

中缅树 肝在冷适应条件下的产热特征

张麟^① 王睿^① 杨芳^① 谢静^① 王政昆^{①*} 龚正达^② 郭宪国^③

(^① 云南师范大学生命科学学院 教育部生物能源持续开发利用工程研究中心

云南省能源与环境生物技术重点实验室 昆明 650092;

^② 大理学院基础医学部媒介与病原生物研究所 云南大理 671000;

^③ 云南流行病防治研究所 云南大理 671000)

摘要: 中缅树 (*Tupaia belangeri*) 为东洋界特有小型哺乳动物。本研究测定了中缅树 冷驯化实验组(7 d、14 d、21 d、28 d) 与对照组(0 d) 中肝线粒体蛋白含量、呼吸状态 III 和状态 IV 的变化, 探讨中缅树 对不同冷环境的适应情况以及肝产热的机理。结果表明, 在冷驯化条件下, 中缅树 产热显著增加, 与对照组相比, 实验组肝总蛋白含量、肝线粒体蛋白含量、呼吸状态 III 和状态 IV 有着显著的提高, 在 28 d 后分别增加了 39.9%、39.3%、84.9%、181.1%, 因此, 肝在中缅树 冷适应产热过程中具有重要的作用。同时, 从生理生态方面为树 的岛屿起源学说提供依据。

关键词: 中缅树 ; 冷适应; 肝; 产热特征; 岛屿起源

中图分类号: Q958, Q955 文献标识码: A 文章编号: 0250-3263(2009)04-47-11

Thermogenesis Characteristics of Cold Adaptation of Liver in *Tupaia belangeri*

ZHANG Lin^① WANG Rui^① YANG Fang^① XIE Jing^① WANG Zheng-Kun^{①*}
GONG Zheng-Da^② GUO Xiarr Guo^③

(^① School of Life Science of Yunnan Normal University, Engineering Research Center of Sustainable Development and Utilization of Biomass Energy Ministry of Education, The Key Laboratory of Biomass Energy and Environment Biological Technology in Yunnan Province, Kunming 650092;

^② Laboratory of Vector and Pathogen of Basic Medicine Faculty, Dali University, Yunnan Dali 671000;

^③ Yunnan Institute of Epidemic Disease Control and Research, Yunnan Dali 671000, China)

Abstract: The Tree Shrew (*Tupaia belangeri*) is a unique species of small mammals in the Oriental realm. In order to study their cold adaptive capacity in cold environment, the III state and the IV state of mitochondrial respiration, the protein content of mitochondria of liver were measured under the condition of being cold exposure ($5 \pm 1^\circ\text{C}$, 12L: 12D) during different times [0 d (control), 7 d, 14 d, 21 d, 28 d]. Compared with the controls, the total protein, mitochondrial protein, and the III state and the IV state of mitochondrial respiration of liver greatly increased with prolonged cold exposure (increased 39.9%, 39.3%, 84.9%, 181.1%, respectively, after 28 d). The result indicates that the liver plays a key role of the adaptive thermogenesis during cold exposure in the *T. belangeri*. The physiological ecology evidence is also given to the island origin of *T. belangeri*.

基金项目 国家自然科学基金项目(No. 30560026), 云南科技强省重点项目(No. 2007C000Z1);

* 通讯作者, E-mail: wzk_930@yahoo.com.cn;

第一作者介绍 张麟, 男, 大学本科; 研究方向: 动物生理生态学; E-mail: lzhangss@xmsn.cn.

收稿日期: 2008-12-29, 修回日期: 2009-05-13

Key words: *Tupaia belangeri*; Cold adaptation; Liver; Thermogenesis characteristics; Island origin

在应对冬季的冷胁迫时,许多冬季活动的小型哺乳动物增加产热来维持稳定的体温^[1]。在低温胁迫环境中,小型哺乳动物的生理和生化机制发生变化,这些变化表现出对生活环境的适应^[2],并影响到动物的生理机制和进化机制^[3],这方面的研究已经成为动物生理生态的重要研究领域。国内外对小型哺乳动物适应性产热的研究主要集中在能量代谢、体重、体温及激素分泌的季节性调节上,但多数研究对象是典型的北方动物,热带种类研究较少^[4-6]。肝是恒温动物尤其是小型动物的主要产热器官^[7],动物的基础代谢率中有20%~25%来自肝^[8],而冷驯化正是刺激基础代谢率增加的重要因素^[9]。在线粒体水平上,个体产热受到冷驯化影响显著,中缅树 (*Tupaia belangeri*) 肝线粒体呼吸也显著受到低温的影响。中缅树在低温环境中,为了适应冷胁迫,其产热可能与质子漏有关^[10]。

中缅树 属于攀 目 (Scandentia) 树 科 (Tupaïidae) 树 属,主要分布于东南亚、印度、锡金、尼泊尔、缅甸及我国广西南部 and 海南岛等地,为东洋界特有小型哺乳动物,是该科中分布最广和分布纬度最高的一个种^[11]。中缅树 在我国的分布范围,为青藏高原南延部分,其海拔西部高东部低,相对高度变化较大,属典型的热带、亚热带气候地区,其环境条件由湿热类型向干旱寒冷逐渐转变,形成明显的气候过渡地带,为动物生存提供了多种多样的立体栖息环境;尤其横断山脉地区,为北方耐寒动物种类向南迁移和南方热带种类向北扩散提供了通道^[12]。我国的云贵高原可能是中缅树 分布的北限^[11],分布于该过渡地带的中缅树 ,其产热能力显示出了温带动物的某些特征,因此其生理适应上可能会显示出与东洋界其他小型哺乳动物的不同。本实验室已有的实验研究表明,分布于该过渡地带的中缅树 ,其生理适应特征显示出某些过渡特征,同时又表现出一定的差异性^[13]。

通过测定中缅树 冷驯化实验组(7 d、14 d、21 d、28 d)与对照组(0 d)中肝线粒体蛋白含量、呼吸状态 II 和状态 IV 的变化,探讨中缅树 对不同冷环境的适应情况以及肝产热的机理。

1 材料与方法

1.1 实验动物 实验动物于 2006 年 7 月捕自云南省昆明市禄劝县屏山镇(北纬 25°25'~26°22',东经 102°13'~102°57')附近灌丛中(海拔 1 679 m),动物捕回后单笼饲养,22~25℃室温条件下适应 3 d,光照 12L:12D,此为 0 d 对照组。冷驯化 7 d、14 d、21 d、28 d 共 4 组,每组 8 只动物,在环境温度(5±1)℃、无巢材、光照 12L:12D 条件下单笼饲养。

