. Acta Histochem Suppl, 1981, 24: 79-95.

[46]Luo Y, Peng N, Yang W, et al. Studies on the distribution of vasopressin-immunoreactive neuronal perikarya and their fibers in the hypothalamus of *Tupaia belangeri*. Brain Res, 1995, 687(1-2): 191-3.

[47]Ni RJ, Shu YM, Wang J, et al. Distribution of vasopressin, oxytocin and vasoactive intestinal polypeptide in the hypothalamus and extrahypothalamic regions of tree shrews. Neuroscience, 2014, 265: 124-36.

[48]Weindl A, Sofroniew MV, Fuchs E, et al. The distribution of neurohypophyseal peptides in the brain of the tree shrew (*Tupaia belangeri*). Folia Morphol (Praha), 1981, 29(1): 41-5.

[49]Rood BD, De Vries GJ. Vasopressin innervation of the mouse (*Mus musculus*) brain and spinal cord. J Comp Neurol, 2011, 519(12): 2434-74.

[50]Zhou JN, Hofman MA, Swaab DF. Morphometric analysis of vasopressin and vasoactive intestinal polypeptide neurons in the human suprachiasmatic nucleus: influence of microwave treatment. Brain Res, 1996, 742(1-2): 334-8.

[51]Ferris CF, Delville Y, Miller MA, et al. Distribution of small vasopressinergic neurons in golden hamsters. J Comp Neurol, 1995, 360(4): 589-98.

[52]Fliers E, Guldenaar SE, Van De Wal N, et al. Extrahypothalamic vasopressin and oxytocin in the human brain; presence of vasopressin cells in the bed nucleus of the stria terminalis. Brain Res, 1986, 375(2): 363-7.

[53]Rosen GJ, De Vries GJ, Goldman SL, et al. Distribution of vasopressin in the brain of the eusocial naked mole-rat. J Comp Neurol, 2007, 500(6): 1093-105.

[54]Kawata M, Sano Y. Immunohistochemical identification of the oxytocin and vasopressin neurons in the hypothalamus

of the monkey (*Macaca fuscata*). Anat Embryol (Berl), 1982, 165(2): 151-67.

[55]Wang Z, Ferris CF, De Vries GJ. Role of septal vasopressin innervation in paternal behavior in prairie voles (*Microtus ochrogaster*). Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91(1): 400-4.

[56]Ferris CF, Gold L, De Vries GJ, et al. Evidence for a functional and anatomical relationship between the lateral septum and the hypothalamus in the control of flank marking behavior in Golden hamsters. J Comp Neurol, 1990, 293(3): 476-85.

[57]Buijs RM, Swaab DF, Dogterom J, et al. Intra- and extrahypothalamic vasopressin and oxytocin pathways in the rat. Cell Tissue Res, 1978, 186(3): 423-33.

[58]Bosch OJ, Meddle SL, Beiderbeck DI, et al. Brain oxytocin correlates with maternal aggression: link to anxiety. J Neurosci, 2005, 25(29): 6807-15.

[59]Rosen GJ, De Vries GJ, Goldman SL, et al. Distribution of oxytocin in the brain of a eusocial rodent. Neuroscience, 2008, 155(3): 809-17.

[60]Van Eerdenburg FJ, Swaab DF, Van Leeuwen FW. Distribution of vasopressin and oxytocin cells and fibres in the hypothalamus of the domestic pig (*Sus scrofa*). J Comp Neurol, 1992, 318(2): 138-46.

[61]Vale W, Spiess J, Rivier C, et al. Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and beta-endorphin. Science, 1981, 213(4514): 1394-7.

[62]Nemeroff CB, Widerlov E, Bissette G, et al. Elevated concentrations of CSF corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity in depressed patients. Science, 1984, 226(4680): 1342-4.

[63]Heilig M, Koob GF. A key role for corticotropin-releasing factor in alcohol dependence. Trends Neurosci, 2007, 30(8): 399-406.

[64]Binder EB, Nemeroff CB. The CRF system, stress, depression and anxiety-insights from human genetic studies. Mol Psychiat, 2010, 15(6): 574-88.

[65]Koutcherov Y, Mai JK, Ashwell KW, et al. Organization of the human paraventricular hypothalamic nucleus. J Comp Neurol, 2000, 423(2): 299-318.

[66]Mezey E, Kiss JZ, Skirboll LR, et al. Increase of corticotropin-releasing factor staining in rat paraventricular nucleus neurones by depletion of hypothalamic adrenaline. Nature, 1984, 310(5973): 140-1.

[67]Erkut ZA, Pool C, Swaab DF. Glucocorticoids suppress corticotropin-releasing hormone and vasopressin expression in human hypothalamic neurons. J Clin Endocrinol Metab, 1998, 83(6): 2066-73.

[68]Palkovits M, Kovacs K, Young WS, et al. Corticotropin-releasing hormone expression in supraoptic neurons after bilateral lesioning of the paraventricular nucleus in rats. Neurobiology (Bp), 1997, 5(3): 423-30.

[69]Bassett JL, Foote SL. Distribution of corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity in squirrel monkey (*Saimiri sciureus*) amygdala. J Comp Neurol, 1992, 323(1): 91-102.

[70]Morin SM, Ling N, Liu XJ, et al. Differential distribution of urocortin- and corticotropin-releasing factor-like immunoreactivities in the rat brain. Neuroscience, 1999, 92(1): 281-91.

[71]Potter E, Sutton S, Donaldson C, et al. Distribution of corticotropin-releasing factor receptor mRNA expression in the rat brain and pituitary. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91(19): 8777-81.

[72]Chalmers DT, Lovenberg TW, De Souza EB. Localization of novel corticotropin-releasing factor receptor (CRF2) mRNA expression to specific subcortical nuclei in rat brain: comparison with CRF1 receptor mRNA expression. J Neurosci, 1995, 15(10): 6340-50.

[73]Lovenberg TW, Chalmers DT, Liu C, et al. CRF2 alpha and CRF2 beta receptor mRNAs are differentially distributed between the rat central nervous system and peripheral tissues. Endocrinology, 1995, 136(9): 4139-42.

[74]Valdenaire O, Giller T, Breu V, et al. A new functional isoform of the human CRF2 receptor for corticotropin-releasing factor. Biochim Biophys Acta, 1997, 1352(2): 129-32.

[75]Spiess J, Dautzenberg FM, Sydow S, et al. Molecular Properties of the CRF Receptor. Trends Endocrinol Metab, 1998, 9(4): 140-5.

[76]Albeck DS, McKittrick CR, Blanchard DC, et al. Chronic social stress alters levels of corticotropin-releasing factor and

arginine vasopressin mRNA in rat brain. J Neurosci, 1997, 17(12): 4895-903.

[77]Palchaudhuri MR, Hauger RL, Wille S, et al. Isolation and pharmacological characterization of two functional splice variants of corticotropin-releasing factor type 2 receptor from *Tupaia belangeri*. J Neuroendocrinol, 1999, 11(6): 419-28.

[78]Palchaudhuri MR, Wille S, Mevenkamp G, et al. Corticotropin-releasing factor receptor type 1 from *Tupaia belangeri*—cloning, functional expression and tissue distribution. Eur J Biochem, 1998, 258(1): 78-84.

[79]Foote SL, Cha CI. Distribution of corticotropin-releasing-factor-like immunoreactivity in brainstem of two monkey species (*Saimiri sciureus* and *Macaca fascicularis*): an immunohistochemical study. J Comp Neurol, 1988, 276(2): 239-64.

[80]Cummings S, Elde R, Ells J, et al. Corticotropin-releasing factor immunoreactivity is widely distributed within the central nervous system of the rat: an immunohistochemical study. J Neurosci, 1983, 3(7): 1355-68.

[81]Kozicz T, Bordewin LA, Czeh B, et al. Chronic psychosocial stress affects corticotropin-releasing factor in the paraventricular nucleus and central extended amygdala as well as urocortin 1 in the non-preganglionic Edinger-Westphal nucleus of the tree shrew. Psychoneuroendocrinology, 2008, 33(6): 741-54.

[82]Grippo AJ, Gerena D, Huang J, et al. Social isolation induces behavioral and neuroendocrine disturbances relevant to depression in female and male prairie voles. Psychoneuroendocrinology, 2007, 32(8-10): 966-80.

[83]Said SI, Mutt V. Polypeptide with broad biological activity: isolation from small intestine. Science, 1970, 169(3951): 1217-8.

[84]Dimaline R, Reeve JR Jr, Shively JE, et al. Isolation and characterization of rat vasoactive intestinal peptide. Peptides, 1984, 5(2): 183-7.

[85]Bodner M, Fridkin M, Gozes I. Coding sequences for vasoactive intestinal peptide and PHM-27 peptide are located on two adjacent exons in the human genome. Proc Natl Acad Sci USA, 1985, 82(11): 3548-51.

[86]Loren I, Emson PC, Fahrenkrug J, et al. Distribution of vasoactive intestinal polypeptide in the rat and mouse brain. Neuroscience, 1979, 4(12): 1953-76.

[87]Zhou JN, Hofman MA, Swaab DF. VIP neurons in the human SCN in relation to sex, age, and Alzheimer's disease. Neurobiol Aging, 1995, 16(4): 571-6.

[88]Goodson JL, Kelly AM, Kingsbury MA, et al. An aggression-specific cell type in the anterior hypothalamus of finches. Proc Natl Acad Sci USA, 2012, 109(34): 13847-52.

[89]Ottesen B, Hansen B, Fahrenkrug J, et al. Vasoactive intestinal peptide (VIP) stimulates oxytocin and vasopressin release from the neurohypophyis. Endocrinology, 1984, 115(4): 1648-50.

[90]Moore RY, Speh JC, Leak RK. Suprachiasmatic nucleus organization. Cell Tissue Res, 2002, 309(1): 89-98.

[91]Baek SY, Yamano M, Shiotani Y, et al. Distribution and origin of vasoactive intestinal polypeptide-like immunoreactive fibers in the central amygdaloid nucleus of the rat: an immunocytochemical analysis. Peptides, 1988, 9(3): 661-8.

[92]Petit JM, Luppi PH, Peyron C, et al. VIP-like immunoreactive projections from the dorsal raphe and caudal linear raphe nuclei to the bed nucleus of the stria terminalis demonstrated by a double immunohistochemical method in the rat. Neurosci Lett, 1995, 193(2): 77-80.

[93]Kozicz T, Vigh S, Arimura A. The source of origin of PACAP- and VIP-immunoreactive fibers in the laterodorsal division of the bed nucleus of the stria terminalis in the rat. Brain Res, 1998, 810(1-2): 211-9.

[94]Tatemoto K, Carlquist M, Mutt V. Neuropeptide Y—a novel brain peptide with structural similarities to peptide YY and pancreatic polypeptide. Nature, 1982, 296(5858): 659-60.

[95]Hendry SH, Jones EG, Emson PC. Morphology, distribution, and synaptic relations of somatostatin- and neuropeptide Y-immunoreactive neurons in rat and monkey neocortex. J Neurosci, 1984, 4(10): 2497-517.

[96]Smith Y, Parent A, Kerkerian L, et al. Distribution of neuropeptide Y immunoreactivity in the basal forebrain and upper brainstem of the squirrel monkey (*Saimiri sciureus*). J Comp Neurol, 1985, 236(1): 71-89.

[97]Adrian TE, Allen JM, Bloom SR, et al. Neuropeptide Y distribution in human brain. Nature, 1983, 306(5943): 584-6.

[98]Blomqvist AG, Soderberg C, Lundell I, et al. Strong evolutionary conservation of neuropeptide Y: sequences of chicken,

goldfish, and Torpedo marmorata DNA clones. Proc Natl Acad Sci USA, 1992, 89(6): 2350-4.

[99]De Quidt ME, Emson PC. Distribution of neuropeptide Y-like immunoreactivity in the rat central nervous system—Ⅱ. Immunohistochemical analysis. Neuroscience, 1986, 18(3): 545-618.

[100]Hostetler CM, Hitchcock LN, Anacker AM, et al. Comparative distribution of central neuropeptide Y (NPY) in the prairie (*Microtus ochrogaster*) and meadow (*M. pennsylvanicus*) vole. Peptides, 2013, 40: 22-9.

[101]Witt SH, Buchmann AF, Blomeyer D, et al. An interaction between a neuropeptide Y gene polymorphism and early adversity modulates endocrine stress responses. Psychoneuroendocrinology, 2011, 36(7): 1010-20.

[102]Tasan RO, Nguyen NK, Weger S, et al. The central and basolateral amygdala are critical sites of neuropeptide Y/Y2 receptor-mediated regulation of anxiety and depression. J Neurosci, 2010, 30(18): 6282-90.

[103]Yannielli PC, Harrington ME. Neuropeptide Y in the mammalian circadian system: effects on light-induced circadian responses. Peptides, 2001, 22(3): 547-56.

[104]Vezzani A, Sperk G, Colmers WF. Neuropeptide Y: emerging evidence for a functional role in seizure modulation. Trends Neurosci, 1999, 22(1): 25-30.

[105]Yang L, Scott KA, Hyun J, et al. Role of dorsomedial hypothalamic neuropeptide Y in modulating food intake and energy balance. J Neurosci, 2009, 29(1): 179-90.

[106]Tiesjema B, La Fleur SE, Luijendijk MC, et al. Sustained NPY overexpression in the PVN results in obesity via temporarily increasing food intake. Obesity (Silver Spring), 2009, 17(7): 1448-50.

[107]Kado M, Yoshida A, Hira Y, et al. Light and electron microscopic immunocytochemical study on the innervation of the pineal gland of the tree shrew (*Tupaia glis*), with special reference to peptidergic synaptic junctions with pinealocytes. Brain Res, 1999, 842(2): 359-75.

[108]Agarwala S, Gunluk AE, May JG, 3rd, et al. Immunohistochemical organization of the ventral lateral geniculate nucleus in the tree shrew. J Comp Neurol, 1992, 318(3): 267-76.

[109]Chan-Palay V, Kohler C, Haesler U, et al. Distribution of neurons and axons immunoreactive with antisera against neuropeptide Y in the normal human hippocampus. J Comp Neurol, 1986, 248(3): 360-75.

[110]Kohler C, Eriksson L, Davies S, et al. Neuropeptide Y innervation of the hippocampal region in the rat and monkey brain. J Comp Neurol, 1986, 244(3): 384-400.

[111]Bons N, Mestre N, Petter A, et al. Localization and characterization of neuropeptide Y in the brain of *Microcebus murinus* (Primate, Lemurian). J Comp Neurol, 1990, 298(3): 343-61.

[112]Li C, Chen P, Smith MS. Corticotropin releasing hormone neurons in the paraventricular nucleus are direct targets for neuropeptide Y neurons in the arcuate nucleus: an anterograde tracing study. Brain Res, 2000, 854(1-2): 122-9.

[113]Mihaly E, Fekete C, Lechan RM, et al. Corticotropin-releasing hormone-synthesizing neurons of the human hypothalamus receive neuropeptide Y-immunoreactive innervation from neurons residing primarily outside the infundibular nucleus. J Comp Neurol, 2002, 446(3): 235-43.

[114]Sabatino FD, Murnane JM, Hoffman RA, et al. Distribution of neuropeptide Y-like immunoreactivity in the hypothalamus of the adult golden hamster. J Comp Neurol, 1987, 257(1): 93-104.

[115]Delalle I, Evers P, Kostovic I, et al. Laminar distribution of neuropeptide Y-immunoreactive neurons in human prefrontal cortex during development. J Comp Neurol, 1997, 379(4): 515-22.

[116]Dong L, Lv LB, Lai R. Molecular cloning of *Tupaia belangeri chinensis* neuropeptide Y and homology comparison with other analogues from primates. Zool Res, 2012, 33(1): 75-8.

[117]Zambello E, Fuchs E, Abumaria N, et al. Chronic psychosocial stress alters NPY system: different effects in rat and tree shrew. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiat, 2010, 34(1): 122-30.



# 第十一章

Tree shrews

## 树鼩基础生理学数据

第一篇树鼩基础生物学
TREE SHREW BASIC BIOLOGY

杨跃雄　徐　林

## 第一节 前　言

人类疾病的动物模型是基础研究联结临床应用的重要基础。转化医学目前面临的困难主要来源于啮齿类动物与人类之间的巨大物种差异，因此创建人类疾病的动物模型最佳选择是使用非人灵长类动物。然而，使用非人灵长类动物作为模型动物必然遇到昂贵的饲养和实验费用，难以忍受的实验周期以及严厉的动物伦理和保护等问题，导致非人灵长类的动物模型难以广泛推广和应用。尽管如此，有一些重大的人类疾病动物模型如艾滋病、肝炎、老年痴呆症等仍然有必要使用非人灵长类动物才能够很好地模拟人类疾病。树鼩既不是非人灵长类动物，但又与非人灵长类动物拥有密切的亲缘关系，可作为非人灵长类动物的重要补充和替代[1]。

实验动物的基础生理学指标是创建人类疾病动物模型的重要基础，为评价动物种群的健康和疾病、遗传背景的一致性、饲养和实验条件、动物模型的有效性等方面奠定关键基础。迄今为止用于生物医学研究的树鼩大部分来自野生，或者短期野生驯化，还缺乏通过工人驯化、繁殖、饲养后建立的稳定繁殖群的基础生理学指标。严格意义上说，树鼩作为实验动物虽有云南省地方标准，但缺乏国家标准。

早在20世纪70年代末，以中国科学院昆明动物研究所为首的多个科研机构在昆明地区就开始人工驯养繁殖树鼩。围绕树鼩人工驯养繁殖和疾病防治开展了一系列相关研究，并于1991年出版了专著《树鼩生物学》，内容包括分类学和生态学、寄生虫学、病理学、解剖学、神经生物学、遗传学、生物化学和免疫学，为国内开展树鼩相关研究提供了宝贵的基本生物学资料。中国科学院昆明动物研究所目前已获得$F_6$代的封闭群树鼩品种。

尽管这样，目前驯养树鼩的各种生物学背景值依然不十分清楚，如正常树鼩的生物学特性、基础生理指标、血液学及生化指标的正常参考值范围标准化等，使得该实验动物无法得到有效质量控制。这些都不同程度影响了实验结果的可靠性和真实性，树鼩实验动物标准化是解决上述问题的关键，但实现树鼩的实验动物标准化仍是需要攻克许多难关，建立树鼩的基础生理学数据库是其标准化建设的重要内容之一。同时对于开发树鼩作为新的实验动物资源，以及应用树鼩开展

人类疾病与动物模型研究具有重要意义。

## 第二节 驯养树鼩常规形态和解剖学数据

常规形态和解剖学数据指标作为实验动物主要的生物学特征，是直接描述动物体征的主要数据。灵长类近亲中缅树鼩（*Tupaia belangeri*）为单系起源的攀鼩目（Scandentia）树鼩科（Tupaiidae）[1, 2]。由于其特殊的生物学特性，已被广泛应用于医学和生物学研究，WHO也曾建议用树鼩代替濒危的非人灵长类动物进行科学实验。近年来，中国科学院昆明动物研究所、昆明医科大学、中国医学科学院医学生物研究所等单位开展了树鼩实验室规模化驯养繁殖并获得成功[3, 4]，加快了其实验动物标准化进程。本文广泛收集近年发表的实验室驯养树鼩的解剖学和生理学数据进行了全面比较与分析，为树鼩实验动物化提供基础数据。

### 一、体尺指标数据

体尺指标数据是实验动物的外部形态指标，包含体重、体长、颅长、尾长、躯干长、左前肢长、右前肢长、左后肢长及右后肢长等，主要反映动物生长发育及饲养管理正常与否。据Fuches（2010）的描述[5]，中缅树鼩*Tupaia*的体尺数据主要有：体重范围在50～270g之间；体长范围在12～21cm之间；尾长14～20cm，乳头数1～3对，怀孕周期41～55天，产仔数1～5只；新生仔体重8～10g，哺乳期约30天左右，离乳后约60天性成熟，正常平均寿命8～12年。我们自己获得的驯养树鼩体尺数据如下：

#### （一）体　重

一般树鼩出生后约3个月（90日龄）左右体重可接近或达到成年体重，成年实验室驯养树鼩的体重大致范围是雄性约在120～200g之间，平均大致（146.90 ± 1.27）g左右；雌性约在117～189g之间，平均为（135.47 ± 2.29）g左右。由于食物性质和生存环境的改变，特别是活动空间受到极大的压缩，通常驯养树鼩的总体平均体重会略低于同等年龄的野生树鼩体重，并且会在子一代及以后保持在一稳定范围。

#### （二）体　长

成年实验室驯养树鼩的体长大致范围是雄性约为14～17cm之间，平均（16.57 ± 0.47）cm左右；雌性约为14～16.5cm之间，平均约（16.38 ± 0.32）cm左右。

#### （三）颅　长

成年实验室驯养树鼩的颅长大致范围是雄性约为（4.90 ± 0.07）cm左右；雌性约为（4.50 ± 0.04）cm左右。

#### （四）尾　长

成年实验室驯养树鼩的尾长大致范围是雄性约为（17.32 ± 0.29）cm左右；雌性约为

（17.27 ± 0.26）cm左右。

### （五）四肢长

前肢长度范围在8.5 ~ 9.7cm之间，后肢长度范围在10.8 ~ 11.5cm之间。

有关驯养树鼩体尺指标的解剖学数据，李波作了较为细致的测量（表11–1）[6]。

表11–1　树鼩雌、雄个体解剖数据测量结果

| 测量项目（cm）Item (cm) | 雌Female (♀) *n*=35 | | | | | 雄Male (♂) *n*=35 | | | | | *P* |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 平均值 Mean | 标准差 SD | 中位数 Medium | 四分位数 DL | 四分位数 DU | 平均值 Mean | 标准差 SD | 中位数 Medium | 四分位数 DL | 四分位数 DU | |
| 体高 Body height | 7.20 | 0.55 | 7.20 | 7.00 | 7.50 | 6.93 | 0.25 | 7.00 | 6.80 | 7.10 | * |
| 体长 Body length | 16.68 | 0.48 | 16.50 | 16.50 | 17.00 | 16.59 | 0.43 | 16.60 | 16.40 | 16.80 | |
| 尾长 Tail length | 16.73 | 0.71 | 17.00 | 16.50 | 17.00 | 16.85 | 0.64 | 17.00 | 16.50 | 17.30 | |
| 尾/体比 Tail/Body | 1.00 | 0.05 | 1.01 | 0.97 | 1.03 | 1.02 | 0.04 | 1.02 | 0.98 | 1.04 | |
| 体斜长 Body slanting length | 10.67 | 0.38 | 10.60 | 10.50 | 11.00 | 11.38 | 0.39 | 11.50 | 11.10 | 11.70 | ** |
| 胸宽 Chest width | — | — | 3.20 | 3.10 | 3.40 | — | — | 3.40 | 3.20 | 3.50 | |
| 胸深 Chest depth | 4.88 | 0.37 | 5.00 | 4.70 | 5.00 | — | — | 5.40 | 5.20 | 5.50 | ** |
| 躯干长 Torso length | — | — | 9.00 | 9.00 | 10.00 | 10.18 | 0.55 | 10.30 | 9.90 | 10.50 | ** |
| 左前肢长 Left forelimb length | — | — | 9.00 | 8.70 | 9.20 | 9.47 | 0.33 | 9.40 | 9.20 | 9.80 | ** |
| 右前肢长 Right forelimb length | — | — | 9.00 | 8.80 | 9.20 | 9.31 | 0.36 | 9.30 | 9.10 | 9.50 | ** |
| 左后肢长 Left hind limb length | 11.07 | 0.32 | 11.00 | 11.00 | 11.30 | 11.20 | 0.51 | 11.30 | 11.10 | 11.40 | |
| 右后肢长 Right hind limb length | 11.08 | 0.30 | 11.00 | 11.00 | 11.20 | 11.30 | 0.25 | 11.30 | 11.10 | 11.50 | ** |
| 左耳长 Left ear length | 1.56 | 0.23 | 1.60 | 1.50 | 1.70 | — | — | 1.20 | 1.10 | 1.20 | ** |
| 右耳长 Right ear length | 1.56 | 0.20 | 1.60 | 1.50 | 1.70 | — | — | 1.20 | 1.10 | 1.20 | ** |
| 左耳宽 Left ear width | 1.55 | 0.14 | 1.50 | 1.50 | 1.70 | — | — | 1.70 | 1.60 | 1.70 | ** |
| 右耳宽 Right ear width | 1.58 | 0.14 | 1.60 | 1.50 | 1.70 | — | — | 1.70 | 1.60 | 1.70 | * |
| 龙骨长 Keel bone length | 1.04 | 0.13 | 1.10 | 0.90 | 1.10 | — | — | 1.20 | 1.10 | 1.20 | ** |
| 左胫长 Left Tibia length | 3.55 | 0.23 | 3.50 | 3.40 | 3.70 | — | — | 3.20 | 3.10 | 3.30 | ** |
| 右胫长 Right tibia length | 3.54 | 0.26 | 3.50 | 3.30 | 3.80 | — | — | 3.20 | 3.10 | 3.30 | ** |
| 十二指肠长 Duodenum length | 10.66 | 2.37 | 11.00 | 9.50 | 12.00 | 12.33 | 2.67 | 12.00 | 10.00 | 14.00 | ** |
| 空肠长 Jejunum length | 47.76 | 5.13 | 48.00 | 44.00 | 50.00 | 39.70 | 7.08 | 40.00 | 32.00 | 46.00 | ** |
| 回肠长 Ileum length | 25.68 | 5.00 | 27.00 | 22.00 | 28.00 | 23.11 | 4.07 | 23.00 | 20.40 | 25.00 | * |
| 盲肠长 Cecum length | 2.19 | 0.36 | 2.20 | 2.00 | 2.50 | 2.24 | 0.37 | 2.20 | 2.00 | 2.50 | |
| 结肠长 Colon length | 5.99 | 1.14 | 6.00 | 5.00 | 7.00 | 5.42 | 0.78 | 5.20 | 5.00 | 6.00 | * |
| 直肠长 Rectum length | 1.75 | 0.48 | 1.70 | 1.50 | 2.10 | 1.69 | 0.41 | 1.60 | 1.50 | 2.00 | |
| 左子宫体长 Left uterine body length | — | — | 1.00 | 0.90 | 1.10 | — | — | — | — | — | — |
| 左子宫角长 Left uterine horns length | 1.32 | 0.24 | 1.25 | 1.10 | 1.50 | — | — | — | — | — | — |
| 右子宫体长 Right uterine body length | 1.07 | 0.26 | 1.00 | 0.90 | 1.10 | — | — | — | — | — | — |
| 右子宫角长 Right uterine horns length | 1.29 | 0.26 | 1.20 | 1.10 | 1.50 | — | — | — | — | — | — |
| 阴道长 Vagina length | 2.10 | 0.58 | 2.00 | 1.70 | 2.45 | — | — | — | — | — | — |
| 阴茎长 Penis length | — | — | — | — | — | 3.57 | 0.33 | 3.50 | 3.30 | 3.80 | |

“—”：由于无对应值或数据非正态分布产生的统计缺省值。

“—”: missing values because of no corresponding or data non–normal distribution. *：$P<0.05$，**：$P<0.01$。

引自文献6，并征得版权者《动物学研究》允许。

## 二、主要脏器指标数据

在毒理学领域，尤其作为人类疾病动物模型，任何药物导致的任意器官参数的改变，都预示着潜在的药物作用机理或毒理。实验动物的主要脏器指标数据是药物安全评价的重要指征，几个重要的脏器脑、肝、心、肾、睾丸、肾上腺、脾脏、胸腺等是生物毒理学主要评价的靶点。评价甲状腺、丘脑下垂体在除小鼠外的所有实验动物也是必不可少，评价性成熟动物的生殖器官也是生殖毒理学的核心内容。因此，建立树鼩主要脏器指标数据库，是使其成为标准化实验动物的重要前提。

近年来，随着树鼩作为实验动物受到广泛重视，它的上述指标已经有许多报道[6~8]，并且分别对驯养树鼩和野生树鼩进行了个脏器重量、脏器系数的性别差异分析。结果显示驯养树鼩的雌、雄个体脑重量差异不显著（$P>0.05$），系数差异显著（$P<0.05$），体重差异极显著（$P<0.01$），而野生树鼩的结果相反[6]。表11–2显示树鼩雌、雄个体脏器重量及系数的测量结果。

表11–2　树鼩雌、雄个体脏器重量及系数的测量结果

| 测定项目 Item | 雌Female (♀) $n$=35 | | 雄Male (♂) $n$=35 | | $P_1$ | $P_2$ |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 脏器重量（g） Organ weight (g) | 脏器系数（%） Organ coefficient (%) | 脏器重量（g） Organ weight (g) | 脏器系数（%） Organ coefficient (%) | | |
| 体重 Body weight | 115.51 ± 5.43 | — | 125.82 ± 11.28 | — | ** | |
| 心脏 Heart | 0.62 ± 0.09 | 0.54 ± 0.07 | 0.85 ± 0.12 | 0.68 ± 0.08 | ** | ** |
| 肺脏 Lung | 1.06 ± 0.17 | 0.92 ± 0.15 | 1.27 ± 0.16 | 1.02 ± 0.13 | ** | ** |
| 肝脏 Liver | 3.86 ± 0.53 | 3.35 ± 0.52 | 4.09 ± 0.51 | 3.25 ± 0.31 | | |
| 脾脏 Spleen | (0.13) | (0.11) | 0.15 ± 0.03 | 0.12 ± 0.02 | ** | |
| 左肾 Left kidney | 0.48 ± 0.05 | 0.41 ± 0.04 | 0.54 ± 0.06 | 0.43 ± 0.04 | ** | |
| 右肾 Right kidney | 0.47 ± 0.05 | 0.40 ± 0.04 | 0.53 ± 0.07 | 0.42 ± 0.04 | ** | * |
| 胃 Stomach | 0.91 ± 0.09 | 0.79 ± 0.09 | 0.90 ± 0.10 | 0.72 ± 0.10 | | ** |
| 膀胱 Bladder | 0.08 ± 0.02 | (0.07) | 0.13 ± 0.03 | 0.10 ± 0.02 | ** | ** |
| 小肠 Small intestine | 4.20 ± 0.73 | 3.65 ± 0.66 | 3.83 ± 0.74 | 3.08 ± 0.66 | * | ** |
| 大肠 Large intestine | 2.02 ± 0.45 | 1.75 ± 0.06 | 1.86 ± 0.4 | 1.49 ± 0.33 | | ** |
| 脑 Brain | 2.97 ± 0.18 | 2.58 ± 0.19 | 3.05 ± 0.19 | 2.44 ± 0.21 | ** | |
| 小脑 Cerebellum | 0.50 ± 0.07 | 0.44 ± 0.07 | 0.52 ± 0.09 | 0.41 ± 0.08 | | |
| 左海马 Left hippocampus | 0.09 ± 0.04 | 0.08 ± 0.03 | 0.12 ± 0.02 | 0.09 ± 0.02 | ** | * |
| 右海马 Right hippocampus | 0.08 ± 0.02 | 0.07 ± 0.02 | 0.12 ± 0.03 | 0.09 ± 0.03 | ** | ** |
| 脑垂体 Pituitary | (0.0038) | (0.0033) | 0.0046 ± 0.0027 | 0.0037 ± 0.0023 | | |
| 左颌下腺 Left submaxillary gland | 0.18 ± 0.03 | 0.15 ± 0.03 | (0.21) | (0.17) | ** | * |
| 右颌下腺 Right submaxillary gland | 0.17 ± 0.03 | 0.15 ± 0.02 | 0.20 ± 0.05 | 0.16 ± 0.04 | * | |
| 左腮腺 Left parotid | 0.16 ± 0.03 | 0.14 ± 0.03 | 0.17 ± 0.04 | 0.13 ± 0.04 | | |
| 右腮腺 Right parotid | 0.16 ± 0.03 | 0.14 ± 0.03 | 0.16 ± 0.04 | 0.13 ± 0.04 | | |
| 胸腺 Thymus | 0.05 ± 0.03 | 0.05 ± 0.02 | 0.06 ± 0.02 | 0.05 ± 0.02 | | |
| 胰腺 Pancreas | 0.52 ± 0.11 | 0.45 ± 0.09 | 0.52 ± 0.13 | 0.41 ± 0.1 | | |
| 左肾上腺 Left adrenal | 0.0228 ± 0.0059 | 0.0198 ± 0.0052 | 0.0196 ± 0.005 | 0.0157 ± 0.0038 | * | ** |
| 右肾上腺 Right adrenal | (0.0225) | (0.0196) | 0.0211 ± 0.0047 | 0.0168 ± 0.0035 | | * |
| 左甲状腺 Left thyroid | 0.0056 ± 0.0038 | 0.0049 ± 0.0034 | 0.0089 ± 0.0053 | 0.0071 ± 0.0044 | ** | * |
| 右甲状腺 Right thyroid | 0.0055 ± 0.0038 | 0.0048 ± 0.0033 | 0.009 ± 0.0057 | 0.0072 ± 0.0046 | ** | * |
| 左卵巢 Left ovary | 0.0048 ± 0.0024 | 0.0041 ± 0.0021 | — | — | | |
| 右卵巢 Right ovary | 0.0047 ± 0.0024 | 0.0041 ± 0.0021 | — | — | | |
| 子宫 Uterus | 0.2 ± 0.08 | 0.17 ± 0.06 | — | — | | |
| 左尿道球腺 Left bulbourethral gland | — | — | (0.0282) | (0.0215) | | |
| 右尿道球腺 Right bulbourethral gland | — | — | (0.0308) | (0.0248) | | |

续表11–2

| 测定项目 Item | 雌Female (♀) *n*=35 | | 雄Male (♂) *n*=35 | | $P_1$ $P_2$ |
|---|---|---|---|---|---|
| | 脏器重量（g） Organ weight (g) | 脏器系数（%） Organ coefficient (%) | 脏器重量（g） Organ weight (g) | 脏器系数（%） Organ coefficient (%) | |
| 阴茎 Penis | — | — | 0.29 ± 0.1 | 0.23 ± 0.07 | |
| 左睾丸 Left testis | — | — | 0.47 ± 0.1 | 0.37 ± 0.07 | |
| 右睾丸 Right testis | — | — | 0.46 ± 0.09 | 0.36 ± 0.06 | |
| 左精囊腺 Left seminal vesicle | — | — | (0.09) | (0.07) | |
| 右精囊腺 Right seminal vesicle | — | — | 0.09 ± 0.03 | 0.07 ± 0.02 | |
| 前列腺 Prostate | — | — | 0.07 ± 0.02 | 0.05 ± 0.02 | |

$P_1$：脏器重量比较，*：$P_1<0.05$，**：$P_1<0.01$。$P_2$：脏器系数比较，*：$P_2<0.05$，**：$P_2<0.01$；“—”：由于无对应值产生的缺省；由于数据非正态分布用“（中位数）”描述数据的集中趋势。

$P_1$: Comparison of organ weight, *: $P_1<0.05$, **: $P_1<0.01$; $P_2$: Comparison of organ coefficient, *: $P_2<0.05$, **: $P_2<0.01$; Hyphens in the table are missing values because of no corresponding date; Describe the central tendency of the data using Median because data showed non-normal distribution.

引自文献6，并征得版权者《动物学研究》允许。

李波[6]在驯养树鼩中脏器及其系数的测定分析结果，与野生树鼩研究结果相比，个体心脏、肝脏、肺脏、胰腺、脑及肠等均存在差异[7, 8]。其中，雌、雄个体心脏重量与系数差异极显著（$P<0.01$），这与野生成年个体情况一致，但重量较轻，而肝脏重量小，胰腺重量大，且其重量与系数差异均不显著（$P>0.05$）[8]。

当然，脏器系数其实也有一定局限性，脏器系数又称脏体比，是实验动物某脏器的重量与其体重之比值。脏器系数增大，表示脏器充血、水肿或增生肥大等；脏器系数减小，表示脏器萎缩及其它退行性改变。一般选用肝、肾、脑、肺、脾、心、睾丸等主要脏器，或根据实验要求进行选择。实验结果应与同时进行的对照组比较，并进行统计学处理。脏器系数是毒理实验中常用的指标。正常时各脏器与体重的比值比较恒定。但异常条件下，动物体重受饲养环境、营养、气候条件等诸多因素干扰而波动变大，因而会出现无法区分究竟是体重，或是受损脏器重量发生改变导致的脏器系数改变。

而另一参数：脏脑比系数，则较理想地表示脏器的分量。脏脑比脏器系数是受试动物的实质器官的重量与脑重的比值。成熟动物的脑重和脑容量都是一个比体重更稳定的值。由此可以确认，脑重或脑容量可以成为动物较为恒定的基准重量，脏脑比系数因此可以较为准确地表达出某一脏器重量占该动物的分量值。

## 三、脑容量数据

核磁共振（MRI）脑影像学研究表明，脑容量具有很高的遗传度，并且与智商和记忆等认知能力高度相关[9, 10]。另外，脑容量在多种精神疾病（如精神分裂症）患者中均发生了明显改变[11]，因此了解脑容量的遗传基础对于人类研究精神疾病的发病机制以及神经发生的分子机制都具有重要的意义。有关树鼩活体下的脑容量现有的报道主要有全脑、海马、杏仁核三部分。

### （一）全　脑

据Wang[12]的核磁共振（MRI）脑影像学测量，活体下整个树鼩的全脑容量大致范围是（3495.4 ± 184.8）$mm^3$左右，如果切除小脑和嗅球的话大致范围在（2568.4 ± 116.7）$mm^3$左右。

### （二）海　马

海马（hippocampal region）是大脑边缘系统的一部分。海马区可分为：齿状回（dentategyrus）、下托（subiculum）、前下托（presubiculum）、傍下托（parasubiculum）、内嗅皮质（entorhinal cortex）。其中齿状回、海马、下托的细胞层为单层，合称“海马结构（hippocampal formation）”，其上下夹有低细胞密度层和无细胞层。此外的部位由复数的层面构成。齿状回与海马的单层构造对神经解剖学以及电生理学的研究进步做出了贡献。

海马区域涉及人类学习、记忆等重要功能。因此，对于大脑整体功能而言，海马神经元在其中的作用举足轻重。Frauke[13]曾经分析了左右海马的容积差异：右边和左边的海马体积大致范围是（85.2 ± 6.7）$mm^3$和（87.4 ± 9.1）$mm^3$，个体间的变动范围不超过10%；若动物经历约4周的慢性外源可的松（cortisol）每天5mg/kg剂量的处理，海马体积可缩小10% ~ 15%。Wang[12]后来的测量结果为人工驯养条件下雄性活体树鼩海马容量大致为（158.5 ± 8.8）$mm^3$，与Frauke Ohl[13]的测量结果基本接近。

### （三）杏仁核（amygdale）

双侧杏仁核合计体积在活体下测量结果（MRI测量）是（64.3 ± 3.4）$mm^3$，进一步推算，在树鼩中海马和杏仁核在整个大脑所占的容积比分别是（6.2 ± 0.2）%和（2.5 ± 0.1）%，而在Sprague-Dawley（SD）大鼠这一数据是（7.2 ± 0.3）%和（1.5 ± 0.2）%。进一步计算杏仁核/海马的比值，树鼩和大鼠的分别0.41 ± 0.01和0.20 ± 0.03（$P<0.0001$, two-tailed Student’s t-test）[12]。而在我们人类，一个成年人的海马和杏仁核的体积分别占整个大脑的（0.85 ± 0.11）%和（0.57 ± 0.03）%[14]。同时有报道成年人杏仁核/海马的比值大约是0.67左右[14 ~ 16]。

## 第三节　驯养树鼩的基础生理学指标

树鼩具有对应激高度敏感、能自发应激相关的各类精神疾病、糖尿病、可感染人类乙肝和丙肝等特点，因而成为理想的新型人类疾病动物模型受到广泛关注[17 ~ 20]。然而，弄清树鼩的基础生理指标尤其是和疾病相关的内分泌学生理指标（如糖代谢和应激激素水平等），是进行树鼩疾病模型其它相关研究的重要基础。

### 一、基础身体指标

目前已报道的树鼩基础身体指标主要是有体重、日饮食饮水量、收缩压、舒张压、心率、核心体温等常规身体数据和应激相关的睾酮、雌二醇以及皮质醇等基础内分泌学指标[5, 21 ~ 24]。尤其心率和血压是代表生命活动的最基本核心体征，树鼩的活动性异常活跃，其中作为重要生命体征的心率在正常树鼩的参考值范围显著地高于其它哺乳类，而血压正常参考值范围没有显著性差异。

### （一）心　率

树鼩是一种活动性异常活跃的动物，因而在白昼间的心率、血压随行为、情绪状态有较大波动范围，成年实验室驯养树鼩的心率大致范围是雄性约为（357.00 ± 31.00）beats/min[21]；雌性约为（335.91 ± 62.81）beats/min左右。如此高的心脏跳动频率在所有哺乳动物中都是罕见的，

而且据我们的日常观察，树鼩事实上在情绪兴奋状态时的心率最大可达600beats/min左右。说明树鼩的自身心血管调节功能非常强大，这一有趣的现象提示我们树鼩可能在这方面很可能是一个非常好的心血管疾病动物模型。仝品芬（2013）用改良的方法分别对野生、驯养及不同年龄树鼩心率进行测定，结果显示静息状态下野生成年树鼩、自繁成年树鼩和青幼年树鼩心率分别为（394.33 ± 37.74）BPM、（351.61 ± 72.76）BPM和（378.19 ± 69.04）BPM，野生和自繁成年树鼩组差异有显著性（$P<0.05$）[24]。而且在受到外界因子刺激，或者情绪高度兴奋状态时可达650BPM左右[5]。

### （二）血　压

成年实验室驯养树鼩的血压大致范围是雄性约为收缩压（20.92 ± 0.04）kPa，舒张压（11.81 ± 2.88）kPa；雌性约为收缩压（19.32 ± 0.06）kPa，舒张压（10.96 ± 2.03）kPa[21, 24]。

值得一提的是仝品芬采用改良后的方法，较为细致地建立健康树鼩的心率、血压正常值参考范围。虽然采用的是大鼠专用仪器，而不是遥控测量技术，所得数据的可靠性可能排除不了捕获惊吓、束缚应激等影响，但至少是比较探入细致地探讨了野生和驯养条件下、不同性别、不同年龄树鼩心率、血压的差异。野生成年树鼩雄雌的平均动脉压分别为（111.57 ± 12.9）mmHg和（113.58 ± 20.89）mmHg；而驯养成年的是（114.50 ± 18.48）mmHg和（100.67 ± 17.15）mmHg；相比较而言驯养的略低于野生的，而驯养条件下幼年树鼩雄雌的平均动脉压分别高达（129.78 ± 16.43）mmHg和（123.75 ± 15.56）mmHg，显著高于成年组[24]。

### （三）其它基础身体指标

有关树鼩日饮食饮水量、收缩压、舒张压、心率、核心体温、睾酮、雌二醇以及皮质醇等基础身体指标数据，较为系统的见Wang, 2013; Fuches, 2009[5, 21]。尤其有代表性的是Wang详细地记录了驯养条件下$F_1$代树鼩的日常饮食饮水量、收缩压、舒张压、糖耐量、睾酮、雌二醇和皮质醇等基础生理指标，为后续建立树鼩动物模型奠定基础。

我们通过长期观察测量的体重、日饮食饮水量、收缩压、舒张压、心率、核心体温、睾酮、雌二醇以及皮质醇等基础身体指标（表11–3）。与现有的啮齿类和非人灵长类基础数据相比，如大鼠和猕猴，树鼩具有较高的心率和核心体温，暗示与其高活动性有密切关系；树鼩的收缩压更接近猕猴；并且树鼩的应激相关激素是皮质醇，与猕猴、人一样，然而大鼠的应激相关激素是皮质酮（表11–4）。

**表11–3　驯养树鼩的基础生理指标**

| | 指　标 | 树　鼩 |
|---|---|---|
| 身体指标 | 体重（g） | 147.90 ± 1.23 |
| | 饮食量（g/d） | 116.40 ± 8.09 |
| | 饮水量（mL/d） | 4.33 ± 1.38 |
| | 核心体温（℃） | 39.59 ± 0.05 |
| | 活动高峰 | 17：30 ~ 19：30 |
| 心血管 | 收缩压（kPa） | 20.92 ± 0.04 |
| | 舒张压（kPa） | 11.81 ± 2.88 |
| | 心率（beats/min） | 357.00 ± 31.00 |
| 性激素 | 睾酮（T, ng/mL） | 0.13 ± 0.01 |
| | 雌二醇（E2, ng/mL） | 42.29 ± 3.36 |

续表11–3

| | 指　标 | 树　鼩 |
|---|---|---|
| 糖代谢 | 空腹血糖（FBG, mmol/L） | 6.20 ± 0.84 |
| | 餐后血糖（PBG, mmol/L） | 10.46 ± 1.59 |
| | 糖水敏感浓度 | 5% |
| 应激相关激素 | 皮质醇（ng/mL） | 200.89 ± 14.24 |
| | 去甲肾上腺素（NE, ng/mL） | 1.51 ± 0.03 |
| | 促肾上腺皮质激素（ACTH, pg/mL） | 57.35 ± 3.17 |
| | 皮质激素释放激素（CRH, pg/mL） | 64.55 ± 2.13 |
| | 尿液皮质醇（ng/mL） | 0.63 ± 0.06 |

表11–4　树鼩、大鼠和猕猴基础生理指标比较

| | 指标 | 大鼠 | 树鼩 | 猕猴 |
|---|---|---|---|---|
| 身体指标 | 核心体温（℃） | 38.80 ± 0.21 | 39.59 ± 0.05 | 38.70 ± 0.26 |
| 心血管 | 收缩压（kPa） | 17.29 ± 1.06 | 20.92 ± 0.04 | 24.10 ± 3.67 |
| | 舒张压（kPa） | 11.70 ± 2.13 | 11.81 ± 2.88 | 18.79 ± 3.50 |
| | 心率（beats/min） | 289.86 ± 18.36 | 357.00 ± 31.00 | 157.92 ± 12.59 |
| 糖代谢 | FBG（mmol/L） | 7.80 ± 2.67 | 6.20 ± 0.84 | 4.65 ± 0.53 |
| 应激相关激素 | 皮质醇（ng/mL） | — | 200.89 ± 14.24 | 107.80 ± 17.60 |
| | 皮质酮（ng/mL） | 171.18 ± 39.98 | — | — |
| | ACTH（pg/mL） | 22.88 ± 7.41 | 57.35 ± 3.17 | 77.88 ± 21.34 |

表11–3和表11–4引自文献21，并征得版权者《动物学研究》允许。

## 二、脑电（electroencephalograms，EEG）

脑电功率谱显示，麻醉状态的树鼩，海马脑区和大脑皮层都是delta波（δ，1～4Hz）占主导地位（图11–1）。从图11–1中可看出，树鼩的脑动电图无论海马脑区或是大脑皮层都显示无性别差异。

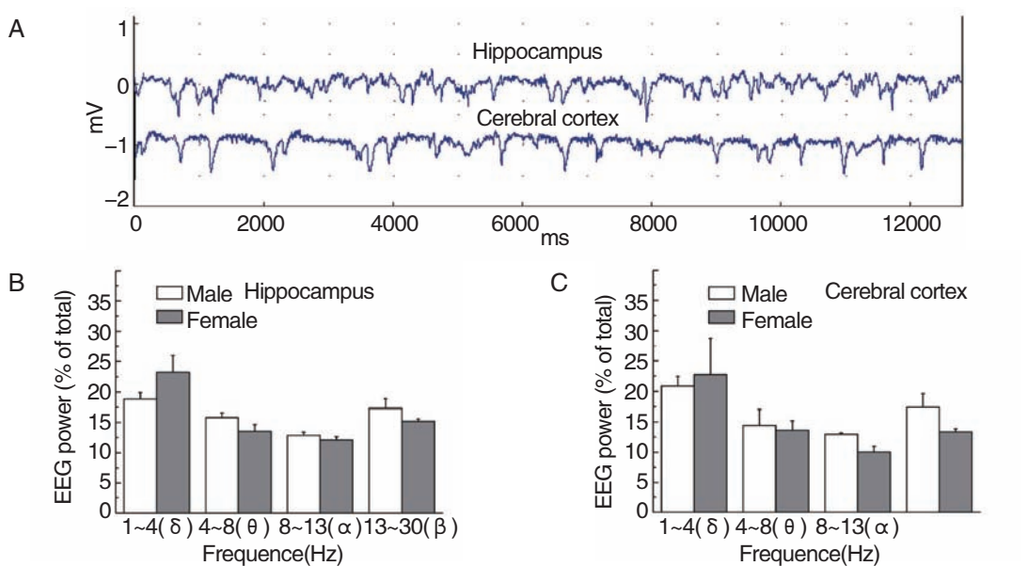



**图11–1　树鼩海马和皮层的脑电图**

雌雄树鼩的脑电功率谱相同，没有差异。树鼩海马（B）和皮层（C）在麻醉状态下以δ波为主。

引自文献21，并征得版权者《动物学研究》允许。

## 三、生理节律

### （一）活动性节律

树鼩系昼行性动物，与我们人类一样是白天活动，晚上睡觉。且光照是影响近似昼夜节律的主要因素。野生树鼩以黎明和黄昏时最为活跃，中午活动较少，实验室饲养的树鼩喜在笼内作翻滚蹿跳活动，能量消耗较大。运动节律检测从8：00～20：00之间树鼩在饲养笼中垂直运动距离，结果显示为了适应实验室环境，驯养树鼩的活动性高峰与野生树鼩不同，主要集中在17：30～19：30之间，没有早高峰（图11–2A）。而Fuches（2010）的观察结果略有不同，他认为实验室驯养树鼩每天在8：30～11：00和16：00～20：00之间分别各出现一次活动高峰[5]。

### （二）尿液皮质醇节律

尿液皮质醇节律检测从8：00～20：00之间树鼩尿液皮质醇的含量，结果显示树鼩尿液皮质醇节律有两个高峰（图11–2B）：早上8：00和下午17：00，与野生树鼩相匹配。

### （三）核心体温节律

Wang[21]连续对驯养树鼩在整个白昼间的核心体温节律做了细致记录，通过肛温表检测，发现树鼩一天之内最低体温为38.7℃，最高体温接近40℃（图11–2C）。而据Fuches[5]的观察：夜间树鼩的体温最低可低至35℃，昼间最高体温也是达到40℃。这种昼夜温差高达5℃的体温差，在所有恒温动物中都是非常罕见的。说明树鼩有着非常好的体温代谢调节能力。

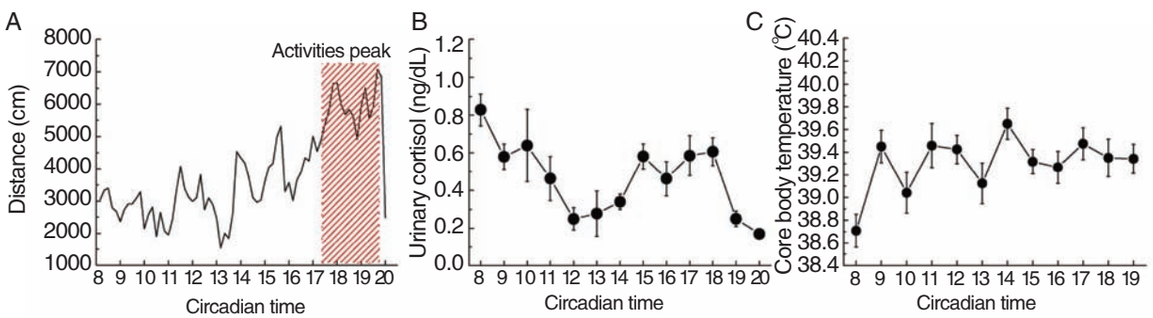



**图11–2　活动性、尿液皮质醇和核心体温的昼夜节律**

（A）活动节律；活动高峰期在17：30～19：30之间；（B）尿液皮质醇节律；尿液皮质醇高峰有两个，分别是8：00和17：00；（C）核心体温节律；最低体温是38.7℃，最高体温是40℃。

引自文献21，并征得版权者《动物学研究》允许。

## 四、糖代谢指标

Wang通过尾部采血检测树鼩进食前1小时的空腹血糖以及进食后1小时的餐后血糖，结果发现餐后血糖为空腹血糖的两倍（图11–3A）。通过对比树鼩与大鼠的糖耐量发现树鼩给予2g/kg蔗糖后30分钟内血糖上升较大鼠快，但是6小时后血糖依然维持在较高水平（图11–3B），说明树鼩更加适合做糖尿病模型，也可能是树鼩易自发糖尿病的生理基础[21]。糖水偏爱度测试结果显示树鼩最喜爱的糖水浓度为5%（图11–3C），而大鼠最偏爱的糖水浓度是1%。在糖耐量测试中，树鼩

较大鼠对糖更加敏感，但是其对糖的代谢能力较差，预示着树鼩是一种很好的自发糖尿病动物模型，可用于研究糖尿病的发病机理[25]。

我们的结果补充了对树鼩基础生理特点的认识，为后续建立树鼩动物模型奠定了基础。

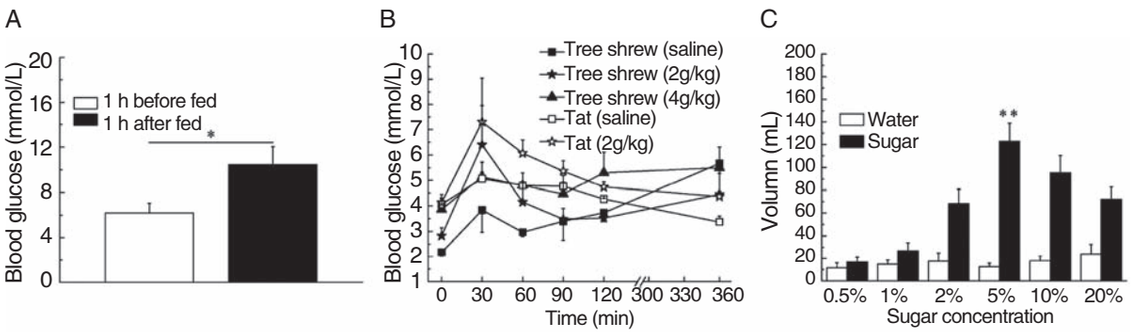



**图11–3　树鼩血糖和糖水偏爱浓度测量**

（A）PBG显著高于FBG；（B）在OGTT检测中，0点血糖检测后，分别在灌胃（i. g.）给予树鼩和SD大鼠葡萄糖/生理盐水后30分钟、60分钟、90分钟、120分钟和360分钟检测血糖；（C）5%是树鼩最喜爱的糖水浓度。*：$P<0.05$，**：$P<0.01$。

引自文献21，并征得版权者《动物学研究》允许。

## 五、应激内分泌学指标

树鼩是高活动性动物，善攀爬，动作敏捷，它的最大特点是高度的应激敏感性。在实验室饲养条件下，树鼩对噪音、温度、湿度、光照的变化都异常敏感，室内环境在空气净化湿度及运动宽敞都没有野外的自然条件好。饲养笼内，压抑、躁动不安，树鼩频繁跳跃会导致在笼壁上的撞击易使得鼻部上方皮肤溃烂，鼻骨断裂或鼻腔出血。同时，一旦有外界刺激或惊吓它们会迅速逃进暗箱，这一过程同样容易造成身体表面损伤，长期如此树鼩易产生应激。这些应激刺激有机体，激活免疫系统，释放细胞因子，发生炎性反应，如肺炎、肠胃炎、肾出血等疾病，导致生长受阻、采食量下降、能量消耗增加，繁殖率下降，以及脑功能的受损出现抑郁样行为，即应激相关的系列症状。

要监测树鼩的应激状态，获得应激相关的内分泌学参数就非常重要。通常应激相关的内分泌学指标有皮质醇（cortisol）、去甲肾上腺素（norepinephrine, NE）、雄性成年树鼩的睾酮（testosterone）、促肾上腺皮质激素（adrenocorticotrophic hormone, ACTH）、促肾上腺皮质激素释放素（corticotrophin releasing hormone, CRH）等。Wang J[21]较详细地报道了树鼩的应激相关荷尔蒙的标准值范围（表11–3）；Susan Kohlhause的研究结果显示，正常成年树鼩的去甲肾上腺素（noradrenaline）均值约（82.6 ± 10.1）pg/μmol crea，应激后约（121.4 ± 12.3）pg/μmol crea；皮质醇约（1.66 ± 0.12）ng/μmol crea和（2.29 ± 0.21）ng/μmol crea；睾酮约（0.32 ± 0.02）ng/μmol crea和（0.18 ± 0.02）ng/μmol crea[26]。上述数据在树鼩模型研究运用中，尤其是应激相关精神疾病动物模型中的核心监测内容。

## 第四节 存在问题与展望

一个成功的人类疾病动物模型，要满足四个方面的要求：第一，动物模型与替代的原型生命活动特征的相似性；第二，模型能够对原型的可替代性；第三，对模型的研究，必须得出与原型一致的信息，尤其是生理学指标的改变能够再现原型的改变过程；第四，对于人类疾病动物模型而言，最重要的是要在生理学指标改变的过程中，能够还原或提示人类的病因学过程和机理，这一点要从模型的药物治疗预见性实验中得到体现。

就动物模型的生理学指标评价而言，生命活动是一个时时刻刻都在动态变化的过程。从本文的生物节律章节中可看出，个体生理学的各项指标都会随节律时间点的不同而变化。而已经发表的众多生理指标研究报道都忽略这一因素，从而造成许多同类结果众说纷纭。例如，我们在研究树鼩抑郁症动物模型中发现，应激诱发皮质醇水平的持续改变，包括药物治疗的效果，在不同节律时间点的比较可能会得出不同的结论（图11–4A），应激组树鼩大约需要连续经历3周的心理应激后皮质醇水平才趋于稳定（图11–4B）[27]。

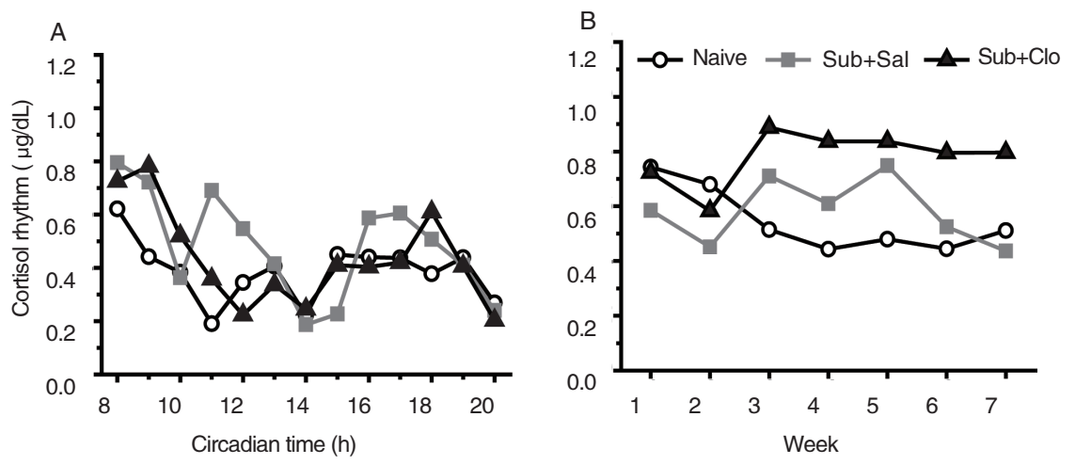



**图11–4 Naive为空白对照组树鼩；Sub+Sal为慢性应激组；Sub+Clo为慢性应激药物治疗组**

（A）显示应激当日树鼩的活动节律时间段内在8：00～20：00之间每隔1小时的尿液皮质醇Cortisol水平；（B）显示经历连续应激7周过程中树鼩的每周平均的皮质醇Cortisol水平。

仿自文献26。

另一方面，绝大多数生理指标的测定都需要抓握、固定、麻醉甚至处死动物来实现测量或取材获得数据，树鼩是一种活动性极强和擅长跳跃攀爬的动物，造成抓握困难，从而最终将其控制的过程会长短不一；而且树鼩对心理应激高度敏感，过长的惊吓本身就会导致各项生理学、内分泌学指标迅速发生较大改变。若是处死动物取材的话，各器官无论宏观上或者微观（细胞，甚至分子层面）水平上更是迅速改变。相信遥测技术（telemetric study）；核磁共振成像技术

（volumetric MRI measurements）；正电子发射计算机断层扫描（in vivo PET）等设备和技术的应用，将会使得保证动物模型活体，甚至无痛、无创获得更为客观真实的生理学指标成为可能。中国科学院动物模型与人类疾病机理重点实验室已为此做了许多有益的尝试。

## 参考文献

[1]彭燕章，叶智彰，邹如金，等．树鼩生物学．昆明：云南科技出版社，1991．
[2]徐林，张云，梁斌，等．实验动物树鼩和人类疾病的树鼩模型研究概述．动物学研究，2013，34（2）：59–69.
[3]沈培清，郑红，刘汝文，等．中国树鼩实验动物化研究进展和展望．动物学研究，2011，32（1）：109–14.
[4]江勤芳，匡德宣，仝品芬，等．树鼩规模化繁殖及繁殖群的建立．实验动物科学，2011，28（6）：35–8.
[5]Hubrecht R, Kirkwood J. The UFAW handbook on the care and management of laboratory and other research animals: Tree Shrew. Eighth Edition. Singapore: Robert Hubrecht and James Kirkwood, 2009: 262-75.
[6]李波，张荣平，李进涛，等．树鼩解剖数据的测定与分析．动物学研究，2013，4（2）：132–8.
[7]何保丽，刘汝文，陈丽玲，等．树鼩脏器系数的测定及脏器重量与体重相关性的探讨．实验动物科学，2008，25（5）：17–9.
[8]叶尤松，罕园园，黄璋琼，等．野生成年树鼩主要脏器重量及脏器系数的测定分析．中国比较医学杂志，2011，21（4）：62–5.
[9]Griffith H, Pyzalski R, O'Leary D, et al. A controlled quantitative MRI volumetric investigation of hippocampal contributions to immediate and delayed memory performance. J Clin Exp Neuropsychol, 2003, 25(8): 1117-27.
[10]Sharma T, Lancaster E, Lee D, et al. Brain changes in schizophrenia. Volumetric MRI study of families multiply affected with schizophrenia—the Maudsley Family Study 5. Br J Psychiat, 1998, 173: 132-8.
[11]张丽华，李明，施晓东，等．精神分裂症易感基因DKK4与中国人群大脑容量的相关性．动物学研究，2011，32（1）：62–5.
[12]Wang S, Shan D, Dai J, et al. Anatomical MRI templates of tree shrew brain for volumetric analysis and voxel-based morphometry. J Neurosci Methods, 2013, 220(1): 9-17.
[13]Ohl F, Michaelis T, Fujimori H, et al. Volumetric MRI measurements of the tree shrew hippocampus. J Neurosci Methods, 1999, 88(2): 189-93.
[14]Watson C, Andermann F, Gloor P, et al. Anatomic basis of amygdaloid and hippocampal volume measurement by magnetic resonance imaging. Neurology, 1992, 42: 1743-50.
[15]Bernasconi N, Bernasconi A, Caramanos Z, et al. Mesial temporal damage in temporal lobe epilepsy: a volumetric MRI study of the hippocampus, amygdala and parahippocampal region. Brain, 2003, 126: 462-9.
[16]Bonne O, Brandes D, Gilboa A, et al. Longitudinal MRI study of hippocampal volume in trauma survivors with PTSD. Am J Psychiat, 2001, 158: 1248-51.
[17]Cao J, Yang EB, Su JJ, et al. The tree shrews adjuncts and alternatives to primates as models for biomedical research. J Med Primatol, 2003, 32(3): 123-30.
[18]Fuchs E. Social stress in tree shrews as an animal model of depression: An example of a behavioral model of a CNS disorder. CNS Spectr, 2005, 10(3): 182-90.
[19]Wang J, Zhou QX, Tian M, et al. Tree shrew models: a chronic social defeat model of depression and a one-trial captive conditioning model of learning and memory. Zool Res, 2011, 32(1): 24-30.
[20]Carter AM. Animal models of human placentation-a review. Placenta, 2007, 28: S41-7.
[21]Wang J, Xu XL, Ding ZY, et al. Basal physiological parameters in domesticated tree shrews (*Tupaia belangeri chinensis*). Zool Res, 2013, 34 (E2): E69-74.
[22]Coolen A, Hoffmann K, Barf RP, et al. Telemetric study of sleep architecture and sleep homeostasis in the day active tree shrew *Tupaia belangeri*. Sleep, 2012, 35(6): 879-88.
[23]角建林，俞志成，陈丽玲，等．树鼩心电图特征与分析．昆明医学院学报，2009，11：19–22.

[24]仝品芬，陆彩霞，江勤芳，等．树鼩血压和心率的无创测定．中国比较医学杂志，2013，23（4）：52–6.
[25]Liang B, Wu XY. Progress on nonhuman primate models of diabetes mellitus. Zool Res, 2011, 32(1): 91-6.
[26]Susan K, Kerstin H, Christina S, et al. Nocturnal hyperthermia induced by social stress in male tree shrews: Relation to low testosterone and effects of age. Physiol Behav, 2011, 104(5): 786-95.
[27]Wang J, Chai AP, Zhou QX, et al. Chronic clomipramine treatment reverses core symptom of depression in subordinate tree shrews. PLOS One, 2013, 18(12): e80980.



Tree shrews

# 第十二章 树鼩基础生理代谢

第一篇 树鼩基础生物学
TREE SHREW BASIC BIOLOGY

李昀海 张玉茹 廖莎莎 张治国 梁 斌

## 第一节 树鼩基础生理代谢

树鼩是灵长类近亲，在进化上比啮齿类更接近于人类。研究和阐明树鼩基础生理生化，特别是树鼩体重、空腹血糖、性别和年龄的关系，以及脂代谢关键途径和重要基因，为树鼩作为一种新型的实验动物和潜在的代谢性疾病如肥胖、糖尿病、脂肪肝、心脑血管疾病等动物模型奠定基础。

### 一、树鼩体重、空腹血糖、性别和年龄的关系

大量流行性病学研究发现，肥胖、糖尿病、脂肪肝、心脑血管疾病等代谢性疾病和体重、空腹血糖、性别和年龄间具有相关性。树鼩作为一种新型的实验动物和人类疾病动物模型，其体重、空腹血糖、性别和年龄之间是否也存在和人类似的相关性呢？这是了解树鼩作为人类代谢性疾病动物模型可行性的一个关键。

我们对中国科学院昆明动物研究所饲养的992只树鼩的体重、空腹血糖、性别和年龄的相关性开展了研究。992只树鼩中野外捕获后在昆明动物研究所驯养6个月以上的树鼩有571只（简称野生树鼩，wild）；人工繁殖后代树鼩421只（简称繁殖树鼩，bred）[1]。992只树鼩的平均体重为（128.66 ± 0.66）g，平均空腹血糖值为（3.91 ± 0.12）mM；其中野生树鼩的平均体重为（128.24 ± 0.52）g，平均空腹血糖值为（3.92 ± 0.06）mM；繁殖后代树鼩的平均体重为（129.22 ± 0.61）g，空腹血糖值为（3.88 ± 0.06）mM。这些结果表明，野生树鼩和繁殖后代树鼩的平均体重和空腹血糖值没有明显差别（图12–1A）。进一步研究分析发现，树鼩空腹血糖值会随着树鼩体重的增长而增加，呈正相关关系（图12–1B），相关系数$r$=0.125，$P$<0.001。

在人类中，男性与女性在体重、空腹血糖、脂肪指数和腰围等生理指标上是有区别[2, 3]，这种差别在其它非人灵长类动物如猕猴和狒狒中也同样存在[4~7]。在992只树鼩中，有538只树鼩是雌性，454只树鼩是雄性，雌雄比为1.18。树鼩性别对体重和空腹血糖有一定影响，相比较而言，雄性的树鼩的平均体重（133.71 ± 0.54）g和空腹血糖（4.16 ± 0.06）mM显著高于雌性的平均体重

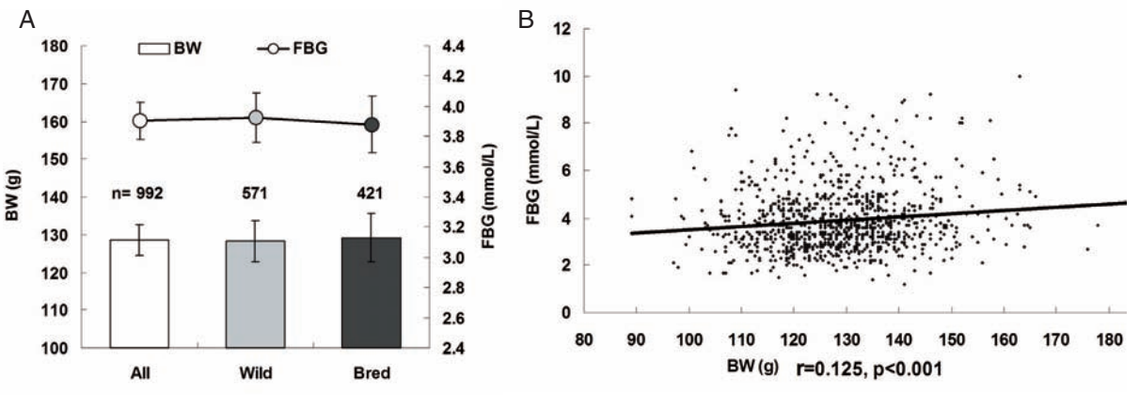



**图12–1　树鼩平均体重（BW）与空腹血糖值（FBG）**

（A）野生（wild）和繁殖后代（bred）树鼩的平均体重和空腹血糖值；（B）树鼩平均体重与空腹血糖值的相关性。（引自文献1）

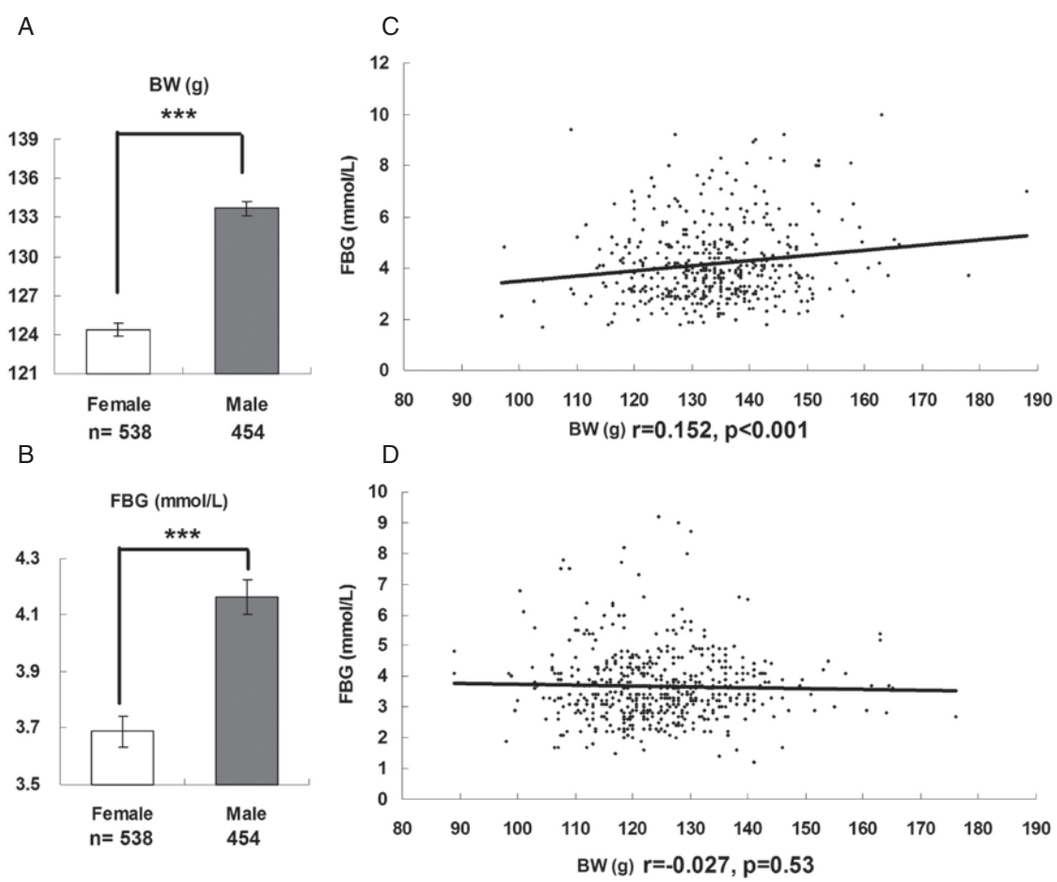



**图12–2　树鼩性别与平均体重（BW）和空腹血糖（FBG）的关系**

（A）雌性树鼩的平均体重（BW）；（B）雌性树鼩的空腹血糖值（FBG）；（C）雄性树鼩空腹血糖（FBG）和体重（BW）的相关性；（D）雌性树鼩空腹血糖（FBG）和体重（BW）的相关性。***：$P<0.001$。（引自文献1）

［（124.39 ± 0.50）g，$P<0.001$］和空腹血糖［（3.69 ± 0.06）mM，$P<0.001$］（图12–2A和B）。进一步相关性研究发现，雄性树鼩的体重与空腹血糖值之间表现出明显的正相关（$r$=0.152，$P<0.001$）（图12–2C），而雌性中则不明显（$r$=–0.027，$p$=0.53）（图12–2D）。

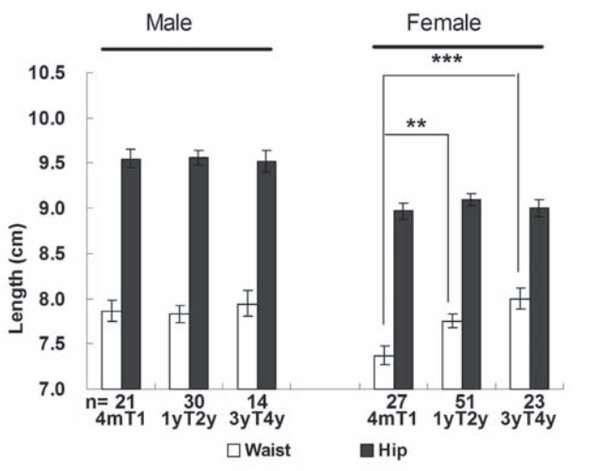



**图12–3　不同年龄阶段的雄性和雌性树鼩的腰围、臀围情况**

**：$P<0.01$，***：$P<0.001$。（引自文献1）

在人类和非人灵长类动物中，代谢性疾病常常和年龄有关，随着年龄的增长，患代谢性疾病的风险逐渐上升，表现出体重增加，脂肪含量增多，胰岛素对糖的敏感性下降，空腹血糖上升[5, 8]。树鼩在不同年龄阶段的体重、空腹血糖也是不断变化的，而且在雄性树鼩和雌性树鼩中其变化趋势不一。由于野生驯化树鼩的真实年龄不知，我们只对421只繁殖后代树鼩不同年龄段的体长、腰围、臀围、体重、空腹血糖进行研究。

这421只树鼩年龄从4个月（已经性成熟）到4岁，可以分成3个组：4个月至1岁组、1～2岁组、3～4岁组。研究发现，树鼩长至4个月大后其体长已固定，不随年龄而变化（图12–3）。雄性树鼩的体长、腰围不随年龄的增长而变化（图12–3）。然而，雌性树鼩的腰围一直随年龄增长而增加（图12–3）。

在421只树鼩中，其体重和空腹血糖会随着年龄的增长而增加（图12–4A）。但在不同性别中，这种变化不一样。雄性树鼩达到性成熟后，虽然3～4岁树鼩的体重略有上升，但雄性树鼩体重很稳定，不随年龄的增长而增加（图12–4B）。然而，雌性树鼩的体重随年龄的增长而逐渐上升，直到2岁以后，其体重才趋于稳定（图12–4B）。不同的年龄段对树鼩的空腹血糖也有影响，无论是雄性还是雌性树鼩，年幼树鼩（1岁以内）的空腹血糖值比1～3岁树鼩的空腹血糖偏高，3岁以后，树鼩的空腹血糖又有所上升（图12–4A和C）。雄性树鼩的空腹血糖并没有明显地表现出随年龄的增加而上升，但雌性树鼩的确出现空腹血糖随年龄的增加而上升（图12–4C）。这些研究结果表明，只有雌性树鼩的体重和空腹血糖随年龄而逐渐上升。

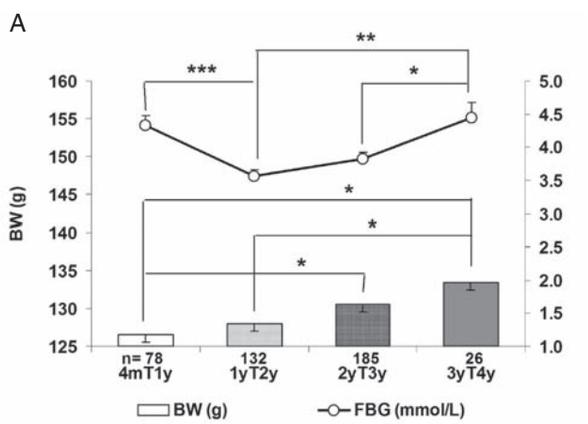



**图12–4（a）　树鼩年龄、性别、体重和空腹血糖间的关系**

（A）不同年龄段树鼩体重与空腹血糖间的关系。*：$P<0.05$，**：$P<0.01$，***：$P<0.001$。（引自文献1）

综上所述，我们的结果表明，树鼩的体重、空腹血糖和腰围等与性别和年龄的关系与人类和其它非人灵长类动物很相似[5, 6]，其体重、空腹血糖和腰围在不同年龄阶段和性别上出现显著差别，提示树鼩

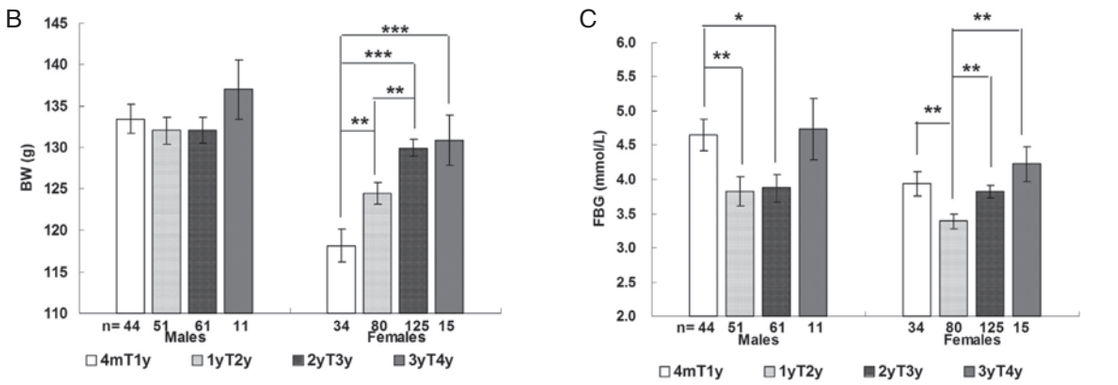



**图12–4（b）　树鼩年龄、性别、体重和空腹血糖间的关系**

（B）不同年龄段树鼩体重在性别间的差异；（C）不同年龄段树鼩空腹血糖在性别间的差异。*：$P<0.05$，**：$P<0.01$，***：$P<0.001$。（引自文献1）

有潜能作为一种新型的人类代谢性疾病动物模型。

## 二、树鼩肥胖与糖脂代谢

肥胖往往引起糖脂代谢紊乱，和糖尿病、非酒精性脂肪肝、心脑血管疾病等代谢性疾病高度相关。在人类中，判断肥胖的指标有BMI（body mass index），即用体重（kg）除以身高的平方（$m^2$），或者腰围/臀围比。李氏指数［Lee index=体重（g）×0.33×1000/体长（cm）］是衡量小动物肥胖的一种广泛使用的方法[9~11]，在成年大鼠中，指数超过310则可鉴定为肥胖。在树鼩中，雄性和雌性的李氏指数都在275左右，没有任何差异。进一步研究发现，李氏指数＞290（298.52 ± 5.92）的树鼩体重、体长、腰围均显著高于李氏指数＜290（274.46 ± 8.16）的树鼩，因此，李氏指数＞290可以考虑作为衡量树鼩肥胖的一个指标。虽然肥胖树鼩（李氏指数＞290）的血液生理生化指标多数变化不明显，但糖化血红蛋白值（HbA1c）明显升高见（表12–1）。

表12–1　肥胖树鼩（李氏指数＞290）与正常树鼩（李氏指数＜290）血液生理生化参数比较（引自文献1）

| | 正常组（*N*=58）（平均值 ± 标准误） | 肥胖组（*N*=17）（平均值 ± 标准误） | *P* value (T–TEST) |
|---|---|---|---|
| 体重（g） | 139.58 ± 11.04 | 152.97 ± 12.93 | ＜0.001*** |
| 体长（cm） | 18.90 ± 0.59 | 17.91 ± 0.48 | ＜0.001*** |
| 李氏指数 | 274.46 ± 8.16 | 298.52 ± 5.92 | ＜0.001*** |
| 腰围（cm） | 7.52 ± 0.58 | 8.15 ± 0.68 | 0.0030** |
| 臀围（cm） | 9.54 ± 0.37 | 9.65 ± 0.41 | 0.3364 |
| HbA1c (mmol/L) | 4.32 ± 0.26 | 4.63 ± 0.24 | ＜0.001*** |
| TG (mmol/L) | 0.35 ± 0.16 | 0.33 ± 0.07 | 0.2812 |
| TC (mmol/L) | 1.41 ± 0.39 | 1.40 ± 0.34 | 0.9227 |
| HDL (mmol/L) | 0.91 ± 0.17 | 0.85 ± 0.18 | 0.2770 |
| LDL (mmol/L) | 0.23 ± 0.12 | 0.17 ± 0.12 | 0.0840 |

HbA1c：糖化血红蛋白；TG：甘油三酯；TC：总胆固醇；LDL：低密度脂蛋白；HDL：高密度脂蛋白。**：$P<0.01$，***：$P<0.001$。

### 三、温度和季节对树鼩生理代谢的影响

很多动物的生理代谢会随着外界温度和季节的变化而变化。动物表型随季节变化表现在三方面：第一是能量的摄入，根据消化特点改变摄食行为；第二是改变能量的支出，调整生长和生殖；第三是以改变组织形态大小的方式来利用或储存能量，比如脂肪组织[12]。不同的环境温度和季节变化会对树鼩的生理代谢产生影响。有研究对实验室饲养的树鼩在冬夏两季的体重、能量摄取、静息代谢率（resting metabolic rate, RMR）、非战栗产热（non-shivering thermogenesis, NST）和内脏形态学做了测量，树鼩在冬季各项基础生理代谢指标都上升，这种改变与其它恒温动物相符[13]。哺乳动物能调节体温，以适应外界环境，有些哺乳动物为维持体温，消耗体内能量，体重等指标下降[14]。树鼩为了调节体温从而在寒冷刺激下调高基础代谢，摄入更多的能量，体重增加。除寒冷刺激导致树鼩基础生理代谢上升外，光照长短也影响树鼩基础生理代谢。各项指标中体重受温度影响大，RMR和NST受温度和光照共同作用。

## 第二节 树鼩肝脏和肌肉蛋白质组学

随着蛋白质组技术和方法的发展，人们可以在整体水平上分析不同组织、细胞和器官中所有蛋白的表达情况，进而根据不同组织或个体不同蛋白差异来阐明隐藏在疾病背后可能的分子机制[15]。肝脏和骨骼肌是重要的代谢器官和组织，肝脏是糖脂合成和分解的重要场所和器官，而骨骼肌是能量消耗的重要组织。肝脏和骨骼肌中糖脂代谢紊乱往往和糖尿病、脂肪肝等代谢性疾病高度相关。目前，关于糖尿病[16]、肝癌[17]、神经性肌肉萎缩[18]和肌肉强直综合征等疾病中的肝脏和骨骼肌蛋白组研究已有报道。因此，树鼩肝脏和骨骼肌蛋白质组学不仅有助于开展树鼩、啮齿类和人类肝脏和肌肉比较蛋白质组学，而且为创建糖尿病、脂肪肝等代谢性疾病树鼩模型奠定基础。

采取约9周龄树鼩的肝脏和骨骼肌组织，利用IEF-LC-MS/MS技术和方法，中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所李荣霞等人首次对树鼩的肝脏和骨骼肌组织进行了蛋白质组学分析[19]。综合人类、黑猩猩、大鼠和小鼠Uniprot数据库中所有蛋白，构建一个包含50476多肽和8024物种特有多肽，共对应于2146个蛋白质综合蛋白数据库。然后用得到的蛋白质组结果数据扫描该综合蛋白数据库，发现共有1759个蛋白质（24444个多肽和5560个物种特有多肽）是树鼩肝脏蛋白质，885个是树鼩骨骼肌蛋白质（24474个多肽和3760个物种特有多肽）。比较树鼩肝脏和骨骼肌的蛋白发现有1236个物种特有的肽段在两个组织中重合。

利用DAVID软件（http://david.abcc.ncifcrf.gov/），参考GO和KEGG数据库信息，对树鼩肝脏和骨骼肌蛋白质进行了细胞位置定位、生物学功能和参与的信号通路等分析。结果表明，肝脏蛋白质多富集在核糖核仁蛋白复合体、膜旁细胞器、细胞器包裹膜等细胞位置；而骨骼肌蛋白质则倾向于在细胞外基质、细胞前沿和非膜旁细胞器区域。同时，肝脏蛋白质的生物学功能偏向于机羧酸结合、核酸连接、裂解酶和转录因子；骨骼肌蛋白质则主要和维持细胞定位和生物调节有关，更多地具有细胞骨架的组成、骨骼肌结构的组成和蛋白的连接等功能。KEGG代谢通路分析发现肝脏蛋白质主要参与脂肪酸的代谢、三羧酸循环和糖酵解、糖异生等过程；而骨骼肌蛋白质

主要和心肌病、老年痴呆症（AD）和亨廷顿舞蹈病（Huntington disease）相关[19]。

另外，利用非加权平均法（UPGMA）对树鼩中肝脏和骨骼肌中蛋白序列进行分析，发现与大小鼠相比，树鼩和人类的亲缘关系更近[19]。根据与人类、黑猩猩和大小鼠等4个不同物种的蛋白质的相似度，把树鼩肝脏和骨骼肌蛋白质分成4个子数据库。在多肽水平，树鼩特有多肽的百分比含量和数目与人类、黑猩猩和大小鼠的差别不大，重合性类似；61.42%（3415）和55.08%（2071）的树鼩特有多肽在人类、黑猩猩和大小鼠中均存在。在2146个树鼩蛋白质中，1/4的树鼩蛋白质存在于大鼠和小鼠中，近一半蛋白质和人类的蛋白质高度相似，18.29%（1017/5560）的树鼩肝脏蛋白和18.46%（694/3760）的树鼩骨骼肌蛋白仅在人类中存在，并且所有蛋白和人类中蛋白匹配的比例远远高于其它3个物种[19]。

## 第三节 树鼩脂代谢相关基因研究

### 一、树鼩脂代谢基因比较基因组学

脂类（lipids），包括甘油三酯、磷脂、鞘磷脂、固醇类等分子，是一类难溶于水、但易溶于有机溶剂的生物有机分子。脂类是生物体内主要的储能物质、构成生物膜的主要成分以及重要的信号分子。不同的脂类在生物体的生长、发育、繁殖、抗逆境以及衰老等诸多生命过程中发挥着重要的功能[20]。脂代谢异常往往和很多疾病，特别是肥胖、2型糖尿病、脂肪肝、心脑血管疾病等代谢性疾病密切相关[20, 21]，这些代谢性疾病已成为严重威胁人类健康的重大医学和社会问题之一。因此，预防和治疗各类脂类代谢类疾病已成为一个迫在眉睫的严重问题[22]。

机体内的脂代谢是一个高度复杂和有机调控的过程[23, 24]。寻找脂代谢相关基因，特别是参与脂类代谢通路以及调控脂类代谢通路的基因，研究其生物学功能和作用机理等广受生命医学研究者的关注和重视[25, 26]。大鼠、小鼠、果蝇和线虫等是人类生命医学研究的重要模式生物[27~29]。树鼩作为一种新型的实验动物，很可能是潜在的人类代谢性疾病动物模型，我们需要了解其基因组中有多少基因参与脂类代谢，这些基因在人类中是否保守等。

利用比较基因组学技术和方法，运用Ensembl Compara查找人类、树鼩、大鼠、小鼠、线虫中参与脂类代谢的基因，我们构建了包括584个脂代谢基因的人类脂类代谢基因数据库（图12–5），其中407个人类脂代谢基因直接从KEGG数据库（http://www.genome.jp/kegg/）中下载。另外，基于秀丽线虫脂类代谢基因组数据[30]，分别用小鼠、大鼠和线虫中的脂代谢基因为出发点寻找人类中的直系同源物（orthologs），得到336个、305个和364个人类脂代谢基因，去除冗余和重复后得到584

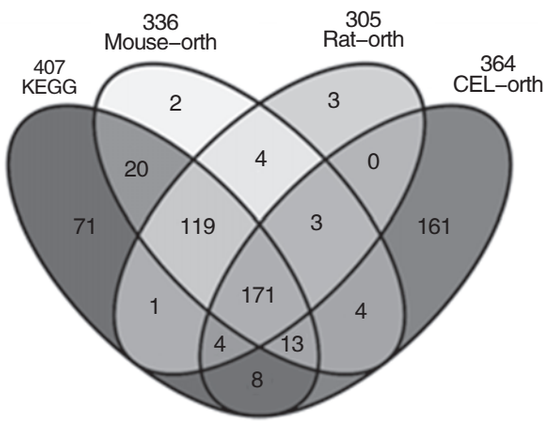



图12–5 人类中584个脂类代谢基因数据库组成图

个人类脂类代谢基因。

然后，以人类548个脂代谢基因为出发点，运用Ensembl Compara查找树鼩、大鼠、小鼠和猕猴中脂代谢基因，分别得到416个、481个、451个和494个脂代谢基因，表明416个人类脂代谢基因存在树鼩中，进一步分析发现347个脂代谢基因在这5个物种中高度保守存在（图12–6）。我们目前在树鼩基因组中只找到416个脂代谢基因，明显少于大鼠、小鼠和猕猴等，这是树鼩自身基因组特征还是其它原因，有待未来研究阐明。虽然树鼩基因组已被测序，但其基因组的详细注释还有很多后续工作需要深入；同时，未来借助更多的树鼩蛋白质组和转录组数据，深度解析树鼩基因组中代谢基因的数目、生物学功能和参与的代谢途径等，全面了解树鼩基因组中脂代谢基因。

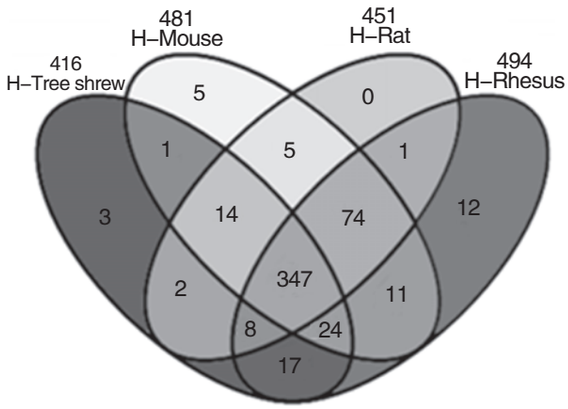



**图12–6　不同物种中脂代谢基因比较文氏图**

此外，进一步比较分析树鼩和人类脂代谢基因，发现人类中的NLGN4Y和ARSH不存在大鼠和小鼠中，但在树鼩、猕猴和人中可以找到（表12–2）。因此，这两个树鼩特有的脂类代谢基因可为研究人类代谢性疾病提供新的参考。

**表12–2　树鼩和人类特有的脂代谢基因**

| Ensembl Gene ID | Associated Gene Name | Description |
|---|---|---|
| ENSG00000165246 | NLGN4Y | neuroligin 4, Y–linked |
| ENSG00000205667 | ARSH | arylsulfatase family, member H |

最后，为了分析脂代谢基因和代谢性疾病的关系，从人类疾病数据库OMIM（http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/）下载现有报道的导致疾病的所有基因。迄今为止，OMIM数据库共收录19994 MIM IDs，这些ID包括基因、表型以及位点信息。运用Ensembl Biomart在线工具进行ID mapping，得到15181基因可能会导致人类各种疾病。接着我们用“肥胖、糖尿病、代谢性疾病”等关键词搜索人类疾病数据库得到包含1264个基因的人类脂类代谢疾病数据库。比较树鼩脂代谢基因和代谢性疾病相关基因，我们发现有65个脂代谢基因和人类的代谢性疾病相关（图12–7）。

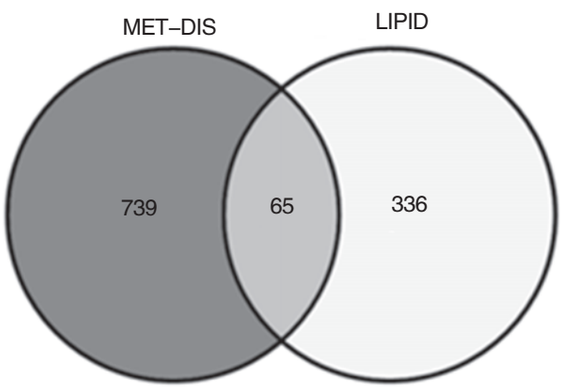



**图12–7　树鼩中脂代谢基因和代谢性疾病基因分析**

## 二、树鼩FABP家族

FABP（fatty acid binding protein），即脂肪酸结合蛋白，是一类胞内运输蛋白，负责细胞内转运脂肪酸，在许多代谢以及炎症反应过程中发挥功用。FABP家族进化上有着极强的保守性，研究发现从秀丽线虫、果蝇、小鼠、大鼠以及人类都有FABP家族。FABP家族有1～9个成员，按照第一次发现它们的组织对其进行命名，分别称为L-、I-、H、A-、E-、Il-、B-、M-以及T-FABP。虽然是按照此方法进行命名，但是没有一个亚型只在某种组织特定表达，一般多数组织表达几个FABP亚型。例如L-FABP又称为FABP1，主要在肝脏表达，但是在肠道，它也表达；肠道是FABP2主要表达的场所，但是在肝脏，FABP2也表达[31]。

FABP家族成员的一级结构相似，氨基酸序列相似性从70%～80%不等。X射线和核磁共振（NMR）研究发现它们的三级结构也具有相似性，这些蛋白构成一个β桶，包含有10个反向平行的β链和一个位于第一和第二β链间的两个短的α螺旋。FABP与脂肪酸结合方式有着一致性，在FABP上存在结合口袋，FABP提供–OH，与脂肪酸的–COOH进行结合，将不同脂肪酸运送至指定位置，发挥作用[32]。作为一种胞内运输蛋白，FABP将脂肪酸运输到目的区域，以发挥特定的效用。比如，形成脂滴以存储能量，运输至内质网形成信号通路，参与细胞的生长与分化，运输到线粒体、过氧化物酶体进行氧化产能等[33]。

相关研究表明，小鼠中*fabp*缺失，会引起代谢疾病发生。已有*fabp*在小鼠非酒精脂肪肝中的相关报道。当*fabp1*缺失，会使肝脏和小肠的β氧化降低；*fabp2*缺失，体重和血液甘油三酯显著升高；*fabp3*缺失，肌肉内脂肪酸的氧化降低所带来的不适，因葡萄糖的利用增多而得到缓解；*fabp4*缺失，使动脉粥样硬化的发生得到阻碍；*fabp7*缺失，使得小鼠更加焦虑[34]。

树鼩作为一种与灵长类进化上很亲近的哺乳动物，了解其FABP家族的结构和功能对创建人类代谢性疾病树鼩模型及研究其发病机理极其重要。利用已经测序的树鼩基因组数据，结合我们的肝脏和骨骼肌蛋白质组学和转录组学数据，我们获得了树鼩FABP家族蛋白序列。分析结果如图所示（图12–8）：树鼩FABP蛋白家族有1～9个成员，它们共同拥有一个保守的指纹结构，包含3个

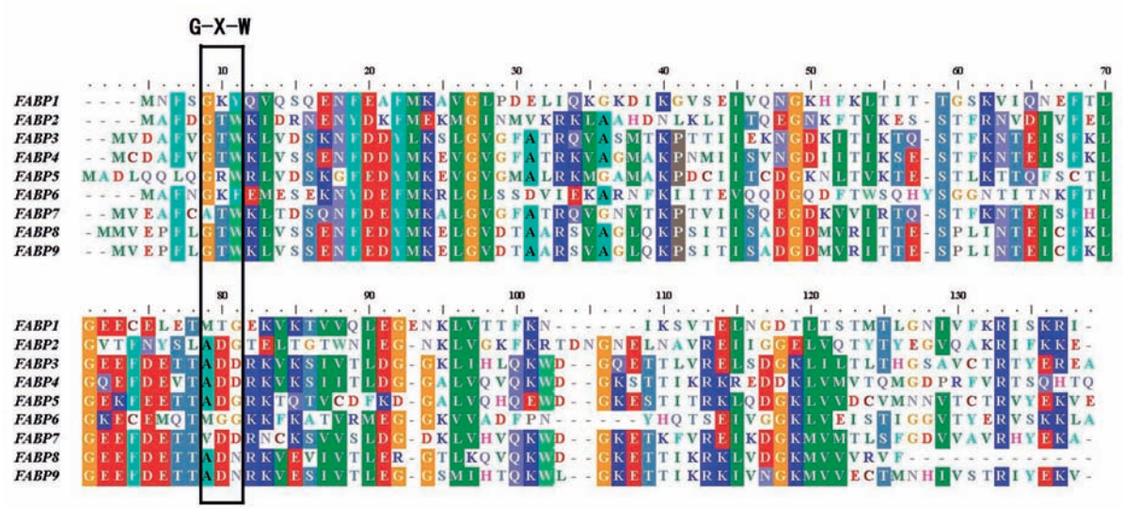



**图12–8　树鼩FABP家族基因氨基酸序列比对**

基序，并且在第一个基序里存在一个G–X–W区段，构成第一个β链的部分区段，与文献报道一致[35]。据报道FABP家族可能源于一个原始基因的连续复制，进而逐步发展为组织特异性的9类家族成员，我们发现树鼩FABP蛋白家族存在显著的结构同源性，且FABP1、FABP2与FABP6相似性高，FABP4、FABP5、FABP8以及FABP9相似性高，FABP3和FABP7相似性高（图12–9）。

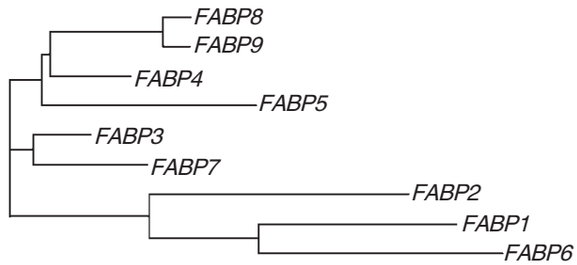



**图12–9　树鼩FABP家族基因系统发育树**

## 三、硬脂酰辅酶A去饱和酶基因

### （一）硬脂酰辅酶A去饱和酶的生物学功能

硬脂酰辅酶A去饱和酶（stearoyl-CoA desaturase, SCD）是脂肪酸合成的一个关键酶，它在饱和脂肪酸（SFAs）delta-9位置引入双键，催化饱和脂肪酸转变成单不饱和脂肪酸（MUFAs）[36]。在脂肪合成过程中，相对于饱和脂肪酸，单不饱和脂肪酸更容易成为ACAT（acyl-CoAcholesterol acyltransferase）和DGAT（diacylglycerol acyltransferase）的底物，被进一步用作合成磷脂（PL）、甘油三酯（TG）、胆固醇酯（CE）和蜡酯等，这些产物广泛参与能量储存、生物膜组成、信号转导等生物学过程。在细胞信号转导和膜的流动性中，不饱和脂肪酸与饱和脂肪酸的比值起着重要的作用。这个比值的变化将影响整个机体的脂质代谢，进而与多种疾病的发生有关，譬如糖尿病、心血管疾病、脂肪肝、癌症、胰岛素抵抗、细胞应激反应等[37]。有文献报道，MUFA还在信号转导和细胞分化中作为介导分子，辅助细胞（包括一些神经元）完成分化，通过中枢神经系统调节食物摄取等。因此，SCD是代谢性疾病治疗的潜在靶分子。

### （二）硬脂酰辅酶A去饱和酶基因的表达

硬脂酰辅酶A去饱和酶是一个定位于内质网的膜蛋白，包含4个跨膜结构域[38～40]，在脂质代谢过程中起着重要的作用。*scd*基因广泛存在于多种生物体中，包括酵母、果蝇、线虫、山羊、大鼠、小鼠以及人类等。在无脊椎动物中，*scd1*基因的同源基因在秀丽隐杆线虫中命名为*fat-5*、*fat-6*和*fat-7*[41～43]，在裂殖酵母中命名为*ole-1*[44]。脊椎动物*scd*基因有5个亚型，分别命名为*scd1*、*scd2*、*scd3*、*scd4*和*scd5*，不同生物中的*scd*基因数目不定。在小鼠中存在4种亚型，即*mscd1*、*mscd2*、*mscd3*和*mscd4*，集中位于19号染色体，编码约4.9kb的转录本。虽然老鼠的4个亚型氨基酸序列一致性达到85%～88%，但它们5′侧翼序列决定着基因的组织特异性表达。正常的饮食条件下，*mscd1*在多种组织中广泛表达，在白色脂肪组织、棕色脂肪组织高度表达。高糖饮食将诱导*mscd1*在肝和心中显著表达。*mscd2*主要在脑中表达，在肾、脾、肺、心中都有少量表达，*mscd2*的表达也受到高糖饮食的诱导。*mscd3*只在皮肤中表达。*mscd4*主要在心脏中表达，受高糖饮食的诱导。大鼠中有两种亚型*scd1*和*scd2*。人体内有两种*scd*基因亚型*hscd1*和*hscd5*，其中*hscd1*与小鼠及大鼠的*scd1*基因同源性很高，而*hscd5*主要在大脑和胰腺中表达。

与人类相似，树鼩基因组只有两个*scd*基因，即*scd1*和*scd5*。通过表达模式分析表明，树鼩*scd1*基因在各组织中广泛表达，而*scd5*基因主要在大脑里表达（图12–10）。

### （三）树鼩硬脂酰辅酶A去饱和酶基因的进化分析

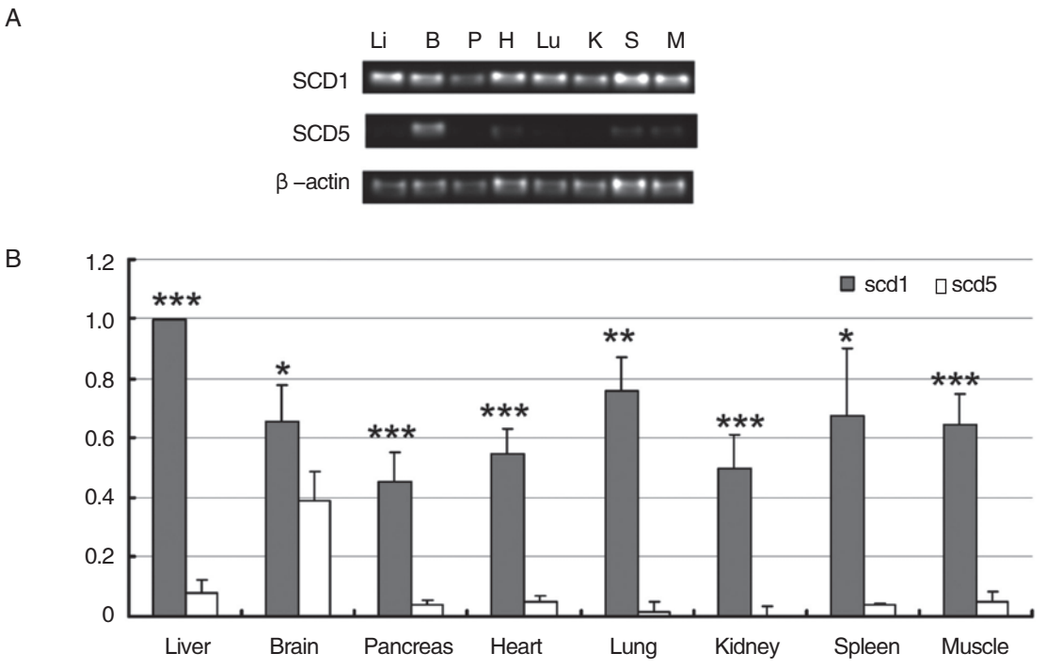



**图12–10　树鼩SCD的表达模式分析**

Li：肝脏（liver）；B：大脑（brain）；P：胰腺（pancreas）；H：心脏（heart）；Lu：肺（lung）；K：肾脏（kidney）；S：脾脏（spleen）；M：肌肉（muscle）。

在人类中，*scd1*基因位于10号染色体，基因约为17kb，包含6个外显子；*scd5*位于4q21.1，基因约为170kb，包含5个外显子。树鼩*scd1*基因位于scaffold_9205，基因约为5.07kb，编码序列由1080个碱基组成，编码359个氨基酸残基；树鼩*scd5*基因位于scaffold_3007，基因约为172.11kb，编码序列由993个碱基组成，编码330个氨基酸残基；尽管二者基因的大小相差很大，但是它们所编码的蛋白质大小接近。为了探究树鼩SCD的保守性，通过比较树鼩与多种模式动物的SCD氨基酸序列，发现在所有序列中都存在3个保守的组氨酸基序

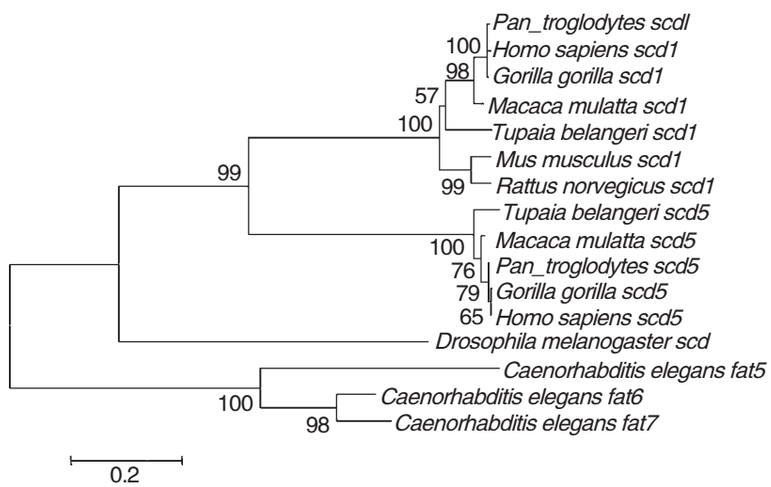



**图12–11　9种模式动物SCD氨基酸序列的分子进化树**

（引自文献45）

HRLWSH、HRAHH、HNYHH。通过分析真核模式生物中*scd*基因的外显子顺序和数目，发现大多数*scd1*基因（如鸡、人等）由6个外显子组成，有些脊椎动物如斑马鱼*scd1*只有5个外显子，所有的*scd5*基因由5个外显子构成[45]。

目前对于*scd1*基因的研究，多以小鼠为动物模型。然而，在进化的过程中*scd1*基因明显地分为*scd5*型和*scd1*型。小鼠中没有*scd5*，不利于对*scd5*功能的研究。通过比对9种模式生物的氨基酸序列，包括人、猕猴、小鼠、大鼠、树鼩、斑马鱼、果蝇和线虫等，构建分子进化树。氨基酸序列比对分析表明，相对于小鼠，*scd*进化上树鼩与灵长类更近（图12–11）[45]。

## 参考文献


[1]Wu X, Chang Q, Zhang Y, et al. Relationships between body weight, fasting blood glucose concentration, sex and age in tree shrews (*Tupaia belangeri chinensis*). J Anim Physiol Anim Nutr (Berl), 2013, 97(6): 1179-88.

[2]Gatford KL, Egan AR, Clarke IJ, et al. Sexual dimorphism of the somatotrophic axis. J Endocrinol, 1998, 157(3): 373-89.

[3]Rosenbaum M, Leibel, RL. Role of gonadal steroids in the sexual dimorphisms in body composition and circulating concentrations of leptin. J Clin Endocrinol Metab, 1999, 84(6): 1784-9.

[4]Hudson JC, Baum ST, Frye DM, et al. Age and sex differences in body size and composition during Rhesus monkey adulthood. Aging (Milano), 1996, 8(3): 197-204.

[5]Ramsey JJ, Laatsch JL, Kemnitz JW. Age and gender differences in body composition, energy expenditure, and glucoregulation of adult rhesus monkeys. J Med Primatol, 2000, 29(1): 11-9.

[6]Power RA, Power ML, Layne DG, et al. Relations among measures of body composition, age, and sex in the common marmoset monkey (*Callithrix jacchus*). Comp Med, 2001, 51(3): 218-23.

[7]Bruns CM, Kemnitz JW. Sex hormones, insulin sensitivity, and diabetes mellitus. ILAR J, 2004, 45(2): 160-9.

[8]Tardif SD, Power ML, Ross CN, et al. Characterization of obese phenotypes in a small nonhuman primate, the common marmoset (*Callithrix jacchus*). Obesity (Silver Spring), 2009, 17(8): 1499-505.

[9]Bernardis LL, Patterson BD. Correlation between "Lee index" and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions. J Endocrinol, 1968, 40(4): 527-8.

[10]Hariri N, Thibault L. High-fat diet-induced obesity in animal models. Nutr Res Rev, 2010, 23(2): 270-99.

[11]Lee MO. Determination of the surface area of the white rat with its application to the expression of metabolic results. Am J Physiol, 1929, 89: 24-33.

[12]Naya DE, Veloso C, Sabat P, et al. Seasonal flexibility of organ mass and intestinal function for the Andean lizard Liolaemus nigroviridis. J Exp Zool A Ecol Genet Physiol, 2009, 311(4): 270-7.

[13]Zhu WL, Huang CM, Zhang L, et al. Changes of energy metabolism, thermogenesis and body mass in the tree shrew (*Tupaia belangeri chinensis*, Tupaiidae, Scandebtia) during cold exposure. Ital J Zool, 2012, 79: 175-81.

[14]Lovegrove BG. Seasonal thermoregulatory responses in mammals. J Comp Physiol B, 2005, 175(4): 231-47.

[15]Lescuyer P, Hochstrasser DF, Sanchez JC. Comprehensive proteome analysis by chromatographic protein prefractionation. Electrophoresis, 2004, 25(7-8): 1125-35.

[16]Deng WJ, Nie S, Dai J, et al. Proteome, phosphoproteome, and hydroxyproteome of liver mitochondria in diabetic rats at early pathogenic stages. Mol Cell Proteomics, 2010, 9(1): 100-16.

[17]Liu Y, Li C, Xing Z, et al. Proteomic mining in the dysplastic liver of WHV/c-myc mice—insights and indicators for early hepatocarcinogenesis. FEBS J, 2010, 277(19): 4039-53.

[18]Staunton L, Jockusch H, Ohlendieck K. Proteomic analysis of muscle affected by motor neuron degeneration: the wobbler mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. Biochem Biophys Res Commun, 2011, 406(4): 595-600.

[19]Li R, Xu W, Wang Z, et al. Proteomic characteristics of the liver and skeletal muscle in the Chinese tree shrew (*Tupaia*

*belangeri chinensis*). Protein Cell, 2012, 3(9): 691-700.
[20]Wymann MP, Schneiter R. Lipid signalling in disease. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008, 9(2): 162-76.
[21]Kopelman PG. Obesity as a medical problem. Nature, 2000, 404(6778): 635-43.
[22]Ford ES, Giles WH, Dietz WH. Prevalence of the metabolic syndrome among US adults: findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey. JAMA, 2002, 287(3): 356-9.
[23]Coll AP, Farooqi IS, O'Rahilly S. The hormonal control of food intake. Cell, 2007, 129(2): 251-62.
[24]Walley AJ, Asher JE, Froguel P. The genetic contribution to non-syndromic human obesity. Nat Rev Genet, 2009, 10(7): 431-42.
[25]Watts JL. Fat synthesis and adiposity regulation in *Caenorhabditis elegans*. Trends Endocrinol Metab, 2009, 20(2): 58-65.
[26]Saltiel AR, Kahn CR. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. Nature, 2001, 414(6865): 799-806.
[27]Chakraborty C, Hsu CH, Wen ZH, et al. Zebrafish: a complete animal model for in vivo drug discovery and development. Curr Drug Metab, 2009, 10(2): 116-24.
[28]Orsucci D, Calsolaro V, Mancuso M, et al. Neuroprotective effects of tetracyclines: molecular targets, animal models and human disease. CNS Neurol Disord Drug Targets, 2009, 8(3): 222-31.
[29]Cox B, Kotlyar M, Evangelou AI, et al. Comparative systems biology of human and mouse as a tool to guide the modeling of human placental pathology. Mol Syst Biol, 2009, 5: 279.
[30]Zhang Y, Zou X, Ding Y, et al. Comparative genomics and functional study of lipid metabolic genes in *Caenorhabditis elegans*. BMC Genomics, 2013, 14: 164.
[31]Furuhashi M, Hotamisligil GS. Fatty acid-binding proteins: role in metabolic diseases and potential as drug targets. Nat Rev Drug Discov, 2008, 7(6): 489-503.
[32]Storch J, Thumser AE. Tissue-specific functions in the fatty acid-binding protein family. J Biol Chem, 2010, 285(43): 32679-83.
[33]Storch J, Thumser AEA. The fatty acid transport function of fatty acid-binding proteins. Biochim Biophys Acta, 2000, 1486(1): 28-44.
[34]Storch J, Corsico B. The emerging functions and mechanisms of mammalian fatty acid-binding proteins. Annu Rev Nutr, 2008, 28: 73-95.
[35]Smathers RL, Petersen DR. The human fatty acid-binding protein family: Evolutionary divergences and functions. Hum Genomics, 2011, 5(3): 170-91.
[36]Paton CM, Ntambi JM. Biochemical and physiological function of stearoyl-CoA desaturase. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2009, 297(1): E28-37.
[37]Flowers MT, Ntambi JM. Role of stearoyl-coenzyme A desaturase in regulating lipid metabolism. Curr Opin Lipidol, 2008, 19(3): 248-56.
[38]Heinemann FS, Ozols J. Stearoyl-CoA desaturase, a short-lived protein of endoplasmic reticulum with multiple control mechanisms. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2003, 68(2): 123-33.
[39]Strittmatter P, Spatz L, Corcoran D, et al. Purification and properties of rat liver microsomal stearoyl-coenzyme A desaturase. Proc Natl Acad Sci USA, 1974, 71(11): 4565-9.
[40]Wang J, Yu L, Schmidt RE, et al. Characterization of HSCD5, a novel human stearoyl-CoA desaturase unique to primates. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 332(3): 735-42.
[41]Watts JL, Browse J. A palmitoyl-CoA-specific delta9 fatty acid desaturase from Caenorhabditis elegans. Biochem Biophys Res Commun, 2000, 272(1): 263-9.
[42]Brock TJ, Browse J, Watts JL. Genetic regulation of unsaturated fatty acid composition in *C. elegans*. PLoS Genet, 2006, 2(7): e108.
[43]Brock TJ, Browse J, Watts JL. Fatty acid desaturation and the regulation of adiposity in *Caenorhabditis elegans*. Genetics, 2007, 176(2): 865-75.

[44]Stukey JE, McDonough VM, Martin CE. Isolation and characterization of OLE1, a gene affecting fatty acid desaturation from Saccharomyces cerevisiae. J Biol Chem, 1989, 264(28): 16537-44.

[45]Wu X, Zou X, Chang Q, et al. The evolutionary pattern and the regulation of stearoyl-CoA desaturase genes. Biomed Res Int, 2013, 2013: 856521.



