

模拟动物冬眠在生物医学应用的研究进展

陈金玉 综述 潘速跃 审校

南方医科大学南方医院神经内科, 广东省广州市 510515

摘要: 冬眠是动物对外界不良环境条件的适应, 是一种能够阻止各种有害事件引起致命伤害的独特生理适应机制。本文结合近期国内最新研究结果, 综合阐述哺乳动物冬眠的定义、相关机制以及药物模拟冬眠的可行性及临床应用前景, 同时展望人工诱导冬眠在未来生物医学特别是卒中后神经保护领域中的重要地位。

关键词: 冬眠; 冬眠诱导; 神经保护; 低温; 低代谢

哺乳动物在冬眠过程中的自发性低代谢是一种独特的应对不良环境的适应机制, 能保护机体免受各种损害, 尤其是低体温阶段的缺血缺氧损伤及快速复温阶段的再灌注损伤。然而, 非冬眠物种尤其人类通常无自发性低代谢, 长期以来, 人们试图揭示冬眠的机制并从中学习利用药物诱导人类低代谢^[1]。

1 冬眠的定义

冬眠指活跃状态时体温恒定的一些动物, 在冬季伴随体温和代谢降低而出现的一种昏睡状态, 是动物对季节性能量短缺的行为和生理适应。冬眠过程被一次次的自发性周期性觉醒所中断, 形成一连串冬眠阵。一个冬眠阵包括 4 个阶段, 即入眠、深冬眠、觉醒和体温恢复正常^[2]。

2 冬眠的相关机制

关于诱导及维持冬眠的机制至今仍不十分清楚, 深入认识并利用其调控机制将为解决人工诱导冬眠等问题提供新方向。

2.1 冬眠诱导阶段

2.1.1 转变能量利用方式 减少糖代谢以保证能量储备是冬眠动物在生理上首要实现的改变, 而脂肪酸代替糖类成主要能源则是冬眠诱导阶段观察到最为显著的变化^[3]。动物禁食后体内葡萄糖缺乏, AMP/ATP 比值增高, 此时“细胞能量调节器”——腺苷酸活化蛋白激酶 (adenosine monophosphate-activated protein kinase, AMPK) 被调节激活, 一方面关闭消耗 ATP 的合成途径, 另一方面启动产生 ATP 的分解途径, 使 AMP/ATP 比率维持在一个较低的水平^[4, 5]。一旦糖代谢降低, 脂类便成主要能源, Andrews 等^[6]发现地松鼠在进入冬眠时其心脏及大脑优先选择酮类作为主要能源。在冬眠诱

导阶段动物受能量限制, 产生一系列生化反应, 其中的关键是线粒体丙酮酸脱氢酶激酶 4 (pyruvate dehydrogenase kinase 4, PDK4) 的诱导生成^[7]。PDK4 使丙酮酸脱氢酶失活, 继而阻断丙酮酸盐转化为乙酰辅酶 A, 干扰正常三羧酸循环 (tricarboxylic acid cycle, TCA), 与此同时, 酮类却依旧可分解成两分子的乙酰辅酶 A 直接进入 TCA, 最终导致糖类消耗减少、脂肪酸转换为提供 ATP 的主要能源^[7, 8]。

2.1.2 减轻氧化应激 冬眠动物在进入冬眠时, 脂肪酸过度氧化可导致电子在呼吸链上堆积, 产生过多活性氧 (reactive oxygen species, ROS), 成为氧化应激损伤的主要根源。机体出现能量限制后, 细胞内烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (nicotinamide adenine dinucleotide, NAD) /还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NADH) 比值上升^[8, 9]。胞内 NAD⁺ 增加可激活沉默信息调节因子 2 相关酶 1 (silent information regulator 2-related enzymes 1, SIRT1) 及尼克酰胺磷酸核糖转移酶 (nicotinamide phosphoribosyl transferase, Nampt), SIRT1 是 NAD⁺ 依赖的去乙酰化酶, Nampt 则是 NAD⁺ 合成的限速酶, 活化的 SIRT1 又可反馈增强 Nampt 活性^[10], 并使缺氧诱导因子-2a (hypoxia-inducible factor-2a, HIF-2a) 在缺氧条件下的表达迅速增加, HIF-2a 是缺氧时广泛存在于体内的一类转录因子, 通过对下游靶基因的调节产生代偿反应, 以增强细胞抵抗氧化应激损伤的能力, 在维持机体对缺氧的适应中发挥重要作用^[11, 12]。SIRT1 也可同时增强脂肪分解通路, 进一步确保脂质替换糖类成为代谢的主要能源^[13]。

