

大熊猫生理生化及细胞遗传学研究进展

彭建军 石红艳

(四川师范学院珍稀动植物研究所 南充 637002)

关键词 大熊猫 生理生化 细胞遗传

自 1869 年大熊猫 (*Ailuroploida melanoleuca*) 得以订名以来, 由于它的古老、珍稀、奇特和狭窄分布, 一直吸引着众多的中外学者。迄今为止, 所发表的有关论文、综述、专著、科普报道可达 1136 篇(部), 其中关于生理生化研究的论文有 163 篇, 细胞遗传学的仅有 23 篇, 此外, 出

版了有关大熊猫生殖生物学的专著 1 部, 发表综述 2 篇。

生理生化及细胞遗传学的研究, 对保护濒危珍稀的大熊猫有着极其重要的意义。然而此

收稿日期: 1995-12-15, 修回日期: 1996-03-20

方面的工作起步较晚:生理生化研究始于 1956 年,细胞遗传学研究始于 1964 年。主要集中于近 10 年。其研究的内容、范围及深入程度是有限的,故笔者就此对 1990 年以后的研究状况作一浅薄综述供同行学者们参考。

1 生理学的研究

有关大熊猫生理学的研究论文共发表了 147 篇,其中生殖生理方面就占了 111 篇,其他生理仅 36 篇。

1.1 生殖生理的研究 大熊猫种群数量稀少,必须通过增强繁殖能力来增大其种群数量,因而生殖生理一直是研究的中心课题。到 1989 年为止,这方面的论文已发表 69 篇,得出了一些重要结论^[1-3]。这些结论为确定人工授精的最佳时间提供了重要依据。此外,通过放射免疫法、乳胶凝集反应和阴道涂片法对大熊猫是否受孕进行了较准确的诊断。

1990 年以来,对大熊猫生殖生理的研究更加深入,在不到 5 年的时间内,发表论文就有 42 篇。

大熊猫是季节性单发情动物,多在春季发情一次。野外雌性大熊猫一般在 5.5 - 7.5 岁开始发情,圈养的一般在 4.5 - 6.5 岁,雄性稍晚 0.5 - 1.0 岁。但近来又发现雌性大熊猫 2.5 岁开始发情。野外大熊猫多于 4 - 5 月发情配种,秋季产仔;在人工饲养下,国内各地大熊猫发情时间不一致。据汤纯香(1994)报道,目前最晚纪录是 6 月底发情配种,冬季产仔。

雌大熊猫发情前期,血清及尿中的促黄体素、 17β -雌二醇、NAG(N-乙酰- β -D 葡萄糖苷醇)含量均处于较低水平,随着其含量的增加,孕酮水平逐渐下降;进入发情高峰期,体内雌二醇、促黄体素、NAG 含量将达最高峰,同时阴道角化细胞百分比也最高,可达 97%,而孕酮则下降到最低水平。LH-Bio(黄体生成素)含量升高能促发母兽的排卵,此时若与雄兽交配或人工授精,则易受孕;到发情后期,雌二醇和 LH-Bio 含量渐降至基础水平,孕酮与 CG(绒毛膜促性腺激素)样物质则逐渐上升,若已怀孕,则在妊娠

早期和晚期升高,晚期最高,妊娠中期停滞在低水平上波动,而分娩前,孕酮及 CG 样物质含量又迅速下降^[4-5]。

王雄清等(1990)对大熊猫精液进行了初步研究,测出一系列特征数据,指出精液质量受大熊猫自身情况及采精方法、频率和量的影响。冯文和等^[6]对大熊猫精液品质进行鉴定,并将其与几种猫科及食草动物的精液质量进行比较,发现大熊猫的精子畸形率比其他动物高,指出这是大熊猫受孕率很低的原因之一。对刚接近性成熟的大熊猫精液在电子显微镜下进行鉴定^[7],发现精液中有巨噬细胞,精子大多发育不正常。这一现象有待进一步研究。此外,邱贤猛等(1992, 1993)对大熊猫与黑熊的人工采精进行了比较研究;陈大元等(1992)研究了大熊猫精液冷冻解冻技术;外源促性腺素诱导大熊猫发情及人工繁殖获得成功^[8];张安居等(1991)研究了大熊猫冷冻精液受胎的效果;刘维新等(1991, 1993)观察研究了大熊猫的分娩活动;何光昕、魏辅文、陈玉村、徐启明、胡锦涛等近几年均先后发表了有关大熊猫繁殖的论文。保护大熊猫还必须注意幼仔的生长发育。何光昕、钟顺隆等(1994)对此方面作了研究。现已有一胎二仔成活的纪录。

