

狨猴人工辅助生殖技术及基因修饰模型研究进展

滕永康, 刘云波*

(中国医学科学院医学实验动物研究所, 北京协和医学院比较医学中心, 北京 100021)

【摘要】 普通绵耳狨猴是体型较小的非人灵长类实验动物, 具有饲养成本低, 繁殖效率高, 性成熟时间短等优势, 非常适合开展辅助生殖技术及基因修饰模型研究。狨猴的人工辅助生殖技术 (assisted reproduction technology, ART) 主要包括: 精液采集、超数排卵、卵母细胞采集、体外成熟、体外授精、胚胎培养和移植等。目前各项技术的研究较全面, 但仍有细节亟需完善。随着基因编辑技术的兴起, 基于人工辅助生殖技术的狨猴基因修饰研究逐渐成为热点。2009年日本首次成功开展转基因狨猴研究, 截至目前, 中国尚无基因修饰狨猴相关报道。本文就近年来狨猴人工辅助生殖技术, 以及狨猴基因修饰研究进展进行综述。

【关键词】 狨猴; 辅助生殖; 基因修饰模型

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2018) 07-0107-06

doi: 10. 3969/j. issn. 1671-7856. 2018. 07. 019

Review of marmoset assisted reproductive technology and their gene-modified models

TENG Yongkang, LIU Yunbo*

(Institute of Laboratory Animal Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences (CAMS); Comparative Medicine Center, Peking Union Medical College (PUMC), Beijing 100021, China)

【Abstract】 Marmosets, a kind of small non-human primates, are very suitable for research by gene modification because of their lower feeding cost and higher efficiency, shorter time of sexual maturation than macaques. Any model established by gene modification cannot be produced without assisted reproduction technology (ART) consisting of semen collection, superovulation, oocyte retrieval, *in vitro* maturation, *in vitro* fertilization, and embryo transplantation. At present, the research of these techniques is relatively comprehensive, but there are still details that need improvement. Recently, studies of gene-modified marmosets based on ART have gradually become a research focus with the development of gene editing technology. In 2009, the first report of transgenic marmosets was published by Japanese scientists, whereas related reports have not been published by Chinese scientists. This article reviews the recent progress of marmoset ART and their gene-modified models.

【Key words】 marmosets; assisted reproduction technology, ART; gene-modified models

普通绵耳狨猴 (*Callithrix jacchus*, common marmoset), 属于类人猿亚目, 狨猴科。它们是一种体型较小的非人灵长类动物, 来源于巴西东北部,

近大西洋的热带雨林中^[1]。它们因头顶耳后各有一簇白色绒毛而得名。目前, 狨猴在生物医学领域^[2]研究较为广泛, 尤其是在生殖生物学、神经科

【基金项目】 北京市科技计划 (编号: Z161100000216154); 国家重点研究计划 (编号: 2017YFA0105201)。

【作者简介】 滕永康 (1991—), 男, 硕士研究生, 研究方向: 动物学。E-mail: tyk12345@126.com

【通信作者】 刘云波 (1962—), 男, 教授, 研究方向: 实验动物学。E-mail: yunbolu@126.com

学、药物动力学及药物的毒性筛查^[3]、干细胞研究^[4-5]、自身免疫性疾病、再生医学、感染性疾病动物模型,如登革热^[6]方面都具有较大的潜能。

成年狨猴体长 20 ~ 30 cm,体重一般为 350 ~ 450 g;人工繁育群体中的狨猴寿命,一般为(148.5 ± 6.1)个月^[7]。狨猴喜群居,一般每个群体的成员数量在 10 只左右;彼此可通过复杂的发音,进行个体和群体间交流^[8]。每个家族中只有一只雌性狨猴有交配权利,多数狨猴是一雌一雄制。雌性狨猴妊娠期 140 ~ 150 d,分娩多在夜晚,一胎可分娩 2 ~ 4 只,3 只居多,或异卵双生^[9],但每胎成活一般不超两个^[10]。泌乳不抑制发情,即分娩后可立刻进入下一个卵泡发育期,准备受孕,因而一年可生两胎。幼猴生长 14 ~ 15 月可达性成熟。但在野外,在一个家族群体内,不是族长的雄性没有交配权。狨猴的发情周期为(28.63 ± 1.1) d,其中卵泡期为(8.25 ± 0.3) d,黄体期为(19.22 ± 0.63) d^[11]。Cui 等^[12]首次对雌性狨猴进行生殖系统解剖探究,发现狨猴阴道总长 3.4 mm;子宫平均大小为 8.4 mm × 10.0 mm × 6.4 mm;卵巢为 5.3 mm × 4.3 mm × 3.8 mm;输卵管平均长度为 10.5 mm,宽度为 1.5 mm。