# 第十三章 树鼩的血液生理生化

Tree shrews

第一篇 树鼩基础生物学
TREE SHREW BASIC BIOLOGY

杜廷义　马旭通　张　云

树鼩的血液生理生化指标，既能反映出树鼩正常的生理代谢状况，又能在此基础上反映疾病状态下的病理性变化，是疾病动物模型建立和研究工作中的必不可少的监测数据和判断指标。1991年出版的《树鼩生物学》对截至20世纪80年代末，有关中缅树鼩滇西亚种（*Tupaia belangeri chinensis*）血液生理生化的研究结果，进行了系统的总结和介绍，并对国内外的相关研究情况进行了比较和分析；从而为国内在此后所进行的树鼩动物模型的研究和探索，建立起了一个良好的参考基础[1]。在过去的20年中，生物检测分析技术的发展，为进一步充实和扩大树鼩血液生理生化指标的参考数据系统提供了更加完备的技术条件。与此同时，实验用树鼩种群及其生存环境的变迁，特别是近年来由野生种群向人工繁育种群的过渡，使系统数据的补充更新问题愈显必要。

本章以上述《树鼩生物学》相关章节内容为基础，结合实验用树鼩种群的发展情况，重点探讨种群变迁对于树鼩血液生理生化所产生的影响及其变化情况，同时介绍了近年来在本领域所取得的研究成果；为便于对前后资料进行对照和比较，本章基本采用了该书的架构安排。

## 第一节 树鼩的常用血液生物化学指标

目前，捕捉后经短期饲养的野生树鼩（*Tupaia belangeri*）仍然是国内实验用树鼩的主要来源；而实验树鼩的人工驯养繁殖等基础研究工作也受到了进一步的关注[2]。有关中缅树鼩在实验室驯化过程中所发生的体重、颅长、体长、尾长等基本体尺指标的变化，已见对比研究报道[3]，实验树鼩的血液生理指标的变化情况同样也是一个值得关注的问题。而在过去的20年中，血液生物化学实验方法和常规检测技术也发生了重大变化，使得大量的原有检测数据已不再适用，甚至有的检测项目已被淘汰；同时不断出现的新的检测项目也为动物试验结果观察提供了新的监测手段。

为适应这一发展趋势，近年来，有关树鼩常用血液生物化学指标的研究有所加强。本节重点

进行了在同一检测条件下，野生树鼩与实验室人工繁育树鼩部分血液生化指标检测值的比较，进而从实验诊断学的角度探讨树鼩在由野生到实验室繁育这一种群变化过程中所发生的生理改变，同时对一些诊断效能优良的临床检测项目在树鼩中的应用进行初步探索[4]。本次实验性的比较研究在现有资料的基础上，增加了检测代谢综合征常用评价指标：如果糖胺、糖化血红蛋白、C肽、高密度脂蛋白胆固醇和低密度脂蛋白胆固醇；反映心肌功能情况的指标：如肌酸激酶、乳酸脱氢酶和肌钙蛋白Ⅰ；以及反映肝脏合成代谢功能的重要指标：如总胆汁酸。而对于基本保持了原有检测方法，以及稳定性较强的检测项目（比如血清蛋白电泳、血清电解质测定等），本次实验不再涉及。

本次实验共用树鼩108只，其中：野生成年树鼩54只，雌雄各半。体重为：雌性95～131g（平均114.2g），雄性108～143g（平均117.8g）。均为在昆明地区捕获后人工饲养1～2月。子一代人工繁育成年树鼩共54只，月龄：6～8个月，雌雄比为25：29。体重为：雌性82～127g（平均107.2g），雄性91～139g（平均115.1g）。

捕获的野生树鼩和人工繁育树鼩在养殖基地，相同条件下进行人工饲养——普通级动物房，一般每只笼具中放置一只树鼩，保持安静环境，维持室内温度在15～24℃，湿度在50%～70%范围，人工光照12小时。每天喂食2次，上午10点左右喂食全价营养粉蒸糕，下午4点左右喂食水果，每星期加喂一次黄粉虫，自由饮水。饲料配方及主要营养成分，树鼩在不同生理阶段的饲养条件要求及管理详见文献[1]。

在进行采样前，将树鼩由养殖基地转入本研究所动物实验中心树鼩饲养室进行适应性饲养2～3天，饲养条件同养殖基地。实验前一天下午喂食后，清扫笼具内残留食物以保证禁食时间统一在15～16小时。

血样采集：树鼩保定，兽用氯胺酮（剂量：15mg/100g体重）麻醉，开胸法心脏采血[5]。血样分注于EDTA-$K_2$抗凝管（武汉致远医疗科技有限公司）和VACUTTE分离胶血清采集管（奥地利Greiner公司），血清管及时离心后1小时内送检。

样本检测采用美国雅培Ci16200免疫生化检测系统，瑞士罗氏E170全自动免疫分析仪。酶类检测采用雅培Ci16200配套试剂，C肽检测采用罗氏E170配套试剂，其它生化检测采用日本积水医疗株式会社产品。严格检测样本要求分别弃除溶血、脂血等不合格标本后严格按相关操作程序进行实验检测和质量控制。

数据处理采用SPSS 13.0软件包。对各组数据分性别各自弃除极端值和离群值后，判断性别间差异的显著性；对差别无显著性的指标，数据合并后重新弃除极端值和离群值计算表述。使用中位数、四分位数描述各检测值的分布特征；正态数据的指标进一步计算其均值和标准差。统计判断：正态数据资料采用t检验，非正态资料采用秩和检验，变异系数比较采用u检验。

检测结果分别见表13–1和表13–2。对在两组中均能进行雌雄合并的12个指标进行的两组间比较结果显示：肌酸激酶、碱性磷酸酶、γ–谷氨酰胺转氨酶、低密度脂蛋白、果糖胺、尿素氮、肌钙蛋白Ⅰ等7个指标间的差别具有显著性（*P*值均小于0.05）。

对本次实验检测的结果分析显示：与野生组相比较，人工繁育组的总体变化趋势是生理指标在性别间差异的缩小及在个体间离散程度的降低。而与这种改善趋势不一致的项目主要集中在反映肝脏功能及心肌情况的项目上。这些项目表现出了一定程度的平均值上升和个体离散程度扩大；这一变化趋势与人工饲养营养条件之间的关系及其影响应引起更多的关注。

表13-1　野生组树鼩常用生化指标检测结果[4]

| 检测项目（单位） | 性别 | 例数 | 中位数 | 四分位数 | | 算术平均值 | 标准差 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 肌酸激酶CK（U/L） | 雌雄合并 | 48 | 986 | 647 | 1211 | 980 | 383 |
| 乳酸脱氢酶LDH（U/L） | 雌雄合并 | 52 | 1217 | 823 | 1530 | 1218 | 466 |
| 天门冬氨酸氨基转移酶AST（U/L） | 雌雄合并 | 49 | 201.0 | 152.0 | 237.5 | 198.4 | 60.1 |
| 丙氨酸氨基转移酶ALT（U/L） | 雌雄合并 | 49 | 67.0 | 46.5 | 95.5 | 73.6 | 36.6 |
| 碱性磷酸酶AKP（U/L） | 雌雄合并 | 49 | 106.0 | 84.0 | 141.5 | 116.2 | 47.9 |
| γ-谷氨酰胺转氨酶γ-GT（U/L） | 雌雄合并 | 49 | 9.00 | 6.00 | 15.50 | — | — |
| 总胆红素TBIL（μmol/L） | 雌雄合并 | 50 | 0.70 | 0.30 | 1.10 | — | — |
| 总胆汁酸TBA（μmol/L） | 雌雄合并 | 52 | 20.0 | 12.1 | 32.6 | — | — |
| 低密度脂蛋白胆固醇LDL-C（mmol/L） | 雌雄合并 | 50 | 0.46 | 0.33 | 0.56 | 0.46 | 0.15 |
| 葡萄糖GLU（mmol/L） | 雌雄合并 | 48 | 5.20 | 3.60 | 7.35 | 5.46 | 2.51 |
| 果糖胺FRUC（μmol/L） | 雌雄合并 | 53 | 379.0 | 322.5 | 426.5 | 371.7 | 73.6 |
| 尿素氮BUN（mmol/L） | 雌雄合并 | 48 | 5.95 | 4.13 | 7.60 | — | — |
| 肌钙蛋白ⅠCTNⅠ（ng/mL） | 雌雄合并 | 52 | 4.01 | 2.10 | 6.20 | — | — |
| 空腹C肽CP-K（ng/mL） | 雌雄合并 | 50 | 0.74 | 0.36 | 1.46 | — | — |
| 总蛋白TP（g/L） | 雌性 | 22 | 61.0 | 58.0 | 65.0 | 62.3 | 5.2 |
| | 雄性 | 26 | 51.5 | 45.8 | 61.8 | 51.4 | 12.9 |
| 白蛋白ALB（g/L） | 雌性 | 24 | 28.5 | 27.0 | 31.0 | 28.5 | 3.3 |
| | 雄性 | 26 | 23.0 | 20.0 | 27.5 | 23.3 | 6.0 |
| 球蛋白GLOB（g/L） | 雌性 | 27 | 33.0 | 29.0 | 38.0 | 33.6 | 6.8 |
| | 雄性 | 26 | 27.5 | 23.8 | 33.3 | 28.1 | 7.6 |
| 总胆固醇CHOL（mmol/L） | 雌性 | 26 | 2.40 | 2.20 | 2.73 | 2.45 | 0.43 |
| | 雄性 | 26 | 2.00 | 1.40 | 2.30 | 1.88 | 0.60 |
| 甘油三酯TG（mmol/L） | 雌性 | 27 | 0.63 | 0.49 | 0.98 | 0.73 | 0.33 |
| | 雄性 | 26 | 0.51 | 0.16 | 0.77 | 0.52 | 0.35 |
| 高密度脂蛋白胆固醇HDL-C（mmol/L） | 雌性 | 27 | 1.23 | 1.08 | 1.44 | 1.24 | 0.23 |
| | 雄性 | 26 | 1.08 | 0.72 | 1.31 | 0.99 | 0.38 |
| 糖化血红蛋白A1C% HBA1C%（%） | 雌性 | 24 | 4.34 | 3.98 | 4.55 | — | — |
| | 雄性 | 22 | 4.05 | 3.77 | 4.12 | — | — |
| 肌酐CREA（μmol/L） | 雌性 | 25 | 17.0 | 14.0 | 19.0 | 17.0 | 3.1 |
| | 雄性 | 24 | 14.0 | 12.0 | 15.0 | — | — |
| C反应蛋白CRP（mg/L） | 雌性 | 27 | 0.43 | 0.40 | 0.46 | 0.43 | 0.04 |
| | 雄性 | 26 | 0.40 | 0.37 | 0.43 | — | — |

表13-2　人工繁育组树鼩常用生化指标检测结果[4]

| 检测项目（单位） | 性别 | 例数 | 中位数 | 四分位数 | | 算术平均值 | 标准差 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 肌酸激酶CK（U/L） | 雌雄合并 | 46 | 1 449 | 961 | 1917 | — | — |
| 天门冬氨酸氨基转移酶AST（U/L） | 雌雄合并 | 48 | 230.5 | 154.0 | 313.3 | — | — |
| 丙氨酸氨基转移酶ALT（U/L） | 雌雄合并 | 48 | 83.5 | 46.0 | 121.8 | — | — |
| 碱性磷酸酶AKP（U/L） | 雌雄合并 | 51 | 142.0 | 102.0 | 220.0 | — | — |
| γ-谷氨酰胺转氨酶γ-GT（U/L） | 雌雄合并 | 50 | 4.00 | 3.00 | 7.00 | — | — |
| 总胆红素TBIL（μmol/L） | 雌雄合并 | 53 | 0.60 | 0.30 | 0.85 | — | — |

续表13-2

| 检测项目（单位） | 性别 | 例数 | 中位数 | 四分位数 | | 算术平均值 | 标准差 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 总胆汁酸TBA（μmol/L） | 雌雄合并 | 51 | 15.6 | 7.9 | 27.6 | — | — |
| 白蛋白ALB（g/L） | 雌雄合并 | 49 | 32.0 | 30.0 | 34.0 | — | — |
| 总胆固醇CHOL（mmol/L） | 雌雄合并 | 50 | 2.40 | 2.00 | 2.90 | 2.39 | 0.63 |
| 高密度脂蛋白胆固醇HDL-C（mmol/L） | 雌雄合并 | 50 | 1.11 | 0.97 | 1.36 | 1.15 | 0.28 |
| 低密度脂蛋白胆固醇LDL-C（mmol/L） | 雌雄合并 | 51 | 0.36 | 0.22 | 0.54 | — | — |
| 葡萄糖GLU（mmol/L） | 雌雄合并 | 51 | 4.90 | 3.70 | 5.50 | — | — |
| 果糖胺FRUC（μmol/L） | 雌雄合并 | 50 | 393.5 | 364.0 | 444.8 | 402.9 | 58.8 |
| 尿素氮BUN（mmol/L） | 雌雄合并 | 48 | 8.80 | 7.63 | 10.95 | — | — |
| 肌酐CREA（μmol/L） | 雌雄合并 | 49 | 15.0 | 13.0 | 18.5 | 15.8 | 3.7 |
| 肌钙蛋白ⅠCTNⅠ（ng/mL） | 雌雄合并 | 53 | 5.94 | 3.50 | 10.74 | — | — |
| C反应蛋白CRP（mg/L） | 雌雄合并 | 53 | 0.42 | 0.39 | 0.44 | 0.42 | 0.04 |
| 乳酸脱氢酶LDH（U/L） | 雌性 | 26 | 1530 | 762 | 2 107 | 1438 | 699 |
| | 雄性 | 25 | 947 | 715 | 1266 | — | — |
| 总蛋白TP（g/L） | 雌性 | 25 | 69.0 | 66.5 | 72.5 | 69.2 | 4.1 |
| | 雄性 | 23 | 65.0 | 62.0 | 69.0 | 65.0 | 5.9 |
| 球蛋白GLOB（g/L） | 雌性 | 26 | 37.0 | 35.0 | 39.3 | 36.8 | 3.1 |
| | 雄性 | 25 | 32.0 | 28.0 | 37.0 | 32.0 | 5.9 |
| 甘油三酯TG（mmol/L） | 雌性 | 22 | 0.52 | 0.44 | 0.56 | 0.51 | 0.10 |
| | 雄性 | 28 | 0.43 | 0.32 | 0.54 | 0.40 | 0.19 |
| 糖化血红蛋白A1C% HBA1C%（%） | 雌性 | 25 | 4.53 | 4.31 | 4.81 | 4.56 | 0.30 |
| | 雄性 | 25 | 4.22 | 4.00 | 4.48 | 4.22 | 0.31 |
| 空腹C肽CP-K（ng/mL） | 雌性 | 24 | 1.03 | 0.54 | 1.66 | 1.14 | 0.86 |
| | 雄性 | 24 | 0.35 | 0.12 | 0.86 | — | — |

比较中显现出的另一个突出变化是血液葡萄糖分布。54只野生树鼩得到53个检测值，其中5个离群值均为高值，分别是：14.9mmol/L、15.8mmol/L、16.2mmol/L、21.1mmol/L和23.4mmol/L，19个检测样本的血糖值高于7.0mmol/L。野生树鼩中存在个体空腹血糖水平较高的现象早已发现，《树鼩生物学》引用Elliot等1968年的研究推论认为“高的血糖值也许不一定表明树鼩中的糖尿病，树鼩易怒的秉性也许是由于血糖升高所致”；这一推测一直未得到进一步的实验论证。而新的代表机体检测前中期（1～2周）及长期（8～12周）血糖水平的果糖胺、糖化血红蛋白指标的引入，有助于解释这一现象。

以7.0mmol/L为限将53只树鼩分为两组，其葡萄糖代谢相关指标的比较结果见表13-3。

表13-3　葡萄糖代谢相关指标比较[4]

| 指标（单位） | 组别（例数） | 平均值 | 标准差 | *P*值 |
|---|---|---|---|---|
| 果糖胺FRUC（μmol/L） | 1（34） | 391.8 | 73.0 | ＜0.05 |
| | 2（19） | 335.9 | 61.4 | |
| 糖化血红蛋白A1C% HBA1C%（%） | 1（34） | 4.15 | 0.35 | ＞0.05 |
| | 2（19） | 3.89 | 0.49 | |
| 空腹C肽CP-K（ng/mL） | 1（34） | 0.62 | 0.45* | ＜0.05 |
| | 2（19） | 2.16 | 1.40* | |

组别1为血糖值≤7.0mmol/L，组别2为血糖值≥7.2mmol/L。*：该组数据呈非正态分布。

比较结果表明，两组间C肽水平的变化与即刻血糖水平高低相匹配，而即刻血糖较高组树鼩在检测前中长期及长期的血糖水平并不高于其对照组，由此可以基本判断采样时部分树鼩个体的高血糖状态应属于一过性的应激性血糖升高，而不是树鼩生理水平的真实反映。而人工繁育组血糖检测值的分布情况，也从另一个侧面支持这一判断。

新的能更灵敏、更特异、更稳定地反映机体生理病理变化的检测指标的引入和尝试，也是本次实验研究的目的之一。本次实验对血常规、肝肾功能、糖、脂代谢、心肌标志物、肿瘤标志物、急性时相反应蛋白等检测指标进行了较为广泛的尝试。其中，前白蛋白、癌胚抗原、甲胎蛋白、胰岛素检测值大多低于检测系统的检测下限，而肌红蛋白检测值远高于人类正常值乃至病理值，且近一半高于系统的检测上限。与检索到的文献比较，本次研究首次报道了肌酸激酶、乳酸脱氢酶、总胆汁酸、高密度脂蛋白胆固醇、低密度脂蛋白胆固醇、果糖胺、糖化血红蛋白、C肽和肌钙蛋白Ⅰ在正常树鼩中的检测值分布。所尝试的指标在临床医学中均得到了广泛应用并被循证医学证明具有良好的临床诊断效能。尽管这些指标在树鼩动物模型中的应用尚有待更加充分的研究资料加以佐证，但果糖胺和糖化血红蛋白对树鼩血糖变化的甄别作用已然初步显现。

除上述指标以外，木云珍等用完全随机抽样方法选取成年期20周龄树鼩10只，采用WS/T66–1996全血胆碱酯酶活性的羟胺–三氯化铁分光光度法分别测定树鼩全血胆碱酯酶活性，检测得其活性值为94.15 ± 4.65（经正态性检验偏度系数和峰度系数$P>0.05$，符合正态性）。

周冰等的研究表明：树鼩脂蛋白脂肪酶活性显著高于人类（7.67倍）；这一结果与测定的树鼩血浆低甘油三酯水平相符，分析结论认为树鼩的高活性脂蛋白脂肪酶可能是其血浆低水平甘油三酯的主要原因[7]。

## 第二节 树鼩的常用血液学指标

血液学是一个独立的分支学科，它的研究对象是血液及造血组织，研究内容包括血细胞形态学、血细胞生理学、血液生化学、血液免疫学、遗传血液学、血液流变学、实验血液学等诸多方面。随着基础学科和实验技术的发展，血液学的研究内容和范畴已扩展到了血细胞生物学和血液分子生物学等领域，并仍然处于不断地深入和扩大之中。

常用的血液学指标，包括了外周血细胞的数量检测和形态学筛查。骨髓细胞学检测分析结果则反映出了骨髓涂片中细胞形态、数量等方面的生理病理变化，可借以了解骨髓的造血功能状况。两者的有机结合，共同构成了一套在动物实验中重要的、经常运用的生理监测和实验效应观测指标。

### 一、骨髓细胞形态学分析

本次实验共用野生成年树鼩54只，雌雄各半，均在昆明地区捕获，于实验前经人工饲养1～2月。树鼩体重为：雌性95～131g（平均114.2g），雄性108～143g（平均117.8g）。实验分析操作如下：

#### （一）骨髓采集

树鼩处死后尽快解剖分离完整股骨，用骨剪在近髋关节端切断股骨，暴露髓腔；止血钳微用力夹裂股骨后再用镊子由腔内向外剥离骨片，暴露骨髓，外形完整、颜色鲜红者为合格样本。用

镊子轻柔取出骨髓，分别制成涂片和印片。

### （二）制　片

1. 涂　片

取出的骨髓置入30 μL事先制备分装好的同种血清中，轻轻混匀后用微量移液器取10 μL于清洁玻片上，推展成涂片，自然通风干燥，保存备用。

2. 印　片

直接将镊子上的骨髓样本轻轻点印在清洁玻片上，样本接触到玻片即可，否则会造成印片过厚。制成的印片自然通风干燥，保存备用。如操作中样本脱离镊子落到玻片上，则为不合格的制片。

### （三）样本分析

由两名工作经验丰富的临床血液病学检验医师共同完成。

1. 样本筛选

结合同批树鼩的血常规检测结果，选择外周血三系分布无异常，制片质量良好的样本30例（其中，雌性占17例）进行染色及骨髓细胞形态分析。

2. 染色及观察

染液配制、染色操作及染色质量的控制参照文献中相关章节[8]，高倍视野初步观察样本的制片、着色及造血细胞增生情况，油镜下对两种制片方式裸核细胞发生率进行20例的计数比较。根据比较结果选择裸核发生率低的印片，仔细观察并分类计数500个有核细胞并完成图像采集。

3. 数据处理

采用SPSS 13.0软件包。所有指标均以中位数作为描述其集中趋势的参数；对于符合正态分布的指标，则计算算术平均值和标准差。统一使用百分位数法制定骨髓各系各阶段细胞分类计数的参考范围。

4. 分析结果

见图13–1、图13–2以及表13–4。

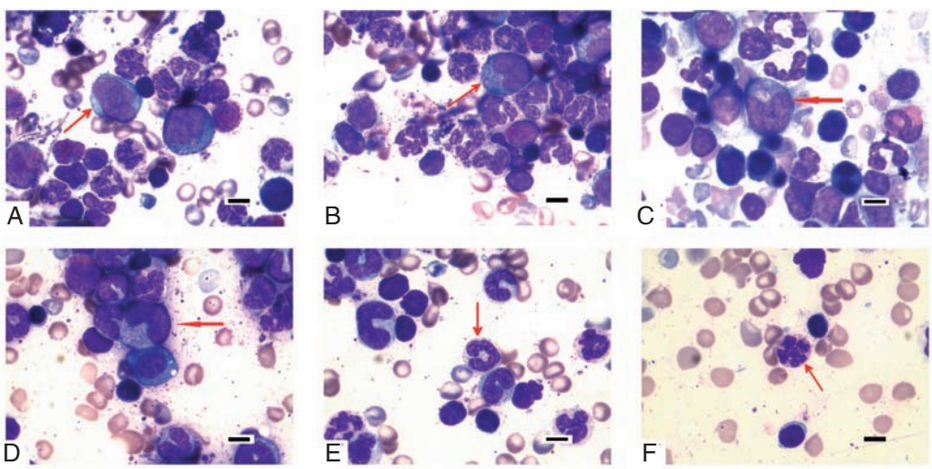



**图13–1（a）　树鼩骨髓粒系细胞和单核细胞图谱**

（A）原始粒细胞；（B）早幼粒细胞；（C）嗜碱性分叶核粒细胞；（D）嗜中性中幼粒细胞；（E）嗜中性晚幼粒细胞；（F）嗜中性杆状核粒细胞。放大倍数：1000，图示“—”：为10 μm。

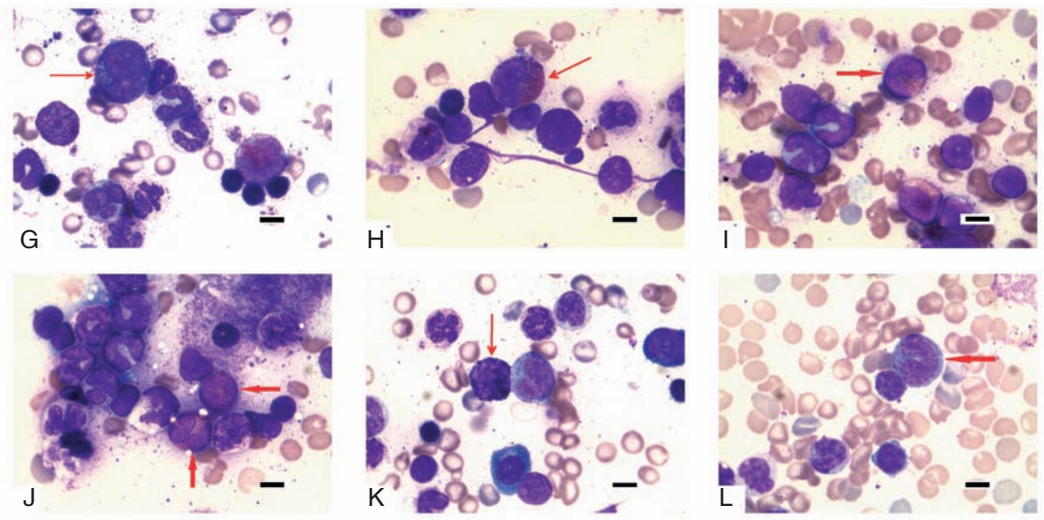



**图13–1（b） 树鼩骨髓粒系细胞和单核细胞图谱**

（G）嗜酸性杆状核粒细胞；（K）嗜酸性分叶核粒细胞；（L）单核细胞。放大倍数：1000，图示“—”：为10 μm。

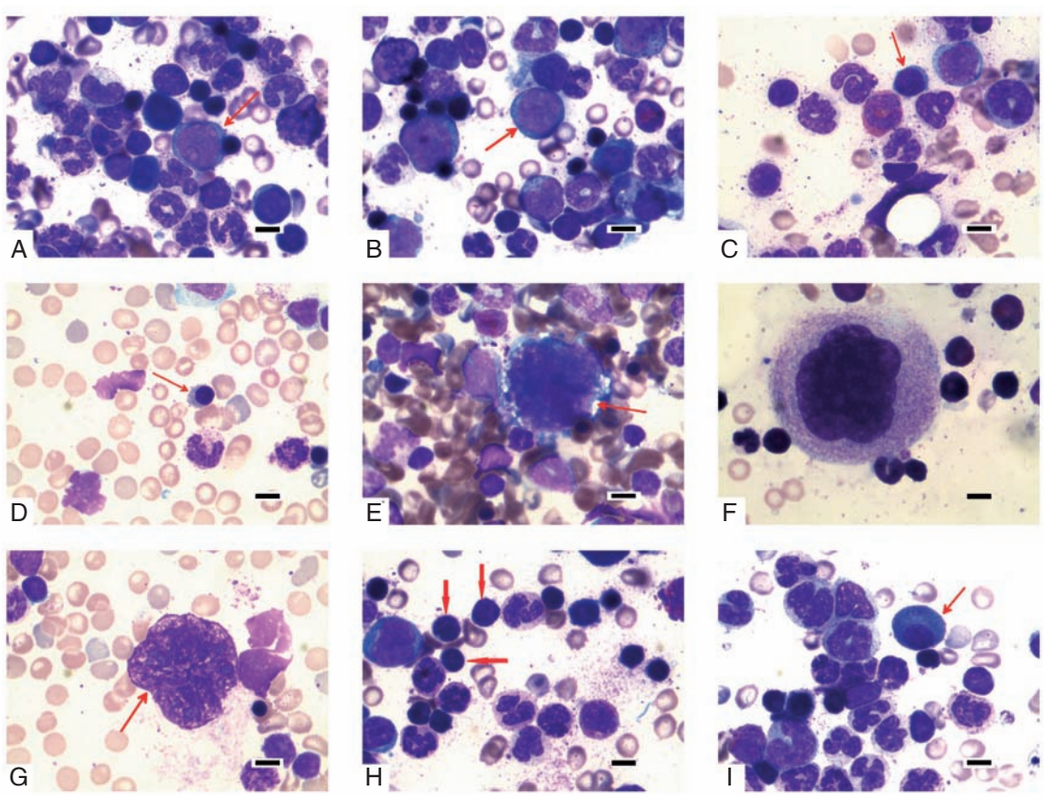



**图13–2 红系、巨核系和其它细胞**

（A）原红细胞；（B）早幼红细胞；（C）中幼红细胞；（D）晚幼红细胞；（E）小淋巴细胞；（F）浆细胞；（G）幼稚型巨核细胞；（H）颗粒型巨核细胞；（I）裸核型巨核细胞。放大倍数：1000，图示“—”：为10 μm。

表13–4　树鼩骨髓细胞分类计数结果（%）

| 细胞类别 | | 算术平均值 ± 均数标准差 | 中位数 | 参考范围 |
|---|---|---|---|---|
| 粒细胞系统 | 原始粒细胞 | | 0.00 | 0.0 ~ 0.5 |
| | 早幼粒细胞 | 1.73 ± 1.16 | 1.50 | 0.5 ~ 3.5 |
| | 嗜中性中幼粒细胞 | | 1.00 | 0.0 ~ 2.0 |
| | 嗜中性晚幼粒细胞 | | 0.50 | 0.0 ~ 1.5 |
| | 嗜中性杆状核粒细胞 | 16.77 ± 6.07 | 15.50 | 7.5 ~ 26.0 |
| | 嗜中性分叶核粒细胞 | 18.58 ± 8.00 | 17.25 | 9.0 ~ 30.0 |
| | 嗜酸性中幼粒细胞 | | 0.50 | 0.0 ~ 1.0 |
| | 嗜酸性晚幼粒细胞 | | 0.75 | 0.0 ~ 1.5 |
| | 嗜酸性杆状核粒细胞 | | 1.50 | 0.5 ~ 5.5 |
| | 嗜酸性分叶核粒细胞 | | 2.50 | 1.5 ~ 8.0 |
| | 嗜碱性分叶核粒细胞 | | 0.00 | 0.0 ~ 1.0 |
| 红细胞系统 | 早幼红细胞 | | 0.25 | 0.0 ~ 1.5 |
| | 中幼红细胞 | | 6.00 | 0.5 ~ 18.5 |
| | 晚幼红细胞 | 20.92 ± 10.91 | 19.75 | 6.0 ~ 34.0 |
| 其它细胞 | 淋巴细胞 | 20.17 ± 8.32 | 19.50 | 8.0 ~ 32.5 |
| | 单核细胞 | 4.60 ± 2.75 | 4.00 | 1.0 ~ 8.5 |
| | 浆细胞 | | 1.00 | 0.0 ~ 2.0 |

原红细胞的构成比低于0.2%。

国内对树鼩骨髓象的研究报告最早见于1986年[9]，以此为参照，俞发荣等曾尝试考察人工饲养环境对树鼩骨髓象的影响[9]。本次实验研究依然以张耀平等1986年的报道为主要参照。

本组树鼩骨髓细胞形态学观察发现：骨髓造血细胞增生程度大都极度活跃。粒系细胞以成熟阶段的中性粒细胞为主，中幼及晚幼粒细胞阶段细胞比例比人类低。中性粒细胞胞浆染蓝色，胞浆中中性颗粒明显减少，部分可见蓝紫色嗜天青颗粒。部分中性杆状核粒细胞胞浆中中性颗粒减少，部分早幼粒细胞的细胞核可见凹陷、折叠；两者均需要与单核细胞进行鉴别。红系以晚幼红细胞为主，形态与人类幼红细胞相近。巨核系增生旺盛，以颗粒型巨核细胞为主。三系外，淋巴细胞以小淋巴细胞为主。裸核细胞易见，大部分为裸核型网状细胞，其余多为崩解退化的粒系细胞。

骨髓细胞分类计数的统计结果显示：在骨髓有核细胞中，粒系细胞占50.7%（38.0% ~ 62.5%），红系细胞占26.9%（10.5% ~ 42.5%），淋巴细胞占20.2%（6.5% ~ 33.0%）。

与张耀平等的结果比较，淋巴细胞比例偏高，但两者的粒红细胞比值接近，各系各阶段细胞计数的分布范围基本接近。没有发现嗜碱性粒细胞比例大于嗜酸性粒细胞及骨髓细胞中出现少量环形核粒细胞的现象；相反，在本组样本中，嗜酸性粒细胞比例偏高。

张耀平等用Giemsa染色方法观察到了在树鼩骨髓细胞中，嗜碱性粒细胞比例较高。但在外周血，邹如金等同样用Giemsa染色方法[11]，谢丽等应用血细胞自动分析计数的手段[12]都没有发现血液中的嗜碱性粒细胞比例的增加。就功能而言，嗜碱性粒细胞在血液中停留时间不长，主要在组织中发挥作用，与机体的炎症和过敏反应有关。嗜碱性粒细胞的增高出现于病理状态，如罕见的嗜碱性粒细胞白血病病例，此外慢性粒细胞性白血病常伴有嗜碱性粒细胞增高，骨髓纤维化症、慢性溶血及脾切除后也可见嗜碱性粒细胞增高。树鼩的嗜酸性粒细胞比例较高可以用野生环境

下，寄生虫侵袭常见来解释；而在生理条件下的嗜碱性粒细胞比例增加，其生理学意义解释有困难。因此，对于树鼩骨髓细胞学特点，尚需更多的实验研究资料加以论证。而关于环形核粒细胞现象，目前已经认识到其在人类骨髓细胞中并不罕见，且多见于MDS等病态造血，但其发生机理及临床诊断价值仍然不明。

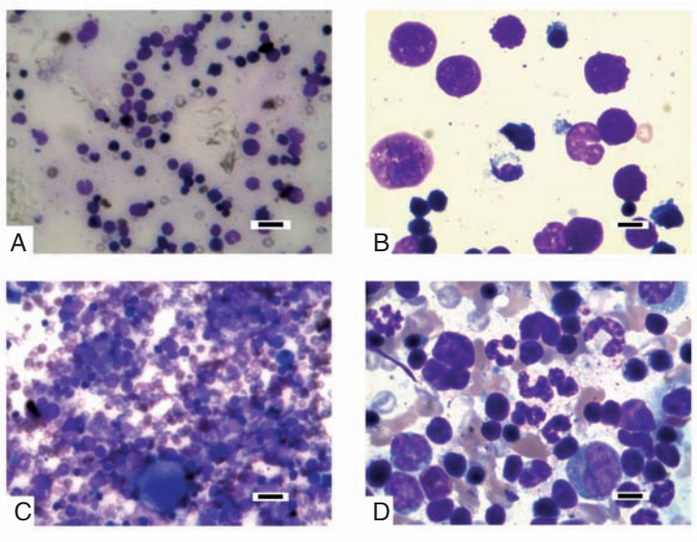



**图13–3　裸核细胞及退化细胞的镜下形态**

（A）涂片（×400）；（B）涂片（×1000）；（C）印片（×400）；（D）印片（×1000）。图示“—”：×400镜下为25 μm，×1000镜下为10 μm。

样本采集及涂片制作是对骨髓细胞形态学分析干扰最大的两个潜在环节[13，14]。外力对较为脆弱的骨髓细胞的破坏是产生裸核细胞的一个主要原因；而裸核细胞的存在会干扰着骨髓细胞分析过程，影响数据分析质量。稀释涂片是小型动物骨髓采集后制片的惯用方法[5]，但如何降低稀释法对骨髓细胞的损伤未见报道。在本次研究中，与涂片相比，印片中的裸核发生率明显减低，参见图13–3和表13–5所示比较结果。这一结果提示，通过对方法学的改进，能够有效地降低树鼩骨髓涂片的裸核细胞发生率，提高骨髓细胞分析的质量。

**表13–5　两种制片方式的裸核细胞发生率比较**

| 项目 | 样本量 | 平均值 | 标准差 | *t*值 | *P*值 |
|---|---|---|---|---|---|
| 涂片 | 20 | 28.5 | 8.0 | –8.89 | <0.01 |
| 印片 | 20 | 13.0 | 4.3 | | |

骨髓是各种血细胞的重要发源地之一，具有重要的生理功能，同时骨髓也是很多有毒物质毒性作用的敏感靶器官[13]。尽管到目前为止，对中缅树鼩滇西亚种的骨髓细胞学研究报道还非常有限，报道的结果也不完全一致，检查方法还有待进一步规范和改进；但是随着树鼩在生物医学研究中的广泛应用，其骨髓细胞学分析研究将会取得与其应用发展相适应的充实和提高。

## 二、外周血细胞数量检测

实验使用的树鼩情况及采样操作见上节。实验检测采用美国雅培CELL-DYN3700全自动血球分析仪及其配套试剂。弃除凝血、存在微小凝块等不合格标本后严格按相关操作程序进行实验检测和质量控制。数据处理同上节，检测结果分别见表13–6和表13–7。

表13–6　野生组树鼩常用血常规指标检测结果

| 检测项目（单位） | 性别 | 例数 | 中位数 | 四分位数 | | 算术平均值 | 标准差 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 白细胞计数WBC（10E9/L） | 雌雄合并 | 44 | 0.63 | 0.40 | 1.04 | 0.72 | 0.43 |
| 血红蛋白HGB（g/L） | 雌雄合并 | 49 | 137.0 | 99.0 | 147.0 | — | — |
| 红细胞计数RBC（10E12/L） | 雌性 | 21 | 7.85 | 7.37 | 8.44 | 7.93 | 0.59 |
| | 雄性 | 25 | 7.35 | 5.24 | 9.02 | 6.97 | 2.15 |
| 血小板计数PLT（10E9/L） | 雌雄合并 | 48 | 621.5 | 537.8 | 757.5 | 640.9 | 163.1 |

表13–7　人工繁育组树鼩常用血常规指标检测结果

| 检测项目（单位） | 性别 | 例数 | 中位数 | 四分位数 | | 算术平均值 | 标准差 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 白细胞计数WBC（10E9/L） | 雌雄合并 | 49 | 0.34 | 0.25 | 0.66 | — | — |
| 血红蛋白HGB（g/L） | 雌雄合并 | 47 | 148.0 | 136.0 | 162.0 | 149.2 | 15.5 |
| 红细胞计数RBC（10E12/L） | 雌雄合并 | 47 | 7.94 | 7.33 | 8.68 | 7.99 | 0.92 |
| 血小板计数PLT（10E9/L） | 雌雄合并 | 51 | 587.0 | 479.0 | 661.0 | 565.6 | 153.5 |

两组间比较结果显示：白细胞计数、血红蛋白、血小板计数3个指标间的差别具有显著性（*P*值均小于0.05）。

本次实验检测中，白细胞计数检测值低于谢丽等使用同一型号检测设备的近期报道[12]；而谢丽等的结果与白继丽等[15]的相似，且两者皆接近邹如金等1983年的研究结果[11]。从方法学角度分析，邹如金等使用的显微镜计数方法的可靠性要优于基于电阻法测定、光电信号转换的自动计数方法；因此，有理由认为在本次检测中，白细胞计数出现了明显的系统误差。有关中缅树鼩滇西亚种的血液学生理指标检测，还可参考李进涛等[16]在近期的相关报道。

自动化检测设备的引入，极大地促进了血液学指标的检测工作，达到了快速、简便、多参数同时检测的目的，并且一般来说其检测重复性也优于手工方法。但是值得注意的是，人与实验动物，以及各种实验动物之间的血液细胞形态学特征是存在着差别的。差别的客观存在，就需要对检测设备进行针对性的参数调整以适应针对不同物种的检测，进而保证检测结果的准确可靠。此外，多种实验因素也会影响到树鼩血液学指标的检测结果，比如树鼩的高应急状态，对于包括白细胞计数在内的应急反应明显的检测指标都会产生难以避免的影响。这种影响已经受到了研究者们的关注，近期黄璋琼等[17]在对树鼩凝血4项：凝血酶时间（TT）、纤维蛋白原凝集时间（Fib）、活化部分凝血活酶时间（APTT）、凝血酶原时间（PT）进行检测分析的工作中，注意到了检测过程中发生的异常情况，并对检测实验的影响因素进行了讨论。在方法学问题得到充分验证之前，应以审慎的态度对待细胞形态学检测分析的新的技术手段，特别是作为实验的关键性观测指标时，尤需如是。

在本组资料的比较分析中还可发现，树鼩的部分生理指标检测值分布的离散趋势较大，而在近期的同类研究报告中也存在相似的情况[12, 15]，本组数据中雌雄合并后呈正态分布的检测项目与相似报道间变异系数的比较结果见表13–8和表13–9。

表13-8　野生短期饲养组树鼩与文献报道[15]结果的变异系数比较[4]

| 检测项目（单位） | 本　文 | | | 文献报道 | | | *u*值 | *P*值 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 例数 | 平均值 | 变异系数（%） | 例数 | 平均值 | 变异系数（%） | | |
| 天门冬氨酸氨基转移酶AST（U/L） | 49 | 198.4 | 30.3 | 140 | 93.94 | 76.5 | 6.150 | ＜0.01 |
| 丙氨酸氨基转移酶ALT（U/L） | 49 | 73.6 | 49.7 | 140 | 30 | 102.0 | 4.236 | ＜0.01 |
| 葡萄糖GLU（mmol/L） | 48 | 5.46 | 46.0 | 140 | 3.7 | 34.6 | 1.880 | ＞0.05 |
| 白细胞计数WBC（10E9/L） | 44 | 0.72 | 59.7 | 140 | 2.21 | 42.1 | 1.997 | ＜0.05 |
| 血小板计数PLT（10E9/L） | 48 | 640.9 | 25.4 | 140 | 430.86 | 14.1 | 3.930 | ＜0.01 |

表13-9　人工繁育组树鼩与文献报道[11]结果的变异系数比较[4]

| 检测项目（单位） | 本　文 | | | 文献报道 | | | *u*值 | *P*值 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 例数 | 平均值 | 变异系数（%） | 例数 | 平均值 | 变异系数（%） | | |
| 肌酐CREA（μmol/L） | 49 | 15.8 | 23.4 | 22 | 16.63 | 37.2 | 2.026 | ＜0.05 |
| C反应蛋白CRP（mg/L） | 53 | 0.42 | 9.5 | 22 | 2.4 | 51.3 | 4.352 | ＜0.01 |
| 红细胞计数RBC（10E12/L） | 47 | 7.99 | 11.5 | 22 | 8.19 | 9.3 | 1.205 | ＞0.05 |
| 血红蛋白HGB（g/L） | 47 | 149.2 | 10.4 | 22 | 155 | 9.4 | 0.567 | ＞0.05 |
| 血小板计数PLT（10E9/L） | 51 | 565.6 | 27.1 | 22 | 450.17 | 14.5 | 3.457 | ＜0.01 |

离散趋势过大不仅直接影响到样本均数的代表性，而且也会对同批次小样本动物实验结果的解释带来难以识别和排除的干扰。对于导致实验树鼩部分生理项目检测值离散趋势较大的原因，除树鼩的个体差异，及在采样过程中由于较强的应激反应特性和麻醉程度可能不一致产生的干扰外，检测方法和检测过程带来的影响也不容忽视。

就检测方法而言，目前在使用中应引起注意的是建立在抗原抗体反应基础上的定量检测试验。抗原抗体反应是特异性结合反应，在无相应检测抗体的条件下，可以借用其它物种的抗体，但作为关键试验参数的交叉程度、反应特异性、灵敏度、线性等大多因无物种特有的标准品而未得到评估；其结果是使得检测结果的准确性和实验室间的可比性难以保证。以本次实验结果为例，难以准确判断与人类同一项目检测值分布接近但低于人类水平的C肽，相去甚远的肌红蛋白、肌钙蛋白是否属于本组树鼩的真实反应。再如树鼩胰岛素的检测。本次实验采用雅培的化学发光检测系统，胰岛素检测值集中分布于系统的检测下限（0.2mU/L）附近，而蒙碧辉等[18]采用放射免疫分析法检测树鼩空腹血清胰岛素水平，正常对照为（4.2 ± 0.8）mU/L。此水平仅接近于人类正常参考范围（6 ~ 25mU/L）[19]的下限，而该实验组树鼩的血糖水平与人类正常参考范围基本一致，这种差异说明树鼩血清胰岛素的真实水平问题尚有待于方法学的论证确定。

即使是成熟的检测技术，在检测过程中也会发生较大的偏差，进而影响到对实验结果的判断，如在本次实验检测中，白细胞计数检测值出现的明显的系统误差；而这类误差同样也可能存在于基于同一检测原理的其它检测项目中。

检测方法和检测过程中类似误差对实验结果解释的不利之处不仅在于会使不同实验室间的结果难以比较，而且更为不利的是可能会模糊或掩盖同一批次实验，不同处理组别之间的差距，从而导致结果判断失真。而要识别和控制实验检测中潜在的类似误差，则需要与检测项目对应，与检测样本具有反应一致性的校准品及质控物。

综上所述，实验树鼩的开发利用已经进入了一个新的发展时期，树鼩在人类疾病的动物模型

研究中具有广阔的前景。这一前景的落实和发展，必然对树鼩生理数据库的建立和不断完善产生相应的要求。而随着实验树鼩在人类疾病动物模型领域的广泛应用，对实验结果的重现性，实验结果间的可比性要求也将逐步提高。

树鼩的人工繁育将会有效地减低树鼩个体间的变异程度，提高实验结果的可比性。与此同时，开发与疾病模型动物相适应的检测方法，寻找更稳定的、诊断效能更佳的检测指标以满足科研活动的需求；开发适用于实验树鼩的基准物质和质控品，对现有检测方法的可利用性和可信度加以评估，以保障实验结果的准确度和精密度；科学合理地选择科研设计和统计分析方法，以使得数据和结果更具指导价值；这些都是实验树鼩标准化建设工作中不可或缺的重要组成部分。

## 参考文献

[1]彭燕章，叶智彰，邹如金，等．树鼩生物学．昆明：云南科技出版社，1991．
[2]角建林，刘汝文，陈丽玲，等．树鼩资源的开发利用与标准化研究——我国实验动物资源建设发展战略探讨．中国比较医学杂志，2009，19（7）：73–8．
[3]于永梅，吴一迁，王生存，等．中缅树鼩的实验室驯化．上海交通大学学报（农业科学版），2002，20（z1）：24–7．
[4]马旭通，李福林，蒋宏君，等．野生和人工繁育树鼩部分生理指标检测与比较．动物学研究，2011，32（1）：4–10．
[5]吴端生，张健．现代实验动物学技术．北京：化学工业出版社，2007．
[6]木云珍，曹慧芳，周肇晏，等．树鼩全血胆碱酯酶活性测定分析．昆明医科大学学报，2012，5：38–9．
[7]周冰，曾武威，孙国涛，等．树鼩脂蛋白脂肪酶的cDNA克隆、组织分布及活性测定．中国动脉硬化杂志，2007，15（11）：801–4．
[8]朱忠勇，马立人，等．实用医学检验学．北京：人民军医出版社，1992．
[9]张耀平，彭燕章，叶智彰．树鼩（*Tupaia belangeri chinensis*）的正常骨髓象及其特点．动物学研究，1986，7（1）：47–52．
[10]俞发荣，连秀珍．人工环境对中国树鼩血象和骨髓象的影响．甘肃科学学报，2001，13（2）：51–3．
[11]邹如金，代伟，贲昆龙，等．树鼩（*Tupaia belangeri*）血象的研究．动物学研究，1983，4（3）：291–4．
[12]谢丽，秦雪，陈晓燕，等．实验室繁育树鼩生理指标的检测分析．四川动物，2007，26（3）：682–5．
[13]刘芳．改进的大鼠骨髓涂片制备方法．实验动物科学，2010，27（2）：50–4．
[14]叶智彰，白寿昌．关于猕猴（*Macaca mulatta*）血象和骨髓象的研究．实验生物学报，1978，11（2）：76–84．
[15]白继丽，孙晓梅，王欣，等．人工饲养树鼩血液学及生化指标正常值测定及分析．中国比较医学杂志，2009，19（7）：38–41．
[16]李进涛，何保丽，李波，等．滇西亚种树鼩血液学生理指标的测定及其初步分析．昆明医科大学学报，2013，2：11–5．
[17]黄璋琼，代解杰，孙晓梅，等．人工饲养树鼩和猕猴的部分凝血因子凝集时间的测定及分析．实验动物科学，2011，28（3）：37–41．
[18]蒙碧辉，刘红，梁莹，等．1型糖尿病树鼩骨骼肌病变及其发病机制．中华糖尿病杂志，2005，13（4）：290–2．
[19]Lothar Thomas．临床实验诊断学——实验结果的应用和评估．吕元，朱汉民，等译．上海：上海科学技术出版社，2004：119．



# 第十四章

Tree shrews

## 树鼩乳腺生物学

第一篇 树鼩基础生物学
TREE SHREW BASIC BIOLOGY

夏厚军　陈策实

乳腺是哺乳动物特有的哺育后代的重要器官，是区别于其它种属动物的重要表型。作为哺乳动物一员，雌性树鼩同样通过乳腺分泌的乳汁哺育后代，但相关方面的研究几乎空白。啮齿类动物被广泛地应用于乳腺发育及乳腺癌发生发展的研究模型。树鼩作为新兴的实验动物，已在神经科学、肝炎及肝癌等研究中取得了重要的成果。在此章节，我们围绕树鼩乳腺的结构和发育，并与人和啮齿类动物乳腺进行比较，为树鼩乳腺疾病模型的建立奠定基础。

## 第一节 树鼩乳腺的正常发育

### 一、树鼩乳腺的特征

#### （一）树鼩乳腺解剖学

在不同物种间，雌性乳头数目是不同的。高等的人类仅有1对乳头，而啮齿类动物中大鼠有6对乳头，小鼠有5对乳头[1]。树鼩的乳头在不同亚种之间存在从1～3对的变化，因此树鼩乳头数目也成为判断树鼩一定的种和种组的特征，其在同一种属中乳头数目是恒定的。现有的分类学将分布于我国南部的树鼩划归到北树鼩（*Tupaia belangeri*；亦称中缅树鼩），雌雄都具有3对乳头，从头部往下第一对乳头位于胸壁，第二对乳头位于腹部，第三对乳头靠




图14-1　青春期雌雄树鼩的乳腺分布（红色箭头对应乳头）

近腹股沟。在青春期，雌性树鼩乳头虽小但还可以明显辨别，而雄性树鼩仅能在对应处看到疑似乳头的小点（图14–1）。

雌性树鼩的一生中可以按照乳腺的发育进程划分为处女期（virgin）、妊娠期（gestation）、哺乳期（lactation）和消退期（involution），其中后3个时期因怀孕次数而更替循环。在处女期，树鼩整个乳腺只有薄薄的一层紧紧贴附于皮肤之下。尽管树鼩在4月龄左右即进入性成熟期，但乳腺很小，仅能从乳头寻找到乳腺所处的位置（图14–1），很难获取到乳腺的组织样本，其往往包裹在脂肪组织中。在实验饲养条件下，树鼩没有明显的生殖季节[2]，一年最少可以交配4次左右，其妊娠期的时间均为41～51天[3]。树鼩乳腺从妊娠期开始迅速膨胀、发育，脂肪组织和结缔组织日益丰富，直到哺乳期分泌乳汁哺育子代。在这个时期树鼩的乳腺比较明显，可以直接观察到乳房膨大。树鼩哺乳时间一般持续35～40天，其后乳腺逐渐消退至正常，但仍保留着部分的乳腺残余。

### （二）树鼩乳腺组织学

在哺乳动物中，乳腺可以简单地描述为由腺体和导管系统两部分组成，其外包裹着脂肪组织和纤维组织的器官。乳腺导管系统是由输乳管（lactiferous ducts）反复分支延伸而呈现树状分支结构的乳汁输送系统，大多为2分支型。输乳管连接着乳腺终端的腺叶和乳头顶端开口处，是由多个小乳管先汇集成小叶间乳管，再由多个小叶间乳管再进一步汇集成一根连接整个腺叶的乳腺导管。腺叶又分成若干个小叶，每个小叶由10～100个腺泡组成。这些腺泡紧密地排列在小乳管周围，腺泡的开口与小乳管相连。腺泡内的分泌细胞将乳汁分泌到腺泡腔中，再逐级汇集，最后经乳腺导管流向体外。在人一侧乳房中分布着10套以上独立的乳腺导管小叶系统，以乳头为中心呈放射状排列，分别开口于乳头[4]。不同于人，啮齿类动物的单个乳房中乳腺组织都终止于单一的输乳管，并分支成5～10个二级导管以线性模式延伸至乳腺脂肪垫中[5]。

树鼩的整个乳腺微观结构与人以及啮齿类动物比较相似，也同样由分形的树枝状导管和内部小叶组成。通过乳头往导管内注入台盼蓝后可清楚看到蓝色液体扩散到导管各层次分支中（图14–2A）。将整片树鼩乳腺剥离后进行染色可以清楚看到树鼩乳腺导管在末端呈现与小鼠相似的分形结构，末端有未发育完全的小叶结构（图14–2B）。通过注射染料无法确定树鼩是否单个乳房只存在单一的导管系统，而横切树鼩乳头显微观察可以发现多个导管系统存在（图14–2C）。

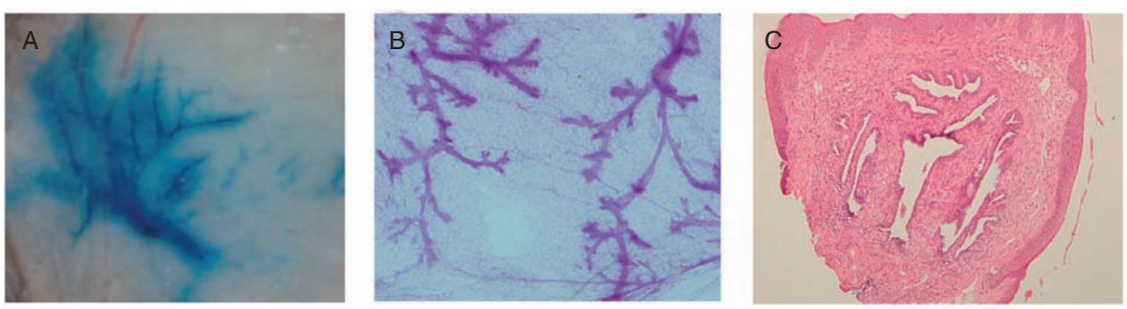



**图14–2　处女期树鼩乳腺导管系统**

（A）台盼蓝注射染色；（B）树鼩全乳腺组织染色（whole mount）；（C）树鼩乳头横切面HE染色。

### （三）树鼩乳腺形态学变化

1. 树鼩乳腺的形态结构

现有的研究能够大致阐述小鼠乳腺的发育过程。小鼠乳腺的发育主要集中在两个阶段：青春期和妊娠早期。从胚胎期10.5～18天，小鼠的5对乳腺上皮基板（mammary epithelial placodes）就已经成型，并嵌进间叶细胞中形成乳腺芽，在出生后到青春期之前仅形成有限的分支。一旦进入青春期，高涨的激素诱使基板导管终端增殖并发育为球状的末端乳芽（terminal end bud, TEB）[6]。在成年后小鼠乳腺进一步通过TEB形成球棒状突起，从而入侵到空余的脂肪组织中，植根于乳腺脂肪垫，TEB突起的外层上皮细胞最终分化为肌上皮细胞（myoepithelial cells），主要辅助乳汁的排出；而内部上皮细胞最终分化为腔上皮细胞（luminal cells），负责分泌乳汁[7]。TEB的扩张带动了导管形成多级结构，直至延伸到脂肪垫边缘而停止[8]。在怀孕过程中，小鼠乳腺将经历第二次发育。导管的增殖能力显著提高并形成腺泡状芽苞（alveolar buds）。到了妊娠晚期，腺泡将充满乳腺脂肪垫中同时腔上皮细胞分化成熟并分泌乳汁。断奶后小鼠乳腺开始消退，分泌型腔上皮细胞发生凋亡促使大量腺泡萎缩。上皮细胞和基质重新组合到怀孕前状态[9]。

由于正常样本的匮乏使得人乳腺的发育还存在很多不清楚的地方，但大致上与啮齿类发育比较一致。人的乳腺基本单位是由腔上皮细胞与肌上皮细胞形成中空的腺泡汇聚成为小叶，再与小叶外导管（extralobar terminal duct, ETD）相连组成末端导管小叶单位（terminal ductal lobular unit, TDLU）。TDLU结构与TEB一致，都是由双层细胞组成乳汁分泌的终端。不过人的乳腺是由多个TDLU聚合成葡萄状小体再与导管相连，而小鼠乳腺大多是单一的TEB与导管相连，这可能与小鼠线性结构的导管系统相关[1]。

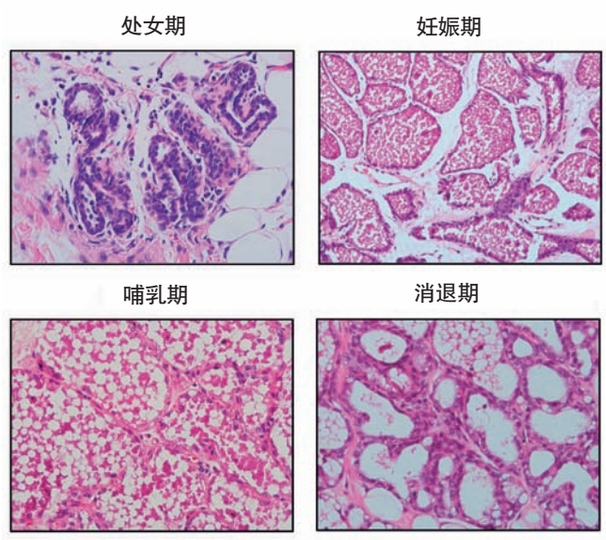



**图14–3　树鼩不同生理周期中乳腺的显微结构（40×）**

从图14–2可见处女期树鼩的乳腺终端同样存在TEB结构，更细微的观察则通过将组织进行切片并进行HE染色观察。从图14–3我们可以看到树鼩乳腺末端在不同生理周期发生了巨大的变化。树鼩乳腺腺泡同样是由腔上皮细胞和肌上皮细胞组成。处女期树鼩乳腺导管体积较小，腺泡中双层上皮细胞内侧的腔上皮细胞呈圆形或卵圆形，成熟后具有分泌功能；外侧的肌上皮细胞呈梭形，具有收缩功能。从妊娠期到哺乳期，乳腺在功能上完全成熟，乳腺小叶腺泡体积逐渐增大，腺泡腔内充满乳液，腔上皮细胞被挤压变扁。随着哺乳期向消退期的转化，腺泡体积缩小，腔上皮细胞也由梭形变成圆形。

2. 树鼩乳腺组织终端的分子标志物表达

正常人乳腺小叶中的TDLU在结构上是由两层细胞形成的中空管腔，内层线性排列的是腔上皮细胞，外层被肌上皮细胞包裹着，整个结构由基底膜将其与小叶内基质分开。由于肌上皮细胞

和腔上皮细胞各自在功能上的分工不同导致其表面分子标志呈现差异，这为细胞的类型提供了判断依据，也以此来分析乳腺肿瘤发生的程度。

（1）上皮细胞分子标志：在青春期乳腺中，肌上皮细胞与腔上皮细胞不仅可以依靠所处的相对位置，也可凭借不同的上皮细胞类型标志表达来区分。肌上皮细胞来源于上皮细胞，不过由于其胞质中含有较多具有收缩功能的细丝，使其因具有与肌细胞类似的收缩潜能而命名。肌上皮细胞表达已知的上皮角蛋白（epithelial cytokeratins, CK）5、14和17，平滑肌肌动蛋白（smooth muscle actin, SMA）[10]和CALLA（common acute lymphoblastic leukaemia antigen）[11]等。与之不同的是腔上皮细胞具有分泌乳汁的特征而表达另一组CK分子（CK8、CK18和CK19），以及低量的乳汁蛋白[12]。从图14–4中可见树鼩不同生理周期中乳腺组织SMA染色都为阳性，而其它分子标志随着周期变化而略有不同。SMA为肌动蛋白的一种，特定的分布在肌上皮细胞上，胞浆着色后形成连续的外层。p63隶属于p53家族，在各种上皮组织的发育、分化和形态发生上起重要作用。p63特定的表达在乳腺肌上皮细胞核内，但只是局部细胞表达，并没有SMA广泛表达。在处女期树鼩乳腺中p63阳性细胞分布在外层比较明显，且阳性细胞数量较其它周期要高。CK8和CK18则分布在树鼩乳腺管腔或小叶双层细胞的内层，都是胞浆着色。CK8在处女期及妊娠期树鼩乳腺中不表达，而在哺乳期和消退期中表达。CK18则在妊娠期和哺乳期不表达，而在处女期和消退期中有表达。

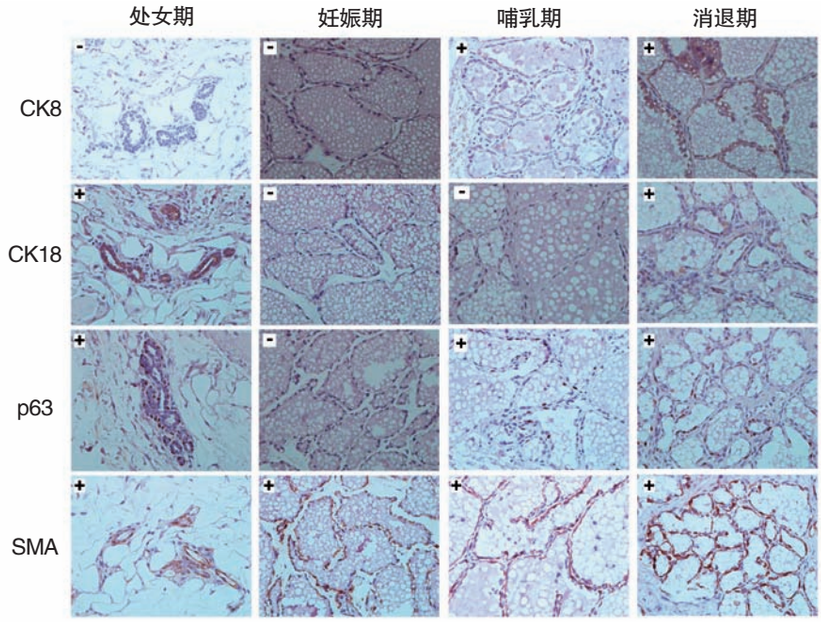



**图14–4　树鼩不同生理周期中乳腺CK8、CK18、p63和SMA的表达**

（2）激素受体：大量临床和流行病学研究已经证实类固醇激素（如雌激素和孕激素）在乳腺发育过程中发挥了重要的作用。这类激素具有亲脂特性，主要通过扩散的方式直接穿过细胞膜和核膜进入细胞核内后特异性的与其受体结合，引发下游反应。雌激素受体（estrogen receptor, ER）有两大类：ERα和ERβ。ERα只表达在15%～30%的腔上皮细胞中[13]；然而ERβ表达在大多数细胞中，包括大部分的腔上皮细胞和肌上皮细胞，以及成纤维细胞和基质细胞[14]。不过只有ERα才是雌二醇的主要介导者，ERβ抑制并平衡着ERα的功能。孕激素受体（progesterone receptor, PR）在正常乳腺中的分布与ERα比较一致，也只表达在少数的腔上皮细胞中，而不表达在肌上皮细胞和基质中。已有文献证明PR的表达是受雌二醇和ER正向调控的，并且ERα与PR共定位于同一细胞中[13]。PR在腔上皮细胞表达的比例从胚胎期的8%增加到成年期的55%[15]。不同于ERα

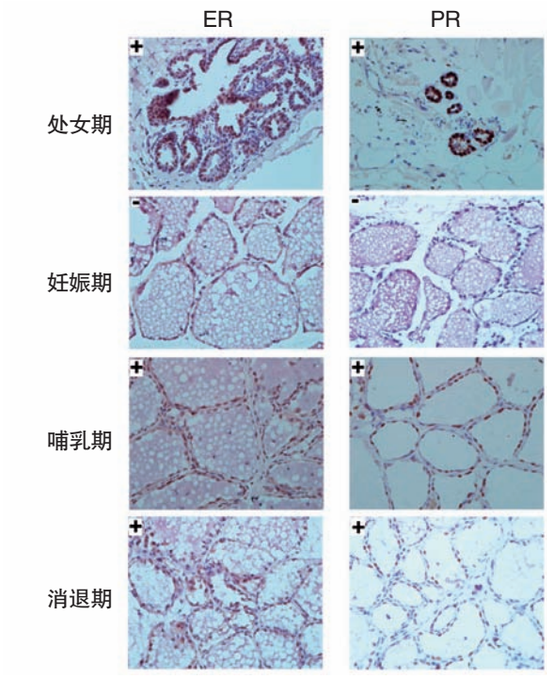



**图14–5　树鼩乳腺组织ER和PR的表达（40×）**

和ERβ，PR的两个亚型PRA和PRB是来源于同一基因的不同剪切体。PRB相对PRA多出了N端的164个氨基酸，而且是主要的基因转录活化因子，介导孕激素在乳腺发育中的功能；PRA则竞争抑制PRB的作用[16]。ERα和PR连通着性激素与其下游信号，从而调控乳腺发育进程。研究证实缺乏ERα的雌性小鼠乳腺发育停滞，仅在乳头处保留初级的导管[17]；同样PR敲除小鼠无法建立哺乳所需的小叶腺泡系统[18]。但往往ER阳性或PR阳性的细胞并不直接增殖，而是其周边的ER或PR阴性细胞受阳性细胞旁分泌生长因子作用增殖显著[13]。

在正常人乳腺细胞中，ER和PR核染色较强，但也呈现较弱的胞浆着色。在树鼩不同生理周期的乳腺组织样本中，ERα和PR的表达随起伏的激素水平而呈现差异，但两者在这4个时期都具有一致的变化趋势。在处女期，ERα和PR都分布在约50%的腔上皮细胞核内。在妊娠期，ERα和PR因激素水平的提高而逐渐降低了表达，都呈现为阴性。进入哺乳期后，ERα和PR逐渐恢复表达，最终以低水平表达维持在消退期（图14–5）。ERα和PR只分布在腔上皮细胞，而在肌上皮细胞和周边基质细胞中没有分布。

（3）细胞增殖和凋亡：在整个乳腺发育过程中，乳腺细胞不断地经历增殖或凋亡，以适应不同生理周期的功能需求。在啮齿类动物出生时乳腺并未完全发育完全，随着青春期的到来而逐步成熟。增殖的部位主要集中在TEB，并随着每一次动情周期TEB增殖分支，产生新的终末导管和腺泡芽，这些腺泡芽在妊娠后发育为成熟的腺泡[19]。从出生到妊娠早期，主要是细胞增殖为主导，但在特定时间的细胞凋亡加快了导管的形成。由于受激素调控，腔上皮细胞的增殖超过90%，远高于肌上皮细胞[20]，这也为多数乳腺肿瘤来源于腔上皮细胞提供一种解释。在哺乳期，乳腺细胞功能分化成熟，整体比较稳定，只有少数的细胞通过增殖和凋亡进行更替。断乳后乳腺进入消退期，整个过程可以分为两个阶段：第一阶段主要是通过凋亡剔除掉多余的上皮细胞，是可逆的过程；第二阶段乳腺重新调整结构分布，为下一次妊娠做准备[21]。凋亡伴随着增殖在多个发育时期都会出现，但大多聚焦在局部区域，彼此之间平衡的打破都会导致肿瘤的发生。

Ki67阳性细胞表现为核着色。与大鼠处女期乳腺增殖情况比较一致[22]，树鼩处女期的细胞增殖同样集中在TEB，而终末导管以及基质细胞都没有增殖标志物Ki67的表达（图14–6）。妊娠期没有检测到Ki67阳性增殖细胞。哺乳期和消退期都能见到极低比例（＜5%）的Ki67阳性细胞。凋亡标志Cl-caspase 3分布在胞浆中。处女期树鼩乳腺TEB无凋亡现象，但在基质细胞中有Cl-caspase 3表达。其余生理周期树鼩乳腺细胞都不表达Cl-caspase 3，无凋亡发生。消退期的树鼩乳腺没有看到凋亡，其原因可能与取材的时间有关，共取了两只哺乳后的树鼩，但断乳后的时间较长，乳腺基本已经恢复到正常。

## 二、树鼩乳腺发育过程中的激素变化

目前公认性激素［雌激素（estrogen）和孕激素（progesterone）］是刺激乳腺上皮细胞增生的重要因素[23]。从妊娠开始，树鼩体内性激素的变化促使了乳腺的形态变化。Schwaier等[24]对缅甸树鼩妊娠期血清孕酮水平做了测量，发现树鼩交配大约16小时后开始排卵，此时血清孕酮水平维持在较低的水平（不足20ng/mL）。交配后第三天随着黄体进一步发展，血清孕酮水平开始上升；在第5～15天内达到一个峰值（20ng/mL），并维持在一个稳定水平，随后在第17天稍有降低，但从第20天开始上升直至分娩，第42天达到最高值（150～225ng/mL），是最初的10倍左右。在分娩后又逐渐恢复到原来的低值。我们随机抽取了不同生理周期中缅树鼩，这包括处女期（4月龄）、妊娠期（孕后35天）、哺乳期（哺乳后20天）和消退期（断乳后12天），进行血清激素检测。我们也发现树鼩血液中雌二醇和孕酮浓度在妊娠期显著高于其它时期，而哺乳期血液中雌二醇和孕酮的浓度虽有部分降低，但也显著高于处女期和消退期（图14–7）。激素的上升促进了乳腺细胞的分裂，提高了乳房的密度，加快了乳汁的产生。激素的变化也对应着受体的改变，在妊娠期由于激素水平的高涨促使ER及PR降低表达，以减缓激素增加导致的细胞增殖。

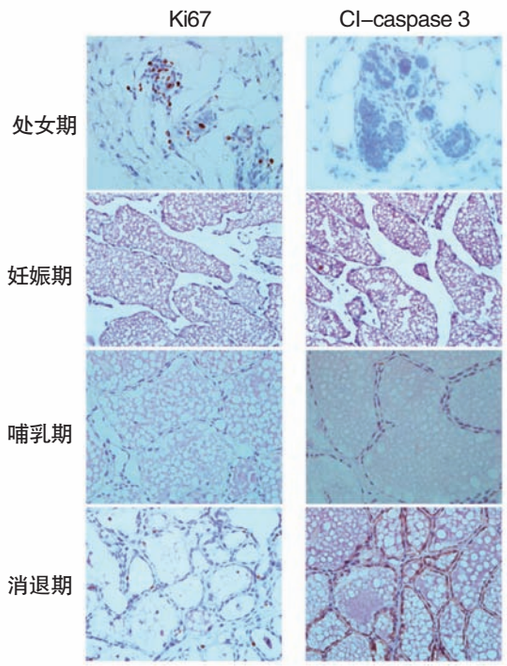



**图14–6　树鼩各生理周期乳腺组织Ki67（核）和Cl–caspase 3（浆）的表达（40×）**

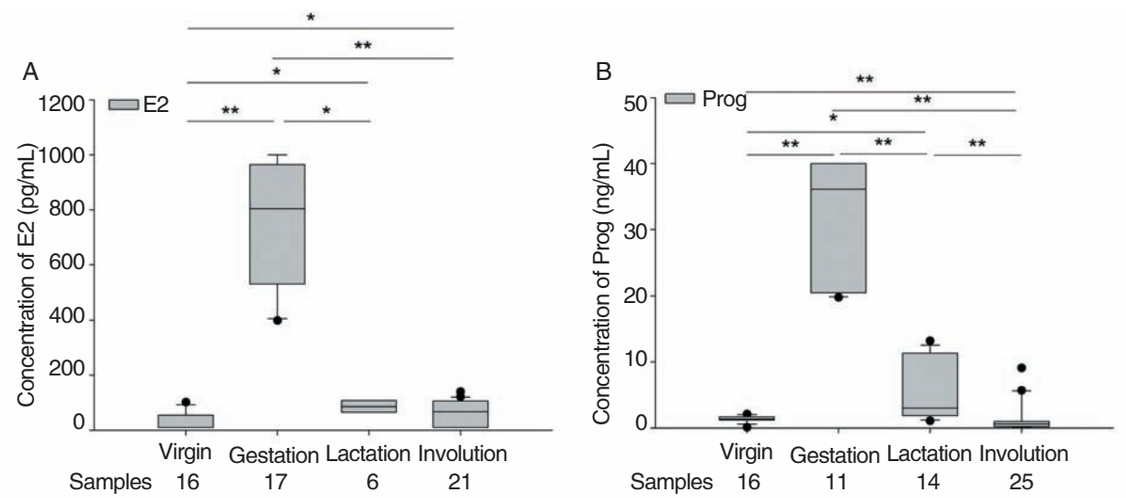



**图14–7　树鼩在不同生理周期中雌二醇（A）和孕酮（B）的浓度变化**

# 第二节 树鼩乳腺相关疾病

## 一、树鼩乳腺自发肿瘤

野生的树鼩寿命大多在1～2年，相关乳腺疾病的案例极其稀少。在饲养条件下，由于树鼩寿命的延长，一些与衰老相关的疾病陆续被发现，肿瘤就是其中之一。在树鼩进行人工饲养繁殖过程中，不断有树鼩自发性肿瘤的文献报道。1966年*Nature*首次报道了一例树鼩自发性乳腺癌[25]。乳腺肿瘤最显著的特征就是乳腺肿块，因此极易在繁育过程中观察到。在我们研究过程中陆续收集到8例树鼩自发乳腺肿瘤，并对其中一只进行了病理学研究和报道[26]。

在对收集到的树鼩自发乳腺肿瘤进行病理学检测后，以现有人乳腺癌类型标准大致可以分为三大类型：导管内乳头状瘤（intraductal papilloma）、乳头状癌（papillary carcinoma）和浸润性导管癌（invasive duct carcinoma）。各树鼩乳腺肿瘤类型总结见表14–1。

表14–1 树鼩自发乳腺肿瘤类型

| 编 号 | HE 染色 |
|---|---|
| #20110709 | 导管内乳头状瘤 |
| #20110816 | 浸润性导管癌 |
| #20110825 | 浸润性导管癌伴随肺转移 |
| #20111230 | 导管内乳头状瘤 |
| #20130105 | 乳头状癌 |
| #20130422 | 乳头状癌 |
| #20130424 | 乳头状癌 |
| #20130624 | 乳头状癌 |

### （一）树鼩自发乳腺肿瘤的分类

1. 导管内乳头状瘤

导管内乳头状瘤是指乳腺导管腔内腺上皮和肌上皮细胞不断增生，逐渐被覆纤维血管束并形成乳头同时呈现树枝状分支排列结构的良性肿瘤。导管内乳头状瘤发生的概率较低，在人的良性肿瘤中发病率不到10%[27]，表现为无痛的乳头溢血和可触摸的乳房肿块[28]。导管内乳头状瘤发生的部位广泛，涵盖乳腺乳晕部大导管直到终末导管小叶单位，可单发或多发病灶。其组织学特征在于由导管上皮细胞及间质增生形成的乳头状肿物突入到扩张导管围成的腔内，以纤维组织和血管构成乳头的轴心，外面被覆1～2层立方或柱状上皮细胞。一旦上皮细胞侵入到基质中，导管内乳头状瘤很可能会发展成为具有浸润性的乳头状癌[29]。导管内乳头状瘤依其增生、分化程度和间质的多少可分为多个亚型。镜下观察导管内乳头状瘤的组织形态会随着上皮细胞增生的程度而呈现差异，但其基本病变是导管和间质增生所形成的乳头状结构填充了乳腺导管。树鼩#20110709和#20111230肿瘤样本经HE染色鉴定为导管内乳头状瘤。显微镜下导管内可见大量乳头状结构，

乳头被覆双层上皮细胞，内层为腔上皮细胞，胞浆较丰富，顶端呈羽毛状，胞核圆形或椭圆形，位于细胞基底；外层为肌上皮细胞，其外包裹完整的基底膜。乳头中轴见纤维及血管，瘤细胞排列极性规则，细胞无异型性（图14–8）。

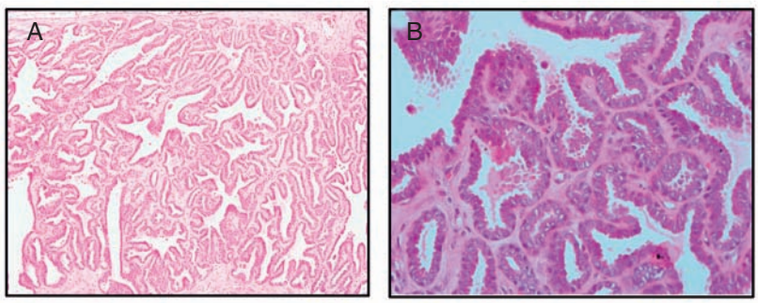



**图14–8　树鼩自发导管内乳头状瘤**
（A）10×；（B）40×。

2. 浸润性乳头状癌

乳腺乳头状癌是乳腺浸润性特殊型癌之一，在整个乳腺癌群体中新发的比例较低，约占新发乳腺肿瘤的0.5%。乳头状癌大都发生于乳腺大导管，极少数由导管内乳头状瘤癌变而来。在结构上乳头状癌与导管内乳头状瘤比较相似，由上皮细胞扩张到导管或囊内呈乳头状生长而成。不过乳头状癌在增殖的乳头状突起处往往缺乏完整的肌上皮细胞层，这是与导管内乳头状瘤相区别的判断依据[29]。乳头状癌的基本特征是纤维维管束状茎上排列着上皮细胞。当大导管扩张呈囊状则称为囊内乳头状癌；若侵及管壁、囊壁或周围组织时，称为浸润性乳头状癌[30]。树鼩#20130105、#20130422、#20130424和#20130624自发肿瘤经HE染色都鉴定为浸润性乳头状癌。显微观察可见癌细胞呈乳头状生长，细胞密集，排列紊乱。细胞核大、异型、深染，核仁明显，核分裂象易见，并见癌细胞侵及间质（图14–9）。

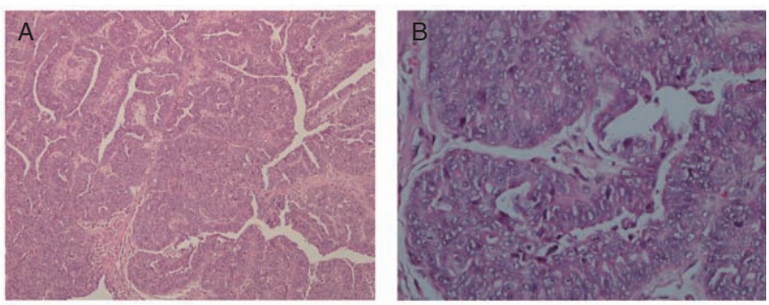



**图14–9　树鼩自发浸润性乳头状癌（#20130624）**
（A）10×；（B）40×。

3. 浸润性导管癌

浸润性导管癌是一种非特殊型的常见异型乳腺肿瘤。流行病学研究指出浸润性导管癌约占总的乳腺癌病例中的60%～80%。浸润性导管癌源发于乳腺导管，并突破导管壁并能在脂肪组织中增殖。浸润性导管癌具有潜在通过淋巴系统或血液系统转移到身体其它部位的能力，一般为肺部、肝脏、骨和大脑。浸润性导管癌呈现导管内癌的各型病变，同时向间质内浸润性生长。树鼩#20110816和#20110825乳腺肿瘤经HE鉴定为浸润性导管癌。#20110816肿瘤组织中除了浸润性导管癌还有局部的导管内乳头状瘤，因此属于肿瘤发生的早期阶段。图14–10展示了#20110825的肿瘤病理分析。#20110825乳腺肿瘤属于Ⅰ级浸润性导管癌，恶性程度较低。病变处有广泛的腺管形成并且肿瘤细胞缺乏核多形性，未见核分裂象。值得注意的是#20110825树鼩肺组织内出现多个实性团块，实性团块中央多有坏死。实性团块周围肺组织充血，炎细胞浸润，肺泡壁增厚，为肺转移性乳腺癌，而该树鼩心、肝、脾和肾没有肿瘤。肺转移性乳腺癌显微镜下可见在肺泡周围形成了实心的非腺体功能的结构，并且细胞与乳腺部位肿瘤细胞比较一致。不过肺转移的肿瘤细胞呈

现明显的核分裂象，核多形性并缺乏腺管的形成，因此可以判定为Ⅲ级恶性程度。

### （二）树鼩自发乳腺肿瘤的免疫组化

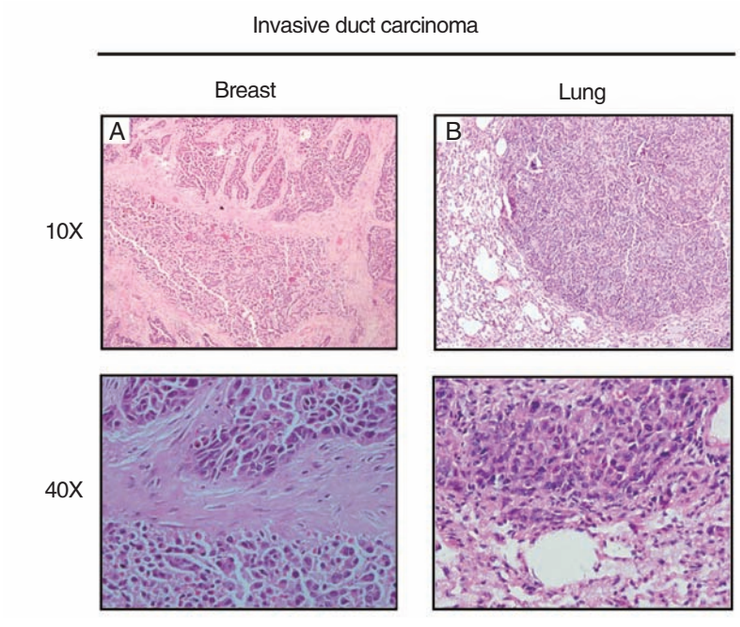



**图14–10　树鼩自发浸润性导管癌（#20110825）及肺转移**

1．树鼩自发乳腺肿瘤的分型

乳腺部位的任何细胞癌变都有导致乳腺癌发生的可能。众多的基因突变或过度表达参与了乳腺癌的发生过程。人乳腺癌按其基因表达谱可分为多个亚型：Luminal型（雌激素受体ER和/或孕激素受体PR阳性）、人表皮生长因子受体–2（human epidermal growth factor receptor 2, HER–2）阳性和basal型（通常ER、PR和HER–2均为阴性）。其中Luminal型乳腺癌又可以根据Ki67的表达高低分为低表达Ki67的Luminal A型和高表达Ki67的Luminal B型[31]。为了了解树鼩肿瘤是否存在同样的分型，我们通过IHC检测了树鼩乳腺肿瘤Cl-caspase 3/Ki-67/ER/PR/HER2的表达，其表达情况见表14–2。在这些树鼩自发肿瘤中，都未检测到HER–2的表达。Ki67除#20110816外都呈阳性，表明大多肿瘤处于增殖状态。PR除了#20110825外都是阳性，因此不管ER是否阳性，这类PR阳性肿瘤都是与内分泌相关的。ER阳性乳腺肿瘤占树鼩自发乳腺肿瘤的比例30%左右，低于人类75%的ER阳性乳腺肿瘤比例。恶性程度最高的#20110825是唯一的三阴性乳腺癌，同样在人乳腺癌中三阴性乳腺癌也是恶性程度最高的，而树鼩中三阴性乳腺癌在自发中的比例（12.5%）与人的发病比例也比较一致（15%～20%）。

**表14–2　树鼩各乳腺肿瘤的表型**

| | Cl–caspase 3 | Ki–67 | ER | PR | HER–2 |
|---|---|---|---|---|---|
| #20110709 | – | + | – | + | – |
| #20110816 | – | – | + | + | – |
| #20110825 | + | + | – | – | – |
| #20111230 | – | + | – | + | – |
| #20130105 | – | + | + | + | – |
| #20130422 | + | + | – | + | – |
| #20130424 | + | + | + | + | – |
| #20130624 | + | + | – | + | – |

2. 树鼩自发乳腺肿瘤浸润程度分析

常见乳腺癌在发展过程中经历了非典型增生、原位导管癌、浸润性导管癌和癌转移，癌的恶性程度也逐步提高。在这些肿瘤类型的变化过程中，肌上皮细胞层的完整程度与癌的进展息息相关。在原位导管癌之前，乳腺肿瘤细胞仍被包裹在肌上皮细胞层中，一旦细胞发生浸润突破，肌上皮细胞减少甚至缺失[32]。通过SMA进行肌上皮细胞层染色可以看出良性的导管内乳头状瘤（#20110709）呈现完整的肌上皮细胞层，而发生浸润的乳头状癌（#20130105）和导管癌（#20110825）则肌上皮细胞层消失或不完整（图14–11）。

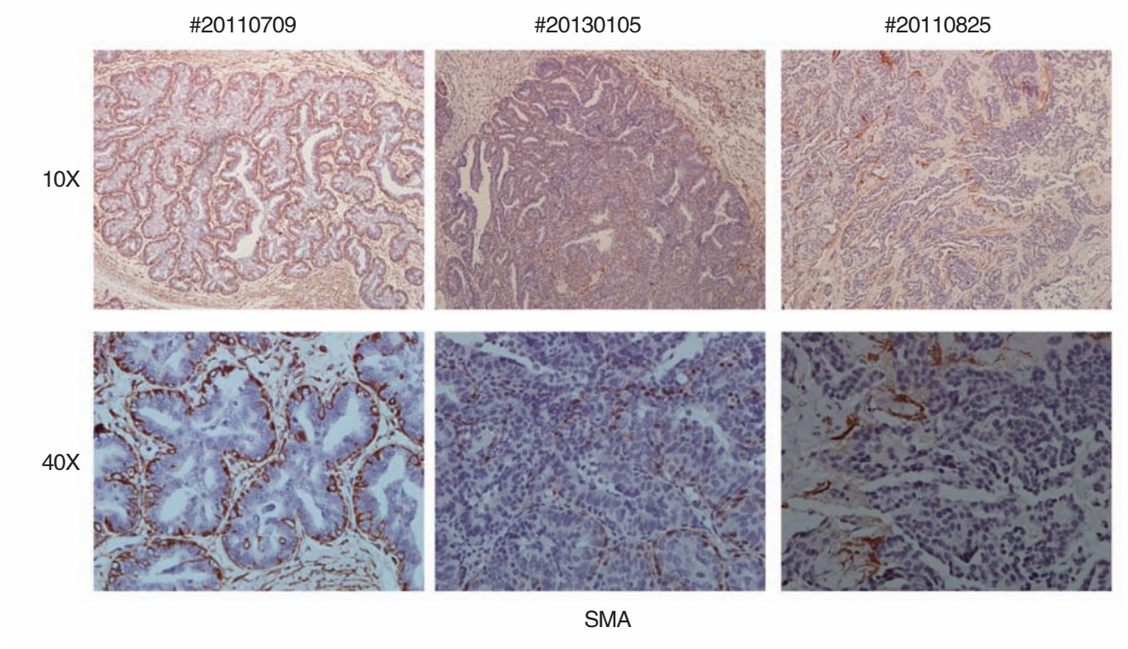



**图14–11 树鼩自发乳腺肿瘤SMA染色**

### （三）树鼩自发乳腺肿瘤发病潜在因素

流行病学研究发现造成乳腺癌的原因多种多样，包括：①年龄；②遗传因素如乳腺癌抑癌基因BRCA1/2的突变；③生殖因素如初潮年龄、月经周期和哺乳史等；④性激素水平如雌激素、孕激素和泌乳激素等水平的改变；⑤营养饮食的差异；⑥环境因素如辐射、药物等[33]。繁殖的树鼩在环境和营养饮食等方面可以控制到一致，因此自身的生理因素差异是导致自发乳腺肿瘤的主要原因。由于缺乏树鼩遗传背景方面的研究，无法从家族遗传方面去分析乳腺肿瘤自发的潜在因素。在此主要是通过已有的年龄和生殖情况来分析树鼩自发乳腺肿瘤可能的诱因。我们将自发肿瘤类型相同的归为一类，同时进行比较分析后发现它们在年龄和生殖情况方面存在某些共同之处。例如，#20110709和#20111230这两只树鼩都为导管内乳头状瘤，肿瘤发生时年龄都在1～2岁（相当于人青年期15～25岁）之间，未经历怀孕生产。树鼩#20130105、#20130422、#20130424和#20130624自发肿瘤都为浸润性乳头状癌。这一组树鼩都属于繁殖的子一代树鼩，未生产过子代，肿瘤发生时年龄都在4～5岁（相当于人中年期50～60岁）之间。树鼩#20110816和#20110825乳腺肿瘤同为浸润性导管癌，不过这组的情况不同于前面两组。这两只树鼩年龄约为2～3岁，繁殖过

子代，但在哺乳时子代死亡导致哺乳提前终止，最终产生乳腺肿瘤。从肿瘤的恶性程度看，浸润性导管癌最高而导管内乳头状瘤最低。由于自发肿瘤数量的不足，我们并不能直接将这些因素与树鼩自发乳腺癌的种类相关联，但这些诱发乳腺癌的因素与人流行病学有一定的相似性。

年龄的增加会导致基因突变的积累，因此乳腺癌大多发生在年长的妇女。生育与否以及哺乳也都是被证实与乳腺癌的发生具有相关性。早在1926年就有假说提出未哺乳妇女易患乳腺癌，这一假说随后被大量流行病学研究证实。Layde等[34]指出首次足月怀孕的年龄、产次和哺乳时间影响了乳腺癌发生的几率。与从未哺乳的经产生育的女性相比，一生中哺乳时间25个月以上的女性仅有67%的风险。在哺乳时间长短方面，与哺乳时间低于3个月的相比，哺乳时间在4～12个月的绝经前女性将减少11%患有乳腺癌的风险；而哺乳时间超过24个月的女性，其风险减少更接近25%[35]。2002年，Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer发表在*Lancet*的文章分析了之前所有的关于哺乳史与乳腺癌关系的数据，得出了这样一个结论：女性哺乳时间越长就越能够减少乳腺癌的风险[36]。当然从本质上年龄、妊娠以及哺乳等影响因素都是通过树鼩体内异常的性激素水平的改变而诱发了乳腺肿瘤的产生，而不同的树鼩自发肿瘤的外在诱因或许能给我们建立树鼩乳腺肿瘤模型提供借鉴。

### 二、树鼩乳腺寄生虫

在临床上，乳腺寄生虫病发生的概率非常低，往往引起乳腺结节和块样病变，容易被误认为乳腺肿瘤。在对野生树鼩的研究中，Ohbayashi等[37]从泰国产普通树鼩（*T. glis*）乳腺内发现了线虫新种，命名为泰国乳腺线虫。该线虫属于毛圆线虫科、Heligmosominae亚科。这是在树鼩乳腺中仅有的一次寄生虫记录。

## 第三节 树鼩乳腺相关基因克隆和分析

树鼩作为新型动物模型，其基础指标尚存在许多空缺。中国科学院/云南省动物模型与人类疾病机理重点实验室和华大基因中心联合的树鼩基因组测序项目已经完成[38]，为从基因水平了解树鼩自发乳腺肿瘤的发生发展提供了基础。我们克隆了几个与乳腺生理相关的基因。

### 一、激素受体*ESR*基因

ERα是雌二醇的主要介导者，我们选取了树鼩子宫来源的cDNA进行ERα的克隆。树鼩*ESR*基因编码区全长1788bp，编码由595个氨基酸组成的蛋白，其核酸序列及推导的氨基酸序列见图14–12。

树鼩ERα蛋白相对分子质量为66200，理论pI值为8.4。树鼩ERα同其它物种ERα一样具有保守的雌激素受体区域，两个C4型锌指结构组成的核受体DNA结合区域，核受体配体结合区域以及雌激素特有的C末端。将树鼩ERα和GeneBank中已有的7种哺乳动物ERα的氨基酸序列比较，结果见表14–3。树鼩的ERα与猪的ERα氨基酸序列一致性最近，而与大鼠及小鼠较远。

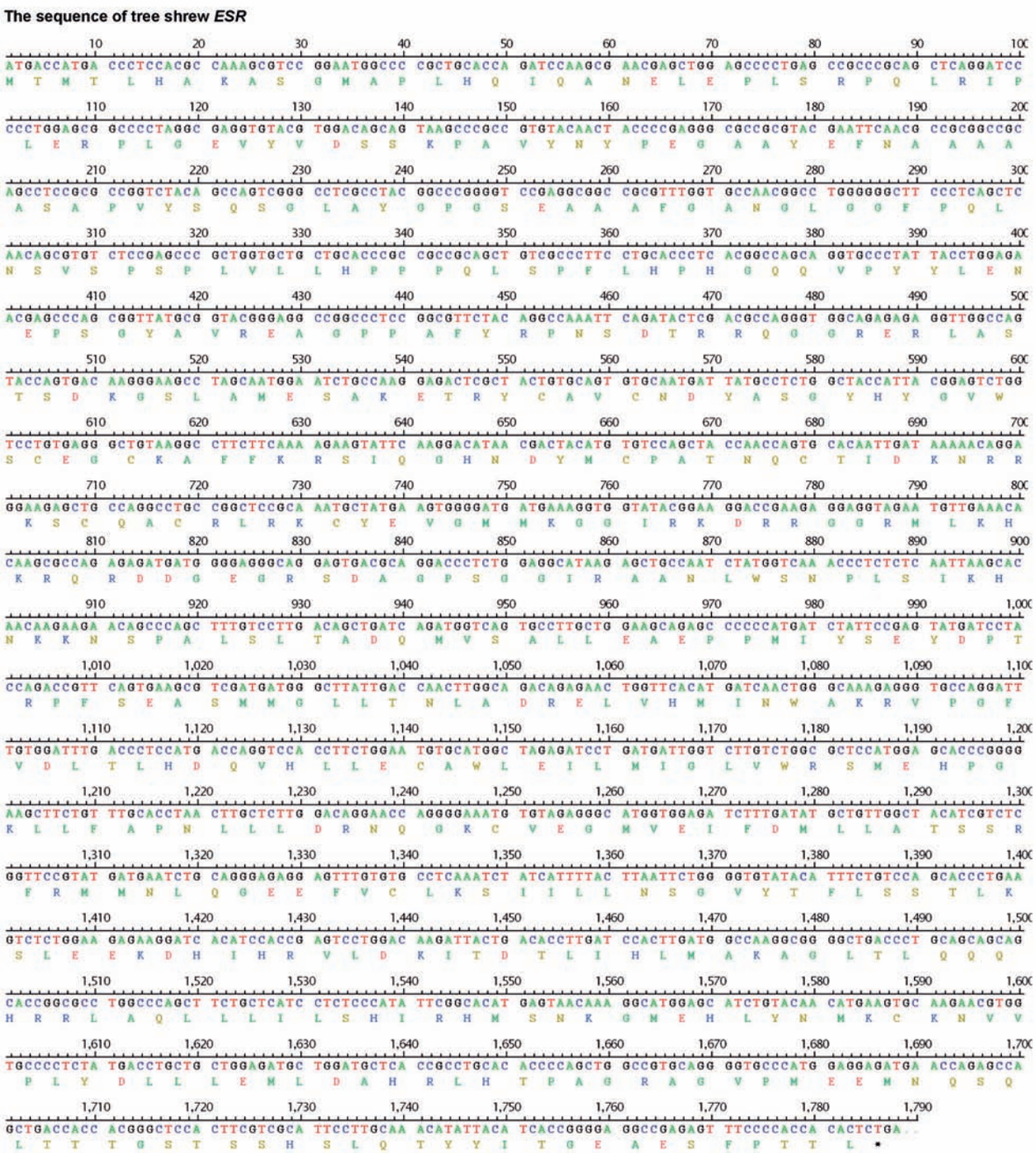



**图14–12　树鼩ESR编码区及蛋白氨基酸序列**

表14–3　树鼩ERα与其它哺乳动物ERα氨基酸一致性

| | Human | Baboon | Cattle | Pig | Rhinoceros | Mouse | Rat |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Tree shrew | 91.1% | 91.7% | 91.9% | 92.8% | 87.2% | 89.1% | 88.7% |

进一步通过Neighbor-joining方法对8种哺乳类动物的*ESR* CDS序列进行了进化分析，构建了系统进化树，如图14–13所示。图中灵长目、攀鼩目、奇蹄目、偶蹄目、啮齿目动物分别聚类，说明*ESR*在进化中存在明显的种属特异性。树鼩*ESR*与灵长类*ESR*同源关系最近，而和其它动物的*ESR*相比分支较早，遗传关系较远。

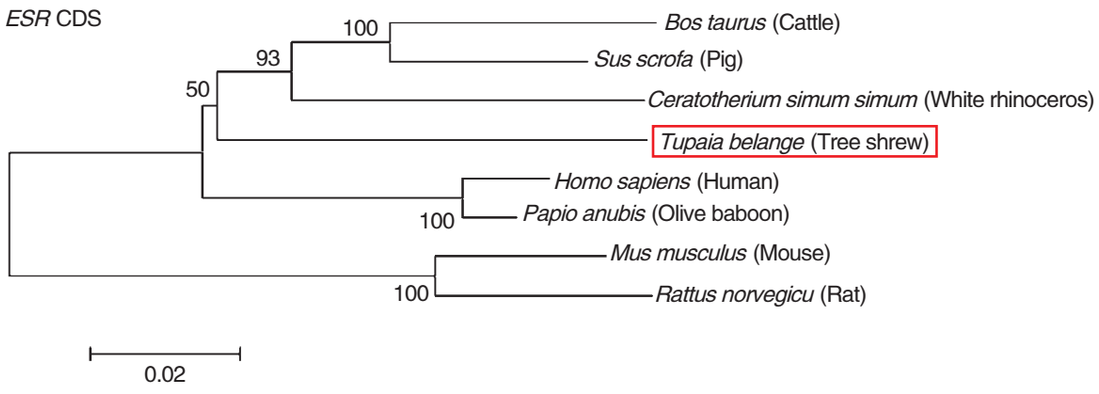



**图14–13　树鼩与其它动物的*ESR*分子的系统进化树**

线段0.02表示每个碱基位有2%的替换率。

## 二、生长因子受体

树鼩*ERBB2/HER2*基因编码区全长3768bp，编码一个由1255个氨基酸组成的蛋白，其核酸序列及推导的氨基酸序列见图14–14。

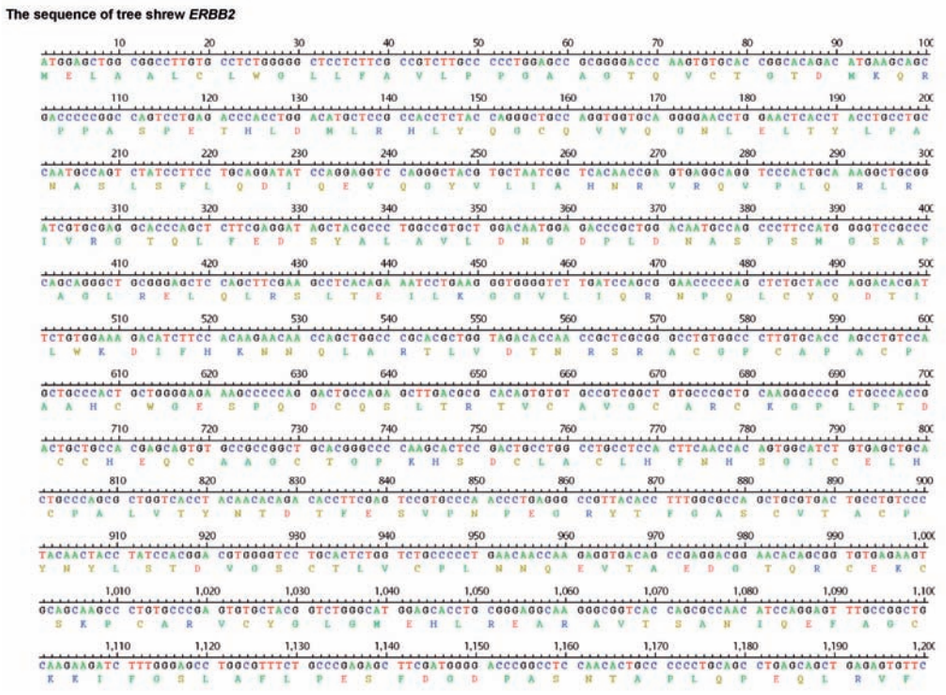



**图14–14（a）　树鼩*ERBB2*编码区及蛋白氨基酸序列**

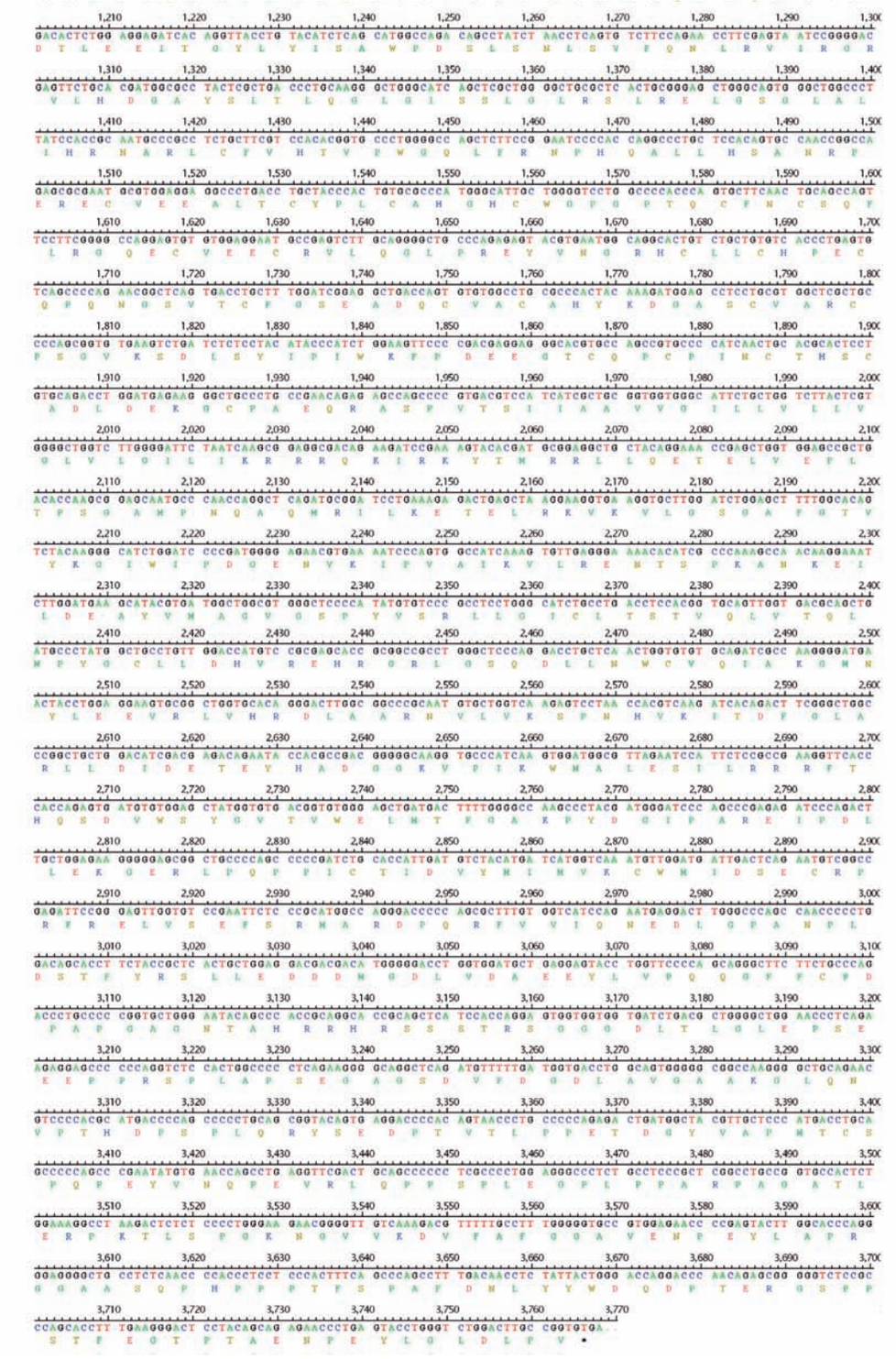


图14–14（b） 树鼩*ERBB2*编码区及蛋白氨基酸序列

树鼩*ERBB2*蛋白相对分子质量为137700，理论pI值为5.7。将树鼩*ERBB2*和GeneBank中已有的6种哺乳动物*ERBB2*的氨基酸序列比较，结果见表14–4。树鼩的*ERBB2*与各物种*ERBB2*在氨基酸序列上非常保守，都含有上皮生长因子受体跨膜区，激酶催化功能域。

表14–4　树鼩ERBB2与其它哺乳动物ERBB2氨基酸一致性

| | Human | Dog | Cat | Bear | Mouse | Rat |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Tree shrew | 91.9% | 91.9% | 92.3% | 91.7% | 87.9% | 88.1% |

进一步通过Neighbor-joining方法对7种哺乳类动物的*ERBB2* CDS序列进行了进化分析，构建了系统进化树，如图14–15所示。树鼩*ERBB2*与灵长类*ERBB2*同源关系较啮齿类要近。

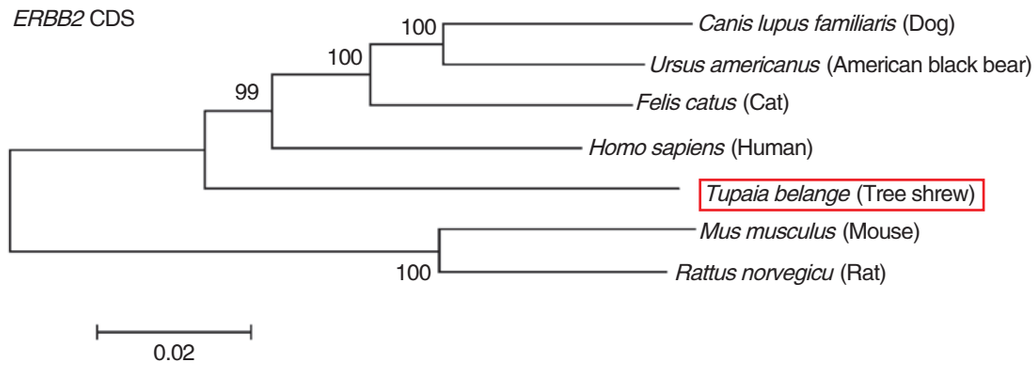



**图14–15　树鼩与其它动物的*ERBB2*分子的系统进化树**

## 三、原癌基因和抑癌基因信号途径

### （一）肿瘤抑制基因*TP53*

树鼩*TP53*基因编码区全长1152bp，编码一个由383个氨基酸组成的蛋白，其核酸序列及推导的氨基酸序列见图14–16。

树鼩p53相对分子质量为42600，理论pI值为6.4。树鼩p53同样含有p53特有的反式激活功能域和DNA结合域。将树鼩p53和GeneBank中已有的16种哺乳动物p53以及1例已经报道的树鼩p53的氨基酸序列比较，结果见表14–5。树鼩的p53氨基酸序列与灵长类的相似性比较高。

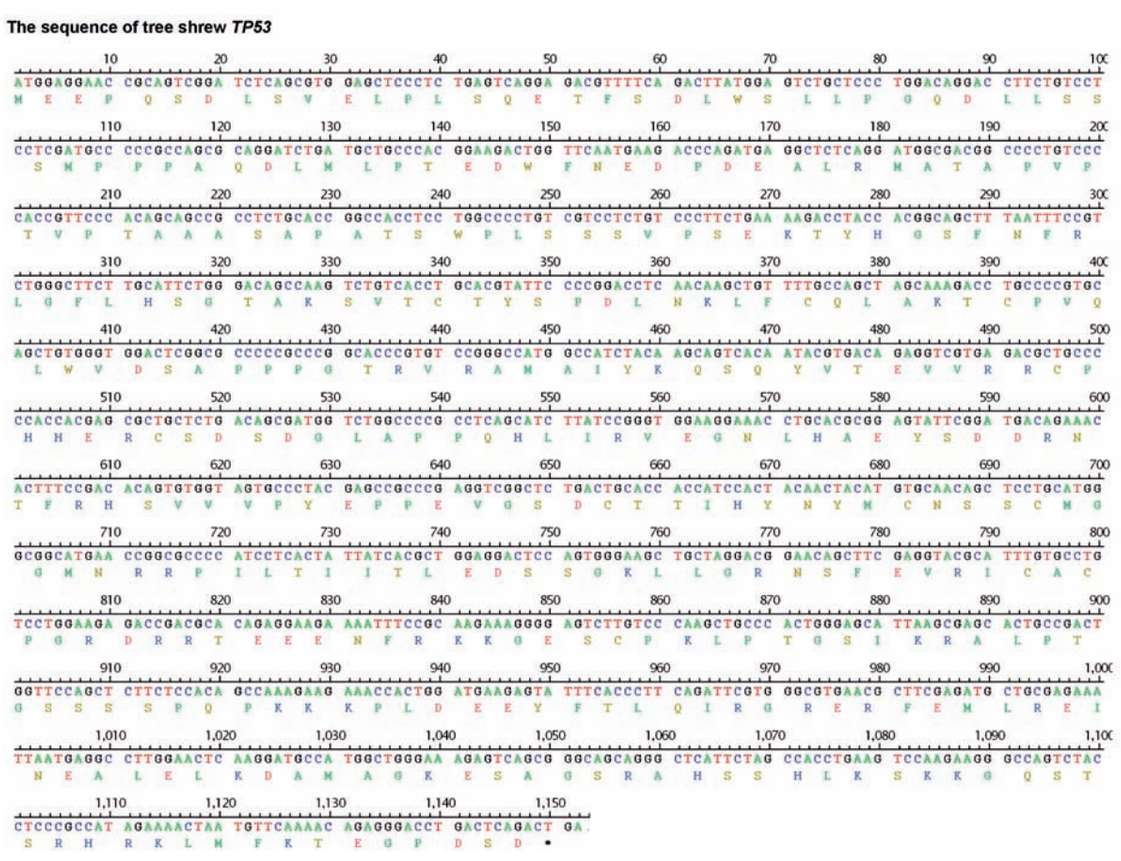



**图14–16　树鼩TP53编码区及蛋白氨基酸序列**

表14–5　树鼩p53与其它物种p53氨基酸一致性

| | Human | Crab-eating monkey | Japanese monkey | Rhesus monkey |
|---|---|---|---|---|
| Tree shrew | 81.7% | 83.1% | 83.1% | 83.1% |
| | Cattle | Water buffalo | Sheep | Beluga whale |
| Tree shrew | 75.8% | 75.2% | 76.2% | 81.9% |
| | Pig | Dog | Cat | Rabbit |
| Tree shrew | 79.5% | 77% | 75.9% | 81.4% |
| | Mongolian gerbil | Chinese hamster | Mouse | Rat |
| Tree shrew | 72.4% | 74.6% | 74.6% | 75% |

进一步通过Neighbor-joining方法对18种哺乳类动物的*TP53* CDS序列进行了进化分析，构建了系统进化树，如图14–17所示。*TP*53在进化中存在明显的种属特异性。树鼩*TP53*与灵长类*TP*53同源关系最近，而其它物种则分支较早，尤其是啮齿类与灵长类同源关系最远。

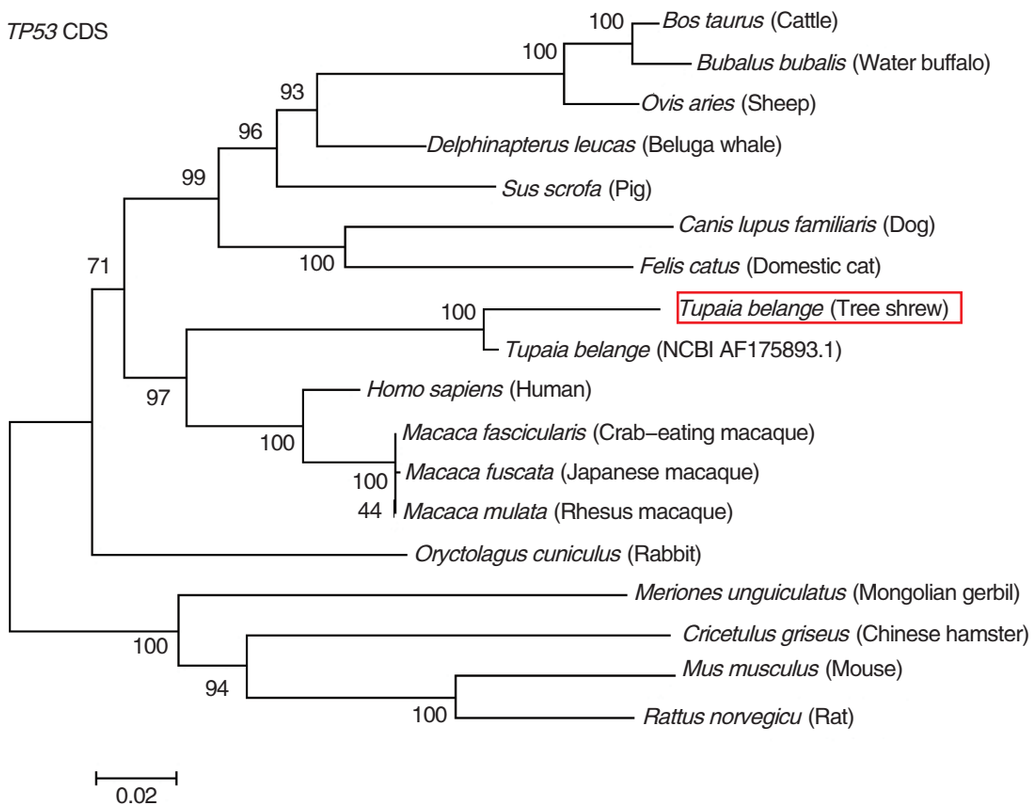



**图14–17　树鼩与其它动物的*TP53*分子的系统进化树**

## （二）肿瘤抑制基因*PTEN*

树鼩*PTEN*基因编码区全长1212bp，编码一个由403个氨基酸组成的蛋白，其核酸序列及推导的氨基酸序列见图14–18。

树鼩pTEN相对分子质量为47200，理论pI值为5.9。pTEN蛋白在各物种之间非常保守。将树鼩pTEN和GeneBank中已有的7种哺乳动物pTEN氨基酸序列进行比较，结果见表14–6。可以看到*PTEN*基因的保守性特别高，和任何一个物种的同源性超过99%。说明它是一个特别重要的进化保守的基因。

表14–6　树鼩pTEN与其它哺乳动物pTEN氨基酸一致性

| | Human | Monkey | Gibbon | Dog | Pig | Mouse | Rat |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Tree shrew | 100% | 100% | 99% | 100% | 99.7% | 99.7% | 99.5% |

进一步通过Neighbor-joining方法对8种哺乳类动物的*PTEN* CDS序列进行了进化分析，构建了系统进化树，如图14–19所示。树鼩*PTEN*与灵长类*PTEN*同源关系最近，而啮齿类*PTEN*与灵长类*PTEN*同源关系最远。

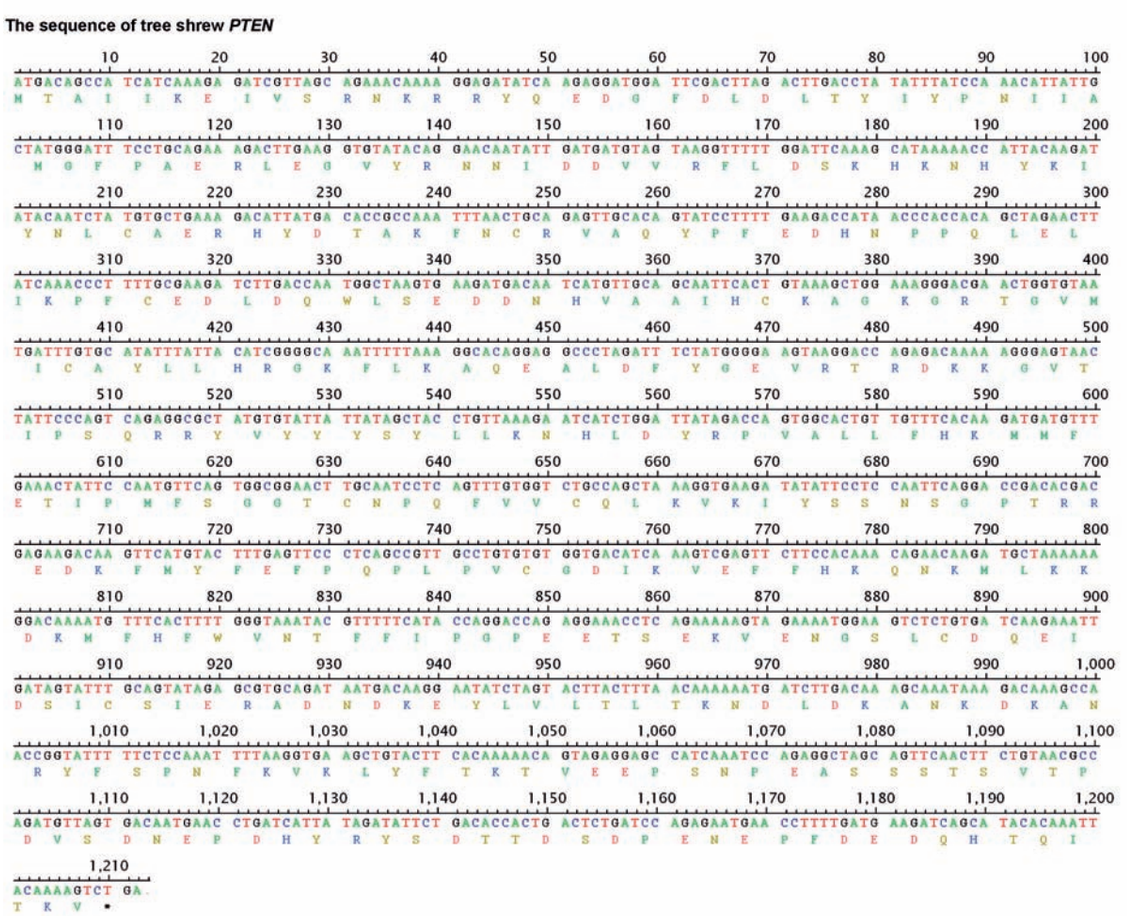



图14–18　树鼩*PTEN*编码区及蛋白氨基酸序列

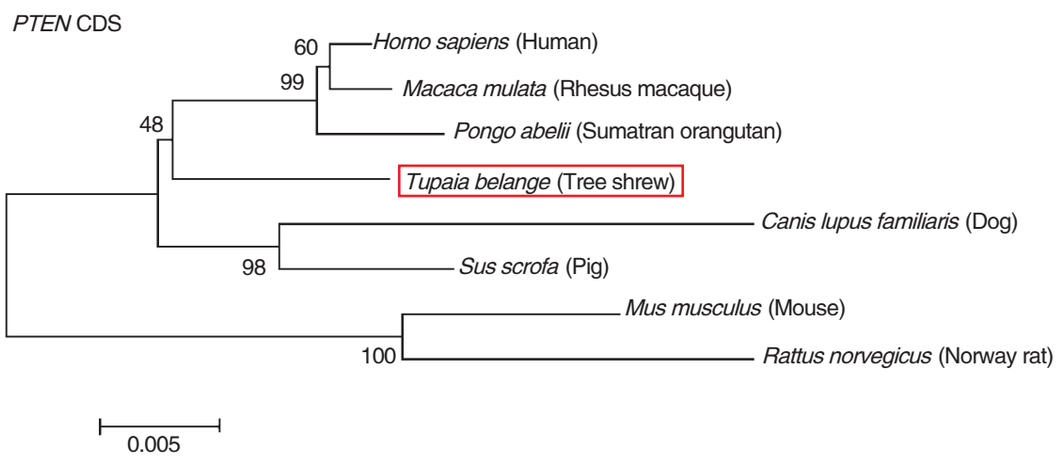



图14–19　树鼩与其它动物的*PTEN*分子的系统进化树

## 参考文献

[1]Cardiff RD, Wellings SR. The comparative pathology of human and mouse mammary glands. Journal of mammary gland biology and neoplasia, 1999, 4(1): 105-22.

[2]Luckett WP. Comparative biology and evolutionary relationship of tree shrew. New York: Plenum Press, 1980.

[3]邹如金，季维智，沙临力，等．树鼩（*Tupaia belangeri chinensis*）的繁殖．动物学研究，1987，8：231–8．

[4]Harris JR, Hellman S, Henderson IC, et al. Breast diseases. Philadelphia: Lippicott-Raven, 1996.

[5]Larson BL, Smith VR. Lactation: a comprehensive treatise. New York: Academic Press, 1978, 4: 3-40.

[6]Gjorevski N, Nelson CM. Integrated morphodynamic signaling of the mammary gland. Nat Rev Mol Cell Biol, 2011, 12(9): 581-93.

[7]Tiede B, Kang Y. From milk to malignancy: the role of mammary stem cells in development, pregnancy and breast cancer. Cell Res, 2011, 21(2): 245-57.

[8]Sternlicht MD, Kouros-Mehr H, Lu P, et al. Hormonal and local control of mammary branching morphogenesis. Differentiation, 2006, 74(7): 365-81.

[9]Richert MM, Schwertfeger KL, Ryder JW, et al. An atlas of mouse mammary gland development. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2000, 5(2): 227-41.

[10]Clarke C, Sandle J, Lakhani SR. Myoepithelial cells: pathology, cell separation and markers of myoepithelial differentiation. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2005, 10(3): 273-80.

[11]Gusterson BA, Monaghan P, Mahendran R, et al. Identification of myoepithelial cells in human and rat breasts by anti-common acute lymphoblastic leukemia antigen antibody A12. J Natl Cancer Inst, 1986, 77(2): 343-9.

[12]Taylor-Papadimitriou J, Millis R, Burchell J, et al. Patterns of reaction of monoclonal antibodies HMFG-1 and -2 with benign breast tissues and breast carcinomas. J Exp Pathol, 1986, 2(4): 247-60.

[13]Clarke RB, Howell A, Potten CS, et al. Dissociation between steroid receptor expression and cell proliferation in the human breast. Cancer Res, 1997, 57(22): 4987-91.

[14]Speirs V, Skliris GP, Burdall SE, et al. Distinct expression patterns of ER alpha and ER beta in normal human mammary gland. J Clin Pathol, 2002, 55(5): 371-4.

[15]Shyamala G, Chou YC, Louie SG, et al. Cellular expression of estrogen and progesterone receptors in mammary glands: regulation by hormones, development and aging. J Steroid Biochem Mol Biol, 2002, 80(2): 137-48.

[16]Conneely OM, Mulac-Jericevic B, DeMayo F, et al. Reproductive functions of progesterone receptors. Recent Prog Horm Res, 2002, 57: 339-55.

[17]Korach KS. Insights from the study of animals lacking functional estrogen receptor. Science, 1994, 266(5190): 1524-7.

[18]Lydon JP, DeMayo FJ, Funk CR, et al. Mice lacking progesterone receptor exhibit pleiotropic reproductive abnormalities. Genes Dev, 1995, 9(18): 2266-78.

[19]Russo J, Russo IH. DNA labeling index and structure of the rat mammary gland as determinants of its susceptibility to carcinogenesis. J Natl Cancer Inst, 1978, 61(6): 1451-9.

[20]Perusinghe NP, Monaghan P, O'Hare MJ, et al. Effects of growth factors on proliferation on basal and luminal cells in human breast epithelial explants in serum-free culture. In Vitro Cell Dev Biol, 1992, 28A(2): 90-6.

[21]Watson CJ. Involution: apoptosis and tissue remodelling that convert the mammary gland from milk factory to a quiescent organ. Breast Cancer Res, 2006, 8(2): 203.

[22]Hvid H, Thorup I, Sjögren I, et al. Mammary gland proliferation in female rats: effects of the estrous cycle, pseudo-pregnancy and age. Exp Toxicol Pathol, 2012, 64(4): 321-32.

[23]Hilakivi-Clarke L. Estrogens, BRCA1, and breast cancer. Cancer Res, 2000, 60(18): 4993-5001.

[24]Antikatzides T, Erichsen S, Spiegel A. The Laboratary animal in the study of reproduction. New York: Fischer Stuttgart, 1976: 75-82.

[25]Elliot OS, Elliot MW, Lisco H. Breast cancer in a tree shrew (*Tupaia glis*). Nature, 1966, 211(5053): 1105.

[26]Xia HJ, Wang CY, Zhang HL, et al. Characterization of spontaneous breast tumor in tree shrews (*Tupaia belangeri chinensis*). Zool Res, 2012, 33(1): 55-9.

[27]Cilotti A, Bagnolesi P, Napoli V, et al. Solitary intraductal papilloma of the breast. An echographic study of 12 cases. Radiol Med, 1991, 82(5): 617-20.

[28]Wei H, Jiayi F, Qinping Z, et al. Ultrasound-guided vacuum-assisted breast biopsy system for diagnosis and minimally invasive excision of intraductal papilloma without nipple discharge. World J Surg, 2009, 33(12): 2579-81.

[29]Pal SK, Lau SK, Kruper L, et al. Papillary carcinoma of the breast: an overview. Breast Cancer Res Treat, 2010, 122(3): 637-45.

[30]Ueng SH, Mezzetti T, Tavassoli FA. Papillary neoplasms of the breast: a review. Arch Pathol Lab Med, 2009, 133(6): 893-907.

[31]Cheang MC, Chia SK, Voduc D, et al. Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. J Natl Cancer Inst, 2009, 101(10): 736-50.

[32]Polyak K, Hu M. Do myoepithelial cells hold the key for breast tumor progression? J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2005, 10(3): 231-47.

[33]Hulka BS, Stark AT. Breast cancer: cause and prevention. Lancet. 1995, 346(8979): 883-7.

[34]Layde PM, Webster LA, Baughman AL, et al. The independent associations of parity, age at first full term pregnancy, and duration of breastfeeding with the risk of breast cancer. J Clin Epidemiol, 1989, 42(10): 963-73.

[35]Newcomb PA, Storer BE, Longnecker MP, et al. Lactation and a reduced risk of premenopausal breast cancer. N Engl J Med, 1994, 330(2): 81-7.

[36]Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Breast cancer and breastfeeding: collaborative reanalysis of individual data from 47 epidemiological studies in 30 countries, including 50302 women with breast cancer and 96 973 women without the disease. Lancet, 2002, 360(9328): 187-95.

[37]Ohbayashi M, Vajrasthira S. A new nematode, *Mammanidula siamensis* n. sp., from the mammary gland of *Tupaia glis* and Rattus surifer of Thailand. Jpn J Vet Res, 1983, 31(1): 1-5.

[38]Fan Y, Huang ZY, Cao CC, et al. Genome of the Chinese tree shrew. Nat Commun, 2013, 4: 1426.



