

冬眠哺乳动物氧化应激产生及 抗氧化防御机制研究进展

魏艳红^{①②} 王慧平^① 高云芳^{①*}

① 西北大学生命科学学院, 陕西省秦岭珍稀濒危动物保育重点实验室 西安 710069; ② 宁夏医科大学基础医学院 银川 750004

摘要: 哺乳动物的冬眠是一种季节性异温状态, 是对外界恶劣自然环境的一种适应策略。冬眠-阵间觉醒周期中, 伴随着生理功能的剧烈变化, 从冬眠期间整体代谢的抑制, 到阵间觉醒时氧代谢的急剧增加, 使动物体内产生了大量的氧自由基。然而, 冬眠动物出眠时并未表现出明显的氧化损伤迹象, 因此, 冬眠哺乳动物被认为是一种天然的抗氧化损伤模型。本文从氧化应激的产生、活性氧的来源、抗氧化防御等方面综述了冬眠哺乳动物对氧化应激的防御, 并从其抗氧化的分子调控方面分析了冬眠哺乳动物对氧化应激的适应机制。

关键词: 冬眠; 哺乳动物; 氧化应激; 抗氧化防御; 分子机制

中图分类号: Q955 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263 (2018) 02-302-11

Oxidative Stress and Mechanism of Antioxidant Defense in Hibernating Mammals

WEI Yan-Hong^{①②} WANG Hui-Ping^① GAO Yun-Fang^{①*}

① *The College of Life Sciences, Northwest University, Shaanxi Key Laboratory for Animal Conservation, Xi'an 710069;* ② *The School of Basic Medical Sciences, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China*

Abstract: Mammalian hibernation is a state of seasonal heterothermy and survival strategy. The hibernation consists of long periods of deep torpor interspersed by brief interbout arousal periods. During torpor, metabolic rate is profoundly depressed and core body temperature decreases to near ambient temperature. However, these functions are promptly restored to the basic level upon arousal, and a quick restoration of blood flow accompanied by an increased mitochondrial respiration and oxygen usage results in elevated generation of reactive oxygen species (ROS) in mammals. However, no oxidative damage is found in the tissues of hibernators during a prolonged period of hibernation. Small mammalian hibernators have, therefore, been considered to be the best model of the anti-oxidative damage. In this paper, the adaptation mechanisms of oxidative stress to hibernating mammals are reviewed with respect to the generation of oxidative stress, the

基金项目 国家自然科学基金项目 (No. 31772459), 2017年西北大学研究生自主创新项目 (No. YZZ17155);

* 通讯作者, E-mail: gaoyunf@nwu.edu.cn;

第一作者介绍 魏艳红, 女, 博士研究生; 研究方向: 动物生理学; E-mail: lovely_yhwei@126.com.

收稿日期: 2017-05-27, 修回日期: 2017-11-01 DOI: 10.13859/j.cjz.201802016

source of ROS and antioxidant defense.

Key words: Hibernation; Mammalian; Oxidative stress; Antioxidant defense; Molecular mechanism

冬眠是动物在寒冷的冬季, 面对食物短缺和极低的环境温度, 进化出的一种独特的生存策略。哺乳动物的冬眠是由多个冬眠-阵间觉醒-再冬眠周期性循环的冬眠阵组成。在冬眠时, 哺乳动物表现出整体代谢低下, 体温、心率、血流速度、耗氧量、呼吸率等都显著降低。而在阵间觉醒时, 各项生理功能快速恢复, 体温回升, 呼吸、心跳频次恢复, 骨骼肌活动再次活跃, 各组织器官血液灌流量迅速增加 (Carey et al. 2003, Muleme et al. 2006, Storey 2010)。理论上, 随着体温升高和耗氧量的增加, 线粒体呼吸增强, 必然导致动物体内产生大量的活性氧 (reactive oxygen species, ROS) (Ruuge et al. 1991, Hermes-Lima et al. 2002, Sanderson et al. 2013)。然而, 有关北极黄鼠 (*Urocyon parryi*) 的研究表明, 阵间觉醒后或出眠时动物并没有出现细胞应激、炎症反应、神经元病理学反应等明显的氧化损伤迹象 (Ma et al. 2005), 大鼠耳蝠 (*Myotis myotis*) 和金背黄鼠 (*Callospermophilus lateralis*) 出眠后仍保留其对捕食等行为的记忆 (McNamara et al. 1973, Ruczynski et al. 2011)。可见, 其体内必然存在着良好的抗氧化防御机制。冬眠动物天然的抗氧化损伤能力已引起广大研究者的青睐, 冬眠哺乳动物已被认为是一种天然的抗氧化损伤模型。研究冬眠动物对特殊环境的生理适应机制是动物生理生态学的研究热点之一。本文对冬眠哺乳动物体内氧化应激和抗氧化防御的最新研究进展进行了综述。

1 动物体内的氧化应激与抗氧化防御系统

细胞中活性氧 (ROS) 主要包括超氧自由基 (superoxide anion radical, $O_2^{\cdot-}$)、羟基自由基 (hydroxyl radical, OH^{\cdot})、过氧化氢 (hydrogen peroxide, H_2O_2) 和脂质过氧化物 (lipid peroxide, LOOH) 等。细胞中很多生理生化过

