



树鼩在肝脏疾病动物模型应用的研究进展

邢会杰^{1,2}, 方梅霞¹, 宋琳亮¹, 和 君¹, 李守军², 傅江南¹

(1. 暨南大学实验动物管理中心, 广州 510632; 2. 华南农业大学兽医学院, 广州 510642)

【摘要】 肝脏疾病已经在世界范围内导致严重的致死率和死亡率, 动物模型是研究肝脏疾病的有效工具, 考虑到非人灵长类实际使用的限制, 树鼩作为非人灵长类替代动物具有资源丰富, 成本较低, 且与人类亲缘关系较近等优势, 本文对树鼩在肝脏疾病动物模型中的应用进行综述。

【关键词】 树鼩; 肝脏疾病; 模型

【中图分类号】 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2014) 02-0079-04

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2014.002.017

Research progress of the application of tree shrew models of liver diseases

XING Hui-jie^{1,2}, FANG Mei-xia¹, SONG Lin-liang¹, HE Jun¹, LI Shou-jun², FU Jiang-nan¹

(1. Insitution of Laboratory Animals, Jinan University, Guangzhou 510632, China;

2. College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642)

【Abstract】 Liver diseases lead to serious fatality and mortality worldwide. Animal models are effective tools for the study of liver diseases. Considering the restrictions in application of non-human primate models, tree shrews has been used as a substitute for non-human primate animals, and show a lot of advantages such as abundant resources, lower cost, close relationship with humans. In this article we will review the research progress of application of tree shrew models of liver diseases.

【Key words】 Tree shrew; Liver disease; Models

生物学研究中动物模型的使用仍将持续很长一段时间。由于伦理及其他如可控性、方便操作及成本效益等方面问题,许多基于人类疾病机理研究和药物研发的实验只能依赖于动物模型的建立和使用^[1]。考虑到非人灵长类实际使用的限制,生物学研究中寻找非人灵长类的替代动物显得尤为必要及紧迫。树鼩(*Tupaia belangeri*, tree shrew)是一种生活在热带和亚热带地区的哺乳纲攀鼩类的小型动物,尽管树鼩精确的系统发育地位仍存在争论,但是一致认为其与灵长类密切相关^[2],与人类

有较近的亲缘关系。最近,昆明动物研究所通过对树鼩全基因组测定和解析,发现树鼩在神经及免疫系统等方面与人类相比具有高度同源性,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,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的研究^[3]。已有证据表明树鼩非常适合用于人体的近视、心理应激和肝炎等问题的研究,且对多种人类易感病毒敏感^[4],本文对近年来利用树鼩在肝脏疾病动物模型中的应用进展综述如下。

【基金项目】 广东省科技基础条件建设项目(No. 2011B060300015), 国家自然科学基金(No. 31101677)。

【作者简介】 邢会杰(1980-)男,在读博士,执业兽医师,主要从事实验动物人类疾病模型研究, E-mail: huijie920326@163.com。

【通讯作者】 傅江南,男,副教授,主要从事实验动物基础与应用研究, E-mail: fujiangnan126@126.com。

1 乙型肝炎病毒模型

乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 感染是全球和我国的重要健康问题,建立方便有效的 HBV 感染动物体内模型是开展 HBV 相关基础和临床研究的重要前提,缺乏合适的体内外感染 HBV 实验模型是阻碍 HBV 基础和临床研究发展的主要瓶颈。因此,建立方便有效的、与人类有较近亲缘关系的动物感染人 HBV 模型,是研究 HBV 的生物学特性、感染致病机理及有效防治措施所亟需的重要课题^[5]。周勇等^[6]将 HBV1.2 质粒通过大隐静脉用水动力注射方法转入树鼩肝脏,检测树鼩血清中 ALT、HBV DNA、HBsAg、HBsAb,结果发现转染 HBV1.2 质粒后树鼩血清中能检测到相关阳性指标,表明大隐静脉水动力注射法能够作为树鼩肝脏外源基因导入的一种方法,这为树鼩成为慢性 HBV 感染模型打下了一定基础。有人对 56 只新生树鼩接种来自 HBV 感染病人或树鼩的血清后分阶段收集血清和肝脏样品,利用 qPCR、酶联免疫分析、Southern blot 和免疫组化等检测分析方法,在接种 48 周后有 6 只树鼩被确定和 4 只疑似表现出慢性 HBV 感染,结果表明树鼩幼仔与人类相比具有一定的可被 HBV 慢性感染的频率,从而初步建立了树鼩 HBV 慢性感染模型^[7]。同时,作者对持续感染 6 年 HBV 的树鼩通过 DNA 分析、肝脏超微结构电镜检测等方法发现肝细胞水肿,脂肪和嗜酸性变性,淋巴细胞浸润和门管区小胆管增生,多区域肝坏死融合形成纤维化和硬化的连接和巨红细胞症,其感染 HBV 病毒的肝脏病理学变化与人相似^[8]。以上研究表明,树鼩具有作为 HBV 感染新模型的应用前景。