探索大熊猫繁殖力下降的原因,不仅需要生理研究方面有所突破,同时还要加强野外大熊猫繁殖生态学的研究,两者结合起来,找到提高大熊猫繁殖力的手段和方法。

1.2 其他生理的研究 近年来,对大熊猫心电图的分析,尿中肾上腺皮质激素节律的研究,氯胺酮及其复合麻醉大熊猫的比较研究等均取得一定进展。对大熊猫血液生理进行了研究,血液成分的测定^[9],血型抗原的特性,以及廉维(1990)进行的红细胞表面抗原和血型的初步鉴定,陈玉村(1990)血液生理生化参量的初探。

大熊猫在分类上属食肉动物,但几乎 99% 仅以竹类为食。故今后需加强其消化生理的研究,探讨进化过程及适应机制,从而解开食竹的奥秘,为饲养食谱的确定提供科学依据。

2 生化的研究

2.1 大熊猫分类的比较生化研究 自1969年 David 将大熊猫定名为黑白熊 (*Ursus melanoleucus*) 已有 120 年, 对其分类地位的确定, 一直都有争议。在 80 年代以前, 其争议大体可归成三大派: 熊派、浣熊派和大熊猫派。到了 80 年代已渐趋于两派。现从比较生化角度分述其观点。

Leouie 和 Wiens (1956) 对大熊猫、熊类及浣熊类的血清作了比较研究, 指出了大熊猫属熊科。随后, Sarrch (1973) 应用免疫技术对大熊猫与其它食肉动物的转铁蛋白和清蛋白进行比较研究, Ramsay (1976) 在神经化学方面对大熊猫脂质成分和脂肪酸组成与其它动物作了比较; 潘文石等 (1982, 1984, 1995) 采用血清学或先进的免疫化学技术将血清与标准抗体所产生的异源反应强度及沉淀量进行比较; Braunitster (1985) 用氨基酸序列测定法对血红蛋白一级结构进行比较; 王希成等 (1989) 将免抗大熊猫 IgG 血清用免疫学方法进行沉淀反应的比较研究。以上这些研究的结论是大熊猫与熊类亲缘关系较近, 建议将大熊猫归于熊类。

罗昌容等 (1984) 对大熊猫与几种食肉类动物的血清蛋白及 LDH (乳酸脱氢酶) 同工酶进行比较研究; 潘文石等 (1984) 对其免疫分类性状进行了比较研究; Tagle (1986) 用蛋白质顺序数据及血红蛋白的 α -链、 β -链相似程度来比较, 均认为大熊猫虽与小熊猫亲缘较近, 但综合来看仍应独立成一类。此外, 梁宋平等 (1986-1989) 比较研究了 LDH 同工酶 M₁ 一级结构, 发现其 LDH-M 亚基一级结构有明显独特性。

大熊猫到底属哪一科? 这不是短时间内就可取得一致回答的问题。90 年代以来, 生物学者们仍在进行此方面的研究。如: 大熊猫与小熊猫消化系统同工酶的比较研究等。90 年代以后, 此工作仍不会停止。随着科学技术的进步, 大熊猫的分类地位将会越来越精确。