# 第十五章 树鼩共生微生物

Tree shrews

第一篇 树鼩基础生物学
TREE SHREW BASIC BIOLOGY

何小芹 李 贵 赖 仞

## 第一节 微生物与微生物学基础理论

### 一、微生物与微生物学

微生物是一群个体微小、结构简单、必须借助光学显微镜或电子显微镜放大几百、几千甚至几万倍才能看到的微小生物。它们虽然形体微小、结构简单，但其代谢作用对于保证自然界食物链的形成，维持人类和动植物的生存及生命的延续十分重要[1]。

微生物学（microbiology）是一门在细胞、分子或群体水平上研究微生物的形态构造、生理代谢、遗传变异、生态分布和分类进化等生命活动的基本规律，并将其应用到疾病防治、医药卫生、生物工程等实践领域的科学，其根本任务是发掘、利用、改善和保护有益微生物，控制、消灭和改造有害微生物，为人类社会的进步服务的一门科学[2]。

### 二、微生物的种类与分布

#### （一）微生物的种类

微生物的种类繁多，有数十万种以上。按照微生物有无细胞基本结构、分化程度和化学组成等可分为三大类[1，2]。

1. 非细胞型微生物

是最小的一类微生物。无典型的细胞结构，无产生能量的酶系统，由单一核酸（DNA或RNA）和/或蛋白质衣壳组成，只能在活的易感细胞内生长繁殖，如病毒。还有比病毒更小的感染因子，称作亚病毒（subvirus），如仅由RNA组成的卫星病毒（satellites virus）和类病毒（viroid）以及仅由蛋白质组成的朊粒（prion）[2]。

2. 原核细胞型微生物

这类微生物的核呈环状裸DNA团块结构，无核膜、核仁。细胞器很不完善，只有核糖体。

DNA和RNA同时存在。依据16S rDNA序列分析，这类微生物可分为古细菌（archaea）和细菌（bacterium）两大类。古生菌有自身的16S rRNA序列特征，不合成细菌细胞壁中存在的肽聚糖，具有独特的代谢方式，可在极端环境下生存。如产甲烷菌（methanogen）、极端嗜盐菌（extreme halophile）和嗜热嗜酸菌（thermoacidophile）等。目前尚未发现具有肯定致病性的古生菌。细菌的种类繁多，包括细菌、支原体、衣原体、立克次体、螺旋体和放线菌等。后五类的结构和组成与细菌接近，故从分类学观点，将它列为广义的细菌范畴。

（1）细菌（bacteria）具有细胞壁、细胞膜和细胞核等基本结构。细胞质中有与遗传有关的核质和质粒，一些细菌还有特殊结构，如鞭毛、菌毛和荚膜等[2]。

（2）支原体（mycoplasmas）一种没有细胞壁的原核细胞型微生物，因无细胞壁而形状不规则。且细胞膜不是类脂双层蛋白质镶嵌结构，而是3层结构，内外层由蛋白质和糖类组成，中间层为磷脂（或糖脂）和胆固醇。

（3）衣原体（chlamydiae）一类介于细菌和病毒之间的细胞内寄生的原核细胞型微生物。它类似于革兰氏阴性菌，有独特的发育周期和形态（原体和始体）。

（4）立克次体（rickettsias）一种在细胞内寄生的原核细胞型微生物。除细胞内寄生外，与革兰氏阴性菌相似。

（5）螺旋体（spirochetes）一类细长、柔软、富有弹性、弯曲成螺旋状，利用细胞壁和细胞膜之间的轴丝活泼运动的原核细胞型微生物。

（6）放线菌（actinomyces）和细菌相似，形态特点是呈丝状，行分支生长。

3. 真核细胞型微生物

它们大多由多细胞组成，细胞核分化程度高，有核膜、核仁和染色体，通过有丝分裂进行繁殖，有内质网、核糖体和线粒体等多种完整的细胞器，细胞壁由纤维素和几丁质构成。真菌（fungi）属于这一类微生物[3]。

### （二）微生物的分布

微生物在自然界的分布极为广泛。在人类、动物和植物的体表，以及与外界相同的人类和动物的呼吸道、消化道等腔道中，生存着大量的微生物。在土壤、江河、海洋、空气中，都有数量不等、种类不一的微生物存在[2]。

## 三、微生物的特点

微生物除具有一般生物新陈代谢、生长繁殖和遗传变异等生命活动的共性外，还有其自身的特点：

（1）多以独立生活的单细胞或细胞群体形式存在，细胞无明显分化，一般都能自行完成其全部生命活动过程。

（2）新陈代谢能力旺盛，生长繁殖速度快。

（3）适应能力强，易变异。

（4）种类多、分布广、数量大[1，2]。

## 第二节 动物与微生物的关系

在动物（包括人）体表皮肤、消化道、上呼吸道、泌尿生殖道等与外界相通腔道黏膜上，栖居着种类繁多、数以亿万计的细菌、真菌等微生物[4]。根据这些微生物与宿主的相互关系，可分为有益微生物、条件致病微生物、病原微生物三大类[5]。

### 一、有益微生物

对动物机体具有生理作用，是机体自然、正常生命活动必不可少的组成部分。如人结肠中的厌氧菌、阴道中的乳杆菌、口腔和口咽部的甲型链球菌等，特别是肠道中的双歧杆菌，不产毒素，无侵袭性，是目前发现的唯一的对人体具有生理作用而无致病作用的细菌[6，7]。

### 二、条件致病微生物

对健康宿主不致病，可具有生理作用。但能使免疫力低下或者生理功能异常的机体致病，或者在特定条件下产生毒性产物获得侵袭性而具有致病性，主要引起内源性感染。栖居于人体黏膜和皮肤的兼性厌氧菌、厌氧菌、真菌即属于此类，如肠杆菌科细菌、肠球菌、葡萄球菌、类杆菌、梭菌、曲霉菌、隐球菌等。广泛存在于外环境中的假单胞菌属、不动杆菌属等细菌也常会引起人的感染，属于条件致病微生物[7]。

### 三、病原微生物

是感染性疾病的病原，产生毒素和/或具有侵袭性，能使健康宿主受感染，通过释放毒性产物或诱发超敏反应引起机体较强烈的结构和功能变化[5，8]。动物常见的病原微生物包括病毒如呼吸道病毒、肠道病毒、肝炎病毒等，革兰氏阳性细菌如白喉棒状杆菌、破伤风梭菌、肉毒梭菌、炭疽芽孢杆菌、A群链球菌、肺炎链球菌等，革兰氏阴性菌如霍乱弧菌、伤寒沙门菌、痢疾志贺菌、淋病奈瑟菌、脑膜炎奈瑟菌、结核分枝杆菌，苍白密螺旋体以及真菌中巴西芽生菌、组织荚膜胞浆菌、球孢子菌、孢子丝菌等[6，9]。

## 第三节 树鼩共生微生物情况分析

树鼩（*Tupaia belangeri*）是一种生长于热带和亚热带地区的低等灵长类动物。由于其体形小，孕期短，解剖学和生理学特性较其它实验动物更接近于人，因而一直受到很多研究人员的关注。随着生物医学、药学等学科的发展，树鼩作为新型实验动物广泛应用于生物医学、药学及生命科学的诸多研究领域，尤其是人类重大疾病的动物模型，被称为“实验动物的新星”。因此，对树鼩共生微生物的研究具有重要的意义，能够为人畜共患疫病提供有效的科学参考[10]。

目前对野生树鼩共生微生物区系的研究较为全面，涉及了体表、口腔、呼吸道、肠道和肛门等各部位。

## 一、体表共生微生物

李贵等[11]对来自云南昆明的野生树鼩体表细菌进行培养和鉴定（表15–1），共检出细菌6种，属于4个属。分别是芽孢杆菌属的枯草芽孢杆菌（*Bacillus subtilis*），假单胞菌属的铜绿假单胞菌（*Pseudomonas aeruginosa*），葡萄球菌属的金黄色葡萄球菌（*Staphylococcus aureus*）、表皮葡萄球菌（*Staphylococcus epidermidis*）和藤黄微球菌（*Micrococcus luteus*），以及库特菌属的吉氏库特菌（*Kurthia gibsonii*）。携带率最高的是表皮葡萄球菌（*S. epidermidis*），为75.0%，其次为枯草芽孢杆菌（*B. subtilis*）、金黄色葡萄球菌（*S. aureus*）、藤黄微球菌（*M. luteus*），携带率最低的为吉氏库特菌（*K. gibsonii*），为16.7%。

邢进等[12]还对树鼩体表的真菌进行了培养和鉴定（表15–2），共检出11种，属于10个属。分别是链格孢属的烟草赤星病菌（*Alternaria alternate*），曲霉菌属的杂色曲霉菌（*Aspergillus versicolor*），毛壳属的*Chaetomium* sp.，*Cystofilobasidium*属的*Cystofilobasidium feraegula*，镰孢菌属的*Fusarium* sp.，小孢子菌属的*Microsporum* sp. KL-2011，毛霉菌属的卷枝毛霉菌（*Mucor circinelloides*）和多枝总状毛霉菌（*Mucor racemosus*），青霉菌属的普通青霉菌（*Penicillium commune*），根霉属的葡枝根霉菌（*Rhizopus stolonifer*），帚霉属的短帚霉菌（*Scopulariopsis brevicaulis*）。

表15–1　树鼩体表共生微生物（细菌）

| 菌　株 | 检出比（*n*=12） | 携带率（%） |
|---|---|---|
| *S. epidermidis* | 9 | 75.0 |
| *B. subtilis* | 5 | 41.7 |
| *S. aureus* | 4 | 33.3 |
| *P. aeruginosa* | 3 | 25.0 |
| *M. luteus* | 3 | 25.0 |
| *K. gibsonii* | 2 | 16.7 |

表15–2　树鼩体表共生微生物（真菌）

| 菌　株 | 检出比（*n*=61） | 携带率（%） |
|---|---|---|
| *A. alternate* | 2 | 3.3 |
| *A. versicolor* | 6 | 9.8 |
| *Chaetomium* sp. | 1 | 1.6 |
| *C. feraegula* | 1 | 1.6 |
| *Fusarium* sp. | 1 | 1.6 |
| *Microsporum* sp. KL–2011 | 1 | 1.6 |
| *M. circinelloides* | 4 | 6.6 |
| *M. racemosus* | 19 | 31.1 |
| *P. commune* | 31 | 50.8 |
| *R. stolonifer* | 5 | 8.2 |
| *S. brevicaulis* | 1 | 1.6 |

## 二、口腔共生微生物

李贵等[11]对树鼩口腔微生物进行了培养和鉴定（表15–3），共检出细菌3种，分别是生淀粉糖化酶产生菌（*Cellulosimicrobium*），奈瑟菌属的黏液奈瑟菌（*Neisseria mucosa*），链球菌属的肺炎链球菌（*Streptococcus pneumonia*）。黏液奈瑟菌（*N. mucosa*）和生淀粉糖化酶产生菌（*Cellulosimicrobium*）的携带率较高，分别为58%和33%，携带率最低的为肺炎链球菌（*S. pneumonia*），为17%。

表15–3　树鼩口腔共生微生物

| 菌　株 | 检出比（*n*=12） | 携带率（%） |
|---|---|---|
| *N. mucosa* | 7 | 58.3 |
| *Cellulosimicrobium* | 4 | 33.3 |
| *S. pneumonia* | 2 | 16.7 |

## 三、呼吸道共生微生物

邢进等[12]对树鼩呼吸道微生物进行了培养和鉴定（表15–4），共培养出细菌36种，属于20个属。分别是弯曲菌属的空肠弯曲菌（*Campylobacter jejuni*），产碱杆菌属的粪产碱杆菌（*Alcaligenes faecalis*），艾肯氏菌属的啮蚀艾肯氏菌（*Eikenella corrodens*），金氏菌属的反硝化金氏菌（*Kingella denitrificans*），假单胞菌属的类产碱假单胞杆菌（*Pseudomonas pseudoalcaligenes*），肠杆菌属的大肠杆菌（*Escherichia coli*），沙门氏菌属的甲型副伤寒沙门氏菌（*Salmonella paratyphi*），放线杆菌属的小鼠放线杆菌（*Actinobacillus muris*），嗜血杆菌属的溶血性嗜血杆菌（*Haemophilus haemolyticus*），巴斯德菌属的嗜肺巴斯德杆菌（*Pasteurella pneumotropica*）和产气巴斯德杆菌（*Pasteurella aerogenes*），肠球菌属的钻黄肠球菌（*Enterococcus casseliflavus*），片球菌属的戊糖片球菌（*Pediococcus pentosaceus*），孪生球菌属的麻疹孪生球菌（*Gemella morbillorum*），葡萄球菌属的金黄色葡萄球菌（*Staphylococcus aureus*）、头状葡萄球菌（*Staphylococcus capitis*）、科氏葡萄球菌（*Staphylococcus cohnii*）、马胃葡萄球菌（*Staphylococcus equorum*）、鸡葡萄球菌（*Staphylococcus gallinarum*）、缓慢葡萄球菌（*Staphylococcus lentus*）、腐生葡萄球菌（*Staphylococcus saprophyticus*）、松鼠葡萄球菌（*Staphylococcus sciuri*）、溶血性葡萄球菌（*Staphylococcus simulans*）和木糖葡萄球菌（*Staphylococcus xylosus*），链球菌属的血链球菌（*Streptococcus sanguinis*）、少酸链球菌（*Streptococcus acidominimus*）、缓症链球菌（*Streptococcus mitis*）、变形链球菌（*Streptococcus mutans*）、肺炎链球菌（*Streptococcus pneumoniae*）和前庭链球菌（*Streptococcus vestibularis*），气球菌属的绿色气球菌（*Aeroeoccus viridians*），格鲁比卡菌属的血格鲁比卡菌（*Globicatella sanguinis*），棒状杆菌属的马氏棒状杆菌（*Corynebacterium matruchotii*）和溃疡棒状杆菌（*Corynebacterium ulcerans*），微球菌属的里拉微球菌（*Micrococcus lylae*），球形芽孢杆菌属的球形溶藻菌（*Lysinibacillus sphaericus*），其中携带率较高的菌有大肠杆菌（*E. coli*）和金黄色葡萄球菌（*S. aureus*），携带率分别达到100%和83.6%。另外还检测到支原体（Mycoplasma），携带率高达93.4%。

表15–4　树鼩呼吸道共生微生物

| 菌　株 | 检出比（*n*=61） | 携带率（%） |
|---|---|---|
| *C. jejuni* | 5 | 8.2 |
| *A. faecalis* | 8 | 13.1 |
| *E. corrodens* | 6 | 9.8 |
| *K. denitrificans* | 5 | 8.2 |
| *P. pseudoalcaligenes* | 29 | 47.5 |
| *E. coli* | 61 | 100 |
| *S. paratyphi* | 2 | 3.3 |
| *A. muris* | 15 | 24.6 |
| *H. haemolyticus* | 4 | 6.6 |
| *P. pneumotropica* | 2 | 3.3 |
| *P. aerogenes* | 28 | 45.9 |
| *E. casseliflavus* | 17 | 27.9 |
| *P. pentosaceus* | 9 | 14.8 |
| *G. morbillorum* | 14 | 23.0 |
| *S. aureus* | 51 | 83.6 |
| *S. capitis* | 11 | 18.0 |
| *S. cohnii* | 27 | 44.3 |
| *S. equorum* | 16 | 26.2 |
| *S. gallinarum* | 56 | 91.8 |
| *S. lentus* | 20 | 32.8 |
| *S. saprophyticus* | 46 | 75.4 |
| *S. sciuri* | 24 | 39.3 |
| *S. simulans* | 25 | 41.0 |
| *S. xylosus* | 24 | 39.3 |
| *S. sanguinis* | 12 | 19.7 |
| *S. acidominimus* | 32 | 52.5 |
| *S. mitis* | 43 | 70.5 |
| *S. mutans* | 15 | 24.6 |
| *S. pneumonia* | 42 | 52.5 |
| *S. vestibularis* | 2 | 3.3 |
| *A. viridians* | 18 | 29.5 |
| *G. sanguinis* | 8 | 13.1 |
| *C. matruchotii* | 20 | 32.8 |
| *C. ulcerans* | 2 | 3.3 |
| *M. lylae* | 22 | 36.1 |
| *L. sphaericus* | 1 | 1.6 |
| Mycoplasma | 57 | 93.4 |

## 四、肠道共生微生物

邢进等[12]对树鼩呼吸道微生物进行了培养和鉴定（表15–5），共检出28种细菌，属于14个属。分别是假单胞菌属的恶臭假单胞杆菌（*Pseudomonas putida*），柠檬酸杆菌属的杨氏柠檬酸杆菌（*Citrobacter youngae*）和弗劳地柠檬酸杆菌（*Citrobacter freundii*），肠杆菌属的生癌肠杆菌（*Enterobacter cancerogenus*），埃希氏菌属的大肠杆菌（*Escherichia coli*）和弗氏埃希杆菌（*Escherichia fergusonii*），克雷伯氏菌属的催产克雷伯杆菌（*Klebsiella oxytaza*），克吕沃尔氏菌属的中间克吕沃尔氏菌（*Kluyvera intermedia*）和栖冷克吕沃尔氏菌（*Kluyvera cryocrescens*），摩根氏菌属的摩氏摩根菌（*Morganella morganii*），变形杆菌属的普通变形杆菌（*Proteus vutgaris*），沙门氏菌属的甲型副伤寒沙门氏菌（*Salmonella paratyphi*），志贺菌属的鲍氏志贺

菌（*Shigella boydii*），葡萄球菌属的金黄色葡萄球菌（*Staphylococcus aureus*）、头状葡萄球菌（*Staphylococcus capitis*）、科氏葡萄球菌（*Staphylococcus cohnii*）、鸡葡萄球菌（*Staphylococcus gallinarum*）、缓慢葡萄球菌（*Staphylococcus lentus*）、路邓葡萄球菌（*Staphylococcus lugdunensis*）、腐生葡萄球菌（*Staphylococcus saprophyticus*）、松鼠葡萄球菌（*Staphylococcus sciuri*）、溶血性葡萄球菌（*Staphylococcus simulans*）和木糖葡萄球菌（*Staphylococcus xylosus*），链球菌属的血链球菌（*Streptococcus sanguinis*）、马肠链球菌（*Streptococcus equines*）和乳房链球菌（*Streptococcus uberis*），棒状杆菌属的马氏棒状杆菌（*Corynebacterium matruchotii*），迪茨氏菌属的迪茨氏菌（*Dietzia timorensis*）[13]。其中携带率较高的为大肠杆菌（*E. coli*）和鸡葡萄球菌（*S. gallinarum*），分别达到100%和91.8%。

表15–5　树鼩肠道共生微生物

| 菌　株 | 检出比（*n*=61） | 携带率（%） |
|---|---|---|
| *P. putida* | 6 | 9.8 |
| *C. youngae* | 3 | 4.9 |
| *C. freundii* | 2 | 3.3 |
| *E. cancerogenus* | 34 | 55.7 |
| *E. coli* | 29 | 100 |
| *E. fergusonii* | 3 | 4.9 |
| *K. oxytaza* | 8 | 13.1 |
| *K. intermedia* | 5 | 8.2 |
| *K. cryocrescens* | 3 | 4.9 |
| *M. morganii* | 10 | 16.4 |
| *P. vutgaris* | 6 | 9.8 |
| *S. paratyphi* | 2 | 3.3 |
| *S. boydii* | 4 | 6.6 |
| *S. aureus* | 51 | 83.6 |
| *S. capitis* | 11 | 18.0 |
| *S.cohnii* | 27 | 44.3 |
| *S. gallinarum* | 56 | 91.8 |
| *S. lentus* | 20 | 32.8 |
| *S. lugdunensis* | 1 | 1.6 |
| *S. saprophyticus* | 46 | 75.4 |
| *S. sciuri* | 24 | 39.3 |
| *S. simulans* | 25 | 41.0 |
| *S. xylosus* | 24 | 39.3 |
| *S. sanguinis* | 12 | 19.7 |
| *S. equines* | 51 | 83.6 |
| *S. uberis* | 7 | 11.5 |
| *C. matruchotii* | 20 | 32.8 |

## 五、肛门共生微生物

李贵等[11]对树鼩肛门微生物进行了培养和鉴定（表15–6），共检出细菌4种，属于4个属。分别是肠球菌属的粪肠球菌（*Enterococcus faecalis*），乳球菌属的乳酸乳球菌（*Lactococus lactis*），埃希氏菌属的大肠杆菌（*Escherichia coli*），沙门氏菌属伤寒沙门氏菌（*Salmonella typhi*）[14]。携带率最高的是大肠杆菌（*E. coli*），达到91.7%；携带率最低的为粪肠球菌（*E. faecalis*）和伤寒沙门氏菌（*S. typhi*），均为16.7%。

表15–6　树鼩肛门共生微生物

| 菌　株 | 检出比（*n*=12） | 携带率（%） |
|---|---|---|
| *E. coli* | 11 | 91.7 |
| *L. lactis* | 4 | 33.3 |
| *E. faecalis* | 2 | 16.7 |
| *S. typhi* | 2 | 16.7 |

另外，李贵等[11]报道了人工驯养繁殖仔三代树鼩体表、口腔、肛门中培养鉴定出5种细菌（表15–7），比野生树鼩少8种[16，17]。

表15–7　人工驯养树鼩的共生微生物

| 菌　株 | 检出比（*n*=12） | 携带率（%） |
|---|---|---|
| 体表 | | |
| *S. epidermidis* | 9 | 75.0 |
| 口腔 | | |
| *Cellulosimicrobium* | 5 | 41.7 |
| *N. mucosa* | 8 | 66.7 |
| 肛门 | | |
| *L. lactis* | 4 | 33.3 |
| *E. coli* | 12 | 100 |

## 第四节　树鼩共生微生物对树鼩资源的开发利用与标准化研究的意义

随着生物医学、药学及生命科学的诸多研究领域发展，尤其是作为人类疾病的动物模型，越来越多的人工驯养树鼩作为实验动物广泛应用于人类医学实验研究的多个领域，如各种类型的病毒性肝炎、流感病毒、登革热病毒、轮状病毒、疱疹病毒、细菌、寄生虫感染及糖尿病、胆结石、肿瘤等人类疾病的动物模型研究，树鼩将来会成为与灵长类动物一样的实验动物，这意味着制定出完善的人工驯养环境中树鼩携带微生物的国家标准迫在眉睫[15]。然而关于人工驯养环境对树鼩共生微生物的影响方面的研究报道很少，没有系统的研究，只有李贵等[11]报道了人工驯养繁殖仔三代树鼩体表、口腔、肛门中培养鉴定出5种细菌（表15–7），比野生树鼩少8种[16，17]。

### 一、人工驯养繁殖对树鼩共生微生物的影响

人工驯养繁殖仔三代树鼩长期生活在人工定制的环境，由于饲料、饮水、饲养笼具、垫料、饲养工具、室内外及周围长期使用各种灭菌消毒剂或灭菌等原因，使得仔三代树鼩生活的环境存在的微生物较少[18]。它们都是生活在相同不变环境之下，温度控制在20～25℃之间，相对湿度为50%～80%，人工光照12小时/天。室内安静，通风较好，空气新鲜。饲料主要是谷类、水果、面包虫、熟鸡蛋等。其中，谷类食物由玉米面、麦面、鱼粉、奶粉、骨粉、白糖、食盐、酵母粉、豆粕、维生素预混料组成，水果主要为苹果和香蕉，这使得树鼩生活环境中微生物的种类少了许多[19]。树鼩携带微生物与微生物存在环境有着密切关系，树鼩生存环境中存在的微生物，也是树

鼩体表、口腔、肛门等部位微生物的重要来源[19]。因此，人工驯养繁殖树鼩的共生微生物种类比野生树鼩少许多，表明环境的净化可以大大促进树鼩共生微生物的净化[20]。

## 二、树鼩的共生微生物研究推进其实验动物化进程

文献报道中的研究共生微生物的树鼩均是健康树鼩，表明这些菌群是树鼩主要的共生微生物菌群。其中大肠埃希氏菌（*E. coli*）的检出率最高，野生树鼩和人工驯养繁殖树鼩的携带率均接近100%，可以表明该细菌是树鼩主要正常寄生菌群，是树鼩的第一大优势菌群，这与其它实验动物情况类似[21，22]。

树鼩（*Tupaia belangeri*）是一种低等灵长类动物，目前还未成为国家规定的实验动物，只是实验用动物，所以没有相应的国家标准[23]。猕猴作为实验动物，国家标准规定猕猴不携带沙门氏菌（*Salmonella* spp.）、皮肤病原真菌（*Pathogenic dermal fungi*）、空肠弯曲杆菌（*Campylobaceter jejuni*）[22，24]。在这些微生物当中，目前检测到树鼩携带的只有沙门氏菌、肠弯曲菌和志贺氏菌。未有文献报道树鼩携带布鲁杆菌（*Brucella* spp.）、钩端螺旋体（*Leptospira* spp.）、结核分枝杆菌（*Mycobacterium tuberculosis*）或小肠结肠炎耶尔森菌（*Yersinia enterocolitica*）等微生物[21]。这推进了树鼩作为实验动物的进程。

## 三、树鼩的人工驯养繁殖和实验树鼩标准化的推进

随着树鼩在人类疾病模型方面的应用潜力被逐步认识，围绕树鼩作为实验动物模型的开发应用，全国各地一些科研院所相继开展了树鼩驯养繁殖和应用的研究。云南是全国开展树鼩人工驯养繁殖研究最早的省份。20世纪70年代末，昆明地区就开始人工驯养繁殖树鼩。中国科学院昆明动物研究所是我国开展树鼩人工驯养繁殖最早的单位，该所围绕树鼩人工驯养繁殖和疾病防治开展了一系列相关研究，包括分类学和生态学、寄生虫学、病理学、解剖学、神经生物学、遗传学、生物化学和免疫学，为国内开展树鼩相关研究提供了宝贵的基本生物学资料。关于树鼩微生物的研究较早的是中国医学科学院医学生物学研究所开展的树鼩实验感染疱疹病毒、轮状病毒等方面的研究并获得成功[25~27]。

实验树鼩标准化研究滞后，是长期以来实验树鼩应用研究发展缓慢的主要原因之一。在兄弟单位同行们的大力支持下，在云南省专项经费的资助下，昆明医学院经过多年的努力工作，终于在2010年10月完成了《实验树鼩云南省地方标准》的研究和编制工作。云南省地方标准《实验树鼩（DB53/T 328.1–328.5–2010）》已于2010年11月16日正式发布，2011年3月1日正式实施，其内容共分为5个部分[27]：

（1）实验树鼩（第1部分）：微生物学等级及检测（DB53/T 328.1）；
（2）实验树鼩（第2部分）：寄生虫学等级及检测（DB53/T 328.2）；
（3）实验树鼩（第3部分）：遗传学质量控制（DB53/T 328.3）；
（4）实验树鼩（第4部分）：配合饲料（DB53/T 328.4）；
（5）实验树鼩（第5部分）：环境及设施（DB53/T 328.5）。

本标准的颁布填补了我国实验树鼩无质量标准的空白，为树鼩人工繁殖和实验研究提供了全面的质量保障，结束了长期仅能使用野生树鼩的历史，标志着树鼩实验动物化研究取得了突破性进展，为实验树鼩广泛应用和深入研究奠定了质量保障。当然，该标准还有一些条款需要在今后的实际工作中予以补充、完善和提高[27]。

## 参考文献

[1]周德庆，等．微生物学教程（第二版）．北京：高等教育出版社，2002．
[2]沈萍，等．微生物学．北京：高等教育出版社，2000．
[3]洪秀华，等．临床微生物学检验（第二版）．北京：中国医药科技出版社，2004．
[4]陆德源，等．医学微生物学（第五版）．北京：人民卫生出版社，2001．
[5]李凡，等．医学微生物学（第七版）．北京：人民卫生出版社，2008．
[6]崔保安，等．动物微生物学（第三版）．北京：中国农业出版社，2005．
[7]陆承平，等．兽医微生物学（第三版）．北京：中国农业出版社，2001．
[8]刘志恒．现代微生物学．北京：科学出版社，2002．
[9]驹行和男．微生物化学分类的实验方法．方爽译．贵阳：贵州人民出版社，1989．
[10]徐林，张云，梁斌，等．实验动物树鼩和人类疾病的树鼩模型研究概述．动物学研究，2013，34（2）：59–69．
[11]李贵．硕士论文《树鼩体表、口腔、肛门共生微生物的分离、鉴定》．云南农业大学，2012．
[12]邢进，冯玉芳，付瑞，等．野生树鼩可培养细菌和真菌携带情况的调查．实验动物科学，2012，29（3）：36–8．
[13]高家红，江勤芳，罗志武，等．树鼩正常肠道细菌的培养分离鉴定及其药敏试验研究．中国比较医学杂志，2009，19（12）：24–34．
[14]Kruse H, Kirkemo AM, Handeland K. Wildlife as source of zoonotic infections. Emerg Infect Dis, 2004, 10(12): 2067-72.
[15]Cao J, Yang EB, Su JJ, et al. The tree shrews: adjuncts and alternatives to primates as models for biomedical research. J Med Primatol, 2003, 32(3): 123-30.
[16]王映纯，金卫翔，唐永明，等．健康树鼩肠道带菌情况分析．医学生物学研究，1987，1：14．
[17]Bahr U, Darai G. Analysis and characterization of the complete genome of *Tupaia* (tree shrew) herpes virus. J Virol, 2001, 75(10): 4854-70.
[18]张才军，施明一，陈芳，等．中缅树鼩常见病原菌的分离鉴定．中国病原生物学杂志，2009，4（12）：899–900．
[19]徐新平，陈红波，贲昆龙，等．树鼩在医学生物学中的应用．中国实验动物学报，2005，13（3）：187–90．
[20]Darai G, Matz B. Characterization of a tree shrew herpes virus isolated from a lymphosarcoma. J Gen Virol, 1979, 43: 541-51.
[21]徐娟，黄晓燕，李晓飞，等．树鼩呼肠孤病毒的分离鉴定．动物学研究，2013，34（2）：116–20．
[22]彭燕章，叶智彰，邹如金，等．树鼩生物学．昆明：云南科技出版社，1991．
[23]角建林，刘汝文，陈丽玲，等．树鼩资源的开发利用与标准化研究．中国比较医学杂志，2009，19（7）：73–8．
[24]沈培清，刘美芳，刘汝文，等．树鼩的应用和标准化产业化研究．实验动物科学，2008，25：49–52．
[25]Wu XX, Tang EH, Xie GZ. Research on tree shrew with herpesvirus I: the isolation, biological characteristics and serum of the virus. Chn J Microbiol Immunol, 1983, 3: 33-6.
[26]Wan XB, Liu JC, Xu AY. Experimental infection of adult tree shrew with rotavirus. Chn J Med, 1982, 62(8): 461-5.
[27]沈培清，郑红，刘汝文，等．中国树鼩实验动物化研究进展和展望．动物学研究，2011，32（1）：109–14．



# 第十六章

第一篇树鼩基础生物学
TREE SHREW BASIC BIOLOGY

Tree shrews

# 树鼩正常组织学及图解

徐 玲 曹 毅

实验动物的正常解剖学、组织学是实验动物推广和应用的重要基础资料。在《树鼩生物学》（云南科技出版社1991年出版）中，树鼩正常解剖学结构被系统、详细的描述，并附有大量图画，在实践中非常直观和实用，效果很好。在同一本《树鼩生物学》中，树鼩正常组织学也被包括，并附有部分组织学照片。然而，由于受当时条件所限，该书所附组织学照片均不是彩色照片。一些从事实验动物及树鼩研究的工作者和学生强烈希望，有一部简明、实用、彩色的树鼩正常组织学图谱。为此，在中国科学院基础前沿研究专项项目，“树鼩基础生物学及重要生物学特性研究（KSCX16–2–EW–J–23）”的支持下，我们编写了《树鼩正常组织学及图解》这一章，内容覆盖树鼩几乎所有的重要器官，包括神经系统、循环系统、呼吸系统、消化系统、泌尿系统、生殖系统、内分泌系统、免疫系统、皮肤、肌肉和脂肪。部分器官和组织的内容因在其它章节也有表述，故这部分内容在本章没有被包括。在实验中，我们对由中国科学院昆明动物研究所实验动物中心提供，产于云南省的正常树鼩（*Tupaia belangeri chinensis*）进行系统的尸体解剖，主要脏器取材后立刻福尔马林固定，石蜡包埋，组织切片经苏木精–伊红（hematoxylin-eosin）染色，普通光学显微镜观察和照相。本着实用、精简、直观的原则，在编写本章时，以组织学照片为主体，抓住相应脏器的关键组织学特征，突出重点，并配以大量图标和解释，以期读者在较短时间内掌握相应器官的组织学要领，并能进行初步的正常组织学观察。我们希望这章节内容能达到“简明正常组织学图谱”的效果，在目前作为《树鼩正常组织学图谱》的精简本，供从事动物学、比较解剖学、实验动物学、组织学、病理学及树鼩相关研究的生物学和医学工作者及学生参考。

## 第一节 神经系统

神经系统分为中枢神经系统和周围神经系统两大部分，中枢神经系统包括脑和脊髓，周围神经系统分为脑神经和脊神经。

神经组织由神经细胞和神经胶质细胞组成。神经细胞是神经系统的结构和功能单位，称为神经元。中枢神经系统的胶质细胞包括有：星形胶质细胞、少突胶质细胞、小胶质细胞。

在脑和脊髓中，神经元胞体集中的部分为灰质（gray matter），只有神经纤维的部分为白质（white matter）。大脑和小脑的灰质位于表层，也称皮质（cortex），皮质下是白质。脑白质中的灰质团块称神经核。脊髓的灰质位于中央，周围是白质。

脊髓灰质横切面呈蝶状，分腹角、侧角、后角。腹角含躯体运动神经元。躯体运动神经元包

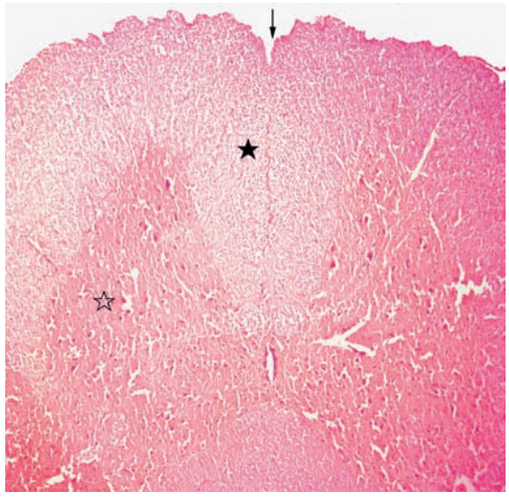


**图16–1　脊髓（10×5）**

脊髓（spinal）横切面为椭圆形，中间呈蝶翼状着色较深的为脊髓灰质（gray matter）(☆)，周围着色较浅的为白质（white matter）(★)。腹侧为腹正中裂（↑）。中央有一脊髓中央管。

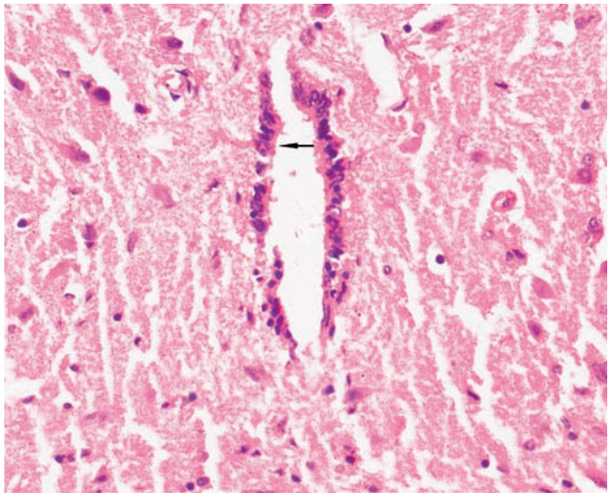


**图16–2　脊髓（10×40）**

示脊髓中央管，管壁为室管膜上皮（↑）。

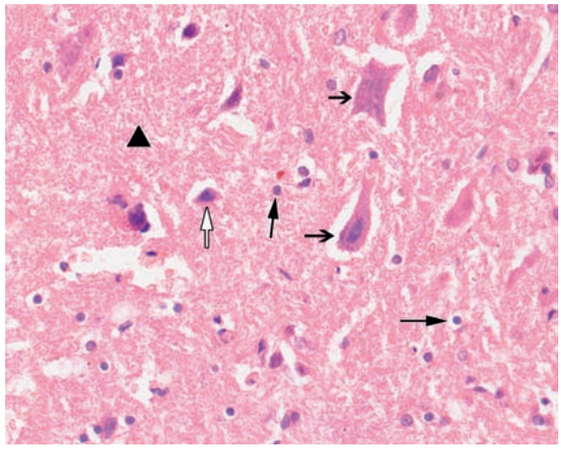


**图16–3　脊髓灰质前角内运动神经元（10×40）**

脊髓前角内大多是躯体运动神经。α神经元（↑），染色较浅；γ神经元（⇨），染色较深。在神经元之间，还有神经胶质细胞（↑）和无髓神经纤维（▲）。

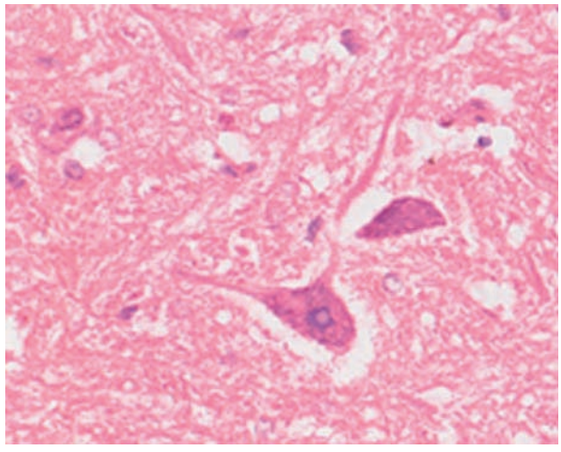


**图16–4　脊髓多极神经元（10×40）**

多极神经元形态不规则，细胞包体大，细胞核位于中央，大而圆，染色淡，核仁明显。胞质紫红色，胞质内可见大小不等的紫蓝色小块，即尼氏体。

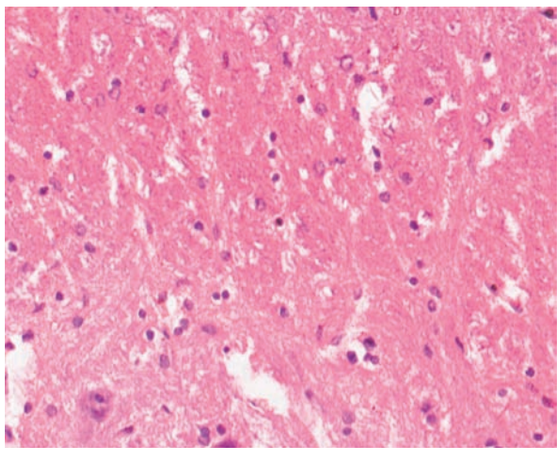


**图16–5　神经胶质细胞（10×20）**

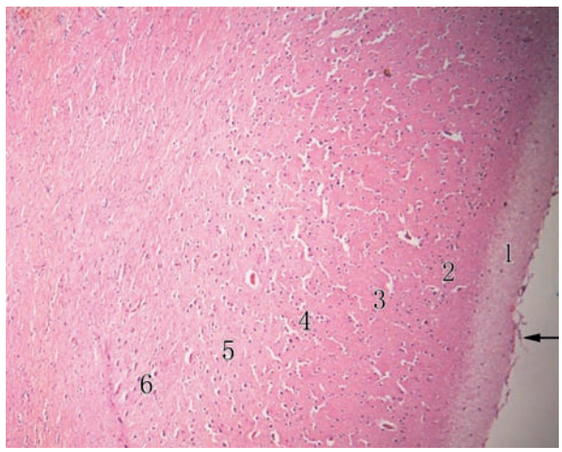



**图16–6　大脑皮质（10×5）**

大脑表面覆盖软脑膜（↑）。大脑皮质从表面到深层分为6层：①分子层（molecular layer），神经元小且少，主要是水平细胞和星形细胞，及与皮质表面平行的神经纤维；②外颗粒层（external granular layer），由星形细胞和少量小型锥体细胞构成；③外锥体细胞层（external pyramidal layer），较厚，有许多中、小型锥体细胞和星形细胞组成；④内颗粒层（internal granular layer），细胞密集，多数是星形细胞；⑤内锥体细胞层（internal pyramidal layer），主要由中、大型锥体细胞组成；⑥多形细胞层（polymorphic layer），以梭形细胞为主，还有锥体细胞和颗粒细胞。

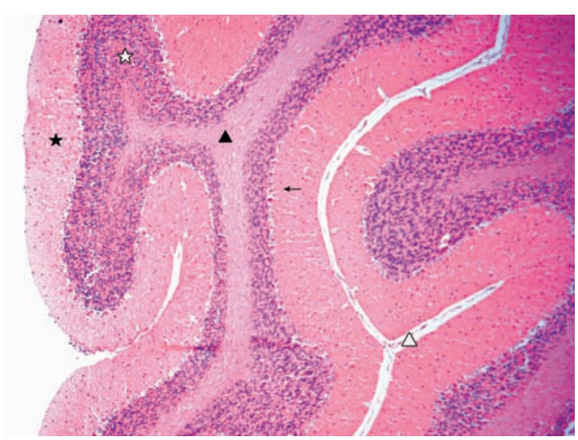


**图16–7　小脑皮质（10×5）**

小脑皮质被平行沟（△）分隔成许多小叶，由外到内分3层：①分子层（★），较厚，神经元较少，主要由星形细胞和篮状细胞组成；②蒲肯野细胞层，由一层蒲肯野细胞胞体（↑）组成（右边为局部放大图）；③颗粒层，由密集的颗粒层细胞和高尔基细胞组成（☆）。皮质下方为髓质（白质）（▲）。分子层和颗粒层内的神经元是中间神经元，蒲肯野细胞是小脑皮质的传出神经元。

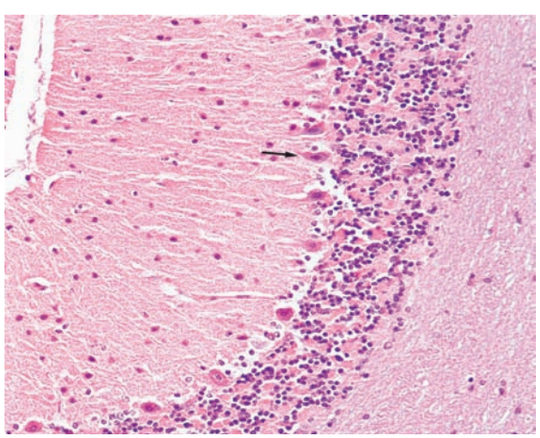


**图16–8　蒲肯野细胞（10×20）**

括：α运动神经元，胞体大而轴突粗，支配骨骼肌；γ运动神经元，胞体小而轴突细，支配梭内肌纤维；闰绍细胞：胞体小，短轴突与α运动神经元形成突触，抑制后者。侧角含内脏运动神经元。背角神经元类型复杂，主要接受感觉神经元轴突传入的神经信号。

大脑皮质神经元呈层状分布，由表至里分为6层：分子层、外颗粒层、外锥体细胞层、内颗粒层、内锥体细胞层、多形细胞层。

小脑皮质神经元有5种：蒲肯野细胞（Purkinje cell）、颗粒细胞、星形细胞、篮状细胞和高尔基细胞。由表至里分为3层：分子层、蒲肯野细胞层、颗粒层。

## 第二节 循环系统

循环系统由心血管系统和淋巴管系统组成。心血管系统包括心脏、动脉、毛细血管和静脉。心脏是输送血液流动的动力泵，由其搏出的血液经动脉到毛细血管，再由静脉回流到心脏。毛细血管管壁薄，血液在此与周围组织进行物质交换。淋巴管系统为辅助的循环管道，包括毛细淋巴管、淋巴管和淋巴导管。毛细淋巴管为淋巴管系统的起始部分位于组织中，组织液进入毛细淋巴管称为淋巴。淋巴经淋巴管和淋巴导管进入大静脉。循环系统是一个连续而封闭的管道系统，其功能是维护血液和淋巴循环。

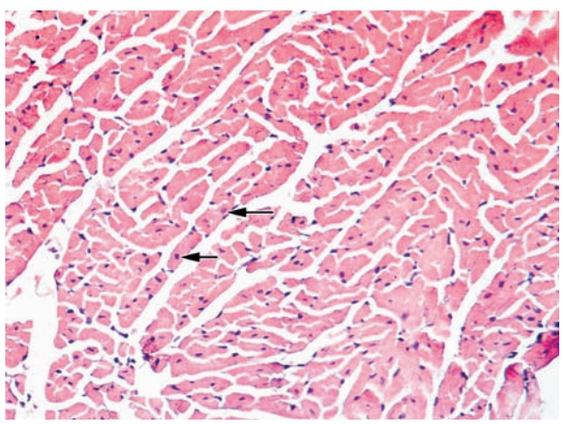


**图16–9 心室壁（10×20）**

心室壁厚，由心肌细胞组成。心肌细胞的横切面，心肌细胞中央有一个椭圆形的细胞核（↑）。

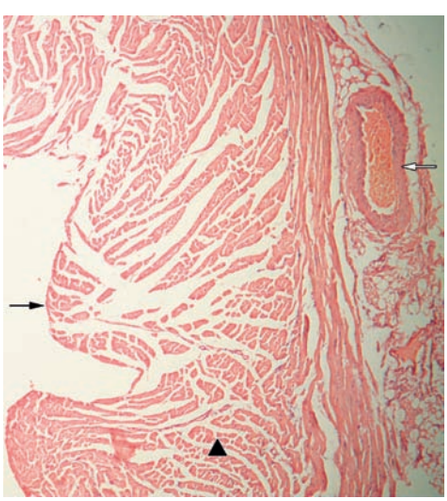


**图16–10 心房壁（10×5）**

图为心房壁内膜（↑）、肌层（▲），外膜内可见血管（⇨）。

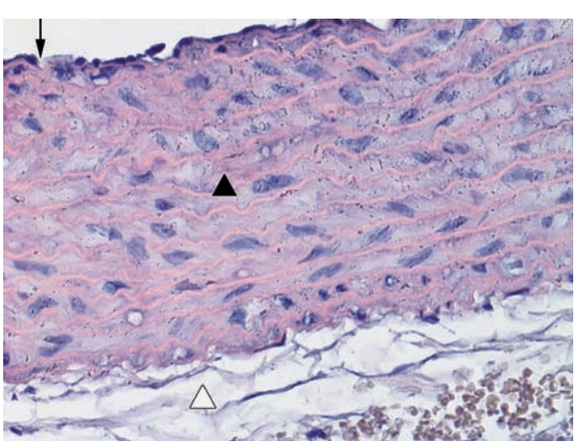


**图16–11 大动脉（10×40）**

大动脉管壁包括内膜（↑）、中膜（▲）和外膜（△）。中膜厚，由许多层弹性膜构成。外膜为疏松结缔组织。

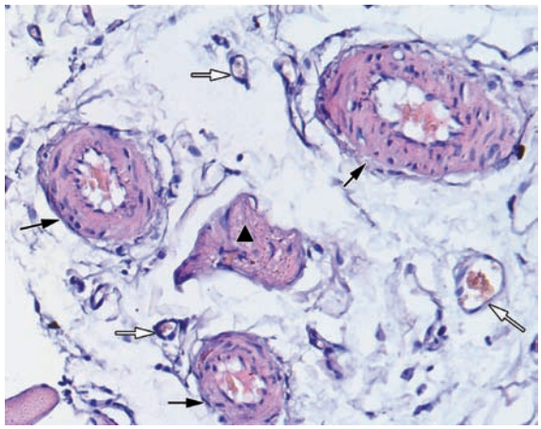


**图16–12　小动脉、毛细血管和神经（10×20）**
示小动脉（↑）、毛细血管（⇨），其间可见神经（▲）。

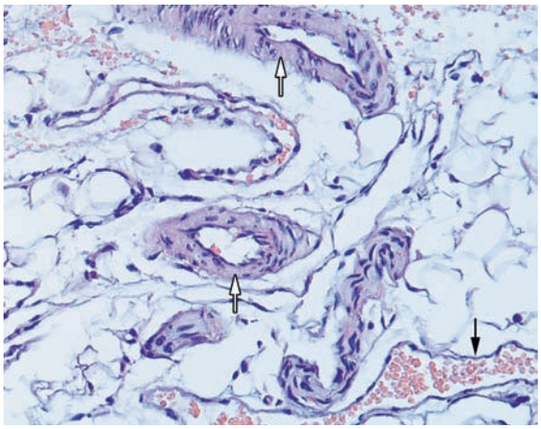


**图16–13　小动脉、小静脉（10×20）**
示小动脉（⇨）、小静脉（↑）。

## 第三节　呼吸系统

呼吸系统由导气部和呼吸部组成。导气部包括鼻、喉、气管、支气管、肺内的终末细支气管，功能主要为保持气道通畅传导气体，管壁多以软骨作支架，黏膜表面为假复层纤毛柱状上皮。气管和支气管上皮内有杯状细胞，黏膜下层有混合腺。杯状细胞和混合腺分泌的黏液覆盖上皮表面，纤毛细胞的纤毛定向运动排出黏液和黏附其中的尘埃及异物，导气部也有防御作用。呼吸部由呼吸性细支气管、肺泡管、肺泡囊和肺泡组成。肺泡壁薄，血液在此与吸入的空气进行$O_2$和$CO_2$交换。

气管壁分为3层：黏膜、黏膜下层和外膜。黏膜上皮是假复层纤毛柱状上皮。黏膜下层为结缔组织，内有混合腺和淋巴组织。外膜由透明软骨环和结缔组织构成。软骨环呈马蹄形，缺口朝向气管的背侧，缺口处有平滑肌和结缔组织。

肺组织结构包括实质和间质两部分。实质为肺内支气管的各级分支和肺泡。间质为肺各级分支管道之间的结缔组织，包括血管、淋巴管和神经等。肺内支气管的上皮与气管相同。肺内导管由支气管向细支气管过渡，上皮由假复层纤毛柱状上皮转变为单层柱状上皮，杯状细胞、腺体和软骨逐渐消失。终末细支气管转入肺的呼吸部，上皮失去纤毛。肺泡壁由Ⅰ型肺泡细胞和Ⅱ型肺泡细胞组成。肺泡腔和肺泡隔内可见到吞噬了灰尘的巨噬细胞。

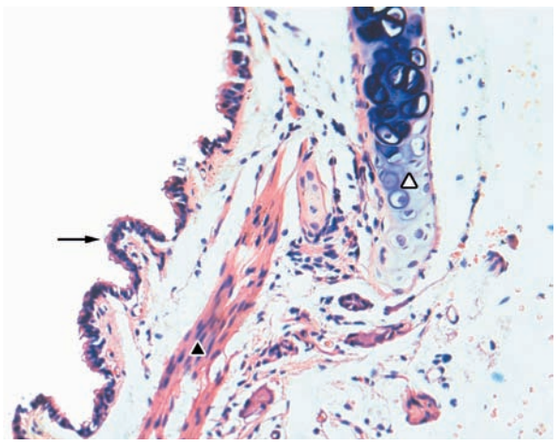


**图16–14　气管（10×10）**

气管管壁至内向外由黏膜、黏膜下层和外膜组成。黏膜上皮，由假复层纤毛柱状上皮（↑）和固有层构成；黏膜下层为疏松结缔组织，与固有层和外膜无明显界限，内有较多混合性腺；外膜厚，含“C”形的透明软骨（△）和平滑肌（▲）。

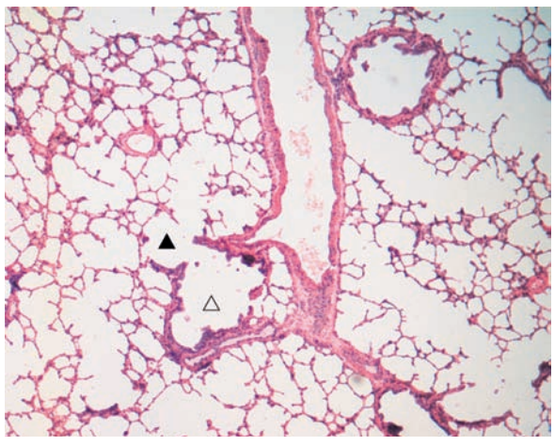


**图16–15　呼吸性细支气管和肺泡管（10×5）**

呼吸性细支气管（△），管壁上有肺泡开口，故管壁不完整，上皮为单层立方，上皮下的结缔组织内有少量环形平滑肌。呼吸性细支气管下连肺泡管（▲），其管壁上有大量肺泡开口，管壁结构少。

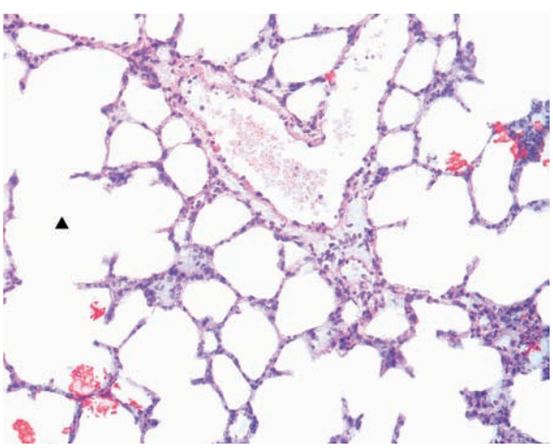


**图16–16　肺泡管和肺泡囊（10×20）**

肺泡管和肺泡囊都由肺泡围成。肺泡管（▲）上的肺泡开口处有少量环形平滑肌，相邻肺泡开口之间呈结节状膨大。肺泡囊上的肺泡开口处无平滑肌，相邻肺泡开口之间无结节状膨大。

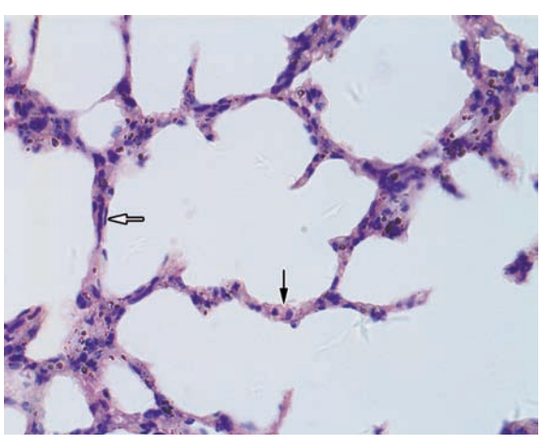


**图16–17　肺泡（10×40）**

肺泡是肺进行气体交换的场所，形状为半球形小囊，开口位于肺泡囊、肺泡管和呼吸性细支气管。肺泡上皮细胞分为Ⅰ型肺泡细胞（⇨）和Ⅱ型肺泡细胞（↑）。Ⅰ型肺泡细胞大而扁，Ⅱ型肺泡细胞小，细胞核圆，分泌表面活性物质。

# 第四节 消化系统

## 一、消化管

消化管是由口腔到肛门的连续性管道，分别是口腔、咽、食管、胃、小肠、大肠等，主要功能是消化和吸收营养物质。除口腔与咽外，自内向外均分为4层：

1. 黏　膜

由上皮、固有层和黏膜肌组成。上皮的类型因部位而不同，消化管的两端（口腔、咽、食管及肛门）为复层扁平上皮，以保护功能为主，其余为单层上皮，以消化吸收功能为主；固有层为疏松结缔组织，其内有丰富的血管和淋巴管。胃肠固有层内还富含腺体或淋巴组织；黏膜肌层为薄层平滑肌，其收缩可使黏膜活动，促进固有层内腺体分泌物排出和血液运行，利于物质吸收。

2. 黏膜下层

由疏松结缔组织组成，内含较大的血管和淋巴管。食管、胃和小肠等部位的黏膜与黏膜下层共同向管腔内突起，形成皱襞。

3. 肌　层

食管与肛门处的肌层为骨骼肌，其余大部均为平滑肌。肌层一般分为内环行、外纵行两层。

4. 外　膜

单由薄层结缔组织构成则称纤维膜，主要分布于食管和大肠末段，与周围组织无明显界限。由薄层结缔组织与间皮共同构成者称浆膜，见于胃、小肠和大肠，其表面光滑，便于胃肠活动。

## 二、消化腺

消化腺包括两部分：①分布于消化管壁内的小消化腺（比如口腔黏膜小唾液腺、胃腺、肠腺等）；②形成器官的大消化腺（唾液腺、胰脏、肝脏）。大消化腺是实质性器官，外层以结缔组织为被膜，被膜的结缔组织伸入腺内，将腺分隔为若干叶和小叶，血管、淋巴管和神经也随同进入腺内。大消化腺由实质（腺泡及导管）和间质（被膜及叶间结缔组织）组成。

唾液腺被膜较薄，为复管状腺，腺实质分为较多小叶，由分支的导管及末端的腺泡组成。

胰腺的腺实质分为外分泌部和内分泌部。外分泌部为浆液性复管泡状腺，分泌的胰液含多种消化酶，经导管进入十二指肠，参加食物消化。内分泌部是散在于外分泌部之间的胰岛。胰岛细胞呈团索状分布，其细胞分泌释放激素入血，主要参与糖代谢的调节。

肝脏由肝小叶和肝门管区构成。肝小叶是构成肝组织的基本结构单位，其中心部位有中央静脉。肝细胞以中央静脉为中心排列形成板状，称为肝板。肝板之间为肝血窦。肝板的断面呈索状，称肝索。肝细胞呈多面形，体积较大，核大而圆，居中，核仁一至数个，部分肝细胞有双核。肝细胞相邻面的细胞膜局部内陷，形成微细的胆小管。肝门管区主要有小叶间静脉、小叶间动脉、小叶间胆管，以及淋巴管和神经纤维。

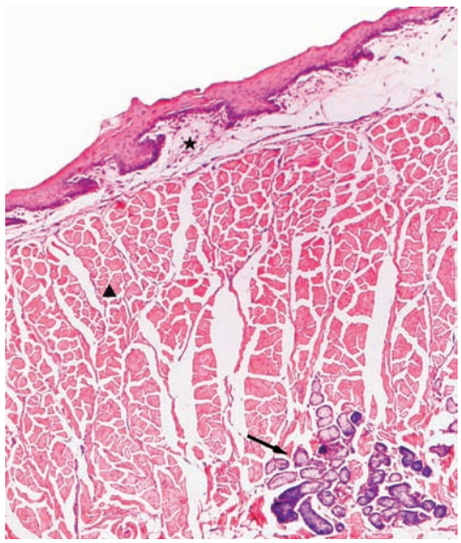



**图16–18　舌体（10×5）**

舌由黏膜、舌肌和舌腺组成。舌背黏膜隆起形成乳头，有丝状乳头、菌状乳头、轮廓乳头、叶状乳头。乳头的表面为复层扁平上皮，上皮下为固有层结缔组织（★），深部为纵横和垂直走向的骨骼肌（舌肌）（▲），舌腺（↑）散在分布于舌肌间。

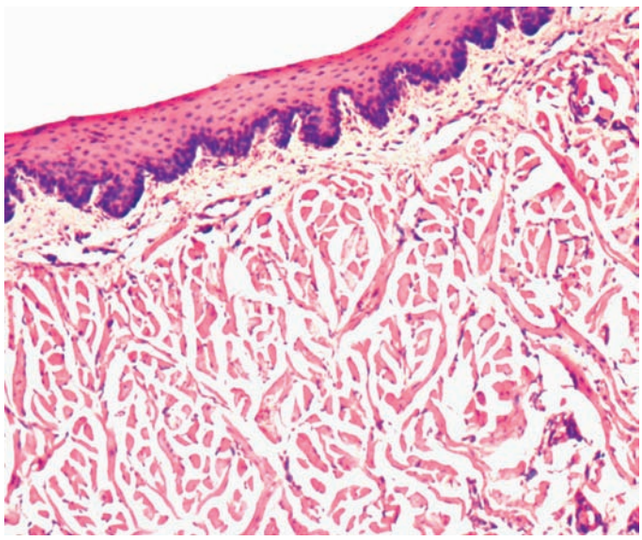


**图16–19　菌状乳头，舌体（10×10）**

菌状乳头，分布于舌尖、舌缘及分散在丝状乳头之间。

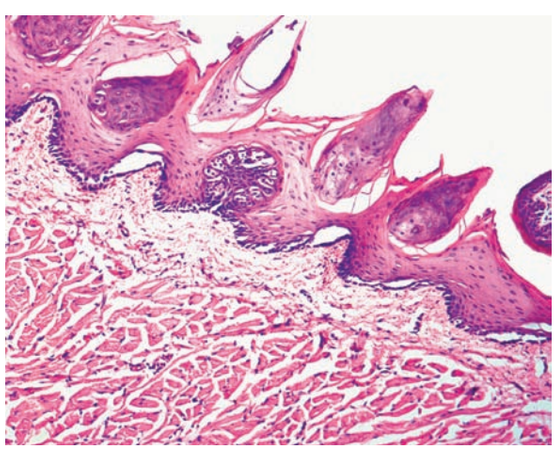


**图16–20　丝状乳头，舌体（10×10）**

丝状乳头，分布于舌背，乳头呈圆锥形，上皮角化明显（角质层厚），浅层上皮细胞角化脱落多。




**图16–21　食管（10×5）**

食管壁由4层组成：黏膜层，由上皮（1）、固有层和黏膜肌层（2）构成；黏膜下层（3），为疏松结缔组织；肌层（4），由内环外纵两层构成；外膜，为纤维膜。黏膜与黏膜下层向管腔内凸起形成皱襞（↑）。

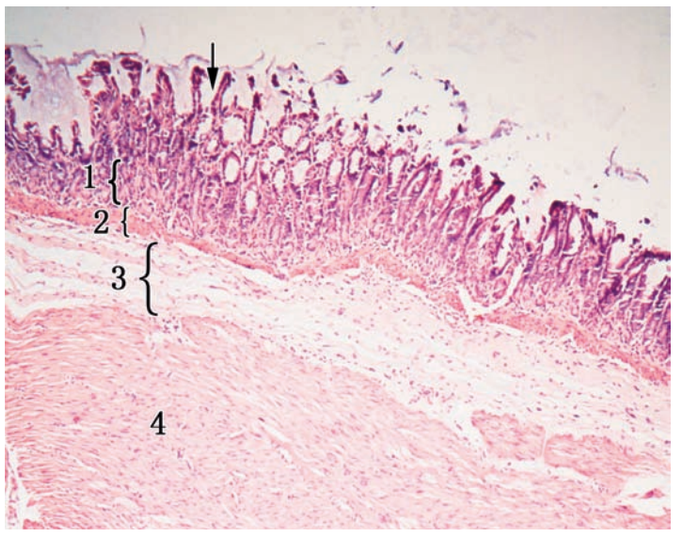



**图16–22　胃底（10×5）**
胃底分为黏膜、黏膜下层和肌层。上皮黏膜向下凹陷形成胃小凹（↑），固有层内有胃底腺（1），黏膜肌层由内环外纵两层平滑肌组成（2）；黏膜下层为疏松结缔组织（3），肌层（4）由很厚的平滑肌组成。

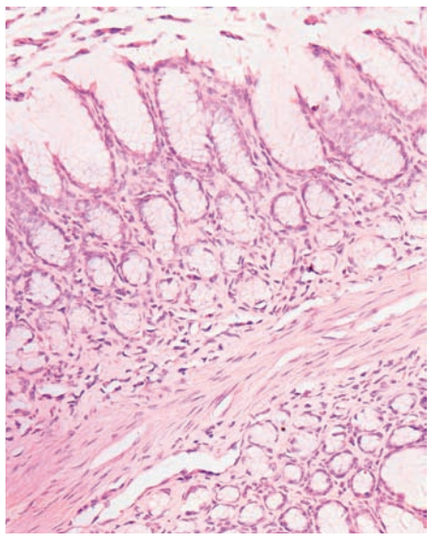


**图16–23　胃幽门部（10×20）**
幽门部的胃小凹较胃底部深，固有层有幽门腺和黏膜肌。

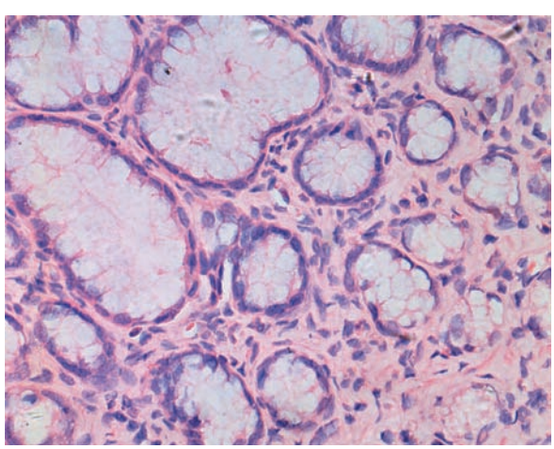


**图16–24　幽门腺（10×40）**
胃幽门部固有层内的幽门腺。

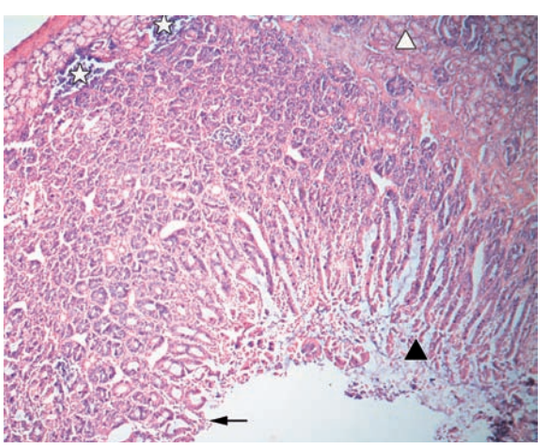


**图16–25　胃幽门—十二指肠交界（10×5）**
胃幽门与十二指肠连接处，黏膜结构突然变化。胃幽门黏膜（↑）表面无绒毛，上皮内无杯状细胞，而十二指肠黏膜（▲）有长短不齐的肠绒毛，上皮内有杯状细胞。固有层内可见孤立淋巴小结（☆），黏膜下层可见十二指肠腺（△）。

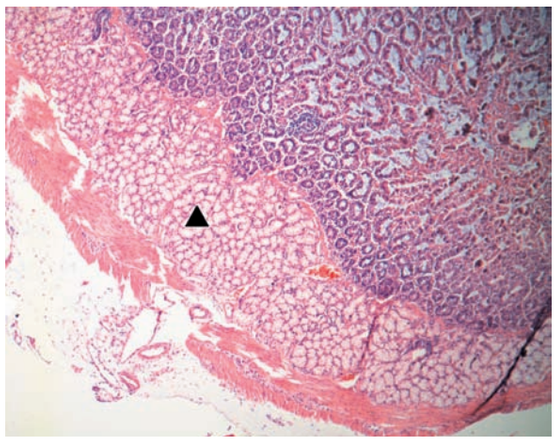


**图16–26　十二指肠（10×5）**

十二指肠肠壁分为黏膜、黏膜下层、肌层和外膜4层。黏膜与黏膜下层向管腔内凸起形成皱襞，黏膜表面具有大量指状凸起的肠绒毛，绒毛表面为单层柱状上皮，有杯状细胞；黏膜下层内有分泌黏液的十二指肠腺（▲）；肌层由内环外纵两层平滑肌组成；十二指肠的外膜，后壁为纤维膜外，其余为浆膜。

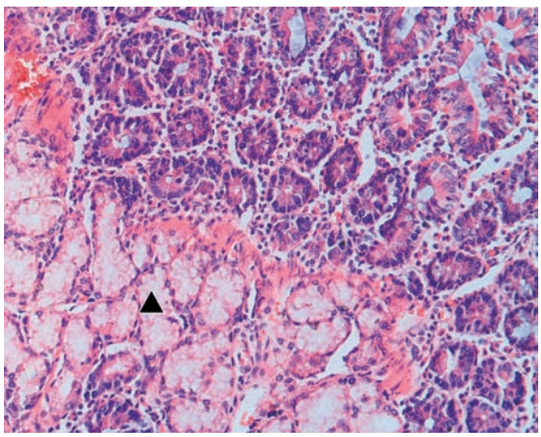


**图16–27　十二指肠腺（10×20）**

十二指肠黏膜下层内的十二指肠腺（▲）为复管泡状腺，分泌碱性黏液，保护十二指肠黏膜免受胃酸的侵蚀。十二指肠腺是十二指肠特有的组织结构。

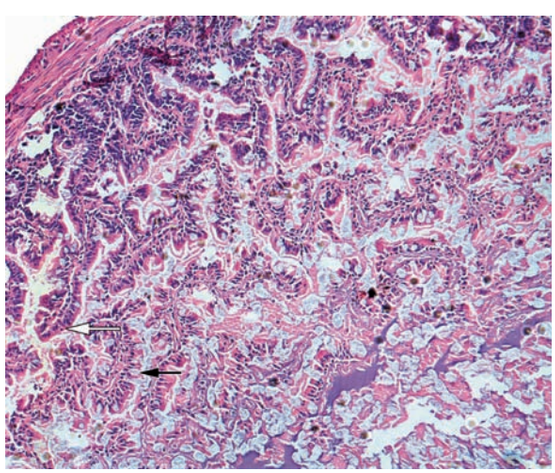


**图16–28　空肠（10×5）**

空肠结构与十二指肠相似，黏膜与黏膜下层凸出形成皱襞，但黏膜下层内无腺体，绒毛发达（⇨），呈指状，上皮内含有少量杯状细胞（↑）。

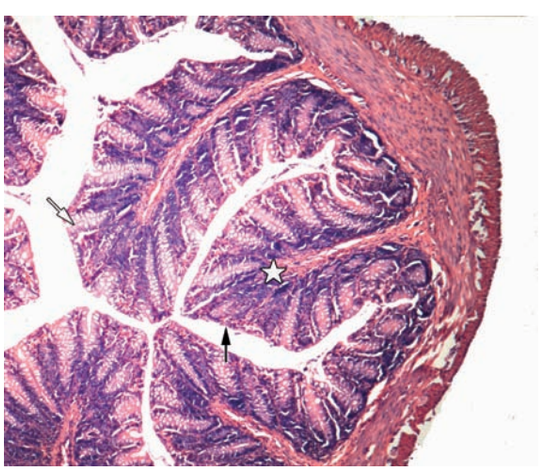


**图16–29　回肠（10×5）**

回肠有皱襞（☆），与空肠相比，绒毛短（↑），欠发达，上皮内含有较多杯状细胞（⇨）。

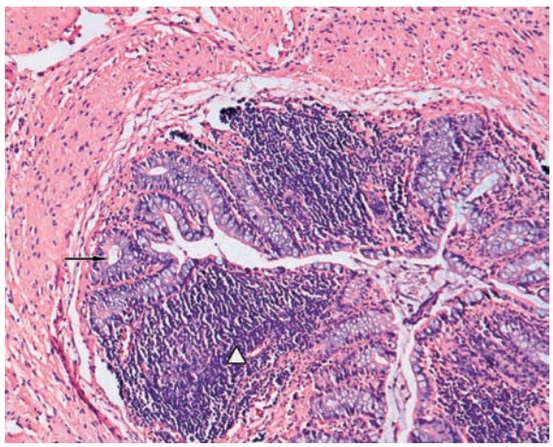


**图16–30　结肠（10×10）**

结肠壁有4层结构类似小肠。黏膜层，上段黏膜有少而不整齐的绒毛，下段黏膜表面光滑无绒毛。结肠上皮下陷形成的大肠腺（↑），上皮为单层柱状上皮，内含杯状细胞。固有层内有淋巴组织（△）。

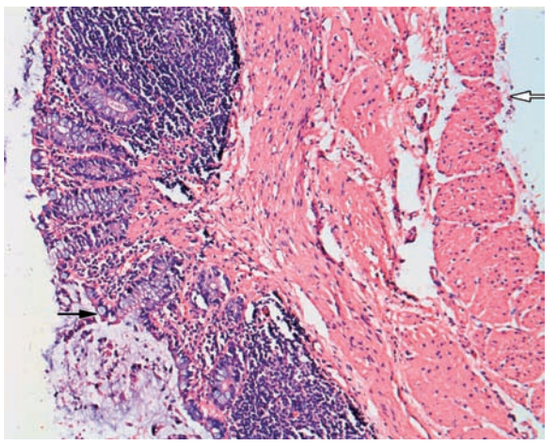


**图16–31　结肠（10×10）**

黏膜表面平整，无绒毛，上皮为单层柱状（柱状细胞和杯状细胞），杯状细胞（↑）数量较多。黏膜下层薄而疏松，肌层较厚，最外层为浆膜（⇨）。

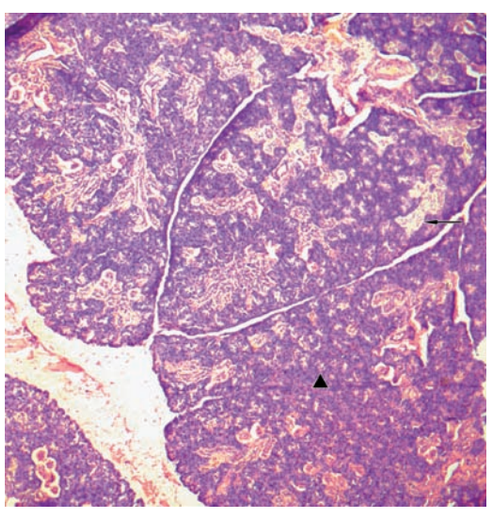


**图16–32　腮腺（10×5）**

腮腺由被膜结缔组织分为若干小叶，为混合性腺体。腺体可分为浆液性腺泡（▲）和黏液性腺泡（↑）。

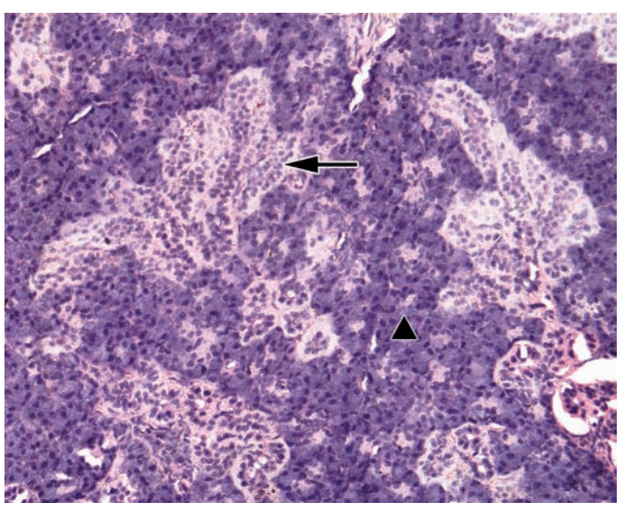


**图16–33　腮腺（10×20）**

腮腺浆液性腺泡（▲）和黏液性腺泡（↑）。

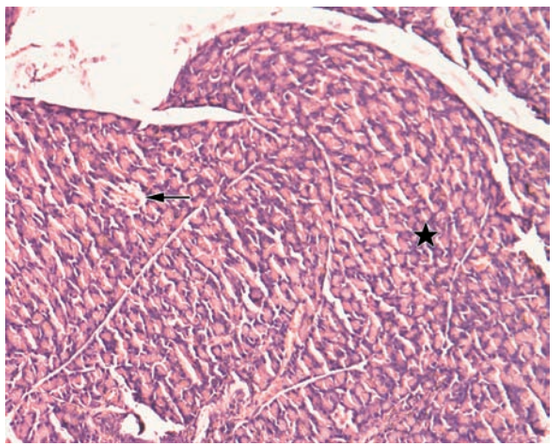


**图16–34　胰腺（10×5）**

胰腺被结缔组织被膜分割成许多小叶。每个小叶分为外分泌部和内分泌部。外分泌部（★）为浆液性复管泡状腺，染色深；内分泌部为分布于腺泡之间的胰岛（↑），染色浅。小叶间结缔组织中有导管（▲）、血管（⇨）、淋巴管和神经。

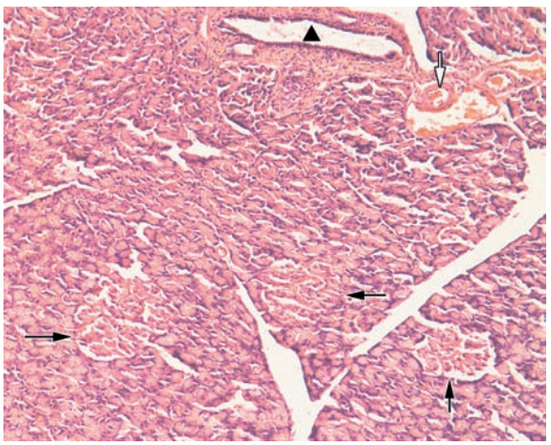


**图16–35　胰腺（10×10）**

胰腺被结缔组织被膜分割成许多小叶。每个小叶分为外分泌部和内分泌部。外分泌部（★）为浆液性复管泡状腺，染色深；内分泌部为分布于腺泡之间的胰岛（↑），染色浅。小叶间结缔组织中有导管（▲）、血管（⇨）、淋巴管和神经。

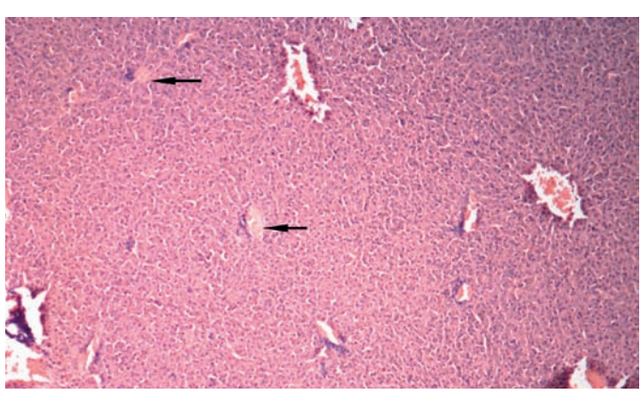


**图16–36　肝（10×5）**

肝表面覆以致密结缔组织被膜，肝门处的结缔组织随门静脉、肝动脉和肝管的分支伸入肝实质，将实质分隔成许多肝小叶，中央静脉（↑）周围是大致呈放射排列的肝细胞和肝血窦。

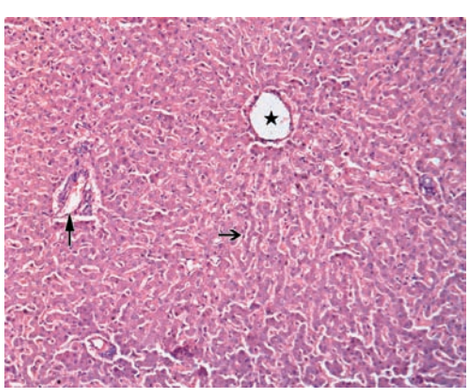


**图16–37　肝小叶（10×10）**

肝细胞以中央静脉（★）为中心排列，肝板（↑）大致呈放射状，相邻肝板吻合连接，形成迷路样结构。肝门管区（↑）有血管、胆管和神经等。

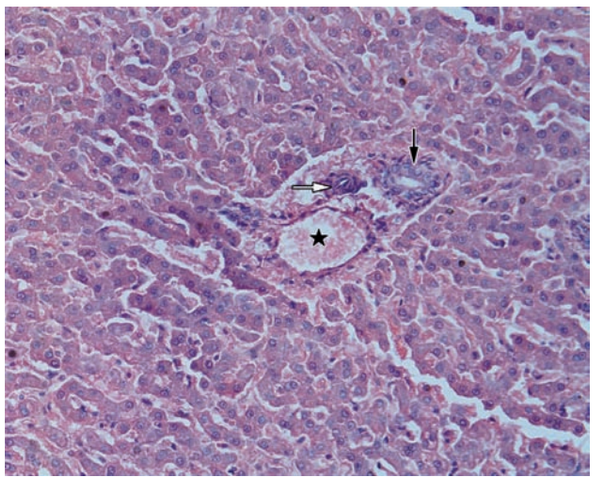


**图16–38　肝门管区（10×20）**
肝门管区有小叶间静脉（★）、小叶间动脉（⇨）和小叶间胆管（↑）组成。

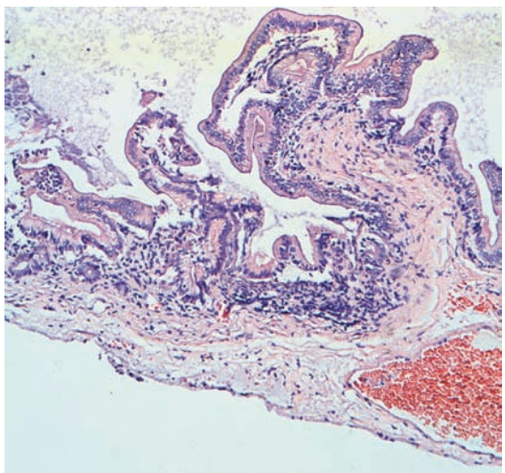


**图16–39　胆囊（10×10）**
胆囊壁表面覆以单层柱状上皮，固有层为薄层疏松结缔组织，围绕结缔组织是肌层，最外是浆膜。

## 第五节　泌尿系统

泌尿系统由肾脏、输尿管、膀胱及尿道组成。肾切面可分为两部分：皮质和髓质。皮质位于肾实质的周边部，暗红色，色较深；髓质位于中心部，色较淡，呈条纹状，由肾锥体组成。

肾由肾单位、集合小管和肾间质组成，其中肾单位是肾的基本结构和功能单位。肾单位分为肾小体、肾小管两部分。肾小体由肾小囊和血管球两部分组成。血管球是入球微动脉和出球微动脉之间的毛细血管盘绕而成的球形结构，内有上皮细胞、基底膜和系膜细胞。肾小球滤过屏障由内皮细胞、基底膜和上皮细胞3层结构组成。肾小囊内层称脏层，外层称壁层，脏壁两层之间的腔隙，称为肾小囊腔。肾小囊壁覆盖单层扁平上皮。肾小管分为近曲小管、髓襻、远曲小管。近曲小管、远曲小管主要位于肾皮质肾小球周围。集合小管包括集合管和乳头管，远曲小管与集合管相通，汇入乳头管，最后通往肾盂和肾盏。

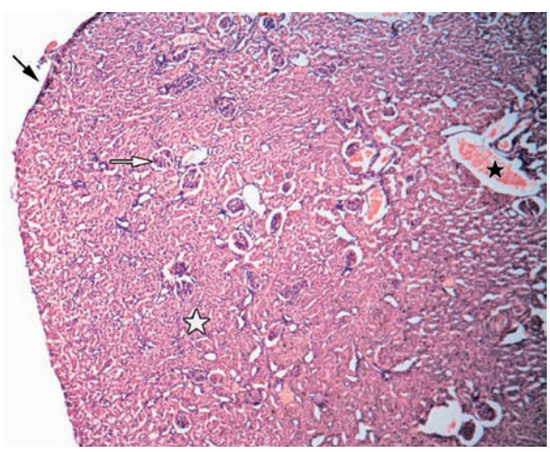


**图16–40　肾脏（10×5）**
肾脏表面为被膜（↑），被膜之下是肾皮质（☆），其中均匀分布众多肾小体（⇨）。切面可见小叶间动、静脉（★）。

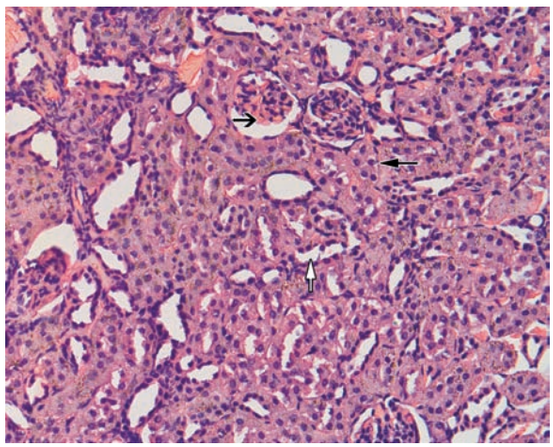


**图16–41　肾小体（10×10）**

肾小体形态为圆形或卵圆形，由血管球和肾小囊两部组成。血管球（↑）位于中央，由入球微动脉和出球微动脉之间的毛细血管弯曲盘绕形成的球状结构。 可见近曲小管（↑）和远曲小管（⇨）。

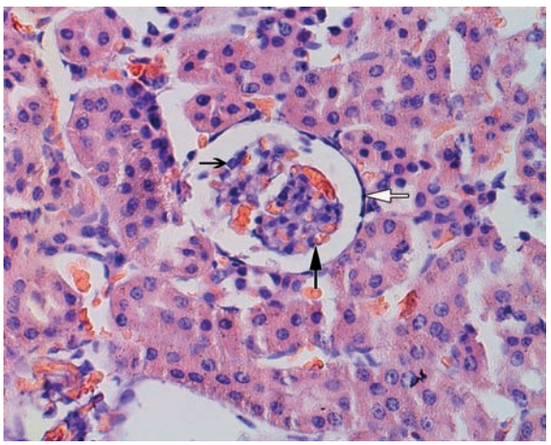


**图16–42　肾小体（10×40）**

血管球内有内皮细胞（↑）、系膜细胞和足细胞（↑）。肾小壁可见扁平的上皮细胞（⇨）。

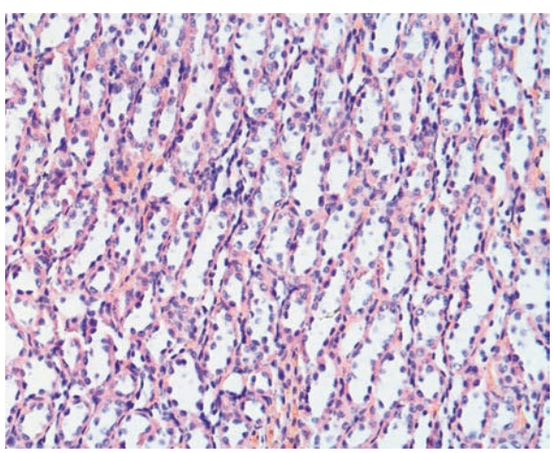


**图16–43　肾髓质（10×20）**

肾髓质由多个锥体组成，主要由泌尿小管构成，包含肾小管和集合小管。

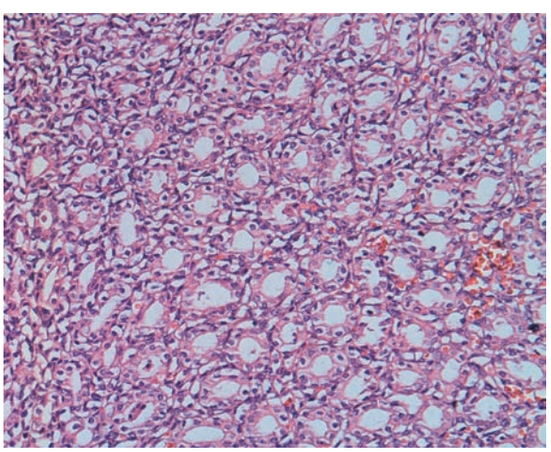


**图16–44　肾脏集合小管（10×20）**

位于肾锥体靠近肾小盏处的是乳头管，由集合管汇集而成，管径较细，形态规则。

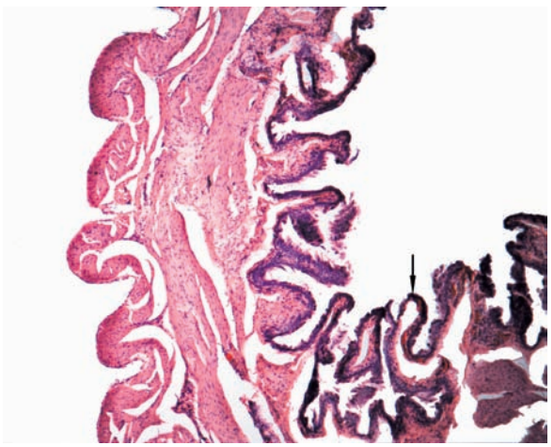


**图16–45　膀胱（10×5）**
膀胱壁由黏膜、肌层和外膜组成。黏膜上皮为移行上皮（↑）；肌层厚，由内纵、中环和外纵3层组成；外膜为疏松结缔组织和间皮。

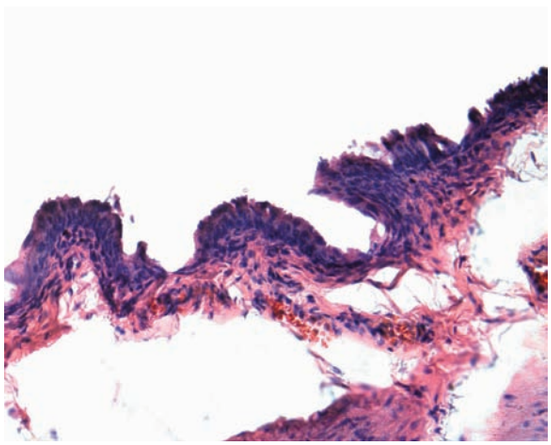


**图16–46　膀胱黏膜（10×20）**
膀胱黏膜上皮是移行上皮，它们的层次与膀胱充盈程度有关，当膀胱处于收缩时上皮可为8～10层，而在扩张时，层次可少至2～3层。

## 第六节　生殖系统

雄性生殖系统包括：睾丸、附睾、精囊腺、前列腺及外生殖器。睾丸是产生精子和分泌雄性激素的器官，附睾暂时贮存精子并使精子进一步成熟。前列腺分泌前列腺液。

雌性生殖系统包括：卵巢、输卵管、子宫、阴道。卵巢由门部、髓质部和皮质部组成，皮质内还有大小不一的卵泡。卵巢是产生卵子和分泌激素的器官。子宫壁很厚，由黏膜、肌层和浆膜组成。

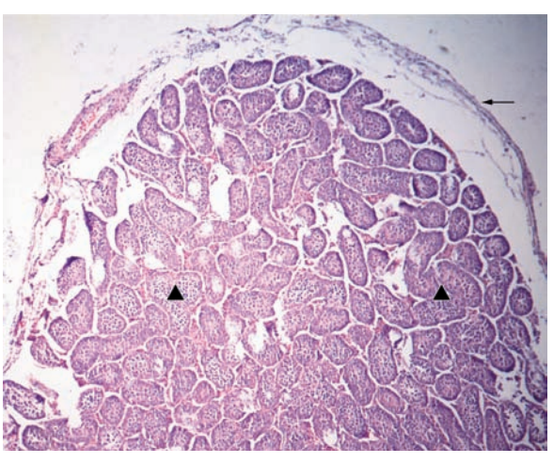


**图16–47　睾丸（10×5）**
睾丸被覆白膜（↑），由睾丸小隔分成很多小叶，小叶内见曲细精管（▲）的断面。

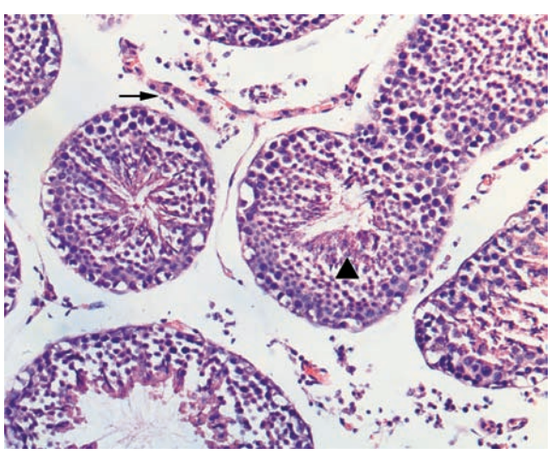


**图16–48　睾丸曲细精管和间质细胞（10×20）**
多层细胞组成曲细精管的管壁，靠近基底层为精原细胞和支持细胞，小管中央为精子（▲）。睾丸间质细胞（↑）成群分布于曲细精管之间，睾丸间质细胞分泌雄激素。

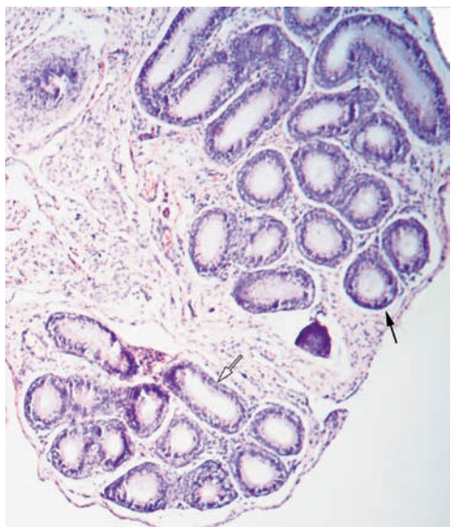


**图16–49　附睾（10×5）**

附睾由输出小管（⇨）与附睾管（↑）组成。

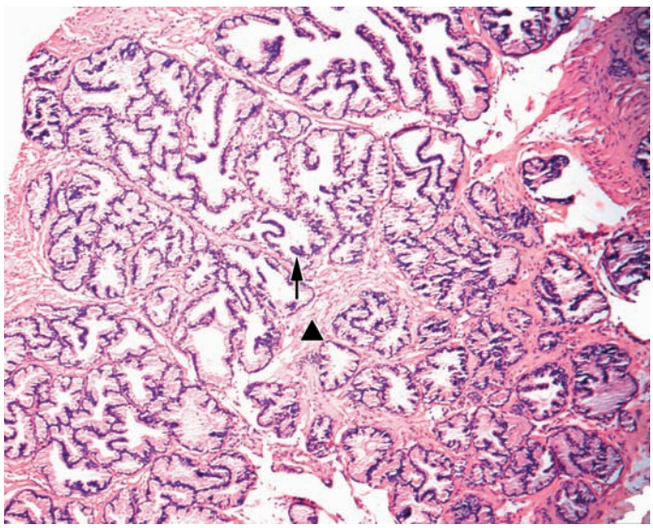


**图16–50　前列腺（10×5）**

前列腺外覆结缔组织，结缔组织和平滑肌向内延伸形成支架（▲），腺体为复管泡状腺（↑）。

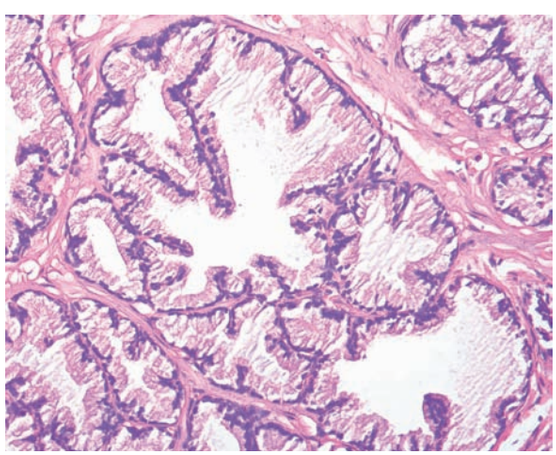


**图16–51　前列腺（10×20）**

前列腺上皮为单层或假复层柱状上皮。

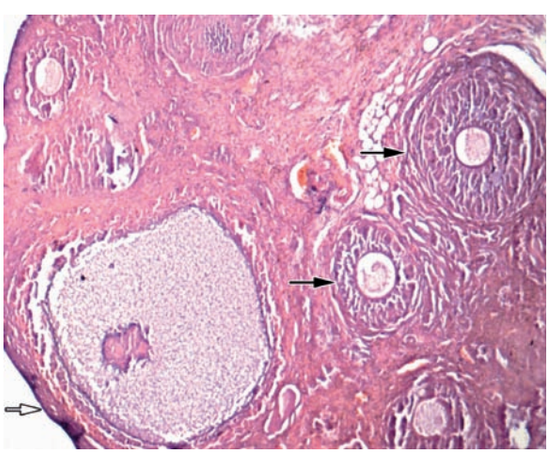


**图16–52　卵巢（10×5）**

卵巢表面被覆上皮结缔组织白膜（⇨），皮质占卵巢的大部分，内有不同发育阶段的卵泡（↑）；中央部位髓质，内含丰富的血管和疏松结缔组织。

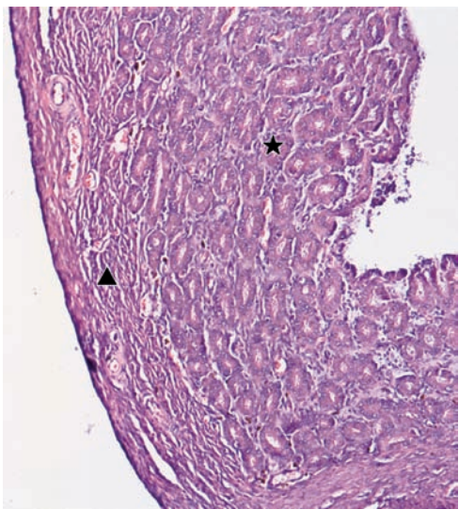


**图16–53　子宫（10×5）**
子宫壁由黏膜（★）、肌层（▲）和浆膜组成。

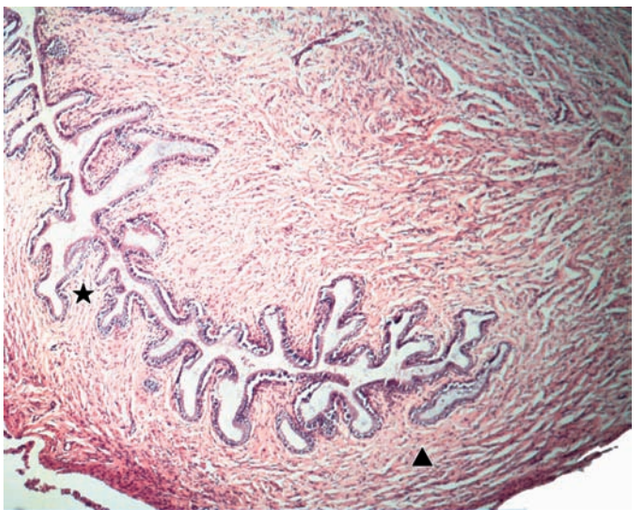


**图16–54　输卵管（10×5）**
输卵管由卵巢延伸至子宫腔，由阔韧带悬于子宫腔壁。输卵管黏膜向内形成皱襞（★），黏膜表面为单层纤毛柱状上皮，纤毛向子宫方向摆动，利于卵子向子宫移动。固有层下为肌层（▲）。外膜为疏松结缔组织和浆膜。

## 第七节　内分泌系统

内分泌系统由内分泌腺和分散于其它器官和组织内的内分泌细胞组成。内分泌细胞分泌激素，调节机体的生长发育和各种代谢，维持内环境的稳定，并控制生殖、影响行为。大多数内分泌细胞分泌的激素通过血液循环作用于远处的靶细胞，少数内分泌细胞的分泌物也可直接作用于邻近的细胞，称旁分泌。内分泌腺的组织结构特点是，腺细胞排列成条索状、团状或滤泡状，没有排送分泌物的导管，但毛细血管丰富，利于激素输送。

内分泌腺包括甲状腺、甲状旁腺、肾上腺、脑垂体和松果体。

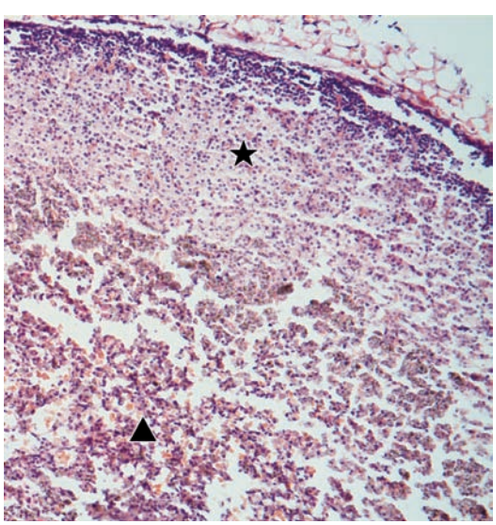


**图16–55　肾上腺（10×5）**
肾上腺外覆结缔组织被膜。腺实质由周边的皮质（★）和中央的髓质（▲）构成。肾上腺皮质分泌盐皮质激素、糖皮质激素、少量雄激素。肾上腺髓质分泌肾上腺素和去甲肾上腺素。

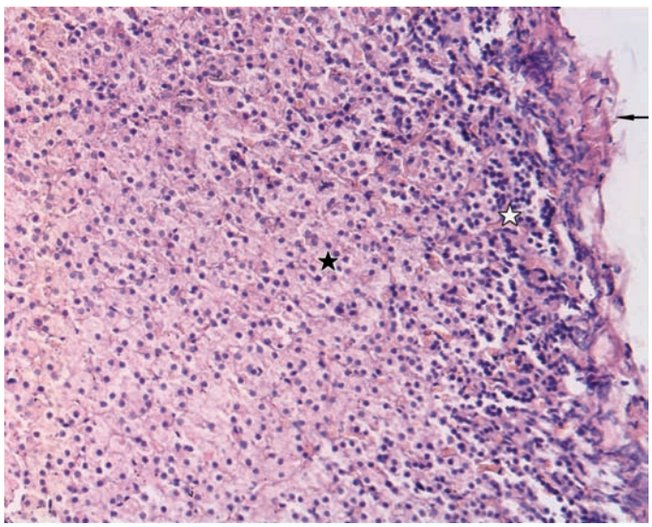


**图16–56　肾上腺皮质（20×10）**

肾上腺皮质的被膜（↑）及皮质前部的球状带（☆）和中部的束状带（★）。

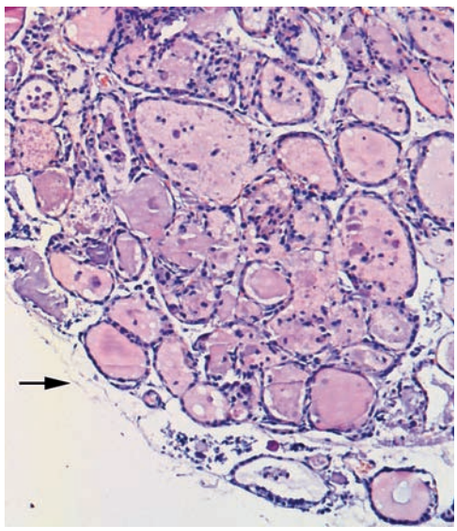


**图16–57　甲状腺（10×10）**

甲状腺外覆被膜（↑），腺实质为甲状腺滤泡。

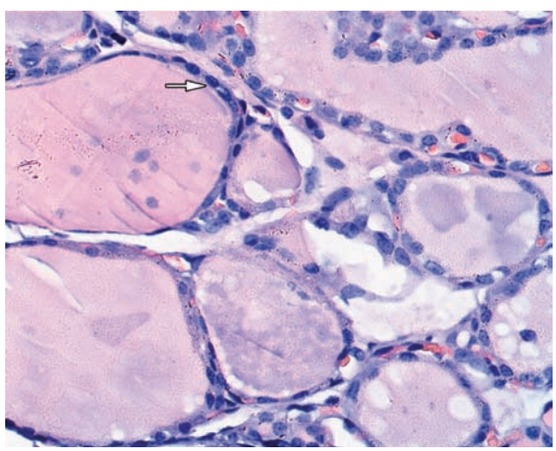


**图16–58　甲状腺（10×40）**

甲状腺滤泡由单质立方上皮（⇨）构成，滤泡腔内着红色的是胶质。

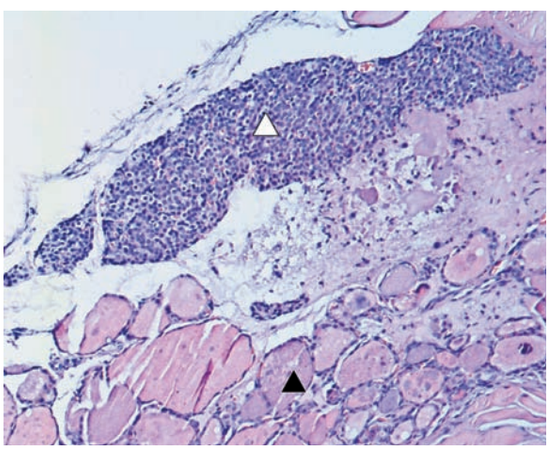


**图16–59　甲状旁腺（10×5）**

甲状旁腺（△）附于甲状腺（▲）。外覆疏松结缔组织被膜。

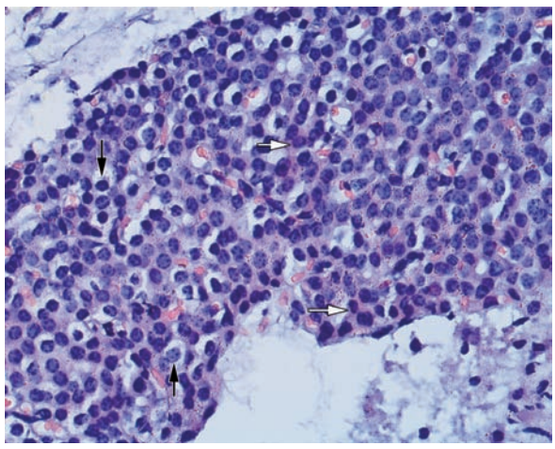


**图16–60　甲状旁腺（10×40）**
甲状旁腺腺细胞分为：主细胞和嗜酸性细胞。主细胞（↑），核圆形，胞质染色浅；而嗜酸性细胞（⇨）较大，核小，胞质着色较红。

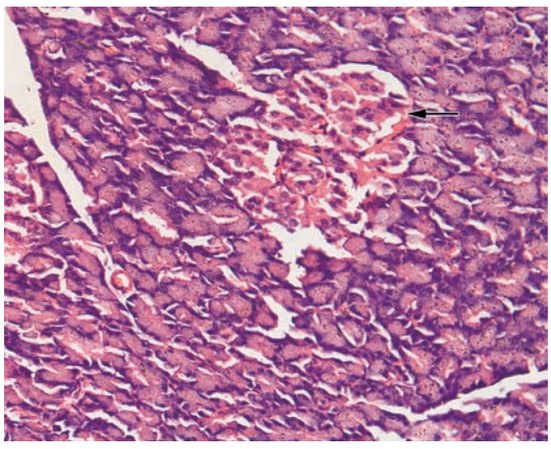


**图16–61　胰岛（10×20）**
胰岛（↑）由A、B、C、D 4种内分泌细胞和丰富毛细血管组成。形态上4种内分泌细胞很难区分。

## 第八节　免疫系统

免疫系统包括淋巴器官、淋巴组织和免疫细胞。淋巴器官由中枢淋巴器官（胸腺和骨髓）和外周淋巴器官（淋巴结和脾等）组成，淋巴组织除构成外周淋巴器官外也广泛存在于消化道和呼吸道等非淋巴器官内。免疫细胞主要分为淋巴细胞、巨噬细胞和抗原呈递细胞等。

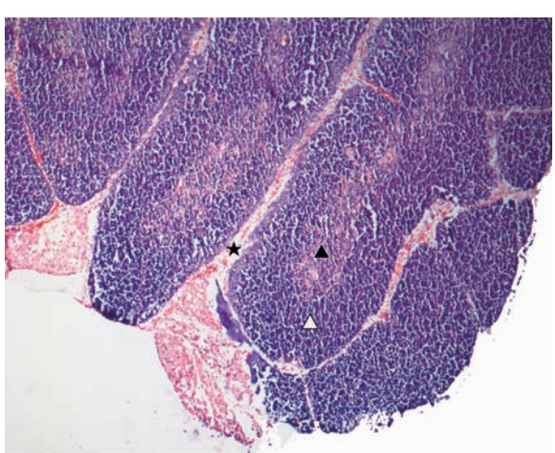


**图16–62　胸腺（10×5）**
胸腺是T淋巴细胞发育形成的场所。胸腺被小叶间隔（★）分隔为胸腺小叶，每个小叶包括皮质（△）和髓质（▲）两部分。

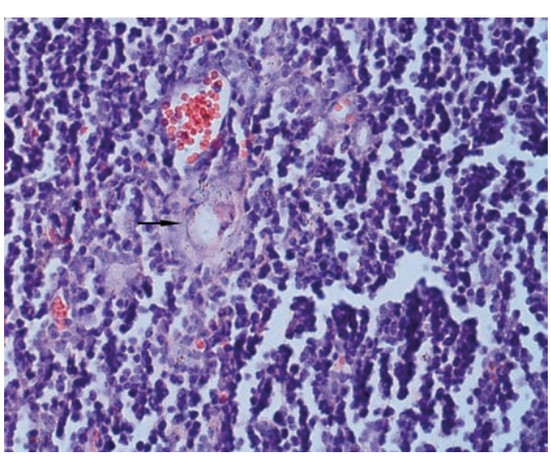


**图16–63　胸腺髓质（10×40）**
胸腺髓质中的胸腺小体（↑）是胸腺髓质的特异性结构。

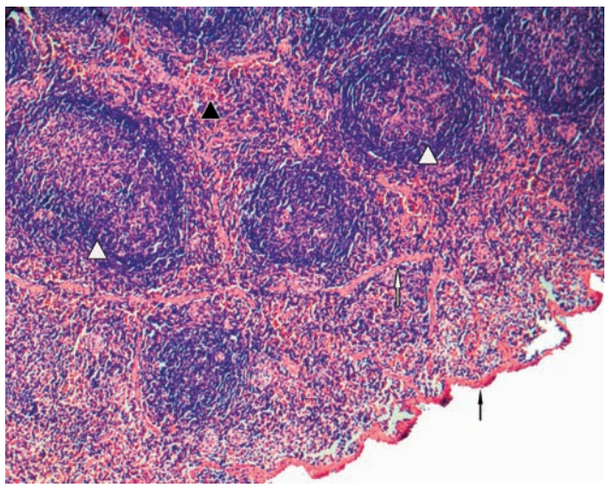


**图16–64　脾脏（10×5）**

脾在胚胎时期是造血器官，自骨髓开始造血后，脾变成为最大的淋巴器官。脾表面覆以被膜（↑），被膜结缔组织伸入脾内形成小梁，脾小梁（⇨）构成脾的粗支架。脾主要有红髓（▲）、白髓（△）构成。条索状的脾白髓染色为蓝紫色，其中可见淋巴小结。白髓间弥漫分布染色较红的是红髓。

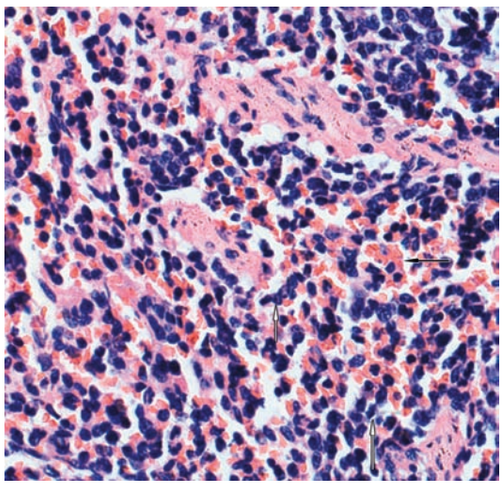


**图16–65　脾红髓（10×40）**

淋巴细胞稀疏，含红细胞较多，故着色红，其中大小不一的规则腔隙为脾血窦（↑），血窦之间为脾索（⇨），脾索互相通连成网。

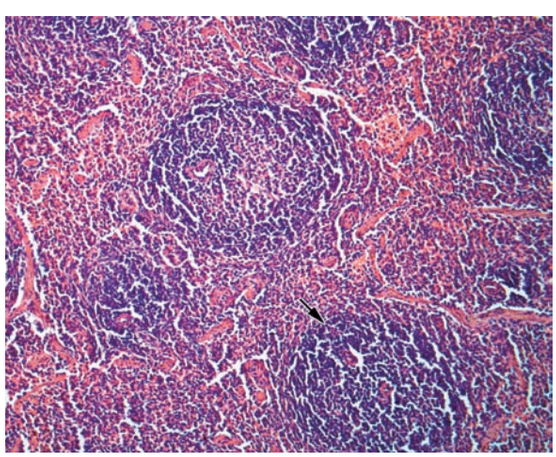


**图16–66　脾白髓及脾白髓淋巴小结（10×10）**

脾白髓分为：动脉周围淋巴鞘、淋巴小结（↑）和边缘区。淋巴小结即为脾小体，它的结构与性质和淋巴结内的相似。

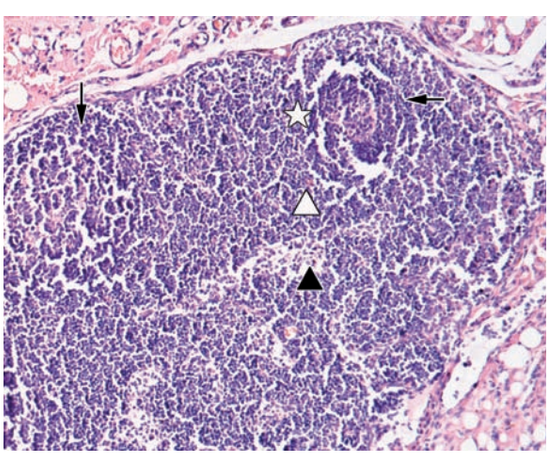


**图16–67　淋巴结（10×10）**

淋巴结分为皮质区（☆）、副皮质区（△）、髓质（▲）。皮质区含淋巴小结，也称淋巴滤泡（↑）。

## 第九节 肌肉、皮肤和脂肪

肌组织一般分为：骨骼肌、心肌和平滑肌，主要由肌细胞构成，含有少量结缔组织、血管和神经。骨骼肌一般借肌腱附着在骨骼上。心肌位于心脏和邻近心脏的大血管一段。平滑肌广泛分布于血管壁和内脏器官。

皮肤由表皮和真皮组成，并有毛、皮脂腺、汗腺和指（趾）甲等附属器。表皮是皮肤的浅层，由复层上皮组成。真皮位于表皮下方。真皮下方为皮下组织，一般由疏松结缔组织和脂肪组成。

脂肪组织由大量脂肪细胞聚集构成，主要分布于皮下、网膜和系膜。

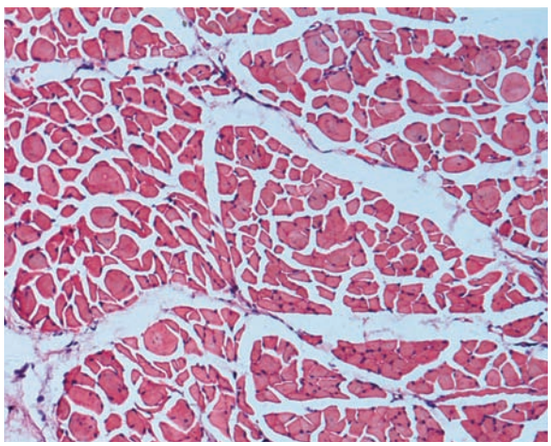


**图16–68　骨骼肌（10×5）**
骨骼肌横切面：肌细胞呈椭圆形，互相平行排列。每个肌细胞有多个细胞核，细胞核小，位于细胞周边。

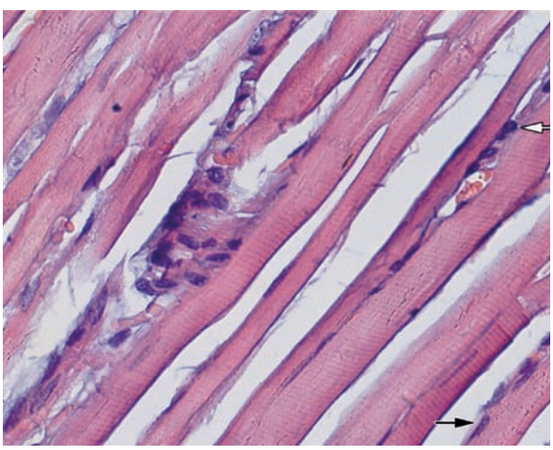


**图16–69　骨骼肌（10×20）**
骨骼肌纵切面，肌细胞可看见规则的明暗交替的横纹，肌细胞的细胞核（↑）呈扁椭圆形。染色深的为纤维细胞核（⇨）。

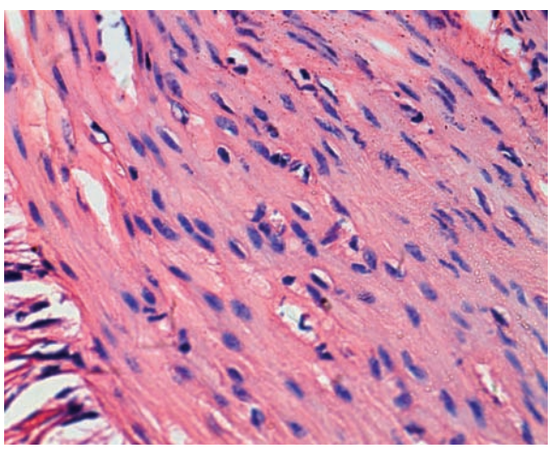


**图16–70　平滑肌（10×20）**
平滑肌纵切，肌细胞呈梭形，细胞核呈椭圆形，位于中央。

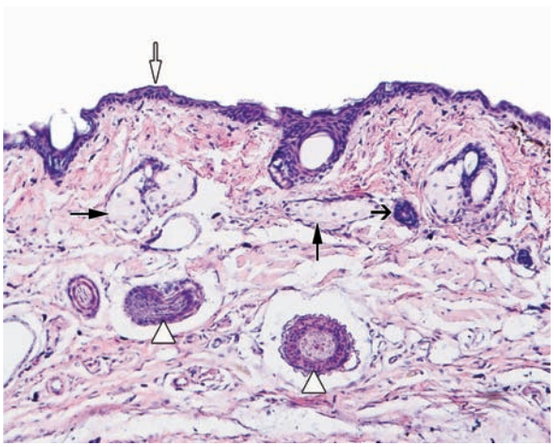


**图16–71　有毛皮肤，体皮（10×10）**

有毛皮肤表皮薄，上皮为复层扁平上皮（⇨）。真皮含毛囊（△）、皮脂腺（↑）和汗腺（↑）。

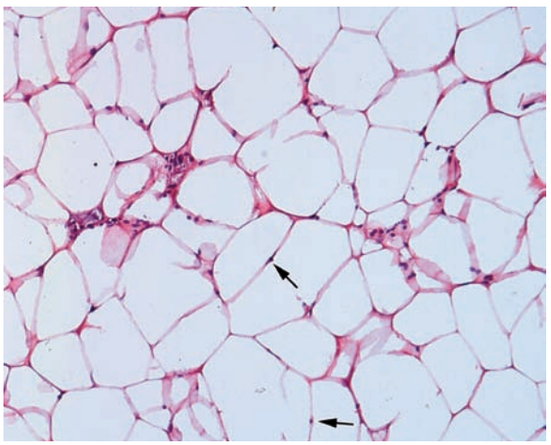


**图16–72　脂肪细胞（10×10）**

脂肪细胞胞质内含脂滴，成空泡样。脂滴外周是薄层细胞质，胞核（↑）扁平状，在细胞一侧。

## 参考文献

[1]彭燕章，叶智彰，邹如金，等．树鼩生物学．昆明：云南科技出版社，1991.
[2]杨举伦，等．实验猴正常组织学图谱．昆明：云南科技出版社，2007.
[3]莱斯利·P. 加特纳，詹姆斯·L. 西亚特．组织学彩色图谱（第四版）．史小林，翁静，等译．北京：化学工业出版社医学出版分社，2008.
[4]郭光文，王序，等．人体解剖彩色图谱（第二版）．北京：人民卫生出版社，2008.
[5]刘彤华，等．诊断病理学（第二版）．北京：人民卫生出版社，2006.
[6]李玉林，等．病理学（第六版）．北京：人民卫生出版社，2006.



# 第十七章

第一篇 树鼩基础生物学
TREE SHREW BASIC BIOLOGY

Tree shrews

# 树鼩生殖生理与辅助生殖

杨世华　张晓辉

## 第一节 树鼩生殖器官解剖结构及生理特性

### 一、雄性生殖器官解剖结构及生理特性

雄性树鼩的生殖器官结构和功能与其它哺乳动物基本类似，差别基本体现在大小、发育的时间、季节性等方面。

#### （一）雄性生殖器官解剖结构

雄性树鼩的生殖器官具有一般雄性动物的解剖结构特点，由性腺及附属器官（包括睾丸、附睾、精索及阴囊）、副性腺（包括输精管壶腹、前列腺和尿道球腺）和交配器官（阴茎、阴囊）组成。有关树鼩雄性生殖器官的研究开展较早，尤其在20世纪五六十年代。参照彭燕章等[1]编著的《树鼩生物学》（1991），以及陈北亨和王建辰[2]（2001）、叶智彰等[3]（1983）和杨增明等[4]（2005）的著作，本章节着重介绍雄性树鼩生殖结构特征，为人工选育、精液采集和交配能力的了解提供参考。

1. 睾丸（testes）、附睾（epididymis）和输精管（ductus deferens）

树鼩的睾丸同其它哺乳动物一样，成肾形或卵圆形。附睾分为头、体、尾3部分，附着在睾丸的一侧。附睾尾的末端连接输精管。受种系、性成熟和生殖季节的影响，成年树鼩睾丸大小有变化。张远旭[5]（2012）对生殖季节中人工驯化饲养的成年中缅树鼩的睾丸、附睾和输精管进行了详细的测量和称重，如表17–1所示，其中树鼩的睾丸重量占体重的比率为（1.05 ± 0.07）%，总体积为（1.12 ± 0.10）mL。

表17–1　树鼩睾丸和附睾解剖结构特征

| 特　　性 | 平均值 ± 标准差 | 变化范围 |
|---|---|---|
| 树鼩重量（g） | 141.0 ± 15.7 | 124.5 ~ 160.08 |
| 两侧睾丸总重量（g） | 1.49 ± 0.23 | 1.117 ~ 1.73 |
| 睾丸重量与体重比率（%） | 1.05 ± 0.07 | 0.95 ~ 1.09 |
| 左侧睾丸重量（g） | 0.75 ± 0.13 | 0.517 ~ 0.88 |
| 右侧睾丸重量（g） | 0.74 ± 0.11 | 0.60 ~ 0.85 |
| 两侧附睾头总重量（g） | 0.19 ± 0.01 | 0.14 ~ 0.21 |
| 左侧附睾头重量（g） | 0.09 ± 0.01 | 0.07 ~ 0.11 |
| 右侧附睾头重量（g） | 0.10 ± 0.02 | 0.07 ~ 0.11 |
| 两侧附睾尾和输精管总重量（g） | 0.15 ± 0.01 | 0.14 ~ 0.16 |
| 左侧睾丸横截面长度（cm） | 1.93 ± 0.17 | 1.7 ~ 2.15 |
| 右侧睾丸横截面长度（cm） | 1.91 ± 0.19 | 1.75 ~ 2.10 |
| 左侧睾丸横截面宽度（cm） | 0.68 ± 0.05 | 0.60 ~ 0.75 |
| 右侧睾丸横截面宽度（cm） | 0.70 ± 0.06 | 0.60 ~ 0.75 |
| 两侧睾丸总体积（mL） | 1.12 ± 0.10 | 0.90 ~ 1.30 |
| 左侧睾丸体积（mL） | 0.56 ± 0.09 | 0.45 ~ 0.65 |
| 右侧睾丸体积（mL） | 0.56 ± 0.09 | 0.45 ~ 0.65 |
| 精子总数（$10^7$个） | 6.32 ± 2.68 | 2.2 ~ 8.8 |
| 精子运动度（%） | 68.8 ± 3.9 | 60 ~ 75 |
| 精子顶体完整率（%） | 90.0 ± 2.1 | 86 ~ 93 |

据罗其胜[6]（1984）的资料，计算树鼩睾丸重量与体重比值为0.07 ± 0.01，与张远旭等[5]（2012）的研究结果差异较大。但是这个比值范围相似于Harcourt等（1981）所测的33种灵长类中单雄交配系或单雄繁殖系种类的比值。这就表明我国中缅树鼩也应属于单雄交配系的社会结构，似乎与Kawamichi等[7]（1982）对马来西亚树鼩（*T. glis*）社会结构的研究结果基本相一致。

树鼩的输精管全长在15mm左右，直径约1mm；其达到膀胱后壁精囊腺腹内侧时明显地膨大和管壁增厚，直径达2mm，成为射精管壶腹（ampulla ductus deferentis），与Collins等（1982）对缅甸树鼩的叙述相同，而与在印度树鼩所述的情况相反，即输精管不被前列腺所包裹[8]。

2. 阴囊（scrotum）

阴囊非悬垂状，位于阴茎前面，故有前位阴囊或阴茎前位（prepenial position）之称，被毛相对较腹部稀少；正中缝际从阴囊包皮开口后缘直延续到肛孔边缘，长约26mm。

阴囊的形状是多变的，因为它与睾丸下降及其发育密切相关。据Luckett（1980）等[9]对缅甸树鼩的繁殖和个体发育研究表明，腹股沟管明显地存在于整个生活时期，且在重压和惊吓等应激条件下，可发现睾丸通过明显的腹股沟管缩入腹腔。

睾提肌（cremaster）较发达，具有通常的3个起点，但以耻骨上缘起点的纤维较少。可能在受到外界刺激如恐怖、愤怒等时候，睾丸借睾提肌可自由地由阴囊缩回到腹股沟环。

3. 精囊腺（glandula vesiculosa）、前列腺（prostata）和尿道球腺（glandula bulbo–urethralis）

树鼩的精囊腺、前列腺和尿道球腺与其它哺乳动物的分布类似。树鼩精囊腺的平均重量为（0.19 ± 0.04）g[6]。根据中缅树鼩标本测量，精囊腺体长9mm，宽5mm，厚4mm，位居前列腺颅

侧，输精管盆段背外侧和直肠腹面两侧。它为分叶状的囊状体，被结缔组织所包裹和分隔。腺体为一整块，只有主管一个开口，不像在印度树鼩和笔尾树鼩中分成前和后部以及分别开口，也不像在印度树鼩中后部被前列腺包着[10]。主管开口于射精管壶腹后端，两主管合并成为射精管（ductus ejaculatorius），行程约2mm，开口于精阜侧面。

中缅树鼩前列腺体平均重量为（0.10 ± 0.03）g[6]。树鼩的前列腺位于尿道背侧，不包围尿道、射精管和精囊腺，形状和大小多变，为一坚实的腺体。可分为小的前叶（颅侧叶）和大的后叶（尾侧叶），前者位于射精管背侧，后者在前者尾侧；不存在前列腺囊（uterus masculinus）。

树鼩尿道球腺的固定标本观察，其呈扁平的三角形或呈球形，底边长约5mm，高约6mm，位于尿道膜部两侧和直肠腹外侧，开口于尿道海绵体始端。在笔尾树鼩中，略呈扁平的卵圆形，长约3.5mm。

4. 阴茎（penis）

成年树鼩阴茎解剖结构观察，其自尿道球开口处至阴茎端部长约34mm，其中包皮反折处至端部约占一半（15mm），完全被阴囊皮肤所包。阴茎经附睾尾部之间沿睾丸尾侧转向前，从阴囊尾侧壁穿出。阴茎呈圆柱形，直径（在包皮根部处）约4mm，向端部逐渐变尖，其尖端直径约1mm。尿道外口呈横裂，开口于距尖端约1mm处腹面。强的阴茎提肌止于阴茎体腹面约1/3处。包皮腺（preputical gland）位于阴茎尖端两侧，长约6mm。经切片检查缺乏阴茎骨或软骨条。距阴茎端部7mm处背腹面稍变扁平，似乎是龟头，但无明显的冠状沟。

### （二）雄性生殖组织细胞结构特征

1. 精子（sperm）

树鼩精子形似蝌蚪，在电镜下可看到树鼩精子由头和尾组成，其尾是精子最长的一个部分，可分成3段，即：尾中段、尾主段和尾末段，其整个精子全长为（73.05 ± 1.10）μm，头部长宽比为1.14 ± 0.03，表面光滑图（17–1A和表17–2）。整个精子由质膜包裹着，其中在头部的顶体区域内的质膜的连接呈现松弛状态；精子的头部呈现圆形或卵圆形，由核、顶体和后顶体鞘组成；顶体和核之间有一个小的间隙叫顶体下间隙；核是精子头部的主要组成部分，占据精子头部的绝大部分体积，并且由核膜包被着，其电子密度大而均匀；核膜的外面是顶体，其电子密度小而均匀；由头的后端向前端，核膜逐渐变薄，在赤道段区域最坚固，在头部前端最薄（图17–1C、D）[5]。

表17–2　中缅树鼩精子细胞的形态测定参数

| 测量参数 | 树鼩精子细胞（$n$=50） |
|---|---|
| 精子全长（μm） | 73.05 ± 1.10 |
| 头部长度（μm） | 6.65 ± 0.26 |
| 头部宽度（μm） | 5.82 ± 0.36 |
| 头部长/宽比率 | 1.14 ± 0.03 |
| 尾部中段长度（μm） | 13.39 ± 0.81 |
| 尾部中段宽度（μm） | 0.84 ± 0.03 |
| 尾部主段长度（μm） | 52.35 ± 0.93 |
| 尾部主段宽度（μm） | 0.66 ± 0.02 |
| 尾部末端长度（μm） | 1.48 ± 0.23 |

在头部核的末端有一个凹面植入窝，与精子颈部的小头嵌合，以便加强头与尾的连接；接着便是精子的颈部，又称为连接段，其颈部由小头、节柱和近端中心粒组成；小头有一个凸型的致密的纤维板结构，与核末端的植入窝的基板线相吻合；稀疏的、适度的电子致密物质填充在基板线和小头的间隙里；近端中心粒位于小头下方的轴丝的45° 方向；颈部主要起着连接精子头和尾的作用（图17–1C）。

尾是精子最长的部分，它主要由轴丝和外致密纤维组成；轴丝起于精子颈部，延伸至尾部末段；轴丝由9对双联体的周围微管和1对中央微管组成，9对双联体的周围微管均匀地环绕在中央微管的周围，形成了“9+9+2”的微管构造；每一对双联体均由一个小的圆柱状微管和一个不完整的C形微管组成；从中心微管到周围微管呈现放射状延伸，其一对中心微管由一个短桥连接。在尾部的中段和主段，轴丝均有9根外致密纤维环绕，每一根外周密纤维伴随着一对双联体微管；纤维的横截面呈现花瓣状、黄豆状或圆形。以中心微管的轴丝为基准将外周密纤维按顺时针方向编号1～9，结果发现外周致密纤维的大小呈现不同：在尾部中段，1、2、5、6这4根外周致密纤维明显比其它6根外周致密纤维粗；在尾部

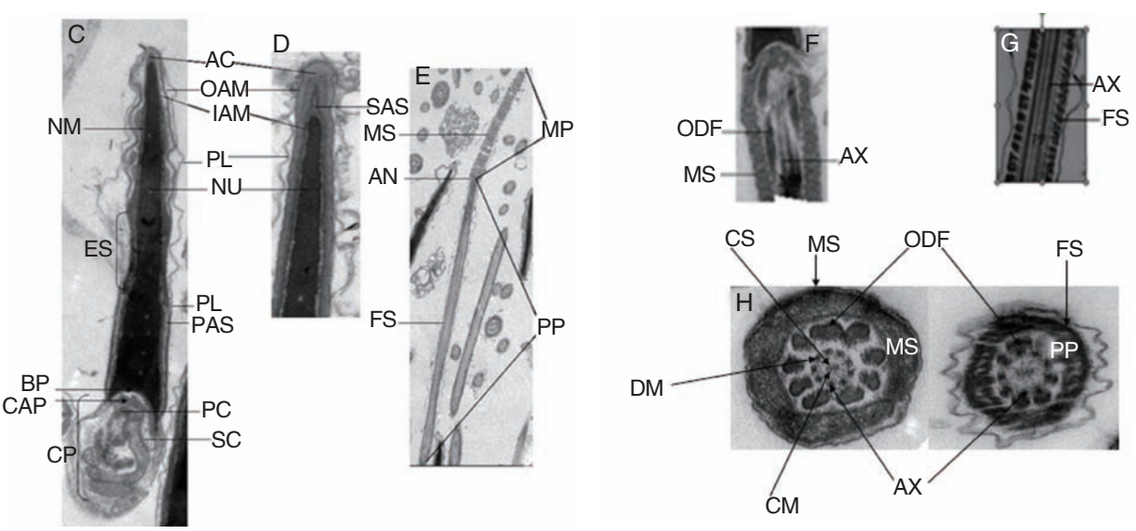



**图17–1　树鼩精子的形态结构**

（A）整个精子外部形态的扫描电镜图；（B）精子头部形态的扫描电镜图；（C、D）精子头部的透射电镜超微结构图；（E–G）精子尾部中段和主段的射电镜超微结构；（H）精子尾部中段和主段线粒体的透射电镜超微结构图。HD：头部；MP：尾部中段；PP：尾部主段；EP：尾部末段；AC：顶体；OAM：顶体外膜；IAM：顶体内膜；PL：质膜；NU：核；NM：核膜；ES：赤道板；PAS：后顶体鞘；BP：基板；CAP：小头；CP：颈部；SAS：顶体下间隙；PC：近端中心粒；SC：节柱；MS：线粒体鞘；AN：终环；AX：轴丝；FS：纤维鞘；ODF：外周致密纤维；CS：中央鞘；CM：中央微管；DM：双联体。

主段，1、5、6这3根外周致密纤维明显比其它外周致密纤维粗；尾部中段和主段的外周致密纤维的粗细也不一样，在靠近颈部的尾部中段的外周致密纤维最粗，在靠近尾部的末段的主段的外周致密纤维最细（图17–1E–H）。

在尾部中段，外周致密纤维由线粒体鞘环绕；在尾部主段，外周致密纤维由纤维鞘环绕。在尾部中段，线粒体呈现头尾相接而形成一个螺旋环绕着致密纤维；树鼩精子的线粒体螺旋数为4~8个；在线粒体鞘的末端有一个环，呈现三角状，将质膜的基底和向内突出的致密纤维的顶端连接起来；环位于螺旋状线粒体的末端和主段纤维鞘的前端之间，作为中段和主段的分界线。纤维鞘从精子的主段延伸到末段，其电子密度高，且越靠近末端的纤维鞘越细，直至消失；纤维鞘由背侧纵柱、腹侧纵柱及其连接这两个纵柱的环形肋柱组成，且这两个纵柱似乎固定在外周致密纤维3和8上；纤维鞘的作用可能是调整精子尾摆动的平面（图17–1E–G）。

2. 精子发生

新生树鼩的精索由外围的支持细胞和中心的精原细胞组成。在刚出生时，精原细胞的有丝分裂指数非常低，到第20天时有丝分裂达到顶峰。之后，胎儿期形成的睾丸间质细胞开始退化。伴随着分化的睾丸间质细胞再现和首次增加的雄核发育的出现，在第30天有丝分裂指数再次回到低水平。有丝分裂和雄激素功能的负相关表明精原细胞的增殖并不需要高浓度的雄激素或者高浓度的雄激素对睾丸间质细胞的有丝分裂有所抑制。后来的精原细胞的有丝分裂发生在升高的睾酮水平期间并且首次的精子发生的时间将与出现睾酮峰值时间相一致。这就表明雄激素或许特异地参与精子发生过程中。在睾酮水平下降过程中，精子发生将完成[11]。

成体树鼩的睾丸中精子发生的细胞学和动力学与灵长类动物类似[11]（图17–2）。树鼩精原细胞可区分为A型和已分化定向的B型。生精上皮周期可分为12个连续阶段，不同阶段典型的细胞组合可被辨认[12]。树鼩各阶段中的相对持续时间以阶段Ⅴ、Ⅵ、Ⅶ的比率最高，分别为11.43、18.88、15.44；阶段Ⅸ、Ⅹ最低，为3.78和3.87。A型精原细胞在各阶段的数量分布并不保持恒定，阶段Ⅵ~Ⅶ和阶段Ⅸ时，分别出现两次成倍增长。B型精原细胞和前细线期精母细胞与每100个足细胞之比的平均值，在阶段Ⅰ、Ⅴ、Ⅶ分别为28.89、76.98、196.99。精细胞经12步变态为成熟精子。精子形成过程中顶体发育的形态学变化及成熟精子的形态，与灵长类动物相比具有较多的类似之处，而同啮齿类动物相比，存在明显的形态差异，表明树鼩适合于创建研究灵长类内分泌调控精子发生的良好动物模型。

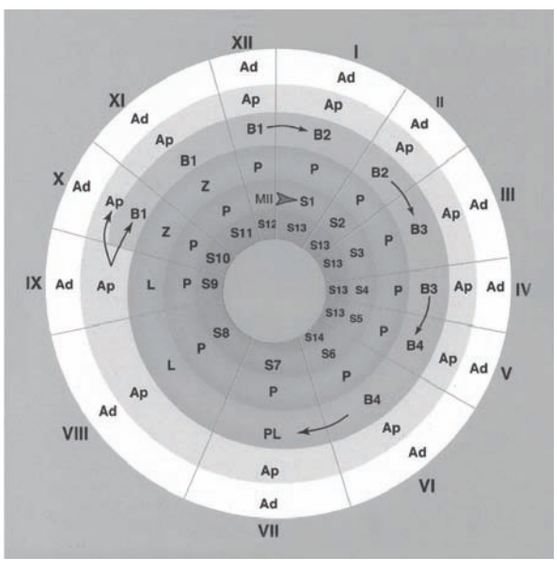



**图17–2　灵长类动物生精上皮发育周期的缩略图[13]**

图17–2描述了Ⅰ~Ⅻ型的精原细胞发育的各个时期。圆周代表时间，宽度比例表示每一部分每个时期细胞所持续的时间。颜色逐渐加深代表了精子发生过程中各细胞的成熟度。精子发生于Ⅸ时期启动，此时约有半数的Ap精原细胞分裂和产生第一代B型精原细胞（B1）。同时，其余部

分Ap精原细胞也分裂并产生相同的Ap精原细胞，从而更新了这些干细胞的库存数量。精子发生终止于Ⅵ期，S14精子细胞被释放到曲精小管内。Ad为暗A型精原细胞，Ap为灰亮A型精原细胞，B1～B4为B型精原细胞的4个时代，PL为前细线期初级精母细胞，L为细线期精母细胞，Z为偶线期精母细胞，P为粗线期精母细胞，MII为减数分裂的完成时期，S1～S14为精子形成过程中的14个阶级的精子细胞。箭头指针和箭头分别表示有丝分裂和减数分裂的完成。

对野生成体树鼩在不同季节的睾丸精细小管发育和生精上皮细胞进行观察，结果发现精小管平均直径的最大值出现在4月份，约为205.7μm；最低值出现在10月份，约为88.4μm。1、4月份的生精上皮表现了高度活跃的精子发生，出现了12个连续阶段精子成熟过程中各种细胞。生精上皮退行性变化最早出现于7月份，8月份进一步发展，10月份退化最明显[14]。附睾精子数量亦表现了类似的季节性波动。表明树鼩精子发生的活性期始于仲冬，最盛在春季，退行期始于仲夏，秋季处于非活跃时期，呈现明显的精子发生与成熟的季节性周期变化。

有研究指出雄性树鼩从出生到性成熟过程中，从出生到第30天来自胎儿时期睾丸和肾上腺迅速退化，之后出现低水平睾酮，并缓慢上升到最终出现睾丸的分化和附属性器官的形成。睾酮峰值的出现与睾丸和附属性器官快速生长的启动和分化相关，睾丸下降、阴囊的发育和显著身体体重增长曲线相关（表17–3）。青春期雄性快速生长有利于模拟这种物种的两性异形的程度，青春期的到来伴随着精子发生和附属性器官的功能分化的完成。出生后的树鼩的发育与一般灵长类类型相致。这种性腺器官发育与青春期内分泌的精确相关性使树鼩成为研究灵长类青春期一个有用的小的动物模型[15]。

表17–3　睾丸、附属性器官、第二性征、垂体的产后发育[15]

| 年龄（d） | 阴囊长度（mm） | 睾丸下降 | 阴茎长度（mm） | 睾丸容量（$mm^3$） | 附睾重量（mg） | 垂体重量（mg） |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | N. D. | – | 4.03 ± 0.16 | 3.82 ± ± 0.24 | 3.47 ± 0.71 | 1.53 ± 0.08 |
| 10 | N. D. | – | 5.07 ± 0.62 | 4.77 ± 0.08 | 4.27 ± 0.20 | 2.40 ± 0.15 |
| 20 | N. D. | – | 6.35 ± 0.85 | 5.07 ± 1.08 | 8.20 ± 2.78 | 2.57 ± 0.22 |
| 30 | N. D. | – | 8.10 ± 0.40 | 4.56 | 7.60 | 3.80 |
| 35 | N. D. | – | 8.17 ± 0.40 | 6.96 | 14.50 | 4.60 |
| 40 | 8.40 ± 0.50 | – | 8.40 ± 0.60 | 10.89 | 47.00 | 4.10 |
| 50 | 9.36 ± 0.39 | + | 9.43 ± 0.70 | 30.69 | 28.30 | 3.90 |
| 69～70 | 11.93 ± 0.59 | + | 11.63 ± 0.63 | 82.54 ± 7.98 | 50.90 ± 2.00 | 6.30 ± 0.30 |
| 80～83 | 12.65 ± 0.65 | + | 11.60 ± 1.70 | 100.69 | 68.30 | 5.20 |
| 90～91 | 12.80 ± 0.30 | + | 10.40 ± 0.30 | 130.90 | 82.75 ± 6.75 | 5.45 ± 2.25 |
| ＞120 | 15.08 ± 0.96 | + | 12.00 ± 0.12 | 301.07 ± 35.04 | 145.07 ± 8.97 | 5.70 ± 0.40 |

