



# 树鼩在眼科学的基础研究进展

周广龙<sup>1</sup>, 朱勤<sup>1</sup>, 李振宇<sup>2</sup>, 陈玲霞<sup>2</sup>, 尹博文<sup>2</sup>, 胡敏<sup>1</sup>, 孙晓梅<sup>2</sup>

(1. 云南省第二人民医院眼科中心 & 昆明医科大学第四附属医院眼科, 昆明 650021;

2. 中国医学科学院医学生物研究所/北京协和医学院, 树鼩种质资源中心, 昆明 650118)

**【摘要】** 树鼩具有发达的视觉系统, 视锥细胞数量占感光细胞的96%, 具有较好的色觉及立体视觉。我国的树鼩资源丰富, 成本较低, 比较医学和基因组学研究证实树鼩是理想的眼科实验动物模型。利用树鼩开展眼科研究主要集中在近视模型的建立、近视对巩膜和脉络膜造成的变化, 以及树鼩视网膜、视神经、角膜及视皮质的基础研究。本文对树鼩在眼科学方面的基础研究结果进行综述。

**【关键词】** 树鼩; 眼科; 近视; 动物模型

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2015)06-0652-04

Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2015.06.021

## Progress in the basic ophthalmological research of tree shrew

ZHOU Guang-long<sup>1</sup>, ZHU Qin<sup>1</sup>, LI Zhen-yu<sup>2</sup>, CHEN Ling-xia<sup>2</sup>, YIN Bo-wen<sup>2</sup>, HU Min<sup>1</sup>, SUN Xiao-mei<sup>2</sup>

(1. Department of Ophthalmology, the Second People's Hospital of Yunnan Province & the Fourth Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650021, China; 2. Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Tree shrew Germplasm Resource Center, Kunming 650018)

**【Abstract】** Tree shrews have an excellent visual system, their cones accounted for 96% of the photoreceptor cells, so that their color vision and stereo vision are well developed. With their rich resources and low cost, tree shrews have been considered as an ideal animal model in eye research in comparative medicine and genomics research. The ophthalmological research on tree shrew mainly focused on the establishment of myopia model, as well as the changes in myopic sclera and choroids, and the basic studies of their retina, optic and visual cortex. This paper reviewed the basic ophthalmological research of tree shrew.

**【Key words】** Tree shrew; Ophthalmology; Myopia; Animal models

树鼩(tree shrews, *Tupaia belangeri*), 隶属于攀鼩目(Scandentia), 树鼩科(Tupaiaidae)树鼩属(*Tupaia*), 为外形类似于松鼠的一类小型哺乳类动物, 广泛分布于南亚、东南亚及我国南部与西南部地区<sup>[1]</sup>。由于它在生理解剖、神经发育、肝炎病毒感染特性及心理应激模式等方面与灵长类甚至人类高度相似<sup>[2]</sup>, 因此主要用于病毒性肝炎、肝细胞癌、近视及心理社会应激方面的研究<sup>[3]</sup>。

树鼩具有较大的眼睛, 眼球近于圆形, 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。由于树鼩视网膜上具有视锥细胞, 因而能分辨出红、黄、绿色调的能力, 一些研究表明: 树鼩已初步具有双眼视觉或立体视觉<sup>[4]</sup>。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。此外, 由于采用传统常规的实验动物(实验啮齿类和非人灵长类等)研究人类眼科疾病遇到了许多困难, 以及近年来非人灵长类动物资源的枯竭和伦理道德等问题, 急需开发经济、可替代的实验动物用于研究, 其中尤其引人注目的就是树鼩。由于树鼩不

**【基金项目】** 云南省自然科学基金(2013FZ191); 云南省科技创新平台建设(2013DA002)。

**【作者简介】** 周广龙(1985-), 男, 在读硕士研究生, 研究方向: 斜视弱视小儿眼病 E-mail: 1127564996@qq.com

**【通讯作者】** 胡敏, E-mail: fudanhummin@sina.com; 孙晓梅, E-mail: sxm@imbcams.com.cn

仅具有特殊的进化地位,同时还具有一些极为重要的特征,如繁殖周期短,人工饲养较易,经济成本较低等,使其成为人类疾病研究的良好动物模型。随着树鼩基因组测序的完成<sup>[5]</sup>,树鼩在人类疾病模型方面的应用将更加广泛。本文就树鼩在眼科方面的研究进展进行综述。