1 狨猴辅助生殖技术

1.1 狨猴精液采集

精子采集是辅助生殖的重要环节,采集的精子数量和质量直接关系到整个实验的成败。目前精子采集主要有:附睾采集法,人工按摩刺激法,直肠或阴茎电刺激法,阴道冲洗法,阴茎震荡刺激法,假阴道法等等。狨猴雄性外生殖器较小,因此,针对狨猴精液采集主要为直肠电刺激方法,阴道冲洗法和阴茎震动刺激法。1991 年, Cui 等研究者^[13]尝试使用直肠电刺激方法成功采集到精液。Morrell 等^[14]对比阴道冲洗法和直肠电刺激法后发现,阴道冲洗法在成功率、重复性上优于直肠电刺激,但操作较繁琐,易掺杂阴道分泌物造成细胞污染。Morrell 等^[15]从附睾采集精子悬浮液,浓度为每毫升 $1.5 \times 10^7 \sim 5.2 \times 10^7$ 个,存活率 73% ~ 91%,活力 70% ~ 90%。Kuederling 等^[16]尝试使用阴茎震动刺激方法进行采精,结果发现:阴茎震动刺激采精是更优化的采精方法,总量和精子浓度均是直肠电刺激方法采精的 3 ~ 4 倍。后来, Schneiders 等^[17]对采精震动器进行改进,采精效率大幅提高

(由 52.3% 提到至 89.4%)。同时,无需麻醉,大部分研究者仍在沿用此方法。

1.2 超数排卵和卵母细胞采集

可超数排卵前利用同期发情来获得更多的供体,同期发情分为延长黄体期和缩短黄体期两种,狨猴多采用后者, Summers 等^[18]研究发现,前列腺烯醇(PGF_{2α})可以作为前列腺素的相似物来加速黄体消融,同时还发现在卵泡期的第 8 ~ 17 天即黄体期的中后期 PGF_{2α}作用效果更显著。Gilchrist 等^[19]发现,窦状卵泡的总数与卵巢的质量和体积成正比,与动物年龄成反比,而且,通过每天测定卵泡刺激素(FSH)、雌二醇(E₂)、孕酮发现,动物在卵泡期的第 9.4 天处于排卵期,为狨猴繁殖生产提供了基础数据。针对狨猴的超数排卵,科学家们做了很多优化, Marshall 等^[20]使用重组人卵泡刺激素(rhFSH)进行超数排卵刺激,每天剂量分别有 0、10、25 和 50 IU,每天刺激 50 IU 的实验组动物平均产生应答的卵泡数明显高于其他三个组分,卵泡数平均为(14.1 ± 1.6)个,在产生的 380 个卵泡中有 267 个未排卵的卵泡,采集回收率为 51%,第一极体率为 85.2%,受精率为 57%,桑椹胚率为 58%,囊胚率为 47%,透明带破处率为 34%。

