



# 树鼩模型在人类病毒性疾病研究中的应用进展

殷安国<sup>1,2</sup>, 匡德宣<sup>2</sup>, 李晓飞<sup>2</sup>, 张媛<sup>2</sup>, 孙晓梅<sup>2</sup>, 夏雪山<sup>1</sup>, 代解杰<sup>2</sup>

(1. 昆明理工大学生命科学与技术学院, 昆明 650500;  
2. 中国医学科学院/北京协和医学院医学生物学研究所树鼩种质资源中心,  
云南省重大传染病疫苗研发重点实验室, 昆明 650118;)

**【摘要】** 由于树鼩在进化上接近于灵长类动物,在生理、生化及解剖学等生物学特性方面与人类有着相似之处,树鼩得到越来越多的关注,研究人员运用与其他动物相比具有多种优势的树鼩建立了一系列的疾病模型,如病毒类疾病、神经系统、肿瘤等,本文着重就树鼩在人类病毒性疾病方面的研究进展进行概述。

**【关键词】** 树鼩;病毒;动物模型

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2014) 02-0086-04

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2014.02.019

## Progress in application of tree shrew models in research on human viral diseases

YIN An-guo<sup>1,2</sup>, KUANG De-xuan<sup>2</sup>, LI Xiao-fei<sup>2</sup>, ZHANG Yuan<sup>2</sup>, SUN Xiao-mei<sup>2</sup>, XIA Xue-shan<sup>1</sup>, DAI Jie-jie<sup>2</sup>

(1. Faculty of Life Science and Technology, Kunming University of Science and Technology, Kunming Yunnan 650500, China;  
2. Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Yunnan Key Laboratory of Vaccine Research & Development on Severe Infectious Diseases, Kunming Yunnan 650118)

**【Abstract】** Tree shrews get more and more concerns due to many of its physiological, biochemical and anatomical characteristics similar to those of human beings. Therefore, tree shrews models of human diseases such as viral diseases, neurological diseases and tumors attract more and more attention of researchers. In this article we will review the recent advances in application of tree shrew models in research on human viral diseases.

**【Key words】** Tree Shrew; Virus; Viral diseases; Animal models

树鼩(*Tupaia belangeri*, tree shrew),一种广泛存在于南亚、东南亚和中国西南地区<sup>[1]</sup>的动物,现在被归为攀鼩目。最近几十年来,因为作为一种实验动物,拥有着多种独特的特质(例如,体积小,脑与身体的比重大,生殖周期短,饲养花费少,最重要的是,被认为与灵长类关系非常近),树鼩已经被提议在生物医学研究和药物安全测试方面<sup>[2]</sup>可替换灵长类动物成为有效的动物模型。

当今,有许多研究人员尝试用树鼩来构建动物模型,这样能更好的研究丙型肝炎病毒(HCV)<sup>[3]</sup>和乙型

肝炎病毒(HBV)<sup>[4]</sup>感染、近视、竞争压力和抑郁症。

## 1 肝炎病毒

### 1.1 甲型肝炎病毒(Hepatitis A virus, HAV)

在甲型肝炎病毒方面,詹美云等<sup>[5]</sup>让树鼩口服甲肝病毒阳性病人新鲜大便滤液,并在随后的时间里,可在树鼩粪便里检测出甲肝抗原,此抗原可被甲肝恢复期病人血清中和,且感染2~16周的树鼩血清中可检测出甲肝抗体,抗体阳转率78%,从电镜中观察到感染树鼩粪便中的病毒颗粒。实验结果初