## 1 树鼩在近视方面的研究

近视是眼科常见眼病之一,发病率之高,已成为严重的公共卫生问题。在我国南方城市 5~15 岁的发病率为 38.1%<sup>[6]</sup>,农村 13~17 岁的发病率为 42.4%<sup>[7]</sup>,已严重影响人们的生活质量。近视的基础研究主要基于动物模型来开展,常用的有鸡、小鼠、树鼩、豚鼠、猫、兔、猴等动物模型。早期的学者多选用鸡为实验对象,但其解剖结构与人类差异很大,不能很好解释人类近视问题,现在已很少应用;虽然小鼠的调节机制与人类相似,但是其眼轴短,测量困难;猫属于夜行性动物,用眼习惯与人类相反;猴子虽然与人类的亲缘关系最密切,但成本较高,而且涉及到伦理问题,也很少采用。而树鼩眼球解剖及视觉系统与人类有高度相似性,感光细胞以视锥细胞为主,对形觉剥夺环境极为敏感,是研究形觉剥夺性近视的极佳动物模型。Siegwart 等<sup>[8]</sup>将自然睁眼后 7、15、21、33、48、63d 树鼩分别用半透明遮光板单眼剥夺 12d 观察眼轴的延长,发现树鼩近视的易感期的高峰时段大约发生在睁眼后 15~45 d 之间。

### 1.1 近视巩膜方面的研究

Neville 等<sup>[9]</sup>用树鼩和鸡制作成单眼缝合诱导近视模型,去除剥夺因素后腹腔注射 D-青霉胺(DPA)或  $\beta$ -氨基丙腈( $\beta$ -APN),发现  $\beta$ -APN 注射组的剥夺眼眼轴明显延长、后极部巩膜明显变薄,并且出现严重的棋盘格样改变,而 DPA 组的变化很小,相同条件下的鸡与对照组相比无明显发育性近视或眼轴延长,说明  $\beta$ -APN 有较强的诱导近视作用以及树鼩在近视模型方面的优势。有研究显示<sup>[10]</sup>将睁眼后 15 d 的树鼩用半透明遮光板戴 12 d,然后在赤道部和后极部巩膜用 5 g 重的负荷,持续 20 min,观察巩膜长度的改变,发现近视眼的后极部和赤道部巩膜标本的延长率比对照组要明显增大,支持了眼轴长度的改变与诱导近视的关系是通过巩膜延长特征来控制的假说。类似的发现还有,巩膜时间依赖性的机械特征受视觉经验的控制<sup>[11]</sup>。Grytz 等<sup>[12]</sup>通过树鼩近视模型研究发现,在近视的发生与恢复过程中,胶原纤维的卷曲直接与眼轴的延伸率相关,这一发现表明,巩膜调节性胶原纤维的可塑性,可能是近视眼轴延长可控制的一个可塑机制,巩膜的硬

度变化与眼轴变化无明显相关性,揭示巩膜软化与近视发生发展无明显因果关系。

### 1.2 近视脉络膜方面的研究

He 等<sup>[13]</sup>将睁眼后 24 d 的树鼩单眼佩戴负透镜诱导形成近视模型,并在恢复期用定量 PCR 检测脉络膜相关基因的变化,发现脉络膜在近视发展过程中起到一个从视网膜到巩膜信号的级联放大作用,进一步说明了脉络膜基因表达的变化引起了巩膜成纤维细胞基因表达的变化和眼轴的延长。同时,他们还通过负透镜、形觉剥夺、持续黑暗环境诱导近视,发现持续黑暗环境组较负透镜组及形觉剥夺组有更明显的近视,而相关基因 mRNA 的表达在负透镜组及形觉剥夺组明显不同,持续黑暗环境组无明显表达异常,说明尽管视觉环境不同,但在脉络膜水平,基因的表达由“启动”正视觉化信号所引起<sup>[14]</sup>。

### 1.3 近视相关基因方面的研究

随着近视基因相关研究的不断深入,近年学者发现 19 种基因的 mRNA 水平在近视眼与正常眼之间存在差异<sup>[15]</sup>。Guo 等<sup>[16]</sup>用树鼩单眼佩戴负透镜的方法来诱发近视“启动”基因的表达,去掉负透镜观察“停止”状态下的基因表达,用定量 RT-PCR 测试了 55 个基因,发现 8 种基因参与了近视的双向调控,这 8 种基因分别是: NPR3、CAPNS1、NGEF、TGFB1、CTGF、NOV、TIMP1、HS6ST1。同时他们还发现通过 3 种(负透镜、形觉剥夺、暗室环境)方式诱导的近视基因表达无明显区别<sup>[17]</sup>。也有学者用酶联免疫法检测到细胞因子 TGF- $\beta$  亚型参与了近视发育过程中巩膜的调控<sup>[18]</sup>。McBrien 等<sup>[19]</sup>通过单眼剥夺树鼩近视模型,然后去除遮盖,体内新合成的葡萄糖胺聚糖(GAGs)用放射性硫标记,结果近视发展的过程中,巩膜 GAG 合成明显减少,尤其是在后极部。