2.1.3 延长迟缓状态 哺乳动物昼夜节律是由位于下丘脑视交叉上核 (suprachiasmatic nucleus,

收稿日期: 2013-06-26; 修回日期: 2013-10-11

作者简介: 陈金玉 (1987-), 女, 在读博士研究生, 主要从事神经危重症的治疗。

SCN) 的调控中枢所支配,昼夜节律基因即生物钟基因主要有 BMAL1、CLOCK、Per、Cry 等^[14]。活化的 SIRT1 通过介导生物钟蛋白 BMAL1 的去乙酰基作用,使 CLOCK/BMAL1 蛋白组成的异源二聚体转录激活复合物失活,继而对生物钟基因 Per 及 Cry 的转录表达产生抑制作用,而 Per、Cry 基因转录翻译的减少又可反馈抑制 CLOCK/BMAL1 复合体的形成,从而形成转录反馈环、扰乱正常的生理反馈回路,导致生物钟减慢甚至静止,影响生物钟所调控的非活跃阶段某些基因的表达,导致动物处于非活跃期的时间相应延长,使之更易进入冬眠状态^[15,16]。见图 1。

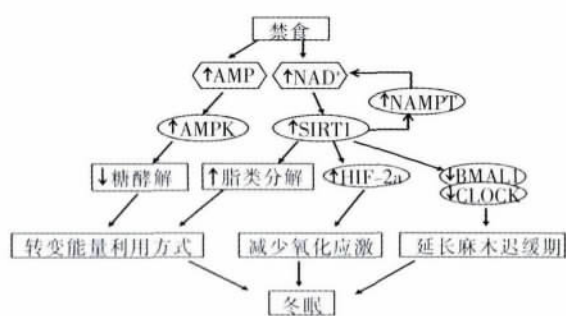


图 1 冬眠诱导阶段相关机制图。由于环境改变和食物短缺,动物开始进入禁食状态,胞内营养物质耗竭、AMP 及 NAD^+ 增高。过多 AMP 可激活 AMPK,通过降低糖代谢将能量利用方式转换成基于脂质代谢。而 NAD^+ 可增强 SIRT1 的活性,活化后的 SIRT1 进入胞核内通过去乙酰化抑制核心生物钟蛋白 BMAL1 的作用,阻断下游基因表达,以延长动物迟缓期,另外 SIRT1 可通过激活与脂质代谢及 HIF-2 α 相关的核受体蛋白的表达,实现减轻氧化应激损伤。

2.2 冬眠的维持阶段

哺乳动物在冬眠时能自动调节机体器官功能,对外来刺激,神经系统仍能作出正常反应,虽心率明显下降,但仍呈节律搏动,机体依旧维持着基本功能。

2.2.1 维持神经系统功能 冬眠动物的神经元在经历低体温至正常体温的过程中表现出较强的可塑性。有学者观察到实验动物神经元在低体温时处于收缩状态,但在觉醒开始后 2~3 h 内即可快速恢复至原始大小,这种收缩与膨胀现象与体温相关并贯穿于整个冬眠过程^[17]。Heller 等^[18] 在实验中观察到,在冬眠低体温期神经元突触减少

55%~60%,伴随突触群集蛋白的解离但没有蛋白的丢失,在复温即觉醒开始的 2 h 内突触数目以及突触蛋白的聚集即可恢复至正常水平。因此学者们认为,冬眠时动物通过神经元的可塑性维持着大脑功能,避免低温阶段的缺血缺氧及复温阶段的再灌注损伤^[19]。

2.2.2 维持心血管系统功能 对于人和多数恒温哺乳动物,心脏保持节律性搏动的最低温度在 15~20℃,实验观察到狗在体温降至 18℃ 左右即可发生严重的心律失常导致死亡。然而冬眠动物体温在 0~35℃ 间变动时依然能保持窦性心律,心率、血压、心输出量随体温平稳下降,心脑血管得到良好维持。其中可能的机制有:一增加缝隙连接的数目以降低细胞内通道电阻,促进心肌细胞的同步收缩;二心脏排除 Ca^{2+} 的能力显著增强^[20,21]。这一理论已被实验所证实,在冬眠的金仓鼠心脏中检测到间隙连接蛋白 43 及 45 表达上调,而在冬眠的土拨鼠体内也发现具有增强 Ca^{2+} 处理能力的基因在低温条件下表达明显增强^[21-23]。