[基金项目] 国家科技支撑计划项目(2011BAI15B01-21;2009BAI83B02-21;2012BAI39B01)。

[作者简介] 殷安国(1988-),男,研究生。研究方向:人类病毒感染性动物模型的建立。

[通讯作者] 代解杰,男,研究员,项目负责人。Email: dj@imbeams.com.cn

步的说明了树鼩可能成为甲肝病毒的敏感动物,但是否引起树鼩肝病尚无明确研究。

### 1.2 乙型肝炎病毒(Hepatitis B virus, HBV)

我国是 HBV 感染高发区,在我国的感染者约 1.2 亿以上,在 HBV 感染原代树鼩肝细胞的实验中,Walter 等<sup>[6]</sup>在 HBV 感染的原代树鼩肝细胞中检测到病毒的 DNA 和 RNA 合成,在培养上清液中检测到分泌的 HBsAg 和 HBeAg。他们的发现证明树鼩肝细胞本身适合灵长类动物 HBV 复制。在 HBV 体内感染树鼩实验中,Walter<sup>[6]</sup>等在感染 4 日龄幼树鼩时,血清学检测发现幼龄树鼩感染类似于人类急性自限性乙型肝炎,认为在树鼩体内感染时病毒的复制和基因表达水平可能较低。杨芳等<sup>[7]</sup>用新生树鼩感染人 HBV,证实病毒能在树鼩体内长期存在并稳定复制。庞其方等<sup>[8]</sup>用 HBV 阳性人血清肌注感染树鼩,结果发现树鼩可能是继黑猩猩和长臂猿之后对 HBV 敏感的动物。苏建家等<sup>[9]</sup>用人 HBV 接种 53 只树鼩,发现 45 只树鼩(84.9%)的血清和肝细胞有人 HBV 标记物,利用血清学、免疫组化、分子杂交及电镜检查等技术,在接种了人 HBV 的树鼩血中可查见 HBsAg 及 Dane 颗粒,在肝细胞也检测出 HBsAg、HbcAg 和 HBV DNA,表明树鼩可作为人 HBV 感染模型。Huan 等<sup>[10]</sup>绘制了一幅高质量的树鼩肝细胞基因表达图谱,经过深入分析后,发现肝脏胆汁酸转运体(NTCP,牛磺胆酸钠共转运多肽)会与乙肝病毒包膜蛋白的关键受体结合域发生特异性相互作用,随后进行了一系列细胞实验,证明肝脏胆汁酸转运蛋白的确是 HBV 病毒感染所需的细胞受体。

尽管有上述 HBV 实验感染树鼩感染率较低,但随着树鼩肝细胞 HBV 受体的发现,及受体进一步的深化研究,树鼩用来做感染 HBV 的动物模型的可靠性和实用性也会得到提高。

### 1.3 丙型肝炎病毒(Hepatitis C virus, HCV)

在 2005 年,赵西平等<sup>[11]</sup>证实了在树鼩的原代肝细胞中 HCV 病毒确实可以复制,研究人员从 HCV 阳性病人身上获得血清或血浆感染树鼩原代肝细胞,用 RT-PCR 方法检测到了负链 RNA,这确认了树鼩被感染和病毒的复制,HCV RNA 可以一直检测到接种后第 14 天。组装好的病毒可以不被 RNA 酶降解,且具有感染其他健康树鼩的能力。谢志春等<sup>[12]</sup>比较了正常树鼩和经 750cGy 的 X 射线全身辐照树鼩的感染 HCV 状况,发现辐照后的树鼩对

HCV 表现出了更高的易感性且病毒持续时间明显增长。提示辐照等方式是降低动物免疫能力,促进感染慢性化的一种方法。2010 年,Amako 等<sup>[13]</sup>报道了被 HCV 全长 cDNA 感染后长达 3 年的树鼩跟踪研究,在急性感染期实验动物显示出了轻微的炎症和病毒血症,随后发展为脂肪肝、肝硬化、肝肿瘤的发生。从这些已被感染的树鼩中抽取的血清通过静脉注射到健康树鼩后,会导致健康树鼩发生急性感染,这表明 HCV 病毒可以在树鼩体内有效的复制且复制后的病毒具有感染其他树鼩的能力。

综上所述,树鼩可急性感染 HCV,同时原代肝细胞分离培养后可感染 HCV,但是 HCV 感染树鼩后病毒的复制及表达水平不高,故慢性 HCV 丙肝模型有待进一步探索。另外,目前我国的树鼩多为野生型,ALT 基础水平偏高,许多学者对所得的感染结果提出质疑。在树鼩体内外进行丙肝机制的研究,为丙型肝炎的发病机制、预防治疗及新药的研发奠定了基础。可以看到,随着研究的深入,树鼩有望成为 HCV 感染的理想动物模型。

### 1.4 丁型肝炎病毒(Hepatitis D virus, HDV)

HDV 是一种缺陷病毒,需 HBV 辅助才能进行复制,所以 HDV 感染者首先要有 HBV 感染。丁明权等<sup>[14]</sup>用 HDV/HBV 阳性人血清经同时和重叠感染方式接种于成年树鼩后,定期留取感染树鼩血清及肝组织,检测血清中 HBsAg、HDAg、抗-HD、HBV DNA 及 HDV RNA,研究发现成年树鼩对人 HBV 易感,HBsAg 阳性率为 75%,部分树鼩经分子杂交证实其血清及肝内有 HBV DNA 存在。在感染 HBV 的基础上,经分子杂交检测,其血清及肝内亦有 HDV RNA 存在,部分树鼩血清 HDAg、抗-HD 阳性。肝组织病理检查显示,肝细胞有明显的变性坏死及炎细胞浸润,较单纯 HBV 感染时重。李奇芬等<sup>[15]</sup>观察到的结果也与上述实验结果相同,血清学表现及肝组织病变与在黑猩猩实验感染 HDV 中观察到的情况十分相似,提示成年树鼩可用于丁型肝炎动物模型的研究。