每天上午定点喂以由玉米面、奶粉、白糖以 90%:5%:5% 比例混合制得的熟食,添加少许水,每隔一天加喂苹果、梨等水果适量。

实验动物均为非繁殖期成年个体,实验组与对照组中尽量雌雄各半,饲养地点为云南师范大学生命科学学院动物学实验室。

1.2 耗氧量测定

1.2.1 基础代谢率(basal metabolic rate, BMR)的测定 动物的基础代谢率采用澳大利亚生产 ADML870 开放式呼吸仪测定。代谢率的计算方法为 Hill^[14] 所述, $RMR = \frac{F(FIO_2 - FEO_2)}{M(1 - FEO_2)}$, 式中, F 为标准状态下的气体流量(ml/min), FIO_2 为进入呼吸室气体的氧气浓度, FEO_2 为流出呼吸室气体的氧气浓度(ml/min), RMR 为静止代谢率(ml O₂/g·h), M 为体重(g)。将呼吸室置于上海博迅医疗设备厂生产的 SPX-300 型人工气候箱,由其将实验温度控制在中缅树 的热中性区(30±0.5)℃^[15]。呼吸室为 500 ml,进入呼吸室的气体流量为 200 ml/min。动物实验前一般饥饿 2~4 h,实验进行 1.5 h,进入呼吸室后适应 30 min,然后记录 1 h 测定基础代谢率。实验前后均称体重,以实验前后体重(精确到 0.1 g)的平均值作为本次的动物体重。实验前

后均测体温,采用数字式体温计(北京师范大学司南仪器厂)插入直肠约 3 cm 测量动物的体温,每次测温探头在直肠内静置约 45 s 左右读数,并以实验后体温作为动物在该温度下的体温。

1.2.2 非颤抖性产热(nonshivering thermogenesis, NST)的测定 在 BMR 测定后,迅速取出实验动物,在肩胛间注射去甲肾上腺素(norepinephrine, NE),用 ADML870 开放式呼吸仪测定动物在 30℃ 下的最大非颤抖性产热(the maximal nonshivering thermogenesis, NST_{max})。注射与体重相应剂量 1.0 mg/kg BM (体重 body mass, BM) 的 NE(剂量经预备实验确定),再放回呼吸室连续测定 30 min 左右,选取最大持续耗氧量作为 $NST_{max}^{[16]}$ 。

1.3 肝组织分离线粒体及线粒体蛋白含量、呼吸活性测定

1.3.1 肝线粒体的分离 动物用断颈法处死后,迅速取出肝。按照 Cannon 等^[17]介绍的方法,将肝在冰浴中剪碎,加 5 倍体积(w/v) 肝提取液,手动匀浆;2 000 g 4℃ 离心 7 min,弃沉淀;取上清于 10 000 g 4℃ 离心 10 min,弃上清;将沉淀用适量提取液悬浮,于 10 000 g 4℃ 离心 10 min,弃上清;所得沉淀即为线粒体,加适量提取液溶解,即可用于测定呼吸活性。

1.3.2 肝线粒体呼吸活性测定 采用 CHLOTO-LAB2 氧电极(Hansatech Instruments Lab)测定线粒体呼吸状态 III 和状态 IV。加 5 μmol ADP 测定状态 II 呼吸,ADP 耗尽后变为线粒体呼吸状态 IV;呼吸底物为琥珀酸,反应杯总体积为 2 ml,反应温度为 30℃。

1.3.3 肝线粒体含量测定 蛋白质定量采用 Folin Phenol 法,以牛血清白蛋白为标准。

1.4 数据处理 实验数据用 SPSS 15.0 统计软件包进行分析处理,体重、体温、基础代谢率、非颤抖性产热、肝重量以及肝线粒体呼吸指标采用回归分析,所有测量指标均采用单因子方差(One-Way ANOVA)多重比较,并且用协方差分析处理体重对基础代谢率、非颤抖性产热的影

响。结果均以 Mean ± SE 表示, $P < 0.05$ 为差异显著, $P < 0.01$ 为差异极显著。

2 结果

2.1 体重(BM)及体温(temperature body, TB)的变化 驯化前,各实验组的中缅树 体重差异不显著(One-Way ANOVA, $F_{4,35} = 0.364$, $P > 0.05$)。随着冷暴露时间的延长,体重逐渐增加,到 21 d 时,体重变化达到显著水平($P < 0.05$),28 d 与对照组(0 d)比较差异极显著(One-Way ANOVA, $F_{4,35} = 4.893$, $P < 0.01$),体重增加了 10.0% (表 1)。体重(BM)与驯化时间(D)显著相关,两者之间的回归方程为: $BM = 106.82 + 3.41D$ ($r^2 = 0.86$, $P < 0.01$, $n = 40$),对照组体重则没有明显的变化。

驯化前,各实验组的中缅树 体温差异不显著(One-Way ANOVA, $F_{4,35} = 0.34$, $P > 0.05$)。随着冷暴露时间的延长,中缅树 的体温与冷驯化时间呈显著负相关($P < 0.01$),与对照组(0 d)比较差异极显著(One-Way ANOVA, $F_{4,35} = 9.431$, $P < 0.01$),7 d 即达到显著水平,28 d 后比对照组(0 d)下降了 3.79% (表 1),并且体温(BT)与驯化时间(D)显著相关,两者之间的回归方程为: $BT = 38.40 - 0.33D$ ($r^2 = 0.87$, $P < 0.01$, $n = 40$)。

2.2 BMR 与 NST_{max} 的变化 中缅树 产热能力受低温胁迫的影响较大。BMR 在驯化期间显著增加,与对照组(0 d)比较差异极显著(One-Way ANOVA, $F_{4,35} = 26.313$, $P < 0.01$)。14 d 即达到极显著水平($P < 0.01$)。驯化 28 d 后, BMR 比对照组(0 d)增加了 55.43% ($P < 0.01$)。协方差处理的结果表明,体重对基础代谢率的影响不显著($F_{4,35} = 0.451$, $P > 0.05$)。驯化时间对基础代谢率的影响极显著($F_{4,35} = 19.084$, $P < 0.01$),而且随着驯化时间的延长,基础代谢率会增加。BMR 与驯化时间(D)显著相关,两者之间的回归方程为: $BMR = 1.52 + 0.28D$ ($r^2 = 0.93$, $P < 0.01$, $n = 40$) (图 1)。

表 1 中缅树 冷驯化过程中体重和体温的变化(Mean ± SE)

Table 1 Changes of body mass and temperature in *Tupaia belangeri* during cold exposure

冷驯化时间 Cold exposed (d)	样本数 Sample (n)	驯化前体重 Initial of body mass (g)	驯化后体重 Final of body mass (g)	驯化前体温 Initial of body temperature (°C)	驯化后体温 Final of body temperature (°C)
0	8	112.6 ± 2.5	112.6 ± 2.5	38.3 ± 0.1	38.3 ± 0.1
7	8	111.3 ± 2.9	110.3 ± 2.5	38.2 ± 0.2	37.6 ± 0.4
14	8	113.4 ± 3.1	116.6 ± 2.9	38.1 ± 0.4	37.1 ± 0.4*
21	8	109.9 ± 2.9	121.7 ± 2.5*	38.0 ± 0.3	37.2 ± 0.4*
28	8	113.9 ± 4.7	123.9 ± 2.7*	38.3 ± 0.2	36.8 ± 0.4*

经 Q-Q 概率分析检验数据均属正态分布, 与对照组比较* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

Data were normal distribution by using descriptive statistics (Q-Q plots test); * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with control.