卵母细胞的采集方法上,在 2003 年, Marshall 等^[20]借助腹腔镜,利用自制装置穿刺采卵,回收率为 51%。

1.3 卵母细胞体外成熟

狨猴卵母细胞的培养基的研究最早可以追溯到 1993 年, Wilton 等^[21]使用 α-MEM 培养基培养卵母细胞时发现胚胎发育状况与卵母细胞成熟状况关系不大,与卵母细胞预孵育的时间有关,孵育 9 ~ 11 h 胚胎发育较好。随后 Gilchrist 等^[22]明确提出在 Waymouth's 培养基中体外培养的狨猴卵泡可以促进优势胚胎移植前的发育。Tkachenko 等^[23]发现表皮生长因子(EGF)对卵母细胞的作用效果显著,即低浓度抑制、高浓度促进。Tkachenko 等^[24]还发现,雌二醇在狨猴卵母细胞体外成熟以及胚胎发育过程中发挥着重要作用,但前提是需要维持在某个合适的浓度范围内。

1.4 胚胎获取

胚胎获取方法分为自然交配后胚胎冲洗回收和体外受精培养,体外受精又分为精卵共培养(*in vitro* fertilization, IVF)和单精子显微注射(*intracytoplasmic sperm injection*, ICSI)方法。1994

年,Thomson 等^[25]介绍了一种冲洗子宫获得着床前胚胎的方法,平均每次冲洗一个胚胎,效率较低。Ishibashi 等^[26]创造性地使用超声波介导实现无创伤胚胎回收,可以回收 90% 的排卵物,极大地提高了胚胎回收效率。2009 年,Sasaki 等^[27]发现,自然交配后获得的胚胎比通过 IVF 获得的胚胎拥有更好的生殖潜力。研究者对于 IVF 方法中受精液以及胚胎培养液进行了较多的探索研究,尝试使用的受精液包括 G1.2^[20] (57%)、G2-HSA^[28] (88.5%)、TYH^[29] (60% ~ 78.6%)。2014 年,Takahashi 等^[30]首次利用 ICSI 方法生产出狨猴子代,并比较了不同注射时间囊胚率和受孕率,发现在相对于第一极体出现 3 ~ 10 h,在 1 ~ 2 h 组的囊胚率最低。同时,研究者还对比了 ICSI 和 IVF 的效率,发现在卵裂率和囊胚率数据上,二者没有明显差异。在提高受精率上,Morrell 等^[31]利用阴道冲洗法,获得精子后分别使用鲜精和冻精进行受精情况比较,详见表 1。

研究者 Valle 等^[32]利用计算机精液分析系统通过分析精子头部尺寸和形态来进行精子亚群分布,进而挑选较好的精子进行受精,提高生殖成功率。同期,江勤芳等^[33]针对非人灵长类动物体外受精及胚胎移植的手术室建设及使用进行了探讨,为相关科研人员提供参考。

1.5 胚胎移植

狨猴的胚胎移植主要有四部分内容:胚胎的选择、受体动物的选择、移植方法和早期妊娠检查,按照供受体动物生理状态可分为同步处理和异步处理两种,同步处理是供受体同时在排卵期后 5 ~ 8 d 进行胚胎移植,异步处理则是供体比受体进入排卵期早至少 2 d,即受体排卵后 2 ~ 4 d 而供体是 6 ~ 8 d,结果显示异步移植明显优于同步移植^[34] (着床率前者 44%,后者 9%;妊娠率前者 33%,后者 0%)。Hanazawa 等^[35]发明了一种微创经腹部收集胚胎的方法,经验证,在早期胚胎

(受精卵/桑椹胚)回收效率上比传统的解剖收集胚胎更高效(前者 76.1%,后者 52.6%),创伤小,术后恢复快,为狨猴胚胎收集开辟新方向。Takahashi 等^[30]成功使用腹腔镜辅助的阴道套管的方法进行胚胎移植,37 个囊胚期胚胎移植入 20 个受孕母体中,4 只受孕,成功率 10.8%。Ishibashi 等^[36]尝试借助超声影像使用更少的移植量(小于 1 μ L)完成冷冻和晚期胚胎操作并取得成功,研究者使用更细的注射器,避免了回声沿套管流动对视觉造成干扰,结果受孕率和出生率均高于之前 2 ~ 3 μ L 注射量的结果。