## 2 肠道病毒 EV71 (Human enterovirus 71, EV71)

手足口病多发于 5 岁以下儿童,可引起手、足、口腔等部位的疱疹,甚至可引起中枢神经系统疾病和相关心肺功能衰竭等症状,常见的引起手足口病的病毒为肠道病毒 EV71。王文广等<sup>[16]</sup>对 3 月龄的树鼩采用灌胃、滴鼻、尾静脉注射 3 种方式进行感

染,结果发现,实验组树鼩在第 4 天前出现体温升高,白细胞、淋巴细胞水平也有类似变化;病毒载量在 3 种攻毒方式的实验组树鼩中均可被检测到,峰值出现在第 10 天前,灌胃途径尤为明显,血清的最大中和抗体效价为 1:16。在第 2 周左右,部分实验组树鼩出现急性弛缓性瘫痪,解剖后发现伴有尿潴留症状;通过组织病理学检查可以发现发病树鼩在脑、肺、肠、脾脏、肾等部位发生病理变化。该实验表明 EV71 病毒通过灌胃、滴鼻和静脉注射 3 种方式均可感染中缅树鼩,这为以后研究 EV71 感染树鼩的致病机理、建立手足口病动物模型奠定了基础,但 EV71 是否对各年龄段的树鼩均可感染还有待进一步验证。

### 3 单纯疱疹病毒 (Herpes simplex virus, HSV)

单纯疱疹病毒 (HSV) 属疱疹病毒科单纯疱疹病毒属。HSV 可分为 HSV-1 和 HSV-2, HSV-1 主要引起腰以上感染; HSV-2 主要则与腰以下感染有关。Darai 等<sup>[17]</sup>采用静脉注射、腹腔注射、皮下注射这 3 种方式给 1 月龄 (28~45d) 和成年树鼩 (150d) 注射 HSV 1 或 HSV 2 型病毒,在感染后第 2 天幼年树鼩即出现临床症状,随后死亡。从肝脏和脾脏中可获得高滴度的 HSV 病毒。病理组织学检查发现肝脏部分区域坏死等严重的肝脏变化,形态学上变化为出现疱疹肝炎,其他脏器亦出现病理变化,如脑炎和脾脏中的纤维化。这些结果显示出 HSV 1 和 HSV 2 在幼年树鼩身上的高致病性。相反的,成年树鼩没有发现临床症状和 HSV 病毒。

### 4 流感病毒 (Influenza virus)

流感是最常见的多发病之一,但是目前尚无较为合适的动物模型。雪貂虽敏感,但不易获得。小鼠必须连续传代,才可适应。而幼年或初生者的金黄仓鼠、大鼠、猪等较敏感。至于猴、豚鼠、狗等接种后多为不显性感染。朱宇同等<sup>[18]</sup>用 3 种流感病毒对树鼩由鼻腔滴入接种,实验发现接种后的三天中,新 A<sub>1</sub> 型或 A<sub>3</sub> 型,树鼩的平均肛温与接种前相比有明显的增加。C 型流感病毒感染的树鼩则无体温升高。B 型流感病毒感染后,体温略有升高,但半数个体无发热反应。树鼩在感染 A 型或 B 型后,可从鼻咽液分离出流感病毒,持续排毒长者可达 17 天,接种 C 型流感病毒的树鼩未能从鼻咽液中分离出病毒,但血清抗体转阳,可能为隐形感染排毒甚少。接

种前树鼩血液均未检出流感抗体,接种后绝大多数树鼩产生抗体,2~3 周为高峰,常规法滴度达 1:60~1:1280 左右。2 只树鼩置于隔壁仅有一小窗空气相通,发现亦能发生接触交叉感染。用云南树鼩感染流感病毒 A3 型、新 A1 型或 B 型均获成功,出现规律排毒且有抗体增长,多数有上呼吸道感染症状,体温曲线不规律,可通过接触感染,因此树鼩可能是用于研究流感病毒的较好动物模型,值得我们进一步深入研究并不断完善此模型。