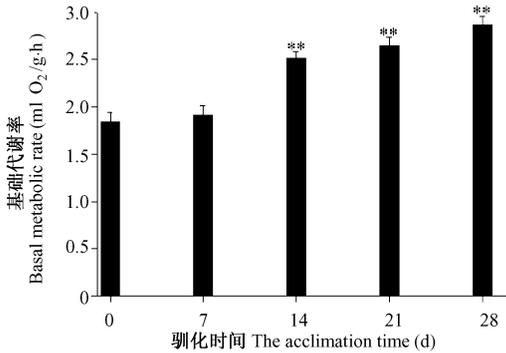


图 1 冷驯化对中缅树 基础代谢率的影响

Fig. 1 The effects of low temperature on BMR of *Tupaia belangeri*

与对照组(0 d)比较, ** $P < 0.01$ 。

** $P < 0.01$, compared with control (0 d).

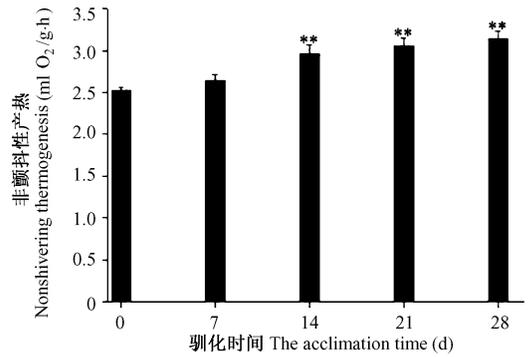


图 2 冷驯化对中缅树 NST_{max}的影响

Fig. 2 The effects of cold exposure on NST_{max} in *Tupaia belangeri*

与对照组(0 d)比较, ** $P < 0.01$ 。

** $P < 0.01$, compared with control (0 d).

NST_{max} 随着冷驯化时间的延长也显著增加, 14 d 达到极显著水平, 驯化 28 d 后, NST_{max} 比对照组增加 24.2% ($P < 0.01$), 与对照组(0 d)比较差异极显著 (One Way ANOVA, $F_{4,35} = 9.319, P < 0.01$)。协方差处理结果表明, 体重对最大非颤抖性产热的影响不显著 ($F_{4,35} = 0.007, P > 0.05$)。驯化时间对最大非颤抖性产热的影响极显著 ($F_{4,35} = 6.39, P < 0.01$), 而且随着驯化时间的延长, 最大非颤抖性产热会增加。NST_{max} 与驯化时间(D)显著相关, 两者之间的回归方程为: $NST_{max} = 2.37 + 0.164D$ ($r^2 = 0.92, P < 0.001, n = 40$) (图 2)。

在冷驯化过程中, 最大非颤抖性产热对中缅树 肝线粒体产热的贡献随着冷驯化时间的延长而显著降低, 21 d 达到极显著水平, 驯化

28 d 后比对照组下降了 74.5% ($P < 0.01$), 与对照组 (0 d) 比较差异极显著 (One Way ANOVA, $F_{4,35} = 4.944, P < 0.01$), 并且与驯化时间(D)显著相关, 两者之间的回归方程为: $\frac{NST_{max} - BMR}{BMR} \times 100\% = 49.53 - 8.25D$ ($r^2 = 0.87, P < 0.01, n = 40$) (图 3)。

2.3 肝重量(the weight of liver, W)及肝相对重量(the relative weight of liver, WX)的变化
中缅树 肝重量及肝的相对重量均随着冷驯化时间的延长而显著增加, 14 d 时即达到极显著水平, 分别比对照组增加了 19.3% 和 16.8% ($P < 0.01$)。28 d 均达到极显著水平, 肝重量与对照组 (0 d) 比较差异极显著 (One Way ANOVA, $F_{4,35} = 22.117, P < 0.01$), 同时肝相对

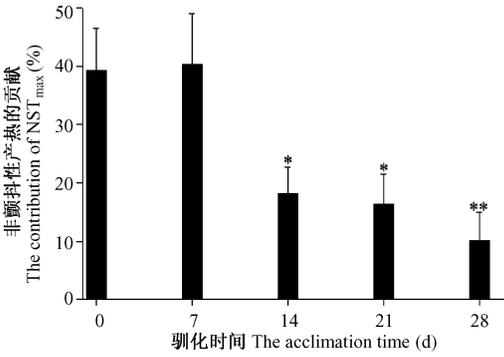


图3 冷驯化中缅树 最大非颤抖性产热(NST_{max})对产热的贡献

Fig.3 The contribution of low temperature on

NST for thermogenesis adaptive of *Tupaia belangeri*

与对照组(0 d)比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with control(0 d).

重量也出现极显著差异(One-Way ANOVA, $F_{4,35} = 8.223, P < 0.01$), 分别比对照组(0 d)增加 51.6%和 37.1% ($P < 0.01$)。二者均与驯化时间(D)显著相关, 两者之间的回归方程分别为: $W = 3.84 + 0.584D$ ($r^2 = 0.98, P < 0.01, n = 40$); $WX = 3.78 + 0.349D$ ($r^2 = 0.97, P < 0.01, n = 40$) (图4)。

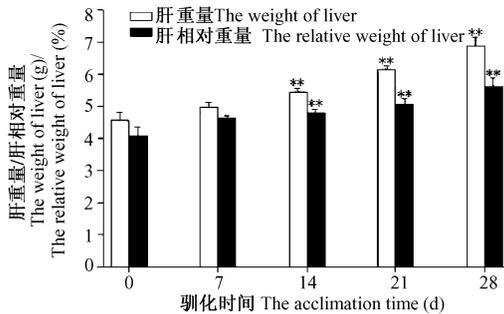


图4 冷驯化对中缅树 肝重量的影响

Fig.4 The effects of low temperature on the

weight of liver in *Tupaia belangeri*

与对照组(0 d)比较, ** $P < 0.01$.