2 狨猴基因修饰

转基因技术原理主要有原核注射法,精子载体法,病毒感染法,转基因体细胞核移植法,诱导性多能干细胞法等,目前转基因技术在啮齿类动物上发展已经比较成熟,然而人类和啮齿类之间在解剖学和组织学、生理学存在较大差异,使得部分人类疾病不能用啮齿动物建模,因而生命科学领域需要开发建立非人灵长类动物转基因技术方法^[37]。与此同时,人们在关于狨猴作为非人灵长类动物进行转基因技术研究是否合适的话题上开始形成分歧。Olsson 等^[38]以综述的形式总结分析了各方的观点,指出,以狨猴作为动物模型进行研究不会引起更多的伦理争议。而后经过探索,转基因灵长类动物制备方法主要以病毒感染法为主,2009 年,Sasaki 等人^[27]通过向胚胎中注射在蔗糖溶液中自失活的,含 EGFP 基因的慢病毒载体生产出首批转基因狨猴。同时,还实现了转基因的种系传递。F2 代狨猴同样携带相应基因型和表型,表明,一种新型的与人基因型更相近的人类疾病动物模型建立了。之后,狨猴因操作方便,繁育高效,不含致命的人畜共患病如疱疹 B 病毒^[37]等优势在近几年受到越来越多的重视,研究者 Matsuzaki 等^[39]尝试使用含有 GFP 的腺相关病毒 9 型(rAAV-9)载体进行狨猴枕大池和

表 1 阴道冲洗法获得精子后,鲜精和冻精的受精情况比较
Table 1 Comparison of fertilization between fresh and cryopreserved sperm by washing the vagina

	受精数量 Number of fertilizations	怀孕数量 Number of pregnancies	分娩子代数量 Number of delivered offspring
鲜精 Fresh sperm	6	6	16
冻精 Cryopreserved sperm	6	3 (1 只流产 1 miscarriage)	4
冻精(低剂量) Cryopreserved sperm (low dose)	6	1	3

小脑皮质注射,两种给药途径均实现在运动神经元中的高效转导。Borel 等^[40]对 9 只狢猴腰椎穿刺在蛛网膜下腔注射分别含有 miR-SOD1 的 rAAV rh10 病毒载体,并以 GFP 作为对照组,给药 23 d 后发现,在整个脊髓处实现 SOD1 基因沉默。2016 年, Park 等研究者^[41]成功制作出 8 只能够表达基因编码钙离子指示剂(GECIs)的转基因狢猴,在不同的组织中鉴定到钙离子指示剂稳定存在并发挥作用,本次实验依然采用向受精卵中注射携带 GFP 和 GECI 家族的慢病毒载体的方式获得转基因受精卵,并通过检测转基因狢猴的卵泡中 GECI 的表达确定该方法实现种系传递,同时实现活体动物的神经活动功能性光学成像。该研究者还指出,狢猴腺相关病毒或慢病毒介导的转基因方法不仅受限于病毒的接种时间,而且还需考虑病毒的嗜亲性、滴度、注射剂量以及启动子的构建和神经元的基因表达。而在此期间,研究者在其他非人灵长类动物基因修饰方面也取得可喜成果,2014 年, Liu 等^[42]通过 TALEN 介导使一个 X 染色体连锁的 *MECP2* 基因发生突变,生成出生即患有雷特综合征的转基因恒河猴和食蟹猴,同时未检测到脱靶突变,证明 TALEN 介导的靶突变能够成为制作携带人类疾病的非人灵长类动物模型的有效工具。同年,牛昱宇^[43]成功利用 CRISPR/Cas9 方法获得基因定向敲除食蟹猴,研究者选择了分别与性别决定、代谢系统和免疫系统疾病密切相关的 *Nr0b1*、*PPAR-γ* 和 *Rag1* 基因,注射成功率为 44.6%,对两只幼猴进行鉴定发现均为阳性。初步证实了利用 TALEN 和 CRISPR/Cas9 系统进行非人灵长类动物进行基因修饰的可行性。