3 人类冬眠的可行性及临床前景

冬眠物种在哺乳动物系统演化分支中呈广泛分散分布,这表明现代哺乳动物的冬眠行为是其祖先特征的残留,而不是进化形成,这同时也暗示冬眠所需基因可能广泛存在于所有哺乳动物的基因组中,非冬眠与冬眠动物的主要区别在于基因表达的不同,而非缺乏冬眠的基因,因此,从理论上推断非冬眠动物可被人工诱导冬眠。

脑和心脏的缺血缺氧常是导致疾病甚至死亡的主要原因,而冬眠动物对缺血缺氧具有独特的耐受力,冬眠时它们能在脑部血流显著下降的情况下存活,且觉醒后没有发生神经学或病理学损伤^[24]。冬眠状态下持续的低体温、高血液黏滞度,以及觉醒时强烈的肾上腺能支配、急剧的心温变化和高亢的工作状态对心血管系统提出更高的要求,然而冬眠动物的心血管系统却表现出超常的机能稳定性^[25]。可见,冬眠在缺血缺氧应激下的神经及心脏保护上具有独特的作用。

4 冬眠的人工诱导

近年大量文献指出,许多物质具有诱导动物进入自然冬眠或类似冬眠的功效,其中包括硫化氢(hydrogen sulfide, H_2S)、5'-磷酸腺苷(5'-AMP)以及甲状腺激素衍生物^[26]。

4.1 硫化氢

H_2S 是以半胱氨酸为底物,在吡多醛-5'-磷酸依赖性酶催化作用下产生的,在神经系统及心血管系统中做为信号分子起着重要作用^[27]。 H_2S 是细胞色素 C 氧化酶的特异性、可逆性抑制剂,通过与 O_2 竞争结合,降低细胞内氧耗,干扰线粒体氧化磷酸化减少 ATP 的生成,最终减慢机体新陈代谢^[26,28]。

Blackstone 等发现,将小鼠暴露于 80 ppm 的低浓度 H_2S 中,可使动物进入严重低体温或假死状态,其核心温度降低至 $15^\circ C$ 、代谢耗能降低约 90%、心率降至 10 次/min,该现象持续约 6 h 后动物可自发觉醒,体温及代谢速率逐渐回复至基线水平,且苏醒后没有观察到明显不良反应^[29,30]。

4.2 5'-磷酸腺苷

5'-AMP 在腺嘌呤核苷酸合成及分解代谢中起关键作用,通过激活 AMPK,促使动物进入低代谢状态。机体通过腺苷激酶调节 $ATP + 5'-AMP \leftrightarrow 2ADP$ 之间的平衡,控制细胞内腺苷酸能荷、影响众多细胞过程,最终导致能量利用方式的转变。

Zhang 等^[4]将持续黑暗(constant darkness, DD)光制小鼠予以禁食处理诱导其进入冬眠,通过检测血液发现,进入冬眠后的小鼠体内 5'-AMP 水平是冬眠前的 2~3 倍,提示 5'-AMP 可能在冬眠的诱导阶段中扮演重要角色。为验证这一推测,研究小组将 5'-AMP 注射到小鼠腹腔内,最终成功诱导动物进入低体温、低代谢状态。在注入药物 5 min 后,小鼠即进入严重低体温,心率由 600 次/min 降至 200 次/min,核心体温由 $37^\circ C$ 降至 $25^\circ C$,这种状态持续较为短暂,小鼠很快进入产热阶段,核心体温随即在数小时内恢复正常,在后期长达数个月的严密监测中,并未发现这些动物有明显不良反应^[4,26]。

4.3 甲状腺激素衍生物

3-碘化甲状腺原氨酸(3-iodothyronamine, T1AM)是近期发现由甲状腺素通过脱羧及脱碘作用生成的衍生物,对 G 蛋白偶联一元胺受体(G protein-coupled trace amine-associated receptor, TAAR1)具有潜在激动作用,对心脏做功效能产生显著影响,以及激活下游相关蛋白表达,产生大量 cAMP,进一步减少心输出量、降低核心体温^[31]。据报道,有实验小组将 T1AM 注入小鼠体内,即可观察到与剂量相关的呼吸耗氧量、体温及心率快速下降,此外还可增加离体心脏对缺血性伤害的抵抗能力^[32,33]。虽然关于