** $P < 0.01$, compared with control(0 d).

2.4 肝组织中总蛋白 (the protein content of liver, TP) 与线粒体蛋白 (the protein content of mitochondria, MP) 含量的变化 中缅树 肝总蛋白含量随着驯化时间的增加而显著增加 ($P < 0.01$), 7 d 时开始达到显著水平, 比对照组(0

d) 增加了 14.9% ($P < 0.05$); 到 28 d 时增加了 39.9% ($P < 0.01$), 与对照组(0 d) 相比出现极显著差异(One-Way ANOVA, $F_{4,35} = 53.423, P < 0.01$)。并且 TP 与驯化时间(D) 显著相关, 两者之间的回归方程为: $TP = 88.31 + 9.17D$ ($r^2 = 0.98, P < 0.01, n = 40$)。肝线粒体蛋白含量也随着驯化时间的增加而显著增加 ($P < 0.01$), 在 14 d 时达到显著水平, 比对照组增加了 14.0% ($P < 0.05$); 28 d 时增加了 39.3% ($P < 0.01$), 与对照组(0 d) 相比出现极显著差异(One-Way ANOVA, $F_{4,35} = 24.469, P < 0.01$)。并且 MP 与驯化时间(D) 显著相关, 两者之间的回归方程为: $MP = 27.43 + 3.49D$ ($r^2 = 0.92, P < 0.01, n = 40$) (图5)。

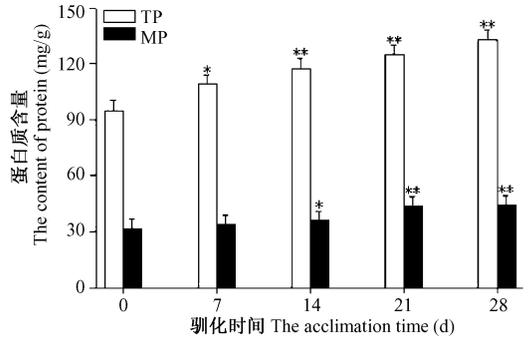


图5 冷驯化对中缅树 肝蛋白质含量的影响

Fig.5 The effects of low temperature on the content of protein in liver of *Tupaia belangeri*

与对照组(0 d)比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with control(0 d).

2.5 肝线粒体状态 III呼吸 (the III state of mitochondrial respiration, ST_{III}) 及状态 IV呼吸 (the IV state of mitochondrial respiration, ST_{IV}) 的变化 中缅树 肝线粒体状态 II呼吸随着冷驯化时间的增加而显著增加 ($P < 0.01$), 7 d 时即达到极显著水平, 比对照组增加了 20.8% ($P < 0.01$); 到 28 d 时增加了 84.9%, ST_{III} 含量与对照组(0 d) 相比出现极显著差异(One-Way ANOVA, $F_{4,35} = 54.732, P < 0.01$)。ST_{III} 与驯化时间(D) 显著相关, 两者之间的回归方程为: $ST_{III} = 0.0341 + 0.0091D$ ($r^2 = 0.98, P < 0.01, n = 40$)。肝线粒体状态 IV呼吸也随着驯化时间

的增加而显著增加 ($P < 0.01$), 在 7 d 时达到极显著水平, 比对照组增加了 54.5% ($P < 0.05$), 28 d 时增加了 181.1%, ST_{IV} 含量与对照组(0 d) 相比出现极显著差异 (One Way ANOVA, $F_{4,35} = 58.037, P < 0.01$)。 ST_{IV} 与驯化时间(D) 显著相关, 两者之间的回归方程为: $ST_{IV} = 0.0083 + 0.0056D$ ($r^2 = 0.98, P < 0.01, n = 40$) (图 6)。

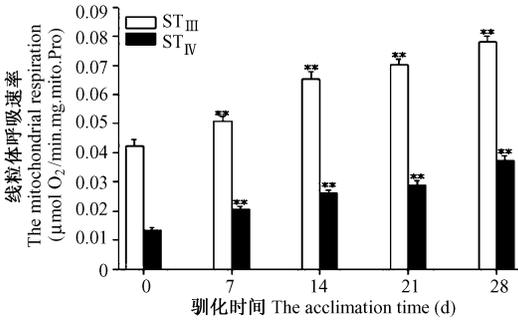


图 6 冷驯化对中缅树 肝线粒体呼吸的影响

Fig. 6 The effects of low temperature on the respiration of mitochondrial in liver of *Tupaia belangeri*

与对照组(0 d) 比较, ** $P < 0.01$,

** $P < 0.01$, compared with control (0 d).

3 讨论

线粒体是哺乳动物消耗氧气的主要部位^[18], 肝是氧气消耗的主要器官, 承担呼吸率的 15% ~ 20%^[17], 低温对线粒体影响显著, 而肝受到低温的影响更为显著^[19]。肝在冷胁迫下对中缅树 的产热有着不可忽视的作用。

3.1 体重、体温与冷驯化的关系 Nagy 等认为小型哺乳动物冬季的能量收支有两种相反的进化对策: 冬眠哺乳动物在秋季体重(大多为脂肪)急剧增加, 冬眼前能量的大量贮存与冬眠时低代谢率使得动物顺利过冬; 而非冬眠小型哺乳动物在秋季体重下降, 从而降低了总体代谢率和对能量的需要^[20]。

在冷驯化过程中, 中缅树 的体重不能维持恒定: 随着驯化时间的延长, 中缅树 的体重呈现逐渐增加的趋势(表 1)。但在冷驯化 7 d 时, 中缅树 的体重下降, 这可能是其在新的生活环境下形成了新的生理适应来应对低温对其

的影响; 21 d 与对照组(0 d) 相比差异显著, 28 d 后体重比对照组增加 10.0%。这种变化趋势与同地区的啮齿类动物高山姬鼠 (*Apodemus chevrieri*) 和大绒鼠 (*Eothenomys miletus*) 不同, 后两种啮齿类动物在冷驯化 28 d 后体重比对照组(0 d) 分别减少 16.05% 和 11.01%^[4], 而且与黑线毛足鼠 (*Phalopus sungorus*)、 属 (*Sorex*) 的大多数种类等典型北方小型哺乳动物在冬季或冷驯化条件下体重降低^[21] 的趋势亦不同。中缅树 在冷驯化过程中体重随着驯化时间的延长, 呈现逐渐增加的趋势, 与环颈旅鼠 (*Dicrostonyx groenlandicus*) 和金色中仓鼠 (*Mesocricetus auratus*) 在低温胁迫下, 体重的变化相同^[22]。

在冷驯化过程中, 中缅树 体温随冷驯化时间的延长而逐渐下降(表 1), 这与中缅树 生活在年温差较小, 日温差较大, 冬短无夏, 春秋季节长达 9 个多月的生活环境中有关, 也与之前的研究结果一致^[23]。中缅树 的体温还具有明显的昼夜变化节律, 体温的昼夜变化幅度达到 5℃ 以上, 这一特征对其抵抗夜间低温也具有重要的适应意义^[24]。