3 展望

目前基因修饰水平的趋于成熟为非人灵长类转基因动物制作创造了很多机遇,转基因狢猴因生物学特性、饲养成本、繁殖效率等方面的特定优势为干预和治疗人类疾病的发展奠定了良好的基础。当然,也存在着不足之处。第一,狢猴辅助生殖技术的很多细节仍不成熟,如卵母细胞及胚胎的冻存复苏,胚胎的体外培养和移植效率等,使得研究者在获得转基因狢猴前需要很多的供体和受体猴,无形中加大了实验成本,增加了基因修饰狢猴研究开展和普及的难度,限制了基因修饰狢猴的研究发展。第二,目前狢猴转基因技术主要存在日本、美国等国家,国内对狢猴尤其是转基因狢猴的研究仍

处在初步阶段,很多研究技术和方法仍需进一步验证和摸索,研究工作任重而道远。第三,由于具有生殖能力的胚胎干细胞和体细胞核移植尚未广泛应用在非人灵长类动物上,狢猴的转基因技术仍局限在慢病毒介导的方法上,外源基因的随机插入不能从根本上达到精确基因修饰效果,需要进一步研究和完善基因修饰方法。第四,据以往的报告,狢猴的胚胎成功移植率并不高^[30, 34, 36],因此整个狢猴的 ART 各个环节,均有待进一步研究和提高。尽管目前转基因狢猴技术还存在种种不足,相信随着狢猴人工辅助生殖技术体系的不断完善,一方面狢猴资源数量会得到更快的提升,另一方面,技术细节的不断优化,也能相对降低狢猴的实验使用数量,同时,相信随着越来越多聚焦狢猴的科研力量的加入,更多的转基因技术方法将被应用在狢猴上,即产生更多宝贵的非人灵长类动物人类重大疾病模型,无疑对生命科学乃至整个生物医学的基础应用研究意义重大。

参考文献:

- [1] Orsi A, Rees D, Andreini I, et al. Overview of the marmoset as a model in nonclinical development of pharmaceutical products [J]. Regul Toxicol Pharmacol, 2011, 59(1): 19–27.
- [2] Mansfield K. Marmoset models commonly used in biomedical research [J]. Comp Med, 2003, 53(4): 383–392.
- [3] Smith D, Trenner P, Farningham D, et al. The selection of marmoset monkeys (*Callithrix jacchus*) in pharmaceutical toxicology [J]. Lab Anim, 2001, 35(2): 117–130.
- [4] Sasaki E, Hanazawa K, Kurita R, et al. Establishment of novel embryonic stem cell lines derived from the common marmoset (*Callithrix jacchus*) [J]. Stem Cells, 2005, 23(9): 1304–1313.
- [5] Müller T, Fleischmann G, Eildermann K, et al. A novel embryonic stem cell line derived from the common marmoset monkey (*Callithrix jacchus*) exhibiting germ cell-like characteristics [J]. Hum Reprod, 2009, 24(6): 1359–1372.
- [6] Omatsu T, Moi ML, Hirayama T, et al. Common marmoset (*Callithrix jacchus*) as a primate model of dengue virus infection: development of high levels of viraemia and demonstration of protective immunity [J]. J Gen Virol, 2011, 92(Pt 10): 2272–2280.
- [7] Nishijima K, Saitoh R, Tanaka S, et al. Life span of common marmoset (*Callithrix jacchus*) at CLEA Japan breeding colony [J]. Biogerontology, 2012, 13(4): 439–443.
- [8] Agamaite JA, Chang CJ, Osmanski MS, et al. A quantitative acoustic analysis of the vocal repertoire of the common marmoset (*Callithrix jacchus*) [J]. J Acoust Soc Am, 2015, 138(5): 2906–2928.