2.2 酶及蛋白质的研究 有关大熊猫酶及蛋白质研究的论文共发表了 24 篇, 近 6 年发表的

(13 篇) 占一半以上。

酶的研究主要是有关 LDH 同工酶的研究。范燕等 (1990) 对产后 30h 死亡的大熊猫尸体组织 LDH 同工酶进行了酶谱分析, 结果显示酶谱与成体尸体组织基本一致, 但幼仔肝脏的 LDH₂ 和小肠的 LDH₁、LDH₂ 含量较成体多。李扬文等 (1991) 对不同产地大熊猫红细胞同工酶进行了研究, 结果表明不同栖息地及不同性别的大熊猫红细胞 LDH 及 GPI (葡萄糖磷酸异构酶) 无明显个体差异, MDH 呈现微小差别^[10]。陈威巍等 (1992, 1993) 测定了大熊猫血清淀粉酶正常参考值, 结果发现其普遍较高, 可能是适应植性食物的进化特性之一。本文测出的参数对诊治大熊猫疾病提供了参考依据。此外, 廖光全 (1992) 进行了同工酶的电泳分析; 张亚平等 (1991) 进行了线粒体 DNA 九种限制酶图谱分析。

蛋白质的研究最先见于细胞色素 C 及维生素 D₃ 的运载蛋白的研究。此后, 有毛、角蛋白分离分析, 卵巢颗粒细胞和卵母细胞中不同类型的纤维蛋白溶酶原激活因子的活性和分子量的研究等^[11-13]。蔡伟杰等 (1993) 对大熊猫肌红蛋白纯化及一级结构进行了研究, 测定了分子量、氨基酸组成以及 1-52、56-57、132-153 位氨基酸的排列顺序, 并将结果与食肉目有关动物的已知肌红蛋白的氨基酸顺序进行了比较。增井光子 (1994) 讨论了有关大熊猫蛋白质的代谢。

由上可见, 在生化技术飞速发展的今天, 大熊猫的酶及蛋白质研究显得落后, 有待于进一步努力, 尤其应加强与消化吸收有关酶的研究, 找到增强大熊猫消化吸收能力的方法, 以增强其体质, 从而促其性早熟, 并提高幼仔的体质和生存力。

2.3 微量元素的研究 大熊猫微量元素的研究还处于起步阶段。发表论文共 12 篇, 其中 1990 年以后的有 5 篇。主要是毛发微量元素的研究分析。此外也有对肝脏、血液等微量元素的研究分析。大熊猫体内微量元素含量与山系、性别、生活条件、身体状况等有关, 元素间也

有一定的相关性和差异性^[2]。因此,人工饲养条件下补充适当的微量元素是非常重要的。

张大忠等(1991)用 PIXE(质子激发 x 射线)技术研究了大熊猫体毛微量元素含量与病疫的关系,发现不同健康状况的大熊猫体毛中 Fe、Gr、Ca、Zn 的含量均不同。张万诚^[11]、黄炎、邱贤猛等(1992)均报道了大熊猫与微量元素的关系。

2.4 其它生化研究 石英毛细柱脂肪酸甲脂气液色谱法分离脑糖脂;乳汁的测定分析;血、粪、尿的生理生化参量的检测等^[1-2];肝脏金属硫蛋白的分离分化;何廷美等(1994)测定了大熊猫毛发中 16 种氨基酸。

3 细胞学的研究

关于大熊猫细胞学的研究共发表论文 12 篇。最早始于 Newham(1964)对大熊猫真核细胞的研究。此后,主要是对大熊猫精子的超显微结构和体外精卵细胞受精生理的研究,对精子的精细结构进行扫描及透射电镜观察,大熊猫同种异种体外受精试验等^[1-2]近 6 年该研究的范围有所扩大。谢秩勋等^[12]建立大熊猫细胞免疫功能测定法,以探讨免疫功能与疾病之间的变化关系;雌性生殖器官的超微结构、脑下垂体前叶的超微结构与生殖关系的研究;方盛国等^[13]对消化道超微结构的研究;曾祥元(1994)对肾小球的电子显微镜观察。总之,细胞学研究的范围和深度是很不够的,很多方面需加强,尤其是生殖细胞学和细胞免疫法研究需进一步加强,这对提高大熊猫的繁殖能力和抗病力是很有帮助的。