T1AM 的具体生理学机制尚未十分清楚,但 T1AM 独特的生物学特性及目前的研究现状都预示着其在冬眠诱导中可能占据重要位置。

4.4 其他具有诱导作用的物质

凡是能够减少能源物质的获得、产生以及使用的物质均可导致机体代谢速率及体温的下降,从而诱导动物出现类似冬眠的状态。2-脱氧-D-葡萄糖便是其中一种,通过干扰糖酵解、加强脂肪酸利用等途径,使实验动物迅速地进入冬眠状态。另外,脑室内注射神经肽 Y 可诱导小鼠、大鼠甚至人类等实验对象出现类冬眠式的低代谢、低体温反应^[34,35]。

5 总结与展望

冬眠是生物在食物短缺等恶劣环境下维持高存活率的保护行为,通过降低新陈代谢、提高适应性等特异性改变,在低体温及复温阶段更好地保存能源、防止细胞死亡、最大限度地降低器官损伤。阐明冬眠诱导的分子机制与人类医学发展之间具有重大关联,揭示冬眠及相关适应行为的信号通路并将其应用于人类,将是未来医学特别是神经领域发展的新方向,有助于减轻缺血缺氧性脑病、缺血性卒中及严重颅脑外伤等疾病的过度应激反应,降低细胞代谢耗氧、改善微循环,使神经元及周围组织免于遭受严重损害,为原发疾病的治疗争取时间及条件。然而现阶段关于冬眠人工诱导的研究缺乏完善的系统,相关的文献更是有限,该领域尚需要更多的学者前来开拓,临床具体治疗方法还有待更进一步的实验研究。

参 考 文 献

- [1] Aslami H, Juffermans NP. Induction of a hypometabolic state during critical illness—a new concept in the ICU? *Neth J Med*, 2010, 68(5): 190-198.
- [2] 杨明,王德华.哺乳动物的蛰眠:类型、物种分布与模式. *兽类学报*, 2011, 31(2): 195-204.
- [3] Hindle AG, Karimpour-Fard A, Epperson L E, et al. Skeletal muscle proteomics: carbohydrate metabolism oscillates with seasonal and torpor-arousal physiology of hibernation *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2011, 301(5): R1440-R1452.
- [4] Zhang J, Kaasik K, Blackburn MR, et al. Constant darkness is a circadian metabolic signal in mammals. *Nature*, 2006, 439(7074): 340-343.
- [5] 张红胜,周玥,许菲. AMPK, SIRT1 与能量代谢. *国际病理科学与临床杂志*, 2009, 29(3): 202-206.