### 5 轮状病毒 (Rotavirus)

轮状病毒是秋季婴儿胃肠炎的主要病原。万新邦等<sup>[19]</sup>用含有轮状病毒的婴儿腹泻粪液,经处理后分为不同浓度的上清液对实验树鼩进行灌胃感染,最早于第 2 天排稀粪,全部发病,普遍表现为呆滞蜷缩,体毛蓬松,食欲减退,体重减轻。个别树鼩腹泻频繁,严重脱水后死亡,病理组织学检查发现死亡树鼩的十二指肠、空肠、回肠和结肠肠腔内均有肠上皮细胞和肠绒毛脱落,有较多淋巴细胞、浆细胞和巨噬细胞浸润,回肠淋巴小节增生。通过电镜检查均在树鼩的粪液中找到轮状病毒,用发病树鼩的粪液感染第 2 代及第 3 代树鼩,亦可在发病期间检测到全部和 2/3 的阳性结果。血清抗人轮状病毒抗体在病程中有 4 倍以上增长。这些结果表明成年树鼩可能是对人轮状病毒的易感动物。

### 6 基孔肯雅病毒 (Chikungunya virus, CHIKV)

基孔肯雅热是由基孔肯雅病毒引起的一种人兽共患病,主要流行于非洲和东南亚地区。张海林等<sup>[20]</sup>用从蝙蝠和基孔肯亚热阳性患者体内分离到的病毒以及国外原型株 ROSS 这 3 株基孔肯雅病毒感染树鼩后,动物出现饮食减少,活动差,3 株病毒感染的树鼩均能产生病毒血症,12 只树鼩中有 11 只产生血凝抑制 (HI) 抗体、中和 (NT) 抗体、补体结合 (CF) 抗体,血凝抑制抗与中和抗体二者相关性非常显著 ( $P < 0.01$ )。且能在其脑、肺、肝、脾和肾等组织中检测到病毒,病理检测显示这些内脏组织呈炎症改变和出血倾向,表明基孔肯亚病毒能侵袭树鼩各主要脏器,认为树鼩对基孔肯亚病毒敏感。树鼩感染基孔肯亚病毒后的病毒血症滴度足以感染蚊虫,在该病毒的保存和传播中可能具有一定流行病学意义,有必要进行深入研究。

## 7 腺病毒 (Adenovirus, ADV)

陈元鼎等<sup>[21]</sup>运用聚丙烯酰胺凝胶(PAGE)从 90 份云南树鼩大便中检出 12 份含腺病毒的粪便样品,用电镜(EM)观察到样品中含有典型腺病毒颗粒,阳性率为 13%,这进一步证实了 PAGE 的结果。病毒 DNA 电泳图型类似于肠道腺病毒,但血凝实验发现这些病毒具有低滴度的凝聚人 O 型、B 型红细胞的作用,这种树鼩腺病毒的血清学关系与人类腺病毒之间的关系以及能否将人类腺病毒运用到树鼩身上建立一种成熟的动物模型尚待进一步研究。

## 8 问题与展望

大小鼠在 HBV 和 HCV 方面亦有很深的研究,如蒋黎等<sup>[22]</sup>运用宫内注射人胎肝细胞形成免疫耐受的方法建立人鼠嵌合肝 HBV 感染模型及 Michael 等<sup>[23]</sup>采用给缺陷小鼠注射肝祖/干细胞的方法建立人源化小鼠 HCV 感染模型,但人鼠嵌合肝和人源化小鼠操作繁琐,周期较长,死亡率高,造价昂贵,故不利于实验的进行。而近年来,树鼩因它在生理、生化及解剖学等生物学特性方面与人类有着相似之处,正日益受到国内外的关注,成为一种新型实验动物,但事实上我们仍缺少针对树鼩的特异性的专有检测试剂及成品试剂盒,用人类或其他物种的检测试剂盒来检测树鼩并不能真实且准确的反映出实际的结果,所以要求获得树鼩大量的且系统的基因组学、蛋白质组学、神经系统、代谢系统、免疫系统等相关方面信息。一种实验动物的使用要求动物的遗传背景清晰,而实现实验动物的标准化和规模化要求建立动物封闭群和品系,这也是现阶段亟需解决的问题。随着树鼩全基因组序列的获得及世界专家的重视,相信上述问题最终会一一被解决,树鼩将作为新型实验动物被研究人员广泛的认同和接受及使用。树鼩在人类疾病动物模型方面的优势对于探究人类疾病机理、消除人类疾病痛苦、提高人类生活水平方面将发挥着重大的作用。