小型哺乳动物的代谢产热特征和体温调节与其能量利用、分配、生活史对策及其进化途径等方面密切相关, 反映了动物对环境的适应模式和生理能力^[25]。

在低温胁迫下, 中缅树 可以通过降低体温来调节能量分配, 减少与环境温度的差值, 以达到减少散热、节省能源^[26] 的目的; 同时, 增加体重可减少相对体表面积, 降低热传导, 进一步增强低温适应能力。由于中缅树 散热能力比产热能力强^[15], 通过增加体重、降低体温, 使其在增加产热相对不多的条件下, 减少散热、用于体温调节的能量, 这对其生存具有重要的适应意义。

3.2 BMR 与 NST_{max} 的变化关系 基础代谢率 BMR 是生理生态学中的重要指标, 能反映不同物种、个体之间的能量消耗水平, 在适应环境的过程中具有重要的意义^[22], 它受到很多因素如温度、食物等影响^[27], 也与季节性变化有关^[28]。

增强产热能力是小型哺乳动物抵抗低温胁迫的一种重要生理适应对策^[29]。在冷胁迫环境中,小型哺乳动物可以通过提高 BMR 和 NST_{max} 来增强冷适应能力^[30]。大量研究结果表明,低温是增加小型哺乳动物产热的主要因子:黑田鼠(*Microtus agrestis*) 在 10 °C 冷驯化 100 d 后, BMR 增加 52.2%^[31]; 小家鼠(*Mus musculus*) 在持续降低环境温度的情况下, BMR 持续上升, 实验组(5 °C) BMR 比对照组增加 23%^[32]; 我们的结果, 中缅树 冷驯化后 BMR 显著增加, 实验组(5 °C) BMR 比对照组增加 55.43%, 也表明低温是刺激中缅树 BMR 增加的主要因子。但是与典型北方小型哺乳动物不同的是, 低温刺激中缅树 BMR 增加的程度较高。黑田鼠、小家鼠等均为典型北方小型哺乳动物, 在低温胁迫条件下, 其 BMR 绝对值比中缅树 对照组(未冷驯化) 高, 但比接受冷驯化的中缅树 BMR 增加程度低; 但中缅树 接受冷驯化后 BMR 增加程度比同地区的大绒鼠(73.7%) 低^[33], 这与中缅树 产热比散热少相一致。低温对小型哺乳动物 BMR 的影响与动物的地理分布有关, 所以 BMR 在增强中缅树 抵抗低温胁迫能力中起着非常重要的作用, 同时也说明低温可能是影响中缅树 进一步向北扩展的限制因素之一。

冷胁迫情况下, NST_{max} 在提高小型哺乳动物产热能力方面具有重要作用^[34]。许多小型哺乳动物受到低温刺激时, NST_{max} 都迅速增加^[30]。如根田鼠(*Microtus oeconomus*) 在 5 °C 驯化 3 周后, NST_{max} 比对照组(23 °C) 增加 32%^[34]。在冷驯化过程中, 中缅树 NST_{max} 随着冷驯化时间的延长也显著增加, 14 d 达到显著水平, 驯化 28 d 后, NST_{max} 比对照组增加 24.2% ($P < 0.01$), 相对根田鼠冷驯化下增加的 NST_{max} 要小。

随着驯化时间的延长, NST_{max} 对冷驯化中缅树 肝线粒体产热的贡献, 在驯化前 7 d 时, NST_{max} 对冷驯化中缅树 肝线粒体产热的贡献出现上升趋势, 说明在这段时间, 中缅树 的非

颤抖性产热在增加; 7 d 后开始下降, 21 d 时达到极显著水平 ($P < 0.01$), 驯化 28 d 后只占到中缅树 肝线粒体产热的 10.03%, 这说明中缅树 在冷驯化条件下, 肝适应性产热占主要地位。

目前关于现生树 的起源与分布, 仍然不完全清楚, 主要存在两种假说, 即岛屿起源假说和大陆起源假说^[35]。从现生攀 目如印度树 (*Anathana ellioti*)、中缅树 、细尾树 (*Dendrogale murina*) 和笔尾树 (*Ptilocercus laotii*) 分布特征, 强有力地支持树 起源于婆罗洲及其附近岛屿, 即岛屿起源假说。除上述几种树 外, 目前已经在泰国、印度、巴基斯坦和中国等大陆的中新统地层^[36-39] 和中国南部的始新世地层^[40] 中发现几种树 的化石记录。值得注意的是, 最近在中国的元谋发现了细尾树 (或原细尾树 *Prodendrogale*) 和笔尾树的近亲^[36], 仅仅发现牙齿, 并没有给出详细的描述和图片, 若确实在中国南部中新世地层中存在树 这两种近亲^[41], 也为大陆起源假说提供了支持。

如果树 起源于大陆, 那么 NST_{max} 对冷驯化中缅树 肝线粒体产热贡献的变化趋势, 应该与北方小型哺乳动物趋势相同, 但本研究结果却刚好相反, NST 在冷适应产热中的比率逐渐降低, 并且下降程度明显高于横断山固有种大绒鼠和由古北界迁移并现居于横断山地区的高山姬鼠(图 3, 表 2), 因此中缅树 很可能是从热带迁移到现在的分布区, 即由南向北迁移, 并保留了热带亚热带小型哺乳动物的产热特征。

中缅树 的这种变化趋势, 由于其遇到低温后机体对冷胁迫的生理生化反应开始加剧, 肌肉的颤抖性产热逐渐减弱, 而通过线粒体其他产热方式如质子漏等^[45] 增加能量, 以应对持续冷暴露。在冷驯化条件下, 中缅树 增加的 BMR 高于黑田鼠、小家鼠等典型北方小型哺乳动物; 增加的 NST_{max} 却低于根田鼠、黄喉姬鼠 (*Apodemus poninsulae*) 及在同地区的大绒鼠和高山姬鼠。很可能因中缅树 这种热带、亚热带

表 2 6 种小型哺乳动物产热比较

Table 2 Compare with the thermogenesis of 6 species of small mammals

	驯化条件	BMR	NSI _{max}	$\frac{NSI_{max} - BMR}{BMR} \times 100\%$	参考文献
	Cold exposure	(ml O ₂ /g·h)	(ml O ₂ /g·h)		Reference
布氏田鼠 <i>Microtus brandti</i>	5°C, 30 d	3.57±0.06	9.81±0.13	174.6±2.0(+)	李庆芬等, 1994 ^[9]
根田鼠 <i>M. oeconomus</i>	5°C, 28 d	2.97±0.29	8.80±0.61	196.3±11.0(+)	王德华等, 1996 ^[34]
高原鼠兔 <i>Ochotona curzoniae</i>	5°C, 28 d	2.19±0.10	3.95±0.21	80.36±9.1(+)	柳劲松等, 1996 ^[42]
高山姬鼠 <i>Apodemus chevrieri</i>	5°C, 28 d	3.81±0.15	5.88±0.24	55.46±7.9(-)	姜文秀等 ^[43]
大绒鼠 <i>Eothenomys miletus</i>	5°C, 28 d	3.42±0.27	5.93±0.30	73.39±5.5(-)	朱万龙等, 2008 ^[44]
中缅树 <i>Tupaia blangeri</i>	5°C, 28 d	2.87±0.09	3.13±0.10	10.03±4.9(-)	本研究

“+”表示上升至,“-”表示下降至。“+”express raised,“-”express dropped.