- [9] Poole TB, Evans RG. Reproduction, infant survival and productivity of a colony of common marmosets (*Callithrix jacchus*) [J]. Lab Anim, 1982, 16(1): 88–97.
- [10] Rothe H, Darms K, Koenig A. Sex ratio and mortality in a laboratory colony of the common marmoset (*Callithrix jacchus*) [J]. Lab Anim, 1992, 26(2): 88–99.
- [11] Harlow CR, Gems S, Hodges JK, et al. The relationship between plasma progesterone and the timing of ovulation and early embryonic development in the marmoset monkey (*Callithrix jacchus*) [J]. J Zool, 1983, 201(2): 273–282.
- [12] Cui KH, Matthews CD. Anatomy of adult female common marmoset (*Callithrix jacchus*) reproductive system [J]. J Anat, 1994, 185(Pt 3): 481–486.
- [13] Cui KH, Flaherty SP, Newble CD, et al. Collection and analysis of semen from the common marmoset (*Callithrix jacchus*) [J]. J Androl, 1991, 12(3): 214–220.
- [14] Morrell JM, Küderling I, Hodges JK. Influence of semen collection method on ejaculate characteristics in the common marmoset, *Callithrix jacchus* [J]. J Androl, 1996, 17(2): 164–172.
- [15] Morrell JM, Nowshari M, Rosenbusch J, et al. Birth of offspring following artificial insemination in the common marmoset, *Callithrix jacchus* [J]. Am J Primatol, 1997, 41(1): 37–43.
- [16] Kuederling I, Schneiders A, Sønksen J, et al. Non-invasive collection of ejaculates from the common marmoset (*Callithrix jacchus*) using penile vibrostimulation [J]. Am J Primatol, 2000, 52(3): 149–154.
- [17] Schneiders A, Sønksen J, Hodges JK. Penile vibratory stimulation in the marmoset monkey: a practical alternative to electro-ejaculation, yielding ejaculates of enhanced quality [J]. J Med Primatol, 2004, 33(2): 98–104.
- [18] Summers PM, Wennink CJ, Hodges JK. Cloprostenol-induced luteolysis in the marmoset monkey (*Callithrix jacchus*) [J]. J Reprod Fertil, 1985, 73(1): 133–138.
- [19] Gilchrist RB, Wicherek M, Heistermann M, et al. Changes in follicle-stimulating hormone and follicle populations during the ovarian cycle of the common marmoset [J]. Biol Reprod, 2001, 64(1): 127–135.
- [20] Marshall VS, Browne MA, Knowles L, et al. Ovarian stimulation of marmoset monkeys (*Callithrix jacchus*) using recombinant human follicle stimulating hormone [J]. J Med Primatol, 2003, 32(1): 57–66.
- [21] Wilton LJ, Marshall VS, Piercy EC, et al. *In vitro* fertilization and embryo development in the marmoset monkey (*Callithrix jacchus*) [J]. J Reprod Fertil, 1993, 97(2): 481–486.
- [22] Gilchrist RB, Nayudu PL, Hodges JK. Maturation, fertilization, and development of marmoset monkey oocytes *in vitro* [J]. Biol Reprod, 1997, 56(1): 238–246.
- [23] Tkachenko OY, Delimitreva S, Isachenko E, et al. Epidermal growth factor effects on marmoset monkey (*Callithrix jacchus*) oocyte *in vitro* maturation, IVF and embryo development are altered by gonadotrophin concentration during oocyte maturation [J]. Hum Reprod, 2010, 25(8): 2047–2058.
- [24] Tkachenko OY, Delimitreva S, Heistermann M, et al. Critical estradiol dose optimization for oocyte *in vitro* maturation in the common marmoset [J]. Theriogenology, 2015, 83(8): 1254–1263.
- [25] Thomson JA, Kalishman J, Hearn JP. Nonsurgical uterine stage preimplantation embryo collection from the common marmoset [J]. J Med Primatol, 1994, 23(6): 333–336.
- [26] Ishibashi H, Motohashi HH, Kumon M, et al. Ultrasound-guided non-surgical embryo collection in the common marmoset [J]. Reprod Biol, 2013, 13(2): 139–144.
- [27] Sasaki E, Suemizu H, Shimada A, et al. Generation of transgenic non-human primates with germline transmission [J]. Nature, 2009, 459(7246): 523–527.
- [28] Grupen CG, Gilchrist RB, Nayudu PL, et al. Effects of ovarian stimulation, with and without human chorionic gonadotrophin, on oocyte meiotic and developmental competence in the marmoset monkey (*Callithrix jacchus*) [J]. Theriogenology, 2007, 68(6): 861–872.
- [29] Tomioka I, Takahashi T, Shimada A, et al. Birth of common marmoset (*Callithrix jacchus*) offspring derived from *in vitro*-matured oocytes in chemically defined medium [J]. Theriogenology, 2012, 78(7): 1487–1493.
- [30] Takahashi T, Hanazawa K, Inoue T, et al. Birth of healthy offspring following ICSI in *in vitro*-matured common marmoset (*Callithrix jacchus*) oocytes [J]. PLoS One, 2014, 9(4): e95560.
- [31] Morrell JM, Nubbemeyer R, Heistermann M, et al. Artificial insemination in *Callithrix jacchus* using fresh or cryopreserved sperm [J]. Anim Reprod Sci, 1998, 52(2): 165–174.
- [32] Valle RR, Nayudu PL, Leal CL, et al. Sperm head morphometry in ejaculates of adult marmosets (*Callithrix jacchus*): a model for studying sperm subpopulations and among-donor variations [J]. Theriogenology, 2012, 78(5): 1152–1165.
- [33] 江勤芳, 高家红, 曾桥, 等. 非人灵长类动物体外受精-胚胎移植(IVF-ET)手术室建设及使用探讨 [J]. 中国比较医学杂志, 2014, 24(5): 72–75.
- [34] Marshall VS, Kalishman J, Thomson JA. Nonsurgical embryo transfer in the common marmoset monkey [J]. J Med Primatol, 1997, 26(5): 241–247.
- [35] Hanazawa K, Mueller T, Becker T, et al. Minimally invasive transabdominal collection of preimplantation embryos from the common marmoset monkey (*Callithrix jacchus*) [J]. Theriogenology, 2012, 78(4): 811–816.
- [36] Ishibashi H, Motohashi HH, Kumon M, et al. Efficient embryo transfer in the common marmoset monkey (*Callithrix jacchus*) with a reduced transfer volume: a non-surgical approach with cryopreserved late-stage embryos [J]. Biol Reprod, 2013, 88(5): 115.
- [37] Kishi N, Sato K, Sasaki E, et al. Common marmoset as a new model animal for neuroscience research and genome editing technology [J]. Dev Growth Differ, 2014, 56(1): 53–62.