有学者通过分析树鼩基因组中 209 个视觉系统相关基因,除了两个光感受器基因 OPN1MW 和 OPN1MW2 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<sup>[4]</sup>。OPN1MW 和 OPN1MW2 都是中波长感光蛋白,决定物种是三色还是二元色视觉的关键基因,一般只存在于高等灵长类<sup>[20]</sup>,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 基因是视网膜上视杆细胞视觉感受器基因,可以调节夜间视力<sup>[4]</sup>。

## 2 树鼩在视网膜基础及功能方面的研究

视网膜的功能是将进入眼内的光信号进行处理

转变为电信号,传入视神经,再经视觉传导通路传入视中枢产生视觉,而这个过程是由光感受器—视锥细胞、视杆细胞的外节来完成的。视锥细胞感受中等或明亮光线(明视觉)和色觉;视杆细胞感受暗光(暗视觉)。

Foelix 等<sup>[21]</sup>用光学显微镜和电子显微镜观察成年树鼩视网膜和出生后早期不同阶段视网膜发育过程,发现树鼩视锥细胞占光感受器的 96%;视杆细胞占 4%。他们还发现视网膜的成熟过程是离心的,从玻璃体面向巩膜面,出生后在外丛状层和内丛状层即有少量的突触出现,这些早期的突触很小而且拥有较少的突触囊泡,在出生后 14 d 接近成熟。光敏感细胞外节发育最晚,出生后 10 d 即可看到膜盘,但是整齐膜盘在生后 18 d 大量出现,并行使其功能。Muller 等<sup>[22]</sup>将视网膜整体包埋、水平半薄切片甲酚紫和甲苯胺蓝染色发现,树鼩视网膜包含两种视锥细胞:长波长敏感细胞(LWS)和短波长敏感细胞(SWS)(人的为 3 种:长波长敏感细胞、中波长敏感细胞、短波长敏感细胞),视锥细胞的密度范围外周少于中心部,密度最小(12 000/mm<sup>2</sup>)的在外周上方,最大(36 000/mm<sup>2</sup>)的在中央鼻侧视网膜。Petry 等<sup>[23]</sup>用显微分光光度测定法同样观察发现树鼩只存在 LWS 和 SWS。另有学者研究发现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,来完成灵敏的跳跃运动<sup>[24]</sup>。

### 3 树鼩在视皮质方面的研究

Peiyan 等<sup>[25]</sup>用小清蛋白、SMI-32 免疫阳性神经丝蛋白抗原、囊泡谷氨酸盐载体 2(VGLuT2)、游离离子锌、髓磷脂、细胞色素氧化酶及尼氏染色,从大脑的冠状切面、矢状切面和水平面对树鼩皮质各分支区域进行重建,发现其视觉相关区域包括 17 区、18 区、TA 区、TD 区、TP 区、TI 区。Drenhaus 等<sup>[26]</sup>用组织的连续切片、三维重建和形态学测量研究树鼩 V1 区出生后的发育,在 V1 区发育的时空进程中,不同分层的出现代表了中枢到外周视网膜有序的连接,双眼驱动部分在出生后第 1 天 V1 区的中心区域出现,而单眼驱动神经元部分在出生后的第 3 周才能看见,即双眼部分达到中间区域的界限时。视皮质快速发育期从树鼩睁眼开始(P18.8 ± 2.1)并在断奶之后(P32-P37)性成熟之前(P103-P112)达到极点,随后由于细胞的凋亡有所减少。Johnson 等<sup>[27]</sup>通过用体内双光子成像技术,评估 V1 区神经元对短波长敏感视锥细胞刺激的反应特征,发现 V1 区 2/3 层的大多数神经元只接收短波长敏感视锥细胞的刺激,并且这种反应很好的展现了方位选择性