- [6] Andrews MT, Russeth KP, Drewes LR, et al. Adaptive mechanisms regulate preferred utilization of ketones in the heart and brain of a hibernating mammal during arousal from torpor. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2009, 296(2): R383-R393.
- [7] Andrews MT. Advances in molecular biology of hibernation in mammals. *Bioessays*, 2007, 29(5): 431-440.
- [8] Melvin RG, Andrews MT. Torpor induction in mammals: recent discoveries fueling new ideas. *Trends Endocrinol Metab*, 2009, 20(10): 490-498.
- [9] Serkova NJ, Rose JC, Epperson LE, et al. Quantitative analysis of liver metabolites in three stages of the circannual hibernation cycle in 13-lined ground squirrels by NMR. *Physiol Genomics*, 2007, 31(1): 15-24.
- [10] 吴梦然, 张红胜. NAD⁺ 和 Nampt 与 SIRT1 的研究进展. *医学综述*, 2010, 16(7): 968-971.
- [11] Dioum EM, Chen R, Alexander MS, et al. Regulation of hypoxia-inducible factor 2alpha signaling by the stress-responsive deacetylase sirtuin 1. *Science*, 2009, 324(5932): 1289-1293.
- [12] Ramsey KM, Yoshino J, Brace CS, et al. Circadian clock feedback cycle through NAMPT-mediated NAD⁺ biosynthesis. *Science*, 2009, 324(5927): 651-654.
- [13] Feige JN, Lagouge M, Canto C, et al. Specific SIRT1 activation mimics low energy levels and protects against diet-induced metabolic disorders by enhancing fat oxidation. *Cell Metab*, 2008, 8(5): 347-358.
- [14] 谢红慧, 王琪, 郭斌. BMAL1 与 ROS 相互作用对衰老的影响. *中华老年口腔医学杂志*, 2012, 10(3): 184-187.
- [15] Hirayama J, Sahar S, Grimaldi B, et al. CLOCK-mediated acetylation of BMAL1 controls circadian function. *Nature*, 2007, 450(7172): 1086-1090.
- [16] Nakahata Y, Kaluzova M, Grimaldi B, et al. The NAD⁺-dependent deacetylase SIRT1 modulates CLOCK-mediated chromatin remodeling and circadian control. *Cell*, 2008, 134(2): 329-340.
- [17] von der Ohe CG, Darian-Smith C, Garner CC, et al. Ubiquitous and temperature-dependent neural plasticity in hibernators. *J Neurosci*, 2006, 26(41): 10590-10598.
- [18] von der Ohe CG, Garner CC, Darian-Smith C, et al. Synaptic protein dynamics in hibernation. *J Neurosci*, 2007, 27(1): 84-92.
- [19] Dave KR, Christian SL, Perez-Pinzon MA, et al. Neuroprotection: lessons from hibernators. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 2012, 162(1-3): 1-9.
- [20] Colugnati DB, Arida RM, Cravo SL, et al. Hibernating mammals in sudden cardiac death in epilepsy: what do they tell us? *Med Hypotheses*, 2008, 70(5): 929-932.
- [21] Wang SQ, Lakatta EG, Cheng H, et al. Adaptive mechanisms of intracellular calcium homeostasis in mammalian hibernators. *J Exp Biol*, 2002, 205(Pt 19): 2957-2962.
- [22] Li XC, Wei L, Zhang GQ, et al. Ca²⁺ cycling in heart cells from ground squirrels: adaptive strategies for intracellular Ca²⁺ homeostasis. *PLoS One*, 2011, 6(9): e24787.
- [23] Yatani A, Kim SJ, Kudej RK, et al. Insights into cardioprotection obtained from study of cellular Ca²⁺ handling in myocardium of true hibernating mammals. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2004, 286(6): H2219-H2228.
- [24] Schwartz C, Hampton M, Andrews MT. Seasonal and regional differences in gene expression in the brain of a hibernating mammal. *PLoS One*, 2013, 8(3): e58427.
- [25] Nelson OL, Robbins CT. Cardiac function adaptations in hibernating grizzly bears (*Ursus arctos horribilis*). *J Comp Physiol B*, 2010, 180(3): 465-473.
- [26] Lee CC. Is human hibernation possible? *Annu Rev Med*, 2008, 59: 177-186.
- [27] 何龙, 储勤军, 艾艳秋. 硫化氢在中枢神经系统的生理及保护作用. *国际麻醉学与复苏杂志*, 2012, 33(11): 760-762, 776.
- [28] Aslami H, Schultz MJ, Juffermans NP, et al. Potential applications of hydrogen sulfide-induced suspended animation. *Curr Med Chem*, 2009, 16(10): 1295-1303.
- [29] Blackstone E, Morrison M, Roth MB, et al. H₂S induces a suspended animation-like state in mice. *Science*, 2005, 308(5721): 518.
- [30] Volpato GP, Searles R, Yu B, et al. Inhaled hydrogen sulfide: a rapidly reversible inhibitor of cardiac and metabolic function in the mouse. *Anesthesiology*, 2008, 108(4): 659-668.
- [31] Snead AN, Miyakawa M, Tan ES, et al. Trace amine-associated receptor 1 (TAAR1) is activated by amiodarone metabolites. *Bioorg Med Chem Lett*, 2008, 18(22): 5920-5922.
- [32] Chiellini G, Frascarelli S, Ghelardoni S, et al. Cardiac effects of 3-iodothyronamine: a new aminergic system modulating cardiac function. *FASEB J*, 2007, 21(7): 1597-1608.
- [33] Zucchi R, Ghelardoni S, Chiellini G. Cardiac effects of thyronamines. *Heart Fail Rev*, 2010, 15(2): 171-176.
- [34] Bouma HR, Verhaag EM, Otis JP, et al. Induction of torpor: mimicking natural metabolic suppression for biomedical applications. *J Cell Physiol*, 2012, 227(4): 1285-1290.
- [35] Paul MJ, Freeman DA, Park JH, et al. Neuropeptide Y induces torpor-like hypothermia in Siberian hamsters. *Brain Res*, 2005, 1055(1-2): 83-92.