2 丙型肝炎病毒模型

丙型肝炎病毒 (hepatitis C virus, HCV) 呈世界流行性,大约 3% 的世界人口遭受慢性 HCV 困扰,到目前为止,还没有预防或治疗 HCV 的疫苗面世,因缺乏合适的动物模型是导致对 HCV 免疫和病原机制研究和研制更有效治疗药物的主要阻碍因素之一。除了人类之外,黑猩猩是对 HCV 易感的唯一物种^[9]。由于 HCV 缺乏理想的动物模型,近年来,国内外学者对树鼩是否可成为 HCV 感染的动物模型作过一些十分有益的尝试。Zhao 等^[10]阐明 HCV 可在树鼩原代肝细胞进行有效的复制和病毒合成,

他们利用 HCV 病人血清或血浆感染树鼩原代肝细胞,通过反转录 PCR 检测到负性单链 RNA 和病毒颗粒证实病毒在树鼩原代肝细胞可进行有效的感染和复制。Amako 等^[11]等用 HCV 患者血清和 HCV 全长 cDNA 重组的病毒颗粒感染树鼩建立 HCV 树鼩模型,并经过长达 3 年观察,通过各项指标检测进行 HCV 感染树鼩后的病原学研究,结果发现急性感染阶段出现中度肝炎和断断续续的病毒血症,并可导致脂肪变性,肝硬化,结节和肿瘤。且通过组织学分析发现 HCV 引起的慢性肝炎和进一步恶化之间存在时间依赖性。为进一步评价树鼩 HCV 是否是由传染的病毒质粒引起的,用被感染 HCV 的树鼩血清去感染幼龄树鼩,然后通过对 HCV RNA 进行检测分析发现受者树鼩也表现出中度肝炎和断断续续的病毒血症,同时将具有较高丰度的 HCV 感染树鼩的血清接种幼年树鼩后呈现急性感染,表明树鼩可有效感染和转染 HCV,但是树鼩模型和人类感染 HCV 后的不同之处在于树鼩较难保持 HCV 病人所表现的持续病毒血症现象^[12]。这些结果表明树鼩有望成为 HCV 感染和疾病研究的有效动物模型进行 HCV 病因及发病机制等方面的深入研究。

3 其它病毒肝炎模型

可用于甲型肝炎病毒 (hepatitis A virus, HAV) 研究的动物模型较少,1981 年詹美云等人对 HAV 感染树鼩进行了初步的研究,他们用 0.5% HAV 阳性病人新鲜大便滤液 0.5 mL 感染 9 只成年树鼩。通过检测抗原、抗体、转氨酶及肝组织病理检查等指标,在感染 2~16 周后,78% 的树血清中检测出了 HAV 抗体,转阳率 75%。这些证据说明树鼩有可能成为人类甲肝病毒敏感的动物。有人认为丁型肝炎病毒 (hepatitis D virus, HDV) 的复制必需依靠 HBV 的辅助,因此 HDV 感染模型必须以 HBV 感染为基础^[13]。有人以树鼩为对象研究证实在感染 HBV 的基础上,可通过同时和重叠感染的方式感染 HDV。肝组织病理学观察发现,树鼩感染 HDV 后,引起的 HDV 的肝脏病理变化与人类的极其相似,可呈现不同的病理类型,易形成慢性发病过程,从而建立 HDV/HBV 实验感染树鼩动物模型^[14]。Yan 等^[15]认为树鼩通过转染 HBV/HDV 病毒全基因组可以在树鼩肝细胞检测到病毒复制,并指出钠离子/牛磺胆酸共转运蛋白抗原 (sodium taurocholate cotransporting polypeptide, NTCP) 在病毒侵入和限