## 二、雌性生殖器官解剖结构及生理特性

野外雌性树鼩（*Tupaia belangeri chinensis*）具有明显的怀孕季节[16]。在实验条件下驯养的树鼩可见常年怀孕现象，但是在非生殖季节的中期怀孕率和产仔率很低。在笼养条件下，树鼩的妊娠期均为41～50天[9, 16]，树鼩性成熟期约为3～6月龄[9, 17, 18]。在树鼩研究的早期，已经对雌性生殖器官解剖学和组织学结构特征进行了比较系统的研究，尤其在子宫胎盘形成和发育方面比较全面，因此，本节采编了《树鼩生物学》第一版[1]中介绍雌性树鼩生殖器官组织解剖学的特征内容。

雌性生殖器官解剖结构和组织学特征：

雌性树鼩的生殖器官同其它哺乳动物一样，有卵巢、输卵管、子宫、阴道等。雌性树鼩的子宫为双角子宫，卵巢外有包膜，卵母细胞富含色素，卵母细胞的透明带与质膜的韧性较大[19]。树鼩卵巢和输卵管除具有哺乳动物（包括人类）的相似结构外，尚有其结构特点，如其卵巢被膜向实质呈切迹状凹陷，原始卵泡数目少，在白膜下几乎均呈单排，透明带厚，初级与次级卵泡形成的闭锁卵泡明显增多，间质腺罕见和髓质内有被覆单层柱状上皮的管道等[20]。

1. 卵巢（ovary）

卵巢是雌性动物的主要生殖器官，具有产生配子和分泌生殖激素的作用。

成年树鼩卵巢的平均重量为（9.48 ± 1.98）mg[6]。卵巢大小与动物年龄、生殖周期等有关。在一个妊娠标本测得树鼩卵巢长3mm，宽2mm，被子宫阔韧带所包，且被卵巢固有韧带附于子宫角近端部。卵巢位于子宫角端部后尾侧约2mm处。卵巢悬韧带向前达肾，附于腹背侧壁。输卵管呈卷曲状，当拉直时，长约1cm，连于子宫角。

卵巢位于由两层浆膜围成的腹膜囊（卵巢囊）内，略呈扁长椭圆形。在光、电镜观察下，卵巢表面均可见多少不等深浅不一的切迹状凹陷，有的卵巢呈明显分叶状，在卵巢矢状面切片标本上，卵巢囊内可见卵巢和输卵管伞的断面，卵巢明显可分被膜、皮质和髓质3部分。被膜是由被覆卵巢表面的单层柱状或立方上皮构成。卵巢上皮细胞游离面有长短、多少不等的微绒毛，其深面为致密结缔组织（白膜）。皮质较厚，位于卵巢实质的外周部，由不同发育阶段的卵泡和大量紧密排列的梭形纤维细胞以及少量平滑肌等组成。髓质居实质中央一个狭小部位，为内含有丰富血管的较致密结缔组织构成，其中有排列不规则的被覆单层柱状上皮的小管，并与卵巢门进入的相同结构的小管相续[20]。

树鼩卵巢的皮质内可见原始卵泡，居白膜下方，几乎均呈单排与卵巢表面平行排列。原始卵泡数目较少，是由居中央的初级卵母细胞和其外周的卵泡细胞组成。初级卵母细胞呈圆形，核大而圆，核仁清楚，胞质嗜酸性，内含有丰富的核糖体和线粒体以及高尔基复合体等细胞器，卵泡细胞为略呈扁平的单层细胞组成[20]。在原始卵泡深面可见不同发育阶段的初级和次级卵泡，初级卵泡的卵母细胞变大，胞质内核糖体和线粒体增多，特别是线粒体成群分布尤为明显，卵泡细胞变多层（颗粒层），在卵母细胞与其卵泡细胞间，显出嗜酸性较厚的透明带，电镜下可见初级卵母细胞的微绒毛和颗粒层细胞的突起伸入透明带内，在初级卵泡周围成纤维细胞密集成卵泡膜[20]。次级卵泡由初级卵泡发育而成，可见卵泡腔、卵丘、放射冠以及卵泡膜内、外两层等结构。皮质内有较多由初级和次级卵泡形成的闭锁卵泡，罕见间质腺存在[20]。树鼩卵巢的间质腺组织稀少，但普遍有“睾丸素”型的髓质索结构。原始卵泡、初级卵泡、次级卵泡和囊状卵泡（包括近成熟卵泡）等各级卵泡的生长，如同典型的哺乳类动物所有的过程，正在生长中的次级卵泡和中等大小的囊状卵泡，卵泡内膜有丰富的血管和淋巴管。卵泡的内外层分明，内膜细胞和卵泡中的颗粒细胞的有丝分裂现象明显。接近成熟的卵泡直径可达876.93 μm，卵泡内膜较狭窄并有分化成膜腺的细胞层，近成熟或成熟的卵泡腔很大，不同程度和不同阶段的闭锁卵泡及闭锁体均可见到，放射冠外层（次级卵泡）和卵泡腔边缘区（囊状卵泡）的颗粒细胞的核固缩和核崩解或卵母细胞的早期退化，是卵泡闭锁最早出现的变化[21]。

怀孕期黄体较大，有丰富的血管，中间有小腔。多角形的颗粒黄体细胞大而浅染，有圆形的核和富含脂滴的胞质，细胞之间以多种形态相连，呈不规则排列，充分显示类固醇激素分泌活性细胞的特征。有的卵巢有来源于未破裂的闭锁卵泡的副黄体（accessory corpus luteum）结构，副

黄体的直径很小并可见退化透明带残体，副黄体腔中松散排列着少量体积增大的颗粒细胞，它们呈多种形态，有的有卵圆或圆形的核，这些细胞呈现旺盛的分裂活动，胞质中的脂滴积聚尚不十分明显，它们有别于一般卵泡的颗粒细胞，而类似于早期发育的真黄体的颗粒细胞，表现正在黄体化的转变之中[21]。

2. 输卵管（oviduct）

输卵管介于卵巢和子宫角之间，呈卷曲状盘绕在卵巢表面。光镜观察在输卵管不同部位横断面切片标本上，输卵管管壁从内向外均可分为黏膜、肌膜和浆膜3层，黏膜面有丰富皱褶，近伞部最发达，黏膜上皮是由一层纤毛柱状细胞和分泌细胞组成。纤毛柱状细胞，核呈卵圆形，着色淡，居细胞近顶部，这种细胞以漏斗处居多，分泌细胞核位于细胞近基部，胞质和核均较纤毛细胞着色深。固有膜由含丰富血管和少量平滑肌的致密结缔组织构成，肌膜为内环行、外纵行平滑肌组成，漏斗部肌膜最薄，只有环肌而无纵肌，浆膜由间质和富有血管的疏松结缔组织组成[20]。

3. 子宫（uterus）

树鼩的子宫为双角子宫，可分成子宫角、子宫体和子宫颈3部分。未妊娠时，其长度分别约为7mm、4mm、5mm；当妊娠时期（怀孕4个胎儿），分别约为10mm、4mm、4mm。子宫体的正中轴与子宫角的长轴之间的夹角约30°，故两子宫角间之夹角约60°。子宫体与子宫颈之间，由于后者呈圆锥状，凸入阴道内而形成阴道穹窿，具有明显的收缩界线。子宫颈外口呈纵裂，前穹窿较后穹窿深得多。树鼩的子宫体相对十分短小，而长的子宫角逐渐变细成输卵管。子宫的组织结构从出生到性成熟以及怀孕过程中发生较大变化。

（1）子宫发育的组织学特征

在出生后约12天时，树鼩子宫内膜出现两个特征带：①子宫中膜和反中膜表面所产生的短而直的管状腺体出现在第3层内膜的浅面；②游离腺体子宫的内膜嵴占据了子宫中膜的侧壁或正中壁并膨胀突出子宫腔。实际为双侧内膜嵴的这些子宫嵴膜几乎扩展至整个子宫角，其形状似蘑菇[22]。子宫内膜嵴上皮之下为密集的袋状细胞组成的基质带，而内膜嵴基部和子宫中膜及反中膜的基质较为疏松。柱状上皮细胞衬于内膜嵴之下。在刚出生的幼仔的子宫角中也能看到内膜嵴，但此时没有子宫腺体形成。

约在50日龄时，子宫腺扩展于子宫内膜。虽然此时螺旋形腺体管已能在子宫腺下的基质中看到，但子宫腺体仍保持游离。这些基础腺体此时曲绕内膜嵴进入子宫腔。子宫腺的外部形态仍和早期相似。

性成熟树鼩在动情周期排卵前，子宫腺的卷曲缓解，且游离腺体的子宫内膜嵴不再突入子宫腔；邻接的腺体内膜的增殖与侧壁的厚度相关。分娩后的动物中，在子宫肌层和嵴的基部之间供应内膜嵴的小动脉是呈明显螺旋状的，而在内膜嵴的小动脉稍呈或不呈螺旋状。

（2）怀孕期子宫发育和胎盘及胎儿发育

①胚胎植入前期子宫组织结构

树鼩胚胎植入前期大约是在受精后6天左右[23]。进入子宫的囊胚分布于子宫角中间区域时，内层细胞群约3～4个细胞厚，尚无Rauber氏层覆盖内层细胞群。随游离囊胚的扩展，其透明带消失。单层囊胚在子宫角中部发展为双层囊胚时，滋养层的立方体上皮细胞的厚度比早期减少。Rauber氏层已完全发育，鳞状的内胚层形成囊胚腔的一连续内衬。

在囊胚从输卵管进入子宫的过程中，子宫腺体变得更卷曲。它们能螺旋围绕膨胀的双层囊胚。子宫内膜嵴基质仍保持早期阶段的密集的袋状细胞形态，尽管一些基质细胞在囊胚膨胀时有

明显的水肿。

总的说来，树鼩的双层囊胚的出现非常相似于其它物种的膨胀植入前的双层囊胚，如小鼠和大鼠等[24, 25]。腺体分泌物在子宫腔和子宫角都很丰富，大量的分泌物围绕囊胚表面而并被吸收。

②怀孕早期子宫的发育

在受孕约7天后，双层囊胚开始植入。子宫腔被两正中膜、游离腺体和长的内膜嵴分开成为反中膜部分，形成含有囊胚的植入腔，并形成裂缝样的子宫腔中膜的残余。在子宫腔的这两部分之间，并列的子宫内膜嵴的上皮表面是平滑的并相互连接一相当长度。子宫内膜腺体进入反中膜部分[23]。

囊胚的表面是平滑的。滋养层被其外胚及圆盘状区牢固缚于并列的子宫内膜嵴平滑的反中膜表面上皮。双层囊胚的开始附着伴有滋养层的立方体细胞层和双侧子宫内膜嵴上皮的直接附着生长。随滋养层附着后，附着区增殖形成2～6个细胞。此时，虽然多层细胞的滋养层附着于子宫上皮，但上皮细胞仍保持完好。这两类细胞的区分可根据其核的特征。滋养层细胞核稍大，含1～2个位于中心的核仁。核内可见分散的染色质，但常为开放的或管状的。子宫上皮细胞核为球状，含很小的核仁。核质均匀，显碱性。

植入的早期阶段，子宫角的上皮产生不规则的浅小窝。子宫腺体（除了内膜嵴的）进入这些浅窝，但子宫上皮仍未出现明显的分裂。在植入的稍后阶段，产生明显的“着床斑”（attachment plaques），约100μm厚，含有多层的附着滋养层和几乎完整的子宫上皮。滋养层和上皮细胞核仍保持上述基本特点，两种细胞间仍存在质膜。

当着床斑增至130μm厚时，大量的圆齿状密集核出现于滋养层和子宫上皮。这有可能是出现了子宫上皮细胞的退化。着床斑的滋养层和子宫上皮层部分出现辐射状，可能是早期着床时滋养层和不规则的上皮细胞间的交叉反应。

植入早期囊胚没有明显的原线期情况。在囊胚的中膜中间，被一薄的、均匀的嗜酸性层把滋养层和内胚层分开，类似于啮齿类、鼩鼱和一些蝙蝠的赖歇特氏层（Reichert lamina），只是没有树鼩的那么厚。在囊胚附着初期，子宫内膜嵴基质出现水肿。基质的一薄层上皮之下的带更为致密，这可能是囊胚膨胀的缘故。植入早期没有出现脱膜反应。

③原线期

约在受孕后的7～9天。增厚的着床斑内子宫上皮已不存在或留有很少的痕迹。着床斑此时包含两个明显的带：a．内层的2～5个细胞厚的滋养层带，被赖歇特氏膜（Reichert membrane）与内胚层分开。此带内存在分散的有丝分裂现象，细胞与早期植入阶段相似。b．母体基质之上的巨细胞滋养层带。至少存在一些多核的巨细胞，但质膜把这些相互邻接的多核巨细胞群分开，其间没有发生有丝分裂。巨细胞内致密胞质呈嗜碱性，其核大小为滋养层细胞的2倍。

在植入早期覆盖内膜嵴的子宫上皮基膜仍然存在，此时出现在附着滋养层的完整的反中膜和中膜边缘之下，并继续与紧连着床斑的子宫上皮基膜连接。在着床斑中部的基膜不完整，这是由于多核巨细胞侵入的结果。在附着区的两边，滋养层巨细胞的楔状突起似把子宫上皮与其下的基膜分开。

子宫内膜嵴基质由大量膨大的封闭袋状的、具嗜碱性胞质的上皮脱膜细胞组成。这些脱膜细胞具管状核，有1～2个明显的核仁。脱膜细胞一接触滋养层即发生变化。其胞质更偏碱性，核内增加了染色质的量。这些染色质群将附着于下一个核膜。质膜增加，很难区分环绕的单个巨大基质细胞；在脱膜细胞与滋养层的边缘出现多核群。有丝分裂常常出现于密集的脱膜细胞，但在薄的未变化的基带和水肿较重的基质中有丝分裂很少。

在此阶段基质没有明显的血岛形成。赖歇特氏膜仍由稍薄的染色均匀的紧贴于反中膜滋养层下的基膜和胚胎外胚层组成。这说明胚胎体外的中胚膜同时把滋养层和赖歇特氏膜与内胚层分开，并提示了树鼩的囊胚由大量的滋养层基膜组成，与鼩鼱科中的情况相似[26]。

④绒卵胎盘的发育

约在受孕的9天前后，绒卵胎盘开始发育。胚胎从4原节发育至12～13原节。4原节的胚胎有神经套、前索结、原线、脊索盘（包括胚胎内胚层）、背侧主动脉、心脏管、胚腔、分节和未分节的胚胎中膜。前部末端比胚胎体外胚层稍高，羊膜尚未开始形成[23]。

胚胎发育至6原节时，可看到无血管的3层脐膜覆盖着内膜嵴的反中膜表面，而嵴的其余部分被双层脐膜覆盖。原线期巨细胞此时明显减少，仅在多核滋养层和脱膜细胞间存在散乱的巨细胞。少数巨细胞陷入脱膜带，但在滋养层中尚未出现这种明显的陷入。

脱膜细胞出现大量的有丝分裂。一些紧连滋养层的脱膜细胞形成合胞的“脱膜结”（decidual knots）。脱膜结由一外围的核环和一中心的细胞质核心组成；脱膜结核含有丰富的外周染色质群。脱膜结大多与附着滋养层紧密相连，但有时也可在内膜嵴的深部发现。

初期胎盘在血管中胚层扩展进入其反中膜区时出现3个明显的带：a．在胎盘的胎儿表面的内滋养层带，由一薄的滋养层组成。通常此滋养层被母体毛细血管围绕。致密核的、不规则的突起从滋养层进入脱膜成为原始绒毛，并出现融合现象。常有一个或数个巨细胞出现在植入的原始绒毛中心，但它们几乎完全被很小的核包围而不清楚。许多原始绒毛完全或部分被脱膜结围绕。b．大量的和更加发展的脱膜结特征带。脱膜与原始绒毛紧紧连接和原始绒毛与脱膜混合。肥大的脱膜结核外周呈半圆或圆形，中心由嗜酸性细胞质组成。球状核的最大直径可达30μm。c．相对正常的基础脱膜。它是与平的子宫腺体分开的，衬于胎盘之下的，一薄层典型的纺锤形基质细胞。有丝分裂大量出现于基础脱膜中，但在脱膜结中仍未发现。此时在脱膜结带中出现组织溶解，但母体毛细血管仍保持完好。在初始胎盘的胎儿表面，这些毛细血管常常完全被滋养层细胞包围。

在12原节时，血管的胚胎体外中胚层的中膜扩展导致双侧绒卵胎盘的建立。双层脐膜适度存在于胎盘的中膜区，但血管中胚层的继续扩展的中膜很快形成一血管的3层脐膜。

在胎儿表面的绒卵胎盘的滋养层从早期的2～4个细胞厚度发育为10个或更多的细胞层。滋养层细胞，特别是在绒卵胎盘早期就出现的滋养层细胞中，常常见到有丝分裂。被绒毛膜盘的滋养层细胞所包围的母体毛细血管趋于进入中膜—反中膜表面。放射状的动脉血管内皮保持完好，其继续保持较薄的壁沿基础脱膜达绒毛膜盘中。在许多情况下，母体的毛细血管与胎儿的血管被1～2个细胞厚的滋养层分开。

密集核的原始滋养层绒毛在绒卵胎盘时发育完好，且杂入绒毛膜胎盘的滋养层。在多核或合胞的原始绒毛膜中有丝分裂减少。滋养层巨细胞在绒卵胎盘的主要部分很少，而副胎盘巨细胞明显地贯穿绒卵胎盘；它们与这一区域的基础膜不断地分离或使子宫上皮分层，并侵入副胎盘的子宫腺体。由于胎盘已占据整个子宫角的侧壁，副胎盘上皮分层的出现使胎盘的边缘膨胀。

在绒卵胎盘的晚期，脱膜结带变薄，脱膜可被绒毛膜盘增殖的滋养层包围，或部分地被密集核的原始绒毛包围。后期，许多脱膜结出现凝缩核增多和失去球状核的特点，有丝分裂大量出现于正常的基础脱膜带没有出现。基础脱膜可达胎盘的一半厚度。

⑤绒卵胎盘和绒尿胎盘间的转变

绒卵胎盘向绒尿囊胎盘的发展，大致发生在受孕12天后。一个很短的卵囊导管连接卵黄囊和中肠。开放的尿囊导管离开胎儿体腹壁，通过反中膜进入大的尿囊，并扩展于两侧和中膜。血管

尿囊取代了卵黄囊的血管脐板，从胎盘表面延展至反中膜的一半。各胎盘的中膜部分仍被卵黄囊的血管脐板覆盖，并有明显的绒卵胎盘功能[22]。

短而钝的血管尿囊的中胚层突起与胎盘的反中膜部分的绒毛膜盘犬牙交错，但这些血管芽此时尚未渗入绒毛膜板，故没有形成与母体毛细血管的直接关系。明显的、密集核的原始绒毛扩展为胎盘厚的60%。分散的有丝分裂出现在绒毛膜盘和基础脱膜，但原始绒毛中无有丝分裂现象。

⑥绒尿囊胎盘的生成

绒尿囊胎盘的建立过程包含4个带，它们之间相互交叉：a．绒毛膜盘；b．绒尿囊迷路；c．原始绒毛和脱膜结的混合带；d．缩小的基础脱膜带。

在此期间，多核的绒毛膜盘的滋养层细胞厚约80～180 μm，而有丝分裂现象不常见。被单一滋养层包围的血管尿囊间叶绒毛渗入绒毛膜盘，形成与母体毛细血管的直接关系。这些绒毛承接绒毛膜盘和联接深入基础脱膜带的原始绒毛，犹如滋养层的“细胞柱”。

绒毛样的间叶细胞突起是肥大的，且外表上皮化。它们的球状或卵圆状核呈泡状并具有明显的核仁；其胞浆呈微酸性。转变型细胞存在于纺锤和绒毛膜胎盘的胎儿表面的，未变化的间叶细胞之间。

覆盖迷路的绒毛样突起的滋养层是完全的合胞滋养层，它们仍具有绒毛膜盘的滋养层和在绒毛样突起端的多核细胞柱。母体毛细血管内皮存在于正在发展的迷路中，且增殖区域相当大，特别是在邻接绒毛盘的地方。泡状的母体核是球形或卵圆形的，含有1～2个嗜碱性核仁。扁平的合胞滋养层的核充满呈碱性的密集的袋状染色质群。

多核的原始绒毛几乎扩展至胎盘底部，在这里它们和脱膜结或与缩小的未变化的基础脱膜带交叉。在发育过程中，迷路在胎盘中变得越来越厚，其间混合的细胞柱带和脱蜕变成一薄的、不规则的、致密多核团的带。

在妊娠晚期，胎盘的主要变化是基础的致密多核团的厚度不断减少。这些致密的多核团可称为“基础染色质团”（basal chromatic masses）[22]。一些基础染色质团可存在两种或更多的形式，其中一些似早期阶段皱缩而退化的脱膜结。绒毛样突起从迷路扩展并变成扁平状贴于基础染色质团。根据正常分娩所得到的胎盘，基础染色质团的厚度小于50 μm，而在胎盘基部的大部分区域都看不到。分娩时，胎盘从染色质团与薄的覆盖子宫腺体的未变化的基质连接处分离。

接近分娩时，胎盘大致是透镜状的，其厚度大多由迷路或血管密集的带构成。在绒尿囊胎盘迷路中的增殖的母体毛细血管内皮一直存在到分娩。在绒尿囊迷路中分离母体和胎儿血液的层是：a．胎儿内皮；b．胎儿内皮和合胞滋养层间的基膜；c．合胞滋养层；d．母体内皮的基膜；e．母体内皮。按Grosser的系统，树鼩的绒尿囊胎盘是内皮绒毛膜型。

树鼩胎盘的循环与大多数具有迷路胎盘的种类相似。母体动脉从子宫肌层通过迷路流进胎儿表面的毛细血管。变化了的和明显放射状的母体毛细血管达胎盘基部，并由此注入子宫静脉。胎儿的动脉在中止于母体毛细血管前深深地插入胎盘迷路。母体毛细血管稍弯曲地流向胎儿表面的尿囊静脉。树鼩胎盘的循环是一个反向逆流形式。这在大多数（但不是全部）哺乳动物胎盘中都是如此[27]。

⑦羊膜的形成

明显的早期羊膜的出现大约在胚胎发育至6原节时期。羊膜尾褶覆盖胚胎的尾尖部，但此时羊膜的头部仅轻微折叠。另一方面，在12原节时，爪哇树鼩胚胎的羊膜头褶扩展并覆盖胚胎的第三腹面，但没有出现羊膜尾褶[22]。在绒卵胎盘的后期，羊膜褶扩展并覆盖胚胎的腹部和后部，但覆

盖中部的羊膜却不完全。羊膜褶直至尿囊憩室和绒毛膜混合成为绒尿囊胎盘时都未完全封闭。

⑧卵黄囊

卵黄囊的反中膜壁由于羊膜和胚胎的膨胀而内陷发生在绒卵胎盘向绒尿囊胎盘转变时期。为了方便，把卵黄囊子宫反中膜的凹面作为中心层，把子宫中膜的凸面作为远层。在被扩展的尿囊与胎盘表面分离时，卵黄囊被压缩于羊膜和胎盘中膜边缘。

在绒尿囊胎盘的早期阶段，肠环成疝进入脐胚腔而不再和卵黄囊导管连接。卵黄囊远侧壁的中膜中部区域有约0.5mm长的内胚层膨囊，相当于卵黄囊导管的远端残余。这是由于卵黄囊静脉的两条原始分支产生的胁腹，其盲端封闭与卵黄囊静脉相接。在绒尿囊胎盘的后期，没有肠环成疝进入脐胚腔，且中肠的内胚层和卵黄囊的内胚层间也不连续。虽然在妊娠后期，游离卵黄囊受到挤压，但仍保持较大，并扩展至整个胎儿的头尾部。单一的卵囊动脉和静脉离开脐带反中膜，并进入羊膜和尿囊间的侧面和中膜通向卵黄囊。

血管化的卵黄囊远侧脏板覆盖着中膜平滑的绒毛膜，形成一绒卵囊膜，且卵黄囊中心侧的脏板同样与羊膜相连形成一血管的羊膜，卵黄囊膜。在绒尿囊胎盘的早期，卵黄囊远侧内胚层厚度常为中心侧的2～3倍。远侧脏板也比中心侧的更富有血管供应。

⑨尿　囊

尿囊导管在绒尿囊胎盘时期直径变小，但仍保持流畅，并通向大而杯状的尿囊腔。尿囊腔扩展和覆盖几乎两个胎盘的表面，直到分娩。尿囊的反中膜带血管化地覆盖绒毛膜，形成一平滑的绒尿囊膜，而尿囊中心侧的壁与反中膜和羊膜的侧面相连形成一羊膜–尿囊膜。这里不存在真正的绒毛膜。

4. 阴道（vagina）

有观察指出，从前穹窿至阴道前庭始部或尿道开口处的长度分别为2.2cm（未妊娠）和2.3cm（妊娠）。阴道前宽后窄，黏膜形成很多纵襞。在妊娠标本中，由于阴道扩大，纵襞相应减少，且较平滑。树鼩尿道开口于阴道内[17]。

5. 阴道前庭（vestibulum vaginae）、阴唇（labia pudendi）和阴蒂（clitoris）

阴道前庭位于阴门裂内，稍呈漏斗状，至尿道外口长约7mm。无论在妊娠或非妊娠，均有10条以上的黏膜纵襞，与阴道黏–纵襞相续。前庭主轴与阴道和子宫的共轴之间成一钝角。会阴体厚度约为4mm，具有自阴裂至肛门腹侧缘的中央沟，在未妊娠时是很薄的，约2mm。小阴唇位于阴裂腹外侧，向腹侧弯向后，联合成阴蒂包皮，长约5mm。大阴唇居阴裂两侧，较小阴唇肥厚。大阴唇的皮肤被稀毛。

阴蒂悬垂呈阴茎状，成年树鼩自阴蒂海绵体始端至阴蒂尖端长约11mm。阴蒂腹面具深沟，与前庭开口相通，两唇（即小阴唇）平滑而无毛。阴蒂海绵体十分发达，形如阴茎状，稍侧扁，左右径约1mm，背腹径约2mm，像阴茎一样，逐渐成圆形和变尖，其尖端约4mm变成软骨状。

树鼩属动物阴蒂大都伸长和在腹侧面上具沟，且在尾侧加深形成尿生殖窦外口。在树鼩属的新生幼仔中，尿道通过阴蒂的整个长度而形成阴蒂尿道，但在成体中尿道与开口于阴蒂基部的阴道共同形成尿生殖窦。有人认为这种差异似乎在功能上与新生幼仔和年幼树鼩中外“阴道”孔关闭有关系，但是这种假设的中间阶段还未观察到[1]。

# 第二节 树鼩生殖内分泌学研究

## 一、妊娠期孕酮的分泌范型

树鼩大约在交配后16小时发生排卵，此时血清孕酮水平维持在较低水平。交配后的第3天，黄体进一步发展，血清孕酮水平开始上升；在第5～15天内，达到第一个峰值，然后保持在一个稳定阶段（图17–3）。在此期间内，黄体在第7天发育完全，直至分娩。在第42天，黄体发育至最大。血清孕酮水平在第17天稍有下降，之后，在第20天又开始上升直至分娩。最高值可达150～225ng/mL。在分娩后又恢复至原来的低值。如果不考虑妊娠期的长短，树鼩妊娠期的两个孕酮峰与人类十分相似[28]。在人类和树鼩，卵巢分泌的孕酮产生第一峰，在达到20ng/mL时保持稳定。之后，树鼩在第17天，人类在怀孕的第9周，孕酮水平略有下降。在第二峰时，树鼩的可达180ng/mL，而妇女的为130ng/mL左右[29]。

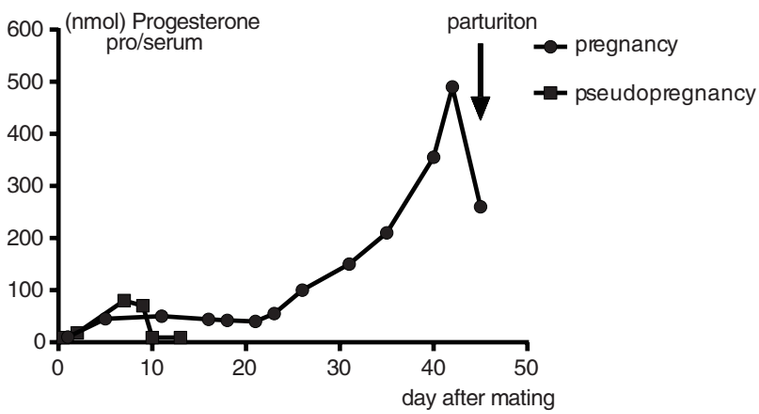



**图17–3 交配后血清孕酮水平变化**

●正常怀孕组，■假孕组（Histology, et al., 1985）。

## 二、雄性树鼩发育中雄激素分泌的范型

如图17–4和图17–5研究显示，尿液中雄激素水平在树鼩婴幼时期雄激素水平很低，之后伴随青春发育，在36～45天和46～55天中雄激素水平显著升高。在青春发育期，雄激素分泌增加与睾丸和生殖系统的发育是同步进行的。由此，通过判定尿液中的雄激素水平作为监测雄性树鼩生殖发育的可靠方法[30]。

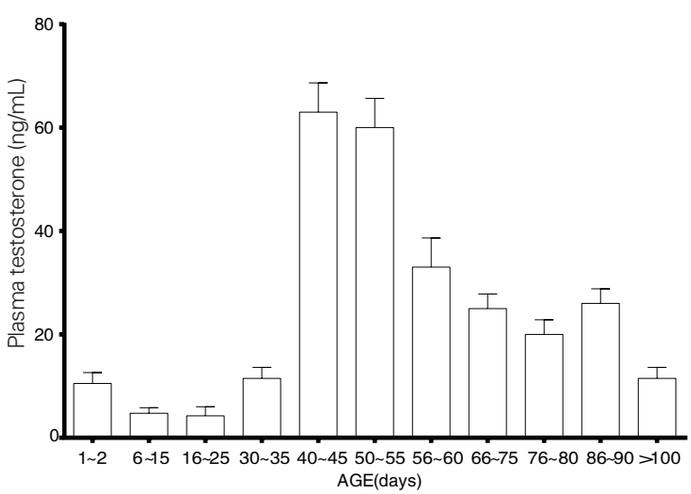



**图17–4 树鼩从出生到性成熟期间睾酮的血浆浓度**

Plasma testosterone为血浆睾酮（Collins, et al., 1989）。

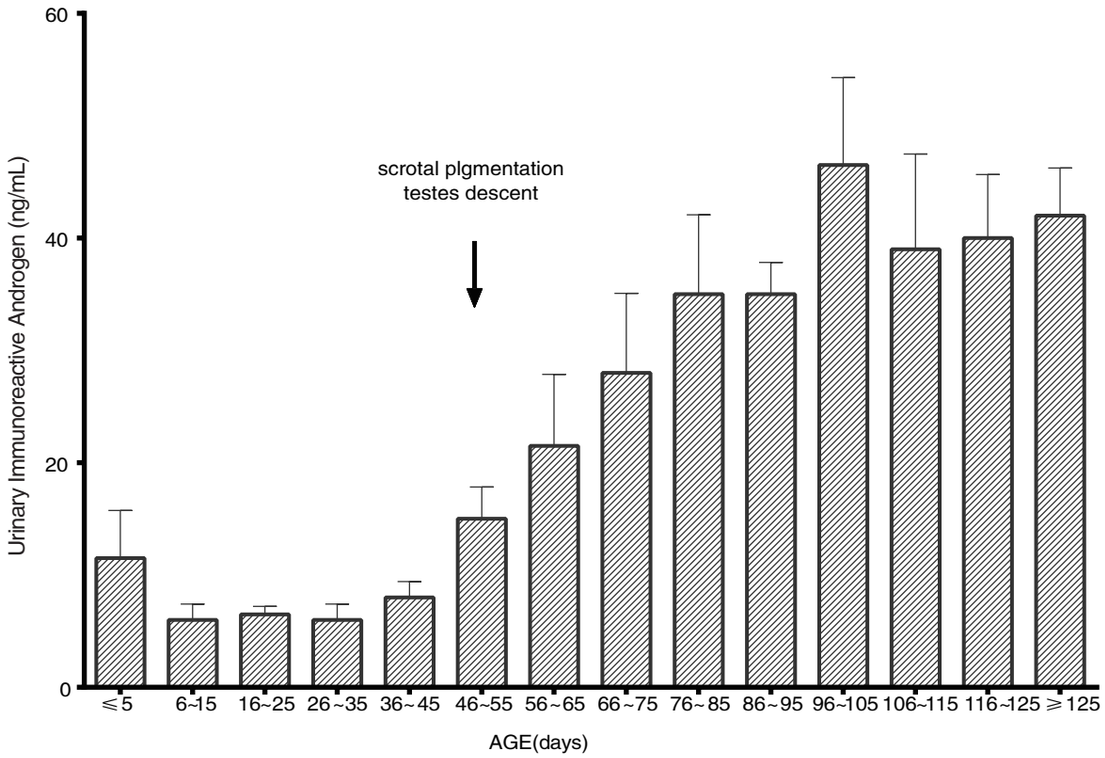



**图17-5　尿中雄激素的浓度**

箭头表示阴囊色素沉淀和睾丸下降的时间（Collins, et al., 1989）。

## 第三节　树鼩人工辅助生殖技术

人工辅助生殖技术是实施实验动物的保种、实验化、快速繁殖、开发利用的必备技术，其中包括物种遗传资源和种质资源的保存及保护，人工繁殖和快速繁殖，受精和胚胎移植，基因修饰工程动物等基础与开发应用研究。有关树鼩的辅助生殖技术研究才刚刚起步，已经获得了一些研究结果。

### 一、树鼩精液采集和冷冻保存[31~33]

精子冷冻的特性与物种有关，影响精子冷冻效果的因素也有很多，如预冷平衡处理、冷冻、解冻以及防冻剂的添加和去除等。在冷冻过程中，精子经受着许多外来压力的考验，如冷休克、膜相转换、冰晶形成等[34, 35]。冷休克会导致部分精子运动能力的丧失、膜结构的损伤[36, 37]、类脂的释放[38]、线粒体膜电位的改变[39]、新陈代谢能力的下降[37]；冷冻会导致细胞的收缩、胞内水的外排和离子的流入，甚至细胞损伤[40]；解冻会导致胞外水的流入而致使细胞破裂。因此，冷冻

速率、解冻速率、防冻剂的浓度、防冻剂的添加与去除等是精子冷冻过程中必须要考虑的关键因素。

### （一）实验树鼩与精液采集

用于精液采集的树鼩的选择，对于野外树鼩，在生殖季节内选取健康成年的雄性树鼩，未见明显疾病症状，睾丸大而质地较硬，充盈整个阴囊，并在实验室条件下饲养不超过一周为宜。对于驯化和实验室繁殖的成年雄性树鼩，一般选取体重在110～140g左右，饲喂营养丰富的饲料，自由饮水，并补充喂食鸡蛋、牛奶和新鲜水果等，且睾丸大而质地较硬，充盈整个阴囊。单只动物饲养在长、宽、高分别为100cm、50cm和40cm的笼子或更大，在温度20～25℃范围下喂养，给予自然光照或室内光线要求比较充足。

树鼩精液通常从树鼩附睾和输精管中获取，具体方法如下。先给树鼩肌肉注射氯胺酮（1～2mg/kg），对其进行麻醉处理；待树鼩完全麻醉后，将树鼩仰卧保定在自制的小型动物手术台上，向其腹部和大腿根部擦拭酒精，随后用刮毛刀刮除下腹部及两大腿之间的皮毛，并且用碘伏棉球擦拭消毒。手术打开下腹部，分离和取出附睾和输精管，经过止血、清理创口、缝合，完成整个手术过程，最后注射抗生素进行消炎处理。将分离获得的附睾尾和输精管置于有TALP-Hepes缓冲液的无菌平皿中，利用TALP-Hepes液冲洗离体的附睾并小心地剔除血管及血液和脂肪组织，随后将附睾尾和输精管置于含1mL 37℃ TALP-Hepes液的平皿中，用精细手术剪剪碎附睾尾，继续于37℃孵育10分钟，让精子游离出来。取10mL精液样品检测精子运动度和顶体完整性。如果没有特殊要求，一般选取运动度超过60%的精子样品用于精子的冷冻保存。精液样品用1mL已预热的TALP-Hepes稀释，经250g、离心4分钟、洗2次，弃上清液，并立即将精子沉淀重悬，等待后续冷冻处理。

### （二）卵黄对树鼩精液的冷冻保护作用

自从Phillips等[41]报道了卵黄的冷冻保护作用后，卵黄就被广泛地应用于多种哺乳动物精子的冷冻保存中，如哺乳类、禽类、鱼及两栖类等。卵黄具有抗冷休克的作用，在冷冻/解冻过程中提供冷冻保护作用[35, 42]。然而，在山羊精子的冷冻过程中，却发现卵黄会降低精子顶体的完整率[35]，且高浓度的卵黄会降低冷冻/解冻精子的活力[43]，这说明精子的冷冻保存效率与卵黄的浓度有关。然而，在猕猴精子的冷冻保存过程中，却发现卵黄的浓度（2%～50%）对冷冻/解冻后精子的运动度没有显著性的影响[44]。近期，我们对树鼩精液的冷冻复苏能力和抗冻特性进行了较系统的研究[31]。首先，研究卵黄及相应冷冻程序对树鼩附睾精子冷冻保存影响，选择最佳的卵黄浓度和冷冻程序。鉴于树鼩与灵长类动物有很多相似的特征，以tris和卵黄为基础的冷冻液已被广泛地应用到灵长类动物精子的超低温冷冻保存中，包括短尾猴[45]和猕猴[46]，因此基于tris的冷冻稀释液可能有利于树鼩精子冷冻保存。卵黄是精子冷冻液的必要组成，但对于不同物种精子的冷冻，卵黄的使用浓度，以及相应的冷冻降温速率和冷冻降温平衡时间各不相同。对此，我们通过检测不同卵黄浓度、冷冻降温速率、冷冻降温平衡时间和冷冻稀释液对冷冻/解冻树鼩精子的运动度、运动度复苏率和顶体完整性，并且通过子宫内人工授精对冷冻/解冻精子的受精能力作进一步检测，以此建立一套树鼩精子的超低温冷冻保存方法。

1. 精子冷冻液和洗涤液的配制

两种精子冷冻稀释液均以tris-TES-egg yolk为基础，其成分见表17–4，其配制方法见前人的

研究报道[46]。卵黄均取自于溶液配制当天生产的鸡蛋，小心敲破蛋壳并去除蛋清，随后用超纯水冲洗完整的卵黄3～5次并用脱脂滤纸吸干卵黄周围的水分，用10mL注射器小心刺破卵黄膜并吸取卵黄。将称量好的药品和卵黄（配制成0、10%、20%、30%、40%、50%卵黄液）溶于超纯水并混匀，于7000g、4℃条件下离心1小时，取上清，弃沉淀，并用盐酸或NaOH调上清液pH值至7.0～7.2，分装于15mL离心管中，储存于–80℃冰箱中待用，储存时间不超过两周，使用前于37℃水浴中解冻。精子洗涤液为TALP-Hepes，其成分见表17–5，其配制方法见Bavister等[47]报道。

表17–4　树鼩精子冷冻保存稀释液TTE和TEST的组成成分

| 成　分 | 浓度（g/100mL） | |
|---|---|---|
| | TTE | TEST |
| tris–HCl | 0.2 | 1.027 |
| TES | 1.2 | 4.325 |
| 葡萄糖glucose | 2 | 1 |
| 乳糖lactose | 2 | — |
| 棉子糖raffinose | 0.2 | — |
| 硫酸链霉素streptomycin sulfate | 0.005 | 0.005 |
| 青霉素penicillin–G | 0.00063 | 0.00063 |
| 卵黄egg–yolk | 根据实验设计添加 | 根据实验设计添加 |

表17–5　TALP–Hepes洗涤液成分

| 成　分 | 浓度（mg/100mL） |
|---|---|
| 氯化钠sodium chloride | 742 |
| 氯化钾potassium chloride | 23 |
| 二水氯化钙calcium chloride dehydrate | 29.4 |
| 六水氯化镁magnesium chloride hexahydrate | 10 |
| 硫酸二氢钠sodium phosphate monobasic | 4.4 |
| 碳酸氢钠sodium bicarbonate | 16.8 |
| 葡萄糖glucose | 90.1 |
| 酚红phenol red | 1 |
| 乳酸钠sodium lactate（60%） | 185 μL |
| HEPES (Na) | 130 |
| HEPES (Acid) | 119.2 |
| 庆大霉素gentamycin | 1mL |
| 牛血清白蛋白BSA | 100 |

2. 卵黄对树鼩精液冷冻保存的作用

（1）在不同温度下卵黄对树鼩精子活力的影响：如表17–6所示，鲜精的运动度和顶体完整率分别为（65.2 ± 3.5）%和（94.7 ± 1.4）%。利用TTE-20%卵黄稀释精液，在4℃和室温下可以分别保存24小时和12小时，其精子运动度和顶体完整率与鲜精没有差别（$P>0.05$）；随着保存时间的延长，精子的运动度有显著性的下降（$P<0.05$）；在保存24小时后，保存在4℃下的精子的运动度要比保存在室温下的精子运动度高（$P<0.05$）。这说明了卵黄对树鼩精液在4℃条件下具有较好的保护作用。

表17–6　TTE–20%卵黄液对不同储存温度下树鼩精子活力的影响

| 保存时间（h） | 室温下保存 | | 4℃下保存 | |
|---|---|---|---|---|
| | 运动度（%） | 顶体完整率（%） | 运动度（%） | 顶体完整率（%） |
| 0 | $65.2 \pm 3.5^{a}$ | $94.7 \pm 1.4^{a}$ | $65.2 \pm 3.5^{a}$ | $94.7 \pm 1.4^{a}$ |
| 12 | $56.7 \pm 5.5^{a}$ | $93.8 \pm 0.2^{a}$ | $60.1 \pm 3.7^{ab}$ | $93.5 \pm 1.0^{a}$ |
| 24 | $41.8 \pm 5.2^{b}$ | $88.6 \pm 1.9^{ab}$ | $57.5 \pm 5.1^{ab}$ | $90.9 \pm 1.9^{a}$ |
| 48 | $33.9 \pm 3.6^{b}$ | $89.4 \pm 2.0^{ab}$ | $51.7 \pm 4.2^{bc}$ | $90.9 \pm 1.0^{a}$ |
| 72 | $22.2 \pm 2.5^{c}$ | $88.0 \pm 5.4^{bc}$ | $43.5 \pm 4.8^{cd}$ | $88.5 \pm 3.6^{a}$ |
| 96 | $11.4 \pm 2.4^{c}$ | $82.5 \pm 2.9^{c}$ | $39.8 \pm 4.0^{d}$ | $88.3 \pm 1.7^{a}$ |

同一列数据上方标的不同字母表示显著性差异（$P<0.05$）。

（2）不同卵黄浓度对精子冷冻预处理的影响：如表17–7所示，分别利用含0、10%、20%、30%、40%和50%卵黄的TTE稀释精子，在4℃冰箱中进行预冷处理2小时后，含50%卵黄处理的精子的运动度比其它卵黄浓度处理的精子的运动度要略低，但没有统计学上的显著性差异（$P>0.05$）；各卵黄处理的精子的顶体完整率没有显著性差异（$P>0.05$）。但卵黄浓度为0时，其预冷处理后精子的运动度和顶体完整率与鲜精比较均有显著性下降，且显著低于含卵黄处理的组（$P<0.05$），这说明了卵黄对树鼩精子在降温过程中有抗冷休克作用。

表17–7　不同卵黄浓度对树鼩精子预冷处理的影响

| 卵黄浓度（%） | 鲜　精 | | 预冷处理后 | |
|---|---|---|---|---|
| | 运动度（%） | 顶体完整率（%） | 运动度（%） | 顶体完整率（%） |
| 0 | 75.1 ± 5.4 | 94.3 ± 1.2 | $13.4 \pm 7.6^{a}$ | $67.8 \pm 6.9^{a}$ |
| 10 | | | $68.2 \pm 6.1^{b}$ | $93.2 \pm 1.7^{b}$ |
| 20 | | | $73.4 \pm 6.0^{b}$ | $93.8 \pm 1.6^{b}$ |
| 30 | | | $71.5 \pm 5.6^{b}$ | $91.5 \pm 2.2^{b}$ |
| 40 | | | $64.6 \pm 5.3^{b}$ | $90.9 \pm 2.0^{b}$ |
| 50 | | | $59.9 \pm 7.0^{b}$ | $90.6 \pm 1.8^{b}$ |

同一列数据上方标的不同字母表示显著性差异（$P<0.05$）。

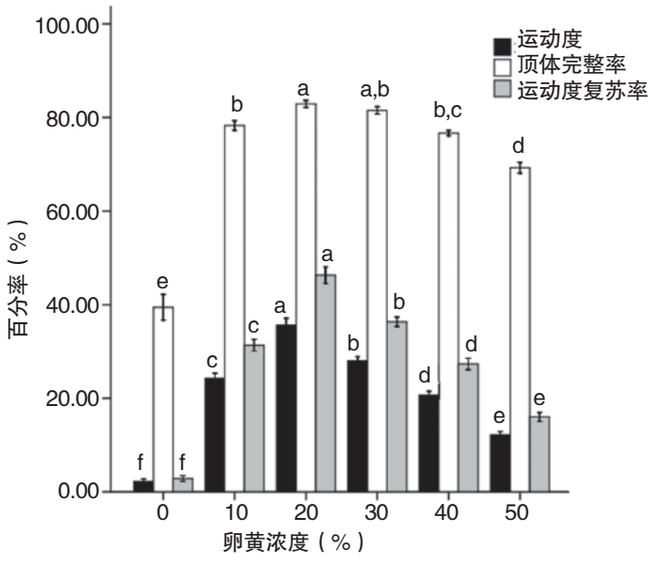



**图17–6　卵黄浓度对精子冷冻复苏运动度、顶体完整率和运动度复苏率的影响**

同一柱上的标注不同表示不同卵黄浓度下的同一检测参数（运动度或顶体完整率或运动度复苏率）之间存在着显著性差异（$P<0.05$）。

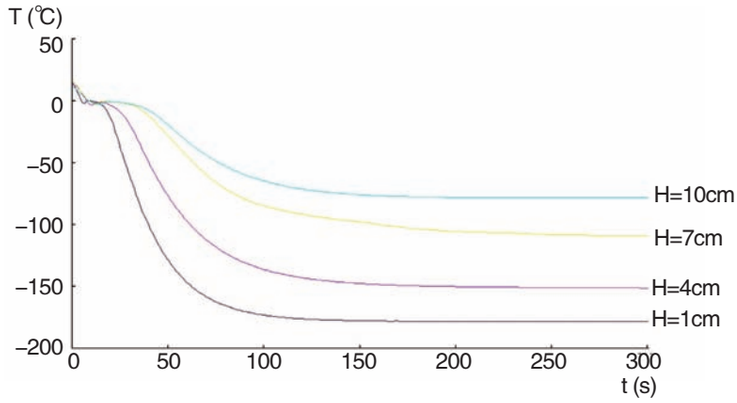



**图17-7　液氮面上方1cm、4cm、7cm和10cm处降温速率模拟图**

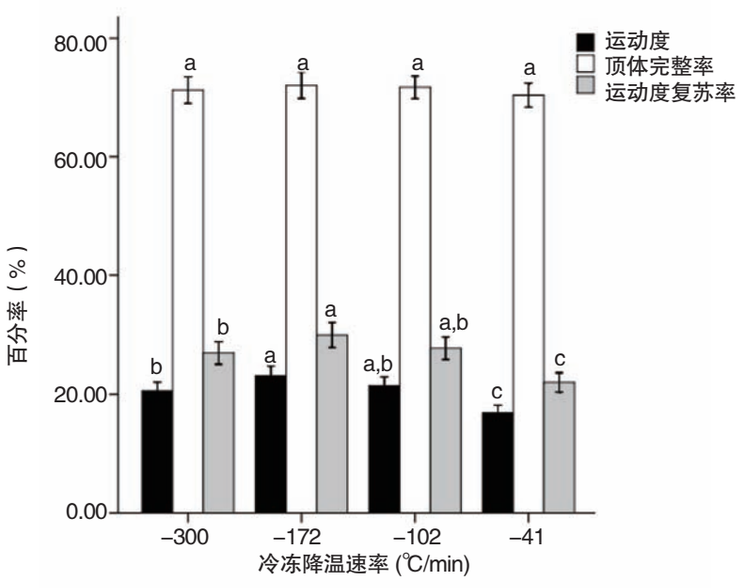



**图17-8　冷冻速率对树鼩精子冷冻效果的影响**

同一参数（运动度、顶体完整率或运动度复苏率）柱上不同字母表示存在显著性差异（$P<0.05$）。

（3）不同卵黄浓度和降温速率对树鼩精子冷冻的影响：忽略卵黄浓度和降温速率对精子冷冻的影响的交互作用，可以在不考虑降温速率的前提下研究卵黄浓度对树鼩精子冷冻的影响。如图17-6所示，在解冻后精子运动度与运动复苏率方面，不同浓度卵黄对精子的冷冻保护均存在显著性差异（$P<0.05$）；在所有冷冻组中，用20%的卵黄冷冻/解冻精子的运动度（35.7 ± 0.9）%和运动复苏率（46.3 ± 1.1）%均显著高于其它组（$P<0.05$）；用20%卵黄冷冻/解冻精子的顶体完整率（82.9 ± 5.2）%和30%卵黄冷冻/解冻精子的顶体完整率（81.5 ± 1.4）%之间无显著性差异（$P>0.05$），但显著高于其它冷冻处理组（$P<0.05$）。在所有冷冻处理组中，无卵黄冷冻/解冻精子的运动度（2.2 ± 0.9）%、顶体完整率（39.4 ± 1.4）%和运动复苏率（2.9 ± 1.1）%均是最低的，并显著低于含卵黄冷冻/解冻精子的（$P<0.05$）。上述结果提示卵黄浓度为20%TTE液体对树鼩精子的冷冻保存作用最好。

在不考虑卵黄浓度的前提下，单独研究降温速率对树鼩精子冷冻保存效率的影响。将麦管放置于距离液氮面的4个不同高度处，其降温趋势和投入液氮前的温度如图17-7所示。在麦管放置于距离液氮面1cm、4cm、7cm、10cm的位置时，其温度从-10℃降到-70℃的平均降温速率分别为-300℃/min、-172℃/min、-102℃/min和-41℃/min，其麦管投入液氮前的温度分别为-178℃、-151℃、-109℃和-78℃。降温速率对精子冷冻/解冻后运动度、顶体完整率和运动度复苏率的影响如图17-8所示。当降温速率为-172℃/min时，冷冻复苏精子的运动度（23.1 ± 0.7）%和运动复苏率（30.0 ± 0.9）%均显著高于降温速率为-300℃/min和-41℃/min组（$P<0.05$）；当降温速率为-102℃/min时，其运动度和运动度复苏率与降温速率为-172℃/min和-300℃/min组之间无显著性差异（$P>0.05$），但显著高于降温速率为-41℃/min组

（$P<0.05$）；在4个降温速率组中，降温速率为–41℃/min时的运动度和运动度复苏率均最低（$P<0.05$）；就顶体完整率而言，4个降温速率组之间没有显著性影响（$P>0.05$）。上述结果说明，当冷冻降温速率在–172℃/min时，精子冷冻损伤较小，保护效果最佳。

表17–8　不同卵黄浓度和降温速率对树鼩精子冷冻的影响

| 降温速率（℃/min） | 卵黄浓度（%） | 运动度（%） | | 运动度复苏率（%） | 顶体完整率（%） |
|---|---|---|---|---|---|
| | | 鲜精 | 冷冻–解冻后 | | |
| –300 | 0 | 77.4 ± 4.2 | 2.8 ± 0.8$^{l}$ | 3.6 ± 1.0$^{l}$ | 33.5 ± 3.6$^{i}$ |
| | 10 | | 26.0 ± 1.8$^{defg}$ | 33.5 ± 2.1$^{efgh}$ | 81.7 ± 1.6$^{abcd}$ |
| | 20 | | 33.2 ± 3.1$^{bc}$ | 43.9 ± 4.3$^{bc}$ | 84.2 ± 1.5$^{ab}$ |
| | 30 | | 29.2 ± 2.0$^{cd}$ | 37.8 ± 2.0$^{de}$ | 79.9 ± 2.0$^{abcd}$ |
| | 40 | | 19.8 ± 1.8$^{h,i}$ | 26.3 ± 2.7$^{ij}$ | 77.4 ± 1.1$^{bcde}$ |
| | 50 | | 12.4 ± 1.6$^{k}$ | 16.8 ± 2.5$^{k}$ | 70.8 ± 2.2$^{efg}$ |
| –172 | 0 | | 2.5 ± 1.3$^{l}$ | 3.1 ± 1.6$^{l}$ | 34.1 ± 3.4$^{i}$ |
| | 10 | | 26.3 ± 1.6$^{def}$ | 34.3 ± 2.0$^{defg}$ | 79.2 ± 1.7$^{abcd}$ |
| | 20 | | 43.3 ± 1.8$^{a}$ | 56.1 ± 1.6$^{a}$ | 86.0 ± 0.9$^{a}$ |
| | 30 | | 30.7 ± 1.5$^{cd}$ | 39.8 ± 1.7$^{cd}$ | 82.9 ± 1.4$^{abc}$ |
| | 40 | | 22.0 ± 2.0$^{fghi}$ | 28.7 ± 2.5$^{ghij}$ | 79.0 ± 1.4$^{abcd}$ |
| | 50 | | 13.9 ± 1.2$^{jk}$ | 18.1 ± 1.6$^{k}$ | 71.2 ± 1.7$^{efg}$ |
| –102 | 0 | | 3.0 ± 1.2$^{l}$ | 3.9 ± 1.5$^{l}$ | 46.2 ± 6.4$^{h}$ |
| | 10 | | 26.2 ± 2.8$^{def}$ | 33.2 ± 2.8$^{efgh}$ | 76.9 ± 2.6$^{bcde}$ |
| | 20 | | 37.9 ± 2.1$^{b}$ | 48.9 ± 1.8$^{b}$ | 81.2 ± 1.7$^{abcd}$ |
| | 30 | | 27.9 ± 1.1$^{d,e}$ | 36.5 ± 1.8$^{def}$ | 82.2 ± 1.7$^{abcd}$ |
| | 40 | | 21.3 ± 1.4$^{ghi}$ | 28.2 ± 2.5$^{hij}$ | 74.8 ± 1.2$^{def}$ |
| | 50 | | 12.3 ± 1.0$^{k}$ | 16.0 ± 1.1$^{k}$ | 69.0 ± 1.7$^{fg}$ |
| –41 | 0 | | 0.7 ± 0.5$^{ll}$ | 0.8 ± 0.5$^{l}$ | 44.0 ± 7.2$^{h}$ |
| | 10 | | 18.5 ± 1.5$^{i,j}$ | 24.2 ± 2.1$^{j}$ | 75.4 ± 1.8$^{cdef}$ |
| | 20 | | 28.2 ± 2.4$^{de}$ | 36.4 ± 2.8$^{def}$ | 80.3 ± 1.3$^{abcd}$ |
| | 30 | | 24.2 ± 1.6$^{efgh}$ | 31.4 ± 1.7$^{fghi}$ | 81.0 ± 1.3$^{abcd}$ |
| | 40 | | 19.6 ± 1.3$^{hi}$ | 26.1 ± 2.2$^{ij}$ | 75.5 ± 0.8$^{cdef}$ |
| | 50 | | 10.2 ± 1.7$^{k}$ | 13.1 ± 2.1$^{k}$ | 66.1 ± 3.2$^{g}$ |

同一列数据上方标的不同字母表示显著性差异（$P<0.05$）。

单独分析卵黄浓度和降温速率对树鼩精子冷冻效果的影响后，随后设计24个冷冻处理组来分析卵黄浓度和降温速率对树鼩精子冷冻的交互作用。如表17–8所示，用20%卵黄、–172℃/min降温速率冷冻的精子具有最高的运动度（43.3 ± 1.8）%、顶体完整率（86.0 ± 0.9）%和运动复苏率（56.1 ± 1.6）%，并显著高于其它处理组（$P<0.05$）。无论降温速率多少，用无卵黄的冷冻液冷冻精子的运动度、顶体完整率和运动复苏率均是最低的，并显著低于卵黄组（$P<0.05$）。

（4）不同冷冻降温平衡时间对树鼩精子冷冻存活率的影响：鲜精的运动度和顶体完整率分别为（74.5 ± 2.6）%和（93.6 ± 0.9）%，经过冷冻/解冻后，精子的运动度和顶体完整率均呈现显著性下降。如表17–9所示，冷冻降温平衡时间为10分钟时，其冷冻/解冻后精子的复苏运动度

（37.8 ± 2.7）%显著高于5分钟和15分钟组（$P<0.05$）。这3个冷冻降温平衡时间各组之间，冷冻/解冻精子的顶体完整率没有显著性差异（$P>0.05$）。

表17–9　不同冷冻降温平衡时间对树鼩精子冷冻/解冻运动度和顶体完整率的影响

| 冷冻降温平衡时间（min） | 鲜　精 | | 冷冻/解冻后 | |
|---|---|---|---|---|
| | 运动度（%） | 顶体完整率（%） | 运动度（%） | 顶体完整率（%） |
| 5 | | | 22.6 ± 2.4[a] | 80.7 ± 1.3[a] |
| 10 | 74.5 ± 2.6 | 93.6 ± 0.9 | 37.8 ± 2.7[b] | 76.5 ± 3.1[a] |
| 15 | | | 28.3 ± 2.1[a] | 79.4 ± 1.8[a] |

同一列数据上方标的不同字母表示显著性差异（$P<0.05$）。

3. 比较TTE和TEST对精子冷冻效果的影响

以tris-HCl和20%卵黄为基础的TTE和TEST精子稀释液对树鼩精子进行冷冻研究，如图17–9，相比鲜精，经过预冷处理后，TTE稀释的精子的运动度未显著下降（$P>0.05$），而TEST稀释的精子的运动度呈现显著性下降（$P<0.05$）；冷冻后，两个处理组的精子运动度均呈现显著性下降，但TTE冷冻/解冻精子的运动度显著高于TEST（$P<0.05$）。如图17–10所示，相比鲜精，经过预冷处理后，TTE组精子的顶体完整率没有显著性下降，而TEST组精子的顶体完整率出现显著性下降（$P<0.05$）；冷冻后，两个处理组精子的顶体完整率均出现显著性下降，但TTE组精子的顶体完整率显著性高于TEST组（$P<0.05$）。结果表明，TTE的冷冻保护效果优于TEST，其原因可能是高浓度的三羟甲基氨基甲烷盐酸（tris）和三甲基氨基乙磺酸（TES）对树鼩精子造成盐害而受损伤或乳糖和棉子糖给树鼩精子冷冻提供较好的保护作用[31, 48]。

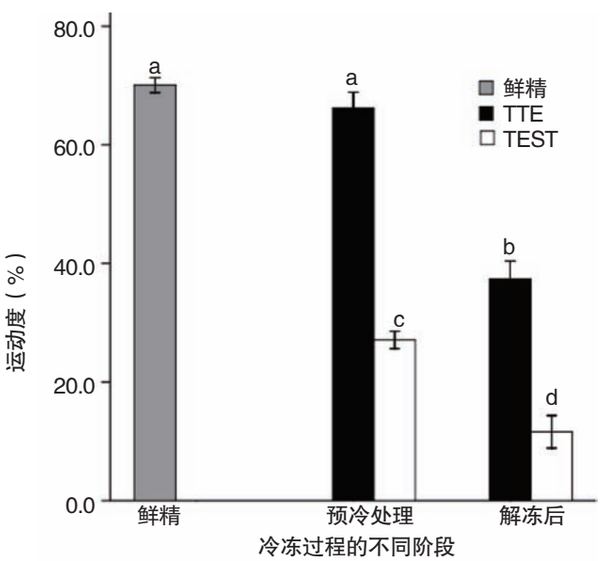



**图17–9　比较TTE和TEST对树鼩精子冷冻过程中的运动度的影响**

柱上方标的不同字母表示显著性差异（$P<0.05$）。

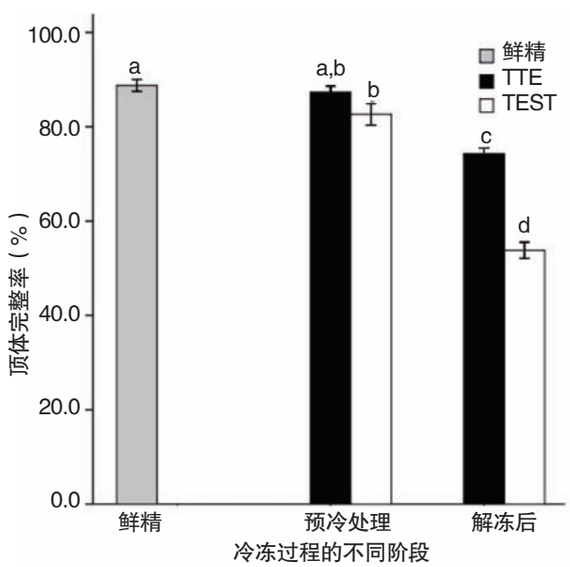



**图17–10　比较TTE和TEST对树鼩精子冷冻过程中精子顶体完整率的影响**

柱上方标的不同字母表示显著性差异（$P<0.05$）。

4. 冷冻精子的受精能力

利用20%卵黄-TTE冷冻液，降温速率在-172℃/min、冷冻时间10分钟，冷冻和解冻复苏精子进行人工授精实验，证明了冷冻精子具有体内受精树鼩卵子的能力，冷冻精子的受精率显著低于鲜精（$P<0.05$）；利用鲜精和冷冻精子所得到的受精卵的数量没有显著性差异（$P>0.05$）（表17-10）。

表17-10 树鼩鲜精和冷冻精子的受精能力

| | 鲜精 | 冷冻精子 |
|---|---|---|
| 人工授精前的精子运动度（Mean ± SD）% | 71.2 ± 3.1 | 38.5 ± 2.3 |
| 人工授精前的精子顶体完整率（Mean ± SD）% | 90.2 ± 1.1 | 80.7 ± 2.1 |
| 用于此实验的雌性树鼩数量 | 5 | 5 |
| 产生受精卵的树鼩的数量[a]（%） | 5（100） | 4（80） |
| 获取的卵的数量（Mean ± SD per female） | 20（4.0 ± 0.7） | 23（4.6 ± 1.3） |
| 受精卵的数量[b]（Mean ± SD per female） | 15（3.0 ± 1.2） | 13（2.6 ± 1.8） |
| 受精率（Mean ± SD）% | 73.3 ± 18.1 | 51.7 ± 32.5 |

[a]相对实验所用树鼩数量的百分比；[b]获取胚胎至少为2-细胞时期。

## （三）渗透性防冻剂对树鼩精子冷冻保存的影响

树鼩作为一种重要的实验动物模型而被广泛地应用于生物医学的研究。目前，用于实验研究的绝大多数树鼩都来自于野外捕捉，精子冷冻能够经济有效地保存这种有价值的野生资源[49]。在上章节中对树鼩精子冷冻保存的实验研究中，树鼩精子能够在含20%卵黄的TTE液、-172℃/min降温速率、10分钟的冷冻降温平衡时间的条件下进行深低温冷冻保存，其冷冻精子具有活力和受精能力。然而，防冻剂作为一个最为重要的因素而影响着冷冻精子的存活率。直到目前为止，甘油（Gly）、乙二醇（EG）、二甲基亚砜（DMSO）和丙二醇（PG）等渗透性防冻剂被广泛应用于哺乳动物精子的深低温冷冻保存过程中[50~55]，它们对树鼩精液的冷冻保护作用不尽相同。

1. 防冻剂的毒性实验

在4℃条件下，甘油、乙二醇、二甲基亚砜和丙二醇及冷冻液的平衡时间对树鼩精子运动度的影响见表17-11。与低浓度的防冻剂相比，浓度为10%的防冻剂对精子的运动度均表现出显著的毒性（$P<0.05$），且随着平衡时间的增长而精子运动度呈现显著性下降（$P<0.05$）；防冻剂为PG、EG和Gly，浓度为1%、3%和6%时，其精子的运动度随着防冻剂浓度的增加和平衡时间的增长而呈现显著性下降（$P<0.05$）；当防冻剂为DMSO，浓度为1%、3%和6%时，其精子的运动度并没有随着浓度的增加和平衡时间的延长而呈现显著性下降（$P>0.05$）；在1%、3%和6%的DMSO组中，精子的运动度不存在显著性差异，其平衡时间对精子的运动度也不存在显著性差异（$P>0.05$）。这表明DMSO对树鼩精子活力影响较小，可能适合于树鼩精液的冷冻保存。

表17-11 不同防冻剂和平衡时间对树鼩精子预冷处理后的精子运动度的影响

| 防冻剂类型及浓度 | 鲜精（%） | 预冷平衡时间 | | |
|---|---|---|---|---|
| | | 30min | 60min | 90min |
| 对照 | 76.9 ± 0.8 | 73.1 ± 1.3$^{abA}$ | 71.6 ± 1.3$^{abA}$ | 68.2 ± 1.1$^{aA}$ |
| 1% DMSO | | 75.4 ± 2.1$^{aA}$ | 75.2 ± 2.1$^{aA}$ | 71.8 ± 2.4$^{aA}$ |

续表17-11

| 防冻剂类型及浓度 | 鲜精（%） | 预冷平衡时间 | | |
|---|---|---|---|---|
| | | 30min | 60min | 90min |
| 3% DMSO | 76.9 ± 0.8 | 74.3 ± 2.2$^{abA}$ | 69.7 ± 2.5$^{abA}$ | 65.3 ± 1.7$^{abA}$ |
| 6% DMSO | | 64.8 ± 3.3$^{abcdA}$ | 60.9 ± 3.0$^{abcA}$ | 57.9 ± 3.0$^{abcA}$ |
| 10% DMSO | | 52.2 ± 2.3$^{cdefA}$ | 48.1 ± 1.7$^{cdeAB}$ | 39.0 ± 2.1$^{defB}$ |
| 1% PG | | 72.2 ± 1.3$^{abA}$ | 71.3 ± 1.3$^{abA}$ | 67.9 ± 1.3$^{abA}$ |
| 3% PG | | 67.4 ± 3.0$^{abcA}$ | 63.2 ± 3.4$^{abcAB}$ | 59.7 ± 3.0$^{abcB}$ |
| 6% PG | | 52.5 ± 4.3$^{cdefA}$ | 49.8 ± 4.7$^{cdeAB}$ | 45.6 ± 4.8$^{cdeB}$ |
| 10% PG | | 46.3 ± 4.7$^{efA}$ | 41.9 ± 4.9$^{defAB}$ | 37.3 ± 4.9$^{efB}$ |
| 1% EG | | 71.6 ± 2.4$^{abA}$ | 69.2 ± 2.3$^{abAB}$ | 64.6 ± 2.3$^{abB}$ |
| 3% EG | | 57.4 ± 2.6$^{bcdeA}$ | 54.5 ± 2.6$^{bcdAB}$ | 50.4 ± 2.7$^{bcdeB}$ |
| 6% EG | | 45.8 ± 3.6$^{efA}$ | 41.7 ± 3.7$^{defAB}$ | 33.3 ± 2.6$^{efB}$ |
| 10% EG | | 37.5 ± 4.2$^{fA}$ | 31.5 ± 2.9$^{efgAB}$ | 25.3 ± 1.7$^{fgB}$ |
| 1% Gly | | 64.8 ± 1.3$^{abcdA}$ | 62.6 ± 1.2$^{abcAB}$ | 56.4 ± 2.2$^{abcdB}$ |
| 3% Gly | | 48.1 ± 5.0$^{defA}$ | 45.1 ± 4.9$^{cdefAB}$ | 40.2 ± 4.6$^{defB}$ |
| 6% Gly | | 37.4 ± 4.7$^{fA}$ | 30.2 ± 6.7$^{fgAB}$ | 26.5 ± 5.1$^{fgB}$ |
| 10% Gly | | 20.6 ± 3.9$^{gA}$ | 17.3 ± 3.8$^{gAB}$ | 13.0 ± 2.3$^{gB}$ |

数据上标小写字母的不同表示同一平衡时间下不同防冻剂下精子的运动度呈现存在显著性差异（$P<0.05$）；数据上标大写字母不同表示同一防冻剂下不同平衡时间下精子的运动度呈现存在显著性差异（$P<0.05$）。

2. 渗透性防冻剂对树鼩精子冷冻存活率的影响

防冻剂对树鼩精子的运动度和运动度复苏率的影响见表17-12。相比鲜精而言，所有冷冻组的精子的复苏运动度均呈现显著性下降（$P<0.05$）。在所有冷冻组中，3% DMSO组的复苏运动度（44.9 ± 1.8）%最高，其次是1% DMSO（35.1 ± 2.3）%，这些均高于对照组的复苏运动度（$P<0.05$）；同时，3% DMSO的运动度复苏率（65.2 ± 3.0）%也是最高的，其次是1% DMSO（50.5 ± 4.0）%和3% EG（54.2 ± 5.0）%，这些均高于对照组的运动度复苏率（$P<0.05$），其它的防冻剂组的运动度复苏率与对照组之间无显著性差异（$P>0.05$）。上述分析结果进一步说明了DMSO对树鼩精液的冷冻保护作用。

表17-12　防冻剂对树鼩精子解冻后运动度和运动度复苏率的影响

| 防冻剂类型 | 运动度（%） | | | 运动度复苏率（%） |
|---|---|---|---|---|
| | 鲜精 | 冷冻前 | 冷冻-解冻后 | |
| Control | 73.4 ± 0.4 | 69.3 ± 1.8$^{ab}$ | 27.7 ± 1.3$^{cd}$ | 40.1 ± 1.8$^{defgh}$ |
| 1% DMSO | | 70.4 ± 1.9$^{a}$ | 35.1 ± 2.3$^{b}$ | 50.5 ± 4.0$^{be}$ |
| 3% DMSO | | 69.3 ± 1.7$^{ab}$ | 44.9 ± 1.8$^{a}$ | 65.2 ± 3.0$^{a}$ |
| 6% DMSO | | 60.3 ± 1.6$^{cd}$ | 28.9 ± 1.5$^{cd}$ | 47.9 ± 2.1$^{bcd}$ |
| 10% DMSO | | 48.8 ± 1.3$^{efg}$ | 21.8 ± 1.3$^{ef}$ | 45.0 ± 2.9$^{cde}$ |
| 1% PG | | 70.7 ± 1.8$^{a}$ | 29.2 ± 1.9$^{cd}$ | 42.0 ± 3.2$^{defg}$ |
| 3% PG | | 66.1 ± 1.7$^{abc}$ | 29.9 ± 1.3$^{c}$ | 45.9 ± 2.8$^{bcd}$ |
| 6% PG | | 51.5 ± 1.3$^{ef}$ | 24.7 ± 1.3$^{de}$ | 48.4 ± 2.9$^{bcd}$ |

续表17–12

| 防冻剂类型 | 运动度（%） | | | 运动度复苏率（%） |
|---|---|---|---|---|
| | 鲜精 | 冷冻前 | 冷冻–解冻后 | |
| 10% PG | 73.4 ± 0.4 | 46.0 ± 1.2$^{fg}$ | 16.1 ± 1.5$^{g}$ | 35.3 ± 3.6$^{fgh}$ |
| 1% EG | | 67.1 ± 1.8$^{abc}$ | 25.6 ± 1.8$^{cde}$ | 38.6 ± 3.3$^{defgh}$ |
| 3% EG | | 53.8 ± 1.4$^{de}$ | 28.7 ± 2.9$^{cd}$ | 54.2 ± 5.0$^{b}$ |
| 6% EG | | 42.9 ± 1.1$^{gh}$ | 19.5 ± 2.0$^{fg}$ | 45.1 ± 4.2$^{cde}$ |
| 10% EG | | 34.8 ± 0.9$^{i}$ | 15.6 ± 0.8$^{g}$ | 44.7 ± 1.7$^{cdef}$ |
| 1% Gly | | 63.5 ± 1.6$^{bc}$ | 22.3 ± 2.3$^{ef}$ | 35.6 ± 4.0$^{efgh}$ |
| 3% Gly | | 47.1 ± 1.2$^{efg}$ | 16.1 ± 1.6$^{g}$ | 34.0 ± 3.1$^{gh}$ |
| 6% Gly | | 36.4 ± 0.9$^{hi}$ | 11.4 ± 0.7$^{h}$ | 31.4 ± 1.9$^{h}$ |
| 10% Gly | | 20.1 ± 0.5$^{j}$ | 9.0 ± 0.9$^{h}$ | 44.6 ± 4.2$^{cdef}$ |

每一列数据的上标字母不同表示存在显著性差异（$P<0.05$）。

防冻剂对树鼩精子的顶体完整率的影响见表17–13。比较鲜精而言，除了6% EG和10% Gly组外，其它所有冷冻组精子的顶体完整率均呈现显著性下降（$P<0.05$）。在所有冷冻组中，6% EG和10% Gly呈现出最高的顶体完整率，并显著高于对照组的顶体完整率（$P<0.05$）；所有冷冻组精子的顶体完整率不存在显著性差异（$P>0.05$）；除6% EG和10% Gly组外，其它冷冻组的顶体完整率与对照组的顶体完整率不存在显著性差异（$P>0.05$）。

表17–13　冻剂对树鼩精子冷冻中顶体完整率的影响

| 防冻剂类型及浓度（%） | 顶体完整率（%） |
|---|---|
| Fresh | 92.5 ± 1.1$^{a}$ |
| Control | 73.6 ± 2.5$^{c}$ |
| 1% DMSO | 77.5 ± 2.7$^{bc}$ |
| 3% DMSO | 79.8 ± 1.6$^{bc}$ |
| 6% DMSO | 78.7 ± 1.7$^{bc}$ |
| 10% DMSO | 78.1 ± 1.3$^{bc}$ |
| 1% PG | 71.5 ± 1.9$^{c}$ |
| 3% PG | 79.2 ± 2.0$^{bc}$ |
| 6% PG | 80.7 ± 1.6$^{bc}$ |
| 10% PG | 72.1 ± 2.4$^{c}$ |
| 1% EG | 74.6 ± 2.1$^{bc}$ |
| 3% EG | 79.3 ± 2.6$^{bc}$ |
| 6% EG | 82.6 ± 1.7$^{ab}$ |
| 10% EG | 76.8 ± 3.0$^{bc}$ |
| 1% Gly | 75.4 ± 2.3$^{bc}$ |
| 3% Gly | 79.2 ± 2.7$^{bc}$ |
| 6% Gly | 76.4 ± 6.2$^{bc}$ |
| 10% Gly | 83.0 ± 1.4$^{ab}$ |

数据的上标字母不同表示存在显著性差异（$P<0.05$）。

3. 评估冷冻精子的受精能力

如表17–14示，3% DMSO冷冻精子的受精率为55.3%，与鲜精的受精率69.7%有显著性差异（$P<0.05$），说明DMSO在树鼩精子冷冻中保护作用还有待提高。

表17–14 树鼩鲜精和3%DMSO冷冻精子的受精能力

| | 鲜精 | 冷冻精子 |
|---|---|---|
| 人工授精前的精子运动度（Mean ± SD）% | 68.9 ± 5.7 | 43.5 ± 3.3 |
| 人工授精前的精子顶体完整率（Mean ± SD）% | 87.8 ± 3.4 | 78.7 ± 2.1 |
| 用于此实验的雌性树鼩数量 | 5 | 5 |
| 产生受精卵的树鼩的数量[a]（%） | 5（100） | 5（100） |
| 获取的卵的数量（Mean ± SD per female） | 24（4.8 ± 0.8） | 21（4.2 ± 1.5） |
| 受精卵的数量[b]（Mean ± SD per female） | 17（3.4 ± 1.1） | 12（2.4 ± 1.1） |
| 受精率（Mean ± SD）% | 69.7 ± 14.2 | 55.3 ± 7.8 |

[a]相对实验所用树鼩数量的百分比；[b]获取胚胎至少为2–细胞时期。

## （四）不同冷冻稀释和单胺类防冻剂对树鼩精子冷冻保存的影响

冷冻稀释液是影响精子冷冻存活率和受精能力的一个重要因素，除了tris-TES的两种冷冻稀释液TTE和TEST外[31]，有很多种稀释液被应用于哺乳动物精子冷冻保存中，如基于tris-TES的TTE和TTG分别用于非人灵长类动物和羊的精子冷冻保存[46, 55]；基于tris-citric acid的TCG和TCF稀释液用于山羊[56]、牛[57]、兔[58]和狗[59]的精子冷冻保存；基于盐和糖的BWW和BTS稀释液用于人类和猪的精子冷冻保存[60]；基于Lactose-egg yolk的DM稀释液可用于食蟹猴的精子冷冻保存[45]，且可以提供类似于TTE液的冷冻保护作用；基于Skim milk-Raffinose的SR稀释液被广泛用于小鼠精子的冷冻保存[61]。尽管有很多冷冻稀释液被用于哺乳动物精子的冷冻保存，但仅有为数不多的文献比较了几种冷冻稀释液对灵长类动物精子冷冻保存的影响[45]。同时，哺乳动物精子冷冻保存的方法多数倾向于经验性和实验性。因此，有必要比较多种冷冻稀释液对树鼩精子冷冻保存的影响，以便探索适合树鼩精子冷冻保存的冷冻稀释液。

胺类，如二甲基甲酰胺（dimethyl-formamide, DF）、甲酰胺（formamide, F）、二甲乙酰胺（dimethylacetamide, DA）和乙酰胺（acetamide, A）等也作为重要的渗透性防冻剂用于哺乳动物精子冷冻保护，比较二甲基甲酰胺、甲酰胺和甘油对犬精子冷冻保存的效率，表明甲酰胺具有类似甘油的冷冻保护效果[62]；比较5%二甲基甲酰胺、5%二甲乙酰胺、5%甲酰胺和3%甘油对野猪精子冷冻保存的效率，表明5%二甲乙酰胺具有最佳的冷冻保存效果[63]；比较甘油、二甲基亚砜、乳酰胺和乙酰胺对日本兔精子保存存活率的影响，表明乳酰胺和乙酰胺的冷冻保护效果优于甘油[64]。由此可见，胺类可作为渗透性防冻剂被考虑用于哺乳动物的精子冷冻保存。然而，在树鼩精子的冷冻保存中单胺类防冻剂及其与冷冻稀释液配伍能否产生最佳的冷冻保存效果，以及冷冻稀释液和防冻剂的冷冻保护作用机制仍不清楚。因此，有必要研究和选择适用于树鼩精子冷冻保存的最佳冷冻稀释液，并探讨单胺类防冻剂类型及浓度对树鼩精子冷冻保存的影响。

1. 不同冷冻稀释液对树鼩精子冷冻存活率的影响

不同冷冻稀释液（表17–15）对树鼩精子冷冻–解冻运动度有影响。相比鲜精而言，经过预冷平衡处理后，TTE、DM和SR稀释液稀释的精子的运动度未显著性下降（$P>0.05$），而其余冷冻稀释液稀释的精子却显著性下降（$P<0.05$），且BWW、TTG、BTS组显著低于其它冷冻稀释液组

（$P<0.05$）。冷冻复苏后，各稀释液组复苏精子的运动度显著低于预冷平衡处理后的运动度（$P<0.05$）；DM组冷冻/解冻精子的运动度显著高于其它稀释液冷冻组（$P<0.05$）；TTE和SR组，显著高于TTG、BWW和BTS组（$P<0.05$）；BWW冷冻组精子的运动度最低（$P<0.05$）。冷冻稀释液对树鼩精子冷冻解冻后顶体完整率的影响见表17-16。相比鲜精，TCF、BWW、BTS和SR组平衡后顶体完整率显著性下降（$P<0.05$），而TTE和DM组精子的顶体完整率显著高于BWW、BTS和SR组（$P<0.05$）。冷冻解冻后，DM组精子的顶体完整率显著高于其它冷冻组（$P<0.05$），但与TTE组之间没有显著性差异（$P>0.05$）。

在此8种冷冻稀释液中，TTE和TTG是以tris-TES为缓冲体系的稀释液，但TTE的冷冻保护效果优于TTG，其原因可能是TTG中的tris-TES浓度高于TTE且TTE中的糖浓度和种类多于TTG，这与Ping, et al., 2011[31]报道的结果一致；TCG和TCF是基于tris-citric acid的稀释液，虽然TCG的盐浓度高于TCF，但是冷冻保护效果一样，其原因可能TCG中tris的浓度升高不足加剧负面影响；BWW和BTS是基于盐和葡萄糖的两种稀释液，对树鼩精子的冷冻保护效果最差，其原因可能是缺少卵黄或盐分的存在；DM的主要成分为乳糖和卵黄，对树鼩精子的冷冻保存效率最高，与TTE、TTG、TCF、TCG相比，DM稀释液中没有tris-TES和盐分的存在；SR的主要组成成分为棉子糖和脱脂奶，但其冷冻保存效率低于DM，其原因可能是卵黄的冷冻保护效果优于脱脂奶。综上所述，在树鼩精子冷冻保存过程中，卵黄是冷冻稀释液中不可缺少的成分，但是过多的tris-TES和金属离子可能易造成树鼩精子冷冻损伤[33]。

表17-15　8种不同冷冻稀释液对树鼩精子冷冻-解冻运动度的影响（$n$=6）

| 冷冻稀释液 | 鲜精运动度（%） | 平衡后精子运动度（%） | 冷冻-解冻后精子运动度（%） |
|---|---|---|---|
| TTE | 63.76 ± 3.45 | 60.18 ± 2.75$^{a}$ | 34.25 ± 1.89$^{a}$ |
| TCG | | 54.57 ± 0.96$^{ab}$ | 29.75 ± 2.26$^{ab}$ |
| TCF | | 52.65 ± 3.63$^{ab}$ | 30.18 ± 2.47$^{ab}$ |
| TTG | | 43.13 ± 5.22$^{c}$ | 21.96 ± 3.37$^{c}$ |
| BWW | | 37.39 ± 4.01$^{cd}$ | 15.36 ± 2.61$^{d}$ |
| BTS | | 43.42 ± 3.96$^{c}$ | 26.39 ± 2.38$^{bc}$ |
| DM | | 61.50 ± 1.77$^{a}$ | 44.10 ± 2.25$^{e}$ |
| SR | | 57.16 ± 2.41$^{a}$ | 35.04 ± 2.97$^{a}$ |

同一列数据上方标的不同字母表示显著差异（$P<0.05$，最小显著差数法）。

表17-16　8种不同冷冻稀释液对树鼩精子冷冻-解冻顶体完整率的影响

| 冷冻稀释液 | 鲜精顶体完整率（%） | 平衡后精子顶体完整率（%） | 冷冻-解冻后精子顶体完整率（%） |
|---|---|---|---|
| TTE | 81.24 ± 2.42 | 79.14 ± 1.17$^{a}$ | 69.34 ± 1.77$^{a}$ |
| TCG | | 74.55 ± 2.31$^{ab}$ | 62.83 ± 1.72$^{abc}$ |
| TCF | | 72.08 ± 1.97$^{ab}$ | 64.15 ± 2.74$^{ab}$ |
| TTG | | 75.98 ± 1.83$^{ab}$ | 67.72 ± 1.93$^{ab}$ |
| BWW | | 69.19 ± 2.52$^{b}$ | 56.73 ± 1.27$^{c}$ |
| BTS | | 69.84 ± 2.07$^{b}$ | 63.34 ± 2.13$^{abc}$ |
| DM | | 78.06 ± 2.11$^{a}$ | 76.08 ± 0.84$^{ad}$ |
| SR | | 71.63 ± 1.45$^{b}$ | 63.31 ± 2.07$^{abc}$ |

同一列数据上方标的不同字母表示显著性差异（$P<0.05$，最小显著差数法）。

2. 不同渗透性防冻剂对树鼩精子冷冻存活率的影响

以0.4mol/L DMSO为阳性对照，不加防冻剂的冷冻液为阴性，对不同单胺类防冻剂对树鼩冷冻/解冻精子运动度的影响见表17–17。对比鲜精，经过预冷平衡处理后，各防冻剂组的精子运动度未显著性下降（$P>0.05$）。经过冷冻解冻后，各组精子的运动度显著低于其预冷平衡处理后的精子运动度（$P<0.05$）；0.8mol/L DF组精子的运动度显著高于其它冷冻组，与0.8mol/L A和0.4mol/L DMSO组之间没有显著性差异（$P>0.05$）[33]。

表17–17 单胺类防冻剂对树鼩精子冷冻–复苏后精子运动度的影响（$n$=10）

| 防冻剂 | 鲜精运动度（%） | 平衡后精子运动度（%） | 解冻后精子运动度（%） |
|---|---|---|---|
| 0.2mol/L DF | 67.12 ± 2.08 | 62.32 ± 2.84$^{a}$ | 27.11 ± 4.07$^{a}$ |
| 0.4mol/L DF | | 62.53 ± 3.41$^{a}$ | 32.59 ± 3.56$^{bc}$ |
| 0.8mol/L DF | | 65.24 ± 3.01$^{a}$ | 40.16 ± 2.99$^{d}$ |
| 1.2mol/L DF | | 63.21 ± 1.89$^{a}$ | 34.56 ± 3.12$^{b}$ |
| 0.2mol/L F | | 63.94 ± 2.91$^{a}$ | 22.17 ± 2.54$^{ef}$ |
| 0.4mol/L F | | 63.61 ± 3.44$^{a}$ | 31.87 ± 4.41$^{c}$ |
| 0.8mol/L F | | 64.65 ± 3.82$^{a}$ | 34.40 ± 2.45$^{b}$ |
| 1.2mol/L F | | 62.12 ± 2.86$^{a}$ | 26.35 ± 2.78$^{a}$ |
| 0.2mol/L DA | | 65.11 ± 3.52$^{a}$ | 31.22 ± 4.83$^{c}$ |
| 0.4mol/L DA | | 64.59 ± 3.98$^{a}$ | 27.01 ± 3.63$^{a}$ |
| 0.8mol/L DA | | 63.49 ± 4.12$^{a}$ | 30.93 ± 2.19$^{eg}$ |
| 1.2mol/L DA | | 61.56 ± 3.24$^{a}$ | 23.42 ± 3.05$^{e}$ |
| 0.2mol/L A | | 63.47 ± 3.69$^{a}$ | 21.42 ± 3.67$^{ef}$ |
| 0.4mol/L A | | 62.86 ± 3.32$^{a}$ | 29.61 ± 4.96$^{eg}$ |
| 0.8mol/L A | | 63.47 ± 3.69$^{a}$ | 36.95 ± 4.7$^{bd}$ |
| 1.2mol/L A | | 60.56 ± 3.10$^{a}$ | 27.64 ± 3.18$^{fg}$ |
| NO CAP | | 64.78 ± 3.54$^{a}$ | 19.88 ± 2.38$^{f}$ |
| 0.4mol/L DMSO | | 66.72 ± 3.88$^{a}$ | 38.42 ± 3.69$^{bd}$ |

同一列数据上方标的不同字母表示显著性差异（$P<0.05$，最小显著差数法）。

不同单胺类防冻剂对树鼩冷冻/解冻精子的顶体完整率的影响见表17–18。预冷平衡处理后，0.2mol/L DF、0.8mol/L DA、0.8mol/L A、0.2mol/L A和无防冻剂组的顶体完整率显著高于1.2mol/L DF、0.8mol/L F和1.2mol/L F组（$P<0.05$）。冷冻解冻后，0.4mol/L F和0.4mol/L DF组精子的顶体完整率显著高于1.2mol/L DF、0.2mol/L F、0.8mol/L DA和1.2mol/L DA组（$P<0.05$）。

表17–18 胺类防冻剂对树鼩精子冷冻–复苏后精子顶体完整率的影响（$n$=10）

| 防冻剂 | 鲜精顶体完整率（%） | 平衡后精子顶体完整率（%） | 冷冻–解冻后精子顶体完整率（%） |
|---|---|---|---|
| 0.2mol/L DF | 81.79 ± 2.24 | 78.68 ± 2.68$^{a}$ | 59.29 ± 3.83$^{abc}$ |
| 0.4mol/L DF | | 77.12 ± 3.35$^{ab}$ | 63.03 ± 3.05$^{a}$ |
| 0.8mol/L DF | | 73.51 ± 1.78$^{abc}$ | 59.39 ± 2.42$^{abc}$ |
| 1.2mol/L DF | | 71.58 ± 2.14$^{b}$ | 55.49 ± 2.37$^{bc}$ |

续表17–18

| 防冻剂 | 鲜精顶体完整率（%） | 平衡后精子顶体完整率（%） | 冷冻–解冻后精子顶体完整率（%） |
|---|---|---|---|
| 0.2mol/L F | 81.79 ± 2.24 | 77.07 ± 2.42$^{ab}$ | 56.98 ± 1.58$^{bc}$ |
| 0.4mol/L F | | 76.08 ± 3.34$^{ab}$ | 64.35 ± 2.13$^{a}$ |
| 0.8mol/L F | | 68.64 ± 4.26$^{bc}$ | 62.99 ± 1.56$^{ab}$ |
| 1.2mol/L F | | 67.26 ± 2.74$^{c}$ | 60.35 ± 1.75$^{abc}$ |
| 0.2mol/L DA | | 77.74 ± 2.89$^{ab}$ | 60.82 ± 3.55$^{abc}$ |
| 0.4mol/L DA | | 75.52 ± 3.11$^{abc}$ | 58.86 ± 3.20$^{abc}$ |
| 0.8mol/L DA | | 78.16 ± 1.03$^{a}$ | 51.80 ± 2.87$^{bcd}$ |
| 1.2mol/L DA | | 73.48 ± 2.15$^{abc}$ | 49.85 ± 2.30$^{d}$ |
| 0.2mol/L A | | 78.92 ± 2.63$^{a}$ | 60.57 ± 3.28$^{abc}$ |
| 0.4mol/L A | | 74.08 ± 3.12$^{abc}$ | 60.68 ± 2.51$^{abc}$ |
| 0.8mol/L A | | 79.04 ± 1.45$^{a}$ | 62.60 ± 3.27$^{ab}$ |
| 1.2mol/L A | | 73.24 ± 2.08$^{abc}$ | 59.67 ± 2.58$^{abc}$ |
| NO CAP | | 78.62 ± 2.82$^{a}$ | 59.58 ± 2.99$^{abc}$ |
| 0.4mol/L DMSO | | 76.75 ± 2.85$^{ab}$ | 60.78 ± 3.31$^{abc}$ |

同一列数据上方标的不同字母表示显著性差异（$P<0.05$，最小显著差数法）。

冷冻精子受精能力的影响，如表17–19，0.8mol/L DF冷冻精子的受精率（16.7%）与0.4mol/L DMSO的受精率（50.0%）有显著性差异（$P<0.05$）。

表17–19　0.8mol/L DF和0.4mol/L DMSO冷冻精子的受精能力

| | 0.4mol/L DMSO冷冻精子 | 0.8mol/L DF冷冻精子 |
|---|---|---|
| AI前的精子运动度（Mean ± SD）% | 36.89 ± 2.41 | 38.65 ± 2.68 |
| AI前的精子顶体完整率（Mean ± SD）% | 61.48 ± 3.21 | 60.15 ± 2.45 |
| 用于此实验的雌性树鼩数量 | 5 | 5 |
| 产生受精卵的树鼩的数量[a]（%） | 4（80） | 2（40） |
| 获取的卵的数量（Mean ± SE per female） | 20（4.0 ± 0.5） | 18（3.6 ± 1.0） |
| 受精卵的数量[b]（Mean ± SE per female） | 10（2.0 ± 0.7） | 3（0.6 ± 0.4） |
| 受精率（Mean ± SD）% | 50 | 16.7 |

[a]相对实验所用树鼩数量的百分比；[b]获取胚胎至少为2–细胞时期。

DF冻精受精能力低下的原因可能是其冻精在移植后存活的时间短或精子内部残存的DF对树鼩受精能力有所影响，具体原因还有待进一步研究。由此推测，从人工授精率方面来说，0.8mol/L DF应于树鼩精子的冷冻保存还有待进一步研究。

### （五）树鼩精子冷冻损伤

树鼩精子经最佳的树鼩精液冷冻条件，如20%卵黄–TTE冷冻液，降温速率在–172℃/min、降温冷冻10分钟，并保存于液氮中。冷冻解冻后经FITC–PNA荧光染色，可见部分精子的顶体表现出部分或完全缺失（图17–11A）精子头部核表面的顶体不匀称，表明经冷冻/解冻后，精子顶体结构出现损伤（图17–11B、C）；精子头部核表面无可见顶体，表明顶体完全缺失（图17–11D）。

经过冷冻/解冻处理后，精子膜结构变化主要表现在以下几个方面（图17–12）：头部顶体处质膜破损；头部和颈部连接处质膜缺失；尾部中段线粒体鞘外质膜缺失；尾部主段质膜缺失；线粒体膜不完整。

在冷冻/解冻过程中，外来冷冻压力会造成精子的机械性损伤，导致其不完整结构。头、颈部断裂致头、尾部分离（图17–13A、E）；尾部中段、主段断裂；尾部主段、末段断裂（图17–13B–D）。

在冷冻/解冻过程中，外来冷冻压力会造成精子的机械性损伤，导致其不完整结构。冷冻/解冻对精子的另一个损伤体现于尾部的弯曲度。精子尾部弯曲通常发生于中段或主段（图17–14），致使主段和中段的线粒体被同一质膜包裹，造成轴丝结构受损，进而导致精子运动功能丧失。

解冻过程中，渗透性防冻剂致使胞内渗透压高于胞外，胞外水向胞内流入，有可能进而导致细胞膨胀，如精子尾部中段膨胀（图17–15）。

由此可见，虽然树鼩精子冷冻保存的目的已经达到，但是毫不例外地出现部分精子受到比较严重的冷冻损伤，与其它物种精子的冷冻损伤没有差别。

## 二、胚胎移植

胚胎移植是哺乳动物进行快速繁殖以及制作基因工程动物的重要辅助生殖技术。一般而言，实质上它包括了从雌性动物供体的输卵管或卵巢卵泡中取出成熟，或待成熟的卵母细胞（oocyte）；从雄性动物的附睾中获取精液；在体内实施人工授精（artificial insemination，AI），或者

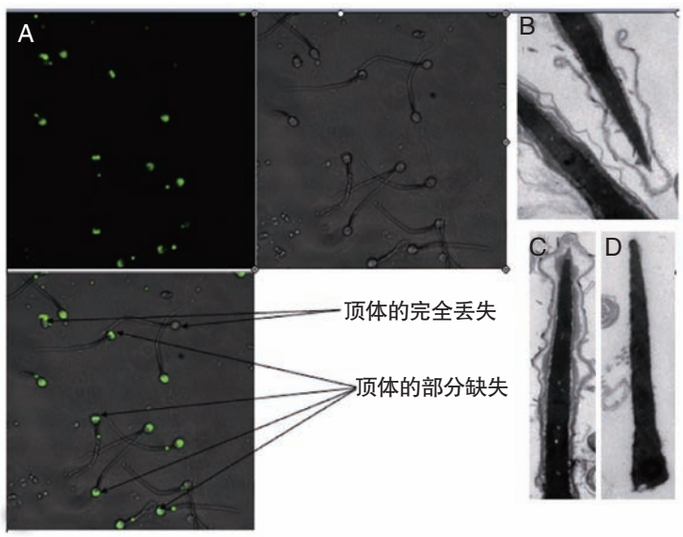



**图17–11　冷冻/解冻精子头部顶体的缺损**

荧光标记精子顶体（绿色）的激光共聚焦显微镜观察如图（×200）。（A）显示顶体完全或部分丢失；（B）透射电镜下显示精子质膜脱离和断裂（×20000）；（C）精子质膜与顶体之间存在明显间隔，且顶体结构发生变化（×30000）；（D）丢失质膜和顶体的精子（×20000）。

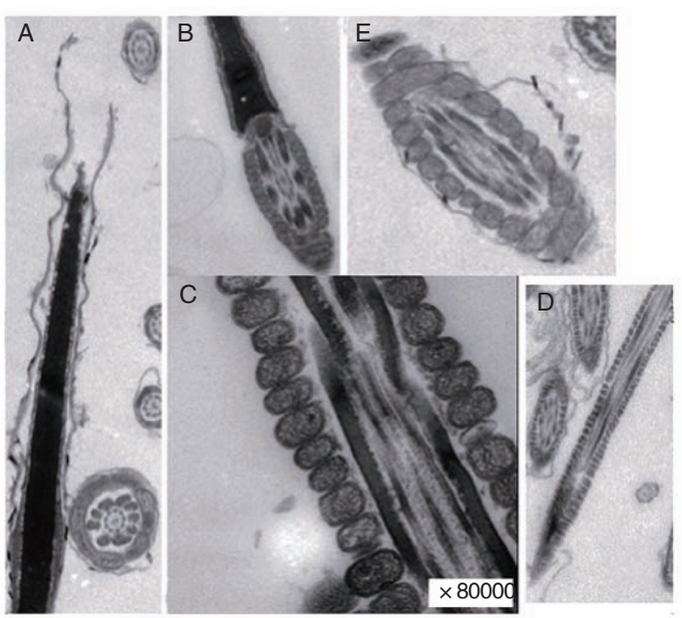



**图17–12　冷冻/解冻精子质膜的缺损**

（A）头部质膜不完整（×20000）；（B–D）质膜完全丢失（×30000～80000）。

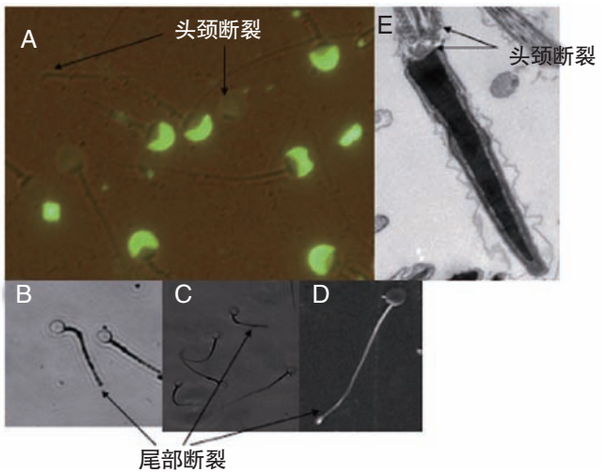



**图17–13　冷冻/解冻精子不同部位间的断裂**

（A）荧光标记显示顶体消失和精子头、颈部断裂（×400）；（B–D）光镜下显示精子尾部断裂（×200）；（E）透射电镜下显示精子头、颈部断裂（×30000）。

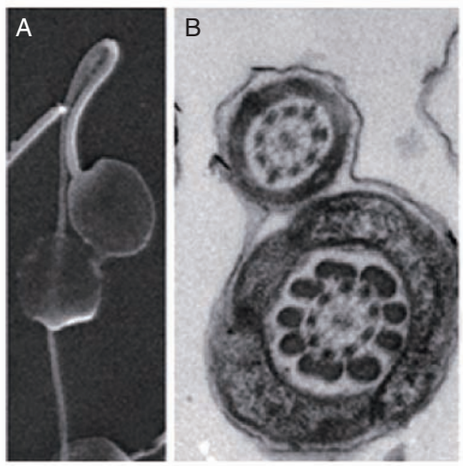



**图17–14　冷冻/解冻精子尾部的弯曲**

（A）透射电镜观察的精子尾部极端扭转（×2000）；（B）透射电镜观察的质膜下折叠（×50000）。

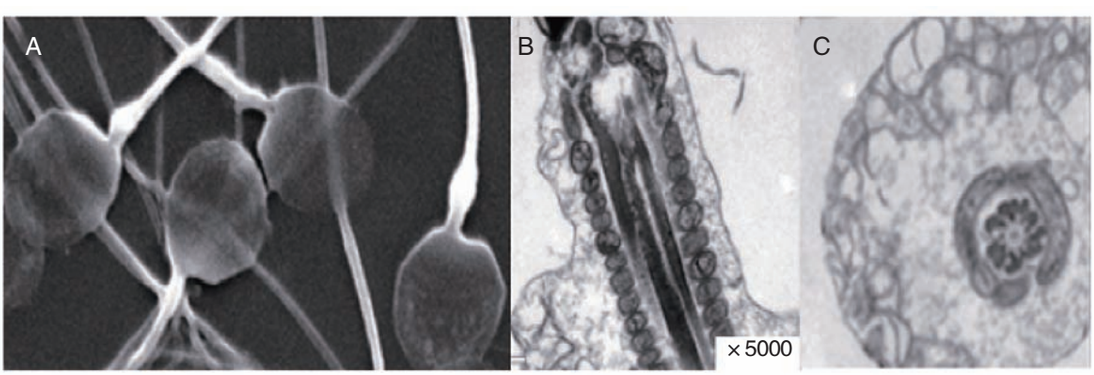



**图17–15　冷冻/解冻精子尾部中段的膨胀**

（A）扫描电镜下精子尾部中段膨大（×2000）；（B、C）透射电镜下精子尾部中段膨大（×50000）。

进行体外受精（in vitro fertilization, IVF），或通过卵胞浆内单精子显微注射技术（intracytoplasmic sperm injection, ICSI）完成精卵结合，形成合子胚胎；在体外进行培养获取不同发育时期的胚胎，将胚胎移植到代孕动物的输卵管或子宫中，检测到有效妊娠时即完成了胚胎移植。

### （一）超数排卵

卵泡和卵母细胞的发育与成熟经过极其复杂的生理过程，并受内分泌激素和细胞因子等作用的调节[65, 66]。理论上讲，只有从生殖周期动物的卵巢内的成熟卵泡中获得的成熟卵母细胞（卵子）才具有后续发育的潜能。但这些卵子极难获取，一方面我们很难掌握动物个体排卵前LH（促黄体生成激素）峰启动的精确时间；另一方面，每个自然周期成熟的卵母细胞仅有一个或者几

个，远不能满足研究工作的需要。因此，一般采用外源激素诱导超生理数量卵巢卵泡发育，得到大量体内成熟的卵母细胞，用于有关生殖生物学机理和实践应用的研究，这一过程称为超数排卵（superovulation），简称“超排”。

关于超数排卵，可追溯到1927年首次发现的小鼠的超排现象[67]，接着1951年成功进行了牛的超数排卵[68]，其它动物研究也相应展开。目前，在家畜和实验动物上的超排技术已经很成熟，并获得一些改进，一定程度上明确了一些影响超排的因素，如季节、年龄、胎次等。实验证明，只有有腔卵泡对外源促性腺激素（eCG、FSH、LH、hCG、HMG等）的刺激敏感而发生应答，由此完成超生理数量卵泡发育成熟。

曹晓梅等[69]用PMSG和HCG给予不同的处理方法尝试诱导树鼩的超排：A组，多次注射PMSG（30～60IU）后，单次注射hCG（30～60IU）；B组，单次注射PMSG（60IU）后，单次注射hCG（60IU）；E组，单次注射PMSG（60IU），结合单次注射hCG（30IU）并加以PMSG（30IU）；C组，仅注射PMSG和D组，仅注射hCG。研究结果表明：B组和E组的成功排卵动物比率均为4/4，平均排卵数分别为3.25 ± 0.48和4.00 ± 0.71。仅注射生理盐水的空白对照组及D处理组均无动物排卵。这些结果提示单次注射PMSG（60IU）结合单次注射hCG（60IU）以及单次注射PMSG（60IU）结合单次同时注射hCG（30IU）和PMSG（30IU）曾被认为是树鼩最简单有效的超排方案。岳惠芬等[70]在实验中分别用不同剂量和组合的促卵泡生成激素（FSH）、那戈瑞林（GnRH）、人绝经期尿促性腺激素（HMG）和国产孕马血清促性腺激素（PMSG）、人绒毛膜促性腺激素（HCG）进行超数排卵实验。结果表明：PMSG 40IU + HCG 20IU组平均获卵母细胞（25.6 ± 3.0）个，明显高于其它实验组（$P<0.05$）。因此，PMSG 40IU + HCG 20IU对雌性树鼩进行超数排卵处理可获得较好的超排效果。

### （二）体外成熟培养及体外受精

树鼩卵母细胞的体外成熟培养和体外受精研究较少。使用促性腺激素进行树鼩超数排卵、TCM199完全培基对卵母细胞进行体外成熟培养、卵母细胞与体外获能的附睾精子进行体外受精，结构观察到受精卵发育至桑葚胚、囊胚。体外成熟培养后，卵母细胞成熟率A级76.7%、B级55.01%、C级17.39%。A级受精率52%。受精卵采用体细胞共培养与非共培养的分裂率分别为37.14%和9.6%，桑葚胚、囊胚发育率分别为13.57%和0[71]。由此可见，树鼩胚胎培养和胚胎发育的研究还很有限。

## 参考文献

[1]彭燕章，叶智彰，邹如金，等．树鼩生物学．昆明：云南科技出版社，1991：89–111，286–93.
[2]陈北亨．兽医产科学．北京：中国农业出版社，2001：667–86.
[3]叶智彰，彭燕章，张耀平．猕猴解剖．北京：科学出版社，1983：201–32.
[4]杨增明，孙青原，夏国良．生殖生物学．北京：科学出版社，2005：17–24.
[5]张远旭，平述煌，杨世华．中缅树鼩精子形态特征及冷冻损伤．动物学研究，2012，33（1）：29–36.
[6]罗其胜．成年树鼩体重、身长和器官解剖正常值的分析．动物学杂志，1984，3：38–40.
[7]Kawamichi T, Kawamichi M. Social system and independence of offspring in tree shrews. Primates, 1982, 23(2): 189-205.
[8]Collins P, Tsang W, Lofts B. Anatomy and function of the reproductive tract in the captive male tree shrew (*Tupaia*

*belangeri*). Biol Reprod, 1982, 26(1): 169-82.

[9]Martin R. Reproduction and ontogeny in tree-shrews (*Tupaia belangeri*), with reference to their general behaviour and taxonomic relationships. Z Tierpsychol, 1968, 25(4): 409-95.

[10]Verma K. Notes on the biology and anatomy of the Indian tree-shrew, *Anathana wroughtoni*. Mammalia, 1965, 29(3): 289-330.

[11]Collins P, Pudney J, Tsang W. Postnatal differentiation of the gametogenic and endocrine functions of the testis in the tree-shrew (*Tupaia belangeri*). Cell Tissue Res, 1987, 250(3): 681-7.

[12]曹筱梅．树鼩（*Tupaia belangeri chinensis*）精子发生的细胞学观察．动物学研究，1986，7（1）：69–77．

[13]Plant TM, Marshall GR. The functional significance of FSH in spermatogenesis and the control of its secretion in male primates. Endocr Rev, 2001, 22(6): 764-86.

[14]曹筱梅．树鼩（*Tupaia belangeri chinensis*）精子发生的季节性变化．动物学研究，1989，10（1）：16–21．

[15]Collins P, Tsang W. Growth and reproductive development in the male tree shrew (*Tupaia belangeri*) from birth to sexual maturity. Biol Reprod, 1987, 37(2): 261-7.

[16]邹如金，季维智，沙临力，等．树鼩（*Tupaia belangeri chinensis*）生长发育的初步观察．动物学研究，1987，8（2）：201–8．

[17]Martin R. Tree shrews: unique reproductive mechanism of systematic importance. Science, 1966, 152(3727): 1402-4.

[18]Langham N. Ecology of the common tree shrew, *Tupaia glis* in peninsular Malaysia. J Zool, 1982, 197(3): 323-44.

[19]陈建泉，于永梅，陈娟，等．雌性树鼩的麻醉和生殖器官解剖与卵母细胞形态特征的观察．中国实验动物学报，2002，10（4）：230–2．

[20]吴凡，苏杨，王季，等．树鼩卵巢和输卵管显微结构观察．上海实验动物科学，1999，19（3）：143–5．

[21]曹筱梅．树鼩（*Tupaia belangeri chinensis*）卵巢的显微结构及不同季节的卵巢活动．动物学研究，1990，11（1）：17–25．

[22]Luckett WP. Morphogenesis of the placenta and fetal membranes of the tree shrews (family Tupaiidae). Am J Anat, 1968, 123(3): 385-427.

[23]Kuhn HJ, Schwaier A. Implantation, early placentation, and the chronology of embryogenesis in *Tupaia belangeri*. Z Anat Entwicklungsgesch, 1973, 142(3): 315-40.

[24]Enzmann E, Saphir N, Pincus G. Delayed pregnancy in mice. Anat Rec, 1932, 54(3): 325-41.

[25]Krehbiel RH. The effects of lactation on the implantation of ova of a concurrent pregnancy in the rat. Anat Rec, 1941, 81(1): 43-65.

[26]Wimsatt WA, Wislocki GB. The placentation of the American shrews, *Blarina brevicauda* and *Sorex fumeus*. Am J Anat, 1947, 80(3): 361-435.

[27]Mossman H. The genital system and the fetal membranes as criteria for mammalian phylogeny and taxonomy. J Mammal, 1953, 34(3): 289-98.

[28]Johansson ED. Plasma levels of progesterone in pregnancy measured by a rapid competitive protein binding technique. Acta endocrinologica, 1969, 61(4): 607-17.

[29]Antikatzides T, Erichsen S, Spiegel A. The Laboratary animal in the study of reproduction. New York: Fischer Stuttgart, 1976: 75-82.

[30]Collins P, Dobyns R, Tsang W. Urinary immunoreactive androgen levels during sexual development in the male tree-shrew (*Tupaia belangeri*). Comp Biochem Physiol A Comp Physiol, 1989, 92(4): 489-94.

[31]Ping S, Wang F, Zhang Y, et al. Cryopreservation of epididymal sperm in tree shrews (*Tupaia belangeri*). Theriogenology, 2011, 76(1): 39-46.

[32]Ping S, Yue F, Wang C, et al. Effects of dimethyl sulfoxide, ethylene glycol, propylene glycol and glycerol on cryopreservation of wild tree shrew (*Tupaia belangeri chinensis*) cauda epididymal sperm. J Anim Vet Adv, 2012, 11(19): 3568-74.

[33]平述煌，王彩云，唐文如，等．几种冷冻稀释液与单胺类防冻剂对中缅树鼩精子冷冻存活率的影响．动物学研究，2012，33（1）：19–28．

[34]White IG. Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: a review. Reprod Fertil Dev, 1993, 5(6): 639-58.

[35]Aboagla EM,Terada T. Effects of egg yolk during the freezing step of cryopreservation on the viability of goat spermatozoa. Theriogenology, 2004, 62(6): 1160-72.

[36]Ortman K, Rodriguez-Martinez H. Membrane damage during dilution, cooling and freezing-thawing of boar spermatozoa packaged in plastic bags. Zentralbl Veterinarmed A, 1994, 41(1): 37-47.

[37]Jones RC, Martin IC. The effects of dilution, egg yolk and cooling to 5 degrees C on the ultrastructure of ram spermatozoa. J Reprod Fertil, 1973, 35(2): 311-20.

[38]Darin-Bennett A, Poulos A, White IG. The effect of cold shock and freeze-thawing on release of phosphiolipids by ram, bull, and boar spermatozoa. Aust J Biol Sci, 1973, 26(6): 1409-20.

[39]Watson PF. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. Reprod Fertil Dev, 1995, 7(4): 871-91.

[40]Mazur P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. Am J Physiol, 1984, 247(3 Pt 1): C125-42.

[41]PH P, HA L. A yolk-buffer pablum for the preservation of bull semen. J Dairy Sci, 1940, 23: 399-404.

[42]Santiago-Moreno J, Toledano-Diaz A, Pulido-Pastor A, et al. Effect of egg yolk concentration on cryopreserving Spanish ibex (*Capra pyrenaica*) epididymal spermatozoa. Theriogenology, 2006, 66(5): 1219-26.

[43]Ritar AJ, Salamon S. Effects of month of collection, method of processing, concentration of egg-yolk and duration of frozen storage on viability of angora-goat spermatozoa. Small Ruminant Res, 1991, 4(1): 29-37.

[44]Dong QX, Vandevoort CA. Effect of egg yolk on cryopreservation of rhesus monkey ejaculated and epididymal sperm. J Androl, 2009, 30(3): 309-16.

[45]Li YH, Cai KJ, Li J, et al. Comparative studies with six extenders for sperm cryopreservation in the cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) and rhesus monkey (*Macaca mulatta*). Am J Primatol, 2006, 68(1): 39-49.

[46]Si W, Zheng P, Tang X, et al. Cryopreservation of rhesus macaque (*Macaca mulatta*) spermatozoa and their functional assessment by in vitro fertilization. Cryobiology, 2000, 41(3): 232-40.

[47]Bavister BD, Leibfried ML, Lieberman G. Development of preimplantation embryos of the golden hamster in a defined culture medium. Biol Reprod, 1983, 28(1): 235-47.

[48]Garde J, Del Olmo A, Soler A, et al. Effect of egg yolk, cryoprotectant, and various sugars on semen cryopreservation in endangered Cuvier's gazelle (*Gazella cuvieri*). Anim Reprod Sci, 2008, 108(3): 384-401.

[49]Rostand J. The influence of sodium fluoride on the sperm of the frog. C R Seances Soc Biol Fil, 1928, 99: 502-3.

[50]Farshad A, Khalili B, Fazeli P. The effect of different concentrations of glycerol and DMSO on viability of Markhoz goat spermatozoa during different freezing temperatures steps. Pak J Biol Sci, 2009, 12(3): 239-45.

[51]Kashiwazaki N, Okuda Y, Seita Y, et al. Comparison of glycerol, lactamide, acetamide and dimethylsulfoxide as cryoprotectants of Japanese white rabbit spermatozoa. J Reprod Dev, 2006, 52(4): 511-6.

[52]Fernandez-Santos MR, Esteso MC, Montoro V, et al. Influence of various permeating cryoprotectants on freezability of Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) epididymal spermatozoa: effects of concentration and temperature of addition. J Androl, 2006, 27(6): 734-45.

[53]Si W, Zheng P, Li YH, et al. Effect of glycerol and dimethyl sulfoxide on cryopreservation of rhesus monkey (*Macaca mulatta*) sperm. Am J Primatol, 2004, 62(4): 301-6.

[54]Fernandez-Santos MR, Esteso MC, Soler AJ, et al. The effects of different cryoprotectants and the temperature of addition on the survival of red deer epididymal spermatozoa. Cryo Letters, 2005, 26(1): 25-32.

[55]Li YH, Cai KJ, Kovacs A, et al. Effects of various extenders and permeating cryoprotectants on cryopreservation of cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) spermatozoa. J Androl, 2005, 26(3): 387-95.

[56]Santiago-Moreno J, Coloma MA, Toledano-Díaz A, et al. A comparison of the protective action of chicken and quail egg yolk in the cryopreservation of Spanish ibex epididymal spermatozoa. Cryobiology, 2008, 57(1): 25-9.

[57]Rasul Z, Ahmad N, Anzar M. Changes in motion characteristics, plasma membrane integrity, and acrosome morphology during cryopreservation of buffalo spermatozoa. J Androl, 2001, 22(2): 278-83.

[58]Mocé E, Vicente J, Lavara R. Effect of freezing-thawing protocols on the performance of semen from three rabbit lines after artificial insemination. Theriogenology, 2003, 60(1): 115-23.

[59]Yildiz C, Kaya A, Aksoy M, et al. Influence of sugar supplementation of the extender on motility, viability and acrosomal integrity of dog spermatozoa during freezing. Theriogenology, 2000, 54(4): 579-85.

[60]Martins SG, Miranda PV, Brandelli A. Acrosome reaction inhibitor released during in vitro sperm capacitation. Int J Androl, 2003, 26(5): 296-304.

[61]Sztein JM, Farley JS, Mobraaten LE. In vitro fertilization with cryopreserved inbred mouse sperm. Biol Reprod, 2000, 63(6): 1774-80.

[62]Futino D, Mendes M, Matos W, et al. Glycerol, methyl-formamide and dimethyl-formamide in canine semen cryopreservation. Reprod Domest Anim, 2010, 45(2): 214-20.

[63]Bianchi I, Calderam K, Maschio ÉF, et al. Evaluation of amides and centrifugation temperature in boar semen cryopreservation. Theriogenology, 2008, 69(5): 632-8.

[64]Kashiwazaki N, Okuda Y, Seita Y, et al. Comparison of glycerol, lactamide, acetamide and dimethylsulfoxide as cryoprotectants of Japanese white rabbit spermatozoa. J Reprod Develop, 2006, 52(4): 511-6.

[65]Adashi EY. The potential relevance of cytokines to ovarian physiology. J Steroid Biochem Mol Biol, 1992, 43(5): 439-44.

[66]Adashi EY, Rohan RM. Intraovarian regulation peptidergic signaling systems. Trends Endocrin Met, 1992, 3(7): 243-8.

[67]Tamura Y. On anovular follicles in the ovaries of the sterile dingo and the aged mouse. J Anat, 1927, 61(Pt 3): 325-8.

[68]Willett EL, Black WG, Casida LE, et al. Successful transplantation of a fertilized bovine ovum. Science, 1951, 113(2931): 247.

[69]Cao X, Ben K,Wang X. Ovulation in the tree shrew (*Tupaia belangeri*) induced by gonadotrophins. Reprod Fert Develop, 2001, 13(6): 377-82.

[70]岳惠芬，翟丹梅，苏建家，等．树鼩超数排卵初探．上海实验动物科学，2004，24（1）：41–2.

[71]岳惠芬，苏建家，李瑗，等．树鼩卵母细胞的体外成熟培养及体外受精．黑龙江动物繁殖，2004，12（1）：5–8.