- [38] Olsson IA, Sandøe P. “What’s wrong with my monkey?” Ethical perspectives on germline transgenesis in marmosets [J]. Transgenic Res, 2010, 19(2): 181–186.
- [39] Matsuzaki Y, Konno A, Mukai R, et al. Transduction profile of the marmoset central nervous system using adeno-associated virus serotype 9 vectors [J]. Mol Neurobiol, 2017, 54(3): 1745–1758.
- [40] Borel F, Gernoux G, Cardozo B, et al. Therapeutic rAAVrh10 mediated *SOD1* silencing in adult *SOD1*^{G93A} mice and nonhuman primates [J]. Hum Gene Ther, 2016, 27(1): 19–31.
- [41] Park JE, Zhang XF, Choi SH, et al. Generation of transgenic marmosets expressing genetically encoded calcium indicators [J]. Sci Rep, 2016, 6: 34931.
- [42] Liu H, Chen Y, Niu Y, et al. TALEN-mediated gene mutagenesis in rhesus and cynomolgus monkeys [J]. Cell Stem Cell, 2014, 14(3): 323–328.
- [43] 牛昱宇. 灵长类动物的基因定向修饰——记运用 CRISPR/Cas9 技术获得基因定向敲除食蟹猴 [J]. 生命科学, 2014, 26(4): 325–328.