和时空调谐特征。他们还发现树鼩 V1 区第四层感受野特征类似于外侧膝状体输入的感受野特征,外侧膝状体细胞无方向选择性,受控于单一信号,能够对正弦光栅产生强烈的调制反应,而 V1 区第四层细胞也呈现了这些特征<sup>[28]</sup>。Elston 等<sup>[29]</sup>研究树鼩视皮质锥体细胞结构发现,树鼩的锥体细胞在通过 V1、V2 和 TD 区向前发展的过程中逐渐变小,而锥体细胞的棘突是灵长类的两倍之多。另有学者发现树鼩的视皮质输入层已被复杂细胞控制,而简单细胞可能并不是视觉信息处理必须的阶段<sup>[30]</sup>。

### 4 树鼩在角膜方面的研究

有学者<sup>[31]</sup>用电子显微镜观察树鼩角膜的超微结构,发现树鼩的角膜厚度虽然只有人类角膜的一半,但角膜结构与人类非常相似,从前向后也分为角膜上皮层、前弹力层、基质层、后弹力层和角膜内皮层,且各层结构占角膜厚度的比例也跟人类的极为相似。不同的是树鼩角膜基质层前部胶原纤维相互交织排列,基质层后部跟人类相似为平行排列。这种结构特征是研究非遗传性角膜疾病所引起的胶原纤维改变很好的动物模型,例如:准分子激光原位角膜磨镶术(LASIK)。

### 5 树鼩在视神经方面的研究

有学者<sup>[32]</sup>研究 4 周至 5 岁树鼩的视神经,分析视神经的整体形态、细胞形态和细胞外基质,并与人类的视神经进行对比发现树鼩的视神经与人的视神经有很多相似之处,尤其是在筛板区,并且视神经结缔组织的改变与年龄相关。这些特征使得树鼩能够成为继非人灵长类之后研究青光眼病理生理学改变的理想动物模型。

综上所述,树鼩在视觉领域的研究已广泛和深入的开展,作为灵长类的近亲,树鼩具有形体小、饲养成本低及繁殖周期短且与人类进化地位接近等生物学特征,已成为研究人类疾病动物模型的良好动物。尤其在近视发病机理研究方面,树鼩是国际公认的近视模型。而其它常用的实验动物都不能较全面的解释近视的发生发展。树鼩具有发达的视皮层系统,也可作为神经眼科学如弱视发病机制等视皮层相关疾病研究的良好模型。另外,树鼩角膜、视网膜以及视神经基础功能方面的深入研究,也为相关眼科疾病模型如准分子激光原位角膜磨镶术、青光眼等提供新的研究思路。目前树鼩用作实验动物模型标准化已趋于完善,很大程度上促进了树鼩在眼科研究中的进展及推广。然而由于目前还未培育出树鼩的近交品系,一定程度上又受到限制。但是,