# 第十八章

Tree shrews

## 树鼩规范化人工繁育

第一篇 树鼩基础生物学
TREE SHREW BASIC BIOLOGY

吕龙宝　陈佳琦　马玉华　王　霜

树鼩（*Tupaia belangeri chinensis*）是一种介于灵长目与食虫目之间的攀鼩目动物，在医学和生物学研究中具有较高价值，名列《国家保护的有益的或者有重要经济、科学研究价值的陆生野生动物名录》及《濒危野生动植物种国际贸易公约》附录Ⅱ。然而，长期以来市场上流通的树鼩基本上都是野生实验用树鼩[1]，不但影响树鼩的应用研究，长此以往，还会对树鼩资源造成严重威胁。因此，树鼩规范化人工繁育具有重大意义。

## 第一节　树鼩饲养环境和设备

树鼩的人工繁育场宜远离居民生活饮用水源、城镇居民区、文化教育科研等人口集中区域和铁路、码头、飞机场、交通要道以及散发大量粉尘和有害气体的工厂、仓库、堆场等有严重空气污染、震动或噪声干扰的区域，与自然疫源地和无害化处理场所、动物屠宰加工场所、动物和动物产品集贸市场、动物诊疗场所、畜禽养殖场等保持一定距离。若无法避开不利区域，应当布置在当地夏季最小频率风向的下风侧。最好选在环境空气质量及自然环境条件较好的区域，地形开阔、阳光充足和避风温暖的地方。同时需要有便利和充足的后勤供应保障（如水、电、给排水系统和交通运输等）。

### 一、饲养环境

树鼩主要分布在亚洲东南部的热带和亚热带地区，在我国主要集中于西南部的云南、四川、贵州、广西等省区。根据树鼩栖息地的环境特点，营造适合树鼩生长繁殖的饲养环境是保障树鼩人工繁育成功的基础。

### （一）环境温度

不适宜的环境温度会影响树鼩的正常生长发育和繁殖。低温环境下树鼩活动量减少、采食量下降，新生、病弱树鼩易死亡。高温除了导致树鼩不爱活动，食欲下降外，还会引起雌树鼩性周期紊乱，妊娠树鼩出现早产、流产、死胎等繁殖障碍，雄树鼩生精能力下降或死精，甚至出现睾丸萎缩，繁殖功能下降。

普通树鼩房内温度应保持在15～28℃范围内，屏障环境温度在20～26℃，一般25℃左右比较适宜[2]。仔树鼩所在的房间，室温控制在25～30℃较为合理，全天低于20℃则不利[2, 3]。新生仔树鼩体表无毛，体温调节机制不健全，若吃奶不足还会加剧寒冷的危害，需要特殊的保暖措施。气温较低时，可采用局部供暖的方法。如在0～14日龄的仔树鼩窝箱内设置红外灯泡（Elstein 20T 100W）保暖，或放入婴儿保育箱保暖，根据仔树鼩的日龄调节温度。

另外，树鼩房内的温度应均匀恒定，温差越小越好。

### （二）环境湿度

相对湿度在40%～70%之间均可。若相对湿度低于10%时，树鼩食欲欠佳，被毛粗糙无光泽且有汗湿感，平均饮水量大增[4]，湿度过高，伴随高温的情况，极易滋生微生物。

### （三）光　照

光周期是树鼩季节性繁殖的信号因子。长光照使树鼩血浆睾酮和雌二醇含量升高，生殖器官发育并且重量增加，进入动情繁殖状态；短光照使树鼩血浆睾酮和雌二醇含量降低，生殖器官萎缩、重量减轻，进入休情状态[5]。因此，在人工饲养条件下，可通过延长人工光照时间促进树鼩的繁殖。

室内长期饲养的树鼩，常会因阳光和人工光照不足发生花斑病（人工饲养条件下会有树鼩出现的块状脱毛现象，多发生在尾部、两后腿外侧、臀部及腰背部）[6]。经阳光照射后，新毛又会长出[6, 7]。树鼩房内应保证每天12～14小时的光照，强度为900lx。

### （四）噪　声

噪声对树鼩的影响较大，尤其是突然响动。噪音不宜超过60dB，并尽可能减小噪音。

### （五）空气质量

空气洁净度可参照其它实验动物的普通环境和屏障环境标准，没有特殊要求。树鼩嗅觉灵敏，饲养员不得使用有浓烈气味的化妆品，与树鼩直接或间接接触的物品不要使用洗涤剂清洗，而用消毒剂浸泡消毒或清洗后高压灭菌处理，避免异味对树鼩造成影响。

## 二、树鼩的饲养笼具

树鼩的饲养空间和巢箱空间的大小不仅要满足树鼩日常活动的需求，也要考虑动物福利的要求[8]。云南地方标准规定树鼩笼具的最小空间为：繁殖笼54cm×45cm×50cm，窝箱30cm×15cm×15cm；实验笼35cm×25cm×30cm，窝箱20cm×10cm×14cm。目前树鼩人工繁育常用的笼具有多种规格，可根据需求和笼具特点进行选择。

中国科学院昆明动物研究所结合30多年的树鼩饲养繁育经验，研制出具有自主知识产权的两种笼具。第一种为人工饲养繁殖树鼩专用笼具，主要由1个笼架和4个笼子（配备可拆卸式窝箱、粪盘、食盒和饮水瓶等）组成。笼子尺寸为60cm × 60cm × 80cm，笼内设有供树鼩休息和活动的栖息杆；窝箱尺寸为35cm × 20cm × 18.6cm，可分成两格，将哺乳后的仔树鼩和母树鼩分开；这种笼具不但可提供充足的活动空间，提高了树鼩的待遇，还有利于仔树鼩的哺乳，提高繁殖成活率（图18–1）。第二种为简单实用的树鼩繁育笼，笼体为3层结构，每层设有3个相通的单元笼，便于离乳、交配时的分笼、合笼等操作（图18–2）。

昆明理工大学设计制造了一种树鼩的标准化饲养装置。由多层笼架、悬挂式笼具、窝箱、水冲式粪尿收集槽、自动饮水器组成。特点是灵活方便，实现了饮水和清粪的自动化（图18–3）。

## 第二节 树鼩的饲料和饮水

树鼩的食性较杂，喜欢吃昆虫、小鸟、水果、叶芽和其它多汁的甜软食物。30多年来，多数研究机构给树鼩提供的饲料，基本上都是由多种单一食物组成的配合日粮或者其它动物的配合饲料。这样的饲喂方式，不但成本昂贵，而且缺乏营养学的理论依据，导致树鼩易患消化道和呼吸道疾病，繁殖力下降[9]。树鼩人工繁育瓶颈的突破，需要改变以往将多种食物简单混合搭配或用其它动物饲料来饲喂树鼩的思路，系统研究树鼩的营养需求，生产科学合理的全价营养饲料。这样既能保证营养均衡，又能有效控制饲料的卫生和质量，减少树鼩的疾病，提高繁殖率和成活率。

### 一、饲料和饮水

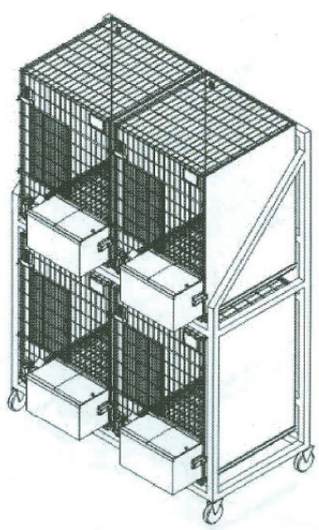


图18–1 人工饲养繁殖树鼩专用笼具立体图

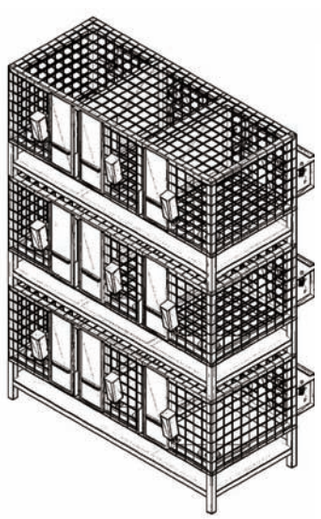


图18–2 简单实用的树鼩繁育笼立体图

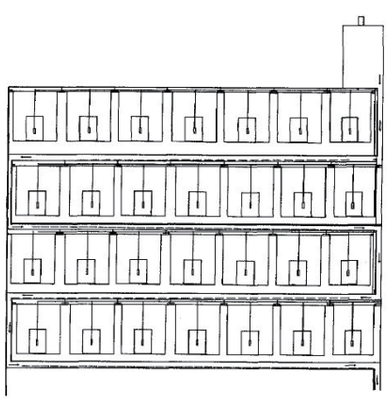


图18–3 树鼩标准化饲养装置示意图

### （一）全价饲料

中国科学院昆明动物研究所根据树鼩的食性和营养需求，经过30多年探索，研制出了一种配合饲料配方，由玉米、豆粕、次粉、奶粉、鱼粉、白糖、添加剂、食用油、磷酸氢钙、鸡蛋和多种维生素等组成，营养成分含量见表18–1。使用该饲料每日饲喂两次，饲喂量为每百克体重30～50g。

表18–1　中国科学院昆明动物研究所树鼩全价饲料营养成分

| 营养成分 | 含　量 |
|---|---|
| 水分（%） | 9.85 |
| 粗蛋白（%） | 20.6 |
| 粗脂肪（%） | 4.32 |
| 粗纤维（%） | 2.4 |
| 粗灰分（%） | 4.6 |
| 磷（%） | 0.49 |
| 钙（%） | 0.73 |
| 镁（mg/kg） | 1470 |
| 碘（mg/kg） | 61.2 |
| 锌（mg/kg） | 68.6 |
| 铜（mg/kg） | 15.3 |
| 钠（mg/kg） | 506 |
| 锰（mg/kg） | 47.2 |
| 硒（mg/kg） | 0.32 |
| 烟酸（mg/kg） | 30.7 |
| 叶酸（mg/kg） | 0.84 |
| 生物素（μg/kg） | 170 |
| VA（IU/kg） | 14300 |
| VE（IU/kg） | 14.4 |
| $VB_2$（mg/kg） | 12.8 |

### （二）青饲料

可供树鼩食用的水果、蔬菜种类较多，可结合上市季节、价格、加工等因素进行选择。果蔬以苹果、甘薯、南瓜等根茎类、果实类为主。饲喂给树鼩的青饲料要保证清洁卫生，饲喂前清洗干净，并经过0.2%～0.3%高锰酸钾溶液消毒。每只成年树鼩每天饲喂量为30g左右。

### （三）饮　水

成年树鼩的饮水量每天约为30～50mL。一般使用饮水瓶或自动饮水系统供水，让树鼩自由饮水。

## 二、应用效果

多年来，中国科学院昆明动物研究所采用上述饲料和饲喂、供水模式，进行树鼩规模化人工繁育，树鼩生长发育正常，死亡率低，繁殖率高，效果良好。

# 第三节 树鼩规范化人工繁育

## 一、树鼩的引进和检疫

树鼩人工驯养的单位需要取得驯养繁殖许可证，通过人工驯养繁殖到子二代才能用于科学实验。2012年云南出台实验树鼩的地方标准，中国科学院昆明动物研究所是全国首家通过树鼩生产许可证认证的单位，目前已建立规模化生产的繁殖种群，向国内外数十家单位提供实验树鼩。

### （一）树鼩的引进

主要通过两种方式引进：一是从其它驯养单位引进；二是从野外抓捕以补充种源。树鼩用于科研实验的运输及野外抓捕、引进新种源须经省、自治区、直辖市野生动物行政主管部门审批。

### （二）树鼩的运输

树鼩运输时应激反应较强，安全运输尤为重要，如果处理不当，极易导致树鼩伤残、患病甚至死亡。

树鼩的运输应使用专用运输箱。中国科学院昆明动物研究所发明的树鼩专用运输箱实用、方便、安全，并有多种型号以适应几只到几十只树鼩的运输需求。运输箱内部空间一般用隔板分成多个单元格，每格中装运树鼩的密度不能过大，以装运1～3只树鼩为宜。装箱时可在运输设备中放置适量干草或秸秆，既能起到保暖作用，还能有效减少相互咬架致伤残及死亡。途中要供给充足的水果等食物，并保证饮水。必要时可使用适量的安定镇静。

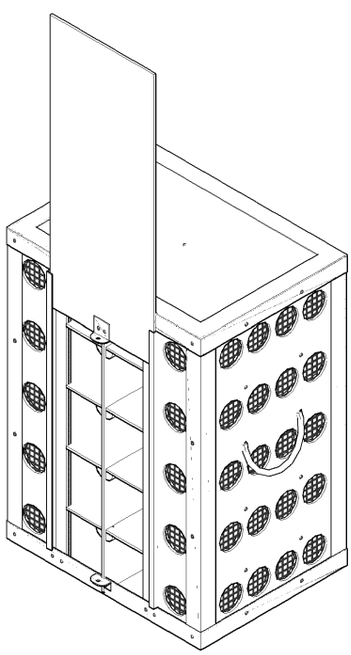


图18–4 树鼩专用运输箱立体图

### （三）树鼩的检疫及管理

1. 树鼩的检疫

（1）检疫前准备：根据引进树鼩的基本情况，做好检疫准备。检疫室及设备在动物引进前应进行彻底的清洗消毒。

（2）动物外观检查：主要检查精神状态，体表有无肿块、外伤，是否残疾，同时对个体进行健康评估，对外伤、疾病、体质差的树鼩应及时治疗、特殊护理和调养。

（3）记录：详细记录相关信息，包括树鼩的来源、产地、种类、体重、性别、数量、出生日期、引进日期、健康状况等。

（4）寄生虫检测：对新进树鼩进行体内、外寄生虫和致病菌的检测和防治。一般野捕新种源都会有寄生虫感染。对检测结果为阳性的个体，根据所感染的寄生虫种类进行针对性驱虫或治

疗，驱虫须彻底，直到检测阴性为止。

2. 树鼩检疫期的饲养管理

新引进的树鼩因环境、饮食等改变，应激反应较大，以致免疫力下降，从而引发疾病甚至死亡。另外，来自不同群体的个体配对饲养，社会等级秩序重新建立，可能会发生激烈的咬斗致残或死亡。因此，适应性饲养期需加强饲养管理，密切观察，出现异常情况及时处理。

（1）饲料过渡和维生素补充：饲料过渡是树鼩适应性饲养的重要环节。提供不适宜的饲料，有的表现为拒绝或减少摄食，有的虽吃食正常，但数天后会出现不同程度的消化系统疾病，甚至死亡。饲喂新鲜苹果和全价饲料熬成的粥，效果较好。适应一段时间以后，可逐渐过渡到蒸制的熟料或颗粒饲料。但要注意严格控制饲喂量，以免树鼩因暴食而发病或死亡。适应饲养期间应供给充足的饮水，另外，可在饮水中补充维生素。

（2）饲养环境的控制：新引进树鼩的饲养环境以“暖、暗、净、少变化”为佳。室温保持在20～25℃较为适宜。新进树鼩，尤其是较胆小的树鼩，喜欢在窝箱内进食和排泄，需定期清理窝箱内污物，以免污染引发疾病。新进树鼩对环境的细微变化非常敏感，因此环境和周围的物体、颜色、气味、饲养员等，应尽量少变化，避免不必要的干扰。

## 二、树鼩繁殖群的管理

### （一）种用树鼩的选择

挑选毛色光滑、精力旺盛、生殖力强、母性好（雌性）的健康树鼩作种用。在繁殖过程中如只选择某些特性，长此以往容易造成另一些特性的消失而出现一些缺陷，因此，要注意避免留种时的偏向[10]。留种时可从以下几个方面进行选择。

1. 年龄和体重

年龄过大的树鼩不宜留作种用。据Eberhard Fuchs和Silke Corbach-söhle的观察，室内饲养的*Tupaia glis*和*Tupaia blangeri*寿命可长达10多年[2]。留种时不选体形过于消瘦或肥胖的树鼩，雌树鼩体重应在130g左右，雄树鼩体重应为140～160g[3]。

2. 健康状况

选择四肢健全，体形丰满，发育正常，被毛有光泽，眼睛明亮有神，行动迅速和反应灵敏的树鼩。微生物检测结果应符合等级要求。一般情况下，自身或家族中患有某种疾病的树鼩不宜留作种用。

3. 繁殖能力

从外观上看，雌树鼩乳头大小均匀，骨盆腔不狭窄；雄树鼩睾丸明显，阴茎长度适宜。也可查阅以往繁殖记录，选择泌乳能力强、繁殖率高的个体留为种用。曾经难产，反复流产、死胎的雌树鼩不宜留作种用。

4. 母　性

选择在人工饲养环境下仍然能保持较好母性，产仔后正确护理仔树鼩，定时哺乳，不咬仔、不食仔的雌树鼩作为种用。

5. 性格特征

选择性格温顺但不胆小、不好斗的树鼩作为种用。

### （二）配对繁殖

1. 树鼩配种要求

树鼩3～4月龄可达性成熟。性成熟的早晚与树鼩的性别、饲养管理水平等因素密切相关。然而，3～4月龄的树鼩虽然达到了性成熟，但此时其身体并未发育完全，过早配对易引起早产、流产和难产，对树鼩的身体也会造成某些不可逆的损坏，影响繁殖率。一般在5～6月龄体成熟后才配对。配种母树鼩体重130g左右、公树鼩体重140～160g为宜。曾经发生难产、产后虚弱的树鼩也不宜再次配种，否则再次产仔时死亡的风险较高。

2. 配对时间

人工饲养条件下，全年均有雌树鼩怀孕，但仍表现出一定的季节性，春夏是繁殖的高峰期，秋冬是繁殖低谷期。因此，可长期配对或根据需要在繁殖高峰期前配对。

非长期配对的树鼩，把握好树鼩的发情规律，注重观察和利用血配等措施可明显提高配对的成功率。母树鼩的发情周期20天左右，发情持续期5～7天，但发情盛期仅13～36小时[3]。发情的树鼩采食减少，比较活跃，表现出某些特殊行为，不断发出响亮的求偶声。求爱期间雄性树鼩会舔自己的阴茎和雌性的外生殖器，喜欢在笼内作翻滚式来回奔跑，或追逐雌性。雌性相对较为安静，也会追逐雄性，或与雄性戏要。树鼩具有产后动情的特点，分娩后即可进行交配，此时配种称为血配。若发生哺乳仔树鼩死亡等情况需要终止哺乳时可及时配种，成功率也会比较高。

3. 配对方式

（1）雌雄配对比例：树鼩属于单雄交配系动物，可采取一雄一雌或一雄多雌的繁殖方式。严禁两只或两只以上的雄树鼩同饲于一笼与雌树鼩配对。虽然在实验室条件下从1∶1～6∶1的雌雄比例似乎都可受孕[11]，但雌雄比例过高，树鼩之间的咬架增多，不但不利于树鼩的生长繁殖，还容易造成树鼩的外伤和死亡。一雌一雄的配对方式便于观察和树鼩的体况维持。一雄配二雌的交配方式，相较于一雄配一雌，树鼩之间咬斗多一些，但繁殖率没有明显差别，对设施设备和劳力的利用率更高。结合繁殖成绩、设施设备、生产成本等因素，树鼩的人工繁育宜采用一雄配一雌或一雄配二雌的配对方式较好。

（2）随机配对与固定配对：固定组合配对成功受孕的树鼩，下一次重新配对，交配受孕率一般都会比较高。随机配对树鼩需要一定时间的磨合，也有少数树鼩出现相处不和的情况，应重新进行调配。

（3）长期配对与定期配对：在人工繁育条件下，树鼩雌雄长期同笼饲养，咬斗比雌雄仅交配时合笼的要多一些，这可能与树鼩的领域性和家族群居生活的短暂性有关[3]。另一方面，定期配对还便于观察，调养树鼩体况，受孕率也略优于长期配对树鼩。

（4）配对前后的饲养管理注意事项：长期配对的树鼩，妊娠检查的同时进行配对，能大大减少对树鼩的应激。妊娠检查时查看树鼩体况和有无外伤，决定是否继续配对。对不适宜配对的树鼩及时进行淘汰。定期配对的树鼩，雌雄树鼩分笼饲养10天后再合笼，一般合笼饲养时间为20天。在分笼期间加强营养供给，增强繁殖树鼩体质。

配对期间，要特别留意观察，尤其刚配对后的几天。在雄树鼩求爱追逐的初期，雌树鼩常躲避，有的甚至攻击雄树鼩，3～5天后，雌性才有接受的表示。若发现雌雄树鼩合笼后出现激烈的角斗或者处于劣势者躲在窝箱内不敢外出进食，体形消瘦，则需及时分笼饲养。配对失败后应重新调配，并做好记录。

### （三）妊娠检查

1. 妊娠检查时间

长期配对树鼩每20天左右检查一次，定期配对树鼩在配对后20天左右进行检查。

2. 检查方法

简便而较有效的妊娠诊断方法是“触诊”：将树鼩腹部向上平托，食指中指并拢，轻轻在其腹部移行。若摸到子宫内有多个滑块状物，可诊断为怀孕。有条件的情况，B超检查结果更准确。

3. 妊娠检查注意事项

（1）妊娠检查前1小时内最好不要饲喂质地坚硬的饲料或水果，检查时明确区分肾、食物和胚胎的位置和触感，避免误判。

（2）检查时要保定好，“触诊”动作轻柔缓慢，减少对树鼩及腹中胎儿的伤害。

（3）熟悉妊娠树鼩的生理、行为变化，可为判断树鼩是否怀孕提供重要参考信息。雌树鼩妊娠之后，新陈代谢加强，体重增加，被毛光润。尤其怀孕3周以后，食欲显著增加，体形开始肥胖，腹部膨大，行动变得迟缓。从怀孕第4周起乳腺开始发育[12]。少数雌树鼩受孕后5～7天有妊娠呕吐反应的现象，分娩前3～4天有明显的筑巢活动[13]。

### （四）妊娠、哺乳期树鼩的饲养管理

一般树鼩的妊娠期为41～45天。仔树鼩哺乳35～45天就可以离乳单独饲养，哺乳期也可以延长，但会影响下一胎的繁殖。

1. 饲养条件

确定雌树鼩妊娠后，就应与雄树鼩分开，转入专用繁殖笼中给予特殊照料。为妊娠哺乳树鼩营造安静舒适的环境，尽量减少人为干扰。固定专人饲养，严禁生人进入引起应激性流产、咬仔。

2. 营养补充

树鼩在妊娠期和哺乳期需合理提高营养水平，严禁饲喂变质饲料和水果，以防引起流产或胎儿畸形。

保证充足、洁净的饮水，尤其是高温季节。母树鼩产前、产后饮水量会加大，产后饮水不足会造成叼仔、吃仔的现象。

3. 日常观察

饲养妊娠哺乳树鼩，要每天认真观察树鼩的体况、食量、粪便及活动情况，掌握树鼩的详细情况，发现异常及时处理。临近分娩的树鼩，除日常观察外，每天7：00、19：00各增加一次巡查，重点观察生产情况。

4. 分娩前后的特殊护理

（1）预测分娩时间及产前工作准备

准确判断树鼩的分娩时间，是提高新生仔树鼩成活率的关键。对树鼩分娩时间把握得好，分娩后得到及时护理的仔树鼩成活率就相对较高。

妊娠检查时根据胚胎的大小估计预产时间。多年的经验表明，胚胎有豌豆粒大小，正常分娩时间一般在30天后，有蚕豆大小，正常分娩一般在20天后。若胎儿死于腹中，往往分娩时间会推后几天甚至十几天。

饲养过程中认真观察，结合树鼩的分娩征兆，进一步提高预测分娩时间的准确性。树鼩分娩前，在生理、形态及行为方面都会发生一系列的变化，称为分娩预兆。绝大多数树鼩临产前腹部饱满、下垂，活动量减少，分娩前3～4天有明显的筑巢活动。有的母树鼩对外界环境高度敏感，频繁活动于窝箱和笼之间，也有的树鼩临产前一天突然减食或不食。

产前3～7天，在巢箱内均匀铺设干草或毛毯等筑窝保暖材料，防止新生幼仔直接与巢箱底接触而受凉。定期更换窝箱内的保暖材料，保持窝箱干燥清洁。

（2）正常分娩及护理

树鼩的分娩多数集中在清晨和黄昏，其它时间也会有树鼩分娩。雌树鼩通常在窝箱内产仔，极少在窝箱外。产程一般需要0.5～2.0小时，超过2.0小时大多为难产。一胎产仔1～6只，大多2～4只。如有发生母树鼩在窝箱外产仔的情况，需将树鼩引导至窝箱内分娩。

正常情况下，母性好的树鼩产仔后会自行处理胎膜和脐带，哺乳完毕后将窝内保暖物品覆盖好才会离开窝箱（图18–5）。母性差或少数初产的树鼩不会护理新生幼仔，造成仔树鼩被饿死、冻死、踩死或咬死（图18–6）。另外，分娩前后或哺乳期内受惊吓，母树鼩可能会拒绝哺乳甚至咬仔、食仔。一般分娩结束应及时查看新生仔树鼩的基本情况，采用人工辅助哺乳或者全人工乳喂养的方法让新生活仔吃饱后，将其用毛巾包裹起来，放入婴儿保育箱，并作详细记录。

（3）非正常生产及护理

发现树鼩难产，需进行助产或剖腹产，助产或剖腹产应由兽医执行，以尽可能挽救母树鼩和胎儿及最小化损伤母树鼩繁殖力为原则。难产极易引起新生仔树鼩的死亡并严重危害母树鼩的生命和生殖能力。种用雌树鼩应注重选育，避免过早配种，保证合理营养，提供适宜的活动空间。

树鼩剖腹产在临产当天进行手术最好，同时准备代哺乳母树鼩或全人工饲养的婴儿保育箱和配方调制奶粉，保障新生仔树鼩能及时哺乳。剖腹产也是今后建立无特定病原体级树鼩，甚至无菌级树鼩的重要手段。



图18–5　刚哺乳后的新生仔树鼩



图18–6　被母树鼩咬死的新生仔树鼩

## 三、仔树鼩的培育

### （一）仔树鼩的护理

笼舍空间狭小、饲喂制度不科学、陌生的气味和颜色、噪声、物体运动等都可能对树鼩“母子”和谐关系建立产生负面影响，导致幼仔被母树鼩放弃而死亡[14]。日常饲养管理中尽可能减少不利因素影响，对出生后一周内的仔树鼩给予悉心照料。直接或间接接触新生树鼩时，都应配戴干净的PE手套。固定专人照料，频繁更换饲养员会引起母树鼩拒绝给新生树鼩哺乳。

母树鼩分娩后饲养员应及时检查哺乳、体温、精神、性别等基本情况，详细记录新生树鼩数量、性别、出生日期等信息。

未吃到足够初乳的仔树鼩，若体表红润，体温略低，用毛巾包裹后放入婴儿保育箱内保暖，一般半个小时后体温恢复正常，即可再次哺乳；体表苍白或呈灰黑色，体温偏低，及时进行人工哺乳，再用热毛巾包裹后放在婴儿保育箱内保暖。

### （二）仔树鼩的哺乳

哺乳方式：人工饲养条件下，仔树鼩的哺乳方式可分为自主哺乳、人工辅助哺乳和全人工哺乳3种方式。

1. 母树鼩自主哺乳

母树鼩自主哺乳是通过仔细观察，提供适宜的、符合树鼩生物学特性的饲养管理条件，让仔树鼩完全由母树鼩自然哺育。

自主哺乳是一种省时、省力、经济的方式，也符合动物的天性，是进行树鼩实验动物化工作需重点突破的关键问题。然而，自主哺乳的条件尚未成熟：一是需要符合树鼩生物学特性的人工饲养条件；二是要树鼩驯化程度高，母性好[15]，抗应激能力强，能较好适应所提供的人工饲养管理条件。

在饲养管理过程中，一方面要不断改善饲养条件，另一方面要积极发现和选留在人工饲养条件下能自主哺乳的树鼩，加强自繁树鼩的驯化。人工繁育出来的仔树鼩，饲养员多接触驯养，让其喜欢与人接近。选择胆大、乐于与人接触的树鼩进行繁育，若干代后建成品系的希望会很大。

2. 人工辅助哺乳

人工辅助哺乳是指母树鼩哺育幼仔的过程中，加以人工协助和控制，人为将出生后仔树鼩与母树鼩隔离，仅在哺乳时将仔树鼩放回窝箱内与母树鼩接触。虽然人工辅助哺乳需要一定的人力、物力投入，却是时下应用最为广泛的方法，技术也较为成熟。原因在于目前树鼩驯化程度还不高，可能人工驯养条件与野生条件存在某些细小而关键的差异所致，一些母树鼩照料不好仔树鼩，若不加以人工干预，仔树鼩多死于饥饿、寒冷，有的甚至被母树鼩踩死、咬死，成活率极低[16]。哺乳后母子分离也便于对仔树鼩进行护理，保障成活率。

人工辅助哺乳过程中需要注意一些细节。哺乳时间不宜过久，15～20分钟为宜，不要超过30分钟[17]。根据乳汁分泌情况每24小时或48小时哺乳一次。遇到母树鼩拒绝哺乳或乳汁分泌不足的情况，分析原因，针对性处理。有的母树鼩产仔较多，分泌的乳汁量难以满足仔树鼩的需要，可考虑将部分仔树鼩交由其它母树鼩代养。有的母树鼩刚分娩后乳汁较少，经过数次仔树鼩的吸吮刺激，乳汁分泌会慢慢正常，这种情况若仔树鼩偶尔吃奶不足，适当增加哺乳次数即可。有的母

树鼩某胎次持续性分泌乳汁较少，几天后即停止分泌乳汁，尽快找母性好、乳汁分泌较好的“奶妈”代养。有的母树鼩突然受惊、乳房刺激不够或者哺乳节律被严重打乱，乳汁分泌也会出现异常，这就需要从日常饲养管理角度入手，尽量避免。

还有一种特殊的人工辅助哺乳方法，当母树鼩和仔树鼩接触时哺乳失败，可对母树鼩进行人工保定后让仔树鼩哺乳。保定时让母树鼩保持侧卧姿势，露出乳头，依次放入幼仔口中吮吸乳汁。但这种方法费时费力，易惊吓到母树鼩，操作时应尽可能减少对树鼩的应激。

3. 全人工哺乳

全人工哺乳是母树鼩和幼仔完全分离，用人工配制的乳替代树鼩母乳喂养仔树鼩的方法。树鼩乳脂的含量为25%左右[2]，可能还有一些不确定的成分，使用配方不合理，饲喂的幼仔常因消化不良、腹泻、腹胀、体质消瘦而死亡（图18–7至图18–9）。



**图18–7　4日龄胃胀、体质消瘦的全人工乳喂养仔树鼩**



**图18–8　20日龄全人工乳喂养被毛粗乱、生长缓慢的仔树鼩**

Tsang & Collins PM介绍了一种相对成功的马来西亚新生树鼩人工乳配方：将384mL浓缩奶、284mL巴氏灭菌奶、30mL玉米糖浆、2个蛋黄和一定数量的VD充分混匀。人工配方乳要保证卫生新鲜，材料和用具认真清洗消毒，最好现配现用，如一次用量少，则将多余部分分成多份在–10℃下保存备用，但不能过久。需要哺乳时取出水浴加热，保持适当温度，用滴管或0.5mL注射器喂奶。喂奶时密切配合仔树鼩的吞咽节奏推动注射器，推得过快易引起胃胀气、吸入性肺炎，严重的导致窒息死亡[18]。



**图18–9　21日龄全人工喂养发生肝肿大、尿潴留、胃壁点状出血的仔树鼩**

树鼩全人工哺乳尚处于探索研究阶段，当不得不采用人工辅助哺乳联合全人工哺乳时，应首先考虑母乳喂养和“奶妈”寄养，其次才是全人工哺乳，并且要严格控制全人工哺乳的次数，否则仔树鼩易出现多种消化问题死亡[19]。中国科学院昆明动物研究所通过多年树鼩全人工哺乳的探索，在配方乳、哺乳方法、护理等方面取得较好进展。

### （三）仔树鼩的离乳

1. 离乳时间

仔树鼩28日龄左右就会出窝箱觅食，饮奶量逐渐减少，35日龄时基本能独立生活，可以考虑离乳，一般35天后离乳比较适宜。

2. 离乳方法

采用“母离子不离”的方式，将母树鼩转至新笼，仔树鼩留在原笼饲养一星期后再分开进行单笼饲养。

3. 仔树鼩的离乳过渡饲养

仔树鼩的离乳是生长发育过程中的一个极其重要的环节。食物、环境发生巨大改变，身体迅速生长，各功能器官必须在短期内做出大幅度调整以适应这些变化。如果过渡不好，极易感染疾病死亡。

在离乳过渡期应根据仔树鼩需要，增加营养水平，促进仔树鼩的生长发育，但要特别注意营养的均衡。饲料的给量要逐渐增加，不可一次突然过量。尤其在40～90日龄的采食高峰期，不要投料过多，防止暴食死亡。

在此期间，除了注意合理过渡外，还应加强观察，发现异常及时处理。仔树鼩在30日龄之后便会相互攻击和角斗，严重的甚至造成个体死亡，极少数母树鼩也会攻击这个时期的幼仔。一旦发现这些情况，应及时分笼饲养。

## 第四节 树鼩常见疾病及其防治

树鼩在自然状态和实验室条件下寄生虫及一些疾病的病理分析，在《树鼩生物学》（彭燕章、叶智彰等，昆明：云南科技出版社）第三篇已有介绍。现对规模化树鼩人工繁育出现的几种常见疾病进行简要概述。

人工驯养繁育树鼩以传染性胃肠炎、肺炎、外伤、肝炎、结膜炎、肿瘤、阴茎炎等较为常见，对规模化人工繁育造成影响，有待进一步加强树鼩自发疾病的防治和深入研究。其中传染性胃肠炎是首要疾患；依次是肺炎、外伤。肺炎冬春季易发，外伤在繁殖季节较为突出；其它如寄生虫感染（子代树鼩一般少见；野捕树鼩多数都会感染，一般在检疫期都做彻底处理）、阴茎炎、肝炎、结膜炎、肿瘤等疾病都偶有发生。规模化人工繁育树鼩主要常见疾病归纳概述如下：

### 一、传染性胃肠炎

传染性胃肠炎在树鼩群体中发病率高，发病急，流行快，尤其2～4月龄的树鼩和野外捕获适应饲养过渡树鼩易发，在规模化人工繁育种群中应引起足够重视。

临床症状：发病初期，食欲下降，便稀，粪便颜色为黑红色、黑色或呈现似未消化食物残渣。进一步精神萎靡，厌食或拒食，出现明显的脱水症状，眼窝下陷、消瘦；被毛蓬松，肛门周围潮湿；皮温下降、头低蜷缩不动。如未得到及时治疗1～3天将死亡。

尸体剖检：常见肛门周围粘着黑红色稀粪便。多数胃、肠鼓气，小肠壁充血、出血，肠系膜

淋巴结充血肿大，剪开肠壁有点状、片状出血或出现片状糜烂。严重者肠管坏死。

防治：发现此病例，立即隔离治疗，并对饲养房及笼具进行严格消毒，发病动物房的树鼩与正常群体隔离，并安排专人饲养，密切观察群体中是否有树鼩继续发病，严格控制疾病流行传播，必要时可对发病房间树鼩进行预防性给药。可用复方磺胺甲基异唑（复方新诺明）、氨苄青霉素、诺氟沙星等口服或肌注治疗3～5天。同时注意保暖，补充维生素和口服补液。一般做到早发现早隔离治疗，治愈率可达85%以上，严重感染者可直接处死，并作无害化处理。

## 二、肺　炎

树鼩肺炎是仅次于胃肠炎的一种常见疾病，对树鼩群体健康影响也比较大，其病原菌主要通过呼吸道感染致病或因自身抵抗力下降引起发病，一般新引进检疫树鼩和10～20日龄树鼩发病率比其它群体高。饲养管理条件不当可传播，乃至暴发。及早发现并隔离治疗、治疗效果也比较理想。

临床症状：活动减少、食欲减退、发热、呼吸急促，偶尔可见流鼻涕、不愿出窝箱活动、精神萎靡等。

尸体剖检：整个肺叶大面积充血、出血，两肺点状或块状出血，肺叶实变病灶部呈鲜红色或暗红色。细支气管充血或出血。部分树鼩胸腔内有少量淡黄色积液。

防治：发现肺炎病例，及时隔离治疗，并对饲养房及笼具进行严格消毒，保持树鼩房通风或空气清新，保暖，对发病动物房内树鼩与正常群体隔离饲养，由专人饲养严格控制疾病流行传播，必要时可对发病房间树鼩预防性给药。肺炎主要有细菌性肺炎、病毒性肺炎和支原体肺炎。树鼩多以细菌性肺炎最为常见，及早发现及早治疗，使用阿莫西林、头孢唑啉钠等药物治疗效果比较好。病毒性肺炎以对症治疗为主，使用利巴韦林并结合抗生素预防继发性细菌感染治疗；支原体肺炎使用红霉素、阿奇霉素治疗。

## 三、外伤性创伤

树鼩外伤主要由咬架所致，一般繁殖配对初期、繁殖季节、30～45日龄及应激反应时咬架较为常见。

临床症状：外伤主要在头部、颈部、背部以及尾部等，皮肤损伤、重者骨头外露，出血、创围肿胀等。

防治：主要以防为主，对繁殖配对初期、繁殖季节、30～45日龄树鼩密切观察，出现咬架等攻击行为，应及时调整。出现外伤及时清创消毒处理，并使用抗生素治疗，防治感染。

另外几种散发常见疾病：肿瘤、阴茎炎、肝炎、结膜炎等，必要时可进行治疗，一般治疗价值不高，可用于科学研究或淘汰处理。

## 参考文献

[1]沈培清，郑红，刘汝文，等．中国树鼩实验动物化研究进展和展望．动物学研究，2011，32（1）：109–14.

[2]Robert H, James K. The UFAW handbook on the care and management of laboratory and other research animals (8th). Oxford, UK: Wiley-Blackwell, 2010: 263-9.

[3]翟丹梅，岳惠芬，李瑗，等．树鼩的人工饲养与管理．广西农业生物科学，2004，22（1）：38–42.

[4]周顺长，蔡红琳，周明，等．人工饲养条件下树鼩的生物学特性观察．上海实验动物科学，1993，13（1）：33–47．
[5]肖薇，李永材．人工光周期及致盲对树鼩繁殖的影响．云南大学学报（自然科学版），1994，16（2）：168–73.
[6]彭燕章，叶智彰，邹如金，等．树鼩生物学．昆明：云南科技出版社，1991：76．
[7]Elliot O, Wong M. Piebadism in the tree shrews. Primates, 1973, 14(2-3): 309-14.
[8]王艳蓉，孙淑华，杨旭，等．实验动物的环境与福利．中国比较医学杂志，2009，19（2）：79–81．
[9]仝品芬，高家红，匡德宣，等．实验树鼩配合饲料的研究与应用．中国比较医学杂志，2012，22（4）：36–42.
[10]卢延龄．实验动物的繁殖与选育．上海畜牧兽医通讯·实验动物科学专辑，1981（1）：28–33．
[11]Morris JH, Negus NC, Spertzel RO. Colonization of the tree shrew (*Tupaia glis*). Lab Anim Care, 1967, 17(5): 514-20.
[12]于永梅，吴一迁，罗海涛，等．树鼩的实验室繁殖．动物科学与动物医学，2001，19（5）：29–30．
[13]于永梅，吴一迁，罗海涛，等．妊娠树鼩生活习性的初步研究．四川畜牧兽医，2002，29（3）：27–8．
[14]刘春燕，张万新，于永梅，等．笼养仔树鼩死亡的关键时期及死亡原因分析．黑龙江畜牧兽医，2008，（6）：100–1．
[15]江勤芳，匡德宣，仝品芬，等．树鼩规模化繁殖及繁殖群的建立．实验动物科学，2011，28（6）：35–8．
[16]邹如金，季维智，沙临力，等．树鼩（*Tupaia belangeri chinensis*）的繁殖. 动物学研究，1987，8（3）：231–7.
[17]钱玉婧，蒋金萍，张瑞忠．树鼩人工哺育初步研究．实验动物与比较医学，2008，28（2）：129–30．
[18]李瑗，Karen B，Denise M，等．树鼩实验种群的繁育．动物学杂志，2001，36（3）：32–6．
[19]梁亮，李瑗，杨春，等．树鼩实验室繁殖及育幼的探讨．四川动物，2005，24（2）：199–201．

# 2 第二篇
# 疾病树鼩模型

## TREE SHREW ANIMAL MODELS


- 第十九章　抑郁症树鼩模型
- 第二十章　树鼩与药物成瘾
- 第二十一章　情绪相关精神疾患的树鼩模型
- 第二十二章　树鼩病毒感染模型的研究
- 第二十三章　树鼩细菌感染模型
- 第二十四章　树鼩乳腺癌模型研究
- 第二十五章　树鼩胶质母细胞瘤模型
- 第二十六章　树鼩血栓疾病动物模型
- 第二十七章　树鼩代谢性疾病模型
- 第二十八章　利用树鼩精原干细胞建立转基因树鼩的尝试



# Tree shrews



# 第十九章

第二篇 疾病树鼩模型
TREE SHREW ANIMAL MODELS

Tree shrews

# 抑郁症树鼩模型

王 静 徐 林

## 第一节 抑郁症

抑郁症是一种常见的精神疾病，影响到20%的全球人口[1~3]，是致残率、自杀率和经济负担等危害最严重的十大疾病之一[4]。抑郁症的主要特征是情绪、奖赏、记忆等脑高级功能紊乱[5]。

目前抑郁症的发生机理和抗抑郁症药物的作用机理均不完全清楚[6, 7]。临床上现有抗抑郁症药物几乎都作用于中枢单胺类神经递质系统[8, 9]。但这些抗抑郁症药物并不令人如意，如仅对大约30%～50%的患者有效，有显著的疗效个体差异，需要连续服用4～8周后才产生显著疗效，维持服用也可能复发和毒副作用等[10]。

保守估计我国有3000万抑郁症患者，其中重症抑郁症患者的自杀行为高达15%～25%。近年来，临床治疗抑郁症取得突破性进展，发现NMDA（N-methyl-D-aspartic acid）受体拮抗剂氯胺酮（ketamine）在亚麻醉剂量下能快速地产生抗抑郁症疗效，起效时间大约为110分钟，并且单次给药后抗抑郁症的疗效可维持一周以上[11]，提示抑郁症是一种以谷氨酸受体功能性障碍为主的精神疾病，从而为抑郁症的谷氨酸假说奠定了根本基础[6]。因此，全球科学家们正期待着，针对谷氨酸受体的新一代抗抑郁症药物有望在临床上取得巨大成功。

## 第二节 抑郁症发病机理假说简介

病因学是研究发病机理的核心内容，抑郁症的病因学主要有：单胺类神经递质假说、神经营养因子假说、成年海马神经元新生假说、奖励缺失假说、应激假说、神经可塑性假说和谷氨酸受体功能假说等。

## 一、“单胺类神经递质”假说

20世纪50～60年代单胺类抗抑郁症药物的发现具有里程碑式的重大意义，因为这些药物一直是治疗抑郁症的主要途径[10，12，13]，也让人类首次认识到抑郁症具有生物学基础。然而，人类对抑郁症的认识也因此停滞不前，单胺类药物对大约30%～50%的患者有效、服用单胺类抗抑郁症药物还可能增加自杀风险等[10，14]。随后的研究进展表明，抑郁症的发生机理远比“单胺类神经递质”假说更加复杂[15，16]。

## 二、“神经营养因子”假说

脑源性神经营养因子（brain-derived neurotrophic factor, BDNF）是成年哺乳动物中枢神经系统分布最广、含量最高的神经营养因子，对神经元的存活、分化、神经再生、突触传递和突触可塑性具有重要作用[17]。大量研究表明BDNF参与抑郁症的发生、发展过程。临床研究发现未进行抗抑郁治疗的重症抑郁症患者和抑郁性格表现的志愿者血中BDNF浓度比正常健康志愿者低[18，19]，并且这种低水平的BDNF可以通过抗抑郁治疗得到纠正[20，21]。在动物模型中脑内注射BDNF也可以逆转抑郁样行为[22]。由此提出了抑郁症发病机制的“神经营养因子”假说，认为脑源性神经营养因子缺乏导致抑郁症的发生，而增加脑内脑源性神经营养因子的表达有抗抑郁作用。

## 三、“成年海马神经元新生”假说

越来越多的证据表明成年海马神经元新生与重症抑郁症之间存在密切关系，阻断成年海马神经元新生，抗抑郁症药物就失去其疗效[4，23，24]，故而人们提出了抑郁症的“海马神经元新生”假说。众多研究从不同角度提示神经新生在抑郁发生、发展以及治疗中发挥重要生理功能[25～27]，海马齿状回神经元新生已经成为治疗抑郁症的热点之一。但是抑郁症神经元新生异常的机理、抗抑郁药促进神经元新生的调控等有待深入研究。至少这种机理与氯胺酮的快速起效并没有直接关系。

## 四、“奖励缺失”假说

“奖励缺失”假说起源于临床观察，一些抑郁症患者摄吸成瘾性药物如鸦片、大麻等能快速、有效地控制抑郁症症状，也因此成为吸毒的动机假说[28～30]。最近临床发现氯胺酮的快速抗抑郁症疗效很可能也与氯胺酮的奖赏效应存在密切关系，因为氯胺酮也是一种已知的成瘾性药物[11]。

## 五、“应激”假说

临床和流行病学研究发现应激是抑郁症发生的重要危险因素[31，32]。应激是指人或动物在生理上的适应和心理上的激活，是体内的警示系统，只要在期望与事实之间存在矛盾就会引发应激事件。应激反应是人类生存所必需的，过高或过低的应激水平均不利于机体存活及发展，适度应激本身无害也不会引起疾病，但是长期持续处于高应激状态时，身体和大脑的稳态会受到威胁而产生精神疾病[33]。因此应激病因学的抑郁症动物模型是目前最为广泛使用的动物模型研究抑郁症发病机制。

## 六、“神经可塑性”假说

无论单胺类神经递质假说、神经发育假说、奖励缺失假说、应激假说等，最终可能归结为

神经可塑性的异常，涉及的不同治疗抑郁症的靶点也最终可能调控神经可塑性[34]。大脑功能区别于其它器官的最大特点是可塑性，也正因为可塑性赋予了大脑的非凡能力，如计算、思维、情绪等。

### 七、“谷氨酸受体功能”假说

神经可塑性的根本基础是谷氨酸受体如NMDA受体[35]。根据氯胺酮的快速疗效[36]，谷氨酸受体功能假说结合了神经营养因子假说和应激假说，认为应激导致神经营养因子缺失，进而导致NMDA受体激活而引发长时程抑制（long-term depression, LTD）样过程；抗抑郁症药物氯胺酮则阻断NMDA受体引发长时程增强（long-term potentiation, LTP）样过程[6，37～39]。

## 第三节 抑郁症的动物模型

首先抑郁症动物模型必须要满足发病机理与人类抑郁症一致（construct validity）[40]，例如临床上应激是导致抑郁症的主要病因之一，在创建动物模型中使用应激就具备了这种类型抑郁症的发病机理一致性。尽管对复杂的抑郁症来说，要很好地实现动物模型和人类抑郁症的发病机理一致性是几乎不可能的，但是研究结果却能帮助我们去推测抑郁症发生的根本基础。实际上，现有的抑郁症动物模型很多是基于基础研究进展。例如，众所周知的习得性绝望（learned helplessness）抑郁症动物模型。基础研究发现，同样的足底电刺激，如果动物有逃跑平台和没有逃跑平台，前者对海马LTP没有损伤，而后者损伤海马LTP[41]。经历了没有逃跑平台的训练后，动物则表现出逃跑（动机）缺陷，被称为习得性绝望[42]。这一发现反过来为理解一些类型的抑郁症提供了重要的生物学基础，不可逃避的应激损伤突触可塑性可能是抑郁症发生的重要病因。然而，抑郁症的病因不可能仅仅是应激。抑郁症可发生在一生的任何时间。流行病学调查发现，抑郁症的发病高峰年龄主要是18～25岁，其次是45～50岁和65岁，正是人类的社会功能发生转折的年龄。不同的发病年龄预示着抑郁症具有不同的发病机理。抑郁症的遗传关联分析也支持了这种区别，发病年龄越早，疾病的遗传贡献越高[1，4，10]。受到广泛关注的一项工作是Caspi等[43]发表在*Science*的报道，表明五羟色胺（5–HT）转运体长链和短链基因型本身与抑郁症发生无关，幼年期经历应激生活事件（受虐待次数）和短链基因型的相互作用导致抑郁症的发病率显著增加。与此相一致的是，抑郁症的遗传关联分析至今未能得到明确结果[44]。最近临床研究发现，氯胺酮能在110分钟内产生显著的抗抑郁症疗效，而氯胺酮是NMDA受体的拮抗剂，本身能诱导突触效能的LTD。提示抑郁症的遗传贡献可能存在极大的个体差异，因而难以获得显著结果，但是当与环境因素相互作用时，就导致一些人经历应激毫无影响，而另一些人经历不是太严重的应激却患抑郁症。值得注意的是，应激在抑郁症中的贡献可能是主要的，因为最近荟萃分析（Meta–analysis）的结果显示遗传易感基因、基因与环境交互作用等均无显著性，而应激生活事件与抑郁症的发生存在显著关联[44]。因此，创建抑郁症的动物模型时，广泛使用了应激为病因的动物模型，如强迫游泳，悬尾测试、慢性不可预知温和应激（chronic unpredictable mild stress, CMS or CUMS）、习得性绝望等基于应激的抑郁症动物模型。

其次抑郁症动物模型必须满足行为表象与人类抑郁症的一致性（face validity），例如强迫游

泳模型中不动时间或CMS模型中糖水偏爱与人类抑郁症症状可能一致或相似。相比发病机理一致性来说，表象一致性却更加困难，甚至迄今我们还不知道是否大鼠、小鼠真正具有抑郁症表型，或简单讲这些动物是否患抑郁症。目前广泛应用于评价抑郁症样行为的指标有强迫游泳和悬尾测试的不动时间、慢性不可预知温和应激后的糖水偏爱、习得性无助后的逃跑潜伏期和成功次数、单胺类耗竭后的体温等。然而这些行为学指标受到影响的因素极其复杂，甚至很多仅仅与应激、奖赏、记忆等相关。提示复杂的抑郁症不仅仅是情绪功能障碍，也可能涉及了系列脑高级功能的紊乱。遗忘是指已经储存的信息丢失或不能被提取。一些类型的抑郁症患者是伴随着显著的负性应激生活事件的遗忘缺陷，导致这些负性记忆长期地影响情绪而导致抑郁症发生。在漫长的生命演化过程中，趋利避害是适应性进化的基本法则，因而人类和动物共同继承了对负性应激生活事件的牢固记忆，以帮助更好地生存。尽管大脑怎么样对负性事件产生牢固记忆的机理还不完全清楚，牢固的负性记忆不仅导致创伤后应激综合征（posttraumatic stress disorder, PTSD），也导致一些人产生抑郁症。

可能最有用、也最有说服力的是抑郁症动物模型的药物治疗预见性是否与临床一致（predict validity），也就是利用临床有效药物来检验抑郁症动物模型，同时也帮助判断未知的发病机理和动物的行为表象是否与人类抑郁症存在合理的一致性，因为抗抑郁症药物的评价指标就依赖于行为表象的定量评价和药物的作用机理。还没有发现氯胺酮能快速产生抗抑郁症疗效以前，单胺类抗抑郁症药物需要4～8周才起显著疗效，因此CMS病因的抑郁症动物模型就被认为是评价抗抑郁症药物的最理想模型，即让动物经历多种不同应激6～8周，连续给予药物4周，然后检测动物糖水偏爱来判断药物的抗抑郁症药效[45, 46]。显然，由于氯胺酮快速起效的发现，CMS模型就不适合评价以氯胺酮为代表的谷氨酸系统抗抑郁症药物，这也可能是为什么过去临床前研发没有发现新作用机理的抗抑郁症药物的主要原因。相比之下，强迫游泳模型对单胺类和谷氨酸类抗抑郁症药物均具有很好的预见性，可能是已知模型中药物治疗预见性最好的模型。强迫游泳是否是抑郁症模型一直存在激烈的争论[47, 48]，反对者的最根本依据是单胺类抗抑郁症药物在该模型中快速起效，而临床上需要4～8周；由于氯胺酮快速起效的发现，而且在强迫游泳中也快速起效[37]，提示强迫游泳本身就是很好的抑郁症模型，否则就难以解释为什么具有如此好的药物治疗预见性。

社会认知功能缺陷是抑郁症的一个更重要、过去被严重忽视的特征，很大程度上是因为没有动物模型可用。人类社会最辉煌的成就发生在过去的100多年。掌握海量的新知识就成了人类进化历史中从未经历过的沉重负担，因此带来的社会竞争也前所未有地激烈，从20世纪70年代开始，抑郁症的发病率上升趋势是大约每10年翻一倍。也与国家的经济发达程度存在密切关系，如美国的抑郁症发病率远远高于发展中国家。此外，抑郁症不太可能在痴呆症患者中发生，可能“傻人有傻福”就是描绘这种情况。然而如果对大鼠、小鼠也进行智商检测，“傻人”的智商显然也远远高于大鼠、小鼠。这种高级的认识功能在啮齿类动物中很难模仿人类。因此需要在更高级、更聪明的动物中才有可能真正实现“社会竞争失败”为病因的抑郁症动物模型，例如社会竞争失败病因学的树鼩模型，模拟人类社会竞争导致的抑郁症。

## 第四节 对现有抑郁症动物模型的评述

啮齿类和非人灵长类动物被广泛用作模式动物研究与抑郁症有关的病因学研究。目前最常用的动物模型多是基于“应激”假说而建立，以啮齿类动物抑郁症模型为主[49]。最常用的应激模型是慢性不可预知温和应激模型，其中包含多种应激刺激，以动物不可预见的顺序出现[50]。除CMS模型外，还有以失去回避能力为指标的习得性绝望模型。最近还发展了慢性睡眠剥夺、持续黑暗后用强迫游泳和悬尾作为检测方法的抑郁模型[51，52]。另外，强迫游泳还可以作为一种慢性应激，通过每天游泳10分钟，连续一周造模，来评价抗抑郁药起效的时间点。

基于“单胺类神经递质”假说建立的模型有以体温为指标的利血平单胺类递质耗竭模型[53，54]。除此之外还有通过药物诱导、人为因素作用而发展的抑郁模型，例如通过嗅球切除、免疫刺激（毒素、炎症因子）和兴奋剂刺激（安非他明、摇头丸）等因素诱发抑郁症模型[55～58]。此外，科学家们利用啮齿类动物发展了以旷场中的自发运动量为指标评价运动抑制的旷场行为模型[59，60]。

尽管这些抑郁症啮齿类模型在抑郁症的发病机理研究和抗抑郁症新药的研发中已经发挥了巨大作用，临床抗抑郁症药物的疗效清楚表明，这些模型存在不可克服的缺陷。都只能部分模拟人类抑郁症的核心症状，还没有一种动物模型可以完全模拟抑郁症的所有表现，而且每个模型都还不能完全排除环境、心理和遗传因素等的交叉影响。例如，应用最广泛的CMS模型虽然可以较好地模拟抑郁症发生的环境诱因和临床上的病理进程，致使动物的行为改变、血浆皮质酮升高等均与内源性抑郁症状相似，维持时间长，且经典抗抑郁药治疗有效。但该模型涉及的应激因子众多，使得人们难于获得病因学上的确切证据，严重地削弱了该动物模型的结构效度。

虽然目前已经有众多抑郁症动物模型，然而，回顾近年来抗抑郁药物研究的发展，发现现有临床抗抑郁药物均未克服普遍存在的疗效延迟缺陷。有报道显示在抗抑郁药物治疗最初的数周里，尝试自杀的风险远高于以后的时期[61]。因而，抗抑郁药物的快速起效极其重要，可以预见这将成为今后抗抑郁药物研发的主要方向。建立对快速抗抑郁作用敏感、性状稳定可靠、操作性强且对具体症状有可鉴别性的动物模型，非常有必要。

一般动物模型应当满足3个一致性验证：①疾病同源性（construct validity），即与人类疾病具有相似的发病机制；②表象一致性（face validity），即与人类疾病具有相似的行为表象；③药物预见性（predictive validity），即与人类疾病具有相似的药物治疗反应[40，62]。一个好的抑郁症动物模型应该具有好的药效预测性，行为表现的模拟性，药物作用时间也应当接近临床，受其它药物干扰少，有合理的理论基础，行为学改变和内分泌改变持续时间足够长等特点。而啮齿类与人类之间存在极大的种属差异，还不能令人满意地满足上述需求，因而需要建立非人灵长类动物模型进行补充。

值得一提的是，近年来发展的社会竞争失败（social defeat）动物模型，能较好地再现人类在日趋激烈的竞争和生活压力中接触应激性生活事件的方式，情绪持续低落、沉重的社会挫败感和有罪感、乐趣丧失等抑郁症核心临床症状的心理过程。且应激因子单一，有利于病因学分析。但啮齿类固有的群居方式，导致建立社会竞争失败抑郁症模型无法获得稳定的结构效度，而非人灵长类动物的近亲树鼩有可能克服这一缺陷。

## 第五节 抑郁症动物模型的科学意义

大脑是自然界最复杂的系统之一，具有非凡的计算、思维、决策、情绪等功能，还具有主宰一切生命的创造能力。理解大脑是理解我们人类自身的根本基础，其中发现和理解喜、怒、哀、乐的生物学机制是最终理解抑郁症的根本前提。目前抑郁症研究所面临的挑战大约可归结为：发病机理不完全清楚、生物学诊断缺乏、治疗措施不够理想。它们的共同基础在于情绪的生物学基础，并且涉及了奖赏和记忆等机制，才能最终实现有效地预测、预防、诊断和治疗抑郁症。因此，抑郁症动物模型的更重要意义在于提供研究大脑情绪的生物学机制的一种研究途径。

## 第六节 抑郁症的树鼩模型研究进展

### 一、树鼩作为模型动物的潜在优势

对树鼩的研究可以追溯到1780年。起初由于对其分类上的不确定而把树鼩定义为“松鼠”（squirrels），至今这种混淆仍然存在。大约80年前有种种报道称树鼩与灵长类相似，Clark[63]以脑解剖为基础研究发现现代树鼩与灵长类之间有直接的系统发生关系。之后有人质疑这种系统发生关系，而将树鼩排除在灵长类之外。随后几十年对树鼩及其系统发生学关系研究成为热点。如今，树鼩被单独列为一目——树鼩目（Scandentia），基于最近分子系统发生学的研究，树鼩目作为一个分支位于灵长目和食虫目之间[64~66]。

树鼩科分为两个亚科：其中，昼行性树鼩亚科有5个属（*Tupaia*、*Anathana*、*Dendrogale*、*Lyonogale*、*Urogale*）；夜行性树鼩亚科则只有笔尾树鼩属（*Ptilocercus*）。从印度到菲律宾，从中国西南到爪哇岛、婆罗洲、苏门答腊岛、巴厘岛都有树鼩分布，热带雨林以及热带、亚热带地区都是其自然栖息地[64]。我国所拥有的树鼩（*Tupaia belangeri chinensis*）资源主要分布于云南、海南、西藏和贵州等省区，均为昼行性。

虽然树鼩种属间有不同之处，但是它们也有共性：都是体形较小、敏捷、杂食，喜食水果和无脊椎动物，特别是节肢动物。从树上（*Dendrogale*、*Tupaia minor*、*Ptilocercus*）到陆地（*Lyonogale*、*Urogale*）都是树鼩的活动范围，但更多是在陆地找食。缅甸树鼩（*Tupaia belangeri*）的视觉系统发育很好且可辨别颜色。对其的声学研究发现，树鼩没有超声波，但可发出8种不同的声音，频率范围在0.4～20kHz之间，其中，有4种的功能是用来表达警告、注意以及防御等含义[67]。

树鼩体形小（110～200g），繁殖和生长周期短，每胎4～6只后代，近亲繁殖能产生稳定后代，完全有可能建立标准化品系。作为新型抑郁症动物模型，树鼩与啮齿类相比，有许多灵长类特有表型[68]，并且由于对应激极度敏感和雄性间好斗的特点，特别适合于应激相关的抑郁症模型建立、机理研究和新药研发。树鼩作为抑郁症模式动物的潜在优势主要有：①大脑前额叶皮

质发育良好，与丘脑之间形成双向投射[69]；②在应激回路下丘脑–垂体–肾上腺（hypothalamic-pituitary-adrenal axis, HPA）轴中，皮质醇是激动糖皮质激素受体的主要成分[70]，与人类极其类似，而在大鼠，则主要为皮质酮；③社会竞争失败后出现睡眠紊乱、运动抑制、情绪持续低落甚至绝食死亡等，与人类抑郁症表象非常类似[71]；④社会竞争失败可导致树鼩的海马神经细胞萎缩，其机理与人类的HPA轴过度激活和5–HT1A受体表达下调、抑制海马神经元新生等有关，也与人类抑郁症机理非常类似[72]；⑤树鼩的糖皮质激素和盐皮质激素受体，促肾上腺皮质激素释放激素（CRH）受体，以及α2A–肾上腺受体DNA序列与人类相应的基因有很高的同源性，高达90%～98%，而大鼠只有80%[73]；⑥正常的节律是健康的重要保障，在研究睡眠失调与抑郁症之间的关系以及抗抑郁药物对昼夜节律的影响中，昼行性动物与夜行性动物相比无疑具有更大的优势[74]。而树鼩可以弥补啮齿类动物模型这个天生的缺陷。这些特点表明抑郁症树鼩模型也许能很好地模拟人类抑郁症，为抑郁症的疾病机理研究、抗抑郁症新药研发，为发展早期诊断技术和预防措施等提供理想的或有显著特色和优势的动物模型。

## 二、树鼩抑郁症动物模型的研究进展

### （一）树鼩抑郁症社会竞争失败模型的疾病同源性

疾病同源性要求动物模型与人类疾病具有相似的发病机理。人类的服从行为主要与低自尊心相关，这点在抑郁症评价中属于较难评价的因子[75]。树鼩具有很强的社会属性，特别是雄性具有很强的领地意识。无论是野生还是实验环境下，都可以观察到树鼩的领地标记行为，如有同种物种入侵会发生打斗[76]。这种由社会竞争失败导致的社会遭遇在一定程度上可以模拟人类面对的自尊丧失。而啮齿类虽然在一定程度上也有社会等级制度，但是由于长期的实验室群养驯化，这种社会属性逐渐被弱化，因而很难建立社会竞争失败病因学抑郁模型。而CMS虽然已被广泛用来研究应激诱发的抑郁症机理，但是由于这些应激多为人为产生，不是动物自发产生的，导致疾病同源性较差，进而导致抑郁症机理研究缓慢。

实验室建立的树鼩社会竞争失败抑郁症模型通过自发打斗，使其中一只遭遇社会竞争失败而成为从属者，其活动性降低、躲避行为增加、进食量减少等表现在一定程度上都可以模仿人类的低自尊心[77]。在人类社会失去社会地位被认为是一种应激生活事件，从而导致患抑郁症风险增加。因此树鼩由应激诱导的抑郁症模型与啮齿类相比更接近人类抑郁症的发病起因，推测可能具有相似的发病机理。

### （二）树鼩抑郁症社会竞争失败模型的表象一致性

近几年研究表明利用树鼩由社会竞争失败诱导的抑郁症模型来研究应激相关疾病的发病机理更合适、更自然。经过社会竞争失败，被攻击后的树鼩长期与主导地位的树鼩保持视觉、嗅觉、听觉上的接触，其行为、生理和神经内分泌均会发生显著改变[78]。通过定量的行为学分析发现，从属树鼩趋向于避开主导者的视野范围，减少活动量，停止自我梳理行为。并且从属者的生理节律被严重破坏，主要表现为早醒。其体重的减少主要由摄食取水减少以及代谢率增加引起。对从属者进行内分泌参数分析发现，肾上腺皮质激素皮质醇浓度以及肾上腺的重量持续增长，与此同时其生殖腺功能降低。对从属树鼩的脑进行研究后的结果表明，5–HT1A受体减少，α2–肾上腺受体功能下调。海马在调节HPA轴的负反馈、空间信息处理和学习记忆方面发挥着重要作用[79，80]。

糖皮质激素、盐皮质激素以及CRH受体下调可改变锥体神经元结构并减缓神经发生，进而影响HPA轴的活动[81]。对上述由应激直接诱导的从属树鼩行为、生理、中枢神经改变的认知解释，只能是在长期处于同种主导者影响下而产生。另外，与从属者表现相反，主导者无明显的行为、生理改变[82]。

从属树鼩的这些行为学、神经内分泌变化，与对啮齿类或灵长类注射CRH来模拟抑郁样症状表现一致，重要的是其表现与抑郁症患者观察到的症状相一致[83]。尽管必须承认情感障碍的关键症状（比如抑郁情绪、无精打采甚至自杀等）都是由主观产生的，且无法在啮齿类动物模型上进行模拟，但是，在从属树鼩行为反应中可以观察到抑郁症患者的上述情感症状。因此，树鼩由应激诱导的抑郁症模型拥有抑郁症的表象一致性。

### （三）树鼩抑郁症社会竞争失败模型的药物预见性

药物预见性是指在动物模型上有效的药物可预见在临床上也会有效的能力，是评价动物模型是否真正模拟人类疾病最关键的指标。Fuchs等[84]采用口服氯咪帕明的方式，比较抑郁症患者和社会竞争失败抑郁症模型的树鼩服用抗抑郁症药物的异同，为了获得抗抑郁药的真实情况，在每日用药的同时，应激因素仍然存在，氯咪帕明的治疗贯穿4周的临床关键期。研究结果表明，三环类抗抑郁药氯咪帕明对从属树鼩有效。

人类氯咪帕明有效剂量是使氯咪帕明和去甲氯咪帕明的血清浓度在230～450ng/mL范围内。经高效液相色谱（high-performance liquid chromatography, HPLC）验证确定树鼩连续5天每天口服大约50mg/kg可以导致氯咪帕明和去甲氯咪帕明血清浓度达到240ng/mL，这是两种复合物血清中的最低浓度[85]。5天后树鼩氯咪帕明的代谢物主要有去甲氯咪帕明、8–羟基氯咪帕明、10–羟基去甲氯咪帕明和8–羟基去甲氯咪帕明。对其进行测试，并与每天口服150mg氯咪帕明的抑郁症患者的血清代谢物相比，发现树鼩与人类氯咪帕明代谢途径相似[73]。但是在大鼠（20mg/kg）的血清中只有去甲氯咪帕明，而没有8–或10–羟基代谢物[86]。

对抑郁症患者的持续观察发现，抑郁症患者的HPA轴功能紊乱，用三环类抗抑郁症药可以恢复从属树鼩HPA轴的活动。这可能是由于药物直接作用于相关脑区的5–HT和去甲肾上腺素循环，进而调节具有调节由垂体产生的促肾上腺皮质激素（ACTH）和其它类吗啡样神经肽的合成与释放作用的CRF（corticotropin release factor）系统[87]。

对人类和动物的研究报道结果表明，氯咪帕明除了有抗抑郁作用还有抗焦虑作用。对苯二氮受体拮抗剂地西泮在从属动物活动性、标记行为以及尿液皮质醇等指标上的作用研究表明，地西泮不起作用从而间接证明氯咪帕明起抗抑郁作用，树鼩社会竞争失败模型是抑郁症模型[88]。由此可见，抑制5–HT重摄取的三环类抗抑郁药氯咪帕明对受心理社会应激的树鼩具有疗效，树鼩社会竞争失败的抑郁症模型具有药物预见性。

# 第七节 树鼩抑郁症动物模型研究现状及展望

## 一、树鼩抑郁症动物模型的研究现状

根据国际疾病分类10（International Classification of Diseases–10, ICD–10）和《精神障碍诊断和统计手册》（第四版）（Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders–Ⅳ, DSM–Ⅳ），抑郁症的核心症状包括抑郁心境、对平日感兴趣的活动丧失兴趣或愉快感、精力不足或过度疲劳。抑郁症的诊断标准是在连续的两周里至少有两个或两个以上的上述核心症状[89]。伴随抑郁行为的发生，抑郁症病人还表现出与神经系统相关的改变[90]。主要表现为与学习记忆相关的海马脑区的萎缩，突触可塑性改变包括LTP受损和LTD变大[24，91～93]。海马脑区负反馈调节HPA轴，海马萎缩可以导致抑郁症患者的HPA轴过度激活，进而导致皮质醇水平升高，肾上腺腺体肥大等[94，95]。

然而目前对于树鼩抑郁症动物模型的核心症状以及突触可塑性的研究还未见报道。中国科学院昆明动物研究所徐林团队对这一问题进行了研究[96]。树鼩（*Tupaia belangeri chinensis*）抑郁症动物模型建立所用打斗笼（100cm × 68cm × 86cm，长 × 宽 × 高）中间由网格隔开，形成两个独立的空间。网格下方有一个抽拉门，可供树鼩通过。被分隔开的打斗笼有2个睡盒、2套饮食饮水装置。笼具背侧不锈钢板可拆卸更换为玻璃板，便于录像观察，并用于后期活动性分析（分析软件是Noldus EthoVision XT Version video tracking system）。

在适应阶段，打斗笼中间网格下方的抽拉门打开，首先进入的树鼩可以在打斗笼中自由活动和生活。一周后放入一只陌生树鼩作为入侵者与其争夺领地和食物，形成社会竞争。待打斗一周形成从属关系后，进行抗抑郁药物氯咪帕明慢性给药处理，期间依然进行每天1小时的打斗。4周后停止打斗和给药，进入恢复阶段（图19–1）。每周对树鼩的体重、活动性、自梳理行为和尿液皮质醇等指标进行检测（表19–1）。




**图19–1 树鼩抑郁症动物模型建立流程**

第1周：适应阶段，将一只树鼩放入打斗笼中适应一周，使其建立属于自己的领地。第2周：打斗阶段，将另外一只陌生树鼩放入打斗笼中，作为入侵者与已建立领地的树鼩争夺领地，促使二者发生打斗。为避免过度打斗造成动物受伤，打斗时间控制在1小时（从早9：00到晚18：00时间范围内随机选取）。其余时间只保持两只树鼩视觉、嗅觉和听觉的接触。通过对打斗过程录像分析判断树鼩的从属关系。第3～6周：给药阶段，在伴随打斗的过程中进行给药处理。每天早上7：45～8：00之间对打斗失败树鼩灌胃给予氯咪帕明（50mg/kg）或者生理盐水（1mL/kg）。第7周：恢复阶段，停止所有打斗和给药处理。

表19-1 树鼩抑郁症动物模型检测指标

| 检测指标 | 检测时间 | 具体方法 |
|---|---|---|
| 体重 | 7：45～8：00（w1～7） | 称树鼩空腹体重 |
| 活动性 | 17：30～18：00（w1～7） | 录像记录两只树鼩分别在各自笼中的跳跃和穿梭睡盒次数 |
| 自梳理行为 | 17：30～18：00（w1～7） | 录像记录两只树鼩分别在各自笼中洗脸和梳理毛发的次数 |
| 5%糖水偏爱 | 8:00～次日8:00（w1～7） | 检测前24小时先2%蔗糖水适应，然后左右随机摆放200mL的水和5%蔗糖水，检测24小时树鼩分别对水和蔗糖水的饮用量 |
| 尿液皮质醇 | 7：45～8：00（w1～7） | 待树鼩未出睡盒活动，迅速将其取出，通过轻按树鼩腹部取约0.5mL晨尿，全程约30秒。-20℃保存，放射性免疫标记法检测 |
| 尿液皮质醇节律 | 8：00～20：00（w7） | 每小时将树鼩从睡盒中取出，轻按腹部，取约0.5mL尿液。-20℃保存，放射性免疫标记法检测 |
| 突触可塑性 | 建模成功后（w7后） | 将树鼩用乙醚麻醉后断头取脑，通过振动切片机切片后（350μmm），记录离体脑片海马CA1-Schaffer（CA1-SC）的LTP |

表中显示树鼩抑郁症动物模型建立中主要检测指标、时间及具体方法。检测时间中括弧内数字表示周，w=week。

结果发现慢性社会竞争使失败树鼩表现出与人类抑郁症患者相似的核心症状即快感缺失和精力不足，主要表现为5%糖水偏爱度减弱，活动性和自梳理行为紊乱。另外，失败树鼩还表现出体重减轻，尿液皮质醇升高及其节律紊乱。而慢性抗抑郁药物氯咪帕明给药处理后使其5%糖水偏爱度恢复正常，紊乱的活动性、自梳理行为和尿液皮质醇节律恢复稳定，这可能是树鼩模型类似于抑郁症患者的最大特征，因为抑郁症患者不是简单的应激激素增高，而是应激激素系统不稳定的问题。并且对活动性的改善主要是在给药后4周才起效，并且可以维持到恢复阶段。这与临床结果一致，但是慢性抗抑郁药物氯咪帕明给药处理对于体重和升高的尿液皮质醇并没有恢复作用。造模结束后，运用离体电生理技术检测树鼩海马CA1-Schaffer的LTP，发现无论是经过生理盐水处理还是氯咪帕明处理的失败树鼩，LTP均受损。

### （一）抑郁症核心症状树鼩与人类表型一致

快感缺失是抑郁症最典型的核心症状之一，作为主要评价指标被广泛用于评价抑郁症程度。在抑郁症动物模型中，糖水偏爱度降低检测成为评价快感缺失的主要手段[97]。与抑郁症病人和啮齿类动物的研究结果一致[98～100]，社会竞争失败的树鼩表现出糖水偏爱度降低，并且这种快感缺失可以有效地被三环类抗抑郁药（tricyclic antidepressants, TCAs）氯咪帕明缓解。然而，与啮齿类糖水偏爱度检测不同，检测树鼩是否出现快感缺失的糖水浓度为5%，而啮齿类多选用1%[101，102]。

抑郁症的另一个核心症状是行动迟滞，精神迟缓[10]。虽然行为激越主要表现在双向抑郁症病人中，但是发现依然有19%表现在重症抑郁症中[103]。因此，活动性在抑郁症动物模型评价中也十分重要。与以往报道不同[84，104，105]，我们并没有发现从属树鼩表现出活动性的持续降低，而是紊乱。主要表现是打斗一周后活动性首先表现出显著降低，随着打斗的持续，活动性出现忽高忽低的表现，氯咪帕明在此期间并没有发挥作用。在给药4周后的恢复阶段，从属树鼩活动性依然低于正常水平，然而给药后的从属树鼩活动性恢复到正常水平。氯咪帕明的延迟起效与临床研究一致[10，106]，更进一步说明抑郁症的树鼩模型具有很高的预测效度。

### （二）抑郁症树鼩和人类的应激激素变化一致

HPA轴在应激反应中作用十分重要，处于长期的应激状态下HPA轴会被过度激活。临床研究发现，抑郁症病人的HPA轴处于过度激活状态，并且可被抗抑郁药物缓解[107～109]。与人类相似，树鼩的主要应激相关激素是皮质醇，而大鼠是皮质酮[101]，这使得树鼩可以成为更好的研究人类抑郁症的致病原因和机理的模型动物。之前研究报道发现应激可以导致从属树鼩皮质醇的显著升高，并且被氯咪帕明缓解[84，104]。然而，随后的报到发现这种升高无法被抗抑郁药物缓解[105]。为此，我们分析了抑郁症树鼩模型中树鼩在各个阶段的尿液皮质醇和恢复阶段的尿液皮质醇节律以及与HPA轴相关的自梳理行为，发现社会竞争失败导致从属树鼩尿液皮质醇升高、节律紊乱，自梳理行为紊乱。抗抑郁药物氯咪帕明可以使这种紊乱趋于稳定，但是无法使升高的皮质醇降低。我们认为之所以与前人报道结果不同[84]，主要是因为所用实验动物的树鼩亚种，以及实验环境等条件不同造成。

### （三）社会竞争失败导致突触可塑性改变

影像学和解剖学研究显示抑郁症病人的应激相关脑区，包括海马、杏仁核、丘脑、前额叶、扣带回和纹状体等结构会发生改变[10，110]。而海马体积缩小，兴奋性突触萎缩等均可导致重症抑郁症患者认知功能受损[111～114]。洞板实验研究发现，社会竞争失败可以导致从属树鼩认知能力受损[115]，但尚缺乏突触可塑性的证据。强直刺激可以使海马冠状切片中CA1-SC通路产生LTP，这是学习记忆的机理之一[91]。离体脑片电生理实验结果发现正常树鼩在这一通路中表现出很高的LTP，但是被社会竞争失败损伤直至消失，并且这种损伤不可以被氯咪帕明逆转。这可能成为临床三环类抗抑郁药恶化抑郁症病人记忆能力的一种解释[8]，同时也暗示经典的抗抑郁药只能部分缓解抑郁症症状。

### （四）抗抑郁药物在树鼩抑郁模型中的副作用

尽管三环类抗抑郁药物在过去几十年广泛应用于临床，但是其副作用也很严重，主要表现为长期服用后导致病人恶心、呕吐，进而导致体重改变，致使服用后期患者由于副作用拒绝服药而导致疗效减弱[10，116]。与临床结果一致，我们发现服药后的树鼩表现出体重严重下降，并伴有呕吐症状。

## 二、存在问题的分析与未来发展方向的展望

抑郁症是情绪、思维等高级功能紊乱的一种精神疾病。这些脑高级功能很难在抑郁症啮齿类模型中明确体现。例如人类抑郁症患者常见的自杀行为，以及各种表情特征。新药研究表明，啮齿类中的实验结果在人类临床中重现的概率约为万分之一，导致了新药研发的困难和人力物力浪费。其根本原因在于啮齿类与人类之间存在巨大的种属差异，导致啮齿类动物模型的药物预见性很差。树鼩被认为是低等灵长类或与灵长类有共同祖先[66]，强烈应激可导致树鼩绝食甚至死亡，从而可以模拟人类的自杀行为。同时在我们实验观察中发现，树鼩具有一定的表情，为研究人类抑郁症患者的各种表情特征提供可能性，使其成为一种研究人类抑郁症较为理想的动物模型。

通过建立树鼩抑郁症模型，对失败树鼩的核心症状分析发现不同于啮齿类抑郁症模型，抗抑郁药物起效具有延迟效应，并且治疗效果不佳，与临床结果基本一致。运用树鼩抑郁症模型，将

为阐明与人类抑郁症之间的相似性以及抑郁症早期预防、发病机理研究和抗抑郁症新药研发提供重要依据。

## 参考文献

[1]Nestler EJ, Barrot M, DiLeone RJ, et al. Neurobiology of depression. Neuron, 2002, 34(1): 13-25.

[2]Charney DS. Psychobiological mechanisms of resilience and vulnerability: implications for successful adaptation to extreme stress. Am J Psychiat, 2004, 161(2): 195-216.

[3]Gillespie CF, Nemeroff CB. Hypercortisolemia and depression. Psychosom Med, 2005, 67(Suppl 1): S26-8.

[4]Manji HK, Drevets WC, Charney DS. The cellular neurobiology of depression. Nat Med, 2001, 7(5): 541-7.

[5]Bremner JD, Vythilingam M, Vermetten E, et al. Deficits in hippocampal and anterior cingulate functioning during verbal declarative memory encoding in midlife major depression. Am J Psychiat, 2004, 161(4): 637-45.

[6]Duman RS, Aghajanian GK. Synaptic Dysfunction in Depression: Potential Therapeutic Targets. Science, 2012, 338 (6103): 68-72.

[7]Belmaker RH, Agam G. Mechanisms of disease: Major depressive disorder. New Engl J Med, 2008, 358(1): 55-68.

[8]Richelson E. Pharmacology of antidepressants. Mayo Clin Proc, 2001, 76(5): 511-27.

[9]Kennedy SH, Rizvi SJ. Emerging drugs for major depressive disorder. Expert Opin Emerg Drugs, 2009, 14(3): 439-53.

[10]Berton O, Nestler EJ. New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines. Nat Rev Neurosci, 2006, 7(2): 137-51.

[11]Berman RM, Cappiello A, Anand A, et al. Antidepressant effects of ketamine in depressed patients. Biol Psychiat, 2000, 47(4): 351-4.

[12]Naughton M, Mulrooney JB, Leonard BE. A review of the role of serotonin receptors in psychiatric disorders. Hum Psychopharmacol, 2000, 15(6): 397-415.

[13]Mctavish D, Benfield P. Clomipramine-an overview of its pharmacological properties and a review of its therapeutic use in obsessive compulsive disorder and panic disorder. Drugs, 1990, 39(1): 136-53.

[14]Modestin J. Antidepressive therapy in depressed clinical suicides. Acta Psychiatr Scand, 1985, 71(2): 111-6.

[15]Den Boer JA, Westenberg HG. Effect of a serotonin and noradrenaline uptake inhibitor in panic disorder; a double-blind comparative study with fluvoxamine and maprotiline. Int Clin Psychopharmacol, 1988, 3(1): 59-74.

[16]Heninger GR, Delgado PL, Charney DS. The revised monoamine theory of depression: a modulatory role for monoamines, based on new findings from monoamine depletion experiments in humans. Pharmacopsychiatry, 1996, 29(1): 2-11.

[17]Laske C, Eschweiler GW. Brain-derived neurotrophic factor: form nerve growth factor to modulator of brain plasticity in cognitive processes and psychiatric diseases. Nervenarzt, 2006, 77(5): 523-37.

[18]Karege F, Bondolfi G, Gervasoni N, et al. Low brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels in serum of depressed patients probably results from lowered platelet BDNF release unrelated to platelet reactivity. Biol Psychiat, 2005, 57(9): 1068-72.

[19]Lee BH, Kim H, Park SH, et al. Decreased plasma BDNF level in depressive patients. J Affect Disord, 2007, 101(1-3): 239-44.

[20]Gervasoni N, Aubry JM, Bondolfi G, et al. Partial normalization of serum brain-derived neurotrophic factor in remitted patients after a major depressive episode. Neuropsychobiology, 2005, 51(4): 234-8.

[21]Shimizu E, Hashimoto K, Okamura N, et al. Alterations of serum levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in depressed patients with or without antidepressants. Biol Psychiat, 2003, 54(1): 70-5.

[22]Krishnan V, Nestler EJ. The molecular neurobiology of depression. Nature, 2008, 455(7215): 894-902.

[23]Castrén E. Is mood chemistry? Nat Rev Neurosci, 2005, 6(3): 241-6.

[24]Sahay A, Hen R. Adult hippocampal neurogenesis in depression. Nat Neurosci, 2007, 10(9): 1110-5.

[25]Cole J, Toga AW, Hojatkashani C, et al. Subregional hippocampal deformations in major depressive disorder. J Affect Disord, 2010, 126(1-2): 272-7.
[26]Colla M, Kronenberg G, Deuschle M, et al. Hippocampal volume reduction and HPA-system activity in major depression. J Psychiatr Res, 2007, 41(7): 553-60.
[27]Santarelli L, Saxe M, Gross C, et al. Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. Science, 2003, 301(5634): 805-9.
[28]Balfour DJ, Ridley DL. The effects of nicotine on neural pathways implicated in depression: a factor in nicotine addiction? Pharmacol Biochem Behav, 2000, 66(1): 79-85.
[29]Denson TF, Earleywine M. Decreased depression in marijuana users. Addict Behav, 2006, 31(4): 738-42.
[30]Green BE, Ritter C. Marijuana use and depression. J Health Soc Behav, 2000: 40-9.
[31]Johnson JH, Sarason IG. Life stress, depression and anxiety: Internal-external control as a moderator variable. J Psychosom Res, 1978, 22(3): 205-8.
[32]Bartolomucci A, Leopardi R. Stress and depression: preclinical research and clinical implications. PloS One, 2009, 4(1): e4265.
[33]De Kloet ER, Joels M, Holsboer F. Stress and the brain: from adaptation to disease. Nat Rev Neurosci, 2005, 6(6): 463-75.
[34]Pittenger C, Duman RS. Stress, depression, and neuroplasticity: a convergence of mechanisms. Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology, 2008, 33(1): 88-109.
[35]Liu L, Wong TP, Pozza MF, et al. Role of NMDA receptor subtypes in governing the direction of hippocampal synaptic plasticity. Science, 2004, 304(5673): 1021-4.
[36]Autry AE, Adachi M, Nosyreva E, et al. NMDA receptor blockade at rest triggers rapid behavioural antidepressant responses. Nature, 2011, 475(7354): 91-109.
[37]Garcia LSB, Comim CM, Valvassori SS, et al. Acute administration of ketamine induces antidepressant-like effects in the forced swimming test and increases BDNF levels in the rat hippocampus. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiat, 2008, 32(1): 140-4.
[38]Skolnick P, Popik P, Trullas R. Glutamate-based antidepressants: 20 years on. Trends Pharmacol Sci, 2009, 30(11): 563-9.
[39]Machado-Vieira R, Salvadore G, DiazGranados N, et al. Ketamine and the next generation of antidepressants with a rapid onset of action. Pharmacol Ther, 2009, 123(2): 143-50.
[40]徐林．人类疾病的动物模型．动物学研究，2011，32(1)：1–3．
[41]Ryan BK, Vollmayr B, Klyubin I, et al. Persistent inhibition of hippocampal long-term potentiation in vivo by learned helplessness stress. Hippocampus, 2010, 20(6): 758-67.
[42]Shors TJ. Stressful experience and learning across the lifespan. Annu Rev Psychol, 2006, 57: 55-85.
[43]Caspi A, Sugden K, Moffitt TE, et al. Influence of life stress on depression: Moderation by a polymorphism in the 5-HTT gene. Science, 2003, 301(5631): 386-9.
[44]Risch N, Herrell R, Lehner T, et al. Interaction between the serotonin transporter gene (5-HTTLPR), stressful life events, and risk of depression a meta-analysis. JAMA, 2009, 301(23): 2462-71.
[45]Willner P. Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: a 10-year review and evaluation. Psychopharmacology, 1997, 134(4): 319-29.
[46]Grippo AJ, Beltz TG, Weiss RM, et al. The effects of chronic fluoxetine treatment on chronic mild stress-induced cardiovascular changes and anhedonia. Biol Psychiat, 2006, 59(4): 309-16.
[47]Frazer A, Morilak DA. What should animal models of depression model? Neurosci Biobehav Rev, 2005, 29(4-5): 515-23.
[48]Abel EL, Bilitzke PJ. A Possible Alarm Substance in the Forced Swimming Test. Physiol Behav, 1990, 48(2): 233-9.
[49]Duman RS, Monteggia LM. A neurotrophic model for stress-related mood disorders. Biol Psychiat, 2006, 59(12): 1116-27.
[50]Gronli J, Murison R, Bjorvatn B, et al. Chronic mild stress affects sucrose intake and sleep in rats. Behav Brain Res,

2004, 150(1-2): 139-47.

[51]Gonzalez MM, Aston-Jones G. Light deprivation damages monoamine neurons and produces a depressive behavioral phenotype in rats. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105(12): 4898-903.

[52]Wilson N. Depression and its relation to light deprivation. Psychoanal Rev, 2002, 89(4): 557-67.

[53]Baumeister AA, Hawkins MF, Uzelac SM. The myth of reserpine-induced depression: role in the historical development of the monoamine hypothesis. J Hist Neurosci, 2003, 12(2): 207-20.

[54]Skalisz LL, Beijamini V, Joca SL, et al. Evaluation of the face validity of reserpine administration as an animal model of depression—Parkinson's disease association. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiat, 2002, 26(5): 879-83.

[55]Dandekar MP, Singru PS, Kokare DM, et al. Cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide plays a role in the manifestation of depression: social isolation and olfactory bulbectomy models reveal unifying principles. Neuropsychopharmacology, 2009, 34(5): 1288-300.

[56]Holmes PV, Masini CV, Primeaux SD, et al. Intravenous self-administration of amphetamine is increased in a rat model of depression. Synapse, 2002, 46(1): 4-10.

[57]Slotkin TA, Seidler FJ. Cholinergic receptor subtypes in the olfactory bulbectomy model of depression. Brain Res Bull, 2006, 68(5): 341-5.

[58]Tunez I, Drucker-Colin R, Montilla P, et al. Protective effect of nicotine on oxidative and cell damage in rats with depression induced by olfactory bulbectomy. Eur J Pharmacol, 2010, 627(1-3): 115-8.

[59]Airan RD, Meltzer LA, Roy M, et al. High-speed imaging reveals neurophysiological links to behavior in an animal model of depression. Science, 2007, 317(5839): 819-23.

[60]Broderick PA. Interleukin 1alpha alters hippocampal serotonin and norepinephrine release during open-field behavior in Sprague-Dawley animals: differences from the Fawn-Hooded animal model of depression. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiat, 2002, 26(7-8): 1355-72.

[61]Simon GE, Savarino J, Operskalski B, et al. Suicide risk during antidepressant treatment. Am J Psychiat, 2006, 163(1): 41-7.

[62]Wilner P. Behavioural models in psychopharmacology. Cambridge, New York, Melbourne, Madrid, Cape Town, Singapore, São Paulo, Delhi: Cambridge University Press, 1991.

[63]Clark W. On the brain of the tree-shrew (*Tupaia minor*). Proceedings of the Zoological Society of London: Wiley Online Library, 1924: 1053-74.

[64]Robert Hubrecht, James Kirkwood. The UFAW handbook on the care and management of laboratory and other research animals (8th). Oxford, UK: Wiley-Blackwell, 2010: 262-75.

[65]Janecka JE, Miller W, Pringle TH, et al. Molecular and genomic data identify the closest living relative of primates. Science, 2007, 318(2851): 792-4.

[66]Fan Y, Huang ZY, Cao CC, et al. Genome of the Chinese tree shrew. Nat Commun, 2013, 4: 1426.

[67]Manuela Martinez. Prevention and control of aggression and the impact on its victims. Springer, 2001: 409-14.

[68]Zambello E, Fuchs E, Abumaria N, et al. Chronic psychosocial stress alters NPY system: different effects in rat and tree shrew. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiat, 2010, 34(1): 122-30.

[69]Divac I, Bjorklund A, Lindvall O, et al. Converging projections from the mediodorsal thalamic nucleus and mesencephalic dopaminergic neurons to the neocortex in three species. J Comp Neurol, 1978, 180(1): 59-71.

[70]Ohl F, Kirschbaum C, Fuchs E. Evaluation of hypothalamo-pituitary-adrenal activity in the tree shrew (*Tupaia belangeri*) via salivary cortisol measurement. Lab Anim, 1999, 33(3): 269-74.

[71]Legros C, Chalivoix S, Gabriel C, et al. First evidence of melatonin receptors distribution in the suprachiasmatic nucleus of tree shrew brain. Neuro Endocrinol Lett, 2007, 28(3): 267-73.

[72]Czéh B, Simon M, Schmelting B, et al. Astroglial plasticity in the hippocampus is affected by chronic psychosocial stress and concomitant fluoxetine treatment. Neuropsychopharmacology, 2005, 31(8): 1616-26.

[73]Van Kampen M, Kramer M, Hiemke C, et al. The chronic psychosocial stress paradigm in male tree shrews: evaluation of a novel animal model for depressive disorders. Stress, 2002, 5(1): 37-46.

[74]Kronfeld-Schor N, Einat H. Circadian rhythms and depression: human psychopathology and animal models. Neuropharmacology, 2012, 62(1): 101-14.
[75]Brown GW, Bifulco A, Veiel HO, et al. Self-esteem and depression. Ⅱ. Social correlates of self-esteem. Soc Psychiat Psychiatr Epidemiol, 1990, 25(5): 225-34.
[76]Eichmann F, Holst DV. Organization of territorial marking behavior by testosterone during puberty in male tree shrews. Physiol Behav, 1999, 65(4-5): 785-91.
[77]Wang J, Zhou QX, Tian M, et al. Tree shrew models: a chronic social defeat model of depression and a one-trial captive conditioning model of learning and memory. Zool Res, 2011, 32(1): 24-30.
[78]Fuchs E. Social stress in tree shrews as an animal model of depression: An example of a behavioral model of a CNS disorder. CNS Spectr, 2005, 10(3): 182-90.
[79]Herman JP, Watson SJ, Chao HM, et al. Diurnal regulation of glucocorticoid receptor and mineralocorticoid receptor mRNAs in rat hippocampus. Mol Cell Neurosci, 1993, 4(2): 181-90.
[80]Shen Y, Specht SM, De Saint Ghislain I, et al. The hippocampus: a biological model for studying learning and memory. Prog Neurobiol, 1994, 44(5): 485-96.
[81]Meyer U, Van Kampen M, Isovich E, et al. Chronic psychosocial stress regulates the expression of both GR and MR mRNA in the hippocampal formation of tree shrews. Hippocampus, 2001, 11(3): 329-36.
[82]Fuchs E, Uno H, Flugge G. Chronic psychosocial stress induces morphological alterations in hippocampal pyramidal neurons of the tree shrew. Brain Res, 1995, 673(2): 275-82.
[83]Spitzer RL, Gibbon ME, Skodol AE, et al. DSM-Ⅳ casebook: a learning companion to the diagnostic and statistical manual of mental disorders (4th). American Psychiatric Association, 1994.
[84]Fuchs E, Kramer M, Hermes B, et al. Psychosocial stress in tree shrews: clomipramine counteracts behavioral and endocrine changes. Pharmacol Biochem Behav, 1996, 54(1): 219-28.
[85]Gex-Fabry M, Balant-Gorgia AE, Balant LP. Clomipramine concentration as a predictor of delayed response: a naturalistic study. Eur J Clin Pharmacol, 1999, 54(12): 895-902.
[86]Weigmann H, Hartter S, Hiemke C. Automated determination of clomipramine and its major metabolites in human and rat serum by high-performance liquid chromatography with on-line column-switching. J Chromatogr B Biomed Sci Appl, 1998, 710(1-2): 227-33.
[87]Nikolarakis K, Pfeiffer A, Stalla GK, et al. The role of CRF in the release of ACTH by opiate agonists and antagonists in rats. Brain Res, 1987, 421(1-2): 373-6.
[88]Van Kampen M, Schmitt U, Hiemke C, et al. Diazepam has no beneficial effects on stress-induced behavioural and endocrine changes in male tree shrews. Pharmacol Biochem Behav, 2000, 65(3): 539-46.
[89]Bech P, Rasmussen NA, Olsen LR, et al. The sensitivity and specificity of the Major Depression Inventory, using the Present State Examination as the index of diagnostic validity. J Affect Disord, 2001, 66(2-3): 159-64.
[90]Gold PW, Gabry KE, Yasuda MR, et al. Divergent endocrine abnormalities in melancholic and atypical depression: clinical and pathophysiologic implications. Endocrinol Metab Clin North Am, 2002, 31(1): 37-62.
[91]Neves G, Cooke SF, Bliss TVP. Synaptic plasticity, memory and the hippocampus: a neural network approach to causality. Nat Rev Neurosci, 2008, 9(1): 65-75.
[92]Pavlides C, Nivon LG, McEwen BS. Effects of chronic stress on hippocampal long-term potentiation. Hippocampus, 2002, 12(2): 245-57.
[93]Xu L, Anwyl R, Rowan MJ. Behavioural stress facilitates the induction of long-term depression in the hippocampus. Nature, 1997, 387(6632): 497-500.
[94]Krugers HJ, Hoogenraad CC, Groc L. Stress hormones and AMPA receptor trafficking in synaptic plasticity and memory. Nat Rev Neurosci, 2010, 11(10): 675-81.
[95]Nemeroff CB, Vale WW. The neurobiology of depression: Inroads to treatment and new drug discovery. J Clin Psychiat, 2005, 66: 5-13.
[96]Wang J, Chai AP, Zhou QX, et al. Chronic clomipramine treatment reverses core symptom of depression in subordinate

tree shrews. PloS one, 2013, 8(12): e80980.

[97]Kedracka-Krok S, Fic E, Jankowska U, et al. Effect of chronic mild stress and imipramine on the proteome of the rat dentate gyrus. J Neurochem, 2010, 113(4): 848-59.

[98]Willner P, Muscat R, Papp M. Chronic mild stress-induced anhedonia—a realistic animal-model of depression. Neurosci Biobehav Rev, 1992, 16(4): 525-34.

[99]Monleon S, Daquila P, Parra A, et al. Attenuation of sucrose consumption in mice by chronic mild stress and its restoration by imipramine. Psychopharmacology, 1995, 117(4): 453-7.

[100]Yu J, Liu Q, Wang YQ, et al. Electroacupuncture combined with clomipramine enhances antidepressant effect in rodents. Neurosci Lett, 2007, 421(1): 5-9.

[101]Wang J, Xu XL, Ding ZY, et al. Basal physiological parameters in domesticated tree shrews (*Tupaia belangeri chinensis*). Zool Res, 2013, 34(E2): E69-74.

[102]Chaudhury D, Walsh JJ, Friedman AK, et al. Rapid regulation of depression-related behaviours by control of midbrain dopamine neurons. Nature, 2013, 493(7433): 532-6.

[103]Olgiati P, Serretti A, Colombo C. Retrospective analysis of psychomotor agitation, hypomanic symptoms, and suicidal ideation in unipolar depression. Depress Anxiety, 2006, 23(7): 389-97.

[104]Kramer M, Hiemke C, Fuchs E. Chronic psychosocial stress and antidepressant treatment in tree shrews: time-dependent behavioral and endocrine effects. Neurosci Biobehav Res, 1999, 23(7): 937-47.

[105]Van Der Hart MGC, De Biurrun G, Czeh B, et al. Chronic psychosocial stress in tree shrews: effect of the substance P (NK1 receptor) antagonist L-760735 and clomipramine on endocrine and behavioral parameters. Psychopharmacology, 2005, 181(2): 207-16.

[106]Anderson IM, Ferrier IN, Baldwin RC, et al. Evidence-based guidelines for treating depressive disorders with antidepressants: A revision of the 2000 British Association for Psychopharmacology guidelines. J Psychopharmacol, 2008, 22(4): 343-96.

[107]Holsboer F, Barden N. Antidepressants and hypothalamic pituitary adrenocortical regulation. Endocr Rev, 1996, 17(2): 187-205.

[108]Wasserman D, Wasserman J, Sokolowski M. Genetics of HPA-axis, depression and suicidality. Eur Psychiat, 2010, 25(5): 278-80.

[109]Piwowarska J, Wrzosek M, Radziwon-Zaleska M, et al. Serum cortisol concentration in patients with major depression after treatment with clomipramine. Pharmacol Rep, 2009, 61(4): 604-11.

[110]Sheline YI. 3D MRI studies of neuroanatomic changes in unipolar major depression: The role of stress and medical comorbidity. Biol Psychiat, 2000, 48(8): 791-800.

[111]Radley JJ, Morrison JH. Repeated stress and structural plasticity in the brain. Ageing Res Rev, 2005, 4(2): 271-87.

[112]Sapolsky RM. Depression, antidepressants, and the shrinking hippocampus. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98(22): 12320-2.

[113]Fuchs E, Flugge G, Ohl F, et al. Psychosocial stress, glucocorticoids, and structural alterations in the tree shrew hippocampus. Physiol Behav, 2001, 73(3): 285-91.

[114]MacQueen GM, Campbell S, McEwen BS, et al. Course of illness, hippocampal function, and hippocampal volume in major depression. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100(3): 1387-92.

[115]Ohl F, Fuchs E. Memory performance in tree shrews effects of stressful experiences. Neurosci Biobehav Res, 1998, 23(2): 319-23.

[116]Carlsson A, Wong DT. Prozac (fluoxetine, Lilly 110140), the first selective serotonin uptake inhibitor and an antidepressant drug twenty years since its first publication. Life Sci, 1995, 57(5): 411-41.



# 第二十章

第二篇 疾病树鼩模型
TREE SHREW ANIMAL MODELS

Tree shrews

# 树鼩与药物成瘾

潘姿娇　王建红

## 第一节 药物成瘾及常用研究方法

阿片类药物可使个体产生强烈的欣快感，该欣快感使得个体迅速形成对药物的依赖性，及成瘾性，最终导致药物滥用（吸毒）。药物滥用已在全球泛滥，成为当今世界的瘟疫和社会的毒瘤。它诱发犯罪、社会暴力、艾滋病等一系列社会问题[1]，冲击国家财政、威胁国家安全、严重破坏生产力。因而，对成瘾药物戒断，尤其如何阻止复吸的研究已成为当务之急。

现代成瘾生物学的一个基本问题是：为什么诸如吗啡、海洛因等阿片类药物极易导致耐受、依赖和成瘾，并引起复吸[2]？通过建立动物模型来研究药物依赖的生物学机制是回答该问题的有效方法之一。

一旦持续性给予动物吗啡等阿片类成瘾药物，很多动物对药物产生依赖性；而一旦停药，动物将出现戒断症状，从而迫使动物形成对药物相关线索的记忆，建立条件反射。利用这一模式，可将动物对药物的寻求过程与相关环境线索联系起来，以检测动物对成瘾药物的渴求程度。

以啮齿类动物为研究对象，常采用条件化位置偏好（conditioned place preference, CPP）和条件化位置厌恶（conditioned place aversion, CPA）检测法（图20–1）。CPP方法利用动物对与药物相关信息的记忆，可有效反映动物对阿片药物的成瘾，及部分心理渴求状态[3~5]。而CPA方法指由戒断所致的厌恶动机、情绪与特定的环境、信号搭配后建立条件反射，当条件化后的对象再次暴露于相同或相似的环境、信号时，个体所表现出的厌恶、回避行为。因此，CPA是判断动物是否产生药物依赖及戒断症状的灵敏方法[6]。




**图20–1　条件化位置偏好和条件化位置厌恶行为箱**

（A）CPP箱示意图。两箱色彩度一样，明暗度一致，但箱体内壁的条纹方向一箱垂直，一箱水平。底面材质亦不一样：一箱粗糙，一箱光滑。与注射成瘾药物相伴的箱体为阳性行为箱，另一只为对照的阴性行为箱。两个箱体与过渡箱之间有可关闭的门相连。过渡箱的地板和四壁一般为白色。（B）只有视觉线索，无躯体感觉线索的CPA箱。（C）具有视觉和躯体感觉线索的CPP箱。箱体周围黑色线条或垂直或水平，底部具圆形小洞或矩形网格铺垫。

药物成瘾研究常采用啮齿类动物模型[7]，但是，啮齿类动物在药物CPP建立之后，随着停药，记忆很快消退，所以在研究心理依赖和复吸上，存在一定的局限性。而在人类，对毒品的心理依赖极易产生，并且能够终生保持，这种心理依赖导致的强烈渴求药物和觅药行为，使得吸毒者产生错误抉择，继而引发复吸。

非人灵长类动物在分类地位上接近人类，因其前额叶发达而成为神经生物学研究的最佳实验模型之一。我们的初步实验结果表明，在6次递增剂量吗啡注射之后，恒河猕猴（*Macaca mulatta*）对与吗啡相关线索的CPP记忆持续时间至少可达（15.3 ± 1.7）个月[8]，最近的实验表明，甚至（36.3 ± 1.3）个月之后，猕猴仍然记得与吗啡相关的环境线索[9]。以上研究结果说明：非人灵长类动物猕猴较易建立与吗啡相关线索的记忆，且能保持很长时间，和人类情况接近。

而猕猴因为价格昂贵、繁殖周期长等因素限制了我们采用大批量猕猴进行成瘾的研究。然而我们可以采用在分类地位上属于或接近灵长类的小型动物如树鼩代替猕猴进行成瘾方面的研究。我们可通过建立树鼩吗啡依赖模型，研究其是否对吗啡产生依赖，以及与吗啡相关的记忆如何转换为长时记忆，进而探讨如何破坏这些长时记忆从而寻找抑制复吸的方法和策略。

## 第二节　树鼩的药物成瘾研究现状和初步结果

树鼩属于攀鼩目（Scandentia）树鼩科（Tupaiinae），虽然其系统分类地位仍有争议，但它具备一些近似原始灵长类的特征，表明与现代灵长类亲缘关系很近[10, 11]。中缅树鼩（*Tupaia belangeri chinensis*）在云南分布较广（图20–2），最近，对中缅树鼩的基因组测序已经完成，发现中缅树鼩在基因水平亦与灵长类动物有很近的亲缘关系[12]，可望作为一种有效的实验动物模型，研究人类疾病，包括心理应激和抑郁症等精神和神经疾病[13]。另外，树鼩体形小、繁殖快、易饲养并且属昼行性动物。因此，如果可以在树鼩上建立慢性吗啡依赖模型，相对于大、小鼠模型，能够更好地模拟人类药物依赖及戒断症状。

然而，以树鼩为模型进行药物成瘾研究的数据非常有限。早先的一项研究表明，树鼩



**图20–2　中缅树鼩**
（王建红拍摄）

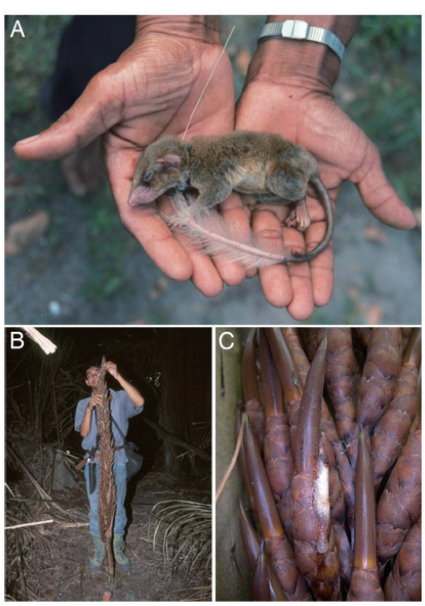



**图20–3　马来西亚热带丛林的笔尾树鼩和玻淡棕榈树花序**
（A）麻醉的笔尾树鼩，颈部戴无线接收器；（B）中等尺寸的玻淡棕榈树花序（几乎与人一样高）；（C）铅笔形状的木质花朵，长约5cm，3个花瓣依然紧闭，渗出花蜜（引自文献15）。

（*Tupaia belangeri*）有偏爱含尼古丁溶液的行为[14]。

自然界中，有的动物喜欢食饮发酵的植物果实或花蜜汁液，例如果蝇、蜜蜂等昆虫，以及懒猴、某些小型啮齿类动物等。一些灵长类动物，如长尾黑腭猴，甚至喜好饮食人类的酒精饮料，其喜好饮酒的动物个体数有一定的比率，大约为30%，该比率和人类喜好饮酒的比率相似。

近期，Wiens等[15]发现，生活在马来西亚热带丛林里的笔尾树鼩（*Ptilocercus lowii*）喜欢喝玻淡棕榈树（bertam palm）花序中发酵的花蜜。花蜜的酒精含量最高可达3.8%（vol/vol）。在棕榈树密集的地区，笔尾树鼩平均每晚饮食花蜜的时间高达138分钟（图20–3）。笔尾树鼩在12小时内饮食的酒精量超出人在同样时间内饮用纯酒精115mL或9小杯葡萄酒。人若饮用这些酒精，血液的酒精含量将超过0.05%（wt/vol），达到损伤机体的水平，被认定为法律上的“醉酒”水平。笔尾树鼩在同样的时间段内有36%可能性超过这个指标，也就是说如果笔尾树鼩具有与人类类似的酒精代谢系统，它们每3个晚上就会醉酒1次（图20–4）。然而，自然界中，笔尾树鼩并没有醉酒的状态，且无宿醉等行为特征。提示，它们可能拥有与人类不同的酒精代谢系统。Wiens[15]接着发现，树鼩毛发中的乙基葡萄糖醛酸苷（EtG）显著增高，高于其它饮食含酒精花蜜或不含酒精食物的动物（比如灰色树鼠、长尾猕猴、竹鼠、欧洲狍子、挪威大鼠等），也高于长期饮酒且具行为障碍的人类（图20–5）。Wiens[15]推测，树鼩可能通过提高肝脏中葡萄糖醛酸代谢的效率，将酒精迅速代谢，从而降低了血液和大脑中的酒精含量。这样的代谢性耐受可能是进化的产物，可保护个体不会因中枢神经系统受损，或者因为长期处于醉酒状态，而降低防御反应，进而影响其在自然界的生存率。

酒精、尼古丁与吗啡作用于不同的受体，但是拥有相似的大脑奖赏环路，因而，酒精易成瘾的大鼠品系对吗啡也易成瘾[16]。那么，喜食含酒精花蜜的树鼩，是否也会对成瘾药物吗啡有所偏好，并且产生依赖呢?

采用吗啡CPP方法，我们在雄性中缅树鼩上，通过多次腹腔注射吗啡观察树鼩对吗啡产生的依赖及成

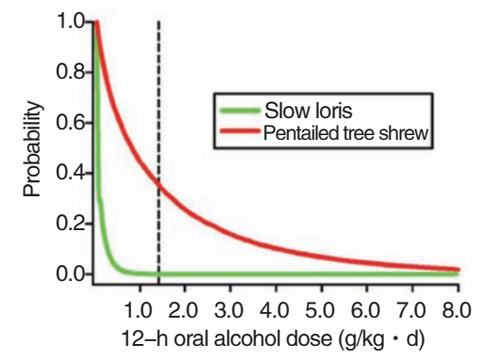



**图20–4　野生动物酒精摄取量化图**

笔尾树鼩和懒猴从玻淡棕榈树上吸食发酵花蜜，导致每天摄取不同剂量酒精的可能性。图中曲线上的每个点表示获得不同剂量酒精（X轴）的可能性（Y轴）。虚线表示人类在饮酒12小时之后，法定醉酒剂量基值（1.4g/kg）。图中可见，树鼩有36%的可能性到达人类醉酒的基值水平（引自文献15）。

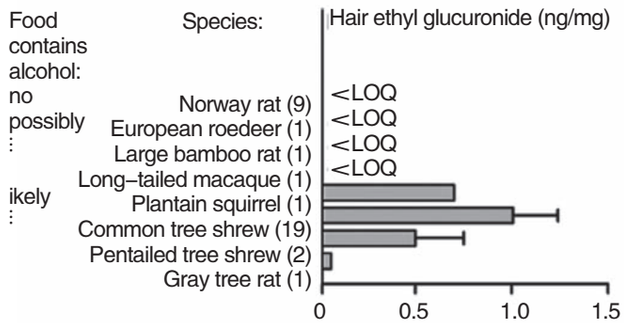



**图20–5　不同物种毛发中乙基葡萄糖醛酸苷（EtG）含量**

毛发中的EtG是酒精的一种代谢产物，它与长期酒精摄取相关。摄食可能含有酒精的食物的成年野外物种包括：2只雌性笔尾树鼩，19只雌雄普通树鼩，1只雌性大蕉松鼠以及1只雄性灰色树鼠。对照组为：马来西亚地区的1只雄性成年长尾猕猴和1只成年竹鼠，来自德国的1只野生成年雄性欧洲狍子。对照组中的动物因摄取腐烂发酵的植物而具有摄取酒精的可能性。另外，酒精空白对照组为9只挪威大鼠，其食物为无酒精的大鼠饲料。量化的阈值（limit of quantitation, LOQ）是0.017ng/mg。在人类中，浓度高于此阈值在表示饮酒过量（引自文献15）。

瘾状况，从而探讨树鼩吗啡依赖/成瘾模型的可行性及其在吗啡等药物成瘾研究方面的应用前景。

初步结果发现：

## 一、戒断症状

判断动物对某种药物是否产生依赖，常通过停药后观察戒断症状，或者注射该药物的受体拮抗剂催瘾等方法。比如吗啡依赖的大、小鼠在注射吗啡4～8小时后，腹腔注射阿片受体拮抗剂纳洛酮会产生明显的戒断症状[17]。

接受过长期吗啡注射的中缅树鼩，在腹腔注射纳洛酮之后，出现与大鼠戒断症状相似的症状，包括跳跃、舔阴、扭体、理毛、摇头、湿狗样抖、洗脸、甩尾等，并表现出其与大鼠不同的独特症状，比如：喜叫（叽呱呱、呱呱），前、后爪拍地，倒立等，但暂未发现腹泻等大鼠的戒断症状（表20–1，引自文献18）。究其原因，可能是因为树鼩采取不同的药物代谢策略，使得吗啡对其与生存相关的肠胃功能影响甚少。

表20–1　树鼩和大鼠吗啡戒断症状比较（引自文献18）

| | 树　鼩 | 大　鼠 |
|---|---|---|
| 相同点 Similarities | 跳跃 jumping、舔阴 cunnilingus、理毛 grooming、扭体 writhing、摇头 head–shaking、湿狗样抖 wet dog shaking、洗脸 face washing、爪震颤 paw trembling、甩尾 drifting | |
| 不同点 Differences | 叫声 yelling：叽呱呱、呱呱 twee–twee | 无 (none) |
| | 前、后爪拍地 paw pattering | 无 (none) |
| | 倒立 head standing | 无 (none) |
| | 头、尾贴地走 head and / or tail grazing | 无 (none) |
| | 无 (none) | 腹泻 diarrhea |
| | 无 (none) | 吞咽 swallowing |
| | 无 (none) | 磨牙 grinding |

体重变化反映出树鼩对吗啡可能快速产生耐受性：树鼩在注射吗啡伊始，体重急剧下降，随后趋于平稳（图20–6），而同时其饮食量并未发生变化，表明树鼩在消化道功能上，对吗啡的适应能力很强。也可能表明树鼩对吗啡产生了耐受性。提示，中缅树鼩可能可以作为研究吗啡耐受机制的模型之一。

## 二、部分树鼩可建立纳洛酮催瘾所致条件化位置厌恶

多次吗啡注射之后，中缅树鼩不易快速建立吗啡相关线索记忆。但是，如果结合其活动高峰时间（6：00～9：30和15：00～18：30），和其对颜色的偏好——树鼩视觉发达，能清楚区别红、黄、绿和灰色，且红色对其具有最大的刺激阈值[10]（彭燕章，1991），在其活动高峰期间（16：00～18：30）进行行为学测试，并将CPA箱和它的视觉刺激敏感颜色相匹配（图20–1B），在吗啡注射之后，采用纳洛酮催瘾，发现吗啡处理后存活的树鼩可以诱导产生条件化位置厌恶[18]。该结果与啮齿类动物上的报道相似[6，19]。说明树鼩一旦对吗啡产生依赖，如果用阿片受体拮抗剂纳洛酮催瘾，不仅可以诱发戒断症状，动物还可能因为戒断症状而对催瘾相关的环境线索产生回避行为。上述结果提示由纳洛酮催瘾引发的树鼩厌恶性反应模型可作为研究药物依赖及戒断的有效方法之一。

此外，实验发现吗啡注射之后，树鼩表现出对红色箱体的显著偏爱（图20–8）。树鼩天生偏爱黑色，因为黑色能够给予它们安全感，能够使它们躲避各种环境应激和潜在的天敌。但可能因为吗啡对脑内奖赏环路的作用，使得树鼩的决策出现问题，所以它们不能做出理性的决策，而表现出偏爱红色箱体的行为。

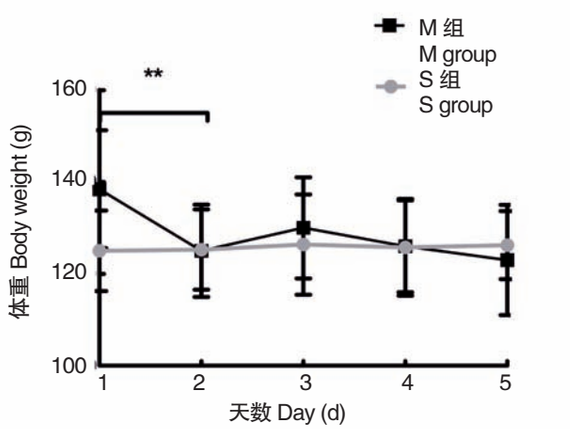



**图20–6　条件化前期吗啡组（M组）和生理盐水组（S组）树鼩体重变化**

**：$P<0.01$，第1次吗啡注射前、后体重比较，有显著性差异（M组：$n=10$；S组：$n=8$）。

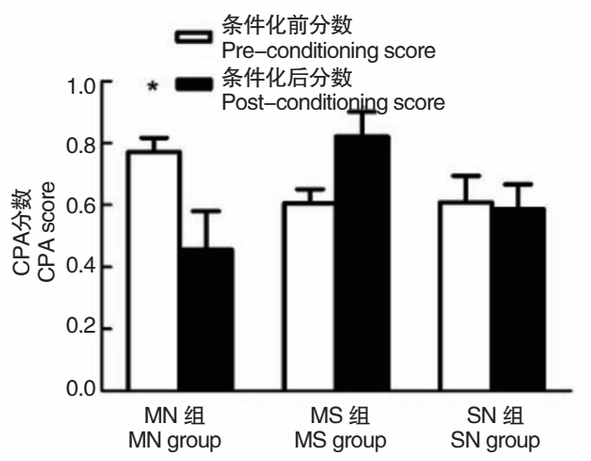



**图20–7　吗啡+纳洛酮（MN），吗啡+生理盐水（MS），生理盐水+纳洛酮（SN），3组树鼩CPA分数**

*：$P<0.05$，MN组条件化前、后分数比较具显著性差异（MN组：$n=6$；MS组：$n=4$；SN组：$n=8$）。

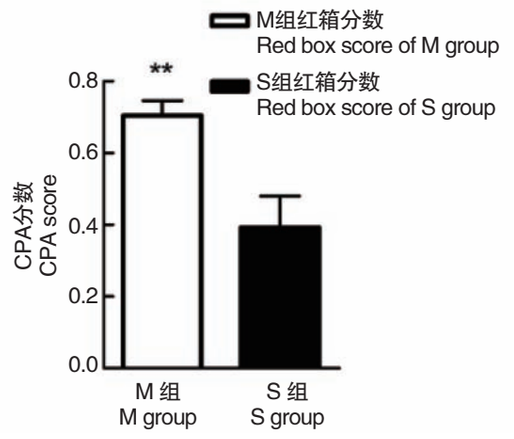



**图20–8　条件化前期吗啡组（M组）和生理盐水组（S组）动物的红色箱体停留分数**

**：$P<0.01$（M组：$n=10$；S组：$n=8$）。

## 三、结合相邻饲养检测树鼩是否形成吗啡条件化位置偏好

树鼩对外界刺激应激反应强烈，因而容易建立树鼩社会竞争抑郁模型。将树鼩相邻饲养两个星期，其间，树鼩并不同笼，也不打斗，但是饲养笼彼此靠近，树鼩可通过气味、视觉等线索，间接相互影响（图20–9）。其中一只往往因为遭遇社会竞争失败而成为服从者。视频录制其行为通过定量的行为学分析发现，服从者树鼩趋向于避开地位强者的视野范围，减少活动量和自我梳理行为，停留在睡盒的时间增加，体重降低。徐林实验室发现双笼饲养，每天互相打斗1小时的树鼩服从者尿液中皮质醇浓度增长[20]，Collins PM[21]发现处于束缚应激状态的树鼩，其皮质酮水平较高。



**图20–9　相邻饲养的雄性中缅树鼩，并无打斗，左侧树鼩社会地位较高**

采用具视觉和躯体感觉线索的CPP箱（图20–1C），我们初步发现，当给相邻饲养的雄性中缅树鼩隔天连续注射递增剂量吗啡之后，取CPP非自然偏好箱为吗啡匹配箱，建立条件反射，之后进行吗啡条件化位置偏好测试。结果，在能够表达CPP的树鼩中间，地位高的树鼩CPP表达率较高，比率和单独饲养树鼩的表达率相近，而地位低的服从者树鼩在吗啡处理后，容易死亡，存活者CPP表达率也较低。总的CPP表达率约60%～70%。此外，发现一旦树鼩建立吗啡CPP，可至少保留10周，而CPP测试前期未表达CPP的树鼩，部分可在后期测试中复又出现位置偏好。在体重上也可看出，地位较高的树鼩在注射吗

啡之后，体重变化较为稳定，而地位低的服从者体重有一定的波动（潘姿娇，待发表资料）。说明，树鼩因为个体差异较大，不像啮齿类动物和猕猴容易建立吗啡条件化位置偏好，但是对于能够建立吗啡相关记忆的树鼩，其抑郁程度可能影响其CPP的表达。

此外，在树鼩CPP行为测试完毕，取不同脑区，采用免疫印迹法，发现树鼩海马、杏仁核和纹状体等脑区，均表达与长时记忆相关的PKM zeta（张洋、张蕾等，待发表资料）。提示，树鼩形成的吗啡CPP可能与长时记忆相关。进一步实验还在继续。

## 第三节 树鼩建立吗啡依赖模型的局限性

树鼩注射吗啡之后，死亡例数较大，尤其相邻饲养中处于服从者的树鼩，所以，有必要分别对待地位强和地位弱的树鼩，给予合理剂量的吗啡，以增加有效样本量。

存活的树鼩对吗啡耐受性较大，表现在CPP建立率仅为60%，体重无明显变化，可能与其独特的代谢方式有关。

因为树鼩尚不是模式实验动物，与啮齿类等模式实验动物相比，它们成为实验室饲养动物的时间较短，尚未形成具稳定遗传背景的繁殖系，因而可能是造成个体差异较大的原因；科研人员对其遗传背景和种系差异的研究尚处于起步阶段，以上因素给建立树鼩成瘾模型带来一定的困难。

总之，以往的动物吗啡CPP和CPA模型主要是在啮齿类动物上建立急慢性模型，而树鼩与啮齿类动物相比，无论进化地位还是脑结构，均更接近灵长类动物。曹毅实验室发现大麻素和阿片μ受体在树鼩中枢神经系统内有表达[22]，说明树鼩可能形成对阿片药物的依赖。另外，在自然界中，对含酒精食物成瘾的动物在同一种系内有一定比率，而在人类中，根据不同的药物有不同的成瘾率，所以，在相关的成瘾动物研究中，需要考虑动物的成瘾率是否能够模拟人类成瘾的真实情况。对于不能药物成瘾的树鼩，也可以用于研究其机制何在？这也是药物成瘾研究中一个值得探讨的问题——即为什么成瘾存在个体差异？总之，建立有效的树鼩吗啡耐受、依赖和戒断模型，对研究吗啡成瘾以及无法成瘾的机制非常必要。

【致谢】作者非常感谢中国科学院昆明动物研究所马原野研究员和孙永梅博士，以及昆明医科大学何敏教授在树鼩实验方面的宝贵建议和讨论。

### 参考文献

[1]Leshner AI. Addiction is a brain disease, and it matters. Science, 1997, 278(5335): 45-7.

[2]Waldhoer M, Bartlett SE, Whistler JL. Opioid receptors. Annual Rev Biochem, 2004, 73(1): 953-90.

[3]Hnasko TS, Sotak BN, Palmiter RD. Morphine reward in dopamine-deficient mice. Nature, 2005, 438(7069): 854-7.

[4]Vindenes V, Handal M, Ripel A, et al. Conditioned place preference induced by morphine and morphine-6-glucuronide in mice. Pharmacol Biochem Behav, 2006, 85(2): 292-7.

[5]Marquez P, Bebawy D, Lelièvre V, et al. The role of endogenous PACAP in motor stimulation and conditioned place preference induced by morphine in mice. Psychopharmacology, 2009, 204(3): 457-63.

[6]Azar MR, Jones BC, Schulteis G. Conditioned place aversion is a highly sensitive index of acute opioid dependence and withdrawal. Psychopharmacology, 2003, 170(1): 42-50.

[7]Deroche-Gamonet V, Belin D, Piazza PV. Evidence for addiction-like behavior in the rat. Science, 2004, 305(5686): 1014-7.

[8]Wang JH, Wu XJ, Li Cy, et al. Effect of morphine on conditioned place preference in rhesus monkeys. Addict Biol, 2012, 17(3): 539-46.

[9]吴绪军，宗慰，孙永梅，等．恒河猕猴吗啡成瘾模型的初步建立．动物学研究，2012，33（1）：89–91．

[10]彭燕章，叶智彰，邹如金，等．树鼩生物学．昆明：云南科技出版社，1991：24–7．

[11]Sargis EJ. New views on tree shrews: the role of Tupaiids in primate supraordinal relationships. Evol Anthropol, 2004, 13(2): 56-66.

[12]Fan Y, Huang ZY, Cao CC, et al. Genome of the Chinese tree shrew. Nat Commun, 2013, 4: 1426.

[13]徐林，张云，梁斌，等．实验动物树鼩和人类疾病的树鼩模型研究概述．动物学研究，2013，34（2）：59–69.

[14]Opitz K, Weischer ML. Volitional oral intake of nicotine in tupaias: drug-induced alterations. Drug Alcohol Depend, 1988, 21(2): 99-104.

[15]Wiens F, Zitzmann A, Lachance M-A, et al. Chronic intake of fermented floral nectar by wild treeshrews. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105(30): 10426-31.

[16]Nichols JR, Hsiao S. Addiction liability of albino rats: Breeding for quantitative differences in morphine drinking. Science, 1967, 157(3788): 561-3.

[17]Schulteis G, Morse AC, Liu J. Conditioning processes contribute to severity of naloxone-precipitated withdrawal from acute opioid dependence. Psychopharmacology, 2004, 175(4): 463-72.

[18]孙永梅，杨建珍，孙华英，等．慢性吗啡依赖树鼩模型的建立．动物学研究，2012，33（1）：14–8．

[19]Myers KM, Carlezon WA Jr. D-cycloserine facilitates extinction of naloxone-induced conditioned place aversion in morphine-dependent rats. Biol Psychiat, 2010, 67(1): 85-7.

[20]Wang J, Zhou QX, Tian M, et al. Tree shrew models: a chronic social defeat model of depression and a one-trial captive conditioning model of learning and memory. Zool Res, 2011, 32(1): 24-30.

[21]Collins PM, Tsang WN, Metzger JM. Influence of stress on adrenocortical function in the male tree shrew (*Tupaia belangeri*). Gen Comp Endocrinol, 1984, 55(3): 450-7.