### 参 考 文 献

- [ 1 ] 彭燕章,叶智彰,邹如金,等. 树鼩生物学 [M]. 云南科技出版社,1991,1-2.
- [ 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: 123 - 130.
- [ 3 ] Zhao, XP, Tang ZY, Bettina K, et al. Primary hepatocytes of *Tupaia belangeri* as a potential model for hepatitis C virus infection [J]. Clin Invest, 2002, 109: 221 - 232.
- [ 4 ] Rui QY, Jian JS, Ding RH, et al. Human hepatitis B virus and hepatocellular carcinoma. II. Experimental infection of tree shrews with hepatitis B virus [J]. Cancer Res Clin Oncol, 1996, 122: 283 - 288.
- [ 5 ] 詹美云,刘崇相,李成明,等. 甲型肝炎病毒感染树鼩的初步研究 [J]. 中国医学科学院学报, 1981, 3(3): 148 - 152.
- [ 6 ] Walter E, Keist R, Niederost B, et al. Hepatitis B virus infection of *Tupaia* hepatocytes in vitro and in vivo [J]. Hepatology, 1996, 24: 1 - 5.
- [ 7 ] 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 [J]. 中华肝脏病杂志, 2009, 17(8): 580 - 584.
- [ 8 ] 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 [J]. 医学研究通讯, 1981, 9: 9 - 11.
- [ 9 ] 苏建家,严瑞琪,甘有全,等. 人乙型肝炎病毒感染成年树鼩的研究 [J]. 上海实验动物科学, 1986, 6(4): 193 - 198.
- [ 10 ] Yuan Y, Zhong GC, Xu GW, et al. Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus [J]. eLife, 2012; 1: e00049.
- [ 11 ] 赵西平,田展飞,陈义春,等. 丙型肝炎病毒体外可感染树鼩肝细胞 [J]. 中华肝脏病杂志, 2005, 13(11): 805 - 807.
- [ 12 ] 谢志春,高志伟,苏寒洁,等. 树鼩对丙型肝炎病毒的易感性研究 [J]. 广西医科大学学报, 2000, 17: 347 - 350.
- [ 13 ] Amako Y, Tsukiyama-Kohara K, Katsume A, et al. Pathogenesis of hepatitis C virus infection in *Tupaia belangeri* [J]. J Virol, 2010, 12: 303 - 311.
- [ 14 ] 丁明权,李奇芬,吴纯清,等. 成年树鼩实验感染丁型肝炎病毒的初步研究 [J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 1995, 9: 138 - 141.
- [ 15 ] 李奇芬,丁明权,王洪,等. 树鼩感染丁型肝炎病毒的实验研究 [J]. 中华医学杂志, 1995, 75: 611 - 613.
- [ 16 ] 王文广,黄晓燕,徐娟,等. EV71 可感染幼龄中缅树鼩 [J]. 动物学研究, 2012, 33(1): 7 - 13.
- [ 17 ] Darai G, Schwaier A, Komitowski D. Experimental Infection of *Tupaia belangeri* (Tree Shrews) with herpes simplex virus types 1 and 2 [J]. J Infect Dis, 1978, 137(3): 221 - 226.
- [ 18 ] 朱宇同,王维祥,曾子安,等. 流感病毒感染成年树鼩的研究 [J]. 上海实验动物科学, 1986, 6(1): 20 - 23.
- [ 19 ] 万新邦,刘玘昌,胥爱源,等. 用人轮状病毒感染成年树鼩的实验研究 [J]. 中华医学杂志, 1982, 62: 461 - 465.
- [ 20 ] 张海林,米竹青,施华芳,等. 树鼩实验感染基孔肯雅病毒的研究 [J]. 病毒学报, 1991, 7(2): 137 - 141.
- [ 21 ] 陈元鼎,戴国珍,李军,等. 树鼩大便中腺病毒的实验研究 [J]. 中国人兽共患病杂志, 1987, 3(3): 2 - 5.
- [ 22 ] 蒋黎. 人鼠嵌合肝动物模型及其感染 HBV 的初步研究 [D]. 第三军医大学, 2004.
- [ 23 ] Washburn ML, Bility MT, Zhang LG, et al. A humanized mouse model to study hepatitis C virus infection, immune response, and liver disease [J]. Gastroenterology, 2012, 140(4): 1334 - 1344.

[ 收稿日期 ] 2013-10-08