制病毒感染方面具有重要作用。以上结果表明,树鼩具有感染甲肝及丁肝的可能,但能否作为此类肝炎病毒的有效模型,尚需进一步深入开展研究。

4 非酒精性脂肪肝模型

郭小芳等^[16]为探讨罗格列酮对脂肪肝细胞 PPAR α 表达的影响,通过对树鼩饲喂高糖高脂饲料建立树鼩非酒精性脂肪肝模型,通过实验前后检测体重(wt)、空腹血糖(FBG)、空腹血清胰岛素(FINS)、总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)和低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)。实验结束时剖腹取肝标本,光镜下观察肝脏形态学改变,以免疫组化法检测肝脏过氧化物酶体增殖物激活受体(PPAR α)表达水平,结果发现,高糖高脂喂养树鼩后与空白对照组相比,其 FBG、FINS 等均明显升高,肝脏形态学发现严重脂肪肝变性。此结果说明高糖高脂饮食可介导树鼩引起脂肪肝变性。牛昱宇等^[17]使用每公斤树鼩普通饲料加 20 g 胆固醇和 200 g 猪油为高脂饲料,供树鼩自由采食的方法建立树鼩非酒精单纯性脂肪肝动物模型,结果发现 7 周后,60% 的树鼩呈明显脂肪肝症状,14 周后,80% 的树鼩呈明显的脂肪肝症状,其中 20% 的树鼩呈重症脂肪肝症状,部分树鼩有约 95% 的肝细胞脂肪化。以上结果表明树鼩可用于非酒精性脂肪肝动物模型,尤其是单纯性脂肪肝的药物研究与功效评价。

5 肝癌模型

黄曲霉毒素是通过聚酮途径由黄曲霉和寄生曲霉所产生的一种对人类和畜禽危害最大、最常见的霉菌毒素。黄曲霉毒素为肝脏毒素,主要损害肝脏,除了主要诱使动物发生肝癌外,也能诱发胃癌、肾癌、直肠癌及乳腺、卵巢、小肠等部位的癌症^[18]。Li 等^[19]利用黄曲霉毒素对树鼩进行处理约 90 周建立树鼩肝癌模型用以研究黄曲霉毒素介导的肝细胞癌形成过程中的基因调控作用,通过对实验处理组树鼩肝脏标本进行分析发现树鼩肝脏发生癌细胞变。Yan 等^[20]在建立了树鼩实验感染人 HBV 模型的基础上,进行了黄曲霉毒素与人 HBV 双因素在肝细胞癌形成中作用的研究,结果首次在动物体内证实黄曲霉毒素和 HBV 在肝细胞癌形成过程中有协同作用。Su 等^[21]利用 HBV 和黄曲霉毒素对树鼩处理后,研究 p53 蛋白和 p21 蛋白在树鼩肝癌形成

过程中的表达,发现 p53 蛋白的变异和肝癌的发生密切相关,p21 蛋白的过量表达在肝癌的发生发展过程中起到重要的作用。

综上所述,树鼩在人类肝脏疾病模型中的应用已经进行了广泛的研究,但由于以往研究所用的树鼩多为野外捕获的动物,还没有实现树鼩标准化,因此,在建立树鼩肝脏疾病模型的稳定性和重复性方面存在不足,致使一些学者提出质疑,很大程度上限制了树鼩作为肝脏疾病动物模型应用的研究进展。但随着树鼩规模化繁殖、生物净化及建立相应的微生物质量控制品系后,树鼩将会在包括肝脏疾病在内的医学生物学领域发挥极大的作用,尤其在人类疾病的致病机理研究和建立人类疾病的树鼩模型对治疗药物的开发及其评价方面具有广阔的应用前景。