[22]张庆余，范晓娜，曹毅．正常猕猴与树鼩神经系统和免疫系统组织中大麻素与阿片受体的表达．动物学研究，2011，32（1）：31–9．



Tree shrews

# 第二十一章

第二篇 疾病树鼩模型
TREE SHREW ANIMAL MODELS

# 情绪相关精神疾患的树鼩模型

祁可可　李勇辉　隋　南

## 第一节 前　言

精神疾病的发病过程中常伴有异常的情绪体验，对外界刺激倾向于负性的情绪或行为反应，例如，抑郁症、双相情绪障碍、精神分裂症、药物成瘾、创伤后应激障碍（posttraumatic stress disorder, PTSD）、慢性疼痛及攻击行为等。除了病理生理和遗传因素以外，这类疾病往往与社会环境刺激或心理压力的承受能力密切相关。由于精神疾病病理机制的复杂性，其症状表现也具有明显的异质性。目前，虽然有多种抗精神疾病药物用于临床，但多数药物的疗效并不确定。因此，深入了解精神疾病的病因和发病机理，对研发新型有效药物尤为重要。

基于机制研究和科学伦理的基本要求，构建具有信度和效度的精神疾病的动物模型，是深入了解病理机制的关键和前提条件。对一个动物疾病模型效度的评价，主要有3个标准：①表面效度（face validity），即动物模型能在多大程度上模拟人类疾病的表现或症状；②预测效度（predictive validity），即在模型动物上有效的药物能否在临床上取得相同的疗效；③结构效度（construct validity），即模型动物是否具有和人类患者共同的病因、病理机制[1, 2]。由于情绪相关的精神疾患的病因和病理机制并不完全清楚，在啮齿类动物构建的情绪相关的精神疾病模型，如抑郁症、药物成瘾及PTSD等，主要以模拟人类患者的症状或行为表现的相似性为主，具有较好的表面效度。但是，由于啮齿类和人类脑的新皮层结构有较大差异，使这些精神类疾病模型的结构效度存在先天不足。迄今为止，以啮齿类为模型基础的药物研发表明，大部分药物治疗效果不好，还存在用药时间长、副作用较大等问题。同时还表明，啮齿类模型的预测效度也不甚理想。因此，创建和人类更接近的新型动物模型，如非人灵长类动物模型，可能是突破这些困境的有效方法之一。

猕猴是目前最常使用的灵长类模型动物，但由于资源有限，繁殖周期长，动物资源保护以及伦理等问题，成规模地用之于机理研究尚存在困难。树鼩与狐猴近缘，体重与大鼠接近，在生物进化上与灵长类相近，具有建立情绪相关精神疾病模型的天然优势。原因如下：第一，树鼩大脑前额叶皮质发育良好，前额皮层占大脑皮层的15%，与黑猩猩前额皮层的比例（16%）接近；并

且前额皮层与丘脑之间形成双向投射。外界刺激经丘脑初级加工后传至前额叶皮质加工，然后再调节情绪相关的行为及神经内分泌反应，使树鼩具有更好地完成情绪行为反应的神经基础[3]；第二，树鼩应激系统相关的基因与人类更接近，如糖皮质激素与盐皮质激素的受体、促肾上腺激素释放激素（CRH）受体以及α2A–肾上腺受体等的DNA序列与人类相应的基因有高达90%～98%的同源性，而大鼠只有80%[4]；第三，树鼩应激反应系统释放皮质醇激素，与人类相同，而啮齿类的则是皮质酮[5]。脑–垂体–肾上腺（HPA）轴适应性变化引发的皮质醇释放异常，可能是导致某些情绪相关精神疾病的重要致病因素，如抑郁症等。因此采用树鼩模型可能会更好地了解类似疾病的发病机理。

动物行为模型效度的提高，除了选择与人类更接近的模式动物外，更重要的是如何模拟精神疾病的关键特征。通常可以从三个方面考虑构建精神疾病模型：①病因学模拟。大多数精神疾病病因并不明确，但一般都根据有实验证据支持的相关假说。例如，经历重大创伤事件后导致PTSD，或长期慢性心理应激导致抑郁状态等；②临床症状模拟。例如，精神兴奋剂甲基苯丙胺或苯环己哌啶（PCP）诱发动物的自发活动的增加，用来模拟精神分裂症的阳性症状；慢性温和应激刺激后，动物糖水饮用下降，用来模拟抑郁症的快感缺失；可卡因或吗啡成瘾后，动物在操作条件反应箱内压杆次数增加，模拟成瘾患者的觅药行为等；③病理机制模拟。根据精神疾病的多种致病机理的假说，干预其相应的分子调控来模拟相应的精神疾病的病理和遗传条件。例如，通过利血平耗竭5–羟色胺来模拟抑郁症；通过DISC1基因的缺失或过表达，构建精神分裂症的遗传模型。

## 第二节 抑郁症模型

抑郁症又称抑郁障碍，以显著而持久的心境低落和兴趣减退为主要临床特征，同时伴有认知功能损害、意志活动减退、饮食睡眠障碍及各种躯体症状等。抑郁症是一种严重危害身心健康的精神疾病，目前全球抑郁症患病率为3%～5%，到2030年抑郁症将位于全球疾病总负担榜首[6]。因此，抑郁症研究受到高度关注。高效度动物模型的构建是阐明抑郁症病因、病理机制以及新药开发的必要手段。

目前，啮齿类抑郁症行为模型主要包括如下几类，习得性无助模型（learned helplessness）、强迫游泳模型（forced swimming）、慢性不可预见性温和应激（chronic unpredictable mild stress, CUMS）及社会挫败模型（social defeat）。这些模型分别在病因学、病理机制和核心临床症状等不同角度模拟了人类的抑郁样行为表现，总体上都具有比较好的表面效度。强迫游泳模型以动物在水中放弃挣扎的时间长短为指标，考察其抑郁样绝望行为，由于操作简单，建立模型时间短，具有比较好的预测效度，曾被广泛用于新型抗抑郁药物的筛选。慢性温和应激和社会挫败模型目前被普遍用于病理机制的研究。这类刺激能很好地模拟抑郁的病因学原理，所导致的行为表现与人类抑郁症的核心症状也有高度的相似性，例如，历经长期慢性应激刺激后，动物糖水饮用下降、主动逃避危险能力不足、社交行为减弱等，表现为动机缺乏、快感缺乏，无助与绝望或社会退缩等[7]，具有较好的表面效度和预测效度。

由于啮齿类与人类在进化地位上的巨大差距，其疾病模型的结构效度似乎存在先天不足。表现为对心理或社会等应激不够敏感，致使造模周期偏长，而诱发的抑郁样行为的持续时间很短。

以啮齿类模型为基础研发的抗抑郁药，对人类患者的疗效并不理想。在临床上，大部分抗抑郁药物起效周期长，只对约50%的患者有效，其中还有50%的患者会复发。另外，副作用明显，甚至会诱发自杀行为[8]。导致啮齿类动物模型局限性最重要的因素可能与结构效度有关，例如，啮齿类的新皮层和前额叶不够发达，应激激素也有差别，因而调节情绪–神经内分泌反应的功能与灵长类还有较大的差距。

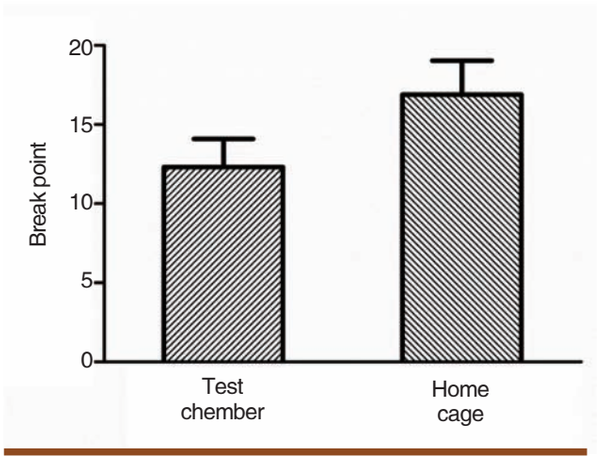



**图21–1　树鼩在长期居住的饲养笼内寻求奖赏物的动机高于新饲养笼**

作为灵长类近缘动物，树鼩具有进化更完好的前额叶皮层和海马。不仅在种系上更接近人类，其应激内分泌系统及其相关的调节基因与人类也更为接近。最重要的是树鼩对环境变化等应激刺激非常敏感。我们实验室观察发现，更换饲养笼后树鼩的节律行为发生明显变化，寻求奖赏物的动机显著降低（图21–1）。

另外，树鼩的领地意识较强，为争夺领地、配偶等资源时，雄性之间会发生激烈的打斗，失败者甚至可能绝食死亡。此类表现适用于模拟情绪疾病相关的心理社会压力等重要致病因素。因此，要创建效度更好的抑郁症行为模型，树鼩可能是较好选择之一。

## 一、社会挫败模型

社会挫败范式因操作简便，时间周期相对短，动物对应激源适应度低，可重复性好，近年来被广泛用于抑郁症造模[9]。这种范式能在病因学层面更好地模拟抑郁症的发病过程。除了脑结构和应激系统与人类相似外，树鼩还有一些易于被观察的行为特征，例如，笼内的领地标记（marking behavior）、主动操作、节律和社交等行为[10]。近20年来，德国Fuchs E.[11]实验室采用竞争领地的方式尝试探索了树鼩社会挫败抑郁症模型。经历社会挫败的树鼩表现出自发活动量减少，自我修饰行为（self-grooming behavior）及领地标记等行为几乎消失等症状。但他们尚未能模拟快感缺失、动机缺乏等抑郁症的核心症状。

为了能够模拟人类抑郁症动机缺乏等核心症状，我们实验室根据树鼩学习能力强、喜欢喝糖水的特点，建立了糖水为强化物的操作性条件反射。采用固定比率（fixed ratio, FR）强化程序（FR1）训练动物学会压杆获取糖水，在此基础上，采用累进比率（progressive ratio, PR）程序，测量其获取糖水的动机强度。结果发现，树鼩的动机行为变化表现出对糖水浓度的显著依赖（图21–2）。

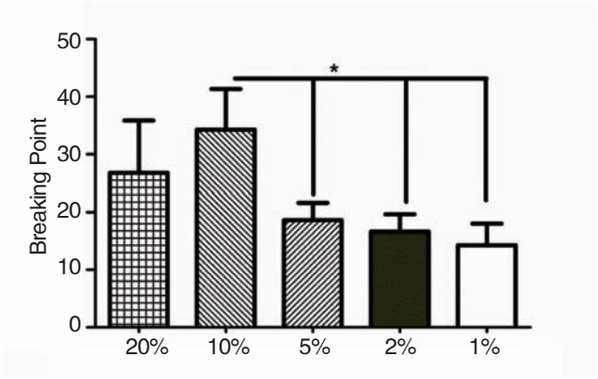



**图21–2　树鼩对不同浓度糖水的寻求动机水平**

若通过竞争领地的社会应激方式，经历

社会挫败后，树鼩获取糖水动机显著下降，而且在早期（第2～3周）就开始发生了，并且动机下降的行为能稳定保持（图21–3）数周。但对糖水强化值的辨别能力（偏爱程度）无明显变化（图21–4）。这也表明在社交挫败中，动机变化的敏感性高于糖水偏好。

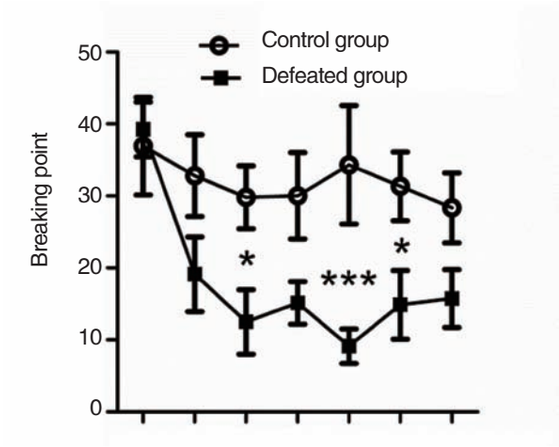



图21–3　社会挫败使树鼩寻求糖水动机水平显著下降

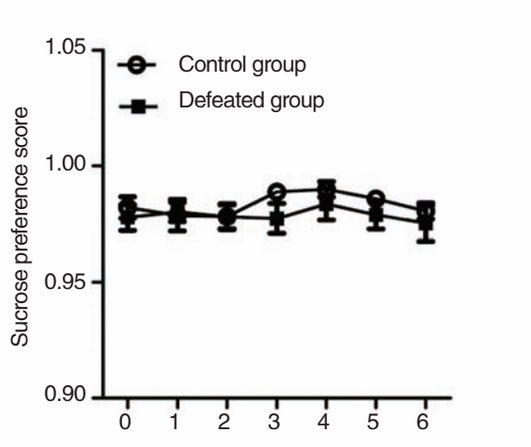



图21–4　社会挫败对糖水偏爱分数无显著影响

经历社交挫败的同时，我们还考察了社会交往和新颖探索等行为变化，发现经历社会挫败的动物社会交往动机明显下降，表现为在交往区域内的活动减少（图21–5）及对陌生同类的交往时间缩短（图21–6）。同样，经历过社会挫败的动物对新颖物体探究动机也显著下降，表现为在放置新颖物体的区域的活动减少（图21–7），但停留时间无显著变化（图21–8）。这些结果表明通过社会挫败应激模式可以建立模拟快感缺失、动机缺乏等抑郁症的核心症状的树鼩抑郁模型。

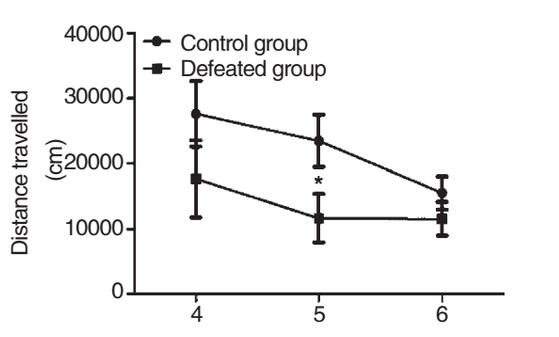



图21–5　社会挫败减少社会交往测试中运动量

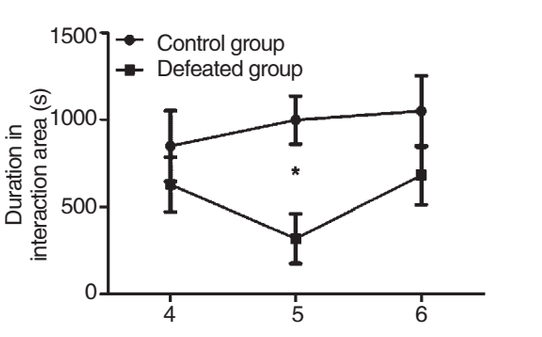



图21–6　社会挫败使树鼩在社交区域停留时间减少

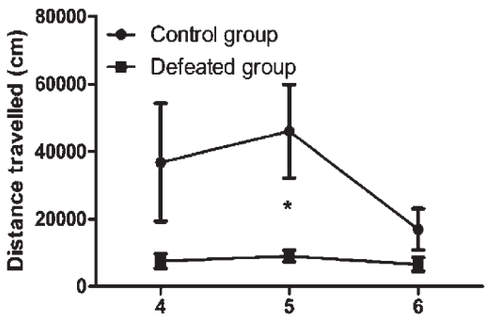



图21–7　社会挫败减少树鼩在新颖寻求测试中运动量

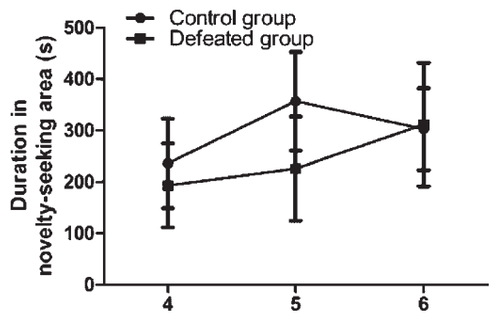



图21–8　社会挫败不影响树鼩在新颖寻求区停留时间

## 二、习得性无助模型

习得性无助模型，因其操作简单，时间短，是抗抑郁药物筛选的理想模型而被广泛使用[12, 13]。更重要的是该模型具有比较好的结构效度，该模型通过设置不可控制的电击应激情境，动物通过多种尝试仍然无法有效应对逃脱电击而产生绝望，然后即使在面对可逃避的电击时，动物出现的主动逃避行为也减少。该模型的理论假设基于抑郁症是习得性无助产生的结果，从认知的角度解释抑郁症产生的心理和病因机制。相对于啮齿类动物而言，树鼩具有进化较好的前额叶和海马，对应激反应的认知调节更具优势，有可能是深入了解抑郁症产生的认知机制的合适模型。目前，尚没有发现关于树鼩习得性无助抑郁症行为模型的报道。

将树鼩置于穿梭箱中，实验组接受不可逃脱的足部电击（0.7mA，30s × 40），对照组树鼩接受可逃脱的足部电击（0.7mA，30s × 40）的方式。经过一周的训练后，我们发现实验组在面临可逃脱的电击时逃跑失败次数（图21–9）、潜伏期（图21–10）显著增加。给予习得性无助树鼩口服氟西汀（15mg/kg）两周后，在面临可逃脱的电击时，它们的逃避失败次数（图21–11）和逃跑潜伏期（图21–12）能够显著改善。这些结果表明，树鼩的习得性无助模型具有较好的表面效度和预测效度。

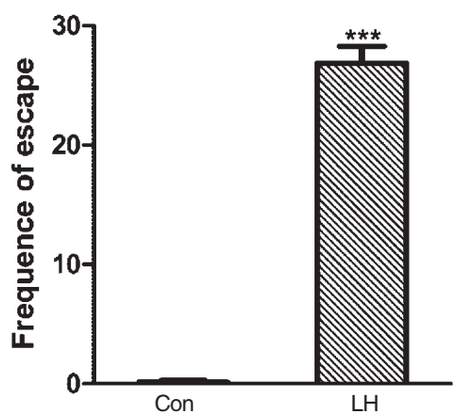



图21–9　习得性无助训练使逃跑失败次数增加

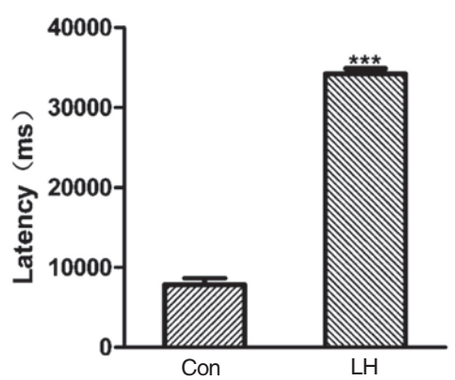



图21–10　习得性无助训练使逃跑潜伏期增加

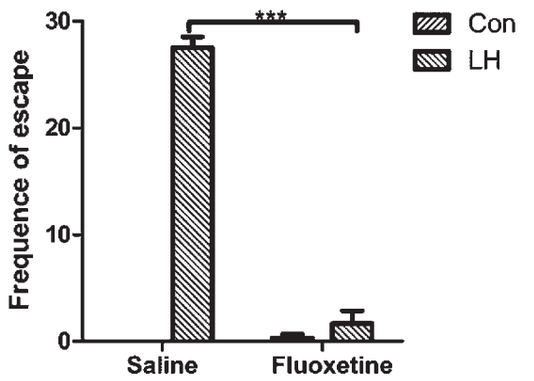



图21–11　氟西汀降低逃跑失败次数

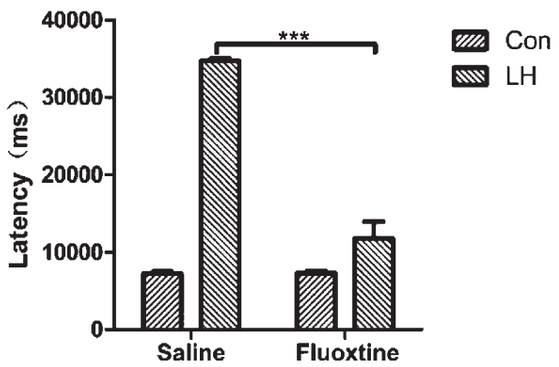



图21–12　氟西汀降低逃跑潜伏期

## 三、慢性不可预见性温和应激模型

采用一系列温和的躯体物理刺激方式，使动物长期处于不可预知的应激状态中，从而导致动物出现抑郁样行为，如糖水偏爱水平下降、活动性减少或新颖寻求水平降低等，被称为慢性不可预见性温和应激（chronic unpredictable mild stress, CUMS）模型。该模型可以较好地模拟人类经历生活环境中的一系列变故而导致的快感缺失、兴趣下降等抑郁症的核心症状，具有较好的表面效度和病因学效度。但缺点是实验周期长，动物可能对反复呈现的应激产生适应，由此产生的问题是动物模型不够稳定，信度不够好。树鼩的应激敏感性高，除对社会心理应激较为敏感外，对于外界环境的改变，如束缚、频闪光、白噪音、昼夜颠倒等，也非常敏感，应激适应性较弱。因此，利用树鼩创建CUMS模型是对社会挫败模型的补充，可以从不同的病因学角度探讨抑郁症的发生机制。另外，抑郁症患者一般都有不同程度的睡眠障碍，睡眠节律的改变是抑郁症的重要临床症状。树鼩是昼行动物，有明确的节律行为，在研究睡眠失调与抑郁症之间的关系以及抗抑郁药物对昼夜节律的影响中，树鼩比啮齿类动物具有更大的优势。

目前，学习记忆、认知灵活性及预期等高级认知活动对抑郁症的影响也成为研究热点。但是，由于啮齿类的进化地位较低，新皮层功能不够完善，完成较为复杂的认知任务困难很大。树鼩脑体重比接近非人灵长类，具备颜色识别能力和深度知觉，前肢拇指与四指能对握，比啮齿类有更好的灵巧性。近年来，有研究用视–空间认知任务等，发现树鼩认知能力远高于啮齿类[14, 15]。本实验室的研究也发现，树鼩的学习能力很强，1小时就可以学会操作性条件反射（图21–13）。这些特点使得树鼩可能比较容易地完成反转学习、奖惩预期与决策等啮齿类较难完成的任务。可以预见，使用树鼩模型探究抑郁

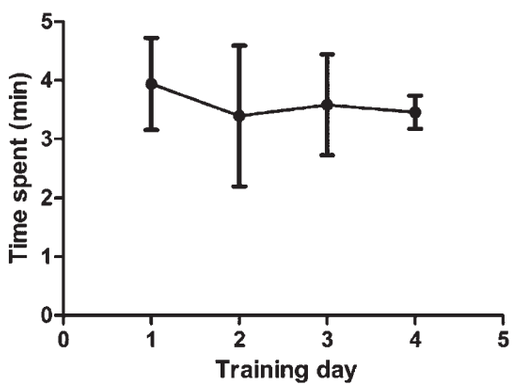



图21–13　树鼩完成压杆任务所需的时间及习得的行为保持稳定

症相关的认知功能的损伤可能会成为抑郁症研究的热点之一。

## 第三节 树鼩的药物成瘾模型

药物成瘾是一种慢性、复发性脑疾病，高复吸率是其典型特征。虽然复吸行为可以由生理戒断反应所驱动，但精神依赖是诱发复吸的主要原因。反复使用成瘾药物是产生成瘾的必要条件。在成瘾行为形成的早期，奖赏效应可以产生正性的强化效果，从而驱动觅药行为；药物被反复使用后，停药会导致生理与情绪戒断反应，戒断反应也是驱动觅药行为的主要动因。随着药物使用次数的增加，机体的神经系统发适应性改变，行为效应也发生变化，奖赏效应会逐渐减少，记忆过程发生重要变化，由强化的记忆发展到习惯化，线索诱发的用药预期成为诱发觅药行为的主要动因。与此同时，在药物反复作用下，情绪系统功能亢进，而认知控制系统的功能弱化，最终产生强迫性或冲动性觅药行为。

目前，最常用的啮齿类动物成瘾模型主要包括精神运动兴奋性（locomotor activity, LA）及行为敏感化（behavioral sensitization）、自身给药（self administration, SA）以及条件性位置偏爱或厌恶（conditioned place preference or aversion, CPP/CPA），以及建立在CPP或SA基础上的复吸模型（reinstatement）。精神运动兴奋性及敏感化是大多数成瘾药物共有的特征，是药物作用后的直接反应。连续使用药物后，相同剂量的药物诱发的兴奋性越来越高，这一模型主要用来研究反复使用药物后神经系统的适应性变化的机制。条件性位置模型是研究成瘾相关的学习记忆的经典范式，也可以用来研究药物的奖赏效应或戒断相关的厌恶反应。以上两类模型都是动物被动接受药物的成瘾模型。自身给药模型是建立在操作性条件反射基础上的主动用药行为，在不同类型强化比率程序下，动物需要付出不同的代价或劳动来获取药物，与人类获取成瘾药物的过程类似。更重要的是，在动物获取药物的过程中，可以设置不同的线索信号和强化程序，用来研究成瘾相关的条件性强化、奖赏预期、动机或决策等认知功能。因此，SA模型具有非常好的表面效度，是目前研究成瘾行为的最好范式。但是，由于啮齿类新皮层进化不够完善，SA模型建立的成功率低，很难有效地进行决策、控制或预期等高级功能方面的研究。

树鼩因新皮层进化相对较好，学习速度很快，短时间内能学会操作性条件反射行为，并稳定保持。其前爪能灵活抓握，能辨别不同的颜色，有可能建立效度更好的复杂行为的SA范式。有研究还发现，可卡因–苯丙胺调节转录肽在树鼩的海马内分布与人类相似，而啮齿类的分布则和人类有所区别[16]。这一结果提示，树鼩比啮齿类的成瘾模型可能具有更好的结构效度。另外，树鼩对酒精有天性偏好[17]，被认为可能是人类以外主动定期饮酒的动物，可能也是研究酒精成瘾机制的模式动物。目前，国际上尚没有关于树鼩SA模型的报道。

### 一、自我给药模型

尽管许多事实表明，树鼩具有建立SA模型的潜在优势，但要建立符合树鼩行为特性的SA范式，还具有一定的难度。首先，是给药方式。绝大多数的SA模型都是通过静脉给药，以确保其在短时间内进入大脑，并产生奖赏强化效应。而静脉给药需要通过手术，将硅胶管道植入肺静脉或右心房，增加了手术痊愈的难度。其次，静脉给药的管道系统需要定期冲洗，但树鼩较容易受感

染，增加了维护的风险。再者，树鼩的运动速度快，以跳跃运动为主，因此，静脉注射的管道系统维护也存在一定困难。总之，树鼩的静脉给药SA模型仍需完善特定手术平台、管道系统及行为操作箱系统。

相对于静脉给药方式，口服给药途径较为容易，但仍然有一些问题需要解决，例如，大多成瘾药物口感苦涩，动物不愿主动服用，即使是酒精也存在同样的问题；另外，成瘾药物通过胃肠道的吸收进入血液，通过肝脏循环后，药物活性大大下降，而且从口服、吸收循环再进入到大脑，可能需要更多的时间，这样的时间差不利于建立行为操作和奖赏效应的直接联系。若在行为训练开始阶段，将成瘾药物与糖水混合，利用糖水的初始强化效应，建立操作性条件反射后，然后降低糖水的浓度可判断动物是否建立了基于药物强化而不是糖水强化的操作行为。

基于上述考虑，我们探索建立了口服吗啡蔗糖水的SA范式。首先，将不同浓度的吗啡溶于10%的蔗糖水，考察了树鼩对不同浓度吗啡糖水自由饮用情况。发现在不需要剥夺饮水的情况下，树鼩1小时内能喝完10mL的含1mg/mL、2mg/mL或5mg/mL的吗啡蔗糖水，而大鼠即使在24小时水剥夺的情况下，也不愿意喝含1mg/mL的吗啡蔗糖水，12小时的饮用量不超过10mL。树鼩能够饮用不同浓度的吗啡蔗糖水为建立口服SA奠定了基础。于是，我们以糖水为强化物训练3天，建立了稳定的操作性条件反射；然后，在慢性吗啡处理之前，用累进比率程序测量糖水与吗啡糖水（2mg/mL）的动机值。我们发现，树鼩最初糖水获取动机高于吗啡糖水的动机，说明吗啡的苦涩味道降低了糖水的强化值；若连续饮用10mL吗啡糖水，以1mg/mL、2mg/mL、5mg/mL三种浓度递增给药，每一浓度连续3天，9天后可建立吗啡依赖状态；此后戒断1天，再次测试糖水和吗啡糖水的动机值时发现，与吗啡慢性处理之前比较，吗啡糖水的动机值明显增加；停止饮用吗啡糖水1周后，继续测试动机值，仍然观察到类似的结果（图21–14）。这一模型较好地表现了口服成瘾的行为过程，为探讨其它范式的SA模型奠定了基础。

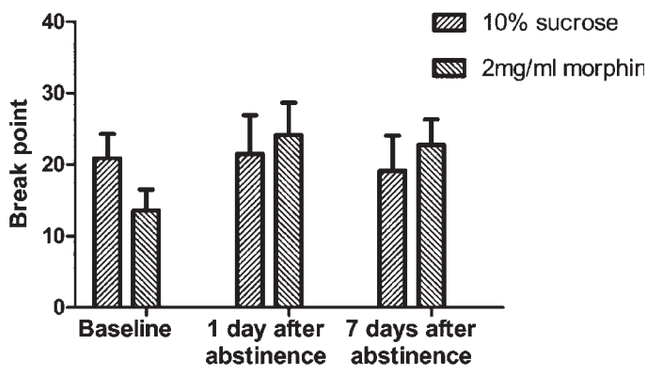



**图21–14　树鼩口服吗啡SA模型：慢性吗啡处理增加树鼩对吗啡糖水的觅药动机**

## 二、条件位置偏爱模型

CPP模型操作简单，重复性好，表面效度较好，是成瘾机制研究中被广泛运用的行为模型，其中包括成瘾过程中不同的行为实验范式，例如获得、提取、巩固、再巩固、消退或重建等。此类模型对动物的认知能力要求不高，可以测试动物被动的成瘾行为反应，因此，在啮齿类动物被普遍使用。因为受结构效度和预测效度的影响，来自啮齿类动物数据的作用是有局限性的，因而在未来药物研发方面仍然需要寻求模式动物的突破。

目前，对树鼩的内源性阿片系统的研究报告仍然不多。有一些研究结果表明，树鼩脑内有丰富的μ受体，但 δ 和 κ 受体较少[18]。其特异性的阿片受体系统是否有助于深入了解成瘾或疼痛的机

制，仍然是我们要面对的挑战。建立树鼩的CPP模型，对研究成瘾记忆长期性的细胞分子和遗传机制、动机激励效应等关键病理机制可能具有重要作用。基于巴甫洛夫条件反射原理，CPP的非条件反应即成瘾药物的奖赏效应，考虑到树鼩对于颜色的敏感性，可辨别红、黄、绿、灰4种颜色，我们选择箱内的条件刺激为红色条纹。通过1mg/kg肌肉注射四轮训练，树鼩就能建立稳定的CPP行为（图21–15）。关于戒断相关的负性情绪反应，有研究发现，在给形成吗啡依赖的树鼩腹腔注射纳洛酮催瘾可以建立CPA模型，可用于研究药物依赖和耐受的生物学机制，以及减轻戒断症状药物的筛选[19]。

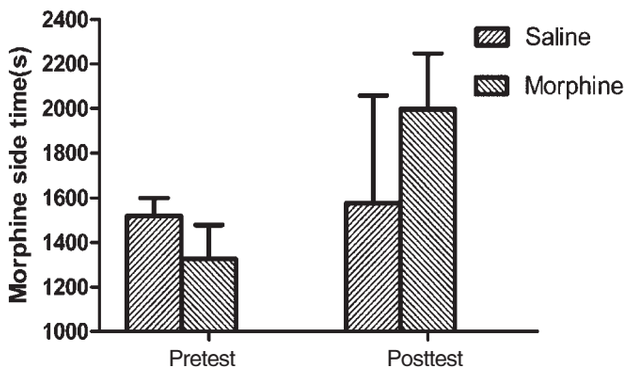



**图21–15　四轮训练后树鼩在吗啡训练侧时间显著增加**

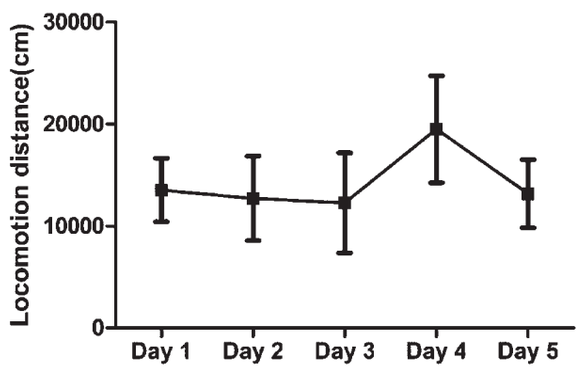



**图21–16　连续注射吗啡树鼩自发活动量上升**

另外，树鼩行动极其敏捷，其自发活动（LA）与啮齿类的平面运动不同，主要包括走、爬、跑、跳跃及前后空翻等。我们在实验中发现连续4天注射1mg/kg的吗啡，树鼩的平面活动性有增加出现行为敏感化现象的趋势（图21–16），但平面运动不能代表树鼩精神运动兴奋性的整体情况。因此，对于树鼩的LA进行记录时，除了要记录树鼩的三维运动距离外，还可以辅助记录树鼩的跳跃和空翻次数等。另外，树鼩的叫声也是其比较重要的特点，树鼩在不同的情境下会发出不同的叫声，如受到威胁时惊恐的报警声、威胁侵犯者的喷鼻声、愉悦的鸟鸣声等。根据这些特点，可以考虑在建立树鼩成瘾行为模型不同阶段记录树鼩的叫声，有可能为研究成瘾过程中情绪行为的测量提供新的指标。

## 第四节　树鼩的创伤后应激障碍模型

创伤后应激障碍（PTSD）是指个体经历、目睹或遭遇到一个或多个涉及自身或他人的实际死亡，或受到死亡的威胁，或严重的受伤，或躯体完整性受到威胁后，所导致的个体延迟出现和持续存在的精神障碍。主要有3类症状表现：持续的重新体验创伤事件（re-experience）、对创伤事件相关的刺激回避及对一般事物显得麻木（avoidance & emotional numbing）、高唤醒状态

（hyperarousal）（DSM–IV., 1994）。PTSD具有延迟出现的特点，一般在遭受创伤数日、数周甚至数月后才得以体现[20]。PTSD具有明确的病因，即一个或多个重大应激事件。目前的动物模型都是从病因学的角度来模拟PTSD，主要包括单程长时应激模型（single prolonged stress）、强电击模型、水下窒息模型，以及遭遇天敌或天敌气味模型。其中，天敌气味模型因其简单，应激源是心理社会应激，被认为具有更好的表面效度。强电击模型因为应激强度可控制，操作简便被广泛用于研究应激强度与PTSD形成关系的研究。

虽然PTSD的病因明确，但症状具有高度异质性，并且核心症状不明确，因此如何在模式动物上测量PTSD样行为存在比较大的差异，再体验和闪回症状在动物模型难以测量；回避和麻木症状大都采用焦虑行为的测量模型，比如，高架十字迷宫、广场或社会交往行为；只有高唤醒的测量比较一致，都采用惊反射来测量，但具体测量模式各异。尽管PTSD样行为的测量模式存在比较大差异，但是测量的时间点都有共同特点，即需要在应激经历后间隔一段时间（至少1周，通常是2周左右）进行PTSD样行为的测量。

目前，尚没有树鼩PTSD模型的报道。树鼩对应激变化敏感，有相对发达的前额叶皮层与海马，特别是应激相关的基因与神经内分泌系统与人类接近，因此，树鼩是建立PTSD模型的理想模式动物。建立树鼩PTSD模型，关键是要找出对其生命构成威胁的应激刺激。树鼩主要是树栖生活，天敌不明确。很难在实验室进行天敌与天敌气味的模拟，但由于树鼩胆小易受惊吓，实验人员在一定时间多次捕获捉拿可以认为是威胁其生命的应激刺激，有可能是一种建立PTSD模型的方式，但捉拿捕获行为不容易量化。因此，强电击模型应该是建立树鼩PTSD模型更可行的方式。我们在实验中发现，树鼩对足部电击敏感，在电击强度为0.2mA时即可引起树鼩的警觉；电击强度为0.6mA时树鼩就会发出喷鼻声而且四处逃窜；而当电击强度升至1.2mA时，树鼩逃跑行为减少，同时出现僵直并伴有嘶叫声。增大电击强度到3mA时树鼩就会出现僵直行为，不再逃跑。因此，可以选择3mA的足部电击作为建立树鼩的PTSD模型的应激刺激。建立树鼩PTSD模型的难点是如何测量树鼩的PTSD样行为，因为一般测量啮齿类焦虑行为的模式，如广场、高架十字迷宫、明暗箱等，都不能用来测量树鼩的焦虑行为。社会交往可能是测量树鼩焦虑行为可行方式之一。另外，对电击环境的条件性位置回避是测量回避行为的方法，我们初步结果发现树鼩对电击环境能产生明显的回避，且能保持1月之久，而且几乎是完全回避，基本不再进入电击箱（图21–17）。惊反射具有很好的种系进化的保守性。我们的结果表明，树鼩对不同强度的白噪音的反应存在明

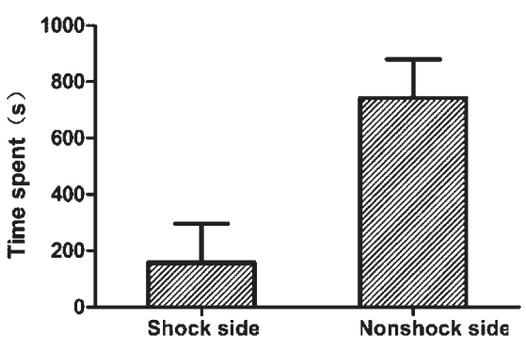



图21–17　树鼩显著回避电击环境

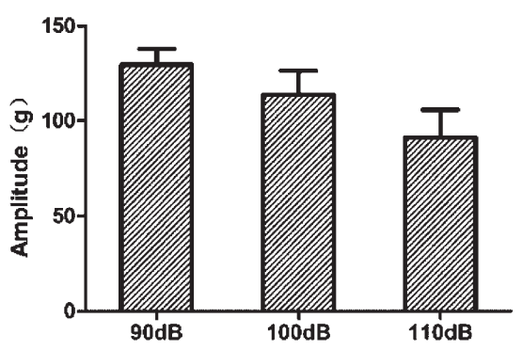



图21–18　树鼩对不同强度白噪音的惊吓反应

显的强度依赖梯度效应，因此，惊反射是测量高唤醒行为的可靠指标（图21–18）。

经历电击后树鼩的听觉惊反射增强（图21–19）。这些结果初步表明，大强度的电击经历后，树鼩表现出明显回避和高唤醒样行为，能比较好地建立树鼩PTSD动物模型。

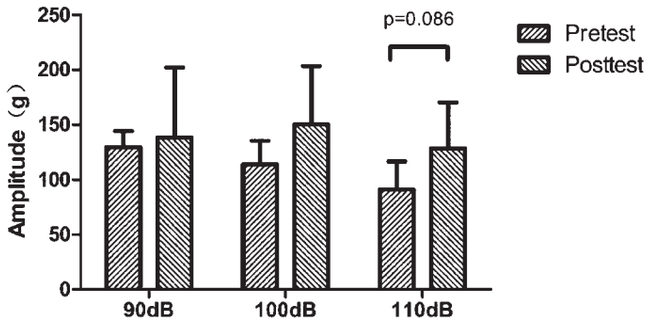



**图21–19　创伤应激经历后树鼩的听觉惊反应增强**

## 第五节　慢性痛模型

慢性疼痛是指持续一个月以上的疼痛，主要包括神经病理性痛、炎症痛、癌症痛等。痛觉体验包括疼痛感觉和疼痛的负性情绪体验两个方面，疼痛体验主要在脊髓、丘脑等皮层下组织加工，而疼痛的负性情绪体验则需要高级中枢的加工与调控。传统的疼痛动物模型中常用的防御性回避行为检测（如甩尾和缩足）可能不涉及脊髓以上的高级中枢；即使是抬脚行为（如热板范式）也只能视为延髓–脊髓反射。许多其它行为如嘶叫、抓挠、咬、舔和防御行为在去大脑动物中也能看到。而开发镇痛药物的临床前试验也都是基于此类刺激诱发的防御性回缩反应。所以测量到的很可能不是疼痛本身，而是伴随疼痛的过度活跃的反射活动。因此，由这些模型筛选出的镇痛药物只能减轻初级的疼痛感觉，而无法作用于疼痛的高级情感反应，对于癌症等重大疾病导致的慢性痛的治愈效果更差。综上所述，传统的疼痛动物模型表面效度、结构效度均不太令人满意。因此，找寻一种新型的慢性痛动物模型显得尤为迫切。

条件性位置范式可以用来研究疼痛相关的负性情绪，基本原理是以疼痛或疼痛缓解（镇痛）作为非条件刺激，并与特定环境或信号（CS）结合而形成联结；当动物再次暴露于该环境或信号时，表现出明显的厌恶或偏爱动机。CPP和CPA是个体主动学习、主动选择产生的。与传统的采用反射行为测量疼痛的方法相比，它包括了更复杂的情绪、动机和决策等过程，需要大脑高级皮层的参与。目前，条件位置范式在疼痛领域主要用于研究疼痛的情绪维度以及自发、持续性疼痛的机制，该范式对于揭示疼痛本质以及有效地评价新型镇痛药物都具有重要的意义，具有较高的结构效度和预测效度[21]。

树鼩的前额叶皮质发育良好，因此可能具有比大鼠更高的学习能力和决策能力。且树鼩的视觉发达，对疼痛也较为敏感，因此采用树鼩创建慢性痛的CPP及CPA模型可能具有更高的结构效度，而且实验难度可能也会比啮齿类低。另外，吗啡是一种有效的镇痛药，主要作用于体内的mu（μ）、delta（δ）、kappa（κ）3种阿片受体。研究发现，树鼩的脑部和脾脏有mu（μ）受体的表达，而无另外两种受体的表达[18]。这一特点使得树鼩可以作为慢性痛的模型动物能更好地研究mu（μ）受体在痛觉中的作用，而不受另外两种阿片受体的影响。目前，国际上尚没有关于树鼩疼痛模型的报告。

## 第六节 树鼩的攻击行为

很多精神病患者都会表现出易激惹及攻击行为，往往会危及他人及患者自身的人身安全。在动物模型的研究中，研究者会对动物的攻击行为进行量化，可以获得动物从静止状态到发动攻击的潜伏期、攻击持续时间、攻击的动作及攻击的目标等。在下一步的实验中就可以干预某些脑区或递质系统，继而观察其对攻击行为的影响。一般动物的领地遭到侵犯或者为争夺食物、配偶都会产生愤怒情绪，进而引发攻击行为。居住者–入侵者（resident-intruder）模型常被用于研究动物的攻击行为。猫是研究攻击行为的常用模型动物，因为其攻击行为的模式比较固定。但也有树鼩的攻击行为模型。

Fuchs E.等人[22]将雄性树鼩（入侵者）放入有打斗经验的陌生雄性树鼩（居住者）的饲养笼中，居住者为守护自己的领地会发起猛烈的攻击行为，试图将入侵者赶出笼子或迫使其屈服。观察发现，树鼩的攻击行为主要有追逐、边追逐边进攻、边跳跃边进攻以及咬等，而入侵者先是打斗，后表现出僵直行为。而树鼩的攻击目标则集中在背部，可见咬伤及擦伤。我们实验室在建立树鼩的社会挫败模型中也发现树鼩在打斗中除了攻击行为外还伴随着尖厉凄惨的惊叫声、威胁的喷鼻声等。此外，居住者除了会咬入侵者的背部外偶尔还会出现踩踏背部的行为。这些攻击行为方式和啮齿类的攻击行为较为相似。

## 第七节 研究展望

目前，临床症状的模拟是构建精神疾病动物模型的主要方式，临床症状的诊断和分类是基于美国精神疾病统计手册（DSM）的标准，其中一个突出的问题就是，大多数精神疾病是不同症状集合成的综合征，并且具体症状也是基于主观报告，缺乏客观的可测量的病理学指标。由此引发的问题是同一疾病高度异质性，比如，在抑郁症的诊断标准中，一个必要条件是符合9个症状表现的其中5个就可以，这样的结果是同样是抑郁症每个患者的5个症状表现各异；而另一个趋势是不同类型精神疾病的症状有一定程度重叠，共病率高。如快感缺失既是抑郁症的核心症状，也是精神分裂症的主要症状之一，同样也存在于创伤后应激障碍之中，而在3种精神疾病中导致快感缺失的病理机制可能不同。因此，尽管DSM在临床应用中有很好的信度，但是其效度饱受质疑。

基于DSM体系的基础研究，特别是动物模型的构建，其基本思路是先模拟症状表现，然后再研究这些症状的脑机制，进而认为该机制可能是该类精神疾病产生的病理机制。基于这一思路探讨精神疾病的病因与病理机制可能会产生严重偏差，其根本原因是临床症状是人为主观划分的，而且症状具有明显的异质性，对某一症状或症状群的机制的研究不能准确代表该类精神疾病（通常是综合征）的病理机制。由此而产生的直接后果是，研发的药物只对50%的患者有效。同时，基于主观测量的诊断分类体系，很难吸收现有的神经科学与遗传学研究的新进展，并在一定程度延滞了对精神疾病的病因和病理机制的研究。因此，需要一个新的分类体系作为补充来指引精神

疾病的病因学、病理性机制的基础研究，并为临床新药开发提供依据。

最近，美国国立精神卫生研究院（National Institute of Mental Health, NIMH）提出了一种新的精神疾病的划分体系——研究领域标准（research domain criteria, RDoC）。其基本观点认为精神疾病不是临床症状的综合体，精神疾病的病与非病不是全或无的分类概念，而是在行为连续谱的不同位点，通过研究这些基本行为类别的变化模式和客观测量方式，以及相应的可测量的神经生物学指标，可以找出病与非病临界分别点。因此，基础研究的目的，首先需要找出具有明确脑环路基础的基本行为类别，然后在不同层面探讨该行为的神经生物学机制。该体系总结了5类基本行为：负性效价系统（恐惧、焦虑等），正性效价系统（奖赏学习、奖赏评价等），认知系统（注意、知觉、工作记忆、认知控制等），社会加工系统（依恋形成、社会交往等）及唤醒系统等[23]。RDoC体系为精神疾病的基础研究提供了新的思路。

未来在创建新型情绪相关的精神疾患动物模型时，可以考虑在RDoC体系的指导下结合DSM的精神疾病分类方式。其根本目的是，充分运用当前神经科学与遗传学的先进技术，探讨精神疾病的病因与病理机制，为精神疾病的诊断和临床新药的开发提供可靠的依据。对于情绪相关的精神疾病而言，可以在DSM分类下，关注不同类别的精神疾病具有共性的RDoC体系的5类基本行为：①在负性效价行为方面，抑郁症、双向障碍、精神分裂症、PTSD、焦虑症的患者都会出现焦虑、心境低落、恐惧等负性情绪；②在正性效价行为方面，抑郁症、精神分裂症及PTSD患者都会出现快感缺失、动机缺乏等症状，从而影响了患者对奖赏物的评估，进而影响奖赏学习等；③在认知行为系统方面，精神分裂症的阴阳性症状、重度抑郁症及双向障碍的躁狂期均会出现注意力无法集中、妄想、幻觉等症状，而精神分裂症的阴性症状、抑郁症及双向障碍的抑郁期则会出现记忆力下降、反应时延长、思维灵活性差等；④在社会加工行为方面，精神病患者很难与他人建立正常的人际关系，严重者甚至会危及他人的人身安全，如出现攻击行为等；⑤在唤醒与行为调节系统方面，精神病按照唤醒程度的高低会出现阳性和阴性症状，阳性症状表现为患者的神经系统高度激活，出现易激惹、警觉性高、思维过分活跃等症状，而阴性症状则主要指患者的激活水平较低，出现麻木、回避等症状。如何界定和有效测量基本行为类别是RDoC研究范式面临的挑战。

树鼩是一种新的模式动物，目前对这一动物的基因、脑结构和神经内分泌等特征了解比较有限。随着对这一物种的基础生物学数据的深入了解，通过建立树鼩动物模型，从不同层面研究这些不同类别的精神疾病中具有共性的基本行为的生物学机制，特别是认知和社会加工等高级行为系统的脑机制，有可能在情绪相关的精神疾病的病因与病理机制的研究中取得突破性进展。

## 参考文献

[1]Duman CH. Models of depression. Hormones of the limbic system. San Diego: Elsevier Academic Press Inc, 2010: 1-21.

[2]Neumann ID, Wegener G, Homberg JR, et al. Animal models of depression and anxiety: What do they tell us about human condition? Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiat, 2011, 35(6): 1357-75.

[3]Divac I, Bjorklund A, Lindvall O, et al. Converging projections from mediodorsal thalamic nucleus and mesencephalic dopaminergic-neurons to neocortex in 3 species. J Comp Neurol, 1978, 180(1): 59-71.

[4]Van Kampen M, Kramer M, Hiemke C, et al. The chronic psychosocial stress paradigm in male tree shrews: evaluation of a novel animal model for depressive disorders. Stress, 2002, 5(1): 37-46.

[5]Ohl F, Kirschbaum C, Fuchs E. Evaluation of hypothalamo-pituitary-adrenal activity in the tree shrew (*Tupaia belangeri*)

via salivary cortisol measurement. Lab Anim, 1999, 33(3): 269-74.
[6]Cohen S, Janicki-Deverts D, Miller GE. Psychological stress and disease. JAMA-J Am Med Assoc, 2007, 298(14): 1685-7.
[7]刘利学，秦琴．抑郁症动物模型概述及评价．实验动物科学，2010，27（1）：53–9．
[8]王静，周启心，吕龙宝，等．社会竞争失败病因学的抑郁症树鼩模型．动物学研究，2012，33（1）：92–8．
[9]Tidey JW, Miczek KA. Acquisition of cocaine self-administration after social stress: Role of accumbens dopamine. Psychopharmacology, 1997, 130(3): 203-12.
[10]彭燕章，叶智彰，邹如金，等．树鼩生物学．昆明：云南科技出版社，1991：87–8．
[11]Fuchs E, Kramer M, Hermes B, et al. Psychosocial stress in tree shrews: Clomipramine counteracts behavioral and endocrine changes. Pharmacol. Biochem Behav, 1996, 54(1): 219-28.
[12]Cryan JF, Markou A, Lucki I. Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. Trends Pharmacol Sci, 2002, 23(5): 238-45.
[13]Pollak DD, Rey CE, Monje FJ. Rodent models in depression research: classical strategies and new directions. Ann Med, 2010, 42(4): 252-64.
[14]Ohl F, Oitzl MS, Fuchs E. Assessing cognitive functions in tree shrews: visuo-spatial and spatial learning in the home cage. J Neurosci Methods, 1998, 81(1-2): 35-40.
[15]Takahashi M, Ushitani T, Fujita K. Inference based on transitive relation in tree shrews (*Tupaia belangeri*) and rats (*Rattus norvegicus*) on a spatial discrimination task. Psychol Rec, 2008, 58(2): 215-27.
[16]Abraham H, Czeh B, Fuchs E, et al. Mossy cells and different subpopulations of pyramidal neurons are immunoreactive for cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide in the hippocampal formation of non-human primates and tree shrew (*Tupaia belangeri*). Neuroscience, 2005, 136(1): 231-40.
[17]Wiens F, Zitzmann A, Lachance MA, et al. Chronic intake of fermented floral nectar by wild treeshrews. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105(30): 10426-31.
[18]张庆余，范晓娜，曹毅．正常猕猴与树鼩神经系统和免疫系统组织中大麻素与阿片受体的表达．动物学研究，2011，32（1）：31–9．
[19]孙永梅，杨建珍，孙华英，等．慢性吗啡依赖树鼩模型的建立．动物学研究，2012，33（1）：14–5．
[20]Joy CB, Adams CE, Rice K. Crisis intervention for people with severe mental illnesses: A cochrane systematic review. Schizophr Res, 2000, 41(1): 230-1.
[21]罗非，姜召彩，王锦琰．条件位置范式在疼痛研究领域的应用．心理科学进展，2013，21（2）：191–8．
[22]Blanchard RJ, Ohl F, Van Kampen M, et al. Attack and defense in conspecific fighting in tree shrews (*Tupaia belangeri*). Aggressive Behav, 2001, 27(2): 139-48.
[23]Cuthbert BN, Insel TR. Toward the future of psychiatric diagnosis: the seven pillars of RDoC. BMC Med, 2013, 11(1): 293-6.



Tree shrews

# 第二十二章 树鼩病毒感染模型的研究

第二篇 疾病树鼩模型
TREE SHREW ANIMAL MODELS

吴春晨 郭 静 杨 琪 陈新文

## 第一节 前 言

病毒是介于生命和非生命之间的生物大分子，与我们的生活和生命健康密切相关。据2012年中国卫生统计提要相关数据显示，2011年我国主要28种传染病的发病率为241.44/100000，致死率为1.138/100000。其中由病毒引起的疾病主要有艾滋病、病毒性肝炎、甲型H1N1流感、麻疹、流行性出血热、狂犬病、流行性乙型脑炎和登革热，其发病率为106.38/100000，致死率为0.911/100000。由此可见，病毒感染引起的疾病占我国主要传染病发病率的近一半，是传染病致死的主要病因，严重威胁国民健康。建立方便有效的、与人类有较近亲缘关系的动物感染人病毒模型，对于了解病毒的生物学特性、感染致病机理及制定有效防控措施具有重要意义。

树鼩与人类在生理生化、代谢、基因组学等方面的相似性远高于大鼠、小鼠、土拨鼠等常用啮齿类实验动物，并具有个体小、便于实验操作、价廉易获得、能感染多种与人类疾病有关的病毒等显著特点，可以发展为较为理想的病毒感染动物模型。

本章将主要介绍树鼩病毒感染模型方面的国内外研究进展。

## 第二节 乙型肝炎病毒树鼩感染模型的研究

### 一、乙型肝炎病毒

#### （一）HBV的分子生物学特征

乙型肝炎病毒（hepatitis B virus, HBV）属于嗜肝DNA病毒科，正嗜肝病毒属。HBV的基因组是部分双链环状DNA，大小约为3.2kb。负链具有固定长度，正链长度可变。基因组高度重叠，含

有C、P、S和X 4个转录方向一致的开放阅读框，分别编码pre–C蛋白和C蛋白、DNA聚合酶蛋白、L蛋白、M蛋白、S蛋白、X蛋白。在感染病人血清中可在电镜下直接观察到3种颗粒：大球形颗粒、小球形颗粒和管形颗粒。大球形颗粒，又称Dane颗粒，由囊膜蛋白和含有DNA分子、病毒自身的依赖DNA的DNA聚合酶的核衣壳组成，是完整的HBV病毒粒子；而后两者均不含核酸，不能复制，所以不具备感染性。

### （二）HBV的生活周期

HBV整个复制生活周期包括附着、侵入、脱壳、转录（逆转录）、复制、包装与释放等过程。病毒进入体液之后由经血液循环系统进入肝脏，通过pre-S蛋白与肝细胞膜上相应的受体结合而吸附到肝细胞表面。与HBV包膜糖蛋白相互作用的蛋白包括载脂蛋白H、多聚人血清白蛋白、羧肽酶D、纤连蛋白及白细胞介素–6等[1]。含有病毒基因组的核衣壳进入到细胞浆内，再脱去核衣壳蛋白，形成全长的HBV松弛环状DNA（relaxed circular DNA，rcDNA）。rcDNA进入到肝细胞核内，构象发生转变，在宿主DNA多聚酶的作用下延伸补平正链，形成共价闭合环状DNA（covalent closed circle DNA, cccDNA）[2]。该DNA分子是病毒前基因组RNA（pregenomic RNA, pgRNA）的合成模板，约1.1倍基因组长度的pgRNA合成后，一方面在细胞质中与病毒核心抗原、DNA多聚酶一起被包装入病毒核壳体，另一方面又重新回到细胞核内以补充cccDNA量[3]。包装入核壳体的pgDNA为模板经逆转录合成负链DNA，前基因组降解后，又以负链DNA为模板合成正链DNA，在正链合成过程同时，含有rcDNA的核衣壳成熟，正链DNA合成终止，至此形成了成熟的病毒核壳体。新合成的DNA在肝细胞内质网和高尔基复合体中装配，最终产生新的病毒颗粒，再以芽生的方式从肝细胞膜释放出来，又开始下一轮的感染和复制周期（图22–1）。

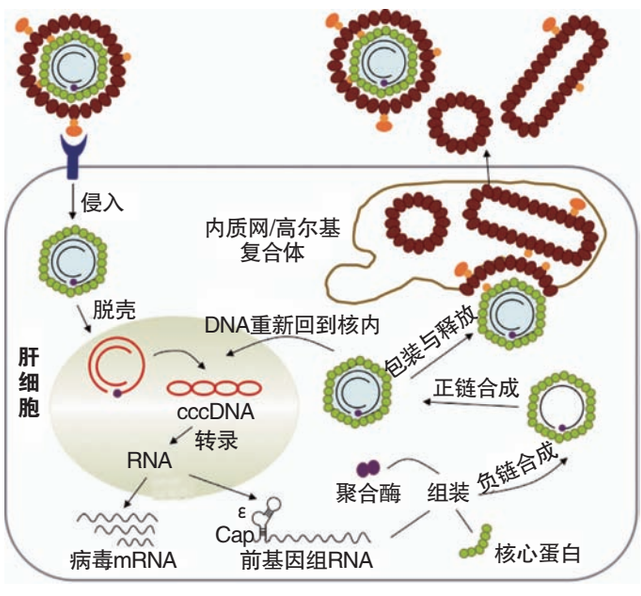



**图22–1　HBV的生活周期**

### （三）HBV的致病机制

HBV感染的致病机制尚不完全清楚。影响病毒持续和致病的因素主要包括两方面：宿主因素和病毒因素。

在急性HBV感染的过程中，机体由于Ⅰ型干扰素和促炎性细胞因子产生不足而发病[4]。近年来，体外研究表明肝细胞的天然免疫应答可识别HBV的感染并限制其传播。病原通过与Toll样受体（Toll-like receptors, TLRs）等可识别受体结合，介导机体产生抗病毒反应并分泌Ⅰ型干扰素（interferon, IFN）IFN-α/β[5]；然后Ⅰ型干扰素刺激抗原递呈细胞产生IL–8、IL–12、IL–18和其它细胞因子。IL–12、IL–18紧接着诱导活化NK和NKT细胞。NK细胞也可以被感染肝细胞表面的

MHC–Ⅰ类分子或压力诱导分子所激活。虽然NK和NKT细胞可以通过直接的细胞毒效应加剧肝脏的损伤，但其调控机制及促进病毒持续机制仍然存在争议[6]。

HBV并不直接引起肝细胞损害，而机体针对HBV蛋白的免疫病理反应是致肝细胞损伤的主要因素。病毒感染细胞后，病毒蛋白如HBcAg等经过细胞内的加工处理由MHC-Ⅰ类分子递呈在肝细胞表面，并被HLA-I类分子限制性$CD8^+$T细胞识别，$CD8^+$T细胞继而通过细胞毒效应直接杀伤靶肝细胞。值得注意的是，HBV被天然免疫系统识别后，T、B淋巴细胞才被激活。其活化的范围和程度决定了HBV感染的预后。动物和临床研究表明在急性自限性乙肝感染中，针对HBV蛋白的$CD8^+$T细胞和$CD4^+$T细胞应答较强，并具有多克隆性和多特异性；而在慢性HBV感染中，这种反应非常微弱甚至难以观察到[6]。除了直接的细胞毒效应之外，$CD8^+$T细胞还可通过分泌IFN-γ和TNF-α（tumour necrosis factor α）而发挥非细胞毒效应。众所周知，IFN-γ和TNF-α可通过多种机制发挥抗病毒效应。实验表明，IFN-α/β在体内可显著抑制HBV基因的表达，其在免疫功能正常的成人抗HBV感染过程中起着决定性作用[2]。因此，现在的观点认为非溶细胞机制和溶细胞机制在成功控制HBV并最终消除病毒的过程中发挥同等重要的作用[7]。

另一方面，HBV病毒可以通过以下机制干扰天然免疫系统的识别：①HBeAg可通过阻断或下调适配子蛋白Mal、TRAM以及TRIF等的表达拮抗TLR信号通路，抑制下游NF-κB和IFN-β的活化。在HBeAg阳性慢性HBV患者中，肝细胞、Kupffer细胞以及外周血单个核细胞的TLR-2明显下调。②STAT转位和甲基化能力降低。在HBV感染的人肝细胞中，常规IFN-α处理不能促进STAT-1（signal transducer and activator of transcription 1）的核转位[8]。HBV还会影响STAT的甲基化和细胞DNA甲基转移酶的活性[9~11]。③HBV非结构蛋白HBx可以通过抑制RIG-I（retinoic acid inducible gene I, RIG-I）信号通路干扰天然免疫[12]。④HBsAg亚病毒颗粒（subviral particles, SVP）抑制TLR-9介导的IFN-α的产生[13]。

HBV感染与肝细胞癌的发生密切相关，多种机制参与这一过程。除了病毒直接整合到宿主基因组，导致细胞基因不稳定，最终发生肝细胞恶性转化之外，还可以通过改变细胞信号通路、线粒体功能、脂代谢、宿主基因组表观遗传学状态等促进肝癌的发生。肝细胞代谢过程涉及多种转录因子，如肝细胞核因子、cAMP应答元件结合蛋白、类视黄醇X受体等，这些因子可与HBV基因组结合，并募集其它肝富集的转录因子到cccDNA微粒体上，进一步调控病毒基因表达[2, 14]。病毒与细胞因子的相互作用也会影响肝代谢活动。HBV可能通过其基因组中的糖皮质激素应答元件，影响糖皮质激素调控的糖脂代谢过程。HBx还可改变多种转录因子、Src激酶家族、Ras-Raf MAPK途径、PKC途径的活性，影响线粒体功能和蛋白降解途径[7]。另外，HBx可能通过表观遗传学修饰影响病毒cccDNA的转录及宿主肿瘤抑制基因的甲基化状态，进一步促进肝癌的发生[15]。

病毒变异也是影响HBV感染进程的重要因素。由宿主免疫应答或多聚酶抑制剂进行抗病毒治疗所产生的选择压力可促进HBV变异株的出现。这些变异可以导致HBsAg或亚病毒颗粒潴留在细胞中，发生在PC/BCP的突变会降低或阻止HBeAg的表达和分泌，增强病毒复制，促进HBV感染恶化和肝癌发生[16]。

### （四）HBV的流行现状

HBV在全球范围内感染了20亿人，并导致3.5亿以上的人群患有慢性乙型肝炎[17]。慢性乙型肝炎极易引发肝癌。据报道，15%～40%的慢性乙肝患者发展为严重的肝并发症，例如肝硬化或肝癌，最终导致每年多于100万的人死亡[18]。慢性乙肝疾病的负担仍在增加：全球人口45%左右生活

在慢性乙肝感染高发区，例如非洲的撒哈拉、东太平洋区域，特别是东亚地区。尽管高效的疫苗在过去的30年内被广泛地采用，但是HBV仍位于全球十大导致死亡的疾病之列。

在1992年的血清流行病学调查中，中国是HBV感染的高发区[19]。随后由于乙肝疫苗预防接种的普及，2006年调查数据显示，我国1～59岁人群的HBsAg携带率从9.75%下降到7.18%[20]，成为HBV感染的中度流行区。目前HBsAg阳性率呈现“年龄越小越低、男性高于女性、农村高于城市”的态势，并且在HBV感染者中，以慢性HBV感染为主[21]。

### （五）HBV的预防及治疗

现在主要的HBV疫苗均通过重组DNA技术制备。整个免疫程序共接种3针，新生儿和小于6周龄的婴儿只需注射一次乙肝疫苗。乙肝疫苗的接种结果表明疫苗可保护90%的婴儿、儿童及成人。

急性乙型肝炎的治疗手段主要是通过免疫调节来治疗。而慢性乙型肝炎治疗的总体目标是：最大限度地抑制HBV，减轻肝细胞炎性坏死及肝纤维化，延缓和减少肝脏失代偿、肝硬化、肝癌及其并发症的发生，从而改善生活质量和延长存活时间。HBV的治疗药物包括干扰素–α、聚乙二醇干扰素–α以及拉米夫定、替比夫定、烷基多普糖苷、D–环戊烷类等核苷类似物[19]。

## 二、乙型肝炎病毒的树鼩原代肝细胞培养模型

1996年，Walker等人[22]用来自于病人血清的HBV进行了树鼩原代肝细胞的感染实验，结果发现HBV能够感染树鼩原代肝细胞，且可以在感染的肝细胞中合成HBV cccDNA及mRNA，并分泌HBsAg和HBeAg，证实了树鼩原代肝细胞能够自然感染HBV。但是其感染效率较低，其原因在于人的血清会干扰HBV与树鼩肝细胞的结合，将病毒颗粒通过密度梯度离心纯化后，其与树鼩肝细胞的结合及感染能力明显增强[23]。Glebe等人[24]发现HBV感染树鼩肝细胞的早期步骤与感染人的肝细胞非常相似，pre-S1及S抗原在感染中都是必需的。此外，病毒的感染能力还与病毒粒子和宿主肝细胞表面的某些未知因子的相互作用有关。为了避免感染初期病毒在进入阶段的限制，Ren等人[25]构建了含有完整HBV基因组，并可携带绿色荧光标记的重组复制缺陷型腺病毒载体。将这种载体转导树鼩原代肝细胞或人肝癌细胞系HepG2和Huh7，可以产生HBsAg、HBeAg、核衣壳以及病毒包膜等，还可以产生cccDNA。因此，树鼩原代肝细胞能够支持HBV从进入、入核形成cccDNA，到进行转录、复制以及病毒组装和分泌等过程的完整生活周期。

近期，李文辉领导的研究小组以树鼩原代肝细胞为靶细胞，利用近零距离光交联技术（near zero distance photo-cross-linking）及蛋白质组学技术，成功鉴定出HBV受体——牛磺胆酸钠共转运多肽（sodium taurocholate cotransporting polypeptide, NTCP）[26]。在这项工作中，为了钓取HBV受体，他们首先合成了一个诱饵肽段$WT_b$，其氨基酸序列与HBV pre-S1第2～47位的序列基本一致，但是其中第11位亮氨酸和第14位苯丙氨酸被人造氨基酸L–光–亮氨酸所取代，后者在紫外线照射后可诱导与肽段相结合蛋白的近零距离共价交联。然后他们将$WT_b$加入到树鼩原代肝细胞中共培养，用紫外线照射使肽段和与之结合的蛋白相交联，交联的复合物被链霉亲和素珠子沉淀后通过蛋白质组学技术进行分离和鉴定，从而发现NTCP是能与pre-S1特异性结合的蛋白。他们通过基因敲除实验进一步发现，沉默NTCP后，HBV感染树鼩原代肝细胞的效率明显降低；将来自于树鼩的NTCP转染非易感细胞HepG2，可使其变得对病毒易感，从而进一步证实了NTCP的HBV受体功能。

利用树鼩原代肝细胞培养模型，Köck J等人[27]研究了阿德福韦酯（Adefovir dipivoxil）以及拉米夫定（Lamivudine）等核苷类似物单独用药或联合用药后的抗HBV效果。结果发现，这两种药物均能部分抑制cccDNA的形成。相比之下，阿德福韦酯效果更好，其可引起HBV RNA合成及病毒表面蛋白的产生降低3倍。然而，单独或联合用药并不能完全阻止cccDNA的形成，及病毒复制中间体的起始合成。

据Dandri M等[28，29]的报道，他们将树鼩的原代肝细胞移植到uPA/RAG-2（immunodeficient urokinase-type plasminogen activator）小鼠，之后用HBV阳性的血清进行感染，成功建立了HBV的慢性感染。Petersen J等人[18]也在这种嵌合小鼠中，利用HBV囊膜L蛋白衍生酰基化多肽成功证实了这种酰基化多肽能阻断HBV的感染进入。

## 三、乙型肝炎病毒的树鼩体内感染模型

### （一）急性感染模型

早在1981年，我国的庞其方等人[30]就报道，野生成年树鼩肌肉接种人HBV感染血清后，动物血清中不仅测到HBsAg，还可在电镜下观察到大量的直径为22nm的HBsAg颗粒。之后严瑞琪、苏建家等人又以人HBV感染者血清为感染源，分别两次经静脉和腹腔接种于树鼩（0.5mL/次），接种后定期采血进行HBV感染相关的血清免疫学检测，分析转氨酶水平，并用斑点杂交法检测HBV DNA，还利用电镜观察HBV颗粒，以及采取部分动物的肝活检组织进行免疫组化检测HBsAg和HBcAg的表达，同时原位分子杂交检测HBV DNA。经过接种后为期137周的实验观察，发现87/96只（90.63%）树鼩血清和/或肝组织出现HBV感染标志物，电镜下血清可查见Dane氏颗粒及HBsAg颗粒，Southern blot检测肝组织可见复制型及整合型HBV DNA。上述结果首次证实利用树鼩可以建立体内感染HBV的动物模型。1995年，李其芬等人[31]进一步用野生成年树鼩在感染HBV的基础上重叠感染丁型肝炎病毒（hepatitis D virus, HDV，其感染需要嗜肝DNA病毒的帮助）并获得初步成功。

国外类似的研究最早见于1996年，Walter等人[22]报道，将HBV阳性病人的血清接种新生和成年树鼩后，观察大约20周，在树鼩肝脏内检测到了HBV DNA的复制及病毒蛋白表达。接种后11周，HBsAg从血清中清除，并于第14周左右产生anti-HBsAg、anti-HBeAg的血清学转换。新生期接种的树鼩的表现类似于人类的急性自限性肝炎，而成年期接种的树鼩仅表现为一过性感染，提示利用树鼩可以建立HBV的急性感染模型。

然而，由于以上研究所用的树鼩多为野外捕获，年龄、遗传和健康背景不详，个体差异大，同时可能由于一些早期的实验研究在检测HBV感染标志物方面所用的ELISA、免疫组化、原位杂交等方法或其试剂的特异性、敏感性不稳定，使某些检测结果的重复性不理想，致使一些学者对树鼩能否真正感染HBV提出质疑[32，33]。在国际上，树鼩体内能否长期感染HBV仍是未知数。

### （二）慢性感染模型

为了使树鼩模型能有效地应用于HBV相关研究，一些实验室在上述研究的基础上进一步对优化树鼩体内慢性感染HBV模型进行了探索。基于人类婴幼儿感染HBV后有很高的慢性化率，而大部分成年人感染HBV后病毒很快被清除这一现象，梁亮等人[34]用人工繁育的围生期（出生前后各1周）和幼年（1～3月龄）树鼩感染人HBV，证实用围生期和幼年树鼩接种人HBV可以提高感染

效率。长期动态观测结果显示，树鼩血和肝组织中HBV DNA和HBsAg可持续阳性至接种后48周以上，并且可检测到肝组织中HBV cccDNA等标志物，表明新生树鼩接种人HBV后，病毒能够在其体内长期存在和稳定复制[35]。他们还对各种可能影响树鼩感染HBV效率的因素，包括不同的感染源、接种方式、检测方法和多种辅助措施等进行了较全面的探讨，发现了一些影响树鼩感染HBV效率的因素，并在此基础上发现，在调查的77只新生树鼩中，有6只新生期接种的树鼩形成HBV慢性感染，表现为动物肝组织保持高拷贝的HBV DNA，血清保持高滴度的HBsAg，维持至接种后72周以上，肝组织中HBsAg和HBcAg均显示阳性；另外，还有7只新生期接种的树鼩为可疑慢性感染，表现为肝组织HBV DNA和血清HBsAg长期间歇性低水平阳性。而调查的49只非新生（出生后1个月至1年）树鼩无一明确显示为慢性感染。这些结果进一步证实新生期接种HBV的树鼩建立慢性持续性感染的效果优于非新生期接种树鼩。另外，他们的结果还发现，在6只确认为持续感染和7只可疑为持续感染的新生期接种的树鼩中，分别有1只和2只是用同一只确证为慢性感染的树鼩血清接种的，表明树鼩间可以传代感染HBV。

### （三）肝癌模型

肝癌是世界上主要恶性疾病之一，其引起的死亡人数占人类癌症死亡人数6%。全球每年肝癌的发生率达到了350000~400000个病例，中国是肝癌高发病率的主要地区之一[36]。肝癌的发展涉及多因子的多步效应。其中，危险度最高的是HBV和诸如黄曲霉素B1等生物或化学药品[37]。研究发现，HBV和黄曲霉素B1协同作用可以诱导树鼩发生肝癌。当用HBV感染树鼩，并在其饮食中添加黄曲霉素B1，HBV慢性感染能够在160周后诱导肝癌的产生[38]，其肝癌发生率为52.9%，而单独感染HBV或单独接触黄曲霉素B1的树鼩其肝癌发生率分别为11.1%和12.5%，显著低于HBV和黄曲霉素B1协同作用诱导的肝癌发病率[39]。通过对HBV和黄曲霉素B1协同作用的树鼩进行观察还发现，在发生肝癌的前期，其肝细胞发育异常及与酶相关的肝细胞病灶增生肥大等现象频繁出现；还可观察到HBV DNA整合到宿主肝细胞基因组中；而在肝癌细胞或癌旁细胞中均可检测到病毒DNA及其编码蛋白。进一步证实了HBV感染与肝癌的发生密切相关[39]。

### （四）HBV树鼩体内感染模型的应用

利用HBV和黄曲霉素B1协同诱导的树鼩肝癌模型可以进行肝癌病因和发病机制的基础研究。对比单独感染HBV或单独接触黄曲霉素B1的树鼩，感染HBV并接触黄曲霉素B1的树鼩体内类胰岛素生长因子（insulin-like growth factor Ⅱ, IGF-Ⅱ），p21和HBV X抗原的表达水平更高。而肝癌发生正是与这些因子的过度表达有关，揭示在树鼩体内，HBV和黄曲霉素B1协同激活了这些因子的基因[40]。另外，在该模型中还发现抑癌基因p53发生了突变[41]，其中有4个树鼩的肝癌组织p53发生了点突变，包括第13个密码子发生C→T突变，导致脯氨酸→丝氨酸突变；第275个密码子发生T→C突变，导致半胱氨酸→精氨酸突变；第78个密码子发生A→G突变，氨基酸为同义突变。其中第275个密码子的点突变可使p53获得DNA结合能力，从而在肝癌发生过程中发挥重要作用。

随着新兴高通量基因组学和蛋白质组学技术的发展，一些实验室还利用该模型对部分树鼩基因进行了测序、制作基因芯片和进行肝癌相关基因的检测[42]，并对树鼩肝癌发生过程中的关键基因和蛋白进行筛选和鉴定等研究[43, 44]。秦雪等[43]发现，在HBV、AFB1诱导的树鼩肝细胞癌中，基因表达图谱有所变化，其中，核糖核蛋白A1/A2/B1、peroxiredoxin 1/2、膜联蛋白4、肌球蛋白α链等26种蛋白质基因发生表达变化。而陈远能等[42]利用该模型发现，IGFII、NF-κB、C-rel、

Bcl-2、Cyclin A和CNTF等分子所参与的信号通路在肝癌发生中发挥了重要作用。同时，Li Y等[45]发现，PrxII通过下调调节过氧化反应的SODI和GSTA 1基因，从而调节过氧化反应，给肝癌细胞提供良好的生存环境，从而引起肝癌发生。因此，树鼩模型可以用于研究肝癌发生过程中的信号通路的改变，从而研究肝癌的发生与治疗。

另外，该模型还可用于抗肝癌药物评估。用两组树鼩做实验，其中一组在第一周时用奥替普拉（oltipraz）连续处理5周，另一组不做处理。两组同时在第二周喂食黄曲霉素B1共4周。每周每只树鼩取1mL血液和其中一天总尿样进行分析。结果发现，在树鼩摄入黄曲霉素B1后，黄曲霉素白蛋白复合物在两周内迅速增长，并在停止供给黄曲霉素B1后减少；而奥替普拉可以在整个服食黄曲霉素B1阶段内中和黄曲霉素白蛋白复合物，使得奥替普拉处理组尿液中的黄曲霉素–N（7）–鸟嘌呤比未用药物处理组减少了93%。由此表明，在树鼩体内，奥替普拉降低了黄曲霉素B1的危险度，这与在啮齿类动物和人体中观察到的现象一致。因此，我们可以利用感染了HBV的树鼩并喂食黄曲霉素B1这个模型来开发癌症化学预防评估体系[46]。

利用树鼩的体内慢性感染模型，一些研究小组还进行了疫苗保护效果的研究。严瑞琪等人[47]发现，将HBV疫苗接种到树鼩中，再用HBV对树鼩进行感染，疫苗对树鼩的保护率达到了88.9%，提示对树鼩进行HBV疫苗的接种能够阻止人工感染的建立。

## 第三节 丙型肝炎病毒树鼩感染模型的研究

### 一、丙型肝炎病毒

丙型肝炎病毒（hepatitis C virus, HCV）是单股正链有囊膜RNA病毒，属黄病毒科（Flaviviridae）肝炎病毒属（*Hepacivirus*）[48]。HCV基因组由5′非翻译区（UTR）、一个大的开放式阅读框大约编码3000个氨基酸的多聚蛋白前体和3′非翻译区（UTR）组成。多聚蛋白前体经由宿主和病毒蛋白酶加工成10个较小的活性蛋白质，包括参与病毒内化、复制、组装和释放的结构蛋白（Core、E1和E2）和非结构蛋白（p7、NS2、NS3、NS4A、NS4B、NS5A和NS5B）[49]。另外，在Core蛋白编码区有一个移码阅读框，据推测编码一个与病毒复制无关的被称为ARF（alternative reading frame）或F（frameshift）蛋白[50]。到目前为止，根据HCV国际分类命名法将HCV分为7个基因型（核苷酸差异在30%～35%之间）和若干个亚型（核苷酸差异在20%～25%之间）[51]。

HCV有高度的物种特异性和组织细胞特异性，目前发现黑猩猩和人类是其唯一的天然宿主。HCV主要感染肝细胞，最近也发现感染B细胞、DC细胞、外周血单核细胞以及其它类型的细胞。HCV的生活周期大致可分为6个阶段：①病毒与宿主细胞表面受体（CD81、SR–BI、claudin–1和occludin）的结合并内化进入细胞[52]；②病毒脱衣壳和核酸的释放；③内部核糖体进入位点（internal ribosome entry site, IRES）依赖的多聚蛋白质前体翻译与加工；④病毒RNA NS5B聚合酶依赖的RNA复制；⑤病毒颗粒的包裹与组装；⑥成熟病毒颗粒的释放（图22–2）。

丙型肝炎致病机制仍不清楚，但当HCV在肝细胞内复制引起肝细胞结构和功能改变或干扰肝细胞蛋白合成时，可造成肝细胞变性坏死，表明HCV可直接损害肝脏。但多数学者认为细胞免疫病理反应可能起重要作用，发现丙型肝炎与乙型肝炎一样，其组织浸润细胞以$CD3^+$为主，细胞毒

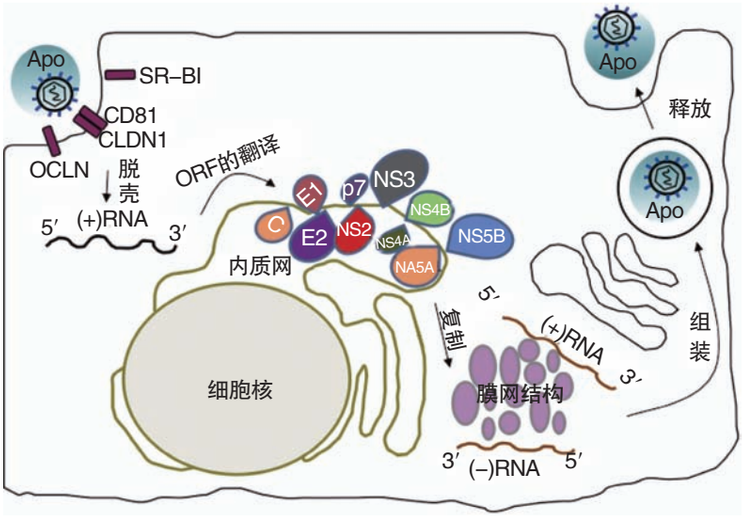



**图22–2　HCV的生活周期**

T细胞特异攻击HCV感染的靶细胞，可引起肝细胞损伤。

HCV主要通过静脉吸毒（intravenous drug use, IDU）传播、输血或血制品传播、性传播和母婴垂直传播[53～55]。HCV有很强的复制能力，在感染后的几天内，检测血清病毒滴度可达$10^6$IU/mL。目前全球有1.5亿～2.0亿人为HCV慢性感染者，约占世界人口总数3%，每年新增300万～400万感染者，并有350000人死于HCV相关疾病[56]。调查显示2010年有16000人死于HCV急性感染和196000人死于肝癌[57]。中亚、东亚、北非以及中东有最高的感染率（＞3.5%）；南亚、中南亚、撒哈拉以南非洲地区，中部和南部的安第斯山脉，拉丁美洲、加勒比海地区、大洋洲、澳大拉西亚和欧洲中部、东部和西部有较低的感染率（1.5%～3.5%）；亚太地区、拉丁美洲热带地区和北美有最低感染率（＜1.5%）[58]。

目前还没有HCV预防性疫苗，但是有许多正在研发和一些令人鼓舞的结果[59]，希望对HCV的预防能起到积极的作用。现阶段只能尽最大努力控制HCV的传播途径来实现对HCV的预防，如我们通过对静脉注射吸毒者联合使用新针头、注射器和治疗药物可降低丙型肝炎约75%的风险[60]。在无菌注射器供应不足的国家里，应口服药物而不是通过注射[61]。慢性丙型肝炎的人应避免酒精和药物对肝脏的毒害[62]。

在HCV感染者中，一般来说只有极少数感染者不需要治疗，病毒可被机体自身免疫系统清除，50%～80%患者易发生慢性感染[63]，慢性HCV感染极易导致慢性肝炎、脂肪变性、肝纤维化、肝硬化，甚至肝癌的发生。现阶段的治疗方法主要局限于抗病毒药物聚乙二醇耦联的长效α干扰素（peg–IFN）和利巴韦林（ribavirin）联合用药疗法[62]，此方法的治疗效果依HCV基因型不同而不同，2型和3型HCV感染者治愈率约在70%～80%之间，其它基因型约在45%～70%之间[64]。另一种药物sofosbuvir（一种HCV聚合酶的核苷酸抑制剂），结合利巴韦林对2型HCV感染者治愈率可达95%左右[64]。博赛匹韦（boceprevir）和特拉匹韦（telaprevir）是新型的HCV NS3蛋白酶抑制剂，联合干扰素和利巴韦林对1型HCV具有良好的抗病毒效果[65～67]。

## 二、丙型肝炎病毒的原代树鼩肝细胞培养模型

除了研究HBV感染之外，树鼩还可用于HCV感染的研究。2002年赵西平等人[68]首次在树鼩的原代肝细胞中检测到HCV的复制以及病毒粒子的形成。他们用来自HCV感染病人的血清感染原代树鼩肝细胞，采用逆转录PCR方法检测到肝细胞及培养上清中的负链RNA，细胞持续培养至14天后仍可检出病毒。通过这种方法产生的病毒粒子可以抵抗核糖核酸酶的降解，并可再感染其它树鼩肝细胞，证实HCV能在原代树鼩肝细胞中进行有效的感染和复制。

### 三、丙型肝炎病毒的树鼩体内感染模型

在2010年，Amako等人[69]用来自病人的HCV或者从cDNA得到的HCV病毒粒子感染树鼩，并进行了为期3年的观察，结果发现，树鼩首先发生急性感染，表现出轻微的炎症反应及病毒血症，随后逐渐发展形成肝脂肪变性、肝硬化以及肝癌。他们还发现，被感染树鼩的血清可以重新感染新的树鼩，不仅证明了HCV能够体内感染树鼩并表现出类似于人类HCV感染的症状，还证明HCV可以在该动物模型中进行有效的复制和传播。值得注意的是，对树鼩进行剂量为750cGy的全身照射以抑制其免疫系统，能够提高HCV的感染效率，导致病毒血症加重和更高滴度的HCV抗体的产生[70]。

2011年，Tong等人[69]克隆出树鼩的CD81、SR–BI、CLDN1和Occludin等受体，并证实这些受体允许HCV假病毒粒子和培养所得的HCV病毒粒子的进入。然而，由于人和树鼩的受体存在结构差异，会导致病毒进入二者的效率存在差异。Tian等人[71]已经证实由于二者在CD81结构上的细微差别造成其胞外环结合糖蛋白E2的能力有所不同。另外，HCV感染树鼩后尚不能形成类似于人体内感染的持续性的病毒血症[69，72]。

### 四、与丙型肝炎病毒相关的树鼩基因组学研究

研究发现人体中一共有163个基因参与到HBV和HCV应答[73，74]，其中大部分基因都能在树鼩中找到对应基因，并有很高的序列同源性。然而有一些基因在树鼩中并不存在，如DDX58基因。该基因可引发由MAVS介导的信号级联反应，继而活化NF–κB通路，在病毒感染诱导干扰素产生的过程中发挥关键作用[75]。因此树鼩缺少DDX58基因这一发现或许可以从某种程度上解释树鼩为什么可以感染HCV[76]。

## 第四节 其它病毒树鼩感染模型的研究

自20世纪80年代以来，树鼩被广泛用于人类病毒感染性疾病的实验动物模型研究。除了HBV和HCV以外，其它嗜肝病毒如HDV、戊型肝炎病毒（hepatitis E virus, HEV）、单纯疱疹病毒1型（herpes simplex virus type 1, HSV–1）、单纯疱疹病毒2型（herpes simplex virus type 2, HSV–2）、腺病毒（adenovirus, ADV）等多种人类病毒均能感染树鼩[69，77～79]。

近期还有研究小组将流感病毒H1N1接种至树鼩，通过分析体温变化、血清转换率，及肺组织和气管组织的病理学变化发现，感染后的树鼩表现出轻度或中度的全身及呼吸道症状，并在树鼩的上呼吸道检测到H1N1的复制。介导H1N1进入的唾液酸（sialic acid, SA）α 2, 6-Gal受体广泛分布于树鼩的气管和鼻黏膜，而SA α 2, 3–Gal受体则主要分布于树鼩肺组织[80]。

有人用EV71病毒通过口服、滴鼻、尾静脉注射等方式接种树鼩，发现口服感染是病毒最易感的途径。在接种感染后2周，树鼩出现急性瘫痪症状，并伴随有尿潴留。在脑、心、肺、脾、肾等多组织中均观察到相应的病变，证实树鼩也可用于研究EV71感染[81]。

## 第五节 结语与展望

一个理想的病毒体内感染模型，要能够用于研究自然状态下病毒感染，病毒和宿主细胞间的相互作用及机体感染了病毒后的免疫应答情况。但目前，建立的大多数动物模型只能用于其中一部分研究。这些动物模型中最接近人类感染状态的是黑猩猩。尽管黑猩猩是很多病毒（如HBV、HCV、HIV等）的自然感染宿主，但因其濒临物种灭绝，实验费用高昂等原因而不适用于普通实验研究。

树鼩与人类在生理机能、生化代谢和基因组学等方面的相似性远高于大鼠、小鼠、犬等实验动物[82～84]，曾被认为是低等的灵长类动物，并具有繁殖快、体形小，便于实验操作、价廉易获得、能感染多种与人类疾病有关的病毒等显著特点，是一种较为理想的用于病毒学研究的动物模型。

虽然树鼩的人工饲养和繁殖已有30多年历史，但迄今为止仍未建立纯种品系，且病毒携带、生理生化、遗传背景等相关的基础生物学和重要生物学特性的数据仍然比较缺乏，同时也缺乏可用于树鼩研究的相关试剂，使得基于树鼩的动物模型研究工作缺少深度和广度。我国的树鼩资源较为丰富，其主要分布于云南、广西等西南部省区，这些地区在树鼩的人工繁育及饲养过程中亦逐步积累了一定的经验，利用这些独特的优势进一步开展病毒体内感染模型研究，建立模式化、标准化的树鼩实验动物，并建立感染性疾病树鼩实验动物模型，对于了解病毒的生物学特性、感染致病机理及制定有效防控措施具有极其重要的价值，对于提升我国在病毒学及实验动物研究领域的国际地位具有重要的战略意义。

### 参考文献

[1]Datta S, Chatterjee S, Veer V, et al. Molecular biology of the hepatitis B virus for clinicians. J Clin Exp Hepatol, 2012, 2 (4): 353-65.

[2]Levrero M, Pollicino T, Petersen J, et al. Control of cccDNA function in hepatitis B virus infection. J Hepatol, 2009, 51(3): 581-92.

[3]Wei Y, Neuveut C, Tiollais P, et al. Molecular biology of the hepatitis B virus and role of the X gene. Pathol Biol (Paris), 2010, 58(4): 267-72.

[4]Wieland S, Thimme R, Purcell RH, et al. Genomic analysis of the host response to hepatitis B virus infection. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101(17): 6669-74.

[5]Wu J, Lu M, Meng Z, et al. Toll-like receptor-mediated control of HBV replication by nonparenchymal liver cells in mice. Hepatology, 2007, 46(6): 1769-78.

[6]Bertoletti A, Ferrari C. Innate and adaptive immune responses in chronic hepatitis B virus infections: towards restoration of immune control of viral infection. Gut, 2012, 61(12): 1754-64.

[7]Dandri M, Locarnini S. New insight in the pathobiology of hepatitis B virus infection. Gut, 2012, 61(Suppl 1): i6-17.

[8]Lütgehetmann M, Bornscheuer T, Volz T, et al. Hepatitis B virus limits response of human hepatocytes to interferon-α in chimeric mice. Gastroenterology, 2011, 140(7): 2074-83.

[9]Christen V, Duong F, Bernsmeier C, et al. Inhibition of alpha interferon signaling by hepatitis B virus. J Virol, 2007,

81(1): 159-65.
[10]Park IY, Sohn BH, Yu E, et al. Aberrant epigenetic modifications in hepatocarcinogenesis induced by hepatitis B virus X protein. Gastroenterology, 2007, 132(4): 1476-94.
[11]Vivekanandan P, Daniel HDJ, Kannangai R, et al. Hepatitis B virus replication induces methylation of both host and viral DNA. J Virol, 2010, 84(9): 4321-9.
[12]Wei C, Ni C, Song T, et al. The hepatitis B virus X protein disrupts innate immunity by downregulating mitochondrial antiviral signaling protein. J Immunol, 2010,185(2):1158-68.
[13]Xu Y, Hu Y, Shi B, et al. HBsAg inhibits TLR9-mediated activation and IFN-alpha production in plasmacytoid dendritic cells. Mol Immunol, 2009, 46(13): 2640-6.
[14]Bar-Yishay I, Shaul Y, Shlomai A. Hepatocyte metabolic signalling pathways and regulation of hepatitis B virus expression. Liver International, 2011, 31(3): 282-90.
[15]Lucifora J, Arzberger S, Durantel D, et al. Hepatitis B virus X protein is essential to initiate and maintain virus replication after infection. J Hepatol, 2011, 55(5): 996-1003.
[16]Liu CJ, Chen BF, Chen PJ, et al. Role of hepatitis B viral load and basal core promoter mutation in hepatocellular carcinoma in hepatitis B carriers. J Infect Dis, 2006, 193(9): 1258-65.
[17]Papatheodoridis G, Buti M, Cornberg M, et al. EASL Clinical Practice Guidelines: Management of chronic hepatitis B virus infection. J Hepatol, 2012, 57(1): 167-85.
[18]Shepard CW, Simard EP, Finelli L, et al. Hepatitis B virus infection: epidemiology and vaccination. Epidemiol Rev, 2006, 28(1): 112-25.
[19]Chang TT, Liaw YF, Wu SS, et al. Long-term entecavir therapy results in the reversal of fibrosis / cirrhosis and continued histological improvement in patients with chronic hepatitis B. Hepatology, 2010, 52(3): 886-93.
[20]贾继东，李兰娟．慢性乙型肝炎防治指南（2010年版）．临床肝胆病杂志，2011，27：113–28．
[21]卫生部疾病预防控制局，等．全国人群乙型病毒性肝炎血清流行病学调查报告．北京：人民卫生出版社，112.
[22]Walter E, Keist R, Niederöst B, et al. Hepatitis B virus infection of *Tupaia* hepatocytes in vitro and in vivo. Hepatology, 1996, 24(1): 1-5.
[23]Köck J, Nassal M, MacNelly S, et al. Efficient infection of primary *Tupaia* hepatocytes with purified human and woolly monkey hepatitis B virus. J Virol, 2001, 75(11): 5084-9.
[24]Glebe D, Aliakbari M, Krass P, et al. Pre-s1 antigen-dependent infection of *Tupaia* hepatocyte cultures with human hepatitis B virus. J Virol, 2003, 77(7): 9511-21.
[25]Ren ST, Nassal M. Hepatitis B virus (HBV) virion and covalently closed circular DNA formation in primary *Tupaia* hepatocytes and human hepatoma cell lines upon HBV genome transduction with replication-defective adenovirus vectors. J Virol, 2001, 75(3): 1104-16.
[26]Yan H, Zhong GC, Xu GW, et al. Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus. Elife, 2012, 1: e00049.
[27]Köck J, Baumert TF, Delaney WE, et al. Inhibitory effect of adefovir and lamivudine on the initiation of hepatitis B virus infection in primary *Tupaia* hepatocytes. Hepatology, 2003, 38(6): 1410-8.
[28]Petersen J, Dandri M, Mier W, et al. Prevention of hepatitis B virus infection in vivo by entry inhibitors derived from the large envelope protein. Nat Biotechnol, 2008, 26(3): 335-41.
[29]Dandri M, Burda MR, Zuckerman DM, et al. Chronic infection with hepatitis B viruses and antiviral drug evaluation in uPA mice after liver repopulation with *Tupaia* hepatocytes. J Hepatol, 2005, 42(1): 54-60.
[30]庞其方，万新邦，胥爱源，等．乙型肝炎病毒（HBV）感染树鼩的实验研究（摘要）．医学研究杂志，1981，9：11–2．
[31]李奇芬，丁明权，王洪，等．树鼩感染丁型肝炎病毒的实验研究．中华医学杂志，1995，75（10）：611–3.
[32]王凤水，陈红松，王宇，等．树鼩感染人乙肝病毒动物模型研究中的非特异性反应．北京医科大学学报，1996，28（5）：340–2．
[33]王海平，姚志强，周永兴，等．树鼩实验感染乙型肝炎病毒的再评价．中华肝脏病杂志，1998，6：96–7．

[34]梁亮，李瑗，杨春，等．用人工繁育的围生期和幼年树鼩感染人乙型肝炎病毒的初步研究．中国人兽共患病学报，2006，22（8）：792–5.

[35]杨芳，曹骥，张晶晶，等．新生期树鼩接种人乙型肝炎病毒的长期实验观察．中华肝脏病杂志，2009，17：580–4.

[36]Bosch FX1, Ribes J, Cléries R, et al. Epidemiology of hepatocellular carcinoma. Clin Liver Dis, 2005, 9(2): 191-211.

[37]Ross RK, Yuan JM, Yu MC, et al. Urinary aflatoxin biomarkers and risk of hepatocellular carcinoma. Lancet, 1992, 339(8799): 943-6.

[38]Li Y, Su JJ, Qin LL, et al. Synergistic effect of hepatitis B virus and aflatoxin B1 in hepatocarcinogenesis in tree shrews. Ann Acad Med Singapore, 1999, 28(1): 67-71.

[39]Yan RQ, Su JJ, Huang DR, et al. Human hepatitis B virus and hepatocellular carcinoma Ⅱ. Experimental induction of hepatocellular carcinoma in tree shrews exposed to hepatitis B virus and aflatoxin B1. J Cancer Res Clin Oncol, 1996, 122(5): 289-95.

[40]Su J, Qin G, Yan R, et al. The expression of insulin-like growth factor Ⅱ, hepatitis B virus X antigen and p21 in experimental hepatocarcinogenesis in tree shrews. Ann Acad Med Singapore, 1999, 28(1): 62-6.

[41]Park US, Su JJ, Ban KC, et al. Mutations in the p53 tumor suppressor gene in tree shrew hepatocellular carcinoma associated with hepatitis B virus infection and intake of aflatoxin B1. Gene, 2000, 251(1): 73-80.

[42]Chen YN, Cao J, Su JJ, et al. A cDNA microarray study of the differential expression of genes in signal transduction pathway during hepatocarcinogenesis in tree shrews. Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi, 2005, 13(10): 763-7.

[43]Qin X, Dai Z, Cui J, et al. Differentially expressed proteomics during hepatocarcinogenesis of tree shrew induced by aflatoxin B1. Chn J Lab Med, 2006, 29(6): 538-42.

[44]Li Y, Qin X, Cui J, et al. Proteome analysis of aflatoxin B1-induced hepatocarcinogenesis in tree shrew (*Tupaia belangeri chinensis*) and functional identification of candidate protein peroxiredoxin Ⅱ. Proteomics, 2008, 8(7): 1490-501.

[45]Li Y, Wan D, Wei W, et al. Candidate genes responsible for human hepatocellular carcinoma identified from differentially expressed genes in hepatocarcinogenesis of the tree shrew (*Tupaia belangeri chinesis*). Hepatol Res, 2008, 38(1): 85-95.

[46]Li Y, Su J, Qin L, et al. Reduction of aflatoxin B(1) adduct biomarkers by oltipraz in the tree shrew (*Tupaia belangeri chinensis*). Cancer Lett, 2000, 154(1): 79-83.

[47]Yan RQ, Su JJ, Huang DR, et al. Human hepatitis B virus and hepatocellular carcinoma Ⅰ. Experimental infection of tree shrews with hepatitis B virus. J Cancer Res Clin Oncol, 1996, 122(5): 283-8.

[48]Moradpour D, Penin F, Rice CM. Replication of hepatitis C virus. Nat Rev Microbiol, 2007, 5(6): 453-63.

[49]Dubuisson J. Hepatitis C virus proteins. World J Gastroenterol, 2007, 13(17): 2406-15.

[50]McMullan LK, Grakoui A, Evans MJ, et al. Evidence for a functional RNA element in the hepatitis C virus core gene. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104(8): 2879-84.

[51]Nakano T, Lau GM, Lau GM, et al. An updated analysis of hepatitis C virus genotypes and subtypes based on the complete coding region. Liver Int, 2012, 32(2): 339-45.

[52]Kohaar I, Ploss A, Korol E, et al. Splicing diversity of the human OCLN gene and its biological significance for hepatitis C virus entry. J Virol, 2010, 84(14): 6987-94.

[53]Xia X, Luo J, Bai JL, et al. Epidemiology of hepatitis C virus infection among injection drug users in China: Systematic review and meta-analysis. Public Health, 2008, 122(10): 990-1003.

[54]Tohme RA, Holmberg SD. Is sexual contact a major mode of hepatitis C virus transmission? Hepatology, 2010, 52(4): 1497-505.

[55]Lam N, Gotsch PB, Langan RC. Caring for pregnant women and newborns with hepatitis B or C. Am Fam Physician, 2010, 82(10): 1225-9.

[56]Gravitz L. Introduction: a smouldering public-health crisis. Nature, 2011, 474(7350): S2-4.

[57]Lozano R, Naghavi M, Foreman K, et al. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in

1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. Lancet, 2012, 380(9859): 2095-128.

[58]Bailey C. Hepatic failure: an evidence-based approach in the emergency department. Emergency Medicine Practice, 2010, 12(4): 1-22.

[59]Halliday J, Klenerman P, Barnes E. Vaccination for hepatitis C virus: closing in on an evasive target. Expert Rev Vaccines, 2011, 10(5): 659-72.

[60]Hagan H, Pouget ER, Des Jarlais DC. A systematic review and meta-analysis of interventions to prevent hepatitis C virus infection in people who inject drugs. J Infect Dis, 2011, 204(1): 74-83.

[61]Alter MJ. Epidemiology of hepatitis C virus infection. World J Gastroenterol, 2007, 13(17): 2436-41.

[62]Wilkins T, Malcolm JK, Raina D, et al. Hepatitis C: diagnosis and treatment. Am Fam Physician, 2010, 81(11): 1351-7.

[63]Torresi J, Johnson D, Wedemeyer H. Progress in the development of preventive and therapeutic vaccines for hepatitis C virus. J Hepatol, 2011, 54(6): 1273-85.

[64]Campion EW, Dammacco F, Sansonno D. Therapy for Hepatitis C virus-related cryoglobulinemic vasculitis. N Engl J Med, 2013, 369(11): 1035-45.

[65]Foote BS, Spooner LM, Belliveau PP. Boceprevir: a protease inhibitor for the treatment of chronic hepatitis C. Ann Pharmacother, 2011, 45(9): 1085-93.

[66]Ghany MG, Nelson DR, Strader DB, et al. An update on treatment of genotype 1 chronic hepatitis C virus infection: 2011 practice guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases. Hepatology, 2011, 54(4): 1433-44.

[67]Smith LS, Nelson M, Naik S, et al. Telaprevir: an NS3/4A protease inhibitor for the treatment of chronic hepatitis C. Ann Pharmacother, 2011, 45(5): 639-48.

[68]Zhao XP, Tang ZY, Klumpp B, et al. Primary hepatocytes of *Tupaia belangeri* as a potential model for hepatitis C virus infection. J Clin Invest, 2002, 109(2): 221-32.

[69]Amako Y, Tsukiyama-Kohara K, Katsume A, et al. Pathogenesis of hepatitis C virus infection in *Tupaia belangeri*. J Virol, 2010, 84(1): 303-11.

[70]Zhong W, Ingravallo P, Wright-Minogue J, et al. GB virus B as a model for hepatitis C virus: Enzymatic characterization of GBV-B NS3 and NS5B. Hepatology, 1999, 30(4): 453A.

[71]Tian ZF, Shen H, Fu XH, et al. Interaction of hepatitis C virus envelope glycoprotein E2 with the large extracellular loop of *Tupaia* CD81. World J Gastroenterol, 2009, 15(2): 240-4.

[72]Xu X, Chen H, Cao X, et al. Efficient infection of tree shrew (*Tupaia belangeri*) with hepatitis C virus grown in cell culture or from patient plasma. J Gen Virol, 2007, 88(9): 2504-12.

[73]Wang FS. Current status and prospects of studies on human genetic alleles associated with hepatitis B virus infection. World J Gastroenterol, 2003, 9(4): 641-4.

[74]Tong Y, Zhu Y, Xia X, et al. *Tupaia* CD81, SR-BI, claudin-1, and occludin support hepatitis C virus infection. J Virol, 2011, 85(6): 2793-802.

[75]Sumpter R, Loo Y-M, Foy E, et al. Regulating intracellular antiviral defense and permissiveness to hepatitis C virus RNA replication through a cellular RNA helicase, RIG-I. J Virol, 2005, 79(5): 2689-99.

[76]Fan Y, Huang ZY, Cao CC, et al. Genome of the Chinese tree shrew. Nat Commun, 2013, 4: 1426.

[77]Zhang L, Ben KL. In vitro infection of tree shrew immunocytes with human immunodeficiency virus type Ⅰ. Zool Res, 2001, 22: 33-40.

[78]Ben K. The essentiality of tree shrews application and experimental animalization in biomedicine research. The proceedings of Yunnan strain animals & plants industry and market developing seminar. Kunming: Yunnan Science & Technology Press, 1997: 78.

[79]Yang EB, Cao J, Su JJ, et al. The tree shrews: useful animal models for the viral hepatitis and hepatocellular carcinoma. Hepatogastroenterology, 2005, 52(62): 613-6.

[80]Yang ZF, Zhao J, Zhu YT, et al. The tree shrew provides a useful alternative model for the study of influenza H1N1

virus. Virol J, 2013, 10(1): 111.

[81]Wang WG, Huang XY, Xu J, et al. Experimental studies on infant *Tupaia belangeri chinesis* with EV71 infection. Zool Res, 2012, 33(1): 7-13.

[82]Novacek MJ. Mammalian phylogeny: shaking the tree. Nature, 1992, 356(6365): 121-5.

[83]Springer MS, Murphy WJ, Eizirik E, et al. Placental mammal diversification and the Cretaceous-Tertiary boundary. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100(3): 1056-61.

[84]Wang Q, Li Y. The progress of HBV and HCV infect tree shrew in vivo and in vitro. J Guangxi Med Univ, 2010, 27(1): 155-8.



Tree shrews

# 第二十三章 树鼩细菌感染模型

第二篇 疾病树鼩模型
TREE SHREW ANIMAL MODELS

李盛安 刘 杰 张 云

## 第一节 细菌感染疾病及其动物模型

在人体中共生着大量的细菌，这些细菌的总数比人体细胞总数都还要多5～10倍[6]。正常情况下这些细菌并不致病，但是当人体免疫能力下降时这些共生菌也可能变成致病菌[4, 12, 18]。比如：手术患者、烧伤病人、癌症患者和艾滋病人的免疫能力受损，一些常见的细菌对这些病人也是致命的[3, 7, 8, 17, 21, 22]。目前最常见的导致感染的细菌有金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、绿脓杆菌、肠球菌以及结核杆菌[5, 14, 20]。

自从第一个抗生素青霉素发明以来，抗生素已经拯救了无数的病人。但是由于长期以来的抗生素应用，细菌已经对大部分的抗生素进化出耐药性，在全世界范围内都已经发现了各种各样的耐药细菌[2, 16, 24]。目前已经报道的有3种主要的耐药细菌对人类的健康造成了巨大的危害。第一种是甲氧西林耐药和万古霉素耐药的金黄色葡萄球菌，第二种是多种抗生素耐药的革兰氏阴性菌，第三种是大多数药物抵抗的结核杆菌。近年来报道的一种携带有“新德里金属–β–内酰胺酶1”基因的超级病菌，这种病菌几乎对除了colistin的其它所有抗生素都具有耐药性，并且这种耐药基因可以在不同的细菌之间转移，感染后导致很高的死亡率[16, 23]。

细菌感染通常是从局部感染开始，如呼吸道感染、尿路感染、腹腔感染、皮肤感染，如果不给予及时治疗，可能会慢慢扩散为全身性感染，最终导致败血症[1, 13, 15, 19]。尽管经过了数十年的研究，但是到现在为止还没有完全清楚败血症的病理机制。目前认为败血症主要有两个重要的发展过程，首先是病原微生物感染导致炎症性的细胞因子大量释放导致多种重要器官衰竭（过度免疫反应期），第二个阶段是抗炎细胞因子大量释放和吞噬细胞功能减弱及凋亡导致二次感染（免疫抑制期），这两个阶段都会导致病人的死亡。细菌的外毒素（exotoxin）和内毒素（LPS）能够剧烈活化生物体内的单核细胞、巨噬细胞、中性粒细胞以及血管内皮细胞导致大量促炎细胞因子的释放，包括肿瘤坏死因子α（TNF-α）、白细胞介素1β（IL-1β）、白细胞介素6（IL-6）以及补体系统和凝血系统的活化，导致血管的稳定性降低以及微血管的阻塞等发生，引发一连串的凝血异常、发热、血管扩张以及微血管的渗漏的病理反应。虽然抗生素治疗、补液治疗和积极的

临床护理对败血症有一定的疗效，但是目前还没有特效治疗方法。情况更为严重的是近年来耐药及超级耐药细菌在全世界范围内大规模快速出现，由于缺少有效的抗生素治疗，由耐药细菌感染导致的败血症的死亡率正在逐年升高。因此，我们急迫需要新的治疗手段来应对这些耐药细菌导致的败血症。

到目前为止，已有上百种药物和治疗手段在败血症动物模型中被证明效果非常好，但是在临床试验中仅仅只有人活化蛋白C（Xigris）对人类败血症有效，美国FDA于2001年11月迅速批准了其作为唯一一个治疗败血症的药物上市。然而历经10年的临床使用，Xigris因未能显著改善败血症患者28天病死率，美国食品和药物管理局与欧洲药物管理局在2011年10月25日撤销该药物的在治疗败血症中的使用。这些药物研发的最终失败说明我们对人类败血症的病理机制还缺乏充分的认识，同时缺乏同人类败血症具有相似病理过程的实验动物模型也是研发治疗败血症药物失败的一个主要原因。

能够较好模拟人类疾病的动物模型是新药研发过程中必不可少的。当一个组分在体外测定活性和毒性后，下一步就是在健康动物和合适的疾病动物模型中评价其毒性和有效性。动物模型的创制试图复制人类疾病过程，需要满足疾病同源性、表象一致性、药物预见性。为了达到这个目的，我们使用的实验动物应该尽可能地能够代表人类。非人灵长类是同人类最接近的动物，比如猕猴和黑猩猩。但是使用猕猴或黑猩猩创制败血症模型，容易产生伦理学问题和耗费大量的研究资金。啮齿类动物，比如大鼠和小鼠，相对于大型灵长类动物更易于饲养、操作以及其相对低廉的费用，目前已成为比较常用的实验动物[9]。尽管大鼠和小鼠同人类有较近的遗传学关系和相似的生物学特征，但在生理和药理学上同人类还是有明显的差异，尤其是在细菌感染导致的败血症的病理机制。例如，小鼠对内毒素（LPS）敏感程度在体内要比人类和别的灵长类动物低1000倍左右。除了对内毒素敏感性的巨大差异外，细菌感染导致的促炎细胞因子的动态表达水平也有较大的差异，比如细菌感染后TNF-α在小鼠中一般1～2小时就达到顶峰，而在人中一般是2.5～10小时达到峰值，并能持续一段时间。用小鼠和大鼠复制的败血症模型，一般都是急性的脓毒血症，动物通常在48小时内死亡，而人类败血症导致的死亡通常会持续数周，因此用啮齿类动物很难复制出人类败血症的复杂病理过程。因此，采用同人类亲缘关系近的实验动物，尤其是低等、小型非人灵长类动物创制败血症模型可能是一种更好的选择。

树鼩（*Tupaia belangeri chinensis*）是一种体形小、价格低、与灵长目动物亲缘关系非常近的哺乳动物，广泛分布于我国云南、广西、广东、海南。它的新陈代谢比犬、鼠等动物更接近于人，大体解剖也近似于人，已被应用于生物医学、药学及生命科学的诸多研究领域，例如肝炎、糖尿病、肿瘤和抑郁症等人类疾病的动物模型研究[9, 28]。最近，昆明动物研究所组织了树鼩全基因组测定和解析工作，得到了高覆盖度（79X）的基因组序列[11]。基因组序列比较发现树鼩与灵长类的亲缘关系更近，此外蛋白序列比对表明人与树鼩之间较人与啮齿类之间拥有更高的蛋白质相似度，进一步说明树鼩与灵长类亲缘关系更近。比较基因组分析发现，树鼩药物代谢酶与人体接近，而猕猴则缺失一大家族的药物代谢酶。同时发现树鼩与灵长类在一些重要的神经系统和免疫系统信号通路中拥有高度的同源性，而免疫系统在不同物种间的差异很大，树鼩的免疫系统与人更加接近[11]。

目前，国内外对树鼩的细菌感染模型研究还非常少。徐玉善等[29]报道了血糖对树鼩感染表皮葡萄球菌清除能力及植入性材料细菌黏附性的影响，结果表明在用链脲佐菌素建立高血糖树鼩模型中，血糖升高不仅使植入生物材料的树鼩的细菌清除能力下降，同时可诱导细菌在植入生物材

料表面形成明显的生物膜。在我们先前的研究中报道了两种树鼩细菌感染模型的建立及抗菌药物的治疗效果评价[27]。在本章中，笔者结合自己的研究经历介绍几种树鼩细菌感染模型的建立方法及其特点和应用。

## 第二节 几种树鼩细菌感染模型的建立

### 一、树鼩生物材料细菌感染模型

#### （一）背　景

生物材料在现代医疗中被广泛使用，由于各种原因导致的生物材料相关的感染随着生物材料应用的增多，发病率明显增高，如：在临床中生物材料植入以及静脉留置针经常会导致慢性感染或者细菌生物膜的生成，严重的甚至会导致败血症。应用生物材料使污染途径增多，感染细菌种类多样化。植入生物材料增加了细菌入侵宿主的机会，降低机体的防御能力，减弱了阻止细菌黏附和生物膜形成的作用。细菌生物膜为细菌的生存提供了庇护场所，同时也为游离细菌提供了新的黏附位点，细菌不断地从生物膜释放出来导致慢性感染。此外细菌生物膜能够阻止抗生素进入到细菌生物膜的内部杀灭病原菌，由于此类感染持续时间长，治疗后容易复发，造成严重的医疗负担[10]。目前，相关的动物模型主要是用大鼠和小鼠建立。在糖尿病病人和肿瘤病人中，生物材料植入感染发病率较高。已有研究表明树鼩的自发性糖尿病和自发性肿瘤比例较高[9, 28]。因此，树鼩作为研究生物材料植入细菌感染模型可能具有一定的优势性。

#### （二）造模原理

很多研究发现细菌黏附在生物材料表面及临近的组织是引起这些感染的原因。阻断细菌黏附是防治与生物材料相关感染的关键环节之一。几乎所有的细菌都能对机体组织和生物材料具有黏附性能，当生物材料植入机体组织时，少量的细菌附着在上面就能引起机体感染。生物材料植入机体后，很快被各种吸附蛋白覆盖，形成一层蛋白吸附层，使进入机体的细菌附着在生物材料表面。细菌黏附需要进一步加固，使细菌避免被免疫系统、抗生素杀灭。绿脓杆菌是一种常见的条件致病菌，在体内容易形成生物膜，造成持续性的感染。在该模型中我们采用低浓度的绿脓杆菌预先滴加涤纶补片上再植入树鼩皮肤伤口造成感染。

#### （三）造模方法

1. 树鼩麻醉

成年树鼩（雌雄各半），体重120～150g。所有动物饲养在单独的笼子里，动物自由饮食饲料和水。树鼩按体重采用氯胺酮（110mg/kg）肌肉注射麻醉。

2. 细菌培养

绿脓杆菌ATCC 27853接种于营养肉汤中，并在37℃振荡培养。当细菌生长至对数生长期时（$OD_{600}$=0.6），离心收集细菌，并用生理盐水洗涤细菌3次，最后用生理盐水调整细菌浓度为

$OD_{600}$=1。

3. 涤纶补片植入与感染

剪掉树鼩背部较长的毛发，并用10%硫化钠溶液去除背部剩余毛发。医用碘伏消毒背部皮肤，在靠近前肢脊柱两侧用无菌刀片作一个1.5cm的切口并分离皮肤和肌肉，制造一个面积约为1.5$cm^2$的空腔。在无菌条件下，1$cm^2$的无菌涤纶补片（BalMedic）植入已造好的空腔内。涤纶补片上滴加0.2mL含有$2\times10^6$CFU绿脓杆菌的菌液，缝合伤口。在树鼩饮水中添加对乙酰氨基酚（0.25mg/mL）缓解疼痛。

4. 模型评价

感染后1、3、6天，处死动物进行细菌计数，并检测生物膜的形成情况。皮肤样品匀浆并细菌计数。涤纶补片放置在含有1mL磷酸盐缓冲液无菌试管中，剧烈振荡2分钟，除去涤纶补片表面未黏附的细菌。将洗涤过的涤纶补片继续振荡10分钟，2次，检测涤纶补片表面细菌生物膜的形成情况。细菌悬液按10倍稀释法稀释后，取0.1mL均匀涂布于LB琼脂平板上，在37℃下培养16小时。此方法检测细菌载量的下限约为100CFU/mL。

### （四）模型特点及应用

接种$2\times10^6$CFU的绿脓杆菌可以引起持续6天的感染（表23–1），第3天在伤口处观察到大量的脓液，并且绿脓杆菌能在涤纶补片上形成明显的生物膜。预先用含有头孢哌酮钠或左氧氟沙星的几丁糖凝胶固化的涤纶补片能够显著地将感染的细菌降低4$log_{10}$CFU，并且抑制涤纶补片上生物膜的形成（图23–3）。结果表明树鼩皮肤伤口植入涤纶补片能够稳定持续感染绿脓杆菌并形成显著的绿脓杆菌生物膜，该模型可用于预防和治疗绿脓杆菌生物膜感染药物的筛选。

表23–1 绿脓杆菌感染植入涤纶补片后的细菌载量

| | 平均细菌载量（$log_{10}$CFU/mL）± SD |
|---|---|
| 接种菌量 | 5.996 ± 0.5233 |
| 感染后1天 | 7.021 ± 0.2269[a] |
| 感染后3天 | 7.329 ± 0.2878[b] |
| 感染后6天 | 7.859 ± 0.2570[c] |

[a]$P>0.05$，同接种菌量比较；[b]$P<0.05$，同接种菌量比较；[c]$P<0.001$，同接种菌量比较；[a]$P>0.05$，同感染后3天和6天组比较。（引自文献27）

## 二、树鼩皮肤烧伤金黄色葡萄球菌感染模型

### （一）造模原理

烧伤、烫伤会严重破坏机体正常的皮肤黏膜屏障以及影响个体正常的免疫能力，增加细菌感染的机会。金黄色葡萄球菌是皮肤烧伤病人在医院获得性感染的主要病原菌，由于其感染能力强且容易对常用抗生素产生耐药性而受到广泛的关注。树鼩三度烧伤后皮肤容易感染金黄色葡萄球菌。

## （二）造模方法

1. 树鼩麻醉

树鼩按体重采用氯胺酮（110mg/kg）肌肉注射麻醉。快速用剪毛剪剪掉树鼩背部较长的毛发，并用10%硫化钠溶液脱毛。

2. 细菌培养

ATCC 27853铜绿假单胞菌接种于营养肉汤中，并在37℃振荡培养。当细菌生长至对数生长期时（$OD_{600}$=0.6），离心收集细菌，并用磷酸盐缓冲溶液洗涤细菌3次，最后用磷酸盐缓冲溶液调整细菌浓度为$OD_{600}$=1。

3. 皮肤烫伤与感染

树鼩背部用脱毛剂除毛后，采用小动物烫伤仪造成树鼩约1/4体表面积的重度烫伤，通过组织切片鉴定烫伤的程度。加热到90℃的圆形钢块（4$cm^2$）使用500g压力放置于皮肤表面10秒，造成三度烧伤（组织切片鉴定）。烫伤后，所有的树鼩腹腔注射0.5mL无菌生理盐水补液，在饮水中添加对乙酰氨基酚（0.25mg/mL）缓解烫伤引起的疼痛。在烫伤的皮肤表面滴加$5 \times 10^6$CFU的金黄色葡萄球菌。在感染后12小时分别皮下注射8mg/kg和40mg/kg的左氧氟沙星和头孢哌酮钠一天两次，共两天。

4. 模型评价

（1）在感染后的第1、4、7天，取烫伤感染部位皮肤匀浆后细菌计数。细菌悬液按10倍稀释法稀释后，取0.1mL均匀涂布于LB琼脂平板上，在37℃下培养16小时。此方法检测细菌载量的下限约为100CFU/mL。

（2）接种细菌4天后取皮肤组织进行组织切片检查。处死树鼩后，立即取皮肤并固定于含有福尔马林（10%）的磷酸盐缓冲液（pH7.4）中。皮肤组织用石蜡包埋并切片最后用苏木精伊红染色，观察白细胞的浸润和炎症情况。

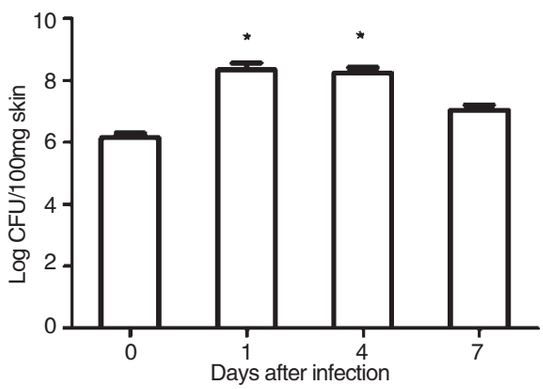



**图23–1　皮肤烫伤感染模型中的细菌计数**
（引自文献27）

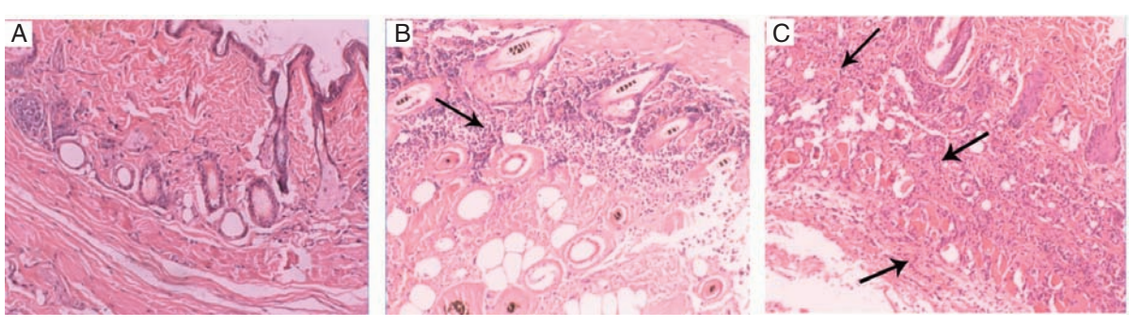



**图23–2　皮肤烫伤金黄色葡萄球菌感染模型组织切片检查**
（A）正常皮肤；（B）烫伤皮肤；（C）烫伤后金黄色葡萄球菌感染皮肤。箭头所示为白细胞浸润。（引自文献27）

## 三、模型特点及应用

采用此方法造成的烧伤模型，用组织切片检测确定可以造成三度烧伤。烫伤后的皮肤表面接种$5\times10^6$CFU的金黄色葡萄球菌，这个数量的金黄色葡萄球菌在感染处的皮肤组织中可以造成7天的持续性感染（图23–1），但是在血液中很难检测到病原菌说明该模型只能在烧伤部位造成局部的皮肤感染，如果要造成全身性的感染可以还需要增加烧伤的面积。在感染后第4天，组织切片检查可观察到大量的白细胞浸润明显的炎症反应（图23–2）。我们进一步用这个模型评价头孢哌酮钠和左氧氟沙星的治疗效果。左氧氟沙星和头孢哌酮钠在皮肤烫伤感染模型中能分别将100mg皮肤组织中的细菌降低$4\log_{10}$和$5\log_{10}$CFU（图23–3）。

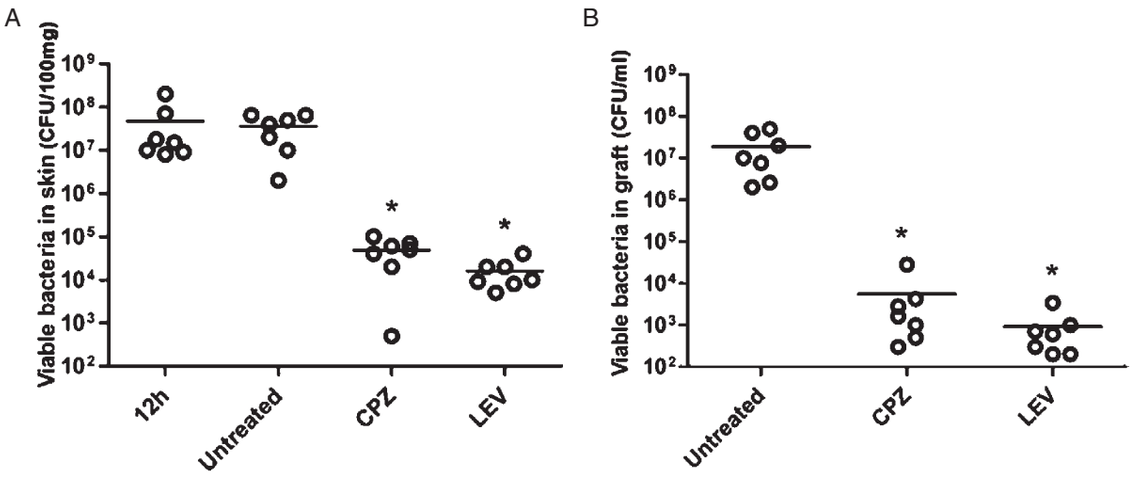



**图23–3　常用抗生素头孢哌酮钠和左氧氟沙星在树鼩皮肤烫伤感染模型和生物材料植入感染模型中的治疗效果**

（A）树鼩皮肤烫伤金黄色葡萄球菌感染模型中细菌计数；（B）涤纶补片植入绿脓杆菌感染模型中细菌计数树鼩。（引自文献27）

## 四、免疫抑制的树鼩绿脓杆菌肺炎模型

### （一）背　景

细菌性肺炎在临床中是免疫能力抑制病人的一个主要死亡原因。以前的研究报道证明树鼩容易患自发性肺炎，并且从死亡的树鼩肺部曾经分离到革兰氏阴性菌大肠杆菌，说明树鼩容易患革兰氏阴性菌肺炎[26]。建立树鼩革兰氏阴性菌肺炎模型对抗菌抗炎药物的筛选具有重要意义。

### （二）造模原理

在临床中，败血症经常发生在年龄较大，或者有其它别的疾病比如糖尿病、癌症患者的病人身上，这些病人都有一个共同的特点，就是正常的免疫能力受损。高剂量的环磷酰胺能够造成骨髓抑制和显著的免疫反应抑制。环磷酰胺引起的骨髓抑制会导致白细胞减少，增加感染的风险。采用腹腔多次注射高剂量的环磷酰胺造成中性粒细胞减少症的树鼩模型，模拟临床中采用化疗药物治疗后导致病人产生免疫抑制。绿脓杆菌是临床中肺部感染的主要致病菌，尤其是免疫抑制病

人和肺纤维化病人。

### （三）造模方法

1. 中性粒细胞减少模型

在实验开始的第1天和第4天分别腹腔注射150mg/kg和100mg/kg的环磷酰胺造成树鼩中性粒细胞减少症。

2. 菌液制备

铜绿假单胞菌ATCC 27853接种于营养肉汤中，并在37℃振荡培养。当细菌生长至对数生长期时（$OD_{600}$=0.6），离心收集细菌，并用生理盐水洗涤细菌3次，最后用生理盐水调整细菌浓度为$OD_{600}$=0.1。

3. 雾化感染

在第5天采用空气压缩雾化的方法感染绿脓杆菌。树鼩装入雾化箱中，采用空气压缩雾化装置将菌液雾化成直径在3μm左右的小液滴感染树鼩（图23–4A）。

4. 模型评价

气管、肺组织及血液细菌计数。感染后7天内每隔12小时观察树鼩存活率。

### （四）模型特点及应用

采用环磷酰胺腹腔注射后造成中性粒细胞减少症的树鼩模型，模拟临床中采用环磷酰胺化疗后病人的免疫抑制情形。环磷酰胺两次腹腔注射后，树鼩外周血液中的中性粒细胞显著降低，并且可以持续到第6天；外周血中的单核细胞也略微降低，但是很快就恢复到正常水平。由于树鼩的上呼吸道比较长，采用鼻孔滴鼻感染的效果并不好，细菌在树鼩肺部定植效果差，采用空气压缩雾化后将含有细菌的培养基雾化成直径在3μm左右的小液滴可增强感染的效率。正常的树鼩暴露在高浓度的绿脓杆菌（$8\times10^8$CFU/mL）雾化环境下10分钟3次，并没有出现明显的感染症状，而环磷酰胺造成的中性粒细胞减少的树鼩对绿脓杆菌高度敏感，暴露在低浓度的绿脓杆菌（$1\times10^7$CFU/mL）的雾化环境下10分钟2次，在感染后出现明显的呼吸窘迫现象，并且在24小时后出现死亡。解剖发现感染后的树鼩肺部病变明显，比如结节状的感染病灶、水肿、出血性坏死等（图23–4B）。在肺部、气管、血液中的细菌载量都显著高于未感染组，其中以肺部组织细菌载量最高。而未感染绿脓杆菌的环磷酰胺造成的中性粒细胞减少的树鼩则正常活动饮食。该模型能够显著降低感染的绿脓杆菌的量，在感染的早期只需要很少数量的绿脓杆菌定植在肺部就能

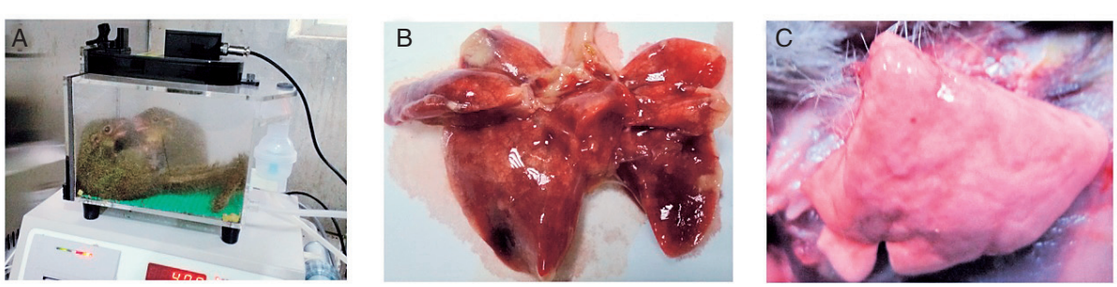



**图23–4　中性粒细胞减少症的树鼩绿脓杆菌肺炎模型**

（A）树鼩雾化感染绿脓杆菌；（B）感染绿脓杆菌24小时后的树鼩肺；（C）正常的树鼩肺。

造成严重的感染，并且在感染的早期给予抗生素治疗能够显著提高已感染树鼩的存活率，说明该模型对抗生素治疗非常敏感，适合用于新型抗生素的体内药效学评价。而环磷酰胺造成的中性粒细胞减少的小鼠模型，在相同的感染条件下，并不能造成小鼠的致死性感染，只能在感染的初期可用在小鼠肺部检测到细菌，而48小时后细菌则被清除掉。增加感染的绿脓杆菌浓度到$5.6 \times 10^8$CFU/mL雾化3次10分钟才能造成中性粒细胞减少的小鼠感染。

## 五、树鼩盲肠结扎与穿孔导致的多种细菌感染模型

### （一）背　景

目前在啮齿类动物上主要有3种广泛使用的败血症模型：①内毒素（LPS）诱导的败血症模型；②外源性细菌感染诱导的败血症模型；③盲肠结扎与穿孔诱导的多种细菌感染败血症模型。由于人类败血症病理机制的复杂性，这3种啮齿类败血症模型都只能部分模拟人类败血症的病理机制。在过去的研究中，研究者们也试图采用新的方法、新的实验动物创制败血症模型，比如用犬、绵羊、马，但是由于这些动物同人类之间的巨大物种差异性，这些败血症动物模型都不能很好地模拟人类败血症的病理过程。因此，采用同人类亲缘关系近的实验动物，尤其是低等、小型非人灵长类动物创制人类败血症模型可能是一种很有希望的选择。目前比较受认可的败血症模型基本都是用啮齿类动物建立的（如小鼠、大鼠），但目前的研究已证明啮齿类动物败血症同人类败血症具有很大的差异。树鼩作为同人类亲缘关系最近的新型实验动物，建立其败血症模型对败血症药物的开发及进一步理解败血症的病理机制具有重要意义。

### （二）造模原理

盲肠结扎穿孔（cecal ligation and puncture, CLP）败血症模型操作简便，其原理是通过外科处理使动物腹腔存在失活组织的同时，少量持续溢入混有多种细菌的肠内容物，引起腹腔感染，形成与临床上阑尾炎穿孔形成的腹膜炎极为相似的病理模型。动物表现出早期高动力循环、高代谢和晚期低动力循环状态等败血症和感染性休克的特征，血中内毒素检出率及细菌培养（包括$G^+$菌和$G^-$菌）阳性率高。

### （三）造模方法

1. 麻　醉

树鼩手术前禁食不禁水12小时。树鼩用氯氨酮（110mg/kg）肌肉注射麻醉后，用自制的树鼩固定板固定树鼩四肢，医用碘伏消毒腹部，沿腹正中线剪开皮肤约3cm暴露腹膜，避开血管小心剪开腹膜约2cm，在树鼩右下腹部找到盲肠（图23–5A和图23–5B）。

2. 结扎与穿孔

暴露盲肠后，在回盲部向盲肠末端方向约0.5cm的地方用手术缝合线结扎（图23–5C）。用5mL注射器针头穿刺盲肠两次，并用手轻轻挤压盲肠，确定有少量粪便漏出，在所有树鼩中尽量保证挤压出的粪便量一致（图23–5D和图23–5E）。将盲肠放回腹腔，分别缝合腹膜和皮肤（图23–5F）。所有树鼩皮下注射20mL/kg的生理盐水防止休克，并用白炽灯照射保温加快树鼩苏醒。在饮水中添加对乙酰氨基酚（0.25mg/mL）缓解烫伤引起的疼痛。假手术组仅做开腹、分离盲肠远端与大肠系膜及关腹手术。

3. 模型评价

术后给予自由进食饮水，观察1周，检测腹腔和血液中的细菌载量，同时记录树鼩死亡情况。

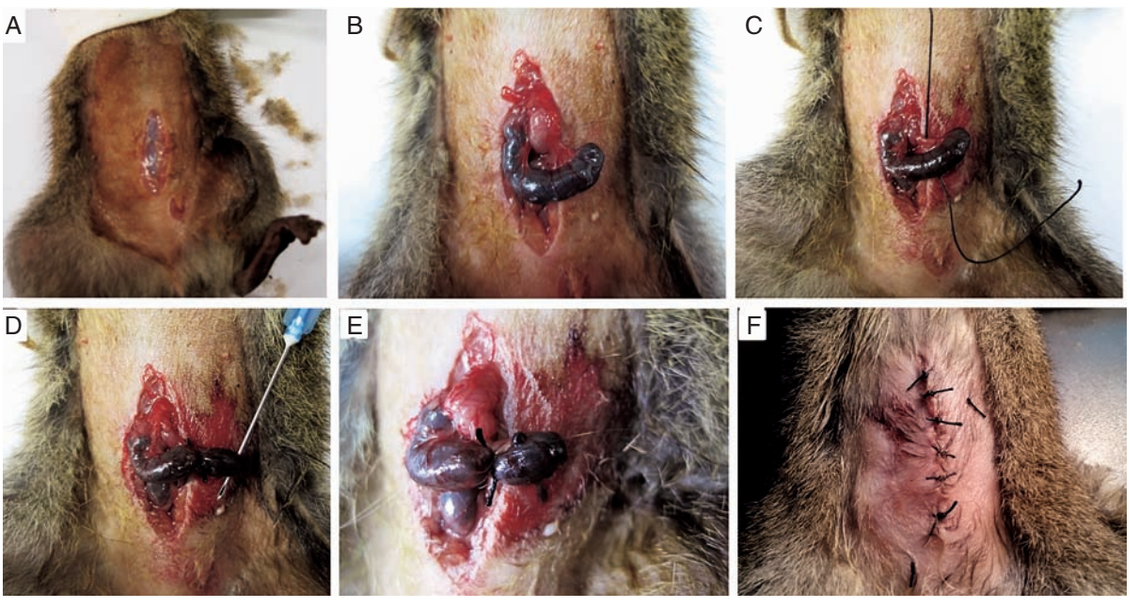



**图23–5　树鼩盲肠结扎与穿孔导致的多种细菌感染模型**

### （四）模型特点与应用

造模后，在12小时内树鼩未出现死亡。树鼩表现出食欲减少，饮水正常，个别树鼩会撕咬手术部位。24小时后开始出现死亡，72小时达到高峰，手术组树鼩在一周内陆续出现死亡。作为对照的树鼩（假手术组）7天内未出现死亡，腹腔和血液中也未检测到细菌。

## 六、树鼩对细菌内毒素（LPS）的免疫反应

### （一）背　景

LPS是革兰氏阴性菌细胞外膜的主要成分，能够通过TLR4激活炎症反应，是革兰氏阴性菌感染导致的败血症的主要致病因子。抑制LPS的免疫原性是治疗革兰氏阴性菌导致的败血症中的一个主要方法。

### （二）造模原理

静脉注射高剂量的LPS能在短时间内引起炎症性的细胞因子大量释放并造成肺、肝等的组织病理变化。

### （三）造模方法

1. 麻　醉

树鼩用氯胺酮（100mg/kg）肌肉注射麻醉后，用自制的树鼩固定板固定树鼩四肢和头部。

2. 静脉注射LPS

暴露树鼩的舌下静脉，用镊子轻轻擦拭使血管充分充盈。1mL注射器穿刺血管缓慢注射含有LPS（10mg/mL）的生理盐水0.25mL，压迫止血。

3. 模型评价

在预期的时间点通过眼眶静脉丛取血采用Griess试剂测量血清中一氧化氮的含量。

### （四）模型特点及应用

我们通过舌下静脉注射亚致死剂量的LPS（20mg/kg）初步研究树鼩对LPS的免疫反应。树鼩的尾巴毛很多其尾静脉不明显，相比之下其舌下静脉非常明显，1mL注射器针头能够很容易穿透血管壁，通过舌下静脉注射是非常容易操作的。亚致死剂量的LPS舌下静脉注射后，树鼩表现出食欲不振，竖毛，部分树鼩眼角有分泌物。另外，我们在不同的时间点通过眼眶静脉丛穿刺多次收集血液，分离血清测定血清中一氧化氮的含量。一氧化氮在人败血症病理过程中扮演了很重要的角色，在败血症的病程中的大部分时间都处于上调阶段。由于啮齿类动物与人类的差异，一氧化氮在小鼠中快速上调后迅速下降，小鼠一般在24小时内死亡，而在树鼩中一氧化氮上升的速度比较缓慢并且能够维持较长的时间。这些初步的结果提示树鼩可能是创制败血症模型的较有前景的新型实验动物，深入研究人类败血症的病理机制和筛选新的治疗败血症的药物。

## 第三节 结语与展望

树鼩是与灵长类亲缘关系最近的新型实验动物，其作为自发性和诱发性疾病动物模型的研究已经受到人们广泛关注，尤其是在树鼩近视模型、抑郁应激模型及病毒感染模型等方面[28]。在树鼩细菌学方面的研究目前主要集中在树鼩病原菌分离，自身共生菌的鉴定，而对细菌导致的疾病动物模型相关的研究非常少见[25, 30]。最近，昆明动物研究所组织了树鼩全基因组测定和解析工作（包括笔者所在本课题组），得到了高覆盖度（79X）的基因组序列，表明树鼩的免疫系统同人类更相似[11]。在本章中，笔者结合自己的研究经历介绍了几种树鼩细菌感染模型的建立方法及其特点和应用，包括树鼩生物材料绿脓杆菌生物膜感染模型、树鼩皮肤烧伤金黄色葡萄球菌感染模型、免疫抑制的树鼩绿脓杆菌肺炎模型、树鼩盲肠结扎与穿孔导致的多种细菌感染模型，以及树鼩对细菌内毒素的免疫反应。在这些模型中我们发现树鼩对绿脓杆菌、金黄色葡萄球菌这两种人类常见的病原菌均易感，并且其敏感程度高于昆明小鼠。我们在体外细胞模型上发现，LPS刺激树鼩巨噬细胞表达的炎症细胞因子（例如：TNF–a、IL–6）和一氧化氮合酶的动态表达水平同人单核细胞THP–1具有很大的相似性，而同小鼠巨噬细胞则有较大的差异。LPS刺激后，树鼩血清中的一氧化氮测定结果也初步表明同小鼠不同。

综上所述，树鼩的细菌感染模型为抗感染药物和败血症药物的筛选提供了新的动物模型，而且树鼩可能是一种潜在的能够较好模拟人类败血症的新型实验动物，在以后的研究中需要对相关的研究进行更深入的研究。

## 参考文献

[1]Abraham E, Matthay MA, Dinarello CA, et al. Consensus conference definitions for sepsis, septic shock, acute lung injury, and acute respiratory distress syndrome: time for a reevaluation. Crit Care Med, 2000, 28(1): 232-5.

[2]Arias CA, Murray BE. Antibiotic-resistant bugs in the 21st century—a clinical super-challenge. N Engl J Med, 2009, 360(5): 439-43.

[3]Atiyeh BS, Costagliola M, Hayek SN, et al. Effect of silver on burn wound infection control and healing: review of the literature. Burns, 2007, 33(2): 139-48.

[4]Barbara G, Stanghellini V, Brandi G, et al. Interactions between commensal bacteria and gut sensorimotor function in health and disease. Am J Gastroenterol, 2005, 100(11): 2560-8.

[5]Ben-Ami R, Rodriguez-Bano J, Arslan H, et al. A multinational survey of risk factors for infection with extended-spectrum beta-lactamase-producing enterobacteriaceae in nonhospitalized patients. Clin Infect Dis, 2009, 49(5): 682-90.