小型哺乳动物在向北扩散过程中, NSI 的增加并不是适应低温的主要产热方式, 中缅树 很可能是通过其他产热方式如质子漏和增加 BMR 来应对低温环境。Speakman 等的研究也认为, 增加的 BMR 能够使机体减少抗氧化物和衰老引起的损伤^[46], 进而能更好地适应环境和生存。

3.3 肝组织及线粒体蛋白含量 在冷驯化过程中, 中缅树 肝重量及相对重量显著增加, 28 d 均达到极显著水平, 分别比对照组增加 51.6% 和 37.1% ($P < 0.001$), 这一变化趋势与中缅树 BMR 的季节性和冷驯化变化趋势相同。在啮齿动物中也发现冷暴露时 BMR 增加的种类, 其肝重量也显著增加, 如圆睡鼠 (*Eliomys querinus*) 增加 67%^[47], 因此, 冷驯化刺激肝重量增加很可能导致 BMR 的增加。中缅树 在冷驯化下肝变化与圆睡鼠相差不大, 这可能是中缅树 在冷驯化过程中, 为了最大限度地增加产热而形成的一种特殊生理变化。

在冷驯化过程中, 肝组织总蛋白含量在 7 d 时开始达到显著水平, 比对照组增加了 14.9% ($P < 0.05$), 但线粒体蛋白含量在前 7 d 基本保持不变, 到 14 d 时达到显著水平, 比对照组增加了 14.0% ($P < 0.05$) (图 3)。在冷驯化过程中, 中缅树 肝组织中其他蛋白的增加、转录表达可能先于线粒体蛋白, 也有可能线粒体蛋白在转录表达之后, 需要装配到线粒体上才发挥功能, 于是在驯化过程中肝组织总蛋白含量增加早于其线粒体蛋白含量的增加。

中缅树 冷驯化 28 d 组肝线粒体蛋白含

量比对照组(0 d) 高 39.3%。表明中缅树 在冷驯化过程中肝线粒体数量增加, 说明在冷驯化的过程中, 低温对线粒体的合成有刺激作用, 质子漏产热所需要的蛋白也有可能同时合成^[36], 并表明线粒体氧化能力增加及线粒体的合成增加^[34]。此外, 在冷驯化过程中, 肝的绝对重量和相对重量都比对照组有显著增加, 肝总蛋白含量也比对照组有显著增加, 这也可能是肝线粒体蛋白含量增加的原因。

中缅树 在冷驯化下, BMR 的增加量小于北方典型小型哺乳动物, 但是肝重量、肝蛋白质及线粒体蛋白含量均高于北方典型小型哺乳动物, 进一步阐述了中缅树 肝在冷适应条件下的重要性。

3.4 肝线粒体呼吸状态 III 状态 IV 与质子漏 状态 II 呼吸指的是 ADP 促进下线粒体的呼吸速率, 即线粒体的氧化磷酸化速率, 状态 II 呼吸过程中, 氧化磷酸化与电子转移呼吸链相偶联, 底物氧化所释放出来的自由能被转移到 ATP 的高能磷酸键中, 称为偶联呼吸^[48]; 状态 IV 呼吸是指线粒体在 ADP 被消耗完毕后的呼吸速率, 与线粒体质子漏有关。在状态 IV 呼吸过程中, 氧化过程中释放出的能量并不是全部转移到 ATP 中, 而由于代谢效率变化, 有部分能量并不能用于合成 ATP, 这种现象就称之为线粒体质子泄漏 (mitochondrial proton leak), 这一呼吸过程则被称为解偶联呼吸^[49]。

在实验中, 中缅树 肝状态 II 呼吸冷驯化 7 d 时即达到极显著水平, 比对照组增加了 20.8% ($P < 0.01$), 28 d 组比对照组(0 d) 增加

了 84.9% (图 6)。这与中缅树 在冷胁迫环境中, 适应低温的策略有关, 即在原有的 ATP 水平不能满足自身需求的同时, 还要增加产热, 促使肝状态 II 呼吸速率显著增强, 以满足机体的需求, 供给生命活动的要求。

从图 5 我们可以发现, 在 0 d 到 7 d 这一段时间里, 线粒体蛋白含量基本保持不变; 但在图 6 中, 中缅树 冷驯化 7 d 时状态 II 呼吸达到极显著水平 ($P < 0.01$), 这说明中缅树 在没有受到低温胁迫时, 线粒体的产热水平并没有达到最大, 遇到低温胁迫后, 机体对冷胁迫的生理生化反应开始加剧, 肌肉的颤抖性产热逐渐停止^[47], 原有的 ATP 不能满足机体正常生化反应的需要, 对热能的需求也增加, 于是状态 III 呼吸、状态 IV 呼吸都出现显著增加, 以达到对能量的需求。

线粒体状态 IV 呼吸过程中, 能量主要以热的形式释放^[50]。在各种组织、器官如肝、骨骼肌^[51]、肾^[52]、胸腺细胞^[53]、脑组织^[52] 都发现质子漏的存在。

质子漏反应消耗的氧气在整个细胞的氧耗中占有较大的比重, 根据 43 只大鼠肝细胞研究的结果, 用于驱动线粒体质子漏的氧耗在细胞总耗氧中的平均比率是 26.1%, 在线粒体呼吸耗氧中的比重更高, 可达 33.3%^[54]。质子漏耗氧不仅在呼吸中所占的比率很高, 而且对细胞呼吸速率有显著的控制作用, 这可以通过流量控制系数看出来。在休眠状态的肝细胞中, 质子漏对细胞氧耗速率的控制系数为 0.24^[54], 表明质子漏的变化可以引起细胞氧耗的显著变化。离体的肝细胞在休眠状态下用于驱动质子漏的氧耗比率可以达到 26%^[55]。