随着分子生物学和基因学的发展以及各项标准化的制定,其在眼科动物模型领域会有更广阔的应用前景。

### 参 考 文 献

- [ 1 ] Helgen KM, Wilson DE, Reeder DM. Order scandentia, mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference (3<sup>rd</sup>) [M]. Maryland: John Hopkins University Press, 2005: 104 - 109.
- [ 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 [J]. 动物学研究, 2013, 34(2): 59 - 69.
- [ 3 ] 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.
- [ 4 ] 郑永唐, 姚永刚, 徐林. 树鼩基础生物学与疾病模型 [M]. 云南: 云南科技出版社. 第一版. 2014: 59, 151.
- [ 5 ] Fan Y, Huang ZY, Cao CC, et al. Genome of the Chinese tree shrew [J]. Nature Commun, 2013, 4: 1426. (Dio: 10.1038/ncomms2416)
- [ 6 ] He M, Zeng J, Liu Y, et al. Refractive error and visual impairment in urban children in southern China [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2004, 45(3): 793 - 799.
- [ 7 ] He M, Huang W, Zheng Y, et al. Refractive error and visual impairment in school children in rural southern China [J]. Ophthalmology, 2007, 114: 374 - 382.
- [ 8 ] Siegwart JT Jr, Norton TT. The susceptible period for deprivation-induced myopia in tree shrew [J]. Vision Res, 1998, 38: 3505 - 3515.
- [ 9 ] McBrien NA, Norton TT. Prevention of collagen crosslinking increase form-deprivation myopia in tree shrew [J]. Exp Eye Res. 1994, 59: 475 - 486.
- [ 10 ] Phillips JR, Khalaj M, McBrien NA. Induced myopia associated with increased scleral creep in chick and tree shrew eyes [J]. IOVS, 2000, 41(8): 2028 - 2034.
- [ 11 ] Siegwart JT Jr, Norton TT. Regulation of the mechanical properties of tree shrew sclera by the visual environment [J]. Vision Res, 1999, 39: 387 - 407.
- [ 12 ] Grytz R, Siegwart JT. Changing material properties of the tree shrew sclera during minus lens compensation and recovery [J]. IOVS, 2015, 56(3): 2065 - 2078.
- [ 13 ] He L, Frost MR, Siegwart JT Jr. et al. Gene expression signatures in tree shrew choroid during lens-induced myopia and recovery [J]. Exp Eye Res. 2014, 123: 56 - 71.
- [ 14 ] He L, Frost MR, Siegwart JT Jr. et al. Gene expression signatures in tree shrew choroid in response to three myopiagenic conditions [J]. Vision Res, 2014, 102: 52 - 63.
- [ 15 ] Gao H, Frost MR, Siegwart JT Jr. et al. Patterns of mRNA and protein expression during minus-lens compensation and recovery in tree shrew sclera [J]. Mol Vision, 2011, 17: 903 - 919.
- [ 16 ] Guo L, Frost MR, Siegwart JT Jr. et al. Sclera gene expression during recovery from myopia compared with expression during myopia development in tree shrew [J]. Mol Vision, 2014, 20: 1643 - 1659.
- [ 17 ] Guo L, Frost MR, He L, et al. Gene expression signatures in tree shrew sclera in response to three myopiagenic conditions [J]. IOVS, 2013, 54(10): 6806 - 6819.
- [ 18 ] Jobling AL, Wan R, Gentle A, et al. Retinal and choroidal TGF- $\beta$  in the tree shrew model of myopia: isoform expression, activation and effects on function [J]. Exp Eye Res. 2009, 88: 458 - 466.
- [ 19 ] McBrien NA, Lawlor P, Gentle A, et al. Scleral remodeling during the development of and recovery from axial myopia in the tree shrew [J]. IOVS, 2000, 41(12): 3713 - 3719.
- [ 20 ] Dulai KS, Durum MV, Mollon JD, et al. The evolution of trichromatic color vision by opsin gene duplication in new world and old world primates [J]. Genome Res, 1999, 9: 629 - 638.
- [ 21 ] Foelx RF, Kretz R, Rager G. Structure and postnatal development of photoreceptors and their synapses in the retina of the tree shrew [J]. Cell Tissue Res, 1987, 247: 287 - 298.
- [ 22 ] Muller B, Peichl L. Topography of cones and rods in the tree shrew retina [J]. J Comp Neurol, 1989, 282: 581 - 594.
- [ 23 ] Petry HM, Harosi FI. Visual pigments of the tree shrew (*Tupaia belangeri*) and greater galago (*Galago crassicaudatus*): a microspectrophotometric investigation [J]. Vision Res, 1990, 30(6): 839 - 851.
- [ 24 ] Lu HD, Petry HM. Temporal modulation sensitivity of tree shrew retinal ganglion cells [J]. Visual Neurosci, 2003, 20: 363 - 372.
- [ 25 ] Wong P, Kaas Jon H. Architectonic subdivisions of neocortex in the tree shrew [J]. Anat Record, 2009, 994 - 1027.
- [ 26 ] Drenhaus U, Rager G, Eggl P, et al. On the postnatal development of the striate cortex (V1) in the tree shrew [J]. Eur J Neurosci, 2006, 24: 479 - 490.
- [ 27 ] Johnson EN, Van Hooser SD, Fitzpatrick D. The representation of S-cone signals in primary visual cortex [J]. J Neurosci, 2010, 30(31): 10337 - 10350.
- [ 28 ] Van Hooser SD, Roy A, Rhodes HT, et al. Transformation of receptive field properties from lateral geniculate nucleus to superficial V1 in the tree shrew [J]. J Neurosci, 2013, 33(28): 11494 - 11505.
- [ 29 ] 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 [J]. Exp Brain Res, 2005, 163: 13 - 20.
- [ 30 ] Veit J, Bhattacharyya A, Kretz R, et al. On the relation between receptive field structure and stimulus selectivity in the tree shrew primary visual cortex [J]. Cereb Cortex, 2014, 24(10): 2761 - 2771.
- [ 31 ] Almubrad T, Akhtar S. Structure of corneal layers, collagen fibrils, and proteoglycans of tree shrew cornea [J]. Mol Vision, 2011, 17: 2238 - 2291.
- [ 32 ] Albon J, Farrant S, Akhtar, et al. Connective tissue structure of the tree shrew optic nerve and associated ageing changes [J]. IOVS, 2007, 48(5): 2134 - 2144.

[ 收稿日期 ] 2015-05-12