[6]Berg RD. The indigenous gastrointestinal microflora. Trends Microbiol, 1996, 4(11):430-5.

[7]Brenchley JM, Price DA, Schacker TW, et al. Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. Nat Med, 2006, 12(12): 1365-71.

[8]Bucaneve G, Micozzi A, Menichetti F, et al. Levofloxacin to prevent bacterial infection in patients with cancer and neutropenia. N Engl J Med, 2005, 353(10): 977-87.

[9]Cao J, Yang EB, Su JJ, et al. The tree shrews: adjuncts and alternatives to primates as models for biomedical research. J Med Primatol, 2003, 32(3): 123-30.

[10]Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. Science, 1999, 284(5418): 1318-22.

[11]Fan Y, Huang ZY, Cao CC, et al. Genome of the Chinese tree shrew. Nat Commun, 2013, 4: 1426.

[12]Freestone PP, Williams PH, Haigh RD, et al. Growth stimulation of intestinal commensal Escherichia coli by catecholamines: a possible contributory factor in trauma-induced sepsis. Shock, 2002, 18(5): 465-70.

[13]Gauglitz GG, Toliver-Kinsky TE, Williams FN, et al. Insulin increases resistance to burn wound infection-associated sepsis. Crit Care Med, 2010, 38(1): 202-8.

[14]Harbarth S, Fankhauser C, Schrenzel J, et al. Universal screening for methicillin-resistant Staphylococcus aureus at hospital admission and nosocomial infection in surgical patients. Jama-J Am Med Assoc, 2008, 299(10): 1149-57.

[15]Hooton TM, Bradley SF, Cardenas DD, et al. Diagnosis, Prevention, and Treatment of Catheter-Associated Urinary Tract Infection in Adults: 2009 International Clinical Practice Guidelines from the Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis, 2010, 50(5): 625-63.

[16]Kumarasamy KK, Toleman MA, Walsh TR, et al. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. Lancet Infect Dis, 2010, 10(9): 597-602.

[17]Kuritzkes DR. Neutropenia, neutrophil dysfunction, and bacterial infection in patients with human immunodeficiency virus disease: The role of granulocyte colony-stimulating factor. Clin Infect Dis, 2000, 30(2): 256-60.

[18]Munford RS. Severe sepsis and septic shock: the role of gram-negative bacteremia. Annu Rev Pathol, 2006, 1: 467-96.

[19]Pavlov Ch S. Spontaneous bacterial peritonitis: a clinical variant of ascites-peritonitis: diagnosis and treatment. Klin Med (Mosk), 2003, 81(5): 15-22.

[20]Peleg AY, Hooper DC. Hospital-acquired infections due to gram-negative bacteria. N Engl J Med, 2010, 362(19): 1804-13.

[21]Santolaya ME, Alvarez AM, Becker A, et al. Prospective, multicenter evaluation of risk factors associated with invasive bacterial infection in children with cancer, neutropenia, and fever. J Clin Oncol, 2001, 19(14): 3415-21.

[22]Triulzi DJ, Vanek K, Ryan DH, et al. A clinical and immunologic study of blood transfusion and postoperative bacterial infection in spinal surgery. Transfusion, 1992, 32(6): 517-24.

[23]Yong D, Toleman MA, Giske CG, et al. Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, bla (NDM-1), and a

novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. Antimicrob Agents Chemother, 2009, 53(12): 5046-54.

[24]Zasloff M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. Nature, 2002, 415(6870): 389-95.

[25]高家红，江勤芳，罗志武，等．树鼩正常肠道细菌的培养分离鉴定及其药敏试验研究．中国比较医学杂志，2009，19（12）：25–6.

[26]高家红，仝品芬，孙晓梅，等．从临床肺炎死亡树鼩中分离到致病性大肠埃希菌．中国比较医学杂志，2012，22（9）：81–3.

[27]李盛安，李文辉，张云．树鼩细菌感染模型的建立及抗菌药物的治疗效果评价．动物学研究，2012，33（1）：1–6.

[28]徐林，张云，梁斌，等．树鼩实验动物和人类疾病的树鼩模型研究概述．动物学研究，2013，34（1）：1–11.

[29]徐玉善，王曦，许云敏，等．血糖对树鼩感染表皮葡萄球菌清除能力及植入性材料细菌黏附性的影响．中国组织工程研究与临床康复，2011，15（51）：9570–4.

[30]张才军，施明，陈芳，等．中缅树鼩常见病原菌的分离鉴定．中国病原生物学，2009，4（12）：899–900.



Tree shrews

# 第二十四章 树鼩乳腺癌模型研究

第二篇 疾病树鼩模型
TREE SHREW ANIMAL MODELS

夏厚军　何保丽　陈策实

乳腺癌是一种高度异质性的肿瘤，是女性最常见的恶性肿瘤。American Cancer Society[1]公布的最新统计数据预计，2013年美国妇女中约有232340例新发浸润性乳腺癌和40030例因乳腺癌而导致的死亡，其死亡率在女性中仅次于肺癌。在我国由于工作压力增大和饮食结构改变，乳腺癌也成为我国女性身心健康的最大威胁，发病率急剧上升，尤其是在节奏快、竞争激烈的一线城市。据《2012中国肿瘤登记年报》报告，我国乳腺癌发生率已增至42.55/10万，居女性恶性肿瘤首位。死亡率为10.24/10万，居女性恶性肿瘤死亡率第5位。乳腺癌的机制研究、新的预防方法和治疗药物的研发都离不开合适的乳腺癌动物模型，因此建立适宜的乳腺癌动物模型对于进一步研究乳腺癌的病因、发病机理，继而对其进行更有效预防和治疗将起到非常关键的作用。

## 第一节 动物模型在乳腺癌研究中的意义

了解乳腺癌的发生发展过程对于乳腺癌的防治具有深刻的指导意义，但是分散的个体样本和取材的不连续性往往无法完整地呈现这一发病过程。适宜的动物模型不仅可以再现乳腺癌的发生发展过程，还能够重现并测试其对各种治疗的反应，从而为乳腺癌的防治提供有益的策略。

### 一、乳腺癌的发生发展过程

乳腺癌的发生发展是一个漫长的逐渐积累的过程，大多认为其发源于终末导管小叶单位中的上皮细胞，经历长期的不同阶段的非正常改变。在临床上乳腺癌发展阶段大致可以分为乳腺增生（hyperplasias）、乳腺非典型增生（atypical hyperplasias）、原位癌（in situ carcinomas）、浸润性癌（invasive carcinomas）以及最终发生远端转移（metastasis）。肿瘤恶性程度也随之加剧。乳腺增生是由于乳腺细胞生长过多，乳腺正常结构出现紊乱。乳腺细胞一旦发生黏附和极性的改变，超出常规的增生，并且增生的上皮细胞大小不一，且不断累积，膨胀成球状，就发展成了非典型

增生，这也被认为是正常细胞从良性到恶性的一个过渡过程，也被称之为癌前病变。乳腺导管上皮细胞的恶性增生不断持续，最终产生了组织学和生物学的改变，当这种改变还局限于导管的基底膜内而未侵犯间质时，称之为原位癌。浸润性癌则突破了基底膜而入侵到其它组织结构中，并潜在的转移到身体其它部位。一旦发生乳腺癌转移，患者生存的几率大大降低，常见的乳腺癌转移部位包括骨、肺、大脑等[2]。在乳腺癌的发展过程中，及早发现并进行有效治疗是降低乳腺癌死亡率的根本途径。

## 二、乳腺癌动物模型类型

理想的人乳腺癌动物模型应该能够客观地反映出疾病的病因、病理和遗传学特征，同时肿瘤特异的发生在乳腺部位，接近100%的发病率和相对较短的潜伏期。但现实中每种乳腺癌模型仅能部分地反映人乳腺肿瘤的某一方面的特征，需要根据实验的目的进行选择。现有的人乳腺癌动物模型从肿瘤产生的方式上可以划分为5大类：

### （一）自发模型

乳腺肿块大多突出于体表，易于观察得到。自发乳腺肿瘤是在长期繁殖饲养过程自然产生，随后通过遗传育种而保留成为一类肿瘤。大多数实验动物包括犬科[3]、猫科[4]、鼠科[5]、树鼩[6]以及猕猴[7]等都会自发产生乳腺肿瘤。此类肿瘤无须实验处理，到一定年龄便自发地产生乳腺肿瘤。此类肿瘤在发生发展过程中与人的肿瘤类似，但其较低的肿瘤发生比例，不确定的发生时间、不易保种以及不同个体的差异很大，都严重限制了自发模型的应用。不过自发肿瘤能够对诱发肿瘤提供研究的思路和借鉴。

### （二）诱发模型

诱发肿瘤是通过化学、物理或生物的手段在实验动物中诱导的乳腺肿瘤。常见的化学诱导乳腺癌试剂包括二甲基苯蒽［7, 12-dimethylbenz (a) anthracene, DMBA］和甲基亚硝脲（N-nitroso-N-methylurea, NMU）。DMBA是多环芳烃类化合物，经代谢产生致癌物，从而引起DNA损伤，基因突变，最终导致肿瘤生成。由于DMBA对乳腺的选择作用较强，特异性高达70%～80%[8]，是目前诱发乳腺癌最常用的致癌剂。物理方法主要通过辐射途径引发基因突变从而诱发乳腺肿瘤，但同时也会产生其它类型的肿瘤。生物学手段则主要使用慢病毒等在实验动物体内过度表达癌基因或沉默抑癌基因来模拟乳腺癌的发生。诱发肿瘤对于各物种具有比较广泛的适用性，是创建树鼩模型的首选方式。

### （三）移植模型

移植模型是通过将乳腺肿瘤组织或细胞植入到同种或异种动物连续传代而建立的模型，该模型是现有肿瘤研究中最常见的模型之一。同种移植的组织或细胞来源于同一物种，具有较高的建模成功率，常见的小鼠乳腺癌细胞株4T1接种到正常小鼠就会产生乳腺肿瘤并伴随转移。异种移植则需要选择免疫缺陷型小鼠以避免免疫系统对外来肿瘤的排斥。通过这种方式部分人乳腺癌细胞系可以在免疫缺陷型小鼠（裸鼠、NOD-SCID小鼠、NOG小鼠）中建立人源的乳腺肿瘤，为乳腺癌的机制和药物测试研究提供动物模型；也可以将临床的乳腺癌样品直接植入免疫缺陷小鼠，这种病人来源的原代移植瘤（PDX）无疑是更好的动物模型，但是乳腺癌建立PDX的成功率很低。

小鼠通过尾静脉或左心房注射肿瘤细胞，可以建立不同部位转移的模型。通过尾静脉注射，肿瘤细胞大多积聚在肺部，因此容易产生肺部肿瘤，模拟肺部转移；而通过左心房注射，肿瘤细胞分散到各个器官，更易于建立类似于骨的转移模型。树鼩的遗传背景并不清晰，没有合适的近交系可供移植使用，更没有创建出免疫缺陷型树鼩，因此目前还不能通过该途径获得乳腺癌树鼩动物模型。

### （四）转基因模型

转基因动物是通过人工的方式将外源基因或特定DNA序列整合到实验动物染色体中，使其随宿主稳定遗传到下一代的动物。在不同的操控策略下，转基因动物全身或局部（如乳腺）过表达外源癌基因，或敲除内源抑癌基因，从而诱发特定的乳腺肿瘤。在小鼠转基因模型中常用小鼠乳腺肿瘤病毒（MMTV）长末端启动子特定在小鼠乳腺部位启动PyMT、Myc、Wnt或Neu等癌基因的表达，自发的产生乳腺肿瘤。MMTV-Neu和MMTV-PyMT转基因小鼠在第一次怀孕以后发生肺部和淋巴结的转移[9]。我们通过在树鼩导管注射PyMT过表达的慢病毒同样发现了肺部的转移。根据实验目的还可以选择不同的启动子以便在特定的情况下过表达或敲除所选的基因，如使用乳清酸蛋白（whey acidic protein, Wap）启动子可以防止遗传工程小鼠的胚胎致死，待哺乳之后再执行基因的过表达或者敲除。利用药物诱导特定时间的转基因动物也是常见的模型之一。树鼩的转基因动物研究还在探索过程中，最新的TALEN和CAS9等打靶技术的成熟使DNA重组效率大大增加，提高了成功率。

## 三、乳腺癌动物模型存在的困境

尽管多种哺乳动物都被报道能够自发产生乳腺癌，但绝大多数乳腺癌的动物模型还是局限在啮齿类动物（大鼠或小鼠）。作为一种最重要的模式生物，啮齿类动物模型具有遗传背景清晰、生长周期短、可以进行基因操作等特点，因此是研究乳腺癌机理和抗癌药物最常用的动物模型。但是从低等的啮齿类到高等的灵长类，进化尺度上的跨度使得啮齿类动物在其自身乳腺发育及乳腺癌的发生发展上与人存在较大的差异，无法准确地反映人体中的这一变化。长期的研究也逐渐暴露出啮齿类动物模型在乳腺癌研究中的一些弊端：①较小的体形和短暂的寿命意味着啮齿类的各种生理代谢要快于人类，肿瘤潜伏的时间很短。体外实验表明相同的癌基因或化学药物更容易促使啮齿类动物细胞的转化，这可能与其基因修补能力弱，基因调控方式不同，以及永生化方面差异等有关[10]。小鼠和人的原代细胞在端粒的动力学和调控方面有很大的不同，实验小鼠端粒的长度（40～60kb）要远超于人（10kb），并且端粒酶在成年鼠各组织中广泛表达[11]。②在肿瘤生物学和病理学上小鼠模型也不能完全模拟人的乳腺肿瘤。尽管在肿瘤的形态学上各物种间都比较一致，但转基因小鼠模型与人在病理级别和类型上都存在不同[12]。③肿瘤发生的微环境在不同物种间存在差异，如小鼠的基质主要是由脂肪组织组成而人的基质含有大量的成纤维细胞。大量文献已经证实基质与乳腺癌细胞的相互作用在一定程度上促进了肿瘤的发展和转移[13，14]。④在遗传层面普遍认为多种基因突变的积累导致了乳腺癌的发生发展，单个基因的转基因模型并不能真实反映这一情况，而多个基因的变化则与人存在较大的差异，如BRCA1和p53在小鼠的同一染色质上，常利用共同敲除这两个基因来建立模型，但该情形在人乳腺癌中并不发生[15]，另外在大多转基因小鼠肿瘤中性激素受体低表达[16]，这与已知大多数人乳腺癌是雌激素和孕激素受体高表达的类型相矛盾。⑤人乳腺癌转移过程癌细胞大多经过淋巴系统迁移到骨和脑等远端器官中，而小

鼠模型中则主要通过供血途径传播[17]。上述这些差异也导致通过啮齿类动物所筛选的抗癌药物大多在人体临床治疗试验中没有显著效果。因此，建立新的乳腺癌动物模型是乳腺癌防治中的迫切需要。

灵长类动物与人类亲缘关系密切，可以较好地模拟人类疾病的发生、发展过程，因此是研究人类乳腺癌机理、药物筛选和评价最理想的模式动物。树鼩（*Tupaia belangeri chinensis*）作为低等灵长类动物，比啮齿类动物与人类更为接近[18，19]。由于树鼩和人在生理解剖、神经发育、心理应激模式等方面有较高的相似性，同时体形小、繁殖快，饲养和繁殖成本远低于猴子等高等灵长类动物，已被应用于人类医学实验研究的诸多领域，是具有应用价值的新型实验动物。1966年*Nature*首次报道了一例树鼩自发性乳腺癌[20]，同时我们在树鼩繁殖过程中也发现了多例自发性乳腺癌，表明树鼩是适合建立乳腺癌模型的。由于没有免疫缺陷的树鼩品系，将人的乳腺癌移植到树鼩基本不可能成功。而基于胚胎干细胞的树鼩转基因技术还没有建立，通过传统的干细胞转基因技术（过量表达癌基因或者敲除抑癌基因）建立树鼩乳腺癌模型也不可行，因此基于树鼩肝癌模型的成功经验，目前选择化学和生物方法来诱发树鼩乳腺癌是比较可行的策略。

## 第二节 致癌剂DMBA联合MPA创建树鼩乳腺癌模型

### 一、研究背景

目前公认性激素［雌激素（estrogen）和孕激素（progesterone）］是刺激乳腺上皮细胞增生的重要因素[21]。雌激素被认为是乳腺癌发生的根源，初潮过早[22]和绝经过晚[23]都会增加女性患乳腺癌的风险，其原因就在于延长了雌激素暴露的时间。雌激素还可以促进乳腺细胞的分裂，提高乳房的密度，增加乳腺癌的风险[24]。孕激素也同样加大了乳腺癌的风险，在月经周期中的黄体期孕酮水平处于最高时，乳房的上皮组织呈现较高程度的有丝分裂[25]。多项研究表明将ACI大鼠持续暴露在妊娠期水平的雌激素之下会诱发乳腺癌[26，27]。但是一旦大鼠切除卵巢以后，雌激素并不能单独诱导乳腺癌，必须同时加入孕酮后才能够诱发乳腺癌。这样的结论同绝经后女性激素替代治疗（hormone replacement therapy, HRT）的研究结果相一致，长期同时服用雌激素和孕酮的女性比只用雌激素的女性乳腺癌发病率会显著提高[28，29]。

现有啮齿类模型中常用的致癌剂包括二甲基苯蒽［7, 12-dimethylbenz (a) anthracene, DMBA］和甲基亚硝脲（N-nitroso-N-methylurea, NMU）。DMBA是多环芳烃类化合物，经代谢产生致癌物，从而引起DNA损伤，基因突变，最终导致肿瘤生成。由于DMBA对乳腺的选择作用较强，特异性高达70%～80%[8]，是目前诱发乳腺癌最常用的致癌剂。DMBA所诱发的Sprague-Dawley（SD）大鼠乳腺癌大多为ER+/PR+[30]，表明雌激素和孕激素可以加速DMBA诱发的乳腺癌生长。研究证实醋酸甲羟孕酮（medroxyprogesterone acetate, MPA），一种人工合成的孕酮衍生物，能够加速大鼠[31]或小鼠[32]DMBA诱发乳腺癌的速度。因此，DMBA联合MPA诱发树鼩乳腺癌模型成为首选。

### 二、树鼩乳腺癌诱发过程

DMBA是一类亲脂性物质，可将其溶解于植物油或吐温中。给药途径一般经过口服（即灌

胃）、肌肉注射或直接涂布乳房表面（或注射进乳腺导管）。我们选择了40只年龄在3～4个月的处女期树鼩，随机的分成了3组进行乳腺癌诱导实验（图24–1A）：①DMBA+MPA组：每3周1次，连续3次DMBA（20mg/mL，20mg/次）灌胃处理之后，每隔3个月于树鼩背部左侧皮下包埋MPA缓释片剂（150mg/片，90天缓释，innovative research），共埋植2次MPA片；②DMBA组：连续3次进行DMBA（20mg/mL，20mg/次）灌胃处理，每周1次；③正常对照组：使用花生油进行灌胃处理。12个月内观察树鼩乳腺癌发生情况。

由于树鼩是胆小易受惊的动物，应激性很强，有的树鼩在实验过程中意外死亡，尤其是在埋植MPA药片的时候。实验期间，总的存活率为见图24–1B所示。在实验结束时，DMBA+MPA组有6只树鼩存活，DMBA组有8只树鼩存活，对照组有9只树鼩存活。图24–1C为存活下来树鼩中肿瘤发生的曲线图。

DMBA组仅有1只树鼩（#30）发生了肿瘤，树鼩肿瘤发生率为6.7%；DMBA+MPA组发生肿瘤的树鼩为3只（#7、#11和#12），树鼩肿瘤发生比率为20%；在对照组没有观察到肿瘤发生。如果排除意外死亡的树鼩，肿瘤发生的比例还会更高。与对照组相比，DMBA单独处理组的肿瘤发生率并没有显著增加（$P$=0.247，＞0.05），而MPA的加入显著提高了肿瘤发生率（$P$=0.018，＜0.05）；DMBA+MPA组的肿瘤发生率虽然高于DMBA组，但没有显著性（$P$=0.124，＞0.05）。

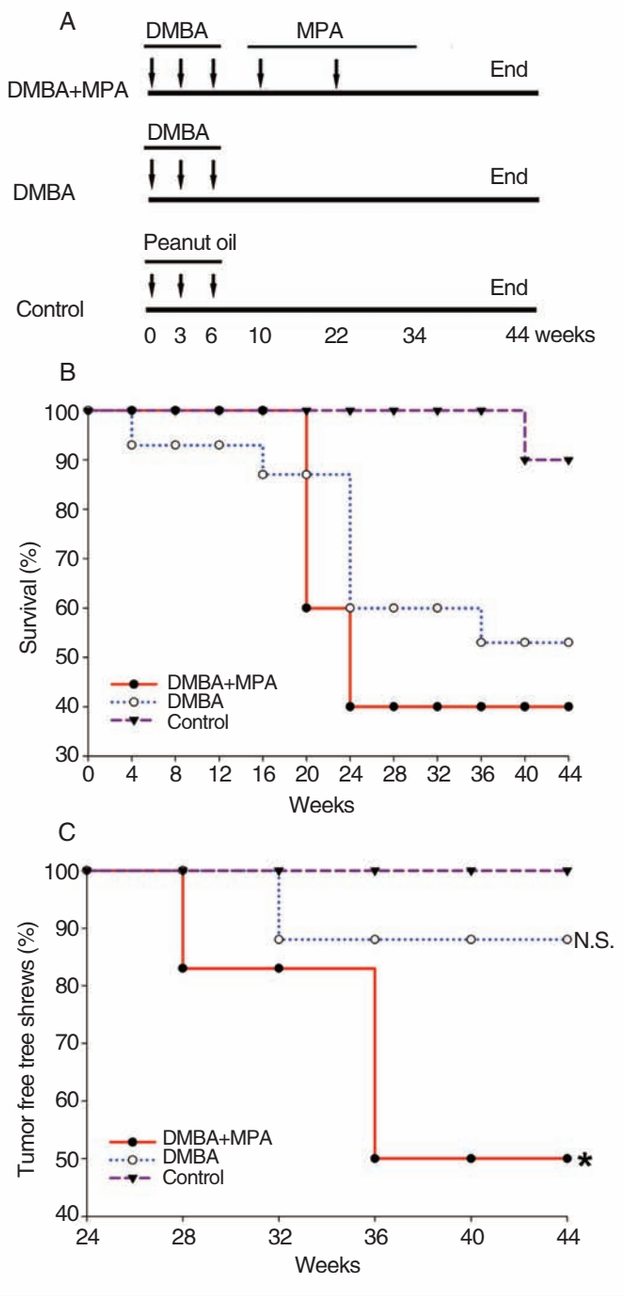



**图24–1　树鼩乳腺癌化学诱导模型的创建**

（A）实验设计示意图；（B）树鼩在不同组别中的存活曲线；（C）树鼩在不同组别中乳腺肿瘤发生曲线。

DMBA诱导的树鼩乳腺肿瘤生长曲线见图24–2。肿瘤首先出现在#11树鼩DMBA首次灌胃后第25周，不同树鼩之间肿瘤发生的潜伏期集中在为26～28周。各个树鼩肿瘤生长的速度明显不同可能是因为诱导方式、肿瘤类型和树鼩个体遗传背景差异所致。尽管该批次树鼩是子一代，但遗传背景不纯，这不仅导致了相同诱导方式下肿瘤的类型有差异，而且导致肿瘤生长速度差异很大。

值得注意的是，导管内乳头状瘤长得较快，而浸润性导管癌长得较慢，恶性程度较高的#7肿瘤生长速度最慢，肿瘤大小也就最小。#12是多点产生单个肿瘤，随后肿瘤逐渐长大并汇聚成一个整体。另外在实验过程中还产生了一些非肿瘤的肿块，如乳腺小叶增生。

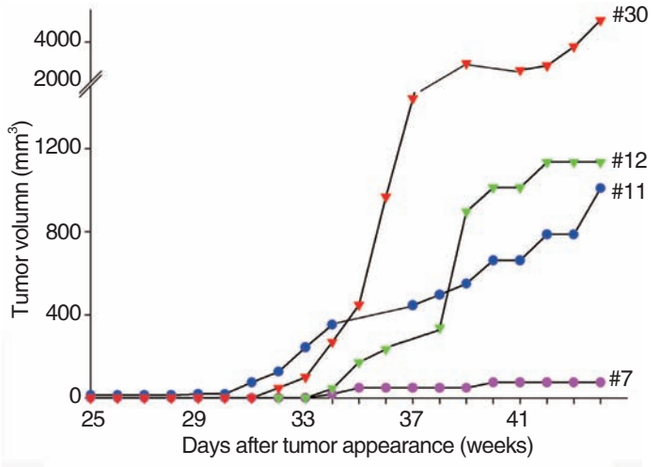



**图24–2　树鼩诱发肿瘤生长曲线图**

这4个肿瘤的诱导方式和病理类型见表24–1。

## 三、肿瘤组织的检测

当实验进行到第44周时，取所有树鼩的肿瘤进行HE和IHC检测。取材时观察整个肿瘤的情况，#11、#12和#30肿瘤都有包膜存在，肿瘤组织呈菜花状，无坏死部分。#7肿瘤无包膜，边界不清晰。将这4个树鼩乳腺肿瘤进行HE染色后依据现有人乳腺癌的判定标准判断其所属类型（表24–1），共鉴定出2种类型，即导管内乳头状瘤和浸润性导管癌。除#7外，其它树鼩肿瘤均为导管内乳头状瘤，属于良性肿瘤。#7为浸润性导管癌2级，属于恶性肿瘤。对照组#3仅为小叶增生，还未发展到肿瘤阶段。

表24–1　DMBA诱导树鼩乳腺肿瘤的类型

| 组　别 | 编号 | HE染色结果 |
|---|---|---|
| DMBA+MPA | #7 | 浸润性导管癌Ⅱ级 |
| | #11 | 导管内乳头状瘤 |
| | #12 | 导管内乳头状瘤 |
| DMBA | #30 | 导管内乳头状瘤 |
| 对照 | #3 | 小叶增生 |

图24–3为各病理类型的代表性图片。导管内乳头状瘤（#12）显微镜下结构与自发性导管内乳头状瘤极其一致，乳头表面及腔面被覆双层上皮细胞，内层为柱状上皮细胞，胞浆较丰富，外层为肌上皮细胞，其外包裹完整的基底膜。乳头中轴见纤维及血管，瘤细胞排列极性规则，细胞无异型性。#7的浸润性导管癌也与自发导管癌在结构上比较一致，癌细胞充满多个扩张的导管内腔隙，呈实性结构。癌细胞较大，形态多样，异型性明显，胞浆较丰富，核仁大，核膜厚，核分裂象多见。依据腺管形成的程度、细胞核多形性及核分裂数的多少将此浸润性导管癌分为中度分化的Ⅱ级。

这4份诱导的乳腺肿瘤的免疫组化结果分别见图24–4和表24–2，DMBA+MPA诱导组的肿瘤均显示ER阳性，而DMBA诱导的肿瘤ER显示阴性。之前的研究也显示，MPA能增加DMBA诱导的SD大鼠ER表达阳性的肿瘤细胞数[31]。PR在所有肿瘤中均有表达而HER2在所有诱导的肿瘤细胞中均未见表达。Ki67阳性细胞在浸润性导管癌中集中分布在肿瘤组织周边，而导管内乳头状瘤Ki67阳性细胞均匀地分布在肿瘤组织中。从免疫组化的结果来看，我们发现在DMBA+MPA组中所有肿瘤分子标志物的表达显示出了一致性。

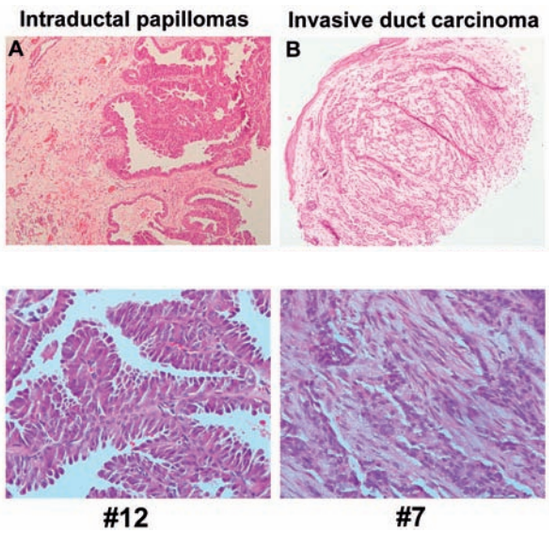



**图24–3　DMBA诱发肿瘤的代表性HE染色**

上（10×），下（40×）。

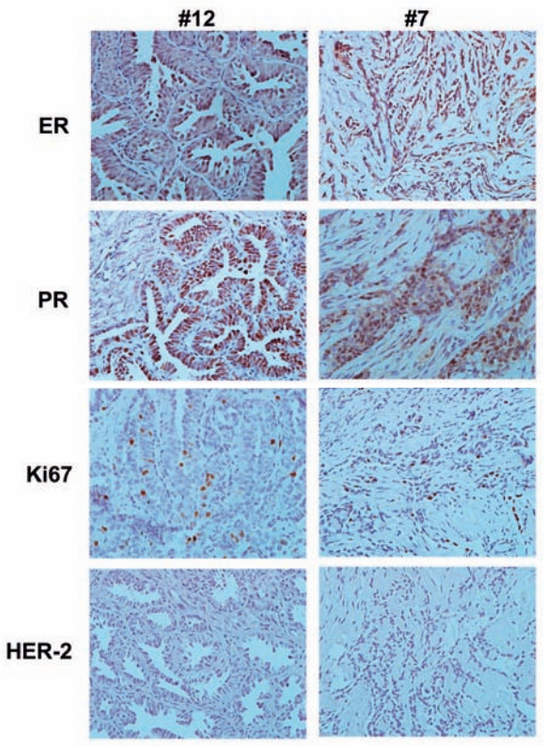



**图24–4　DMBA诱发肿瘤的代表性IHC染色**

表24–2　DMBA诱发乳腺肿瘤的亚型分析

| 组别 | 编号 | ER | PR | Her–2 | Ki–67 | 亚型 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| DMBA+MPA | #7 | + | + | – | – | Luminal A |
| | #11 | + | + | – | – | Luminal A |
| | #12 | + | + | – | – | Luminal A |
| DMBA | #30 | – | + | – | – | Luminal A |

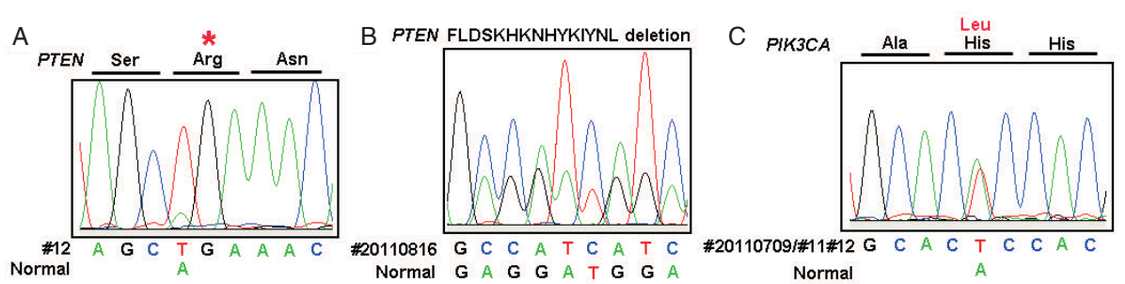



**图24–5　树鼩乳腺肿瘤组织中PTEN和PIK3CA突变位点**

（A）#12树鼩的PTEN无义突变；（B）#20110816树鼩PTEN片段缺失；（C）树鼩PIK3CA H1047L突变。

## 四、基因突变分析

越来越多的研究显示PTEN/PIK3CA、p53和GATA3在乳腺癌进程中发生突变[33]，树鼩基因组序列的顺利完成[19]，让我们得以顺利得到这些基因的PCR扩增产物，并鉴定了突变位点。#12号肿瘤因*PTEN*在第31位碱基序列A突变为T而产生终止密码子，从而发生蛋白翻译提前终止（图24–5A）；#20110816树鼩自发肿瘤PTEN CDS中有一个45bp的片断缺失，导致pTEN蛋白丢失了一段氨基酸序列（图24–5B），以往的文献报道在白血病中检测到过这种突变[34]。有3只树鼩（#20110709、#11、#12）的PIK3CA显示在其蛋白质序列中第1047位置上有1个氨基酸发生错义突变（即亮氨酸替代组氨酸），这种替代是因为其CDS序列中第3140位的碱基A突变为T而导致的（图24–5C）。PIK3CA 1047位置上组氨酸突变为亮氨酸的几率在人类乳腺肿瘤中占所有PIK3CA突变的5%[35]，尽管树鼩的PIK3CA蛋白突变并不是人中占主要的H1047R突变，但其功能改变都是一致的，可以持续磷酸化下游Akt蛋白，使其活化并导致细胞增殖。我们还测定了p53以及GATA3基因，但在我们收集的树鼩自发和诱发肿瘤样本中未发现任何突变，仅有#20110825自发肿瘤在p53 CDS中发生了同义突变，但并不改变蛋白的功能。#11和#12树鼩都是通过DMBA+MPA诱导的导管内乳头状瘤，且都发生了pTEN/PIK3CA信号通路的突变，但是DMBA组的#30并没有同样的突变，这是否提示了DMBA+MPA诱导可能是通过突变pTEN/PIK3CA信号通路来促使肿瘤发生发展的。无论如何，pTEN/PIK3CA是树鼩乳腺肿瘤中最有可能突变的信号通路。

AKT作为pTEN/PIK3CA信号通路的下游，受到PIK3CA直接的调控，pTEN则是PIK3CA的负调控因子，因此AKT可以作为判断该途径功能变化的重要指标。一旦pTEN/PIK3CA信号通路活化就会直接磷酸化AKT（主要位点为Thr308，Ser473）。选用pAKT（Ser473）抗体进行肿瘤样本免疫组化研究，分析pAKT表达与pTEN/PIK3CA信号通路突变的相关性。代表性的组化图见图24–6，pAKT以核/浆部位表达。各肿瘤组织的pAKT染色情况见表24–3。遗憾的是肿瘤的样本太少，无法进行统计分析，但从对应关系看，pAKT的表达与pTEN/PIK3CA信号通路突变一致的样本有8份，不一致的有3份，表明彼此之间还是可能存在一定的正相关的。我们推测pTEN/PIK3CA突变是有功能性变化的，进一步还需要更多的样本来证实该结论。

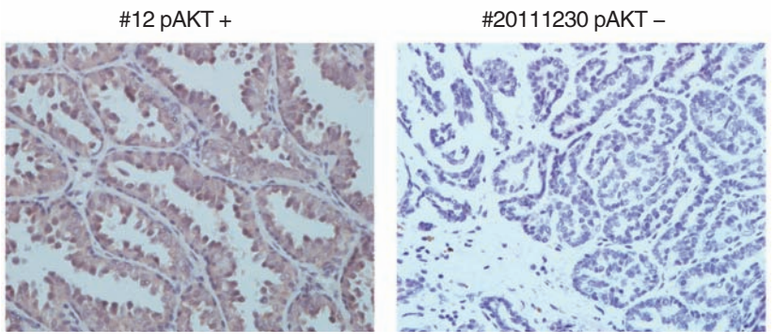



**图24–6　pAKT免疫组化代表图**

表24–3　各肿瘤组织的pAKT表达情况及其*PTEN/PIK3CA*突变

| 编　号 | pAKT | *PTEN/PIK3CA* 突变 |
|---|---|---|
| 20110709 | – | + |
| 20110825 | + | – |
| 20110816 | + | + |

续表24–3

| 编　号 | pAKT | *PTEN/PIK3CA* 突变 |
|---|---|---|
| 20130105 | – | – |
| 20111230 | – | – |
| 20130424 | + | – |
| 20130422 | – | – |
| 20130711 | – | – |
| 30 | – | – |
| 11 | + | + |
| 12 | + | + |

“–”表示表达阴性或未突变；“+”表示表达阳性或发生了突变。（7#因样品量少没有进行测序分析）

## 五、讨　论

非人灵长类动物在进化上最接近于人，因此被认为是可适用于疾病模型建立的最佳选择，但其属保护动物，饲养和管理烦琐，并常常受到伦理的限制，使得其适用范围大大缩小。啮齿类动物被广泛地运用于疾病模型研究，但逐渐暴露出诸多问题，选择合适的动物优化疾病动物模型成为一种趋势。树鼩在进化上已被证实相比较于啮齿类动物更接近于人[19]，同时也具备啮齿类的某些优势，如较小的身体易于操作、低消耗费用低等。迄今树鼩已经被应用于HBV[36]、抑郁症[37]、近视[38]以及癌症等研究。在癌症领域已经成功建立了两种树鼩模型，即黄曲霉素B1[39]联合HBV[40]诱导的肝癌模型和2–羟基丙基亚硝胺（2, 2′-dihydroxy-di-n-propylnitrosamine, DHPN）诱导的肺腺瘤模型[41]。尽管树鼩在1966年就已经发现有自发乳腺肿瘤[20]，但缺乏后续研究。到目前为止没有树鼩乳腺癌模型的研究。在啮齿类动物中有多种方法可以建立乳腺癌动物模型，但由于目前技术条件的限制下我们采用化学试剂诱导的方式。大量文献都利用两种最强的致癌剂DMBA或NMU来诱导啮齿类乳腺肿瘤。我们尝试了这两种致癌剂，但肌肉注射NMU未能诱导出乳腺肿瘤（数据没有展示）。同样肌肉注射DMBA也没能诱导出树鼩乳腺癌（数据没有展示），原因可能在于DMBA难溶于最初选择的吐温，使得注射后吸收的水平较低。因此我们选择了将DMBA溶于花生油再进行灌胃。已有实验证实树鼩肠代谢速度较快，因此我们进行了多次灌胃。另外，越来越多的证据证明，在人类女性的雌激素联合孕酮的治疗中，长期的孕酮治疗增加乳腺癌的患病风险[42]。有研究发现孕酮和它的衍生物MPA已经足以诱导乳腺癌[43]。随后MPA加速乳腺癌的发生被一系列的研究所证实。同样我们在DMBA灌胃的基础上进行了MPA的植入。DMBA诱导啮齿类会产生多种类型器官的肿瘤，而在树鼩，DMBA诱导树鼩产生的肿瘤集中在乳腺肿瘤，但大多是导管内乳头状瘤。MPA的确能够加速DMBA诱导的树鼩乳腺肿瘤的发生，并提高肿瘤发病率。虽说诱发树鼩肿瘤和自发的类型有相似之处，但与人高比例导管癌的情况有一定差异。在临床上70%～80%的人乳腺癌都是ER阳性同时至少50%都对激素治疗有反应[44]，自发树鼩乳腺肿瘤并没有达到这么高的比例，不过DMBA+MPA诱导的都是ER阳性的肿瘤，而在小鼠模型中大多数乳腺肿瘤都是ER阴性或不依赖于激素的[45]。

有不少研究资料表明基因的自然突变或许是癌症发生的起源，不同的基因在癌症进程中起着不同的作用。*PTEN*是著名的肿瘤抑制基因，在乳腺癌中频繁发生突变[33]，pTEN/PIK3CA信号通路在树鼩中是首次研究。*PTEN*和*PIK3CA*的序列在人类和树鼩都是高度保守的。在树鼩肿瘤中*PTEN*

第31位的A突变为T以及56～70片段的丢失，在人类乳腺癌中还没有报道过。从这些结果来看，我们也发现树鼩*PTEN*的突变都集中在N末端，因为*PTEN*的功能区大多集中在这一部分[46]。pTEN抑制PIK3CA编码的磷脂酰肌醇–3–激酶依赖的信号，*PIK3CA*在人类乳腺癌中也在一些位点发生突变，从而激活了下游的信号，进而引发细胞增殖产生肿瘤。树鼩乳腺肿瘤中，*PIK3CA*第3140位碱基A突变为T（相应的1047位氨基酸由组氨酸变为亮氨酸）在*PIK3CA*突变中占主导。值得注意的是，发生*PIK3CA*基因突变的3只树鼩中有两只（即第11号和12号树鼩）都属于DMBA+MPA诱导组（这一组的7号树鼩肿瘤因样品量的问题没有进行测序），那么，我们推测MPA或许通过促进树鼩*PIK3CA* 3140 A＞T突变而促进乳腺肿瘤的发生。

DMBA诱导的树鼩乳腺癌模型与人类乳腺癌在形态学方面比较相似，肿瘤生长跨度大，瘤细胞增殖比率低，产生的肿瘤类型多样，更适合于人肿瘤不同发展阶段的研究。不过另一方面DMBA在树鼩中诱癌耗时太长，成功率较低，加之不同背景个体对肿瘤潜伏期及类型的影响，使其很难得到病程或癌块大小相对一致的动物模型供研究和实验治疗，这一模型不利于药物筛选等研究。因此，该模型更适用于乳腺癌的病因学及预防等相关研究。

结论：采用DMBA灌胃的方法成功建立了树鼩的乳腺肿瘤模型，MPA与DMBA联合使用可以促进树鼩乳腺肿瘤的发生。所诱导的导管内乳头状瘤和浸润性导管癌均为人类共有的肿瘤类型，这些诱发肿瘤和树鼩自发肿瘤在病理和遗传方面比较一致。*PTEN/PIK3CA*基因频繁突变可能是导致树鼩乳腺肿瘤发生的遗传基础。但是该模型存在潜伏期长、诱导效率低等缺陷，需要探索更加高效的乳腺癌树鼩模型创建方法。

## 第三节 PyMT慢病毒诱导创建树鼩乳腺癌模型

### 一、研究背景

当前基于胚胎干细胞的树鼩转基因技术还不成熟，而慢病毒载体作为一种特殊的逆转录病毒载体，具有可感染各种哺乳动物分裂细胞及非分裂细胞、转移基因片段容量较大、目的基因表达时间长、不易诱发宿主免疫反应等优点，因此也可以特异有效地将癌基因在树鼩乳腺上皮细胞过度表达，从而诱发树鼩乳腺癌。Baylor医学院李毅实验室建立了一套慢病毒介导癌基因在小鼠乳腺导管内上皮细胞过表达的方法，乳腺癌发生效率高，潜伏时间短[47]。几种在转基因小鼠乳腺癌模型中常用的癌基因，包括Wnt1、Neu/HER–2和多瘤中间T抗原（polyoma middle-T antigen, PyMT），成为我们在树鼩乳腺癌模型中的首选。MMTV-PyMT转基因小鼠是一种常用的乳腺癌模型。PyMT是由小DNA多瘤病毒编码的黏附在内膜上的蛋白。人乳腺肿瘤中并不表达PyMT基因，但是其编码蛋白能够结合并调控多条在人乳腺癌中畸变的信号转导途径，包括Src、Ras和PI3K/Akt激酶途径等[48]。MMTV-PyMT转基因小鼠在4周即能观察到乳腺增生，在14周左右大部分小鼠发展为肿瘤并伴随着肺转移[49]。MMTV-PyMT转基因小鼠乳腺肿瘤在恶化过程中逐渐降低ER、PR表达并提高ErbB2/Neu表达，在人乳腺癌中该变化预示着较差的预后[50]。创建树鼩乳腺癌模型的另一条思路便是以慢病毒作为癌基因PyMT的载体，通过乳腺导管注射技术把病毒液注射到树鼩乳腺导管，病毒感染乳腺导管部分腔上皮细胞，被感染细胞过表达PyMT，从而诱发乳腺癌，在此基础

上我们还可以进一步构建更多在人乳腺癌发生过程中起到关键作用的基因进行树鼩模型建立，从而建立起更接近于人乳腺癌的树鼩模型。

## 二、慢病毒诱导树鼩乳腺肿瘤过程

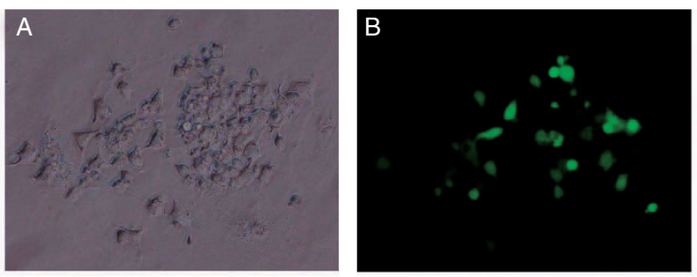



**图24–7　慢病毒感染树鼩原代乳腺上皮细胞**

（A）慢病毒感染后细胞形态；（B）慢病毒感染后绿色荧光的表达。

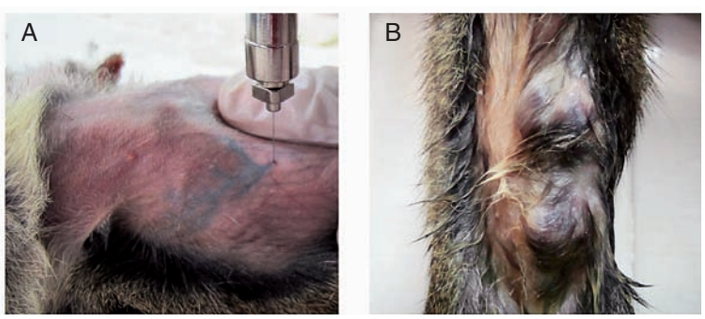



**图24–8　PyMT慢病毒诱发树鼩肿瘤**

（A）树鼩乳头注射慢病毒；（B）树鼩PyMT诱发肿瘤。

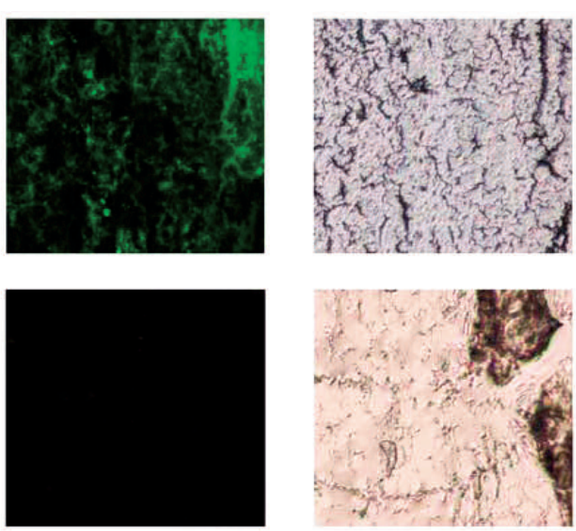


**图24–9　冰冻切片检测PyMT诱发树鼩乳腺肿瘤荧光**

（左图蓝光；右图白光）

首先将过表达PyMT的慢病毒载体进行病毒包装，收集病毒液后进行浓缩。PyMT慢病毒通过泛素C启动子驱动表达，并同时携带EGFP标记。与常规的假慢病毒类似，PyMT慢病毒具有广泛的易感性，能够感染树鼩的原代细胞，并发出绿色荧光（图24–7）。

由于该慢病毒启动子并没有组织特异性，因此我们将病毒液通过乳头直接注入树鼩乳腺导管内（图24–8A），以确保慢病毒特异的感染导管内上皮细胞。病毒滴度经由流式细胞仪进行测定，经测定PyMT慢病毒的滴度为$1.8\times10^{6}$/mL，而空载FUCGW的滴度约为PyMT的10倍，为$2.2\times10^{7}$/mL。注射时的病毒滴度控制在$1\times10^{6}$/mL，每只树鼩每个乳头注射10 μL。选取10只树鼩进行实验，每只第2、3对乳头分别注射FUCGW空载或PyMT慢病毒进行比较。PyMT注射乳腺在24周以内10只树鼩全都生长出肿瘤，潜伏期为病毒注射后3周左右。第1例乳腺肿瘤在注射后的第3周发现，乳腺肿瘤的潜伏期平均为（29 ± 8）天。空载注射处乳腺均未长肿瘤。部分乳腺肿瘤皮肤溃烂，瘤体发生感染，有的整个瘤体感染化脓。树鼩肿瘤图片（图24–8B）。不过肿瘤的体积非常不规范，因此测量的结果并不能反映正确的肿瘤生长。

这一方法诱导的树鼩乳腺肿

瘤质地坚硬，大部分为实性，少部分为囊实性相间，包膜多不完整，表面很不规整，肿瘤活动性差，有的与皮肤粘连破溃，坏死处呈紫黑色。肿瘤解剖时组织有砂粒感，切面为黄白色，少数部分肿瘤切开可见黄绿色黏液样液流出。部分肿瘤发现与腹部肌肉组织粘连。将肿瘤组织取材后直接通过冰冻切片在荧光显微镜下可以观察到绿色荧光，表明肿瘤确实是因为慢病毒的感染而诱发出的（图24–9）。

## 三、慢病毒诱导乳腺肿瘤病理检测

PyMT诱导的乳腺肿瘤经HE染色后通过形态学鉴定，均为乳头状癌，诱发的肿瘤类型比较单一，与人的乳腺肿瘤发病类型差异较大，但与小鼠中的结论比较一致。除乳头状癌以外，没有诱导出其它类型的乳腺肿瘤。乳头状癌镜下观察可见其结构与自发性乳头状癌比较一致，癌组织扩张到导管或囊内并呈乳头状生长，细胞密集，排列紊乱。胞核大小不一，深染，核分裂易见，并见癌细胞侵及管壁、囊壁或周围组织，因此为浸润性乳头状癌（图24–10）。值得注意的是不同树鼩之间癌的恶性程度略有差异，最恶性的PyMT #6树鼩在颌下淋巴结和肺部有癌组织转移。肺部及淋巴结是PyMT所构建小鼠转基因模型中最常见的转移部位，该结论同样在树鼩中得到了验证。从HE图24–10中可见淋巴结及肺部的肿瘤微观结构与原位比较相似，并与周边正常组织相区别。

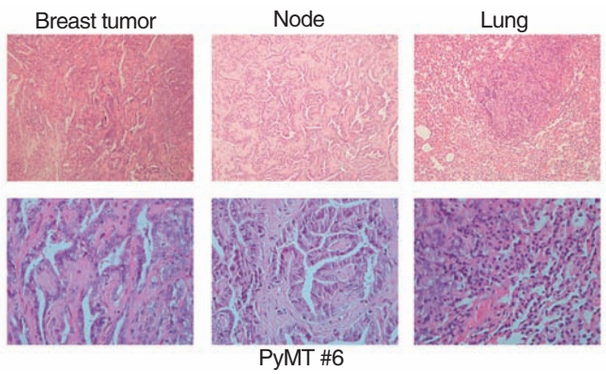



**图24–10　PyMT慢病毒诱发树鼩乳头状癌原位及转移肿瘤HE图**
原位乳腺肿瘤为浸润性乳头状癌，在发展过程中，肿瘤转移并侵袭到颌下淋巴结和肺组织。上图为10倍放大，下图为40倍放大。

在临床研究中，针对乳腺癌分子标志物的评估可以为乳腺癌的治疗和预后提供重要的指导。现有的性激素受体，包括ER和PR，以及HER2是最常见的乳腺癌的分子标志物。PyMT慢病毒诱导乳腺肿瘤的IHC结果（表24–4）。

表24–4　PyMT慢病毒诱导乳腺肿瘤的IHC结果

| PyMT 编号 | 肿瘤类型 | ER | PR | Ki67 | HER–2 | 亚型 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| #1 | Papillary carcinoma | – | + | + | – | Luminal B |
| #2 | Papillary carcinoma | – | + | + | – | Luminal B |
| #3 | Papillary carcinoma | – | + | – | – | Luminal A |
| #4 | Papillary carcinoma | – | + | + | – | Luminal B |
| #5 | Papillary carcinoma | – | + | + | – | Luminal B |
| #6 | Papillary carcinoma with lung metastasis | + | – | – | – | Luminal A |
| #7 | Papillary carcinoma | + | + | + | – | Luminal B |
| #8 | Papillary carcinoma | + | – | – | – | Luminal A |
| #9 | Papillary carcinoma | + | + | + | – | Luminal B |
| #10 | Papillary carcinoma | + | + | + | – | Luminal B |

在树鼩的PyMT病毒诱导的所有样本中都检测不到HER–2的表达，但都不同程度地表达性激素受体。Lin等[50]指出MMTV-PyMT转基因小鼠诱发的肿瘤在不同的发展阶段中呈现ER表达的变化，在最恶性阶段ER的表达水平往往较弱或阴性。树鼩PyMT病毒诱导的仅有50%为ER阴性，这可能与肿瘤所处的恶性程度差异有关。树鼩中PyMT病毒诱导的PR阳性肿瘤比例高达80%，远高于人乳腺癌PR阳性肿瘤的平均水平（55%～65%），这与自发高表达PR的结果比较一致。尽管树鼩遗传背景存在差异，但诱导的肿瘤都与内分泌存在联系。根据ER与PR的组合还可以进一步将这10份肿瘤分成ER单阳、PR单阳、ER/PR双阳和ER/PR双阴在人乳腺癌中，性激素受体阴性的肿瘤往往显示出更高的恶性程度和复发比例[51]。肿瘤类型为Luminal A或B型，没有三阴性乳腺癌。大多Ki67高表达，肿瘤生长活跃。代表性免疫组化（IHC）结果（图24–11）。

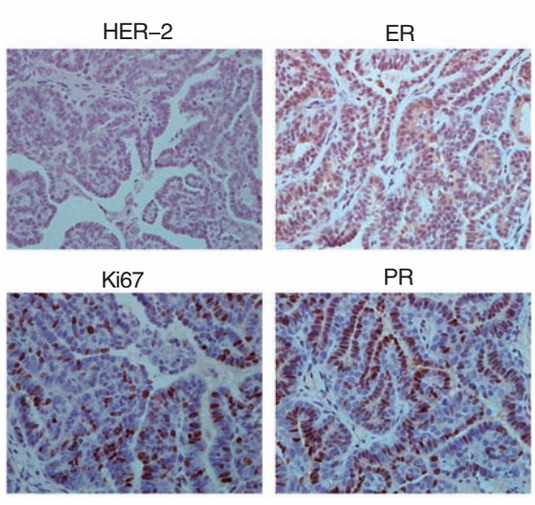



**图24–11　PyMT慢病毒诱发树鼩乳头状癌IHC代表图**

## 四、讨　论

转基因模型是研究乳腺癌不可或缺的模型之一。转基因模型能够揭示更多已知或潜在基因在乳腺癌发生发展过程中的作用，这包括检验抑癌基因丢失的效应（包括*Trp53*、*Brca1*和*Pten*）以及癌基因的获得性功能（包括*Erbb2*、*Myc*、*Ccnd1*和PyMT）[52]。随着转基因模型的广泛运用，不足之处也逐渐暴露出来，相比较于人乳腺癌大多转基因小鼠的肿瘤并不是主流的人乳腺癌类型，多数肿瘤转移到肺部，并且肿瘤不表达ER[53]，因此我们寻求建立可替代小鼠的模型。常用的癌基因PyMT是一种与c-Src结合的膜结合病毒蛋白，调控多条信号通路包括Shc和PI3K信号途径[54]。MMTV-PyMT转基因小鼠在出生后5～25周左右即可观察到乳腺肿瘤产生，不同的品系潜伏期不同[55，56]。不过树鼩还没有成熟的转基因模型出现，也因此无法建立PyMT转基因树鼩来获得乳腺癌模型。除此之外，PyMT还可以通过直接多瘤病毒（Py virus）感染或慢病毒表达的方式进行模型创建。直接的Py病毒感染安全风险较大，并且作用的机理更为复杂，因此慢病毒过表达成为唯一的选择。利用RCAS-TVA系统在特定小鼠品系乳头导管注射微量RCAS-PyMT慢病毒，肿瘤的潜伏期平均仅有12.5天，肿瘤产生率达到100%，这表明PyMT具有很强的致癌能力，单独少量的PyMT表达足以转化正常乳腺上皮细胞产生肿瘤[57]。我们采用了相同的注射方法并使用了更低的病毒滴度，同样高效快速的诱发出树鼩乳腺肿瘤，然而相同剂量的Wnt-1和Neu慢病毒未能得到肿瘤（数据没有展示），表明了不同癌基因差异巨大。PyMT慢病毒直接注射乳腺导管产生的肿瘤都是浸润性乳头状癌，一致性非常高，但在发展阶段上各树鼩之间也存在一些差距。#6树鼩肿瘤在原发的基础上转移到了颌下淋巴结以及肺部，与小鼠的情况非常一致。尽管小鼠实验中并没有指明PyMT诱发肿瘤的类型，但无论MMTV-PyMT小鼠自发肿瘤[50]或是我们自己注射乳腺导管诱发的肿瘤，在发展过程中都是乳头状癌。乳头状癌是乳腺浸润性特殊型癌之一，起源于乳晕区大导管、壶腹部及乳头管的上皮细胞。在自发树鼩肿瘤中，我们也收集到乳头状癌的样本，与诱发的在结

构上没有大的差异。乳头状癌产生的因素很多，树鼩与小鼠相似的乳腺导管平面层级结构使得病毒液更容易集中在树鼩初级大导管中，可能是促发乳头状癌的原因。另外外源的PyMT也可能是导致乳头状癌的诱因，在MMTV-PyMT小鼠中乳腺肿瘤发生过程中，增生最早发生在乳头处的大导管内，随着时间逐渐生长恶化[50，55，58]。在诱发肿瘤的类型上，PyMT诱导基本不受树鼩遗传背景的影响，可以应用于该类肿瘤的研究。

不过PyMT慢病毒诱发肿瘤的表型在不同树鼩之间的差异比较大，但未发现ER、PR和HER2三阴性的样本。在小鼠模型中慢病毒过表达PyMT产生的肿瘤同样是ER阴性的，但在树鼩中有50%是阳性的，与人乳腺癌的结果比较接近。在MMTV-PyMT小鼠肿瘤发展的过程中，ER的表达是随着肿瘤的进展逐渐降低的，到肿瘤晚期ER、PR低表达[50]。由于PyMT诱发的肿瘤生长速度在不同背景树鼩中并不完全一致，肿瘤生长不同阶段的形态学和分子标志物的变化还需要进一步研究。

PyMT诱导模型具有病毒滴度要求较低（$10^6$ TU/mL），诱发肿瘤潜伏期短（注射后3～4周时间），肿瘤生长快和诱发效率高（100%），肌肉部位和肺部转移等优点，非常适合药物检测研究。而以病毒感染为手段的方式，可以通过控制病毒感染剂量，使组织中仅有少量细胞被感染，细胞逐渐发生癌变诱发肿瘤，从而更加真实地模拟了体内肿瘤的发生过程。与传统转基因动物相比，诱导方式更加科学，肿瘤发生时动物体内环境更加真实。不过该模型也存在以下不足：①PyMT是由小DNA多瘤病毒编码的基因，人乳腺肿瘤中并不表达PyMT癌基因；②肿瘤类型都是乳头状癌，而在人乳腺癌中主要是导管癌，这很可能与实验动物、癌基因以及诱导手段有关。从长远看，我们希望能够建立人自身导致乳腺肿瘤的癌基因所诱发的树鼩乳腺肿瘤模型，创建新型的与人乳腺癌发病机理和病理一致的树鼩模型，从而为解析乳腺癌发生机制以及评价抗乳腺癌药物奠定基础。

## 参考文献

[1]American Cancer Society. Cancer Facts & Figures 2013. Atlanta: American Cancer Society, 2013.

[2]Allred DC, Medina D. The relevance of mouse models to understanding the development and progression of human breast cancer. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2008, 13(3): 279-88.

[3]Pinho SS, Carvalho S, Cabral J, et al. Canine tumors: a spontaneous animal model of human carcinogenesis. Transl Res, 2012, 159(3): 165-72.

[4]Matos AJ, Baptista CS, Gärtner MF, et al. Prognostic studies of canine and feline mammary tumours: the need for standardized procedures. Vet J, 2012, 193(1): 24-31.

[5]Everett R. Factors affecting spontaneous tumor incidence rates in mice: a literature review. Crit Rev Toxicol, 1984, 13(3): 235-51.

[6]Xia HJ, Wang CY, Zhang HL, et al. Characterization of spontaneous breast tumor in tree shrews (*Tupaia belangeri chinensis*). Zool Res, 2012, 33(1): 55-9.

[7]Xia HJ, Chen CS. Progress of non-human primate animal models of cancers. Zool Res, 2011, 32(1): 70-80.

[8]Wurz GT, Marchisano-Karpman C, DeGregorio MW. Ineffectiveness of American ginseng in the prevention of dimethylbenzanthracene-induced mammary tumors in mice. Oncol Res, 2006, 16(6): 251-60.

[9]Fantozzi A, Christofori G. Mouse models of breast cancer metastasis. Breast Cancer Res, 2006, 8(4): 212.

[10]Holliday R. Neoplastic transformation: the contrasting stability of human and mouse cells. Cancer Surv, 1996, 28: 103-15.

[11]Greenberg RA, Allsopp RC, Chin L, et al. Expression of mouse telomerase reverse transcriptase during development, differentiation and proliferation. Oncogene, 1998, 16(13): 1723-30.

[12]Nandi S, Guzman RC, Yang J. Hormones and mammary carcinogenesis in mice, rats, and humans: a unifying hypothesis. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92(9): 3650-7.

[13]Cardiff RD. Validity of mouse mammary tumour models for human breast cancer: comparative pathology. Microsc Res Tech, 2001, 52(2): 224-30.

[14]Wiseman BS, Werb Z. Stromal effects on mammary gland development and breast cancer. Science, 2002, 296(5570): 1046-9.

[15]Cichon MA, Degnim AC, Visscher DW, et al. Microenvironmental influences that drive progression from benign breast disease to invasive breast cancer. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2010, 15(4): 389-97.

[16]Kim IS, Baek SH. Mouse models for breast cancer metastasis. Biochem Biophys Res Commun, 2010, 394(3): 443-7.

[17]Cheung A, Young L, Chen P, et al. Microcirculation and metastasis in a new mouse mammary tumor model system. Int J Oncol, 1997, 11(1): 69-77.

[18]Janecka JE, Miller W, Pringle TH, et al. Molecular and genomic data identify the closest living relative of primates. Science, 2007, 318(5851): 792-4.

[19]Fan Y, Huang ZY, Cao CC, et al. Genome of the Chinese tree shrew. Nat commun, 2013, 4: 1426.

[20]Elliot OS, Elliot MW, Lisco H. Breast cancer in a tree shrew (*Tupaia glis*). Nature, 1966, 211(2053): 1105.

[21]Hilakivi-Clarke L. Estrogens, BRCA1, and breast cancer. Cancer Res, 2000, 60(18): 4993-5001.

[22]Hunter DJ, Spiegelman D, Adami HO, et al. Non-dietary factors as risk factors for breast cancer, and as effect modifiers of the association of fat intake and risk of breast cancer. Cancer Causes Control, 1997, 8(1): 49-56.

[23]Hulka BS, Stark AT. Breast cancer: cause and prevention. Lancet, 1995, 346(8979): 883-7.

[24]Aiello EJ, Buist DS, White E. Do breast cancer risk factors modify the association between hormone therapy and mammographic breast density? (United States). Cancer Causes Control, 2006, 17(10): 1227-35.

[25]Söderqvist G, Isaksson E, Von Schoultz B, et al. Proliferation of breast epithelial cells in healthy women during the menstrual cycle. Am J Obstet Gynecol, 1997, 176: 123-8.

[26]Harvell DM, Strecker TE, Tochacek M, et al. Rat strain-specific actions of 17 beta-estradiol in the mammary gland: correlation between estrogen-induced lobuloalveolar hyperplasia and susceptibility to estrogen-induced mammary cancers. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97(6): 2779-84.

[27]Li JJ, Weroha SJ, Lingle WL, et al. Estrogen mediates Aurora-A overexpression, centrosome amplification, chromosomal instability, and breast cancer in female ACI rats. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101(52): 18123-8.

[28]Ross RK, Paganini-Hill A, Wan PC, et al. Effect of hormone replacement therapy on breast cancer risk: estrogen versus estrogen plus progestin. J Natl Cancer Inst, 2000, 92(4): 328-32.

[29]Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, et al. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. JAMA, 2002, 288(3): 321-33.

[30]Gallo D, Ferrandina G, Giacomelli S, et al. Dietary soy modulation of biochemical parameters in DMBA-induced mammary tumors. Cancer Lett, 2002, 186(1): 43-8.

[31]Benakanakere I, Besch-Williford C, Schnell J, et al. Natural and synthetic progestins accelerate 7, 12-dimethylbenz (a) anthracene-initiated mammary tumors and increase angiogenesis in Sprague-Dawley rats. Clin Cancer Res, 2006, 12(13): 4062-71.

[32]Aldaz CM, Liao QY, LaBate M, et al. Medroxyprogesterone acetate accelerates the development and increases the incidence of mouse mammary tumors induced by dimethylbenzanthracene. Carcinogenesis, 1996, 17(9): 2069-72.

[33]Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. Nature, 2012, 490(7418): 61-70.

[34]Larson Gedman A, Chen Q, Kugel Desmoulin S, et al. The impact of NOTCH1, FBW7 and PTEN mutations on prognosis and downstream signaling in pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia: a report from the Children's Oncology Group. Leukemia, 2009, 23(8): 1417-25.

[35]Kalinsky K, Jacks LM, Heguy A, et al. PIK3CA mutation associates with improved outcome in breast cancer. Clin Cancer Res, 2009, 15(16): 5049-59.

[36]Yan H, Zhong G, Xu G, et al. Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus. Elife, 2012, 1: e00049.

[37]Fuchs E. Social stress in tree shrews as an animal model of depression: an example of a behavioral model of a CNS disorder. CNS Spectr, 2005, 10(3): 182-90.

[38]Norton TT, Amedo AO, Siegwart JT, Jr. Darkness causes myopia in visually experienced tree shrews. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2006, 47(11): 4700-7.

[39]Reddy JK, Svoboda DJ, Rao MS. Induction of liver tumors by aflatoxin B1 in the tree shrew (*Tupaia glis*), a nonhuman primate. Cancer Res, 1976, 36(1): 151-60.

[40]Park US, Su JJ, Ban KC, et al. Mutations in the p53 tumor suppressor gene in tree shrew hepatocellular carcinoma associated with hepatitis B virus infection and intake of aflatoxin B1. Gene, 2000, 251(1): 73-80.

[41]Rao MS, Reddy JK. Carcinogenicity of 2, 2′-dihydroxy-di-n-propylnitrosamine in the tree shrew (*Tupaia glis*): light and electron microscopic features of pulmonary adenomas. J Natl Cancer Inst, 1980, 65(4): 835-40.

[42]Beral V. Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study. Lancet, 2003, 362(9382): 419-27.

[43]Blank EW, Wong PY, Lakshmanaswamy R, et al. Both ovarian hormones estrogen and progesterone are necessary for hormonal mammary carcinogenesis in ovariectomized ACI rats. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105(9): 3527-32.

[44]Glass AG, Lacey JV, Jr., Carreon JD, et al. Breast cancer incidence, 1980-2006: combined roles of menopausal hormone therapy, screening mammography, and estrogen receptor status. J Natl Cancer Inst, 2007, 99(15): 1152-61.

[45]Medina D. Premalignant and malignant mammary lesions induced by MMTV and chemical carcinogens. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2008, 13(3): 271-7.

[46]Rodriguez-Escudero I, Oliver MD, Andres-Pons A, et al. A comprehensive functional analysis of PTEN mutations: implications in tumor- and autism-related syndromes. Hum Mol Genet, 2011, 20(21): 4132-42.

[47]Bu W, Xin L, Toneff M, et al. Lentivirus vectors for stably introducing genes into mammary epithelial cells in vivo. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2009, 14(4): 401-4.

[48]Dankort DL, Muller WJ. Signal transduction in mammary tumorigenesis: a transgenic perspective. Oncogene, 2000, 19(8): 1038-44.

[49]Lin EY, Nguyen AV, Russell RG, et al. Colony-stimulating factor 1 promotes progression of mammary tumors to malignancy. J Exp Med, 2001, 193(6): 727-40.

[50]Lin EY, Jones JG, Li P, et al. Progression to malignancy in the polyoma middle T oncoprotein mouse breast cancer model provides a reliable model for human diseases. Am J Pathol, 2003, 163(5): 2113-26.

[51]Pichon MF, Broet P, Magdelenat H, et al. Prognostic value of steroid receptors after long-term follow-up of 2257 operable breast cancers. Br J Cancer, 1996, 73(12): 1545-51.

[52]Vargo-Gogola T, Rosen JM. Modelling breast cancer: one size does not fit all. Nat Rev Cancer, 2007, 7(9): 659-72.

[53]Herschkowitz JI, Simin K, Weigman VJ, et al. Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. Genome Biol, 2007, 8(5): R76.

[54]Ichaso N, Dilworth SM. Cell transformation by the middle T-antigen of polyoma virus. Oncogene, 2001, 20(54): 7908-16.

[55]Guy CT, Cardiff RD, Muller WJ. Induction of mammary tumors by expression of polyomavirus middle T oncogene: a transgenic mouse model for metastatic disease. Mol Cell Biol, 1992, 12(3): 954-61.

[56]Williams TM, Cheung MW, Park DS, et al. Loss of caveolin-1 gene expression accelerates the development of dysplastic mammary lesions in tumor-prone transgenic mice. Mol Biol Cell, 2003, 14(3): 1027-42.

[57]Du Z, Podsypanina K, Huang S, et al. Introduction of oncogenes into mammary glands in vivo with an avian retroviral vector initiates and promotes carcinogenesis in mouse models. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, 103(46): 17396-401.

[58]Maglione JE, Moghanaki D, Young LJ, et al. Transgenic Polyoma middle-T mice model premalignant mammary disease. Cancer Res, 2001, 61(22): 8298-305.



# 第二十五章

第二篇 疾病树鼩模型
TREE SHREW ANIMAL MODELS

Tree shrews

# 树鼩胶质母细胞瘤模型

童耀辉 周 霞 赵旭东

## 第一节 胶质母细胞瘤概述

### 一、胶质母细胞瘤简介

胶质瘤是最常见的脑肿瘤，占颅内原发肿瘤的35%～60%，其中50%为胶质母细胞瘤。根据组织学特性，脑胶质瘤主要分为星形胶质瘤、少突神经胶质瘤、室管膜瘤以及混合性胶质瘤等。根据世界卫生组织（WHO）的分类系统，按照恶性程度，脑胶质瘤可分为Ⅰ～Ⅳ 4个等级。Ⅰ和Ⅱ级胶质瘤恶性程度较低，如星形胶质瘤；Ⅲ和Ⅳ级胶质瘤恶性程度很高，如多型性神经胶母细胞瘤（glioblastoma multiform, GBM）是威胁人类生命健康最严重的恶性肿瘤之一，在老年个体发病率比较高，儿童发病率比较低，并且男性发病率比女性高，平均存活时间在15个月左右。根据临床病史，胶质母细胞瘤分为原发性胶质母细胞瘤（primary glioblastoma）和继发性胶质母细胞瘤（secondary glioblastoma），原发性胶质母细胞瘤占全部胶质母细胞瘤的90%左右，以老年患者为主（一般＞45岁），它没有低级胶质瘤转变的过程；继发性胶质母细胞瘤则以年轻患者为主（一般＜45岁），这其中的原因还不清楚[1]。原发性胶质母细胞瘤和继发性胶质母细胞瘤在临床、遗传学和生物学方面都具有极

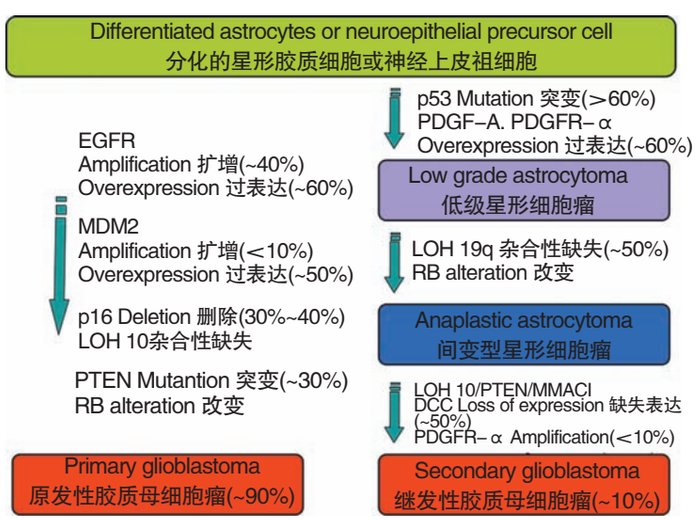



**图25–1 原发性胶质母细胞瘤和继发性胶质母细胞瘤主要遗传进化途径**
（引自文献1和2）

高的相似性，所以将两者完全区分开来并不容易，近几年科学家们通过比较两者基因组图谱发现两者的遗传途径和基因变异有着显著差异（图25–1）。

胶质母细胞瘤干细胞是最早分离和研究的实体瘤干细胞之一，利用表面分子标记$CD133^+$能将一些能自我更新的细胞从胶质母细胞瘤细胞中分离出来已经得到多方面证实，另外还有部分科学家利用化学药物抗性或辐射抗性来分离肿瘤干细胞，如人类胶质母瘤细胞中具有卡莫司汀［1, 3-bis-(2-chloroethyl)-1-nitrosourea, carmustine, BCNU］抗性的一小部分细胞具有类似干细胞特性，将这些细胞移植到免疫缺陷型小鼠大脑能够形成肿瘤，并检测到这些细胞表面表达CD133、CD117、CD90、CD71和CD45表面分子标记[3]；具有辐射抗性的胶质母细胞瘤的细胞表面表达大量的CD133、CD117、CD71和CD45表面分子标记，这些细胞具有异常增殖、自我更新和多潜能性，移植到免疫缺陷型小鼠大脑同样能形成肿瘤[4]。然而目前还不能确定在胶质母细胞瘤中$CD133^+$是唯一肿瘤干细胞表面分子标记，比如据相关研究显示，在部分原发胶质母细胞瘤中用$CD133^-$分选出来的细胞同$CD133^+$分选出来的细胞一样具有形成肿瘤的能力[5]。

## 二、人类胶质母细胞瘤的遗传学变异

在人类胶质母细胞瘤中发现许多畸形染色体和基因突变现象。在胶质母细胞瘤中染色体1、6、9、10、13、17、22和Y都发现有部分缺失现象，7、12、19号染色体发现有扩增[6]。

癌症基因组学的诞生揭开了全面解析肿瘤细胞基因组及其表达的序幕。美国国立卫生研究院（NIH）支持的The Cancer Genome Atlas（TCGA）项目已完成胶质母细胞瘤、肺癌、卵巢癌症基因组的缺失、重复和序列变异，以及基因表达水平的改变等全面分析。结果表明，胶质母细胞瘤中RTK/Ras/PI3K、p53和Rb三个信号通路是胶质母细胞瘤的核心信号通路。在RTK/Ras/PI3K信号通路中，Ras处于核心位置可介导该通路中绝大部分基因功能。在p53和Rb通路中突变最高率的基因是*TP53*和*CDKN2A*基因，二者突变极少出现在同一肿瘤样品中[7]，但p53和Rb信号通路可通过多个节点（包括蛋白分子、miRNA、lncRNAs等）相互调节[8～10]。另外，癌症基因组学还在胶质母细胞瘤中发现了一些新的基因突变，如*IDH1*、*NF1*、leucine-zipper-like transcriptional regulator 1（*LZTR1*）基因等。

## 三、人类胶质母细胞瘤组织病理学特征

胶质母细胞瘤主要由分化差的恶性星形胶质细胞构成。组织学特点主要包括以下四个方面：

### （一）细胞异常增殖并且包含许多种类细胞

与其它恶性肿瘤相似，胶质母细胞瘤细胞具有很强的增生能力，细胞密度明显增加，这种异常增生能力可能的分子机制包括缺失多个细胞周期抑制因子和高表达一些生长因子受体（如EGFR和PDGFR）[11]。在组织病理学上，这些异常增殖细胞中以小而深染的圆细胞为主，伴以间变的未分化的纤维性、原浆性与肥胖性星形细胞，表现出核型异常，多形性，甚至能够观察到多核的巨细胞。

### （二）细胞坏死

细胞坏死是胶质母细胞瘤中自发细胞死亡的最显著形式，细胞坏死区域往往被一层假栅栏细胞（称为“pseudopalisades”）包围。血液和氧气的供应不足及微血栓的形成是细胞坏死

的主要原因，目前细胞坏死表型的分子基础（特别是它在抗凋亡环境下）主要集中在Bcl2样12（Bcl2L12）蛋白[1]。Bcl2L12蛋白属于Bcl-2家族蛋白，Bcl2L12蛋白能直接中和caspase-7和间接中和caspase-3，从而抑制线粒体凋亡信号的转导，同时激活了细胞坏死过程，在原发性胶质母细胞瘤中明显地过表达[12]。

### （三）血管增生

胶质母细胞瘤内血管丰富，微血管的增生是原发性胶质母细胞瘤和继发性胶质母细胞瘤重要的组织病理学特征，低级星形胶质细胞瘤向胶质母细胞瘤转变过程中伴随肿瘤血管明显增生。一些关键基因的突变可能与血管形成有很大的关系，有研究显示与胶质母细胞瘤形成相关的基因突变，包括*PTEN*、*EGFR*、*C-MYC*等，可能扮演着“血管形成开关”作用于下游靶位点，从而影响血管形成[13]。

### （四）细胞侵袭

胶质母细胞瘤具有很强的侵袭正常脑组织的能力，导致临床手术很难将其完全移除，大大降低治疗的成功率。通常胶质母细胞瘤都有一个中央坏死灶，周围是高致密的肿瘤细胞区，这些肿瘤具有明显的边界，但组织病理学上却发现有局部细胞好像“冲破”边界，侵袭到正常细胞区。侵袭通常是沿着血管或有髓神经纤维路径侵袭，特别是后者。胶质母细胞瘤的侵袭是一个复杂的调控过程，需要同细胞外质基质（extracellular matrixc, ECM）和相邻正常脑组织相互作用，比如可能通过改变细胞外质基质成分来促进肿瘤细胞侵袭[14，15]。另外，有研究发现一些生长因子及受体也能促进细胞侵袭，如c-Met、EGFR和PDGFR[16]。

## 四、胶质母细胞瘤治疗及前景

目前手术切除并辅助以放疗和化疗仍然是治疗胶质母细胞瘤的主要方法，手术治疗无法做到完全切除肿瘤，目前基本上是在不对大脑功能造成重大影响的前提下尽量切除肿瘤。目前标准化疗药物主要是替莫唑胺（temozolomide, TMZ），替莫唑胺作为第二代烷化剂化疗药物，经FDA（Food and Drug Administration，美国食品和药物管理局，简称“FDA”）批准可以将其用于治疗初发脑胶质母细胞瘤病人，相关研究显示放疗并辅以替莫唑胺，在临床上能够显著延长胶质母细胞瘤患者的生存期[17]。

随着科学的发展，关于胶质母细胞瘤治疗研究越来越多，也取得了一定进展，比如胶质母细胞瘤异质性基因和与细胞生长和存活相关信号通路中的一些异常基因不断被发现，一些靶向针对这些信号通路上的靶分子治疗也在不断尝试，例如，EGFR靶基因治疗，其中EGFR激酶抑制剂吉非替尼（gefitinib）和埃罗替尼（erlotinib）在治疗恶性胶质瘤临床试验中显示出明显的效果[18，19]。另外，通过研究抗血管生成在治疗胶质母细胞瘤也取得了很大进展，如一种抗VEGF（vascular endothelial growth factor，血管内皮生长因子）人源单克隆抗体——贝伐单抗（bevacizumab）经FDA批准可以将其用于治疗不断恶化的胶质母细胞瘤患者，它与伊立替康（irinotecan，CPT-11）联合治疗复发的恶性胶质瘤具有很好的临床效果。

另外胶质母细胞瘤干细胞的发现为治疗胶质母细胞瘤提供了新思路，胶质母细胞瘤中这些干细胞样细胞在形成肿瘤中发挥着重要的作用，随着针对这些干细胞样细胞的异常分子和遗传途径深入研究，针对这些细胞的靶向治疗将不断被开发。提高靶向治疗胶质母细胞瘤的效率还需要其

它策略，比如结合基因组学去筛选新的靶标分子、改进临床前药物测试模型、改善治疗药物传递系统等。

## 第二节 脑胶质瘤动物模型的研究及进展

目前动物模型已经成为研究癌症生物学的主要工具，选择合适的动物模型是研究脑胶质瘤发病机制及其治疗方法的关键，目前用于构建胶质瘤模型的主要实验动物为小鼠或大鼠，根据遗传学特征分为非确定基因改变（undefined genetic alterations）和确定基因改变（defined genetic alterations）两大类[20]。

### 一、非确定基因改变策略

非确定基因改变策略主要有诱发模型和移植模型。诱发模型目前以化学物和病毒两种诱导剂为主，早期就有科学家们利用甲基胆蒽制成丸剂植入小鼠脑内成功诱发了脑胶质瘤，随着致瘤化学物的不断发现（如烷化剂甲基亚硝基脲和乙基亚硝基脲），越来越多的化学物被用于诱发胶质瘤[21]。病毒诱发胶质瘤基于发现病毒感染与很多肿瘤的发生相关，能够诱发胶质瘤的病毒很多，如London, et al.（1978）将JCV（John Cunningham virus，它是人类多瘤病毒的一种）接种至4只成年猴子脑内，有2只成功生成胶质瘤[22]；Tabuchi, et al.（1985）将RSV（Respiratory Syncytial Virus，呼吸道融合病毒）感染的鸡胚胎成纤维细胞注射到猴子脑内，也成功生成了脑肿瘤[23]。

移植模型是将人类肿瘤组织或细胞系移植到免疫缺陷型鼠（裸鼠或SCID鼠）体内[24, 25]，根据肿瘤供体动物与受体动物之间种属的差异性可分为异种移植和同种移植模型。例如，人类胶质瘤细胞系U251皮下或颅内注射裸鼠，可模拟人类胶质瘤的典型性特征，在组织病理学和免疫组织化学方面都与人类胶质母细胞瘤极为相似，具有很强的侵袭能力、细胞坏死、血管增生、胶质纤维酸性蛋白（glial fibrillary acidic protein, GFAP）和波形蛋白表达、无活性P53的表达、caspase-3显著表达以及HIF-1α表达[26]；小鼠胶质瘤细胞系GL261颅内注射正常小鼠形成的胶质瘤同样具有与人类胶质母细胞瘤相似的组织病理学特征[27]。另外胶质瘤干细胞的发现和成功的分离为胶质瘤移植动物模型的建立提供了新思路，将从胶质瘤患者中分离得到的胶质瘤干细胞移植至裸鼠脑内能成功形成脑肿瘤。胶质瘤干细胞移植模型能够重现原胶质瘤的组织学、分子生物学等特征，能更真实地还原并反映人类胶质瘤的病理特征和分子生物学特性，该模型用于研究靶向性杀死胶质母细胞瘤干细胞的方法将为治愈胶质母细胞瘤提供可能性，是近年来兴起的一类新型胶质瘤移植模型[28]。

总体来说，诱发胶质瘤模型可在一定程度上模拟自然状态下人类脑胶质瘤的发生，但这种诱发的遗传机制并不清楚，导致其应用也存在很大的局限性。虽然移植模型具有移植瘤株易存活，易建立及保存，且保留了较好的人脑胶质瘤的组织形态学、分子生物学及细胞生物学特性等优势，但是它移植的毕竟是肿瘤细胞或组织，所以不能模拟正常细胞恶性转化为肿瘤细胞的过程，另外该模型仍然不能完全避免肿瘤与宿主的免疫反应。

## 二、确定基因改变策略

确定基因改变策略主要体现在生殖细胞修饰和体细胞基因改变两个方面[19]。目前生殖细胞修饰就是利用小鼠转基因或基因打靶来控制基因的表达或缺失，通过不同癌基因和抑癌基因的组合，可建立不同类型的小鼠脑胶质瘤模型（表25–1），特别是可以利用组织特异性表达的启动子来控制基因的表达。Cre-loxP技术的发展将转基因技术推上了新的台阶，它可以实现在特定细胞中选择性表达或缺失靶基因，例如，Kwon, et al.（2008）在GFAP-cre/Nf-1$^{f/+}$/P53$^{-/+}$小鼠基础上，条件性敲除*Pten*，可直接诱导Ⅳ级恶性胶质瘤的发生[29]；Zhu, et al.（2005）利用GFAP-cre/Nf-1$^{f/+}$/P53$^{-/+}$模型可条件性控制后天性胶质瘤的发生（早期诱导Ⅱ级胶质瘤，随后发展为Ⅲ级胶质瘤，最后发展为Ⅳ级）[30]。随后又出现了Nestin-CreER介导的特异性靶向神经干细胞的胶质瘤小鼠模型Nestin-creER/NF-1$^{f/+}$/P53$^{-/+}$/Pten$^{f/+}$，Nestin蛋白是神经干细胞的特征性分子标记，只在神经干细胞中表达，ER是雌激素受体，在他莫昔芬（tamoxifen）处理下，CreER可进入细胞核内，介导loxP位点的重组，可诱导新生小鼠及成年小鼠胶质瘤100%的发生[28，31，32]。

体细胞基因改变构建胶质瘤模型主要利用病毒感染，用于感染的病毒包括腺病毒、逆转录病毒和慢病毒，目前普遍是将病毒感染诱导小鼠体细胞基因改变与转基因小鼠相结合来构建胶质瘤模型（表25–1）。腺病毒载体具有高效传递和表达基因的能力，例如，Wei, et al.（2006）在转基因小鼠H-RasV12基础上，利用腺病毒载体表达EGFRVIII或Pten$^{flox/flox}$能够成功诱导高级胶质瘤的形成[33]。逆转录病毒载体携带的基因能稳定地整合至宿主基因组中，目前主要有MMLV（moloney murine leukemia virus）和ALV（avian leukosis virus）两个系统，其中ALV系统中RCAS载体及其受体在构建胶质瘤模型中应用更加广泛，例如，Holland, et al.（2000）利用RCAS-Kirsten Ras（KRas）和RCAS-Akt相结合来诱导小鼠胶质母细胞瘤[34]。考虑到腺病毒自身具有的非特异性致瘤和逆转录病毒宿主范围较窄，只能感染分裂细胞等缺点，慢病毒用于转基因载体显示出很大的优势，它不仅能将外源基因有效地整合到靶细胞基因组内，而且可以感染各种分裂和非分裂细胞，所以慢病毒载体是目前应用前景较好的转基因载体，例如，Niola, et al.（2013）在小鼠海马区利用慢病毒载体表达Harvey-RasV12（H-RasV12）和shP53短时间就能够形成高级胶质瘤[35]。

运用确定基因改变策略建立的胶质瘤小鼠模型，可按照人们意愿在分子水平和细胞水平对动物的遗传物质进行改变，具有分子机制明确和重复性好等优点。随着分子生物学技术的不断完善，尤其将生殖细胞修饰和体细胞基因改变两者结合，运用确定基因改变策略建立的胶质瘤模型的优势越来越明显。

**表25–1　确定基因改变策略构建的小鼠模型**

| 肿瘤类型 | 修饰策略 | 基因型 | 参考文献 |
|---|---|---|---|
| Anaplastic astrocytoma and GBM | Germ–line | Nf1$^{(+/-)}$p53$^{(+/-)}$cis–heterozygeneous | Reilly, et al.[36] |
| Anaplastic astrocytoma | Germ–line | H–RasV12 | Ding, et al.[32] |
| Grade Ⅲ or Ⅳ astrocytomas | Germ–line | Nestin–creER/NF–1$^{f/+}$/P53$^{-/+}$/Pten$^{f/+}$ | Llaguno, et al.[37] |
| Low–grade astrocytoma | Germ–line | EGRFVIII/pTen$^{-/-}$ | Li, et al.[38] |
| Oligodendroglioma | Germ–line | v–erbB/EGFRVIII | Weiss, et al.[39] |
| Oligodendroglioma | Germ–line | v–Ras/EGFRVIII | Ding, et al.[40] |
| GBM | Germ–line | GFAP–cre/Nf–1$^{f/+}$/P53$^{-/+}$mice; Pten$^{-/+}$ | Kwon, et al.[29] |
| GBM | Germ–line | GFAP–cre/Nf–1$^{f/+}$/P53$^{-/+}$ | Zhu, et al.[30] |

续表25-1

| 肿瘤类型 | 修饰策略 | 基因型 | 参考文献 |
|---|---|---|---|
| GBM | Germ-line | EGFRVIII/Ink4a /Arf$^{-/-}$/pTen$^{-/-}$ | Zhu, et al.[41] |
| GBM | Somatic (RCAS) | RCAS-KRas and RCAS-Akt | Holland, et al.[34] |
| GBM | Somatic (RCAS) | Ink4a/Arf$^{-/-}$ and RCAS-KRas | Uhrbom, et al.[42] |
| Anaplastic astrocytoma and GBM | Somatic (adenovirus) | H-RasV12 (transgenic) + EGFRVIII or Pten$^{(flox/flox)}$ | Wei, et al.[33] |
| GBM | Somatic (lentivirus) | pTomo-H-RasV12-shP53 | Niola, et al.[35] |
| Anaplastic astrocytoma and GBM | Somatic (lentivirus) | pTomo-H-RasV12 and pTomo-Akt in GFAP-Cre orGFAP-Cre; p53$^{(+/-)}$mice | Marumoto, et al.[43] |

## 第三节 树鼩胶质母细胞瘤模型的研究

人类应用小鼠模型进行肿瘤研究已有100多年历史，小鼠体形小、繁殖周期短、产仔数多、饲养容易、肿瘤生长迅速、遗传资源丰富等优点决定了小鼠模型在研究人类肿瘤时有着得天独厚的优势。不可否认，小鼠肿瘤模型的建立为肿瘤的病因学、发展过程和治疗研究提供了极大的帮助，尤其是近来分子生物学技术的提高及在小鼠肿瘤模型中的应用，为肿瘤有关基因研究提供了依据，为进一步研究肿瘤发生机制及靶向治疗提供了广阔的前景。但就目前的研究结果来看，小鼠胶质瘤模型与人类胶质瘤的发病机理始终有所差异，所以在抗肿瘤药物筛选上，虽然很多抗肿瘤药物对模式胶质瘤动物有很好的疗效，但在人体上却收效甚微[28]。导致这种发病机理的差异主要原因：一方面可能是小鼠与人的亲缘关系相差较远；另一方面因人类胶质瘤的发生和发展是由很多基因的改变引起的。理想的胶质瘤动物模型应既能重现人类胶质瘤中的遗传学改变又能表现出与人类胶质瘤相似的组织病理学特征，所以在建立动物模型时不仅要考虑其与人类的亲缘关系，选择进化上更加接近人的动物，例如树鼩和猕猴，而且要尽可能模拟人类胶质发病机理，使动物脑胶质瘤模型尽量接近人类胶质瘤发生，最终攻克胶质瘤这一顽症。

与小鼠相比较，树鼩同样具有体小、繁殖快、易捕捉和饲育等优点，除此之外树鼩还具有进化程度高，新陈代谢、解剖结构等比犬、鼠等动物更接近于人。长期以来，树鼩与灵长类的亲缘关系一直存在争论。尽管目前树鼩的具体系统发育分类地位仍有争议，但多数研究显示其与灵长类具有最接近的亲缘关系[44]。最近，中国科学院昆明动物研究所组织了中缅树鼩全基因组测定和解析工作，得到了高覆盖度的基因组序列，通过基因组分析，发现树鼩是灵长类近亲，在神经及免疫系统等方面与人类具有较为高度的同源性，在很多方面具有可用来替代猕猴等大型灵长类实验动物的遗传基础[45]。

树鼩不仅能自发形成肿瘤，如乳腺癌[46]、肝癌[47]和肺癌[48]，而且可以用于诱发各种癌症，例如，Yan, et al.（1996）组合乙肝病毒感染和黄曲霉毒素在树鼩中成功诱发肝癌[49]；Rao, et al.（1980）用致癌剂DHPN可以诱导树鼩生成肺癌[50]，树鼩用于构建人类肿瘤模型与小鼠相比

显示出明显的优势，例如小鼠诱导的乳腺癌模型一般为雌激素受体ER阴性，而60%～70%的人乳腺癌患者为ER阳性，相关研究发现在自发性树鼩乳腺肿瘤中ER同样为阳性，另外小鼠乳腺癌和人病理组织形态差异较大，而自发性树鼩乳腺肿瘤的形态和病理与人导管内乳头状肿瘤非常接近[51, 52]。目前还没有报道树鼩用于构建人类胶质瘤的模型，考虑到树鼩和人更加类似的进化地位，树鼩胶质母细胞瘤模型较小鼠模型在生理和病理方面可能更加接近人胶质母细胞瘤，应能建立更好的人类胶质母细胞瘤动物模型。

Marumoto, et al.（2009）利用慢病毒在小鼠海马或SVZ区（GFAP$^+$细胞P53基因杂合缺失）中同时过表达H-RasV12和AKT能够形成人类胶质母细胞瘤类似的疾病[43]；Niola, et al.（2013）在小鼠海马区利用慢病毒载体表达H-RasV12和shp53短时间也能够形成高级胶质瘤[35]。我们通过构建一个表达H-RasV12（Human）和shP53（针对树鼩P53）的慢病毒载体来构建树鼩胶质母细胞瘤模型，首先将人类H-RasV12 cDNA和shp53（针对树鼩p53）构建在慢病毒载体中（图25–2），然后包装成病毒注射到树鼩海马区，观察和研究树鼩成瘤情况。

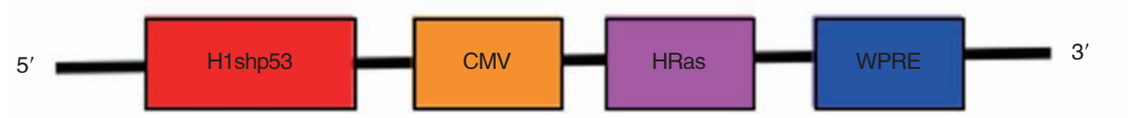



**图25–2　pTomo–H1shP53–CMV–HRas病毒载体示意图**
（未发表数据）

树鼩在注射病毒之后最早在39天就开始有发病现象（图25–3），发病主要表现出精神萎靡和肢体无力，139天内注射的树鼩全部发病（图25–4）。发病树鼩取脑做HE染色（hematoxylin-eosin staining）能看见明显的病变区，并且发病区的确位于海马区（图25–5），另外HE染色结果显示在病变区存在细胞异常增生并且包含不同种类细胞、侵袭生长、细胞坏死及血管增生等现象（图25–6），说明我们构建的树鼩胶质母细胞瘤具有与人类胶质母细胞瘤非常相似的病

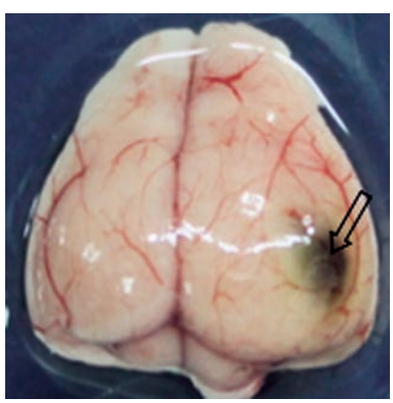


**图25–3　pTomo–H1shp53–CMV–HRas病毒注射树鼩海马诱导胶质母细胞瘤发病树鼩大脑解剖图，在大脑皮层明显能看到病变（箭头指的就是病变区）**
（未发表数据）

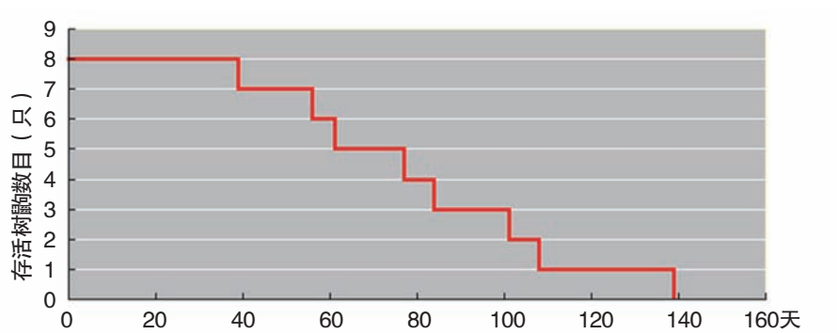



**图25–4　pTomo–H1shp53–CMV–HRas病毒注射树鼩海马诱导胶质母细胞瘤生存曲线**
（未发表数据）

理学特征。接下来还需要检测树鼩胶质母细胞瘤是否具有与人类胶质母细胞瘤相似的分子生物学特征，进而说明树鼩胶质母细胞瘤模型应该是研究人胶质母细胞瘤发病机理较理想的动物模型。

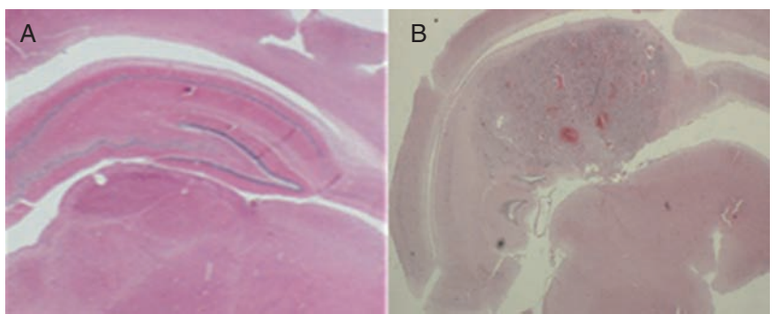



**图25-5 pTomo-H1shp53-CMV-HRas病毒注射树鼩海马诱导胶质母细胞瘤发病树鼩大脑HE染色图**

（A）为正常树鼩海马HE图；（B）为发病树鼩海马HE图。（B）可见树鼩海马明显发生病变。（未发表数据）

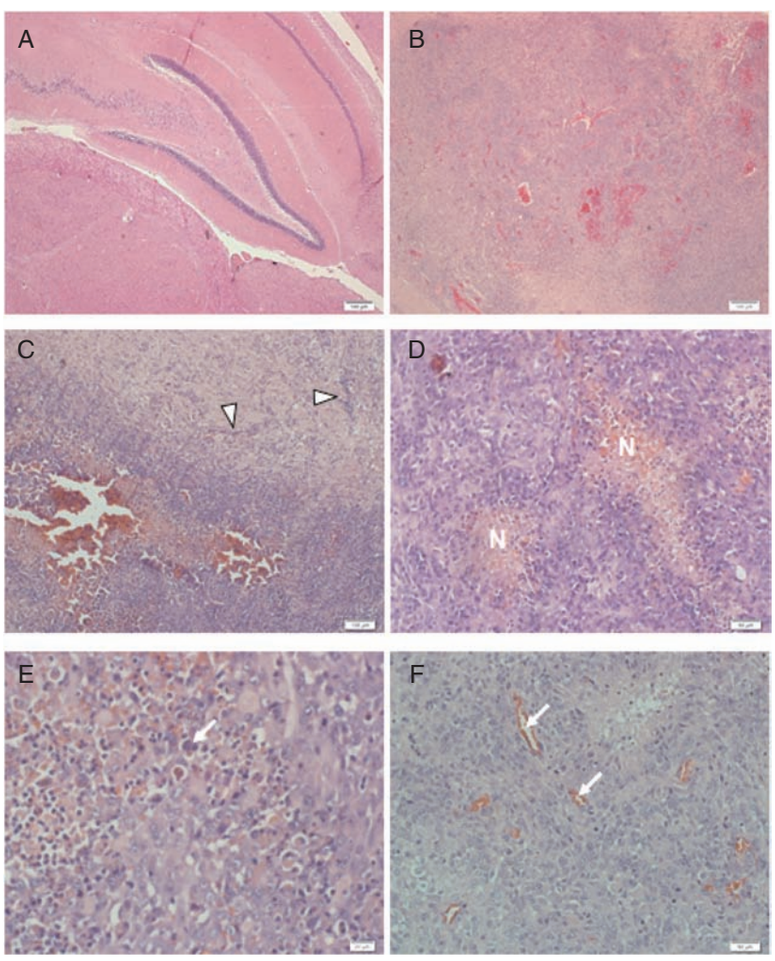



**图25-6 HE染色显示pTomo-H1shp53-CMV-HRas病毒注射树鼩海马诱导产生肿瘤的组织学特征**

（A）为正常树鼩海马对照，标尺代表：100 μm；（B）显示细胞密度明显增加，标尺代表：100 μm；（C）箭头显示肿瘤细胞有明显向正常细胞侵袭现象，标尺代表：100 μm；（D）N表示明显的细胞坏死区，标尺代表：50 μm；（E）显示病变区存在不同类型的细胞，甚至箭头所指位置能见到多核的胶质母细胞瘤巨细胞，标尺代表：20 μm；（F）箭头所指位置有血管增生现象，标尺代表：50 μm。（未发表数据）

## 第四节 结语与展望

总体上看，本研究发现树鼩对慢病毒是易感的，模型构建周期相对较短，而且构建的树鼩胶质母细胞瘤具有与人类胶质母细胞瘤非常相似的病理学特征。然而我们仍然缺乏遗传背景清晰、遗传成分稳定的种群或品系树鼩，导致实验用树鼩个体间差异较大，成瘤时间也不是很集中，这使得现有研究工作在深度及广度方面均存在缺陷，有待进一步提升。建立树鼩纯品系和相关封闭繁殖群，尽早完成其实验动物的模式化和标准化，也是目前我们迫切需要解决的一个重大问题。

树鼩相对于小（大）鼠具有进化程度更接近人类的优势，这提示我们用树鼩替代小（大）鼠模拟人类疾病发生和发展具有重要的意义，树鼩全基因组、转录组及蛋白组的不断解析为构建模型提供了扎实的基础。另外，通过基因组分析，发现树鼩在神经及免疫系统等方面与人类具有较为高度的同源性，在很多方面具有可用来替代猕猴等大型灵长类实验动物的遗传基础。所以在不久的将来树鼩将有望成为“明星动物”用于研究人类疾病的动物模型。

### 参考文献

[1]Furnari FB, Fenton T, Bachoo RM, et al. Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. Genes Dev, 2007, 21(21): 2683-710.

[2]Kleihues P, Ohgaki H. Primary and secondary glioblastomas: from concept to clinical diagnosis. Neuro Oncol, 1999, 1(1): 44-51.

[3]Kang MK, Kang SK. Tumorigenesis of chemotherapeutic drug-resistant cancer stem-like cells in brain glioma. Stem Cells Dev, 2007, 16(5): 837-47.

[4]Kang MK, Hur BI, Ko MH, et al. Potential identity of multi-potential cancer stem-like subpopulation after radiation of cultured brain glioma. BMC Neurosci, 2008, 9: 15.

[5]Beier D, Hau P, Proescholdt M, et al. $CD133^{+}$ and $CD133^{-}$ glioblastoma-derived cancer stem cells show differential growth characteristics and molecular profiles. Cancer Res, 2007, 67(9): 4010-5.

[6]Ware ML, Berger MS, Binder DK. Molecular biology of glioma tumorigenesis. Histol Histopathol, 2003, 18(1): 207-16.

[7]Brennan CW, Verhaak RG, McKenna A, et al. The somatic genomic landscape of glioblastoma. Cell, 2013, 155(2): 462-77.

[8]Campisi J. Cancer and ageing: rival demons? Nat Rev Cancer, 2003, 3(5): 339-49.

[9]Fujii YR. Oncoviruses and pathogenic microRNAs in humans. Open Virol J, 2009, 3: 37-51.

[10]Subramanian M, Jones MF, Lal A. Long Non-coding RNAs embedded in the Rb and p53 pathways. Cancers (Basel), 2013, 5(4): 1655-75.

[11]Sathornsumetee S, Rich JN. Designer therapies for glioblastoma multiforme. Ann N Y Acad Sci, 2008, 1142: 108-32.

[12]Stegh AH, Kim H, Bachoo RM, et al. Bcl2L12 inhibits post-mitochondrial apoptosis signaling in glioblastoma. Genes Dev, 2007, 21(1): 98-111.

[13]Shchors K, Shchors E, Rostker F, et al. The Myc-dependent angiogenic switch in tumors is mediated by interleukin 1 β . Genes Dev, 2006, 20(18): 2527-38.

[14]Preusser M, Haberler C, Hainfellner JA. Malignant glioma: neuropathology and neurobiology. Wien Med Wochenschr, 2006, 156(11-12): 332-7.

[15]Ricardo Martinez Murillo, Alfredo Martinez. Animal models of brain tumors. Springer, 2013: 275-98.
[16]Gladson CL, Prayson RA, Liu WM, The pathobiology of glioma tumors. Annu Rev Pathol, 2010, 5: 33-50.
[17]Stupp R, Mason WP, Van Den Bent MJ, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. N Engl J Med, 2005, 352(10): 987-96.
[18]Sathornsumetee S, Reardon DA, Desjardins A, et al. Molecularly targeted therapy for malignant glioma. Cancer, 2007, 110(1): 13-24.
[19]Takao Kanzawa, Hideaki Ito, Yasuko Kondo, et al. Current and future gene therapy for malignant gliomas. J Biomed Biotechnol, 2003, 2003(1): 25-34.
[20]Hu X, Holland EC. Applications of mouse glioma models in preclinical trials. Mutat Res, 2005, 576(1-2): 54-65.
[21]Koestner A. Characterization of N-nitrosourea-induced tumors of the nervous system; their prospective value for studies of neurocarcinogenesis and brain tumor therapy. Toxicol Pathol, 1990, 18(1 Pt 2): 186.
[22]London WT, Houff SA, Madden DL, et al. Brain tumors in owl monkeys inoculated with a human polyomavirus (JC virus). Science, 1978, 201(4362): 1246-9.
[23]Tabuchi K, Nishimoto A, Matsumoto K, et al. Establishment of a brain-tumor model in adult monkeys. J Neurosurg, 1985, 63(6): 912-6.
[24]Shapiro WR, Basler GA, Chernik NL, et al. Human brain tumor transplantation into nude mice. J Natl Cancer I, 1979, 62(3): 447-53.
[25]Kobayashi N, Allen N, Clendenon NR, et al. An improved rat brain-tumor model. J Neurosurg, 1980, 53(6): 808-15.
[26]Radaelli E, Ceruti R, Patton V, et al. Immunohistopathological and neuroimaging characterization of murine orthotopic xenograft models of glioblastoma multiforme recapitulating the most salient features of human disease. Histol Histopathol, 2009, 24(7): 879.
[27]Candolfi M, Curtin JF, Nichols WS, et al. Intracranial glioblastoma models in preclinical neuro-oncology: neuropathological characterization and tumor progression.J Neuro-Oncol, 2007, 85(2): 133-48.
[28]朱惠芳，张远旭，赵旭东．脑胶质瘤动物模型的研究及应用进展．动物学研究，2012，33(3): 337–42．
[29]Kwon CH, Zhao D, Chen J, et al. Pten haploinsufficiency accelerates formation of high-grade astrocytomas. Cancer Res, 2008, 68(9): 3286-94.
[30]Zhu Y, Guignard F, Zhao D, et al. Early inactivation of p53 tumor suppressor gene cooperating with NF1 loss induces malignant astrocytoma. Cancer Cell, 2005, 8(2): 119-30.
[31]Chen J, Kwon CH, Lin L, et al. Inducible site-specific recombination in neural stem/progenitor cells. Genesis, 2009, 47(2): 122-31.
[32]Alcantara Llaguno S, Chen J, Kwon CH, et al. Malignant astrocytomas originate from neural stem/progenitor cells in a somatic tumor suppressor mouse model. Cancer Cell, 2009, 15(1): 45-56.
[33]Wei Q, Clarke L, Scheidenhelm DK, et al. High-grade glioma formation results from postnatal Pten loss or mutant epidermal growth factor receptor expression in a transgenic mouse glioma model. Cancer res, 2006, 66(15): 7429-37.
[34]Holland EC, Celestino J, Dai C, et al. Combined activation of Ras and Akt in neural progenitors induces glioblastoma formation in mice. Nat Genet, 2000, 25(1): 55-7.
[35]Niola F, Zhao X, Singh D, et al. Mesenchymal high-grade glioma is maintained by the ID-RAP1 axis. J Clin Invest, 2013, 123(1): 405.
[36]Reilly KM, Loisel DA, Bronson RT, et al. Nf1; Trp53 mutant mice develop glioblastoma with evidence of strain-specific effects. Nat Genet, 2000, 26(1): 109-13.
[37]Ding H, Roncari L, Shannon P, et al. Astrocyte-specific expression of activated p21-ras results in malignant astrocytoma formation in a transgenic mouse model of human gliomas. Cancer Res, 2001, 61(9): 3826-36.
[38]Li L, Dutra A, Pak E, et al. EGFRvIII expression and PTEN loss synergistically induce chromosomal instability and glial tumors. Neuro Oncol, 2009, 11(1): 9-21.
[39]Weiss WA, Burns MJ, Hackett C, et al. Genetic determinants of malignancy in a mouse model for oligodendroglioma. Cancer Res, 2003, 63(7): 1589-95.

[40]Ding H, Shannon P, Lau N, et al. Oligodendrogliomas result from the expression of an activated mutant epidermal growth factor receptor in a RAS transgenic mouse astrocytoma model. Cancer Res, 2003, 63(5): 1106-13.

[41]Zhu H, Acquaviva J, Ramachandran P, et al. Oncogenic EGFR signaling cooperates with loss of tumor suppressor gene functions in gliomagenesis. Proc Natl Acad Sci USA, 2009, 106(8): 2712-6.

[42]Uhrbom L, Dai C, Celestino JC, et al. Ink4a-Arf loss cooperates with KRas activation in astrocytes and neural progenitors to generate glioblastomas of various morphologies depending on activated Akt. Cancer Res, 2002, 62(19): 5551-8.

[43]Marumoto T, Tashiro A, Friedmann-Morvinski D, et al. Development of a novel mouse glioma model using lentiviral vectors. Nat Med, 2009, 15(1): 110-6.

[44]许凌，范宇，蒋学龙，等．树鼩进化分类地位的分子证据．动物学研究，2013，34（2）：70–6.

[45]Fan Y, Huang ZY, Cao CC, et al. Genome of the Chinese tree shrew. Nat Commun, 2013, 4: 1426.

[46]Elliot OS, Elliot MW, Lisco H. Breast cancer in a tree shrew (*Tupaia glis*). Nature, 1966, 211(5053): 1105.

[47]Hofmann W, Möller P, Schwaier A, et al. Malignant tumours in *Tupaia* (tree shrew). J Med Primatol, 1981, 10(2-3): 155-63.

[48]Brack M, Schwartz P, Heinrichs T, et al. Tumors of the respiratory tract observed at the German Primate Center, 1978-1994. J Med Primatol, 1996, 25(6): 424-34.

[49]Yan RQ, Su JJ, Huang DR, et al. Human hepatitis B virus and hepatocellular carcinoma. Ⅱ. Experimental induction of hepatocellular carcinoma in tree shrews exposed to hepatitis B virus and aflatoxin B1. J Cancer Res Clin Oncol, 1996, 122(5): 289-95.

[50]Rao Ms, Reddy JK. Carcinogenicity of 2, 2′-dihydroxy-di-n-propylnitrosamine in the tree shrew (*Tupaia glis*): light and electron microscopic features of pulmonary adenomas. J Natl Cancer I, 1980, 65(4): 835-40.

[51]徐林，张云，梁斌，等．树鼩实验动物和人类疾病的树鼩模型研究概述．动物学研究，2013，34（2）：59–69.

[52]夏厚军，王春燕，张海林，等．自发性树鼩乳腺肿瘤的特性．动物学研究，2012，33（1）：55–9.



# 第二十六章

第二篇 疾病树鼩模型
TREE SHREW ANIMAL MODELS

Tree shrews

# 树鼩血栓疾病动物模型

郝 雪 赖 仞

## 第一节 血栓疾病研究概况

### 一、血栓概念及发病情况

血栓是一类可危及全身性的疾病，在中老年人群中尤其常见，其发病率、致残率和死亡率都非常高，在“人类健康头号杀手”——心脑血管疾病中占据着举足轻重的地位，严重威胁着人类的生命。而随着生活节奏的加快，患者的数量也显著增加，年龄也逐渐年轻化。据世界卫生组织统计，全球每年有1700万人死于心脑血管类疾病[1]。通过医学研究者多年来坚持不懈的努力，人们对血栓形成机制的了解不断深入，并已开发出了许多抗血栓药物，其中一些对于血栓的治疗具有良好的效果。

#### （一）血栓的定义

血栓是生理或病理情况下在血管中形成的血凝块，会阻碍血液循环系统的流动。当血管受到损伤时，机体利用血小板和纤维蛋白形成血块以阻止血液流失。即便血管没有受损，在特定的条件下，血块也会形成。正常机体中凝血系统与纤溶系统维持着动态平衡，防止出现流血不止或血凝块堵塞血管的情况，但当纤溶系统出现故障，血凝块形成速度远大于它被溶解的速度时，就形成了血栓[2, 3]（图26–1）。

#### （二）血栓的分类

1. 按形成部位

血栓主要分为两类：静脉血栓和动脉血栓，二者又有多种亚型。

（1）静脉血栓：静脉血流速度较慢，凝血酶及其它凝血因子易在局部聚集形成高浓度，黏附于血管壁上，形成血栓。

①深静脉血栓（deep vein thrombosis, DVT）：深静脉血栓是在深静脉产生的血栓，主要针对

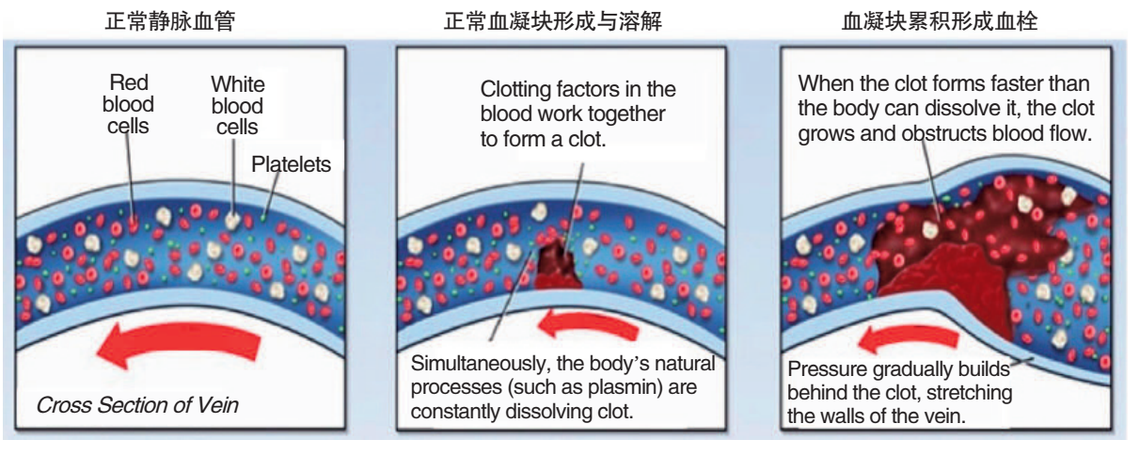



**图26–1　血栓形成的过程**

腿部的静脉而言，如股静脉。一般是由于血流过慢、血液黏稠、血管管壁粗糙造成的。深静脉栓塞会造成组织肿胀，有局部红肿的症状。

②肾静脉血栓（renal venous thrombosis, RVT）：是指肾静脉主干和/或分支内形成的血栓，可导致肾静脉部分甚至全部阻塞。一般是由于肾病综合征、肿瘤、妊娠期胎儿对腔静脉的压迫、下腔静脉炎、肾衰竭等引发的。

③门静脉血栓（poratl vein thrombosis, PVT）：是指在门静脉主干、脾静脉、肠系膜下静脉、肠系膜上静脉中形成的血栓。通常由胰脏炎、肝硬化、憩室炎或胆管炎等诱发，可造成门静脉阻塞，引起肝外门静脉高压、肠管瘀血、食管胃底静脉曲张出血，严重可引起小肠梗死，导致休克甚至死亡。

④颈静脉血栓（jugular vein thrombosis, JVT）：起因可能是感染、服用静脉内药物或者肿瘤。颈静脉栓塞可引发多种并发症，如全身性败血症、肺栓塞以及视神经乳头水肿。

⑤脑静脉血栓（cerebral venous sinus thrombosis, CVST）：是一种罕见的中风，主要病症包括头痛、奇怪的视幻觉，以及半身麻痹、癫痫等中风症状，一般用X–射线断层成像（computed tomography, CT）以及核磁共振影像来诊断，多数患者可痊愈。

⑥巴德–希亚利症候群（Budd-Chiari syndrome, BCS）：亦被称为布加症候群，是由于多种原因引起的肝静脉和/或其开口上端下腔静脉部分或完全梗阻性病变引起的肝静脉—下腔静脉血液回流障碍，导致以瘀血性门静脉高压症和下腔静脉高压症为特点的一系列症候群[4]。布加症候群的主要临床表现为腹水、腹痛、下肢水肿以及肝脾肿大等。发病率很低，约为百万分之一。病因复杂，尚未完全明确。

⑦潘吉特–施罗特症候群（Paget-Schroetter disease）：是由于上肢深静脉血管如腋静脉或锁骨下静脉堵塞形成的血栓。相对而言，潘吉特–施罗特症候群发病比较罕见[5]，通常在年轻人和其它方面比较健康的病人中引发，男性发病率高于女性。通常是在剧烈运动后发生这种症状[6]，病症包括突然的疼痛、发热、肌肉变红又现蓝色以及胳膊肿胀。

（2）动脉血栓：顾名思义，形成于动脉血管内的血栓总称为动脉血栓。多数动脉血栓是由于粥样斑的破裂导致的，即动脉粥样硬化。另一种常见原因则是动脉肌纤维颤动，造成血流阻滞而

易于形成血栓。

①中风（stroke）：是由于脑部血液供应不畅引起的脑功能急剧下降的现象，诱发原因包括脑局部缺血、血栓、栓塞或大出血等。栓塞性中风通常发病较慢，因其血栓是逐渐生成的。中风发病突然，患者通常会猝然晕倒随即不省人事。中风具有发病率、致残率、复发率、致死率均很高的特点，同时兼有多种并发症，对人类生命健康威胁非常大。可通过头颅CT（图26–2）、核磁共振检查来确诊。

②心肌梗死（myocardial infarction）：通常是由于供血不足造成局部缺血所致。如图26–3，这种情况多源于已形成的血栓引起冠状动脉的堵塞，机体此时会产生缺氧现象，导致心肌组织坏死。若抢救不及时，则很有可能致命。

③其它：主要是肝动脉血栓，多为肝移植后的并发症。

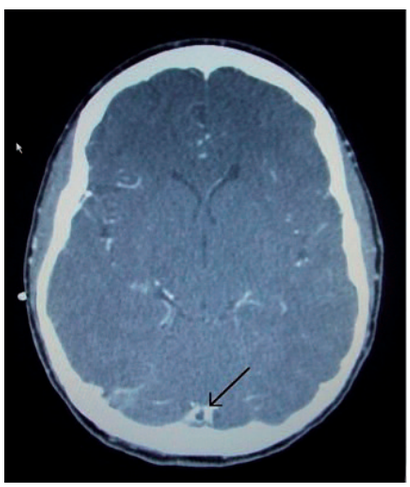


**图26–2　脑部中风CT扫描图箭头所指处为脑梗死区域**

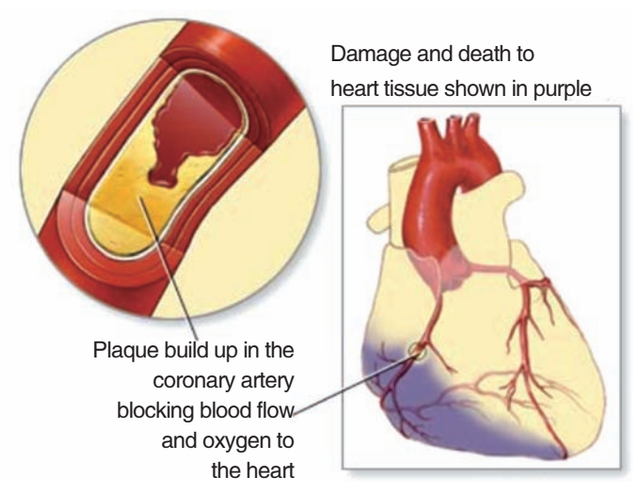



**图26–3　心肌梗死示意图**

http://nursingcrib.com.