4 遗传学的研究

此方面研究发表论文 14 篇,1990 年以来的有 5 篇。主要是染色体组型及带型的形态和比较研究。如精母细胞联合体的电子显微镜观察。此外还进行种群遗传学的研究。如潘文石(1989)、张黎明(1994)分别对秦岭,四川、甘肃所有的野生大熊猫种群的年龄组成与性别比例进行了分析,依群体遗传学原理探讨了它们的

有效群体大小,近交系数及发展趋势。

大熊猫分布于我国六大山系,已处严重濒危,了解其遗传多样性及差异程度,具有保护物种的重要意义。宿兵等对大熊猫进行了遗传多样性的蛋白质电泳研究。对野外大熊猫的研究、取材很困难。最近以大熊猫的粪便、尿液及甲醛固定的组织为材料进行的 DNA 指纹分析,弥补了该缺陷。本项研究既不麻醉损伤珍稀动物,又能自死亡的动物获得材料作 DNA 分析。分析结果表明:同一个体的血液、被毛、粪便、尿液以及固定组织检测,其 DNA 指纹图谱完全一致。这无疑为保护野生动物,开辟了 DNA 指纹分析材料来源的广阔应用前景。另外,张思仲等^[14]对大熊猫的 SRY(睾丸决定因子)基因的 PCR(基因扩增技术)扩增和克隆进行了研究,并制作和比较分析了人和大熊猫基因片的限制酶图谱。

综上所述,要保护大熊猫,首先必须保护遗传,控制其种群杂合度的改变,然后大力加强繁殖生理生化和细胞生物学等微观领域的研究,彻底攻克大熊猫繁殖力低的难关,从而增加种群数量,让大熊猫与人类共存共荣!

致谢 本文得到四川师范学院珍稀动植物研究所胡锦矗教授的悉心指正,在此深表谢意!

参 考 文 献

- 1 胡锦矗. 大熊猫生物学研究与进展. 成都:四川科技出版社,1990.
- 2 刘天成. 大熊猫及金丝猴、扭角羚、梅花鹿、白唇鹿、小熊猫. 攀文献情报. 成都:四川科技出版社,1990.
- 3 马逸清,胡锦矗,翟庆龙. 中国的熊类. 成都:四川科技出版社,1994.
- 4 曾国庆,蒋广泰,杨克勤等. 大熊猫生殖生物学研究. I: 大熊猫发情期血清和尿中促黄体素、孕酮和 17 β -雌二醇含量的变化. 动物学报,1990,36(1):63-68.
- 5 曾国庆,张 星,蒋广泰等. 大熊猫生殖生物学研究. II: 大熊猫妊娠期尿中孕酮和绒毛膜促性腺激素样物质含量的变化. 动物学报,1992,38(4):429-434.
- 6 冯文和,王鹏彦,上春蓉等. 大熊猫精液品质的研究. I: 精液质量的动态观察. 兽类学报,1991,11(1):1-8.
- 7 陈大元,段崇文,宋祥芬等. 大熊猫精液品质的研究——

- 精子和非精子的细胞成分超微结构观察, 兽类学报, 1995, 15(1): 1-3.
- 8 陈大元, 潘星光, 宋祥芬等. 外源促性腺激素诱导大熊猫发情及人工繁殖获得首次成功. 动物学报, 1990, 36(1): 46.
- 9 董全, 龙志, 稽美群等. 大熊猫血液成分的测定. 动物学报, 1991, 37(1): 64-73.
- 10 李杨文, 张燕生. 不同产地大熊猫红细胞同工酶的比较研究. 动物学报, 1991, 37(3): 281-286.
- 11 张万成, 丁东, 李丹等. 大熊猫毛发中无机元素的初步研究. 兽类学报, 1991, 11(4): 246-252.
- 12 谢祥勋, 李素华, 王天然. 大熊猫细胞免疫功能的测定. 动物学报, 1991, 37(1): 108-109.
- 13 方盛国, 冯文和, 张安居等. 大熊猫亲子鉴定 DNA 指纹技术应用. 四川大学学报(自然科学版), 1994, 3(3): 389-395.
- 14 张思仲, 周荣家. 大熊猫 SKY 基因的 PCR 扩增和克隆. 遗传学报, 1994, 21(4): 281-286.