[收稿日期]2017–07–03

(上接第 101 页)

- in the mouse retina [J]. J Neurosci, 2013, 33(27): 10972–10985.
- [39] Schneider FM, Mohr F, Behrendt M, et al. Properties and functions of TRPM1 channels in the dendritic tips of retinal ON-bipolar cells [J]. Eur J Cell Biol, 2015, 94(7–9): 420–427.
- [40] Puller C, Arbogast P, Keeley PW, et al. Dendritic stratification differs among retinal OFF bipolar cell types in the absence of rod photoreceptors [J]. PLoS One, 2017, 12(3): e0173455.
- [41] Migdale K, Herr S, Klug K, et al. Two ribbon synaptic units in rod photoreceptors of macaque, human, and cat [J]. J Comp Neurol, 2003, 455(1): 100–112.
- [42] Mangel SC. Spiking dopaminergic amacrine cells strongly modulate ON-cone bipolar cell surrounds and direct signaling from horizontal cells to ON-cone bipolar cells [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2017, 58(8): 2225.
- [43] Anderson JR, Jones BW, Watt CB, et al. Exploring the retinal connectome [J]. Mol Vis, 2011, 17: 355–379.
- [44] Chaya T, Matsumoto A, Sugita Y, et al. Versatile functional roles of horizontal cells in the retinal circuit [J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 5540.
- [45] Kothmann WW, Trexler EB, Whitaker CM, et al. Nonsynaptic NMDA receptors mediate activity-dependent plasticity of gap junctional coupling in the AII amacrine cell network [J]. J Neurosci, 2012, 32(20): 6747–6759.
- [46] Tsukamoto Y, Omi N. Classification of mouse retinal bipolar cells: type-specific connectivity with special reference to rod-driven AII amacrine pathways [J]. Front Neuroanat, 2017, 11: 92.
- [47] Wässle H. Parallel processing in the mammalian retina [J]. Nat Rev Neurosci, 2004, 5(10): 747–757.
- [48] Wu SM. Synaptic organization of the vertebrate retina: general principles and species-specific variations: the Friedenwald lecture [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2010, 51(3): 1263–1274.
- [49] Morgan JL, Soto F, Wong RO, et al. Development of cell type-specific connectivity patterns of converging excitatory axons in the retina [J]. Neuron, 2011, 71(6): 1014–1021.
- [50] Lin B, Masland RH. Synaptic contacts between an identified type of ON cone bipolar cell and ganglion cells in the mouse retina [J]. Eur J Neurosci, 2005, 21(5): 1257–1270.
- [51] Neumann S, Haverkamp S. Characterization of small-field bistratified amacrine cells in macaque retina labeled by antibodies against synaptotagmin-2 [J]. J Comp Neurol, 2013, 521(3): 709–724.
- [52] Kaneko A, Pinto LH, Tachibana M. Transient calcium current of retinal bipolar cells of the mouse [J]. J Physiol, 1989, 410: 613–629.
- [53] Ohkuma M, Kawai F, Horiguchi M, et al. Patch-clamp recording of human retinal photoreceptors and bipolar cells [J]. Photochem Photobiol, 2007, 83(2): 317–322.
- [54] Walston ST, Chow RH, Weiland JD. Direct measurement of bipolar cell responses to electrical stimulation in wholemount mouse retina [J]. J Neural Eng, 2018, 15(4): 046003.
- [55] 夏峰, 安晶, 张磊, 等. 正常猕猴与人的视网膜电图比较 [J]. 中国比较医学杂志, 2012, 22(7): 32–35.
- [56] Dunn FA, Wong RO. Diverse strategies engaged in establishing stereotypic wiring patterns among neurons sharing a common input at the visual system’s first synapse [J]. J Neurosci, 2012, 32(30): 10306–10317.
- [57] Cao Y, Sarria I, Fehlaber KE, et al. Mechanism for selective synaptic wiring of rod photoreceptors into the retinal circuitry and its role in vision [J]. Neuron, 2015, 87(6): 1248–1260.
- [58] Beier C, Hovhannisyan A, Weiser S, et al. Deafferented adult rod bipolar cells create new synapses with photoreceptors to restore vision [J]. J Neurosci, 2017, 37(17): 4635–4644.
- [59] Wensel TG, Zhang Z, Anastassov IA, et al. Structural and molecular bases of rod photoreceptor morphogenesis and disease [J]. Prog Retin Eye Res, 2016, 55: 32–51.

[收稿日期]2018–02–10