2. 按血栓的组成成分

血栓又可分为白色血栓、红色血栓、细胞栓、透明栓。白色血栓主要由血小板和白细胞组成，多存在于动脉血栓中；红色血栓由纤维蛋白和红细胞组成，存在于动脉血栓、静脉血栓中；细胞栓由血小板组成，透明栓则为变性蛋白混合体，这两者主要存在于微血管血栓中。

## 二、血栓形成机制的研究

正常生理状态下，生物体内的凝血系统和纤溶系统存在着动态平衡，前者防止生物体在受到血管损伤时有大出血的危险，后者则避免凝血过度而形成血栓，二者共同调节保证了血液循环系统的稳定和畅通无阻。而当这种平衡被打破的时候，机体便面临出血或形成血栓的危险。

血栓形成的机制非常复杂，最早可追溯到1856年，德国病理学家Virchow就已指出，血管壁受损、血液成分发生改变以及血流状态的变化（包括缓慢、停滞、漩涡形成等）是诱发血栓的主要因素。一旦血管受损，该受损的血管壁粗糙不平的内膜便募集血小板黏附其上，同时暴露出胶原纤维，启动内源性凝血过程；而损伤的内膜释放的凝血因子又能够激活外源性凝血系统，

两条通路共同作用，在受损部位促进凝血形成局部血栓。若血栓脱落，在血管腔内循环流动，在此过程中部分或全部堵塞某些血管，引起相应组织器官缺血、瘀血、坏死等，就形成了栓塞（thromboembolism）。一般来说，凝血与抗凝因素在静脉血栓发生中发挥主要作用，而血管壁和血小板的因素则在动脉血栓的发生中起主要作用。

## 三、抗血栓药物研究情况

针对止血途径中某一个或多个环节物质的拮抗剂即有抗血栓功效。一般将抗血栓类药物分为3大类：抗血小板药物、抗凝药物和溶栓药物。

### （一）抗血小板药物

血管受损后，血小板黏附于损伤处暴露的胶原上是血栓形成的首要步骤，因此抑制血小板聚集成为抗血栓的第一选择。

1. 血小板膜糖蛋白ⅡbⅢa（GPⅡbⅢa）受体拮抗剂

该类拮抗剂可以阻断血小板和纤维蛋白的结合，从而抑制血栓的发生。目前临床使用的主要有阿昔单抗（abeximab）、依替巴肽（eptifibatide）和替罗非班（tirofiban）[8]。

2. 血栓烷受体抑制剂（thromboxane receptor inhibitors）

该类抑制剂可以抑制血栓烷A2对单核细胞和血管内皮细胞的作用，进而抑制环氧化酶产生前列环素，最终抑制血小板的聚集和血管收缩[9]。此类药物的明星代表是阿司匹林（aspirin）[10，11]。

3. ADP受体拮抗剂

ADP是体内最常见的血小板激动剂，抑制其与血小板膜上的ADP受体结合可以解除对腺苷酸环化酶AC的抑制作用，此酶可以催化合成环磷酸腺苷单磷酸cAMP，后者可以激活血管扩张因子对磷酸蛋白的磷酸化作用，反过来抑制ADP介导的GPⅡbⅢa受体活化和血小板聚集。普拉格雷属于此类药物，虽见效快，但存在较大的出血危险性。

4. cAMP增强剂

由cAMP对ADP的抑制作用可知，促进其浓度升高可以用于血栓的抑制。临床使用的PGI2、伊洛前列素（iloprost）以及塞氯匹定（ticlopidine）可以提高AC活性进而增加cAMP浓度；西洛他唑（cilotazol）[12]、曲匹地尔（trapidil）[13]以及西洛酰胺（cilostamide）等则可通过抑制磷酸二酯酶的活性来抑制cAMP的降解。

### （二）抗凝药物

抗凝药物主要针对凝血因子和凝血酶。

1. 抗凝血因子药物

此类抗凝药以肝素（heparin）为代表。肝素为水溶性酸性黏多糖，分子量在3000～50000Da之间，通过抑制凝血因子Ⅱ和Ⅹa发挥抗凝作用，已广泛应用于临床。肝素的主要不良反应是易引起自发性出血以及血小板减少症。因此医学工作者又开发出改良型的低分子量肝素（low molecular weight heparins, LMWHs），如依诺肝素（enoxaparin）、亭扎肝素（tinzaparin）、达肝素（dalteparin）等，以及硫酸皮肤素等肝素类似物，用于静脉血栓的防治[14]。其它如华法林（warfarin）、利伐沙班（rivaroxaban）等，也是针对其它一些凝血因子的药物。

2. 抗凝血酶药物

代表药是水蛭素（hirudin）。水蛭为我国传统中药，主治闭经、血瘀腹痛、跌打损伤等。水蛭素是一个含有65个氨基酸残基的小分子多肽，可高效特异的抑制凝血酶的活性，阻断纤维蛋白的形成及凝血酶介导的血小板激活。且由于是小分子多肽，水蛭素可以进入到血栓内部，对动静脉血栓均有较好治疗效果[15]。市场上比伐卢定（bivalirudin）即是人工合成的水蛭素类似物。

其它常用药如维生素K拮抗剂（vitamin K antagonist, VKA），可以抑制维生素K依赖性凝血因子的生成，但见效较慢，需配合其它快效抗凝药使用[16]。阿加曲班（argatroban）可快速高效的与凝血酶的催化部位可逆结合而使其失去催化功能，极低浓度即可见效，对脑血栓、肺栓塞、急性心肌梗死都有良好的疗效[17]。

### （三）溶栓药物

已经形成的血栓亦可被逐渐溶解，此过程主要涉及纤维蛋白的溶解。近年来溶栓治疗发展较快，已广泛应用于急性心肌梗塞、肺栓塞及深静脉血栓和外周血管动脉血栓的治疗。

自1958年溶栓剂首次被用于急性心肌梗塞的治疗开始到20世纪80年代溶栓剂被普遍应用，此类药物经历了3代[18]。第一代以尿激酶、链激酶为代表，通过激活纤溶酶促进纤溶，但存在选择性差、易引起出血及过敏等不良反应。第二代以组织型纤溶酶原激活剂（tissue-type plasminogenactivator, t-PA）、单链尿激酶型纤溶酶原激活剂（single chain urokinase-type plasminogenactivator, scu-PA）为代表，目前处于临床试验阶段。第三代是指通过蛋白质工程手段开发的分子生物学改良产品，主要是对以往的溶栓剂通过化学修饰、特定氨基酸突变等手段以增强其溶栓活性。此外还包括新来源的溶栓剂，如蛇毒溶栓剂、蚯蚓纤溶酶、蜈蚣纤溶酶[19]、地鳖虫纤溶酶[20]等。

## 第二节 血栓疾病动物模型

### 一、人类疾病与动物模型

生老病死，是每一个生命必须经历的过程。人类的疾病归咎于遗传背景和环境因素的共同作用，最有效的治疗方案是直接依据患者的各方面临床研究来设定，然则由于患者的个体差异以及考虑到医学伦理问题，很多新药和新疗法不能直接应用于人体，选择合适的动物疾病模型预先测定药物的给药剂量、时效性和安全性是十分必要的。

所谓的模式动物是指能够广泛应用于疾病或生物学研究的人类以外的动物物种。模式动物一般具备的特点就是取材容易（繁殖周期短、数量多）、操作简便、性状与生理特性相对稳定（基因信息比较完全），如应用于基因功能研究的果蝇，应用于代谢学研究的秀丽隐杆线虫，用于基因操作和功能研究的小鼠等。动物模型即是利用这些模式动物来研究相关疾病的发生、发展以及治疗。

### 二、血栓疾病动物模型的研究情况

在本章已介绍了血栓类疾病对人类健康的威胁之大，因此多年来，医学人员建立了多种动物

血栓模型，力求简单、快速、经济，以满足不同作用途径的抗血栓药物的疗效研究。

### （一）小体形动物血栓模型

在筛选抗血栓药物的流程中，通常先进行体外活性检测，再利用动物模型确定药物效果如何。对于抗凝血酶的药物，一般是测定活化部分凝血酶时间（activated partial thromboplastin time, aPTT）或者血浆凝血酶原时间（prothrombin time, PT）。而对于抗血小板的药物，一般是检测对于血小板聚集的影响。

小体形的啮齿类动物非常适合用来建立疾病模型。它们体形小，可以减少待检测药物的使用剂量，便于操控且可以同时进行多项指标的检测，大大缩短了实验时间，在短期内即可筛选出高效的抗血栓药。同时，由于在啮齿类动物上建立的血栓模型多数比较成熟，技术细节和数据信息均可查阅到，实验人员可以参考这些资料来确定自己的实验所需要的动物模型及给药剂量范围。不过，小体形的啮齿类动物与人类的生理结构以及血液循环系统中一些成分的功能差异较大，因此部分在小体形动物模型中筛选到的抗血栓药物还需要进一步在体形稍大、与人类血浆成分更为接近的模式动物体内进行测试，以确定其安全性和药效。

1. $FeCl_3$诱导的颈动脉血栓模型

该模型最早由Kunz[21]建立，利用$FeCl_3$诱导动脉内膜损伤，进而引起的血小板黏附、聚集、释放，致内源性凝血系统激活而形成复合性血栓，与人类血栓疾病的发病机制类似，既能用来筛选抗栓药又能反映溶栓药的药效，且操作简便，实验结果具有较好的重现性。

2. 下腔静脉血栓模型

此模型应用结扎法阻断大鼠下腔静脉血流而形成血栓，术后2小时血栓形成率在60%～80%之间。可添加凝血因子Xa或组织因子加速血栓形成[22，23]。

3. 角叉菜角血栓形成法

角叉菜角是一种含硫酸的多糖物质，具有较强的致炎能力，发生炎症时可释放大量炎症介质破坏凝血与纤溶系统之间的平衡态，导致血栓形成。一般将角叉菜角从小鼠的尾动脉注入体内，诱发尾动脉局部血栓。此方法操作相对其它模型要简单，且尾动脉血栓的形成现象很明显，可从体表观察血栓形成及出现的时间与发展，直观简便。

4. 动静脉旁路血栓模型

动静脉旁路血栓模型是要在动脉和静脉之间用软管联通，管内置有诱发血栓生成的障碍物（如一段毛线），当血流从动脉流经软管进入静脉后，会在管内障碍物上形成血栓。称量血栓重量即可估测药物的抗血栓效果。利用此模型形成的是混合型血栓，被广泛应用于抗血栓药物的筛选。目前在大鼠和兔体内建立了比较成熟的颈部动静脉旁路血栓模型[24～29]。

5. 弥散性血管内凝血模型

另一种被广泛应用于大鼠和小鼠体内的血栓模型就是弥散性血管内凝血（disseminated intravascular coagulation, DIC）模型了。此模型是由组织因子、内毒素（脂多糖）或凝血因子Xa诱导的血栓[30，31]，通过将可诱导血栓发生的这些刺激物通过静脉滴注等方法注射到动物体内，形成全身性血栓，以凝血酶原时间（PT）、纤维蛋白原（FIB）含量及肺、肾微血栓形成观察指标，评估药物的抗血栓效果。这种模型由于鼠的体形偏小，手术血样难取，以及一些凝血因子Xa的拮抗剂在鼠和人的血浆中活性存在较明显差异，因而后续还需要做更高级的动物模型的实验来确认。

6. Wessler兔静脉血栓模型

在经过前面的小体形啮齿类动物模型证明了药物具有抗血栓效果后，一般要用体形稍大些的动物来进一步确定药效。对于一些可能与凝血因子Ⅹa发生拮抗作用的药物，可以用兔模型做下一步实验。Wessler兔静脉血栓模型[32～34]，是在兔颈静脉用注射诱发血栓生成因子的方法形成血栓，然后再注入药物，观察血栓的变化。Wessler模型相对简便，重现性较好，更重要的是，兔和人的凝血因子Ⅹa与其底物及拮抗剂的亲和力十分相似，可以为药物在人体内的使用提供参考。

7. 凝血酶诱导的兔股动脉血栓模型

在兔股动脉中注入凝血酶、氯化钙或者新鲜血液的方法可以诱发动脉血栓。

### （二）大体形动物血栓模型

在通过了小体形动物血栓模型的初步检测后，具有抗血栓活性的药物可以在大体形模式动物体内进行活性和安全性测试。常用的大体形血栓模式动物包括狗、猪以及非人灵长类。

1. Folts冠状动脉血栓模型

此模型为Folts和其同事于1976年所建立[35]，他们将狗麻醉，打开其胸腔，在冠状动脉内用一个聚碳酸酯柱形物阻碍血流畅通，生成了依赖于血小板的血栓，造成血流流速周期性的降低，形成规律的循环。Folts模型在抗血栓药物的药理学研究中发挥着重要的作用，因为此模型用到的引发血栓生成的障碍物和造成间歇性心绞痛的刺激物可能是相似的。然而，由于溶栓药对Folts模型诱发的血栓没有作用，它实际上与急性心肌梗死的血栓差异很大。临床发现，无论是链激酶（SK）还是组织纤维溶酶原激活物（t-PA）都不能溶解Folts模型生成的血栓，而在心肌梗塞患者的溶栓治疗中，这两种溶栓药可以溶解50%～75%的血栓[36]。因此，可以把Folts模型看作是“抗溶栓”的冠状动脉血栓模型。

2. 铜网圈诱发的犬动脉血栓模型

1964年，Blair[37]将铜网圈置入犬冠状动脉内，诱发了闭塞性血栓，病理切片显示犬冠状动脉内血栓与人类冠状动脉血栓结构类似。与Folts模型相比，此模型诱发的血栓可被SK和t-PA溶解[41]，几乎被专门用来评估溶栓药或者辅助药物的药效[38～43]。

3. 损伤诱导的犬动脉血栓模型

1961年，Salazar[44]用电刺激的方法直接损伤犬的冠状内膜，诱发了血栓的生成。多种抗凝药、抗血栓药和溶栓药的药效都是通过此模型得到证实的[45～49]。除此之外，损伤诱导模型还被用来检测药物预防血栓形成的能力。

## 第三节 树鼩血栓模型

### 一、树鼩作为动物疾病模型的优势

非人灵长类动物由于受动物来源不易获得、价格昂贵、对实验设备和手术操作要求高等条件所限制，不易被推广，因而寻找兼具灵长类进化程度优势和啮齿类可行性优势的模式动物成为重要趋势[50]。

1922年，Carlsson首次提出与食虫类相比，树鼩在谱系上与猿类更为密切。树鼩作为一种低等

灵长类动物，它的新陈代谢系统和解剖结构远比犬、鼠等更接近于人类，而且相对其它灵长类动物来说，树鼩具有容易饲养、管理方便、成本低、繁殖周期短、体形小易控制的特点，因此已被广泛用于神经、内分泌、肿瘤、细菌、病毒等方面的研究。现在许多国家已经开展了树鼩实验动物化方面的研究，德国灵长类中心已经人工繁殖树鼩成功。昆明动物研究所是我国开展树鼩人工驯养繁殖最早的单位，通过探索改进，已实现了树鼩的标准化人工驯养繁育，并于2012年10月通过树鼩生产和使用许可证认证，成为全国首家获得树鼩生产许可证的单位，意味着树鼩将更容易被推广至全国乃至世界[51]。

## 二、树鼩颈部动静脉旁路血栓模型的构建

### （一）实验动物

成年雄性树鼩，体重120～140g，购自中国科学院昆明动物研究所实验动物中心。在本所动物饲养中心适应环境2～4周，用于实验前12小时禁食不禁水。

### （二）实验所需试剂及手术工具

肝素钠，实验浓度：50U/mL。

戊巴比妥钠，实验浓度：2%（溶于生理盐水）。

依替巴肽由上海吉尔生化公司合成。

PE50和PE90导管，各截成6cm每段，在PE90内塞入双股4号手术线，在其两端分别塞入一段PE50导管，形成连贯的弧形。

止血钳4个，4号手术线，棉花及棉签，剪刀2把，镊子2把，玻璃分离针2根，木质手术台1个，捆绑用粗线5根，夹子5个，注射器若干。

### （三）手术操作步骤

（1）用新鲜配制（4度，＜1周）的戊巴比妥钠按照60mg/kg体重剂量对成年雄性树鼩进行腹腔注射麻醉。待树鼩眼睛微张，按其掌心无反应时，确认麻醉完全可用于试验。

（2）在手术台上垫一层棉花以给麻醉的树鼩保持体温，将已麻醉的树鼩用粗线捆住四肢及头部，并用夹子固定在手术台上（图26–4A）。

（3）将树鼩颈部毛用剃毛器剔除，生理盐水擦洗干净。用剪刀在其颈部剪开一个“T”形的切口（图26–4B），小心剥离左静脉上层黏膜，钝性分离出左静脉（图26–4C），用手术线在静脉远心端打上结；之后分离位于气管右侧的动脉血管（图26–4D），近心端用止血钳夹住，远心端用手术线打结。

（4）用剪刀小心在分离出的颈部静脉及动脉（要确保已结扎完全，防止喷血）上剪开小口，将组装好的PE50–PE90（含双股4号手术线）–PE50导管（内充满肝素钠溶液）两端分别插入静脉血管及动脉血管中，形成完整回路，分别用止血钳固定导管使之不会脱离血管（图26–4E）。

（5）在树鼩腿部腹股沟附近剪开长口，暴露静脉（图26–4F），将生理盐水或药物注射入股静脉，计时5分钟；结束后将结扎于近心端的动脉止血钳打开，使得插管内回路开始流通血液（图26–4G），计时5分钟后用止血钳夹住近心端动脉血管，取出PE90导管中的手术线，称湿重，55℃烘箱烘烤2小时，取出称干重，计算血栓重量。



A　麻醉及固定



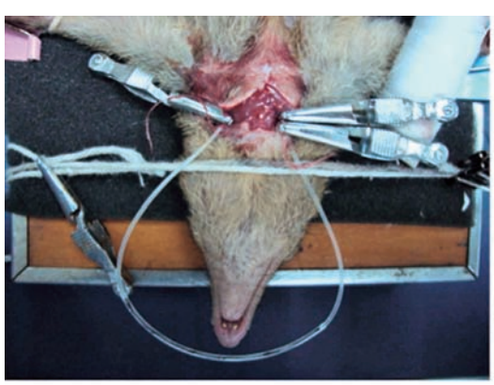
B　颈部T形切口



C　左颈静脉血管分离



D　右颈动脉血管分离



E　插管固定



F　股静脉暴露



G　旁路血管流通

**图26–4　A–G分别是树鼩颈动静脉旁路血栓模型各操作步骤**

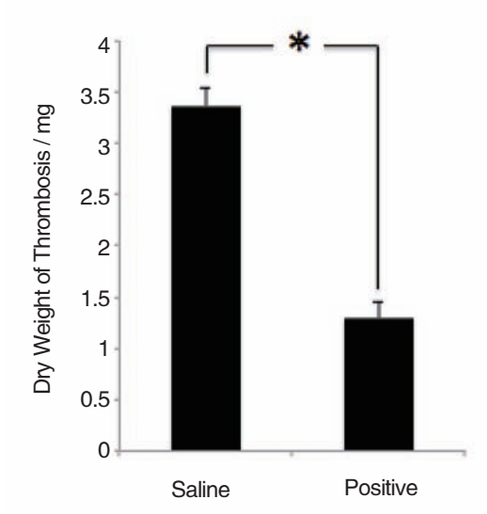



**图26–5　生理盐水组与依替巴肽组的血栓均重**

* 与生理盐水组对比，显著性差异水平，$P<0.05$。

### （四）实验结果

本节实验环节，阳性参照以依替巴肽为例，给予树鼩0.2mg/kg体重的剂量，另设一组空白对照生理盐水组，每组做3只树鼩，取平均值。得到结果如图26–5和表26–1所示。

表26–1　依替巴肽组血栓形成抑制率

| | 生理盐水组 | 依替巴肽组0.2mg/kg体重 |
|---|---|---|
| 血栓形成抑制率 | 0 | 61.39% |

## 第四节　结　语

血栓性疾病是导致死亡率最高的病因之一，在过去几十年中，每年都有新的针对凝血、血小板和血栓溶解的抗血栓药物被开发出来，然而其中许多药会导致低血压和出血的副作用，因此新抗血栓药的开发利用仍然是一项严峻的工程。

但凡涉及新药开发，都要有一套合理的药物筛选流程。动物模型则是将药物应用于人体上的最后一步，合适的动物模型能够为药物的使用剂量、药效、作用机理的研究提供可靠的信息，药物的安全性也可以先在动物体中得到验证。研发的药物最终要应用于人体，因此模式动物与人类的生理特性、结构机理越相似，从动物模型所得到的数据就越有参考价值。在本章中，结合过去几十年里建立的多种动物血栓模型，以及对于树鼩与灵长类亲缘关系的研究，选择树鼩作为新的血栓疾病模型在临床实验中将有很好的应用前景。与其它已有的动物血栓模型相比，树鼩在生理结构、繁殖周期、体形上占有综合性的优势，弥补了以往大型灵长类动物模型的试验成本高、啮齿类动物生理结构与人差异较大的缺陷。此外，在本章最后一节中，利用树鼩建立了颈部动静脉旁路血栓模型，以生理盐水和依替巴肽分别作为阴性对照组和阳性对照组，尽管选用实验动物数量不多，但从方差上看，组内树鼩个体之间的差异非常小，具有可重复性高、结果稳定的优点，这可为今后减少实验动物数量、节省实验成本提供良好的开端。综上，表明树鼩颈动静脉旁路血栓模型可以作为一种合适的血栓模型用于抗血栓药物的筛选。

## 参考文献

[1]付研，王大为．血栓栓塞性疾病的急诊治疗和预防．中国临床医生，2006，34（8）：51–3.

[2]Furie B, Furie BC. Mechanisms of thrombus formation. NEJM, 2008, 359(9): 938-49.

[3]Collen D, Lijnen HR. Basic and clinical aspects of fibrinolysis and thrombolysis. Blood, 1991, 78(12): 3114-24.

[4]Jaussen HL, Garcia-Pagan JC, Elias E, et al. Budd-Chiari syndrome: a review by an expert panel. J Hepatol, 2003, 38(3): 364-71.

[5]Hughes ES. Venous obstruction in the upper extremity Paget-Schroetter's syndrome: a review of 320 cases. SurgGynecolObstet, 1949, 88(2): 89-127.

[6]Flinterman LE, Van Der Meer FJ, Rosendaal FR, et al. Current perspective of venous thrombosis in the upper extremity. JTH, 2008, 6(8): 1262-6.

[7]Tanaka KA, Key NS, Levy JH. Blood coagulation: hemostasis and thrombin regulation. AnesthAnalg, 2009, 108(5): 1433-46.

[8]高亚玥，王书杰．抗血栓药物的研究进展．中日友好医院学报，2009（4）：250–3.

[9]Gaussem P, Reny JL, Thalamas C, et al. The specific thromboxane receptor antagonist S18886: pharmacokinetic and pharmacodynamic studies. JTH, 2005, 3(7): 1437-45.

[10]Born G. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. Nature, 1962, 194(4832): 927-9.

[11]Trialists CA. Collaborative meta-analysis of randomised trials of antiplatelet therapy for prevention of death, myocardial infarction, and stroke in high risk patients. BMJ, 2002, 324(7329): 71-86.

[12]Biondi-Zoccai GG, Lotrionte M, Anselmino M, et al. Systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials appraising the impact of cilostazol after percutaneous coronary intervention. Am Heart J, 2008, 155(6): 1081-9.

[13]李虔桢，陈良万．曲匹地尔的药理作用及机制．中国实用医药，2007（3）：111–4.

[14]Warkentin TE, Levine MN, Hirsh J, et al. Heparin-induced thrombocytopenia in patients treated with low-molecular-weight heparin or unfractionated heparin. NEJM, 1995, 332(20): 1330-6.

[15]Rydel TJ, Tulinsky WA, Huber R. Refined structure of the hirudin-thrombin complex. JMB, 1991, 221(2): 583-601.

[16]Anand SS, Yusuf S. Oral anticoagulant therapy in patients with coronary artery disease: a meta-analysis. JAMA, 1999, 282(21): 2058-67.

[17]Follis F, Filippone G, Montalbano G, et al. Argatroban as a substitute of heparin during cardiopulmonary bypass: a safe alternative? Interact Cardiovasc Thorac Surg, 2010, 10(4): 592-6.

[18]Verstraete M. Third-generation thrombolytic drugs. Am J Med, 2000, 109(1): 52-8.

[19]You WK, Sohn YD, Kim KY, et al. Purification and molecular cloning of a novel serine protease from the centipede, *Scolopendra subspinipesmutilans.* Insect BiochemMol Biol. 2004, 34(3): 239-50.

[20]Yang H, Wang Y, Xiao Y, et al. A bi-functional anti-thrombosis protein containing both direct-acting fibrin(ogen)olytic and plasminogen-activating activities. PLoS One, 2011, 6(3): e17519.

[21]Kurz KD, Main BW, Sandusky GE. Rat model of arterial thrombosis induced by ferric chloride. Thromb Res, 1990, 60(4): 269-80.

[22]Herbert JM, Bernat A, Dol F, et al. DX 9 065A, a novel, synthetic selective and orally active inhibitor of factor Xa: in vitro and in vivo studies. JPET, 1996, 276(3): 1030-8.

[23]Sato K, Kawasaki T, Hisamichi N, et al. Antithrombotic effects of YM-60 828, a newly synthesized factor Xa inhibitor, in rat thrombosis models and its effects on bleeding time. Br J Pharmacol, 1998, 123(1): 92-6.

[24]Wiley MR, Weir LC, Briggs S, et al. Structure-based design of potent, amidine-derived inhibitors of factor Xa: evaluation of selectivity, anticoagulant activity, and antithrombotic activity. J Med Chem, 2000, 43(5): 883-99.

[25]Sato K, Taniuchi Y, Kawasaki T, et al. Relationship between the antithrombotic effect of YM-75466, a novel factor Xa inhibitor, and coagulation parameters in rats. Eur J Pharmacol, 1998, 347(2-3): 231-6.

[26]Sato K, Kawasaki T, Taniuchi Y, et al. YM-60828, a novel factor Xa inhibitor: separation of its antithrombotic effects from its prolongation of bleeding time. Eur J Pharmacol, 1997, 339(2-3): 141-6.

[27]Morishima Y, Tanabe K, Terada Y, et al. Antithrombotic and hemorrhagic effects of DX9065a, a direct and selective factor Xa inhibitor: comparison with a direct thrombin inhibitor andantithrombin Ⅲ-dependent anticoagulants. Thromb Haemost, 1997, 78(5): 1366-71.

[28]Wong PC, Crain EJ, Nguan O, et al. Antithrombotic actions of selective inhibitors of blood coagulation factor Xa in rat models of thrombosis. Thromb Res, 1996, 83(2): 117-26.

[29]Wong AG, Gunn AC, Ku P, et al. Relative efficacy of active site-blocked factors Ⅸa, Xa in models of rabbit venous and arterio-venous thrombosis. Thromb Haemostasis, 1997, 77(6): 1143-7.

[30]Sato K, Kaku S, Hirayama F, et al. Antithrombotic effect of YM-72466 is separated from its effect on bleeding time and coagulation time. Eur J Pharmacol, 1998, 352(1): 59-63.

[31]Yamazaki M, Asakura H, Aoshima K, et al. Effects of DX-9065a, an orally active, newly synthesized and specific inhibitor of factor Xa, against experimental disseminated intravascular coagulation in rats. Thromb Haemost, 1994, 72(3): 393-6.

[32]Wessler S. Studies in intravascular coagulation and coagulation changes in isolated venous segments. J Clin Invest, 1952, 31(11): 1011-4.

[33]Gold HK, Yasuda T, Jang I, et al. Animal models for arterial thrombolysis and prevention of reocclusion. Circulation, 1991, 83(6 suppl): Ⅳ26-40.

[34]Leadley RJ, Chi L, Rebello SS, et al. Contributionof in vivo models of thrombosis to the discovery and development of novel antithrombotic agents. J Pharmacol Toxicol Methods, 2000, 43(2): 101-16.

[35]Folts JD, Crowell EB, Rowe GG. Platelet aggregation in partially obstructed vessels and its elimination with aspirin. Circulation, 1976, 54(3): 365-70.

[36]Smith JM, Shebuski RJ. Lack of an inhibitory effect of tissue plasminogen activator (tPA) on platelet aggregation in vivo. FASEB J, 1988, 2: A1164.

[37]Blair E, Nygren E, Cowley RA. A spiral wire technique for pro-ducing gradually occlusive coronary thrombosis. J Thorac Cardiovasc Surg, 1964, 48: 476-85.

[38]Bergmann SR, Fox KA, TerPogossian MM, et al. Clot-selective coronary thrombolysis with tissue-type plasminogen activator. Science, 1983, 220(4602): 1181-3.

[39]Marsh-Leidy E, Stern AM, Friedman PA, et al. Enhanced thrombolysis by a factor XIIIa inhibitor in a rabbit model of femoral artery thrombosis. Thromb Res, 1990, 59(1): 15-26.

[40]Golino P, Ashton JH, Glas-Greenwalt P, et al. Mediation of reocclusion by thromboxane A2 and serotonin after thrombolysis with tissue-type plasminogen activator in a canine preparation of coronary thrombosis. Circulation, 1988, 77(3): 678-84.

[41]Bergmann SR, Lerch RA, Ludbrook PA, et al. Temporal dependence of beneficial effects of coronary thrombolysis characterized by positron tomography. Am J Med, 1982, 73(4): 573-81.

[42]Van Der WF, Jang IK, Cohen D. Thrombolysis with recombinant human single chain urokinase-type plasminogen activator (rscu-PA): dose-response in dogs with coronary artery thrombosis. J Cardiovasc Pharmacol, 1987, 9(1): 91-3.

[43]Mellott MJ, Connolly TM, York SJ, et al. Prevention of reocclusion by MCI-9038, a thrombin inhibitor, following t-PA induced thrombolysis in a canine model of femoral arterial thrombolysis. Thromb Haemost, 1990, 64(4): 526-34.

[44]Salazar AE. Experimental myocardial infarction, induction of coronary thrombosis in the intact closed-chest dog. Circ Res, 1961, 9: 135-6.

[45]Romson JL, Haack DW, Lucchesi BR. Electrical induction of coronary artery thrombosis in the ambulatory canine: a model for in vivo evalua- tion of antithrombotic agents. Thromb Res, 1980, 17(6): 841-53.

[46]Simpson PJ, Smith JB, et al. Reduction in the incidence of thrombosis by the thromboxane synthetase inhibitor CGS 13080 in a canine model of coronary artery injury. J Pharmacol Exp Ther, 1986, 238(2): 497-501.

[47]Shea MJ, Driscoll EM, Romson JL, et al. Effects of OKY 1581, a thromboxane synthetase inhibitor, on coronary

thrombosis in the conscious dog. Eur J Pharmacol, 1984, 105(3-4): 285-91.

[48]Schumacher WA, Lucchesi BR. Effect of the thromboxane synthetase inhibitor UK 37 248 (Dazoxiben) upon platelet aggregation, coronary artery thrombosis and vascular reactivity. J Pharmacol Exp Ther, 1983, 227(3): 790-6.

[49]Hook BG, Schumacher WA, Lee DL, et al. Experimental coronary artery thrombosis in the absence of thromboxane A2 synthesis: evidence for alternate pathways for coronary thrombosis. J Cardiovasc Pharmacol, 1985, 7(1): 174-81.

[50]Freret T, Bouet V, Toutain J, et al. Intraluminal thread model of focal stroke in the non-human primate. J Cereb Blood Flow Metab, 2008, 28(4): 786-96.

[51]徐林，张云，梁斌，等．实验动物树鼩和人类疾病的树鼩模型研究概述．动物学研究，2013，34（2）：59–69.



Tree shrews

# 第二十七章 树鼩代谢性疾病模型

第二篇 疾病树鼩模型
TREE SHREW ANIMAL MODELS

吴晓云 张林强 梁 斌

代谢综合征（metabolic syndrome）是指合并有腹部肥胖、血脂异常、高血压、胰岛素抵抗等多种代谢异常的代谢紊乱症候群。它是包括2型糖尿病（T2DM）、心血管疾病（CVD）及癌症在内的几种人类重大复杂疾病的最大危险因子。全球约有1/4的成年人患有代谢综合征，其发病率呈快速上升趋势。中国的超重和肥胖人口已达2.6亿，高血压人口1.6亿，血脂异常人口1.6亿，2型糖尿病患者超过1.4亿，已经成为世界第一糖尿病大国[1]。代谢综合征不仅严重影响亿万人民的健康和生命，同时造成巨大的生产损失和国民经济负担。

由于社会伦理和道德的制约，代谢性疾病发病机理及治疗手段的研究离不开实验动物和模式动物。秀丽线虫、果蝇、大鼠、小鼠是经典的研究人类代谢性疾病的模式动物，树鼩作为一种新型的实验动物，能否成为人类代谢综合征、糖尿病、非酒精性脂肪肝、高血压、动脉粥样硬化等代谢性疾病模型呢?

## 第一节 树鼩糖尿病动物模型

糖尿病是一种以高血糖为主要标志的代谢性疾病，它是由于遗传因素和环境因素或它们间的相互作用，出现胰岛素抵抗和胰岛β细胞功能失常引起的相对胰岛素不足。目前，全世界患糖尿病的人数约为2.85亿，预计未来20年的发病率将增长1倍[2]。最新研究数据表明，我国患糖尿病的人数已超过1亿，糖尿病前期患病人数接近5亿，成为全球糖尿病人最多的国家[1, 3]。糖尿病患病率的快速增长不仅严重危害着我国以及全世界人民的生命健康，而且给个人和家庭带来巨大的经济损失。糖尿病主要分为1型糖尿病（胰岛素依赖型）和2型糖尿病（非胰岛素依赖型）。一般认为，1型糖尿病源于自身免疫系统的紊乱，即胰岛内分泌胰岛素的β细胞被体内免疫系统攻击而凋亡，导致胰岛素的缺乏。1型糖尿病发病较早（大多＜16岁），发病急，症状明显，消瘦，常见酮症，依赖胰岛素治疗，易出现酮症酸中毒等急性并发症。2型糖尿病则是一种典型的代谢紊乱，以

出现胰岛素抵抗和胰岛β细胞功能失常引起的相对胰岛素不足为特征。2型糖尿病是糖尿病的最主要类型，占糖尿病人群的90%以上。2型糖尿病大多在40岁以后发病，发病较缓，超重和肥胖居多，无酮症，不依赖于胰岛素治疗，易出现循环系统并发症。

## 一、树鼩自发糖尿病

1966年，Rabb等在2只菲律宾树鼩（*Urogale everetti*）中观察到自发糖尿病，这些树鼩的发病表型如酮症、脱发、白内障等和人类糖尿病的表型一致；病理学检查显示胰腺小岛的β细胞缺失，被纤维细胞代替，这与人类糖尿病的发病机理一致。但菲律宾树鼩和中缅树鼩（*Tupaia belangeri chinensis*）分属不同属，可能存在一定的差异。

2011年，我们对饲养在中国科学院昆明动物研究所动物实验中心及昆明医科大学实验动物中心的1000多只树鼩进行了自发糖尿病筛选。我们对首次血糖测定值高于5.5mmol/L的动物再经过3～4次的血糖监测，发现有6只树鼩的血糖在4次检测中都偏高。通过进一步的生理生化指标检测发现这6只树鼩的糖化血红蛋白、甘油三酯和低密度脂蛋白的含量都要高于正常对照动物（表27–1）。对其进行的口服葡萄糖耐量实验显示，与血糖值正常的对照树鼩相比，这6只树鼩的糖耐量高峰后移，表明胰岛素对葡萄糖反应略有迟钝，疑似为2型糖尿病前期发病症状（图27–1）。

表27–1　口服葡萄糖耐量正常和异常树鼩的生理生化指标比较（引自文献46）

| | 对照动物（*n*=12） | 异常动物（*n*=6） | *P* value (T test) |
|---|---|---|---|
| 体重（g） | 127.21 ± 8.87 | 126.58 ± 13.49 | 0.9070 |
| HbA1c (%) | 4.21 ± 0.30 | 4.64 ± 0.36 | 0.0172 |
| TG (mmol/L) | 0.27 ± 0.08 | 0.51 ± 0.18 | ＜0.001 |
| TC (mmol/L) | 1.51 ± 0.40 | 1.90 ± 0.71 | 0.1524 |
| HDL (mmol/L) | 1.04 ± 0.19 | 1.06 ± 0.21 | 0.7486 |
| LDL (mmol/L) | 0.23 ± 0.07 | 0.52 ± 0.39 | 0.0226 |

HbA1c：糖化血红蛋白；TG：甘油三酯；TC：总胆固醇；LDL：低密度脂蛋白；HDL：高密度脂蛋白。（引自文献8）

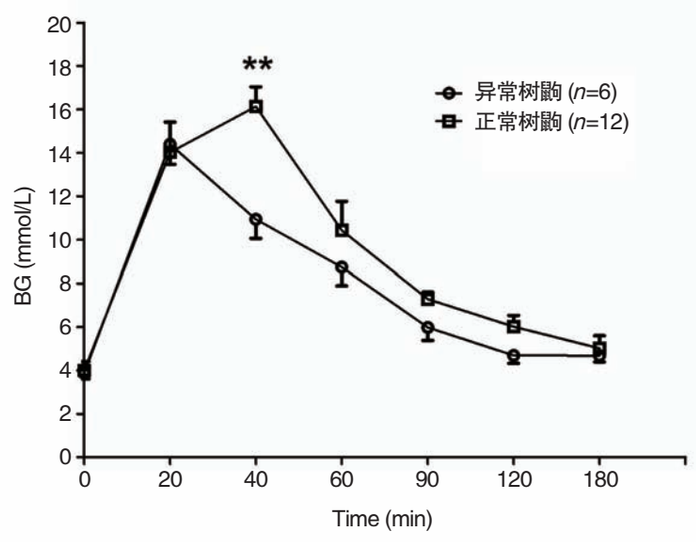



**图27–1　血糖正常树鼩与异常树鼩的口服葡萄糖耐量曲线，BG：血糖浓度（blood glucose）**
（引自文献46）

在随后的一年里，我们对这6只动物进行了3次糖耐量试验监测，发现其中编号为101的动物在3次检测中均表现为明显的糖耐量受损（图27–2）。随后，我们在2011年和2013年期间跟踪了101号树鼩，发现其血液中血糖、糖化血红蛋白和总胆固醇含量都出现逐年升高趋势，并且明显高于正常树鼩[4]，表明101树鼩可能出现2型糖尿病症状（表27–2）。

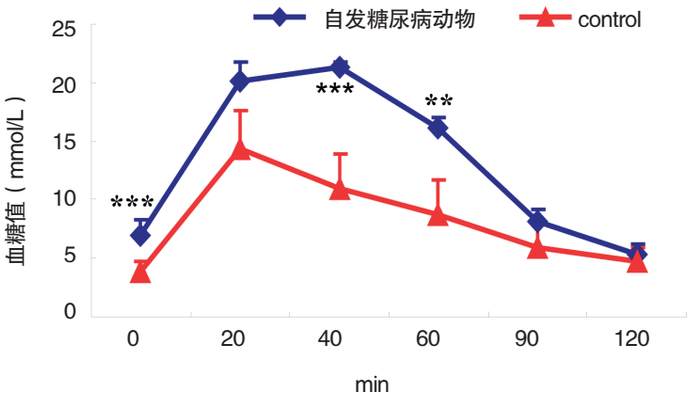



**图27–2　101树鼩葡萄糖耐量试验**
（实验结果为3次糖耐量的平均值）

表27–2　101树鼩血液生理生化指标检测

| 检测时间 | BW (g) | GLU (mmol/L) | HbA1c (%) | TG (mmol/L) | CHOL (mmol/L) | HDL–C (mmol/L) | LDL–C (mmol/L) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 2011年 | 161.75 ± 18.03 | 4.55 ± 1.20 | 4.84 ± 0.11 | 0.52 ± 0.23 | 1.48 ± 0.35 | 1.12 ± 0.16 | 0.23 ± 0.01 |
| 2013年 | 161.50 ± 5.77 | 6.13 ± 1.79 | 5.88 ± 0.62 | 0.45 ± 0.08 | 1.81 ± 0.24 | 1.18 ± 0.16 | 0.19 ± 0.04 |

BW：体重；GLU：空腹血糖；HbA1c：糖化血红蛋白；TG：甘油三酯；CHOL：总胆固醇；LDL–C：低密度脂蛋白；HDL–C：高密度脂蛋白。

## 二、树鼩1型糖尿病动物模型

链脲佐菌素（streptozotocin, STZ）被广泛用于糖尿病动物模型的创建。STZ主要通过诱导产生大量的氧自由基造成胰腺β细胞受损，胰岛素合成减少，引发糖尿病。STZ对β细胞有很强的选择杀伤作用，能够诱导大鼠、豚鼠、小鼠、地鼠、兔、犬、猴等动物产生糖尿病[4]。

在1997年和2000年，Ishiko等[5]和冼苏等[6]就使用了不同剂量的STZ来诱导树鼩糖尿病。Ishiko等[5]所使用的STZ剂量大于300mg/kg可以诱导树鼩出现糖尿病症状，并在一周后出现糖尿病早期眼部病变。而冼苏等[6]所使用的STZ剂量为120～150mg/kg可诱导树鼩出现糖尿病症状，糖尿病树鼩表现为高血糖、多饮、多食、消瘦等糖尿病症状。其胰腺病理组织学显示胰岛数量较正常树鼩明显减少，肿胀，残存的胰岛可见少量出血，坏死灶。醛复红染色可见数量不等的β细胞脱颗粒，甚至无紫红色颗粒；淀粉染色阳性。电镜下胰岛中未见或仅见少量异常的β细胞，可见明显的β细胞脱颗粒或颗粒变性；细胞质疏松，空泡样变，线粒体肿胀变形。嵴断裂、基质空化等。Ishiko等[5]和冼苏等[6]报道的树鼩糖尿病模型从发病特征来看，更类似于1型糖尿病。

## 三、树鼩2型糖尿病动物模型

2010年，李海燕等[7]报道使用高糖高脂食物［含白砂糖30%，精炼猪油10%，蛋白质10%（鸡蛋+奶粉），甲基硫氧嘧啶5片/kg饲料，胆氨酸1%和自行配制的基础营养饲料49%］，联合多次注射地塞米松注射液能够在短时间内诱发树鼩血糖升高，体重降低，同时发生脂代谢紊乱，

糖耐量异常。他们的研究结果为进一步建立树鼩胰岛素抵抗和2型糖尿病模型提供了一定的研究基础。

2013年，吴晓云等[8]报道使用2～3次小剂量注射STZ（60mg/kg、70mg/kg和80mg/kg）诱导树鼩出现类似2型糖尿病症状。他们将24只树鼩随机分为对照组（A–con），60mg/kg（A–60）、70mg/kg（A–70）和80mg/kg（A–80）剂量STZ诱导组。注射STZ后，成模树鼩出现明显的多饮、多食和多尿症状，但平均体重未减轻（图27–3A）。各实验组成模动物持续8～16周高血糖，尿糖显著阳性。注射不同剂量STZ的3个组动物的平均空腹血糖在注射一周后，平均空腹血糖值出现大幅上升，其中A–60组动物在STZ注射后8周的平均空腹血糖值为（14.23 ± 4.15）mmol/L；A–70和A–80组动物在STZ注射后16周的平均空腹血糖值分别为（15.10 ± 5.33）mmol/L和（16.54 ± 4.95）mmol/L，与对照组相比均出现显著性升高（$P<0.0001$）（图27–3B）。

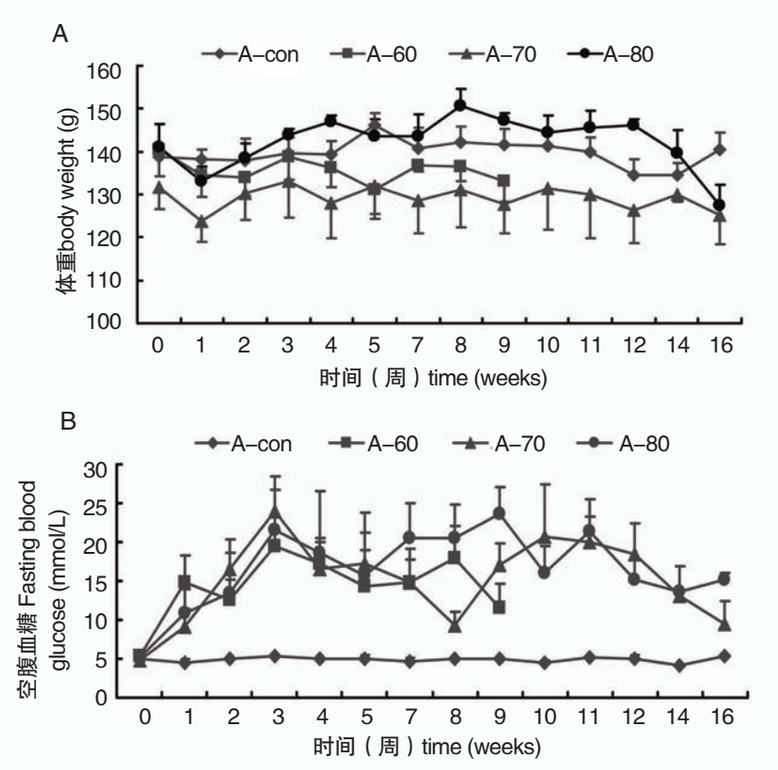



**图27–3　各组树鼩体重（A）和空腹血糖（B）变化趋势**
（引自文献8）

## （一）口服葡萄糖耐量试验和胰岛素耐量试验

注射STZ的各组动物表现为显著地葡萄糖不耐受。4周时口服葡萄糖耐量试验显示，A–60、A–70和A–80动物在饲喂葡萄糖后的20分钟、40分钟、60分钟和90分钟出现明显的高血糖，远高于A–con组动物，且A–con组动物的峰值出现在20分钟，而A–60、A–70和A–80动物组动物的口服葡萄糖耐量的峰值均出现在40分钟，表现为波峰延迟（图27–4A）。另外，糖耐量曲线下面积在A–60（74.43 ± 12.18）、A–70（76.93 ± 13.67）和A–80（77.77 ± 14.38）组显著高于A–con组（46.57 ± 3.09）（$P<0.05$）（图27–4B），

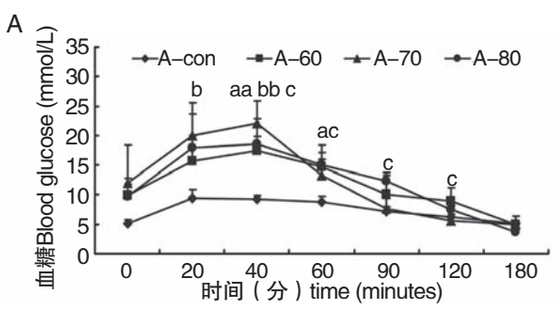



**图27–4（a）　4周（A、B）和10周（C、D）时，各组口服糖耐量实验曲线（A、C）及曲线下面积（B、D）**
*：$P<0.05$，**：$P<0.01$，***：$P<0.001$；a：A–60 vs A–con；b：A–70 vs A–con；c：A–80 vs A–con。（引自文献8）

各组均表现出显著的葡萄糖耐量受损。到10周时，A–60组动物在成模动物意外死亡，转阴动物的口服葡萄糖耐量曲线仍显示不正常。而A–70和A–80组动物在各个时间点的血糖值均显著高于对照组，A–80组动物的峰值仍出现在40分钟（图27–4C）。糖耐量曲线下面积也显示A–70组（130.4 ± 24.32）和A–80组（130.55 ± 4.76）显著高于A–con（67.33 ± 6.65）和A–60组（61.58 ± 1.81）（图27–4D），表现出显著的糖耐量受损。

在胰岛素耐量试验中，A–60和A–70动物的血糖下降幅度虽高于对照组，但均不显著（$P>0.05$），A–80动物的血糖下降幅度在30分钟、60分钟和90分钟显著高于对照组（$P<0.05$）（图27–5），表现为一定程度的胰岛素分泌不足。

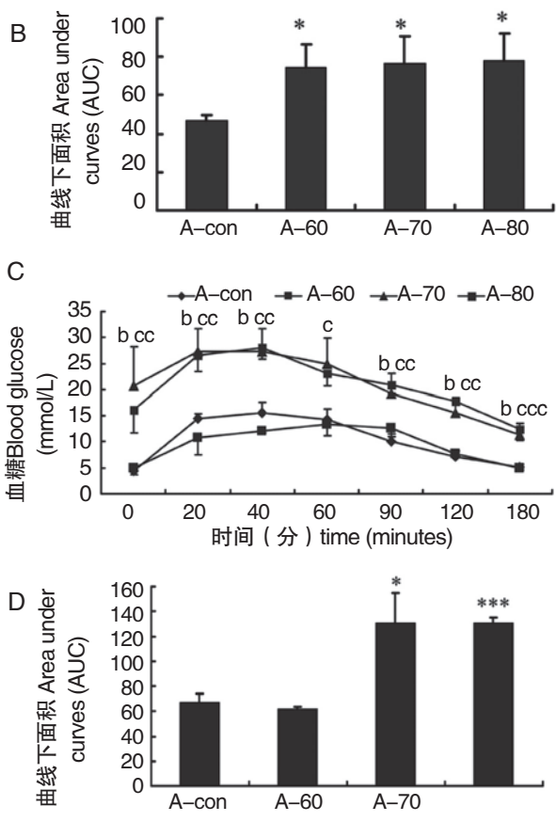



**图27–4（b） 4周（A、B）和10周（C、D）时，各组口服糖耐量实验曲线（A、C）及曲线下面积（B、D）**

*：$P<0.05$，**：$P<0.01$，***：$P<0.001$；a：A–60 vs A–con；b：A–70 vs A–con；c：A–80 vs A–con。（引自文献8）

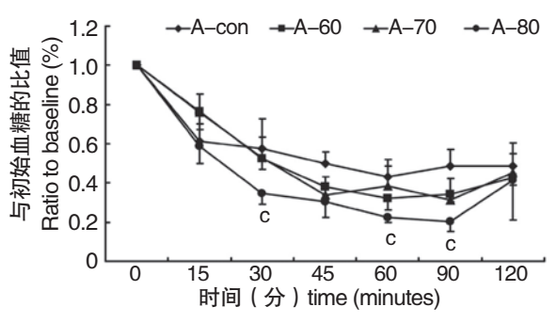



**图27–5 5周时，各组胰岛素耐量曲线**

*：$P<0.05$；c：A–80 vs A–con。（引自文献8）

## （二）血液生理生化指标

1. 糖、脂及胆固醇代谢变化

成模动物出现明显糖脂代谢紊乱。A–60、A–70和A–80组动物的糖化血红蛋白含量在STZ注射后的4周、8周和16周，与注射前及A–con组动物相比都发生了显著的升高（$P<0.05$）；在A–70和A–80组动物，这个指标增加了约2～3倍。A–60和A–70组动物的甘油三酯的含量在STZ注射后4周［分别为（0.87 ± 0.33）mmol/L和（0.73 ± 0.24）mmol/L］与注射前相比有显著升高（$P<0.05$）。A–70组动物的甘油三酯的含量在16周时（0.35 ± 0.14）mmol/L显著下降（$P<0.05$）。和注射前的A–con组动物相比，A–80组动物的甘油三酯含量在8周时出现显著升高［（0.85 ± 0.35）mmol/L，$P<0.05$］。

A–70组动物的总胆固醇含量仅在STZ注射后4周比A–con组显著增高［（2.35 ± 0.55）mmol/L，$P<0.05$］。A–80组动物的总胆固醇含量在STZ注射后，和A–con和注射前先比都有升高，但仅在4周时显著［（2.19 ± 0.12）mmol/L，$P<0.05$］（表27–3）。

2. 肾功能分析

成模动物肾功能出现显著受损。血尿素氮含量是反映肾功能的指标之一。尿素氮的含量在注

射不同剂量的STZ后都出现大幅升高。A–60组的尿素氮平均值在4周时和8周时都比注射前升高了约6mol/L，在4周时显著升高［（10.98 ± 4.39）mmol/L，$P<0.05$）］。A–70和A–80组动物在STZ注射后16周，尿素氮含量值都比注射前显著升高了约2～3倍（$P<0.05$）（表27–3）。

另外，在我们分别取8周时对照组动物和成模动物尿液，检测动物是否出现糖尿病肾病并发症（表27–4）。尿糖含量在成模动物中均为“++++”，而A–con组动物没有检测到尿糖。在所有动物中均未检测到酮体存在，表明树鼩糖尿病不是1型糖尿病。成模动物组尿微量白蛋白的含量约为对照组动物的3倍，而尿肌酐在成模动物和对照组没有显著变化（$P<0.05$）。尿微量白蛋白/尿肌酐的比值在成模动物中约为对照组动物的5倍。

表27–3　STZ不同造模时期血液生理生化指标检测（引自文献8）

| | 0周<br>（0 week） | 4周<br>（4 week） | 8周<br>（8 week） | 12周<br>（12 week） | 16周<br>（16 week） |
|---|---|---|---|---|---|
| 血糖 GLU (mmol/L) | | | | | |
| A–con | 3.53 ± 1.03 | 5.28 ± 0.67* | 4.98 ± 0.65* | 4.98 ± 1.28 | 4.64 ± 0.38* |
| A–60 | 4.00 ± 1.41 | 19.44 ± 4.56*# | 17.86 ± 9.94*# | | |
| A–70 | 5.12 ± 1.86 | 24.05 ± 9.56*# | 9.38 ± 3.67*# | 18.38 ± 8.66*# | 9.40 ± 6.78 |
| A–80 | 4.72 ± 1.20 | 21.63 ± 10.95*# | 20.48 ± 9.39*# | 15.13 ± 5.84*# | 23.60 ± 14.71*# |
| 糖化血红蛋白 HbA1c (%) | | | | | |
| A–con | 4.55 ± 0.18 | 5.35 ± 0.15* | 4.51 ± 0.21 | 4.77 ± 0.24 | 4.40 ± 0.14 |
| A–60 | 4.25 ± 0.32 | 7.78 ± 1.46*# | 7.15 ± 2.29# | | |
| A–70 | 4.52 ± 0.80 | 9.05 ± 0.78*# | 10.53 ± 2.98*# | 10.85 ± 2.72*# | 12.47 ± 3.02*# |
| A–80 | 4.73 ± 0.61 | 8.45 ± 1.23*# | 10.84 ± 2.32*# | 12.10 ± 2.74*# | 14.09 ± 2.96*# |
| 总蛋白 TP (g/L) | | | | | |
| A–con | 66.00 ± 6.93 | 62.33 ± 5.13 | 63.67 ± 2.66 | 64.67 ± 3.01 | 61.17 ± 1.60 |
| A–60 | 67.50 ± 5.32 | 68.00 ± 4.06 | 67.80 ± 3.03# | | |
| A–70 | 68.00 ± 5.83 | 68.25 ± 4.57 | 68.00 ± 2.94# | 68.25 ± 4.19 | 60.67 ± 2.08 |
| A–80 | 63.17 ± 15.56 | 70.25 ± 4.50# | 71.50 ± 4.04# | 67.00 ± 3.46 | 72.00 ± 13.89 |
| 白蛋白 ALB (g/L) | | | | | |
| A–con | 28.00 ± 5.02 | 24.17 ± 1.94 | 25.33 ± 1.86 | 24.67 ± 2.66 | 22.67 ± 1.63* |
| A–60 | 29.50 ± 6.41 | 25.40 ± 4.04 | 25.00 ± 2.83 | | |
| A–70 | 30.17 ± 7.03 | 29.75 ± 1.89# | 24.50 ± 1.73 | 26.50 ± 1.73 | 23.33 ± 0.58 |
| A–80 | 26.00 ± 7.24 | 28.00 ± 3.16# | 29.50 ± 1.91# | 28.33 ± 3.21 | 26.33 ± 7.51 |
| 球蛋白 GLOB (g/L) | | | | | |
| A–con | 38.00 ± 3.03 | 38.17 ± 5.81 | 38.33 ± 3.72 | 40.00 ± 4.56 | 38.50 ± 1.97 |
| A–60 | 38.00 ± 4.38 | 42.60 ± 4.83 | 42.80 ± 1.10*# | | |
| A–70 | 37.83 ± 2.79 | 38.50 ± 5.51 | 43.50 ± 3.42* | 41.75 ± 3.59 | 37.33 ± 2.52 |
| A–80 | 37.17 ± 10.05 | 42.25 ± 5.12 | 42.00 ± 4.24 | 38.67 ± 0.58 | 45.67 ± 6.43# |
| 甘油三酯 TG (mmol/L) | | | | | |
| A–con | 0.37 ± 0.17 | 0.55 ± 0.19 | 0.51 ± 0.12 | 0.38 ± 0.10 | 0.48 ± 0.11 |
| A–60 | 0.47 ± 0.23 | 0.87 ± 0.33* | 0.63 ± 0.19 | | |
| A–70 | 0.44 ± 0.10 | 0.73 ± 0.24* | 0.50 ± 0.19 | 0.35 ± 0.14 | 0.23 ± 0.12* |
| A–80 | 0.42 ± 0.21 | 0.68 ± 0.19 | 0.85 ± 0.35* | 0.53 ± 0.16 | 0.50 ± 0.33 |

续表27-3

| | 0周<br>( 0 week ) | 4周<br>( 4 week ) | 8周<br>( 8 week ) | 12周<br>( 12 week ) | 16周<br>( 16 week ) |
|---|---|---|---|---|---|
| 总胆固醇 TCHOL (mmol/L) | | | | | |
| A-con | 1.90 ± 0.50 | 1.89 ± 0.19 | 2.01 ± 0.35 | 1.89 ± 0.32 | 1.84 ± 0.24 |
| A-60 | 2.14 ± 0.55 | 2.04 ± 0.42 | 1.81 ± 0.23 | | |
| A-70 | 2.12 ± 0.28 | 2.53 ± 0.55# | 2.20 ± 0.66 | 2.52 ± 0.63 | 2.35 ± 0.71 |
| A-80 | 1.90 ± 0.22 | 2.19 ± 0.12*# | 2.26 ± 0.37 | 2.09 ± 0.02 | 3.39 ± 1.51# |
| 尿素氮 BUN (mmol/L) | | | | | |
| A-con | 6.85 ± 2.36 | 7.72 ± 2.18 | 6.38 ± 1.49 | 7.12 ± 0.85 | 5.35 ± 1.33 |
| A-60 | 4.37 ± 2.76 | 10.98 ± 4.39 | 10.20 ± 6.18 | | |
| A-70 | 3.52 ± 1.92 | 12.58 ± 4.43*# | 10.25 ± 4.70 | 10.30 ± 5.05 | 15.73 ± 6.96*# |
| A-80 | 4.11 ± 2.41 | 15.10 ± 2.52*# | 9.40 ± 1.44*# | 8.77 ± 3.19 | 21.03 ± 15.89*# |
| 乳酸 LAC (mmol/L) | | | | | |
| A-con | 7.98 ± 1.46 | 7.32 ± 2.37 | 6.23 ± 1.14* | 6.10 ± 0.88* | 6.30 ± 1.29 |
| A-60 | 7.32 ± 4.87 | 7.26 ± 1.82 | 7.00 ± 1.95 | | |
| A-70 | 6.56 ± 5.29 | 7.58 ± 2.32 | 5.43 ± 2.33 | 6.95 ± 1.34 | 3.50 ± 0.61# |
| A-80 | 6.04 ± 3.61 | 6.20 ± 2.19 | 5.93 ± 1.29 | 4.97 ± 3.04 | 4.87 ± 1.10 |
| 钠 $Na^+$ (mmol/L) | | | | | |
| A-con | 146.83 ± 2.64 | 172.83 ± 6.91* | 172.50 ± 7.26* | 176.40 ± 9.84* | 176.67 ± 10.78* |
| A-60 | 157.00 ± 12.03 | 174.60 ± 9.32* | 178.60 ± 12.20* | | |
| A-70 | 170.20 ± 23.25 | 175.67 ± 8.33 | 185.00 ± 8.29 | 181.00 ± 5.94 | 166.00 ± 1.73 |
| A-80 | 165.50 ± 10.12 | 178.75 ± 15.86 | 165.00 ± 3.74∞ | 170.67 ± 2.08∞ | 180.33 ± 17.10 |
| 钾 $K^+$ (mmol/L) | | | | | |
| A-con | 8.47 ± 0.85 | 7.03 ± 0.96* | 6.25 ± 0.98* | 6.73 ± 1.23* | 6.22 ± 0.68* |
| A-60 | 7.60 ± 2.03 | 6.68 ± 0.82 | 5.72 ± 0.85 | | |
| A-70 | 7.46 ± 1.82 | 5.48 ± 0.88# | 5.73 ± 0.67 | 5.60 ± 0.82 | 6.23 ± 0.25 |
| A-80 | 7.80 ± 1.47 | 5.73 ± 0.93 | 4.60 ± 0.70*# | 5.63 ± 0.72 | 6.70 ± 1.11 |

*：$P<0.05$，与0周时基础值相比；#：$P<0.05$，与对照相比；∞：$P<0.05$，A-70组和A-80组相比。

表27-4　成模动物尿液指标检测（引自文献8）

| | 尿糖<br>uGLU | 酮体<br>KET | 尿微量白蛋白MA<br>(mg/L) | 尿肌酐uCREA<br>( μmol/L) | 尿微量白蛋白/尿肌酐<br>MA/uCREA ( μg/ μmol) |
|---|---|---|---|---|---|
| 对照动物 | – | – | 5.04 ± 2.95 | 1982.5 ± 819.56 | 2.47 ± 0.82 |
| 成模动物 | ++++ | – | 16.03 ± 3.87*** | 1417.00 ± 245.66 | 11.31 ± 1.81*** |

***：$P<0.001$。

3. 乳酸及渗透压变化

为检验STZ注射后，动物是否出现糖尿病乳酸中毒和高血糖高渗，我们检测了乳酸、血钠和血钾的含量（表27-3）。这3个指标在对照组和STZ注射组呈现相同的趋势。比如乳酸的含量在对照组中降低，在STZ处理组也降低；血钠的值在各组中均升高，血钾值均降低。这些结果表明成模动物未出现糖尿病乳酸中毒和高血糖高渗等并发症。

综上所述，使用多次小剂量STZ注射创建的树鼩糖尿病发病症状更类似于2型糖尿病。前人的

经验表明多次小剂量的STZ注射可以部分破坏胰岛β细胞，并引起巨噬细胞和淋巴细胞浸润等炎症反应，最终引起胰岛素分泌不足[9]。因此，糖耐量试验和胰岛素耐量试验的结果分别显示树鼩注射STZ后出现糖耐受受损和胰岛素相对分泌不足（图27–4和图27–5）。在树鼩注射STZ后，虽出现多饮、多食和多尿症状，但是除A–80组动物在16周出现体重下降，动物在整个实验过程中，体重均维持稳定（图27–3A）。另外，尿液中是否存在酮体也是区别1型糖尿病和2型糖尿病的重要指标[10]。在我们的试验中，STZ注射组树鼩的尿液检测分析都没有发现酮体阳性。而且，对乳酸、血钠、血钾水平的检测与同时期对照组动物相比都没有显著变化，也没有发现成模动物出现明显的血糖高渗状态和乳酸性中毒（表27–3）。这些结果均表明使用多次小剂量注射STZ诱导的树鼩糖尿病症状与1型糖尿病症状不相似，而更类似于2型糖尿病症状。

## 第二节 树鼩非酒精性脂肪肝模型

非酒精性脂肪肝病（non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD）是指除酒精外由其它因素所致的肝细胞内以脂肪过度沉积为主要特征的临床病理综合征。非酒精性脂肪肝病的组织病理学特征和酒精性脂肪肝病十分相似，其病程涵盖了简单的脂肪变性（即单纯性脂肪肝）、脂肪性肝炎、纤维化以及肝硬化等阶段[11, 12]。在脂肪变性，即脂肪肝阶段，该病的最主要特征就是肝脏脂肪积累，大量的甘油三酯（triglyceride, TG）以脂滴（lipid droplet）的形式积累在肝脏中，引起肝脏损伤。

非酒精性脂肪肝病实际上是一种代谢综合征，肥胖（包括腹部肥胖）、胰岛素抵抗、高血糖、高血脂、高血压以及2型糖尿病等都是可能引起非酒精性脂肪肝病的危险因子[13~15]。当然，并非所有具有代谢综合征危险因子的人就会形成脂肪肝，而且也不是所有的脂肪肝患者会发展成为脂肪性肝炎以及肝硬化等[13]。值得注意的是，即使没有表现出这些危险因子的人也有可能会患上脂肪肝[16]。在对脂肪肝的临床诊断过程中，血液生理生化指标是最常用的，包括转氨酶和血脂等，其中转氨酶常用有天冬氨酸氨基转移酶（aspartate aminotransferase, AST）和丙氨酸氨基转移酶（alanine aminotransferase, ALT），血脂包括胆固醇（cholesterol, CHOL）、甘油三酯（TG）、高密度脂蛋白胆固醇（high density lipoprotein-cholesterol, HDL-C）以及低密度脂蛋白胆固醇（low density lipoprotein-cholesterol, LDL-C）等。当然，最真实可靠的判断则是来自于肝脏组织切片观察。

近年来，随着社会经济的发展，人们的生活水平不断提高，由于高糖高脂食物摄入增加、工作多坐少动、激素食品泛滥等因素，使非酒精性脂肪肝病发病率逐年增高，脂肪肝病已经发展成为仅次于病毒性肝炎的第二大肝脏疾病[17]，非酒精性脂肪肝已成为一个世界性的公共健康问题[16]，得到日益增多的关注[15]。就全球而言，在发达国家，非酒精性脂肪肝在成人中广泛流行，大约影响着1/3成人的健康[12]，并逐渐呈现低龄化趋势[18, 19]。在中国，12%～24%的中国人群患有脂肪肝，且亦呈上升趋势[20]和低龄化趋势[21]。

### 一、高热量食物诱导的树鼩非酒精性脂肪肝

我们利用高脂饲料、高糖饲料以及高脂高糖饲料来诱导树鼩非酒精性脂肪肝，成功建立了非酒精性脂肪肝的树鼩模型。该实验设计如下：选取28只雄性成年树鼩饲养于温度（25℃）和湿度

（30%～60%）相对恒定的环境中，每天光照时间为12小时。将树鼩平均分为4组，设置为对照组、高脂组、高糖组和高脂高糖组，分别饲喂以对照饲料、高脂饲料、高糖饲料以及高脂高糖饲料，所有动物自由进食饮水。食物诱导8周以后，将动物禁食8～12小时，然后处死，对各组树鼩采血检测血液生理生化指标，并取肝脏标本通过HE染色观察肝脏组织切片的变化。

### （一）血液转氨酶变化

食物诱导8周以后，在各个组中检测反映肝损伤程度的两个重要指标天冬氨酸氨基转移酶（AST）和丙氨酸氨基转移酶（ALT）如下：高脂组中，这两个值分别为（667.5±152.1）U/L和（670.0±111.8）U/L；高糖组中，这两个值分别为（488.3±120.6）U/L和（495.0±112.3）U/L，均高于对照组的（280.0±113.6）U/L和（218.0±120.5）U/L，但都没有达到统计学意义上的显著性差异（$P>0.05$）；在高脂高糖组中，这两个值分别为（817.2±69.07）U/L和（810.7±131.3）U/L，和对照组相比达到了显著的差异（$P<0.05$）（图27–6）。这些结果说明经这些食物诱导8周之后，树鼩的肝脏受到了不同程度的损伤，并且尤以高脂高糖食物的影响为甚。

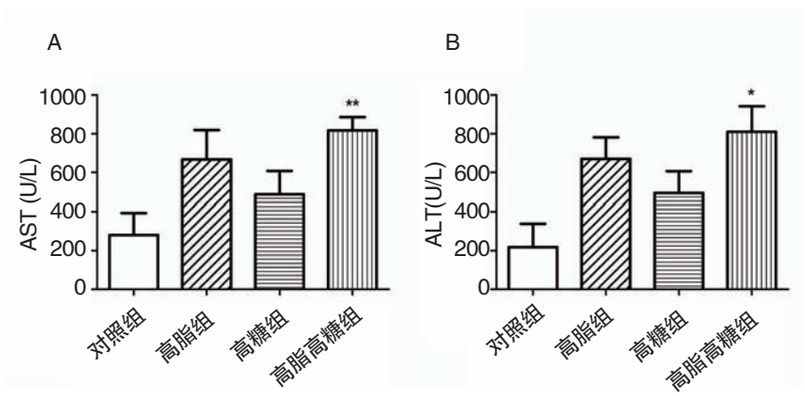



**图27–6　食物诱导8周以后各组树鼩血液转氨酶浓度**

### （二）血液脂类水平变化

对于血脂水平而言，胆固醇方面，不论

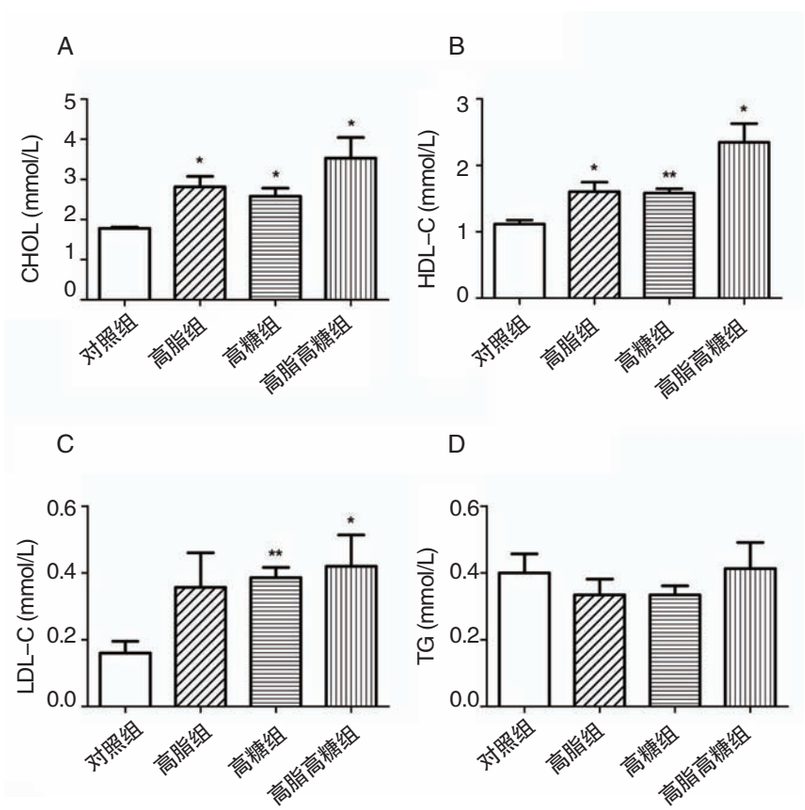



**图27–7　食物诱导8周以后各组树鼩血脂水平**

是血液游离胆固醇，还是高密度脂蛋白胆固醇（HDL-C）或低密度脂蛋白胆固醇（LDL-C），在高脂组、高糖组和高脂高糖组中都表现出比对照组明显的升高。游离胆固醇在对照组、高脂组、高糖组和高脂高糖组中的值分别为（1.78 ± 0.03）mmol/L、（2.82 ± 0.26）mmol/L、（2.58 ± 0.20）mmol/L和（3.53 ± 0.52）mmol/L，和对照组相比其余3组均达到了显著性差异（$P<0.05$）；高密度脂蛋白胆固醇在4组中的值分别为（1.12 ± 0.06）mmol/L、（1.60 ± 0.15）mmol/L、（1.58 ± 0.07）mmol/L和（2.35 ± 0.28）mmol/L，和对照组相比，高脂组和高脂高糖组达到了显著性差异（$P<0.05$），高糖组达到了极显著性差异（$P<0.01$）；低密度脂蛋白胆固醇在4组中的值分别为（0.16 ± 0.04）mmol/L、（0.36 ± 0.10）mmol/L、（0.39 ± 0.03）mmol/L和（0.42 ± 0.09）mmol/L，和对照组相比，高脂组虽有升高，但未达到显著性差异，而高糖组和高脂高糖组则分别达到了极显著性差异（$P<0.01$）和显著性差异（$P<0.05$）；甘油三酯（TG）在4组间的值分别为（0.40 ± 0.06）mmol/L、（0.33 ± 0.05）mmol/L、（0.33 ± 0.03）mmol/L和（0.41 ± 0.08）mmol/L，未见明显的差异（图27–7）。血脂的升高说明了在这些树鼩体内脂类代谢出现了紊乱，而且不同的食物组成具有不同的效果。单独饲喂高脂食物和高糖食物会导致树鼩血脂升高，而且这两种食物引起的结果之间差别不大，如果使用高脂高糖食物时，其导致树鼩血脂升高的效果则甚于前两种食物的单独使用。

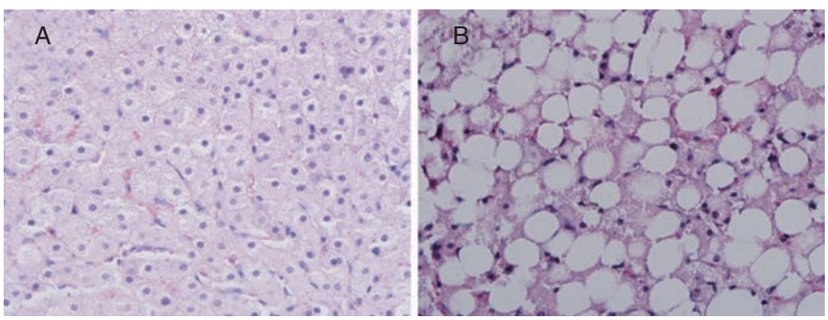



**图27–8　食物诱导8周后树鼩肝脏组织切片**
（HE染色，400×）

### （三）肝脏组织切片

在实验过程中，虽然看到了不同食物诱导下树鼩肝功能和血脂的改变，然而作为诊断脂肪肝的金标准，肝脏组织切片才是最有力的判断证据。肝脏病理切片发现，高脂组、高糖组和高脂高糖组树鼩在经过8周的食物诱导之后，肝脏均不同程度地出现了脂肪积累。在显微镜下观察组织切片发现，其特征是在对照组中，肝细胞之间紧密排列，细胞核位居中央，较大并呈圆形，细胞中观察不到明显的脂滴；而在诱导组中，肝细胞内出现巨大的脂滴，占据了肝细胞的几乎全部空间并将细胞核挤向一边，表现出脂肪肝特征：图27–8，仅展示对照组（图27–8A）和高脂高糖组（图27–8B）树鼩肝脏组织HE染色切片图，其余2组症状与高脂高糖组相同。

根据上述结果可知，利用高脂、高糖或者高脂高糖饲料均可以成功地建立非酒精性脂肪肝树鼩模型，该模型的主要特征是肝功能受损、血液胆固醇浓度升高、肝脏出现脂肪沉积，符合脂肪肝的症状。但是该模型是否能进一步地发展成为脂肪性肝炎甚至肝脏纤维化？以及其发病机制如何？这些问题还需要进一步的研究来回答。

## 二、罗格列酮治疗树鼩非酒精性脂肪肝

在树鼩非酒精性脂肪肝的治疗方面，蒙碧辉等[22]探讨了国产罗格列酮对树鼩肝脏脂肪变性

的保护作用。他们选取了38只树鼩，分出8只饲喂常规饲料作为对照组，另外28只饲喂高糖高脂饲料22周，之后将这28只树鼩中血糖值高于11.1mmol/L的动物再分为两组：药物干预组8只，非干预组11只进行实验。药物干预组以5mg/kg的剂量喂以国产罗格列酮，给药时间为7周。实验发现，在22周时，在血糖方面，和对照组（4.21 ± 0.93）mmol/L相比，药物干预组和非干预组的血糖值分别高达（12.95 ± 1.28）mmol/L和（12.79 ± 2.08）mmol/L，达到了显著性差异。肝脏脂肪变性方面，用脂肪变性面积密度（$\mu m^2$%）和脂肪变性细胞阳性率（%）两个指标来评价，对照组均为阴性，而药物干预组为（28.7 ± 6.3）$\mu m^2$%和（26.8 ± 6.9）%，非干预组为（29.4 ± 7.3）$\mu m^2$%和（28.9 ± 5.8）%，说明药物干预组和非干预组树鼩均出现了肝脏脂肪变性。在29周实验结束时，非干预组树鼩的血糖值仍然高达（12.31 ± 1.47）mmol/L，同时血液甘油三酯、血液自由胆固醇、血液胰岛素水平以及胰岛素抵抗指数也高于对照组。而药物干预组和对照组的血糖则无明显差别，分别为（5.48 ± 1.54）mmol/L和（6.23 ± 1.99）mmol/L，其它指标也与对照组相似。肝脏脂肪变性方面，对照组依然为阴性，药物干预组的脂肪变性面积密度（$\mu m^2$%）和脂肪变性细胞阳性率（%）为（1.9 ± 0.4）$\mu m^2$%和（1.5 ± 0.4）%，与自身药物干预前相比表现出显著性下降，脂肪肝症状减轻；而非干预组的这两个指标则进一步上升，高达（37.3 ± 5.7）$\mu m^2$%和（35.6 ± 9.8）%，表明脂肪肝症状加重。

UCP3是线粒体载体蛋白超家族成员之一，主要表达于骨骼肌组织，其功能之一是与线粒体的硫酯酶–1（mitochondrialthioesterase-1）起协同作用，参与线粒体对FFA的转运和氧化利用过程。正常情况下肝细胞不表达UCP3，但在某些情况下如高脂喂养的大鼠在某些药物如非诺贝特（fenofibrate）的作用下，可诱导肝细胞重新合成UCP3，而且UCP3的表达与肝细胞线粒体硫酯酶表达上调和线粒体β–氧化增强密切相关。在该研究中，研究人员用免疫组化方法发现实验29周时药物干预组肝细胞表达UCP3的范围远大于未用药组。由于UCP3表达程度与肝脂肪变性程度呈负相关，这表明高糖高脂喂养本身即可诱导树鼩肝细胞表达UCP3蛋白，并被罗格列酮所加强。亦有研究表明胰岛素抵抗在脂肪肝形成过程中起重要作用，血液中的高浓度胰岛素与肝脏高表达的胰岛素受体共同作用会导致肝脏脂肪合成增加。研究人员利用免疫组化方法也发现实验29周时，非干预组的胰岛素受体表达程度明显高于对照组，而药物干预组则与对照组相似，说明药物干预组动物肝脏脂肪合成程度与自身给药前相比大大下降。该研究结果说明国产罗格列酮可能通过改善胰岛素抵抗、提高胰岛素敏感性、促进肝脏UCP3的表达，对实验性树鼩肝脂肪变性起防治作用。

## 第三节 树鼩动脉粥样硬化

动脉粥样硬化指的是脂质（胆固醇、胆固醇酯及甘油三酯）在动脉血管内膜积累，与此同时血管中层平滑肌细胞移行至内膜下并增殖，导致内膜增厚，形成黄色或灰黄色状如粥样物质的斑块，可引起动脉壁增厚、变硬、失去弹性[23]。在动脉粥样硬化的研究方面，早在20世纪80年代，俄国科学家Anitchkow和Chalatow注意到喂食富含鸡蛋饲料的兔子容易形成类似于人动脉粥样硬化的脂肪病变[24]。后来对这种饲料成分的提纯研究发现，是鸡蛋中的胆固醇而不是卵清蛋白或者其它非脂成分导致这种脂肪病变。这些结果与人动脉粥样硬化过程中发现的胆固醇积累现象是一致的[25]。

动脉粥样硬化在发展过程中主要是动脉内壁动脉粥样斑的积累。动物实验以及对人的临床观

察都指向这样一个假设：首先是在动脉血管内表面的单层内壁细胞发生初始的病变，然后这些细胞在受到诸如高血脂、高血压以及前炎症因子等的刺激时就会表达黏附分子来捕获白细胞，与此同时，内皮通透性及内皮下的胞外基质组成会发生改变，这一系列变化会促进低密度脂蛋白胆固醇颗粒（low density lipoprotein-cholesterol, LDL-C）在动脉壁的积累[26]。一旦白细胞进入动脉壁以后，它们很快分化成为巨噬细胞，在新生的动脉粥样硬化斑中这些巨噬细胞吞噬脂蛋白颗粒，成为脂质沉积的巨噬细胞，称之为泡沫细胞[27]。

动脉粥样硬化是一种慢性疾病，尽管目前在该疾病的发病机理及其并发症（如心肌梗死和中风）方面的研究提出了很多引人注目的假说，但是这些假说还不足以阐明在人的动脉粥样硬化发病过程中脂蛋白氧化、炎症以及免疫反应等扮演着怎样的角色[27]。虽然脂类在动脉粥样硬化的发生过程中起着非常关键的作用，但其具体机制还不是十分清楚，有证据表明血浆脂质水平与心血管疾病之间有着强烈的关系[27]。在体内，低密度脂蛋白（low density lipoprotein, LDL）的作用主要是是将肝脏中合成的胆固醇转移出肝脏从而进入血液。研究表明血浆低密度脂蛋白胆固醇水平的升高是导致动脉粥样硬化及其并发症的直接原因[28]。因此，降低血液中的胆固醇水平就可以降低动脉粥样硬化发生的危险。在胆固醇合成过程中，3–羟基–3甲基戊二酰单酰辅酶A还原酶（3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase, HMG-CoA reductase）是一个重要的限速酶，用他汀类药物抑制该酶就可以降低血液中的胆固醇水平[29]。另外，通过低密度脂蛋白受体通路（LDL receptor pathway）加强对LDL的摄取继而对其进行降解也可以达到降低血液胆固醇的目的[28]。高密度脂蛋白（high density lipoprotein, HDL）在体内的作用是将血液中的多余胆固醇反向转运至肝脏，在此过程中，HDL借助于膜结合的ATP结合盒式转运蛋白（ATP-binding cassette transporters, ABC transporters）（成熟的HDL结合ABCG1，新生的HDL结合ABCA1）可以将泡沫细胞中沉积的胆固醇卸载掉，因此其在血液中的水平与动脉粥样硬化以及心血管疾病等的发病呈负相关[30，31]。

胆固醇酯转移蛋白（cholesteryl ester transfer protein, CETP）是胆固醇反向转运过程中的一个重要蛋白，其作用是转移HDL上的胆固醇酯到LDL和极低密度脂蛋白（very low density lipoprotein, VLDL）上，然后进一步转至肝脏进行代谢[32～35]。在血液中CETP参与对高密度脂蛋白胆固醇（high density lipoprotein-cholesterol, HDL-C）水平的调节以及对HDL颗粒的修饰[36]。有报道指出，CETP的活性与动脉粥样硬化的形成有十分密切的关系[37]，其活性的下降能够增加HDL-C的水平而降低LDL-C的水平，从而减小中风以及冠心病发生的风险[38～40]，相反，如果使CETP的活性增强就会导致HDL-C水平的下降和LDL-C水平的升高，相应地促进了动脉粥样硬化的形成[41～43]。

一些研究认为树鼩是抵抗动脉粥样硬化的一种动物模型，其特点是血液HDL水平非常高，大约占总的脂蛋白的70%～75%。在Liu等人[44]的研究中，研究人员利用9个年龄为20～30岁的血脂正常男性和9只6个月大的雄性树鼩为对象，检测了其血脂水平和血液中的CETP的活性。他们发现，在人血液中，HDL-C的水平比LDL-C低，两者的比例（HDL-C/LDL-C）大约是0.6，而在树鼩中，HDL-C的水平显著地高于LDL-C，两者比例（HDL-C/LDL-C）高达2.7。而在CETP活性方面，在树鼩中则是显著地低于人。可能正是由于这一点，使得树鼩血液中的HDL-C的分解代谢降低、含ApoB的脂蛋白的形成减少，进而维持了血液中高HDL-C、低LDL-C的水平，最终产生了对动脉粥样硬化的抵抗。为了进一步探讨这其中的机制，同样的研究人员对树鼩CETP的结构和功能进行了深入研究[45]，他们克隆了树鼩的CETP的cDNA全长（1704bp）并由cDNA推导出相应地蛋白序列，将该蛋白序列与人、猴和兔子进行比较发现，树鼩与这三者的相似性分别是81%、80%和74%。对

于CETP蛋白的合成和分泌，高CETP mRNA的表达提示肝脏提供了这一场所。而且如果把其氨基酸残基的110位的天冬酰胺（Asn）突变为谷氨酰胺（Gln）则导致其分泌受阻，而将344位的脯氨酸（Pro）残基替换为丝氨酸（Ser），或将452位的谷氨酰胺（Gln）替换为精氨酸（Arg）时虽然分泌不会受阻，但其转运胆固醇酯的能力则受到影响：344位氨基酸残基突变时下降48%，452位氨基酸残基突变时下降26%。然而这其中具体的树鼩低活性的CETP与其表现出的对动脉粥样硬化的抵抗之间的关系还需要进一步的研究和探讨。

虽然在树鼩的研究过程中还有不少困难，但相比于目前研究动脉粥样硬化的动物模型——啮齿类和鸟类而言，树鼩作为灵长类的近亲再加上其天然的对动脉粥样硬化的抵抗或许更能提供给研究人员更多的优势，从而推动对动脉粥样硬化这一疾病的研究。

## 参考文献

[1]Yang W, Lu J, Weng J, et al. Prevalence of diabetes among men and women in China. N Engl J Med, 2010, 362(12): 1090-101.

[2]Shaw JE, Sicree RA, Zimmet PZ. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. Diabetes Res Clin Pract, 2010, 87(1): 4-14.

[3]Xu Y, Wang L, He J, et al. Prevalence and control of diabetes in Chinese adults. JAMA, 2013, 310(9): 948-59.

[4]Srinivasan K, Ramarao P. Animal models in type 2 diabetes research: an overview. Indian J Med Res, 2007, 125(3): 451-72.

[5]Ishiko S, Yoshida A, Mori F, et al. Early ocular changes in a tree shrew model of diabetes. Nihon Ganka Gakkai Zasshi, 1997, 101(1): 19-23.

[6]冼苏，黄松，苏建家，等．链脲佐菌素诱导树鼩糖尿病动物模型研究．广西医科大学学报，2000，19（6）：945–8.

[7]李海燕，黎家敏，李婧潇，等．高糖高脂饲料联合地塞米松诱发树鼩血糖、血脂异常．实验动物与比较医学，2010，20（3）：197–200.

[8]吴晓云，李昀海，常青，等．链脲佐菌素诱导树鼩2型糖尿病．动物学研究，2013，34（2）：108–15.

[9]Kolb H, Kröncke KD. IDDM: lessons from the low-dose streptozotocin model in mice. Diabetes Rev, 1993, 1: 116-26.

[10]中华医学会糖尿病学分会．中国2型糖尿病防治指南．北京：北京大学医学出版社，2011.

[11]Matteoni CA, Younossi ZM, Gramlich T, et al. Nonalcoholic fatty liver disease: A spectrum of clinical and pathological severity. Gastroenterology, 1999, 116(6): 1413-9.

[12]Cohen JC, Horton JD, Hobbs HH. Human fatty liver disease: old questions and new insights. Science, 2011, 332 (6037): 1519-23.

[13]Browning JD, Szczepaniak LS, Dobbins R, et al. Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity. Hepatology, 2004, 40(6): 1387-95.

[14]Farrell GC, Larter CZ. Nonalcoholic fatty liver disease: from steatosis to cirrhosis. Hepatology, 2006, 43 (2 Suppl 1): S99-112.

[15]Yeh MM, Brunt EM. Pathology of nonalcoholic fatty liver disease. Am J Clin Pathol, 2007, 128(5): 837-47.

[16]Erickson SK. Nonalcoholic fatty liver disease. J Lipid Res, 2008, 50: S412-6.

[17]钱伯初，史红，吕燕萍．非酒精性脂肪肝与脂肪性肝炎动物模型研究进展．中国比较医学杂志，2007，17（7）：426–30.

[18]Barshop NJ, Sirlin CB, Schwimmer JB, et al. Review article: epidemiology, pathogenesis and potential treatments of paediatric non-alcoholic fatty liver disease. Aliment Pharmacol Ther, 2008, 28(1): 13-24.

[19]Fracanzani AL, Valenti L, Bugianesi E, et al. Risk of severe liver disease in nonalcoholic fatty liver disease with normal aminotransferase levels: a role for insulin resistance and diabetes. Hepatology, 2008, 48(3): 792-8.

[20]Fan JG, Farrell GC. Epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease in China. J Hepatol, 2009, 50(1): 204-10.

[21]Fu JF, Shi HB, Liu LR, et al. Non-alcoholic fatty liver disease: an early mediator predicting metabolic syndrome in

obese children? World J Gastroenterol, 2011, 17(6): 735-42.

[22]蒙碧辉，梁世坤，黄松，等．国产罗格列酮对实验性树鼩肝脂肪变性的保护作用．中华消化杂志，2003，23（12）：718–22．

[23]张美玲，王茁伉，彭成．动脉粥样硬化动物模型研究进展．四川动物，2009，28（5）：794–7．

[24]Anitschkow N, Chalatow S. Classics in arteriosclerosis research: on experimental cholesterin steatosis and its significance in the origin of some pathological processes by N. Anitschkow and S. Chalatow, translated by Mary Z. Pelias, 1913. Arteriosclerosis, 1983, 3(2): 178-82.

[25]Libby P, Aikawa M, Schönbeck U. Cholesterol and atherosclerosis. Biochim Biophys Acta, 2000, 1529(1-3): 299-309.

[26]Tabas I, Williams KJ, Borén J. Subendothelial lipoprotein retention as the initiating process in atherosclerosis: update and therapeutic implications. Circulation, 2007, 116(16): 1832-44.

[27]Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. Nature, 2011, 473(7347): 317-25.

[28]Goldstein JL, Brown MS. The LDL Receptor. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2009, 29(4): 431-8.

[29]Istvan ES, Deisenhofer J. Structural mechanism for statin inhibition of HMG-CoA reductase. Science, 2001, 292(5515): 1160-4.

[30]Rye KA, Bursill CA, Lambert G, et al. The metabolism and anti-atherogenic properties of HDL. J Lipid Res, 2009, 50: S195-200.

[31]Tall AR, Yvan-Charvet L, Terasaka N, et al. HDL, ABC Transporters, and cholesterol efflux: implications for the treatment of atherosclerosis. Cell Metab, 2008, 7(5): 365-75.

[32]Tall A. Plasma lipid transfer proteins. Annu Rev Biochem, 1995, 64: 235-57.

[33]Stein O, Stein Y. Lipid transfer proteins (LTP) and atherosclerosis. Atherosclerosis, 2005, 178(2): 217-30.

[34]Masson D, Jiang XC, Lagrost L, et al. The role of plasma lipid transfer proteins in lipoprotein metabolism and atherogenesis. J Lipid Res, 2008, 50: S201-6.

[35]Barter PJ. Hugh Sinclair Lecture:The regulation and remodelling of HDL by plasma factors. Atheroscler Suppl, 2002, 3(4): 39-47.

[36]Bruce C, Chouinard RA, Jr., et al. Plasma lipid transfer proteins, high-density lipoproteins, and reverse cholesterol transport. Annu Rev Nutr, 1998, 18: 297-330.

[37]Quintão ECR, Cazita PM. Lipid transfer proteins: past, present and perspectives. Atherosclerosis, 2010, 209(1): 1-9.

[38]Thompson A, Di Angelantonio E, Sarwar N, et al. Association of cholesteryl ester transfer protein genotypes with CETP mass and activity, lipid levels, and coronary risk. JAMA, 2008, 299(23): 2777-88.

[39]Inazu A, Brown ML, Hesler CB, et al. Increased high-density lipoprotein levels caused by a common cholesteryl-ester transfer protein gene mutation. N Engl J Med, 1990, 323(18): 1234-8.

[40]Brown ML, Inazu A, Hesler CB, et al. Molecular basis of lipid transfer protein deficiency in a family with increased high-density lipoproteins. Nature, 1989, 342(6248): 448-51.

[41]Plump AS, Masucci-Magoulas L, Bruce C, et al. Increased atherosclerosis in apoE and LDL receptor gene knock-out mice as a result of human cholesteryl ester transfer protein transgene expression. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1999, 19(4): 1105-10.

[42]Tsai MY, Johnson C, Kao WHL, et al. Cholesteryl ester transfer protein genetic polymorphisms, HDL cholesterol, and subclinical cardiovascular disease in the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. Atherosclerosis, 2008, 200(2): 359-67.

[43]Westerterp M, Van Der Hoogt CC, De Haan W, et al. Cholesteryl ester transfer protein decreases high-density lipoprotein and severely aggravates atherosclerosis in *APOE*3-leiden* mice. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006, 26(11): 2552-9.

[44]Liu HR, Wu G, Zhou B, et al. Low cholesteryl ester transfer protein and phospholipid transfer protein activities are the factors making tree shrew and beijing duck resistant to atherosclerosis. Lipids Health Dis, 2010, 9: 114.

[45]Liu H, Wu G, Zhou B, et al. Structure and function of cholesteryl ester transfer protein in the tree shrew. Lipids, 2011, 46(7): 607-16.

[46]Wu X, Chang Q, Zhang Y, et al. Relationships between body weight, fasting blood glucose concentration, sex and age in tree shrews (*Tupaia belangeri chinensis*). J Anim Physiol Anim Nutr, 2013, 97(6): 1179-88.



Tree shrews

# 第二十八章

第二篇 疾病树鼩模型
TREE SHREW ANIMAL MODELS

# 利用树鼩精原干细胞建立转基因树鼩的尝试

郑 萍 赵旭东 季 爽 郭 颖

## 第一节 前 言

现代生物医学研究中，转基因是建立疾病动物模型的重要和常用手段。虽然用自然筛选以及人工诱导的方法可以产生疾病动物模型，但通过这些方法建立的模型不可遗传、不稳定、表型及发病机理也不尽相同，导致研究费用高、耗时长、实验结果重复性差等缺陷。利用基因操作方法建立疾病动物模型则可克服以上缺点，因此，从基因操作层面上考虑疾病动物模型的建立是大势所趋。本章将结合我们的工作介绍利用转基因技术建立树鼩疾病动物模型的思路、现状和进展。

## 第二节 基因编辑的分子生物学技术简介

### 一、外源基因的随机插入

外源基因随机插入到受体细胞的基因组中，外源基因插入的拷贝数及位置都不确定，因而无法实现对外源基因的表达进行调控。此外，如果外源基因插入到基因组的功能区，可引起插入区的功能失活，这样所观察到的表型可能与外源基因的功能无关，而是由插入位点功能失活引起。因此，通过随机插入外源基因的方式制备转基因动物通常需要建立几株不同的转基因动物株（外源基因具有不同的插入位点）并观察其表型。如果不同的转基因动物株的表型大体一致，可以认为表型的产生是真实反映了转基因的功能。

### 二、基因的定点编辑技术

由于外源基因的随机插入存在很多弊端，现代转基因技术已很少采用随机插入的方式，取而代之的是基因的定点编辑技术。定点编辑采用的基本原理是细胞内DNA双链断裂后进行同源重组

修复[1]。传统的基因定点编辑技术是利用细胞内自发的DNA双链断裂及同源重组修复能力，以外源导入的同源修饰序列为模板，通过同源重组修复而达到对目标基因进行定点编辑的目的。细胞内自发DNA双链断裂及同源重组的几率非常低下，在胚胎干细胞中约为1%，而在早期胚胎细胞（如1–细胞胚胎）中甚至低于0.1%，这使得传统的基因定点编辑技术效率低下，且其应用受到了很大的限制，往往只能应用于建立了胚胎干细胞系的物种（目前仅有小鼠和大鼠）[2~4]。虽然在部分家畜动物如猪、牛、羊中科学家采用体细胞克隆的方法，即首先在体细胞上完成对特定基因的定点编辑，然后通过体细胞核移植的重编程技术产生可遗传的基因定点编辑动物[5~8]，但核移植重编程技术本身的效率也十分低下，而且需要特殊的专业操作技术，这也使得体细胞克隆的基因编辑手段难以推广应用。

近5年来，逐渐发展了一系列新的基因编辑技术，其要点是通过在细胞内引入人工合成的融合DNA核酸内切酶对特定目标基因实现定点切割，高效和特异地在目标DNA序列上产生DNA双链断裂，从而克服了传统方法利用细胞内低频率的自发DNA双链断裂的弊端。发生DNA双链断裂后，细胞可通过非同源末端连接（nonhomologous end joining, NHEJ）方式或者同源重组（homologous recombination, HR）方式修复DNA双链损伤。NHEJ方式的修复效率高，但保真性差，极易在修复后的DNA序列中引入新的突变，包括DNA片段的插入或者缺失，从而造成特定目标基因的移码突变，使目标基因丧失功能，最终达到基因敲除（gene knock-out）的目的。相对于NHEJ，HR修复方式效率低，但保真性高，细胞以DNA同源片段作为模板进行DNA的复制和损伤修复[9]。如果在向细胞内导入人工DNA内切酶诱导DNA双链定点断裂的同时，导入一段包含与目标片段同源的修饰DNA片段，细胞就可以通过HR修复途径实现基因定点敲入（gene knock in），对目标片段进行精确修饰和编辑。新型基因编辑技术的出现使得我们可以对很多物种（包括动物和植物）进行基因编辑[10]，为大规模基因功能的发掘奠定了基础。

下面将对3种人工合成的融合DNA核酸内切酶技术进行简单介绍。人工合成的融合DNA核酸内切酶可以对任意DNA序列进行特异性定点切割，它由两个功能域组成，一个功能域执行非特异性DNA核酸内切酶功能，另一个功能域可特异性识别并高效结合特定DNA片段，两个功能域的组合使人工融合DNA核酸内切酶能高效特异地行使定点DNA切割功能。

### （一）锌指核酸内切酶（zinc finger endonuclease, ZFN）技术

ZFN是第一代人工核酸内切酶，是将DNA结合蛋白的锌指结构域（用于特异识别并结合DNA位点）和非特异性核酸内切酶FokI融合而成[11]。每个锌指结构域一般包含30个左右的氨基酸，而每个锌指结构域可以特异识别3～4个核苷酸，因此将几个锌指结构域串联起来就可以特异识别DNA序列（通常为9～18核苷酸）。由于FokI核酸内切酶只有在二聚体的情况下才具备内切酶活性，因此需要在DNA切割点的两侧约间隔6个核苷酸的位点分别设计左侧和右侧ZFN。ZFN技术建立以后，在多种动物和植物上已成功应用[10，11]。但ZFN制备复杂，价格昂贵，并且不能完全实现对任意目标基因序列的编辑，已逐渐被新一代的核酸内切酶技术TALEN（类转录激活因子效应物核酸酶）所代替。

### （二）类转录激活因子效应物核酸酶（transcription activator–alike effector nuclease, TALEN）技术

TALEN是第二代核酸内切酶技术，同ZFN相似，其原理也是将DNA结合结构域与FokI核酸内

切酶融合而成。但TALEN技术是利用了植物致病菌*Xanthomonas*合成的一类天然蛋白TALE的DNA识别和结合结构域[12，13]，该结构域在设计和构建上较锌指结构域更简便容易。简单讲，TALE的DNA结合域由多个重复结构域单元串联而成，每个重复结构域单元由33～35个氨基酸组成，识别一个核苷酸，其识别核苷酸的特异性由单元内两个高度变化的氨基酸决定。不同重复结构域单元间直接进行串联，不需要连接序列，因此设计和制备上比ZFN更加简单方便，特异性也更好[14]。2010年，TALEN技术首次在酵母中成功应用后[15]，很快在其它物种中也得到广泛应用。2012年，TALEN技术被*Science*杂志评为十大科学突破之一。

### （三）CRISPR/Cas9 [clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) / CRISPR–associated (Cas)] 人工核酸内切酶技术

2013年初，第三代全新的人工核酸内切酶技术CRISPR/Cas诞生[16，17]。与ZNF和TALEN不同，CRISPR/Cas是RNA介导的核酸内切酶技术，是从细菌和古生菌中的天然免疫系统CRISPR和Cas蛋白改造而来[18]，目前在基因打靶中应用比较广泛的是Ⅱ型（type Ⅱ）CRISPR/Cas9系统[19]。简单讲，CRISPR是一段包含一至多个高度可变间隔区的重复序列，该段序列被转录成前体RNA后随即被Cas9蛋白切割形成含有一个可变间隔区和部分重复序列的成熟小RNA。成熟小RNA与Cas9蛋白形成核糖核蛋白复合体，其中的小RNA可与基因组上的同源目标序列通过碱基互补配对将Cas9核酸内切酶定向，最终实现DNA目标序列的定向切割。与ZFN和TALEN相比，CRISPR/Cas9具有以下优点：制备更简单和经济，只需在原有载体的基础上替换20～30bp核苷酸即可对一个位点进行打靶，并可在一个载体中同时实现对几个不同位点的打靶[20～22]；Cas9蛋白经过改造可以进行DNA单链切割，从而增加同源重组的效率；CRISPR/Cas9的靶点在基因组中的分布频率远高于ZFN和TALEN，因此其适用性更加广泛。

## 第三节 进行稳定遗传基因编辑需要的细胞种类

科学研究中，通常需要建立能稳定遗传的转基因动物。因此，需要最终在生殖细胞中实现基因修饰，通过生殖细胞将基因修饰稳定遗传。可遗传的基因编辑通常在以下3类细胞中进行：1–细胞胚胎、多能干细胞、精原干细胞。

### 一、在1–细胞胚胎中进行基因编辑

1–细胞胚胎发育形成新生个体的所有细胞，因此在1–细胞胚胎中进行基因修饰可以确保修饰的可遗传性。随着新一代基因编辑技术的发展，1–细胞胚胎已成为很多物种建立转基因动物的首选细胞载体。但是，新一代基因编辑技术在一个物种上的成功不代表可以在其它物种上也能成功。1–细胞胚胎是否适合于进行新一代基因编辑操作与其对DNA双链断裂的耐受能力密切相关。耐受能力差的物种，仅一个DNA双链断裂也可能导致胚胎发育停滞和胚胎死亡。因此，在应用新一代基因编辑技术到每个具体的物种时，还需要进行系统研究。

### 二、在多能干细胞中进行基因编辑

多能干细胞具有发育全能性，可以分化形成机体的各类细胞，包括生殖细胞。并且，多能干细胞对DNA双链断裂的修复能力极高，且主要采用同源重组的方式，因此在多能干细胞中进行基因编辑的效率相对较高。新一代基因编辑技术出现之前，胚胎干细胞就已成为传统基因编辑技术的首选细胞载体。但是，利用多能干细胞建立转基因动物时，对多能干细胞的全能性要求非常高，多能干细胞必须要具备生殖系统嵌合能力。也即经过基因编辑的多能干细胞注射入受体囊胚后，它们不仅能参与形成机体的多种组织和器官，还必须能够分化形成生殖细胞，从而使基因修饰遗传下去。虽然当前已在几种物种中建立了胚胎干细胞（包括小鼠、大鼠、猕猴、人）[2，3，23，24]，也在其它物种中报道了诱导多能干细胞的建立（如猕猴和家畜动物）[25～27]，但仅有小鼠和大鼠的胚胎干细胞才具备嵌合能力并能作为基因编辑的载体[28]。

### 三、在雄性生殖干细胞中进行基因编辑

雄性生殖干细胞也称精原干细胞，存在于所有哺乳动物的睾丸内，定位于曲细精管的基底部，通过自我更新及定向分化源源不断产生新的雄性生殖细胞。雄性生殖干细胞可以通过特定的表面标记分子从睾丸细胞中分离和富集，并在体外培养、增殖和进行基因修饰，移植到睾丸曲细精管后可以存活并通过自我更新和再生持续产生精子。因此，精原干细胞是又一种极富潜力的基因编辑细胞载体[29]。目前，小鼠和大鼠精原干细胞的分离富集、体外扩增培养、转基因操作以及精原干细胞移植的技术平台都较成熟，并已成功利用精原干细胞建立了基因修饰小鼠和大鼠[30，31]。

## 第四节 树鼩基因编辑的现状分析

树鼩是新兴的实验动物，在进化地位及生理生化特征上较啮齿类更加接近于灵长类[32]。同时，树鼩的繁殖周期短，生长发育周期快，使用价格便宜。这些特征使树鼩在生物医学研究中较非人灵长类模型动物猕猴有更高的实用性和更大的发展潜力。建立树鼩基因操作平台对于推动树鼩在生物医学研究中的广泛应用具有决定意义。

新一代基因编辑分子生物学技术的发展为转基因树鼩的建立提供了新的希望和机遇。但是，在进行转基因操作探索之前，还需要解决一系列相关的技术问题，主要包括转基因细胞载体的获得和胚胎移植技术。前面我们已经阐述了进行基因编辑的3种细胞载体1–细胞胚胎、胚胎干细胞和精原干细胞。哺乳动物中稳定获得1–细胞胚胎需要建立相关的系列辅助生殖技术，包括动物生殖周期的判断、激素超数排卵技术、精液的采集冻存和精子体外获能、体外受精和胚胎培养。在啮齿类如小鼠和大鼠，通过激素超数排卵和正常交配受精，在受精后的固定时间（小鼠为受精后12小时）处死动物可以从输卵管中获得大量体内发育的1–细胞胚胎。在非人灵长类动物猕猴中，1–细胞胚胎是通过超数排卵和体外受精获得。猕猴具有明显易观察的月经周期，猕猴中已成功建立了基于生殖周期的激素超数排卵技术，通过超数排卵可获得大量体内成熟的卵细胞。另外，猕猴的精液采集和冷冻技术、精子体外获能技术也很成熟。新鲜采集的精子或者冻存复苏的精子在培养皿中完成体外获能（获得受精能力），与卵细胞进行体外受精（in vitro fertilization）及体外胚

胎培养就能获得1–细胞胚胎用于转基因操作[33]。但在树鼩中，尚无法通过简易观察方法判断雌性树鼩的生殖周期，也还未建立雌性树鼩激素超数排卵技术、精液采集和冷冻技术、卵细胞体外受精技术及胚胎培养技术。另外，雌性和雄性树鼩合笼后是否可以像小鼠那样当日发生交配行为也还不清楚。这些尚未解决的技术难题使我们当前仍无法获得1–细胞胚胎。由于无法稳定获得充足的胚胎，建立胚胎干细胞的尝试也无从进行。对树鼩精原干细胞的研究也是空白，尚不清楚树鼩精原干细胞的特异分子标记，其分离富集和培养的方法也亟待探索和研究。因此，当前在树鼩上进行转基因操作的3种细胞载体的获得仍是巨大难题，很多基础性的研究工作特别是树鼩生殖生理的研究工作需要大量开展，从而为树鼩转基因细胞载体的获得奠定关键的工作基础。

除了能稳定获得基因操作的细胞载体，胚胎移植技术也是建立转基因哺乳动物的又一关键技术平台。胚胎移植技术的关键要点是假孕雌性受体动物的准备，而假孕受体制备的关键是确定雌性动物的生殖周期。假孕受体的生殖周期需要与胚胎供体的生殖周期同步化，这样假孕受体的子宫才能接受移植的胚胎着床。目前，我们尚不清楚如何鉴定雌性树鼩的生殖周期，因此尚无法制备胚胎移植需要的假孕受体。

## 第五节 利用精原干细胞建立转基因树鼩的初步尝试

在第四节我们已经阐述了当前建立树鼩转基因技术平台所面临的困难和需要解决的关键问题。相比较1–细胞胚胎和发育全能性的胚胎干细胞，树鼩精原干细胞的获得具更高的可行性，通过树鼩精原干细胞建立转基因动物也因此而成为当前可以尝试和努力的方向。下面将简单介绍我们在利用精原干细胞建立转基因树鼩上所作的多方面尝试和努力。

### 一、树鼩睾丸细胞的分离及精原干细胞的体外培养尝试

#### （一）雄性树鼩年龄的选择

雄性生殖细胞的发生和发育受年龄和激素调控，青春期前完整的生精过程尚未发生，睾丸曲细精管的主要细胞构成为支持细胞、精原干细胞，以及由精原干细胞通过有丝分裂形成的精母细胞。青春期到来后，曲细精管即开始连续的生精过程，产生很多分化和成熟的生殖细胞。由于精原干细胞在所有睾丸细胞中的比例随年龄的增长而下降，动物年龄对于精原干细胞的分离和纯化效率有很大影响，年龄越小，精原干细胞的比例越大。但另一方面，年龄小的动物睾丸质量小，总细胞数量也少。因此在进行实验时，一般将两方面综合进行考虑。树鼩精原干细胞的分离试验中，我们使用2月龄左右的幼年雄性树鼩，一只树鼩可以满足一次实验。

#### （二）树鼩睾丸细胞的分离

联合使用机械和酶消化方法分离树鼩睾丸细胞。具体讲，树鼩睾丸用PBS清洗干净后去掉白膜，剪碎，然后用1mg/mL透明质酸酶+3mg/mL胶原酶+0.2mg/mL DNase I在37℃水浴中消化15～20分钟，期间每几分钟用移液枪吹打混匀。酶消化结束后，离心去除消化液，用PBS清洗2～3次。再使用0.25%胰酶消化10～15分钟，每几分钟用移液枪吹打混匀。消化结束用血清终止胰酶活性，

PBS清洗两遍，消化后的细胞用培养基混匀，用滤膜过滤去掉未消化的较大团块。细胞接种于培养皿中培养。

### （三）树鼩精原干细胞的培养尝试

消化的睾丸细胞中既含有生殖细胞，也包含大量的体细胞。这些体细胞代谢旺盛，若和生殖细胞共同培养，会很快消耗完培养基的营养成分，并产生大量的代谢废物，从而破坏生殖干细胞的体外生长和增殖。因此，需要首先从睾丸消化细胞中去除大量的体细胞。生殖细胞和体细胞在培养皿中贴壁的速度和时间存在显著差异，体细胞容易在短时间内贴壁生长，可以通过差异贴壁的方法除去大部分体细胞。具体将消化的树鼩睾丸细胞培养在铺了0.1%明胶的培养板上贴壁培养约12小时后，大部分体细胞已经在培养皿上贴壁生长，而生殖细胞则没有贴壁或者轻微贴壁。可以通过移液枪轻轻吹打使生殖细胞悬浮在培养基中，收集培养基并离心获得生殖细胞，然后接种到用丝裂霉素处理失去分裂能力的STO或者MEF饲养层细胞上培养。培养基成分参考人[34]和小鼠[35]精原干细胞培养基，并做少许修改。具体为：基础培养基StemPro-34, 10% FBS, penicillin (30mg/L), streptomycin (75mg/L), L-Glutumine (2mM), β -mercaptoethano (0.1mM), sodium pyruvate (1mM), NEAA (1mM), putrescine (60 μM), StemPro supplement (250 μL/10mL), human GDNF (40ng/mL), human EGF (10ng/mL), human bFGF (1ng/mL), mouse LIF (10ng/mL)。一星期后，可观察到形态类似精原干细胞的细胞集落（图28–1），手工收集这些细胞集落并传代培养，细胞可以连续培养至3～4代（图28–1），但不能继续维持增殖和传代培养。由于细胞数目较少，我们还不能从分子水平上鉴定它们是否是生殖细胞，但它们有典型的精原干细胞形态（大小在10 μm左右，圆形，细胞核大），可以从其特殊的形态上初步断定为精原干细胞。目前的培养体系尚不完善，需要继续改进，并最终从功能上对细胞身份进行鉴定（即精原干细胞移植后能持续生成新的精子）。

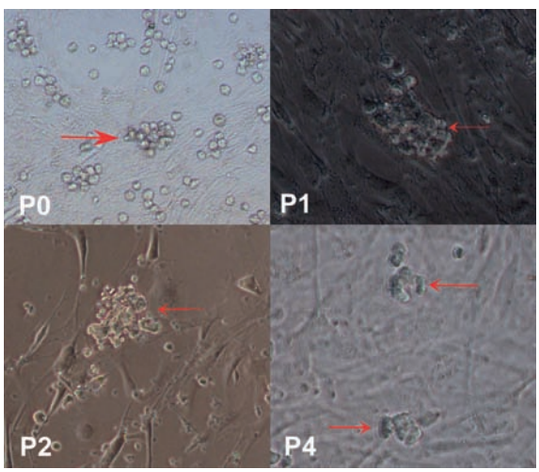



**图28–1　树鼩精原干细胞原代（P0）和传代培养**

P1：第一代；P2：第二代；P4：第四代。箭头指扩增形成的细胞克隆。

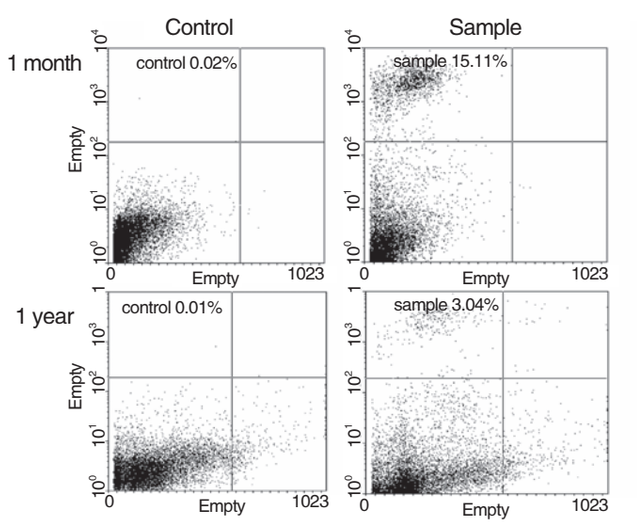



**图28–2　用表面抗原通过流式分选，可以从幼年（1月龄）树鼩睾丸细胞中获得约15%的阳性细胞，从成年（1年龄）树鼩睾丸细胞中获得约3%的阳性细胞**

## 二、树鼩精原干细胞的表面分子标记的筛选

树鼩精原干细胞的有效富集是体外成功扩增培养的重要前提之一。此外，如果能够有效富集一定数量的精原干细胞，可以直接对富集到的精原干细胞进行基因编辑操作，避免长期体外培养。因此，成功筛选树鼩精原干细胞的可能表面标记分子，并利用表面标记分子通过流式细胞术对精原干细胞进行分选和富集，是利用精原干细胞建立转基因树鼩研究的重要内容。已报道的啮齿类（小鼠、大鼠）和灵长类精原干细胞的表面标记分子包括CD24、CD49d（α4-Integrin）、CD49f（α6-Integrin）、GFRα-1、CD90（Thy-1）和SSEA4等[36～38]。目前我们已经从其中筛选到一个表面标记分子，可有效地对树鼩睾丸细胞进行分群。例如，用1～2月龄的树鼩睾丸细胞，可以通过流式细胞术稳定获得约15%的阳性细胞群，成年树鼩（约1年龄）的睾丸细胞也可获得约3%的阳性细胞群（图28–2）。这些阳性细胞是否富集了树鼩精原干细胞，还需要进一步鉴定和研究。

## 三、白消安处理建立精原干细胞移植受体

利用精原干细胞移植方法建立转基因动物，首先要清除移植受体自身的生殖细胞（包括精原干细胞及分化的生殖细胞），然后将供体精原干细胞移植到生精作用受损的受体睾丸曲细精管中，损伤的曲细精管内环境可以有效地刺激移植精原干细胞增殖、分化产生转基因精子。以往的研究广泛使用busulfan（白消安，又名马利兰）破坏曲细精管，将白消安注射到睾丸内，可以诱导大部分生殖细胞发生凋亡[39]。白消安最早是作为治疗慢性粒细胞白血病的缓解性药物，但随着该药物的广泛使用，发现长期服用该药物的男性出现不育现象。后来研究者们利用白消安来杀伤生殖细胞，制作精原干细胞移植受体。在小鼠中，使用白消安制备精原干细胞移植受体已是非常成熟的技术[40，41]，也有人使用白消安制备精原干细胞移植用的受体大鼠及猕猴[31，39，42]。不同物种中白消安的使用剂量有很大差异，小鼠需要注射大约30mg/kg体重的剂量才能有效去除内源精子[40，41]，大鼠中的剂量约为15mg/kg体重[31]，而猕猴注射8～12mg/kg体重的白消安也可产生不可恢复的生精损伤[39，42]。因此，我们需要摸索出损伤树鼩生精作用的白消安最佳注射剂量。

与其它物种类似，在正常雄性树鼩睾丸的曲细精管中，精原细胞在减数分裂时打破紧密连接向管腔移位，分化形成的精子进入曲细精管管腔中（图28–3）。白消安处理制备精原干细胞移植受体的基本原则是既要抑制生精作用的发生，也要保证树鼩的存活。在试验过程中，我们选择健康成年雄性树鼩腹腔注射白消安（用等体积的DMSO和水溶解），分为7个实验组分别注射以下不同剂量的白消安：15mg/kg体重、20mg/kg体重、25mg/kg体重、30mg/kg体重、35mg/kg体重、40mg/kg体重、45mg/kg体重。每组注射剂量在不同时间点取树鼩睾丸，制备组织切片并进行HE染色，观察各个剂量的白消安作用不同时间后树鼩睾丸曲细精管中生殖细胞及精子发生过程的损伤情况。结果发现：白消安注射剂量为15mg/kg体重的实验组中，树鼩睾丸在注射后34天能看到部分曲细精管管腔中已分化的精子细胞被清除，50天后可观察到有些管腔已开始恢

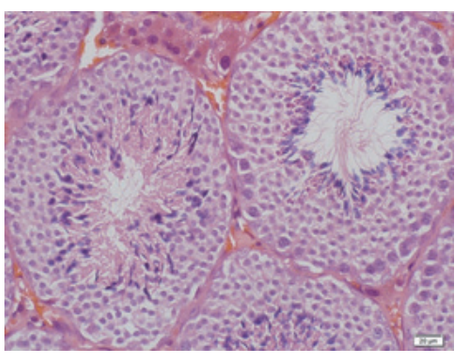


**图28–3　正常树鼩睾丸组织HE切片，随着精子发生过程分化的精细胞向管腔中央迁移**
放大倍数为40×。

复精子发生（图28–4）；注射剂量为20mg/kg体重的实验组，处理15天之后部分曲细精管生精细胞明显受到损伤，精子发生过程被抑制，30天后可观察到大量流线型空腔，曲细精管中精子大量凋亡，但70天后又可以在曲细精管中观察到已分化的精子细胞，表明精子发生过程可能开始恢复（图28–5）；25mg/kg体重的实验组，白消安处理16天即可发现部分曲细精管内已分化精细胞几乎全部被清除，处理30天后睾丸90%以上的管腔是空腔，70天后有部分曲细精管管腔出现生精作用的恢复（图28–6）；30mg/kg体重剂量处理后结果与25mg/kg实验组结果基本一致，两组树鼩在经白消安处理后最终曲细精管精子发生基本都能恢复到正常水平。35mg/kg体重组，白消安处理16天后虽然没有出现大量曲细精管空腔，但曲细精管中各种精细胞的排列出现明显异常，119天后仍有大部分管腔不能恢复精子发生，可以看到管腔中没有分化成熟的精细胞（图28–7）；而注射40mg/kg体重和45mg/kg体重的剂量可导致树鼩在短时间内相继死亡，死亡率分别为60%和80%。对这些

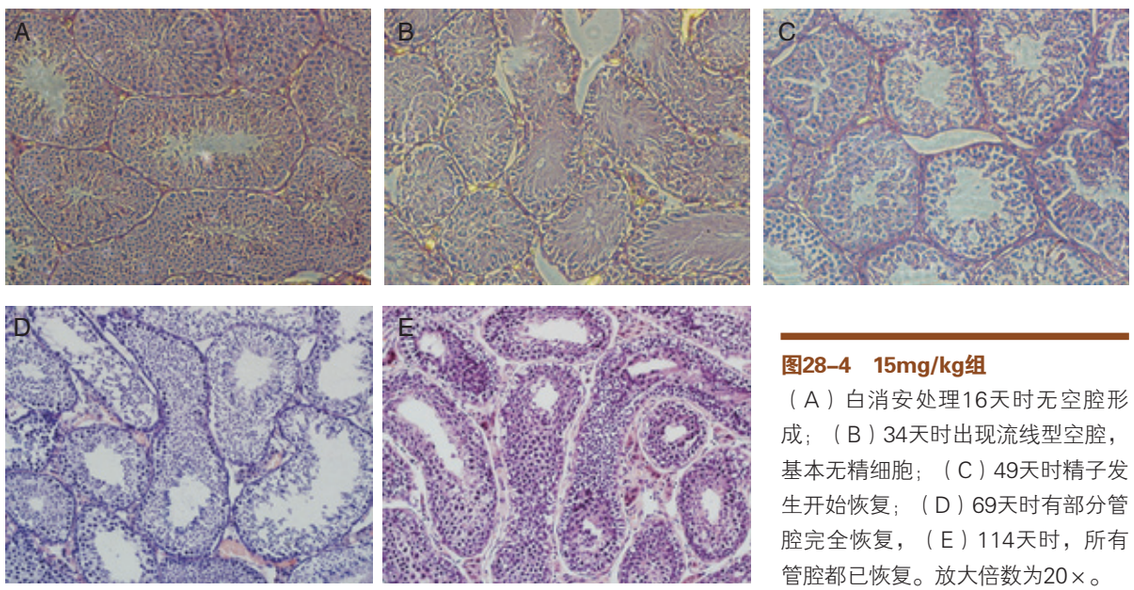



**图28–4　15mg/kg组**

（A）白消安处理16天时无空腔形成；（B）34天时出现流线型空腔，基本无精细胞；（C）49天时精子发生开始恢复；（D）69天时有部分管腔完全恢复，（E）114天时，所有管腔都已恢复。放大倍数为20×。

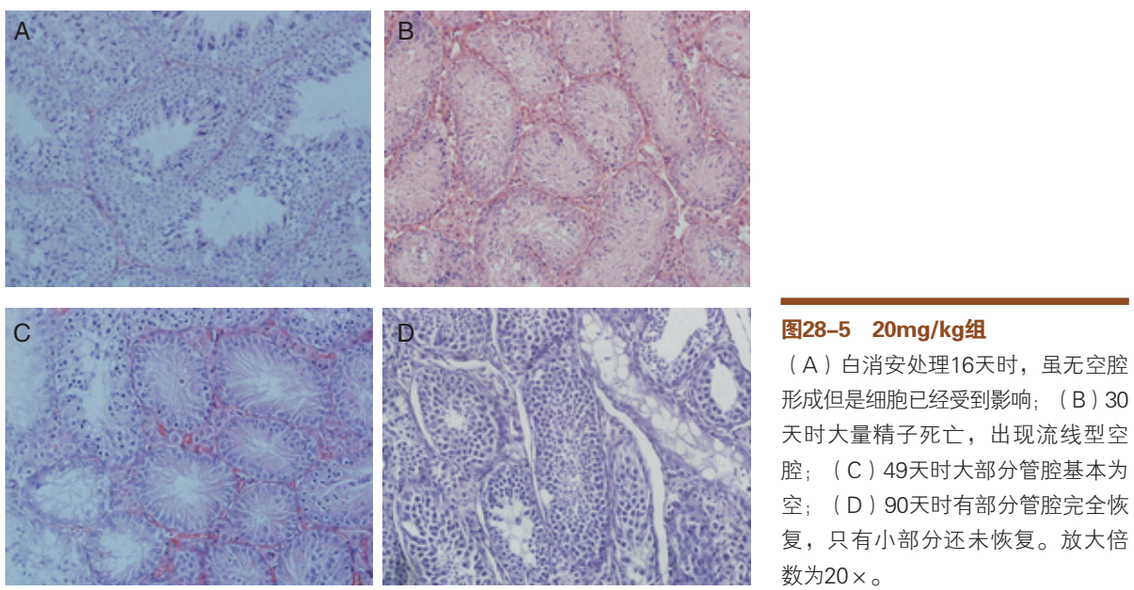



**图28–5　20mg/kg组**

（A）白消安处理16天时，虽无空腔形成但是细胞已经受到影响；（B）30天时大量精子死亡，出现流线型空腔；（C）49天时大部分管腔基本为空；（D）90天时有部分管腔完全恢复，只有小部分还未恢复。放大倍数为20×。

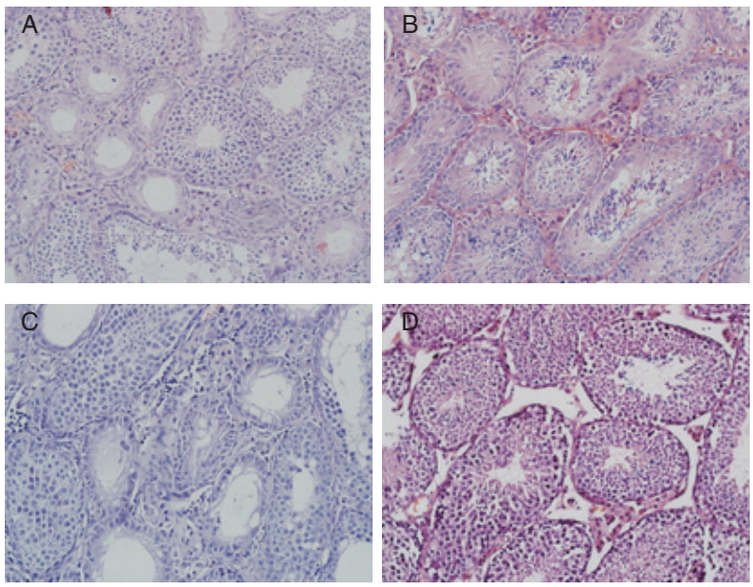



**图28–6　25mg/kg组**

（A）白消安处理16天时，已经有空腔形成；（B）34天时大量精子死亡，出现流线型空腔；（C）69天时有小部分管腔开始恢复；（D）119天时有部分管腔完全恢复。放大倍数为20×。

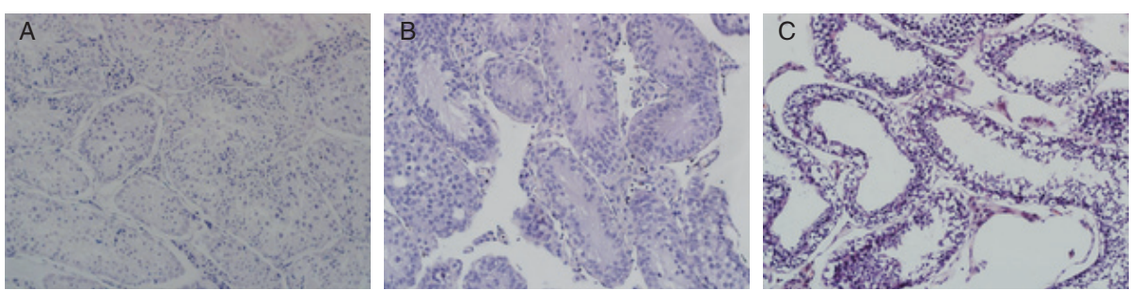



**图28–7　35mg/kg剂量组**

由左到右分别是白消安处理16天、77天、119天后树鼩睾丸曲细精管切片，虽然有部分管腔有恢复迹象，但是曲细精管管腔中央还是中空状态。放大倍数为20×。

非正常死亡树鼩的睾丸进行HE染色观察，发现高剂量白消安处理7天后就能使曲细精管内精细胞变形并且死亡（图28–8）。

总结以上实验结果，发现白消安的使用剂量越高，破坏精子生成需要的时间就越短，生精作用恢复需要的时间也越长，甚至有的可能无法恢复。但白消安的剂量效应在个体间有较大差异，这可能与树鼩年龄相关。在我们测试的7组剂量中，35～40mg/kg体重的剂量应该是制备树鼩精原干细胞移植受体的最佳剂量，既可以有效清除内源性生精细胞，也使生精过程不易恢复甚至不能恢复，同时也不会导致树鼩死亡。而其它的剂量表现为作用不显著（如15～30mg/kg体重），或者使树鼩死亡（如40～45mg/kg体重）。

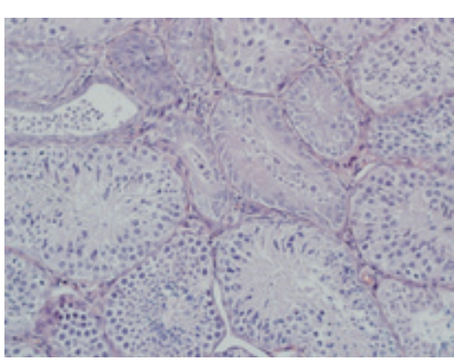


**图28–8　45mg/kg剂量组**

白消安处理7天后，精细胞已受损。放大倍数为20×。

## 第六节 结语与展望

利用精原干细胞作为基因修饰的细胞载体，极可能在树鼩的转基因操作中取得突变。目前，利用精原干细胞创建转基因树鼩的关键技术难点是建立适合于树鼩精原干细胞体外扩增培养的体系。为了避免改善现有培养条件的盲目性，需要理解调控树鼩精原干细胞自我更新和分化的重要信号通路，然后据此对培养条件进行改进和修饰，最终建立树鼩精原干细胞体外稳定扩增培养体系和利用精原干细胞的基因打靶技术。

### 参考文献

[1]Capecchi MR. Gene targeting in mice: functional analysis of the mammalian genome for the twenty-first century. Nat Rev Genet, 2005, 6(6): 507-12.

[2]Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. Nature, 1981, 292(5819): 154-6.

[3]Li P, Tong C, Mehrian-Shai R, et al. Germline competent embryonic stem cells derived from rat blastocysts. Cell, 2008, 135(7): 1299-310.

[4]Buehr M, Meek S, Blair K, et al. Capture of authentic embryonic stem cells from rat blastocysts. Cell, 2008, 135(7): 1287-98.

[5]Lai L, Prather RS. Creating genetically modified pigs by using nuclear transfer. Reprod Biol Endocrinol, 2003, 1: 82.

[6]McCreath KJ, Howcroft J, Campbell KH, et al. Production of gene-targeted sheep by nuclear transfer from cultured somatic cells. Nature, 2000, 405(6790): 1066-9.

[7]Lai L, Kolber-Simonds D, Park KW, et al. Production of alpha-1,3-galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning. Science, 2002, 295(5557): 1089-92.

[8]Kuroiwa Y, Kasinathan P, Matsushita H, et al. Sequential targeting of the genes encoding immunoglobulin-mu and prion protein in cattle. Nat Genet, 2004, 36(7): 775-80.

[9]Nagaria P, Robert C, Rassool FV. DNA double-strand break response in stem cells: mechanisms to maintain genomic integrity. Biochim Biophys Acta, 2013, 1830(2): 2345-53.

[10]Gaj T, Gersbach CA, Barbas CF, 3rd. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. Trends Biotechnol, 2013, 31(7): 397-405.

[11]Remy S, Tesson L, Menoret S, et al. Zinc-finger nucleases: a powerful tool for genetic engineering of animals. Transgenic Res, 2010, 19(3): 363-71.

[12]Boch J, Scholze H, Schornack S, et al. Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type Ⅲ effectors. Science, 2009, 326(5959): 1509-12.

[13]Moscou MJ, Bogdanove AJ. A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. Science, 2009, 326(5959): 1501.

[14]Miller JC, Tan S, Qiao G, et al. A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. Nat Biotechnol, 2011, 29(2): 143-8.

[15]Christian M, Cermak T, Doyle EL, et al. Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. Genetics, 2010, 186(2): 757-61.

[16]Mali P, Aach J, Stranges PB, et al. CAS9 transcriptional activators for target specificity screening and paired nickases for cooperative genome engineering. Nat Biotechnol, 2013, 31(9): 833-8.

[17]Mali P, Yang L, Esvelt KM, et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9. Science, 2013, 339: 823-6.

[18]Horvath P, Barrangou R. CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. Science, 2010, 327: 167-70.
[19]Richter H, Randau L, Plagens A. Exploiting CRISPR/Cas: interference mechanisms and applications. Int J Mol Sci, 2013, 14: 14518-31.
[20]Wang H, Yang H, Shivalila CS, et al. One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. Cell, 2013, 153: 910-8.
[21]Yang H, Wang H, Shivalila CS, et al. One-step generation of mice carrying reporter and conditional alleles by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. Cell, 2013, 154: 1370-9.
[22]Cong L, Ran FA, Cox D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. Science, 2013, 339(6121): 819-23.
[23]Thomson JA, Kalishman J, Golos TG, et al. Isolation of a primate embryonic stem cell line. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92(17): 7844-8.
[24]Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. Science, 1998, 282(5391): 1145-7.
[25]Montserrat N, Bahima EG, Batlle L, et al. Generation of pig iPS cells: a model for cell therapy. J Cardiovasc Transl Res, 2011, 4(2): 121-30.
[26]Cao H, Yang P, Pu Y, et al. Characterization of bovine induced pluripotent stem cells by lentiviral transduction of reprogramming factor fusion proteins. Int J Biol Sci, 2012, 8(4): 498-511.
[27]Liu H, Zhu F, Yong J, et al. Generation of induced pluripotent stem cells from adult rhesus monkey fibroblasts. Cell Stem Cell, 2008, 3(6): 587-90.
[28]Tachibana M, Sparman M, Ramsey C, et al. Generation of chimeric rhesus monkeys. Cell, 2012, 148(1-2): 285-95.
[29]Takehashi M, Kanatsu-Shinohara M, Shinohara T. Generation of genetically modified animals using spermatogonial stem cells. Dev Growth Differ, 2010, 52(3): 303-10.
[30]Kanatsu-Shinohara M, Ikawa M, Takehashi M, et al. Production of knockout mice by random or targeted mutagenesis in spermatogonial stem cells. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, 103(21): 8018-23.
[31]Izsvak Z, Frohlich J, Grabundzija I, et al. Generating knockout rats by transposon mutagenesis in spermatogonial stem cells. Nat Methods, 2010, 7(6): 443-5.
[32]Fan Y, Huang ZY, Cao CC, et al. Genome of the Chinese tree shrew. Nat Commun, 2013, 4: 1426.
[33]Niu Y, Yu Y, Bernat A, et al. Transgenic rhesus monkeys produced by gene transfer into early-cleavage-stage embryos using a simian immunodeficiency virus-based vector. Proc Natl Acad Sci USA, 2010, 107(41): 17663-7.
[34]Sadri-Ardekani H, Mizrak SC, Van Daalen SK, et al. Propagation of human spermatogonial stem cells in vitro. JAMA, 2009, 302(19): 2127-34.
[35]Kubota H, Avarbock MR, Brinster RL. Growth factors essential for self-renewal and expansion of mouse spermatogonial stem cells. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101(47): 16489-94.
[36]Maki CB, Pacchiarotti J, Ramos T, et al. Phenotypic and molecular characterization of spermatogonial stem cells in adult primate testes. Hum Reprod, 2009, 24(6): 1480-91.
[37]Shinohara T, Orwig KE, Avarbock MR, et al. Spermatogonial stem cell enrichment by multiparameter selection of mouse testis cells. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97(15): 8346-51.
[38]Buageaw A, Sukhwani M, Ben-Yehudah A, et al. GDNF family receptor alpha1 phenotype of spermatogonial stem cells in immature mouse testes. Biol Reprod, 2005, 73(5): 1011-6.
[39]Kar AB, Kamboj VP, Chandra H. Effect of some chemicals on spermatogenesis in rhesus monkeys. J Reprod Fertil, 1968, 16(2): 165-70.
[40]Brinster RL, Zimmermann JW. Spermatogenesis following male germ-cell transplantation. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91(24): 11298-302.
[41]Bucci LR, Meistrich ML. Effects of busulfan on murine spermatogenesis: cytotoxicity, sterility, sperm abnormalities, and dominant lethal mutations. Mutat Res, 1987, 176(2): 259-68.
[42]Hermann BP, Sukhwani M, Lin CC, et al. Characterization, cryopreservation, and ablation of spermatogonial stem cells in adult rhesus macaques. Stem Cells, 2007, 25(9): 2330-8.