在冷驯化过程中, 中缅树 冷驯化 28 d 组肝状态 IV 呼吸比对照组 (0 d) 增加了 181.1% (图 6), 说明中缅树 在冷胁迫环境中, 对维持正常生命活动的需求比对照组 (0 d) 及平时都大。这表明在冷驯化过程中, 质子漏可能存在并且起着极为重要的作用, 即通过质子漏产热, 以增加机体对热量和能量的需求。中缅树 状态 IV 呼吸速率极显著增强与低温是密切相关

的。Speakman 等的研究也认为, 质子漏能够使机体减少抗氧化物和衰老引起的损伤^[46], 进而能更好地适应环境和生存。

以上研究表明, 低温是诱导中缅树 肝线粒体产热的重要因子, 肝对中缅树 适应性产热起着重要作用; 其中, 肝质子泄漏可能具有重要的作用。同时, 低温也可能是中缅树 在由南向北扩展过程中的一个重要限制因素, 并且也从生理生态方面为树 的岛屿起源学说提供依据。

参 考 文 献

- [1] Wunder B A. Strategies, and environmental cueing mechanisms of seasonal changes in thermoregulatory parameters of small mammals. In: Merritt J F. Winter Ecology of Small Mammals. Pittsburgh: Carnegie Museum Natural History, 1984, 165 ~ 172.
- [2] Feder M E, Block B A. On the future of animal physiological ecology. *Functional Ecology*, 1991, 5: 135~ 144.
- [3] 朱万龙. 冷驯化对大绒鼠和高山姬鼠肝脏线粒体呼吸的影响. *四川动物*, 2008, 27(3): 371~ 377.
- [4] Speakman J R. The energy cost of reproduction in small rodents. *Acta Theriologica Sinica*, 2007, 27(1): 1~ 13.
- [5] 李庆芬, 李宁, 孙儒泳等. 布氏田鼠对低温的适应性产热. *兽类学报*, 1994, 14(4): 286~ 293.
- [6] 李兴升, 王德华, 杨明等. 冷驯化条件下长爪沙鼠血清瘦素浓度的变化及其与能量收支和产热的关系. *动物学报*, 2004, 50(3): 334~ 340.
- [7] Villarín J J, Paul J S, Ronald A M, et al. Chronic cold exposure increases liver oxidative capacity in the mesophilic *Monodelphis domestica*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 2004, 136: 621~ 630.
- [8] Brand M D, Countour P, Else P L. Evolution of energy metabolism. *Biochemistry*, 1991, 275: 81~ 86.
- [9] Chaffee R R J, Roberts J C, Conaway C H, et al. Comparative effects of temperature exposure on mass and oxidative enzyme activity of brown fat in insectivores, tupaiids and primates. *Lipids*, 1970, 5(1): 23~ 29.
- [10] Stuart J A, Adenas S C, Jakabsons M B, et al. Mitochondrial proton leak and the uncoupling protein 1 homologues. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2001, 1504: 144~ 158.
- [11] 王应祥, 李崇云, 马世来. 树 的分类与生态. 见: 彭燕章. 树 生物学. 昆明: 云南科技出版社, 1991.
- [12] 王政昆, 刘璐, 梁子卿等. 绒鼠体温调节和产热特征. *兽类学报*, 1999, 19(4): 276~ 286.

- [13] 王政昆, 李庆芬, 孙儒泳. 光周期和温度对中缅树 产热能力的影响. *动物学报*, 1999, **45**(3): 287~ 293.
- [14] Hill R W. Determination of oxygen consumption by use of the paramagnetic oxygen analyzer. *Journal of Applied Physiology*, 1972, **33**(2): 261~ 263.
- [15] 王政昆, 孙儒泳, 李庆芬等. 中缅树 静止代谢率的研究. *北京师范大学学报(自然科学版)*, 1994, **30**(3): 408~ 414.
- [16] 王政昆, 李庆芬, 孙儒泳. 中缅树 的非颤抖性产热及细胞呼吸特征. *动物学研究*, 1995, **16**(3): 239~ 246.
- [17] Cannon B, Lindberg O. Mitochondria from brown adipose tissue: Isolation and properties. *Methods in Enzymology*, 1979, **55**: 65~ 78.
- [18] 张启元. 现代生物学实验技术. 北京: 北京师范大学出版社, 1992, 89~ 96.
- [19] RoFe D F S, Brown G C. Cellular energy utilization and molecular origin of standard metabolic rate in mammals. *Physiology*, 1997, **77**: 731~ 758.
- [20] Nagy T R, Gower B A, Stetson M H. Endocrine correlates of seasonal body mass dynamics in the Collared Lemming (*Dicrostonyx groenlandicus*). *American Zoologist*, 1995, **35**: 246~ 258.
- [21] Bartness T J, Elliot J A, Wade B D. Control of torpor and body weight patterns by a seasonal timer in Siberian hamsters. *American Journal of Physiology*, 1989, **257**: 142~ 149.
- [22] Nagy T R, Negus N C. Energy acquisition and allocation in male collared lemmings (*Dicrostonyx groenlandicus*): effects of photoperiod, temperature, and diet quality. *Physiological Zoology*, 1993, **66**(4): 537~ 560.
- [23] 张武先, 王政昆, 徐伟江等. 冷驯化对中缅树 能量代谢的影响. *兽类学报*, 2002, **22**(2): 123~ 129.
- [24] Refinetti R. Comparison of the body temperature rhythms of diurnal and nocturnal rodents. *The Journal of Experimental Zoology*, 1996, **275**: 67~ 70.
- [25] 宋志刚, 王德华. 长爪沙鼠的代谢率与器官的关系. *动物学报*, 2002, **48**(4): 445~ 451.
- [26] 王海, 杨晓密, 刘春燕等. 大绒鼠和高山姬鼠的体温调节和产热特征. *兽类学报*, 2006, **26**(2): 144~ 151.
- [27] Terblanche J S, Janion C, Chown S L. Variation in scorpion metabolic rate and rate temperature relation: Implications for the fundamental equation of the metabolic theory of ecology. *Journal of Evolutionary Biology*, 2007, **20**: 1 602~ 1 612.
- [28] Klaus S, Heldmaier G, Ricquier D. Seasonal acclimation of bank voles and thermogenic properties of brown adipose tissue mitochondria. *Journal of Comparative Physiology B*, 1988, **158**: 157~ 164.
- [29] Hain A, Izuake I. The ecological significance of resting metabolic rate and nonshivering thermogenesis for rodents. *Journal of Thermal Biology*, 1993, **18**(2): 71~ 81.
- [30] Heldmaier G, Steinlechner S, Ruf T, *et al.* Photoperiod and thermoregulation in vertebrates: body temperature rhythm and thermogenesis acclimation. *Journal of Biological Rhythms*, 1989, **4**: 251~ 265.
- [31] McDevitt R M, Speakman J R. Limits to sustainable metabolic rate during transient exposure to temperatures in short tailed voles (*Microtus agrestis*). *Physiological Zoology*, 1994, **67**(5): 1 103~ 1 116.
- [32] Oufara S, Barre H, Rouanet J L, *et al.* Adaption to extreme ambient temperature in cold acclimated gerbils and mice. *American Journal of Physiology*, 1987, **253**: 39~ 45.
- [33] 朱万龙, 贾婷, 王政昆等. 冷驯化对大绒鼠代谢率的影响. *云南师范大学学报(自然科学版)*, 2008, **28**(3): 53~ 56.
- [34] 王德华, 孙儒泳, 王祖望等. 根田鼠冷驯化过程中适应性产热特征. *动物学报*, 1996, **42**(4): 368~ 376.
- [35] Olson L E, Sargis E J, Martin R D. Intraordinal phylogenetics of treeshrews (Mammalia: Scandentia) based on evidence from the mitochondrial 12S rRNA gene. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2005, **35**: 656~ 673.
- [36] Ni X J, Qiu Z D. The micromammalian fauna from the Leilao, Yuanmou hominoid locality: implications for biochronology and paleoecology. *Journal of Human Evolution*, 2002, **42**: 535~ 546.
- [37] Chopra S R K, Vasishat R N. Sivalik fossil tree shrew from Haritalyangsr, India. *Nature*, 1979, **281**: 214~ 215.
- [38] Mein P, Ginsburg L. Les mammifères du gisement miocène inférieur de Li Mae Long, Thaïlande: Systématique, biostratigraphie et paléoenvironnement. *Geodiversitas*, 1997, **19**: 783~ 844.
- [39] Jacobs L L. Sivalik fossil tree shrews. In: Luckett W P ed. *Comparative Biology and Evolutionary Relationships of Tree Shrews*. New York and London: Plenum Press, 1980, 205~ 216.
- [40] Tong Y. Fossil tree shrews from the Eocene Hetaoyuan formation of Xichuan, Henan. *Vertebrata Palasiatica*, 1988, **26**: 214~ 220.
- [41] Ducrocq S, Buffetaut E, Buffetaut-Tong H, *et al.* First fossil Flying lemur: a demoptera from the late Eocene of Thailand. *Palaeontology*, 1992, **35**: 373~ 380.
- [42] 柳劲松, 李庆芬. 高原鼠兔冷驯化和脱冷驯化中的产热变化. *动物学报*, 1996, **42**(4): 377~ 385.
- [43] 姜文秀, 王蓓, 王睿等. 冷驯化条件下高山姬鼠能量对策的初步研究. *动物学杂志*, 2009, **44**(4): 142~ 149.
- [44] 朱万龙, 贾婷, 王政昆等. 冷驯化条件下大绒鼠的产热