参考文献:

- [1] 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]. J Genet Genomics, 2012, 39: 131-137.
- [2] Janecka JE, Miller W, Pringle TH, et al. Molecular and genomic data identify the closest living relative of primates [J]. Science. 2007, 318(5851):792-794.
- [3] Fan Y, Huang ZY, Cao CC, et al. Genome of the Chinese tree shrew [J]. Nat Commun, 2013, 4: 1426. doi: 10.1038/ncomms2416.
- [4] 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 [J]. 动物学研究, 2012, 33(1):92-98.
- [5] 李瑗,苏建家,杨春,等. 乙型肝炎病毒树鼩体内慢性感染模型的研究历程和展望 [J]. 动物学研究, 2011, 32(1): 104-108.
- [6] 周勇,闫少多,闫虎,等. 树鼩水动力转染方法的建立及在 HBV 模型探索中的应用 [J]. 军事医学, 2011, 35(10):742-745.
- [7] 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 J, 2012, 9:170. doi: 10.1186/1743-422X-9-170.
- [8] Ruan P, Yang C, Su J, et al. Histopathological changes in the liver of tree shrew (*Tupaia belangeri chinensis*) persistently infected with hepatitis B virus [J]. Virol J. 2013, 10:333.
- [9] Compans RW, Cooper MD, Gleba YY, et al. Hepatitis C virus: from molecular virology to antiviral therapy [M]. Current Topics in Microbiology and Immunology, Volume 369, Springer,

- Heidelberg New York Dordrecht London. 2013. 49 – 86.
- [10] Zhao X, Tang ZY, Klumpp B, et al. Primary hepatocytes of *Tupaia belangeri* as a potential model for hepatitis C virus infection [J]. *J Clin Invest*. 2002, 109:221 – 232.
- [11] Amako Y, Tsukiyama-Kohara K, Katsume A, et al. Pathogenesis of hepatitis C virus infection in *Tupaia belangeri* [J]. *J Virol*. 2010, 84:303 – 311.
- [12] 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]. *J Gen Virol*, 2007, 88:2504 – 2512.
- [13] 陈瑾, 代解杰, 孙晓梅. 树鼩肝炎动物模型的研究进展 [J]. *中国比较医学杂志*, 2008, 18(2):59 – 62.
- [14] 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, 75:661 – 613, 639 – 640.
- [15] Yan H, Peng B, He W, et al. Molecular determinants of hepatitis B and D virus entry restriction in mouse sodium taurocholate cotransporting polypeptide [J]. *J Virol*. 2013, 87: 7977 – 7991.
- [16] 郭小芳, 蒙碧辉, 陆丽莹. 罗格列酮对非酒精性脂肪肝病树鼩肝细胞 PPAR γ 表达的影响 [C]. 中华医学会第十次全国内分泌学学术会议论文汇编. 2011 年.
- [17] 牛昱宇, 王宏, 司维, 等. 树鼩非酒精单纯性脂肪肝动物模型的构建方法 [S]. 中国科学院昆明动物研究所, 专利号:201210106203。
- [18] 庄振宏, 张峰, 李燕云, 等. 黄曲霉毒素致癌机理的研究进展 [J], 2011, 50:1522 – 1525.
- [19] Li Y, Wan DF, Su JJ, et al. Differential expression of genes during aflatoxin B (1)-induced hepatocarcinogenesis in tree shrews [J]. *World J Gastroenterol*. 2004, 10:497 – 504.
- [20] 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]. *J Cancer Res Clin Oncol*. 1996, 122:289 – 295.
- [21] Su JJ, Ban KC, Li Y, et al. Alteration of p53 and p21 during hepatocarcinogenesis in tree shrews [J]. *World J Gastroenterol*. 2004, 10:3559 – 3563.
- [修回日期]2013-12-21

更正说明

本刊 2014 年第 1 期文章“参加第 60 届日本实验动物年会汇报”作者姓名应为“张伟伦”, 特此更正。