- 和能量代谢特征. 动物学报, 2008, 54(4): 590~ 601.
- [45] Nedergaard J, Golzobubova V, Matthias A. UCP1: the only protein able to mediate adaptive nonshivering thermogenesis and metabolic inefficiency. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2001, **1504**: 82~ 106.
- [46] Speakman J R, Talbot D A, Selman C, et al. Uncoupled and surviving: individual mice with high metabolism have greater mitochondrial uncoupling and live longer. *Journal Aging Cell*, 2004, **3**: 87~ 95.
- [47] Lami A, Martins R, Ambil L, et al. Liver and brown fat mitochondrial response to cold in the garden dormouse (*Eliomys quercinus*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 1990, **97**(4): 809~ 813.
- [48] Bouillaud F, Couplan E, Pecqueur C, et al. Homologues of the uncoupling protein from brown adipose tissue. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2001, **1504**: 107~ 119.
- [49] Porter R K, Brand M D. Body mass dependence of H⁺ leak in mitochondria and its relevance to metabolic rate. *Nature*, 1993, **362**: 628~ 630.
- [50] Porter R. Mitochondrial proton leak: a role for uncoupling proteins 2 and 3? *Biochimica et Biophysica Acta*, 2001, **1504**: 120~ 127.
- [51] Rolfe D F S, Newman J M B, Buckingham J A. Contribution of mitochondrial proton leak to respiration rate in working skeletal muscle and liver and to SMR. *Physiology*, 1999, **276**: 692~ 699.
- [52] Rolfe D F S, Hulbert A J, Brand M D. Characteristics of mitochondrial proton leak and control of oxidative phosphorylation in the major oxygen consuming tissues of the rat. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1994, **1188**: 405~ 416.
- [53] Krauss S, Buttgerit F, Brand M D. Effects of the mitogen concanavalin A on pathways of thymocyte energy metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1999, **1412**: 129~ 138.
- [54] Harper M E, Brand M D. The quantitative contributions of mitochondrial proton leak and ATP turnover reactions to changed respiration rates of hepatocytes isolated from rats of different thyroid status. *Journal of Biological Chemistry*, 1993, **268**(20): 1485~ 1486.
- [55] Brand M D, Chien L F, Ainscow E K, et al. The cause and functions of mitochondrial proton leak. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1994, **1187**: 132~ 139.

(上接第 27 页)

参考文献 应列出与本文直接有关的中外文主要文献, 未公开发表的文献可作脚注处理。本刊文献的著录格式采用顺序编码制, 即以文献在文中出现的先后顺序连续编码, 加方括号标注在文中引用处, 文后文献表的文献要与文中一致, 并按文中的顺序排列, 多名作者须在列出前三名作者后加“等”。具体格式要求为:

①期刊: 作者. 题名. 刊名(外文刊用斜体), 出版年, 卷(期)号: 起止页码. 示例:

[1] 郑光美. 黄腹角雉. 动物学杂志, 1987, **22**(5): 40~ 43.

[2] Wu P, Zhou K Y. General condition of systematics study on Testudines. *Chinese Journal of Zoology*, 1998, **33**(6): 38~ 45.

②专著: 作者. 书名. 版本(第一版不标注). 出版地: 出版者, 出版年, 起止页码. 示例:

[3] 孙儒泳编著. 动物生态学原理(第二版). 北京: 北京师范大学出版社, 1992, 329~ 330.

[4] Jiang Z G ed. Conservation Biology. Hangzhou: Zhejiang Science and Technology Press, 1997, 160~ 164.

③论文集: 作者. 题名. 见(英文用 In): 编者. 论文集名. 出版地: 出版者, 出版年, 起止页码. 示例:

[5] 陈大元. 动物显微受精与克隆研究. 见: 中国动物学会主编. 中国动物科学研究. 北京: 中国林业出版社, 1999, 59~ 64.

[6] Yang T. On the leeches from Wuling Mountains area in south China. In: Song D X ed. Invertebrates of Wuling Mountains Area, Southwestern China. Beijing: Science Press, 1997, 395~ 399.