程都会产生活性氧, 其中线粒体电子传递是活性氧产生的最主要途径。人类和动物体内在细胞呼吸和能量代谢过程中时刻发生着有氧氧化, 分子氧经线粒体电子传递链传递被还原成水, 产生 ATP。然而电子在经线粒体电子传递链复合体 I (complex I; NADH 脱氢酶复合体: NADH ubiquinone oxidoreductase) 和复合体 III (complex III; 细胞色素 c 还原酶复合体 ubiquinone-cytochrome c oxidase,) 传递过程中极易发生逃逸, 与分子氧作用生成诸如超氧自由基 ($O_2^{\cdot-}$)、羟基自由基 (OH^{\cdot}) 和过氧化氢 (H_2O_2) 等形式的活性氧 (Halliwell et al. 1994, Raha et al. 2000, Turrens 2003, Murphy 2009)。此外, 在内质网蛋白氧化折叠过程中, 内质网糖蛋白 1 (endoplasmic reticulum oxidoreductin 1, ERO1) 在黄素腺嘌呤二核苷酸 (flavin adenine dinucleotide, FAD) 的协助下将电子从蛋白质二硫键异构酶 (protein disulfide isomerase, PDI) 转移至 O_2 , 从而产生包括过氧化氢 (H_2O_2) 在内的活性氧 (Tu et al. 2002, Zhang et al. 2008, Dickinson et al. 2011)。细胞内活性氧的另一个主要来源是定位于各类细胞膜上的还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶 (reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase, Nox) 和与 Nox 相似的双重氧化酶, Nox 能够将分子氧通过单电子还原产生超氧自由基 ($O_2^{\cdot-}$) 和过氧化氢 (H_2O_2) (Lambeth 2004, 葛勤敏等 2007, Dickinson et al. 2011)。

各种活性氧分子均具有高度的氧化反应性和非特异性, 可氧化体内的诸多生物分子, 如脂质、碳水化合物、蛋白质和 DNA 等, 造成其结构或分子组成发生变化, 从而损害正常的生物功能。如活性氧可造成蛋白质结构突变, 导致蛋白质降解或丧失生物活性; 可造成 DNA 链断裂、DNA 位点突变、DNA 双链畸变和原

癌基因与肿瘤抑制基因突变等形式的 DNA 损伤；可降低酶活性，损害生物膜及其功能，从而导致细胞结构和功能改变，促进细胞凋亡（Kohen et al. 2002, Circu et al. 2010, 冉茂良等 2013）。

通常认为活性氧对细胞有害，但是低浓度、适量的活性氧对调节机体生理过程具有非常重要的作用。体内产生适度的氧自由基可以作为细胞信号转导过程中的第二信使，参与机体正常的生理活动，如防御病原体，参与多种抵御损伤信号通路的应答过程，以及诱导有丝分裂反应等；也可以诱导各类抗氧化应答来保护细胞免受氧化损伤，维持氧化还原稳态（Valko et al. 2007, Dickinson et al. 2011, Espinosa-Diez et al. 2015）。

虽然细胞呼吸和代谢过程易产生活性氧，但体内同时存在着抗氧化防御系统，可及时清除多余的活性氧，抵御其造成的氧化损伤。抗氧化防御系统主要由一系列具有活性氧清除功能的抗氧化酶和非酶类的小分子抗氧化剂组成。抗氧化酶在各种动物组织中普遍存在，主要包括超氧化物歧化酶（superoxide dismutase, SOD）、过氧化氢酶（catalase, CAT）、谷胱甘肽过氧化物酶（glutathione peroxidase, GPx）和谷胱甘肽还原酶（glutathione reductase, GR）等（Halliwell et al. 1994）。超氧化物歧化酶（SOD）可催化超氧阴离子（ $O_2^{\cdot-}$ ）分解为过氧化氢（ H_2O_2 ），过氧化氢酶（CAT）可将过氧化氢（ H_2O_2 ）分解为 O_2 和 H_2O ，谷胱甘肽过氧化物酶（GPx）在还原型谷胱甘肽（reduced glutathione, GSH）作用下将过氧化氢（ H_2O_2 ）分解成 H_2O ，同时将脂质过氧化物（LOOH）转变为无活性的脂质氢氧化物（lipid hydroxide, LOH）（Kohen et al. 2002, Blagojevic 2007, Chainy et al. 2016）（图 1）。另外，近年来研究发现许多蛋白质也起到抗氧化酶的作用，比如过氧化还原酶家族（peroxiredoxin, Prdx）和硫氧还原蛋白（thioredoxin, Trx）等（Hofmann et al. 2002）。除了上述各种抗氧化

酶之外，体内还存在许多小分子抗氧化剂，诸如谷胱甘肽（glutathione）、尿酸（uric acid）、抗坏血酸（ascorbate）、组氨酸二肽（histidinedipeptide）、褪黑素（melatonin）和生育酚（ α -tocopherol）等，直接或间接地阻止氧自由基对细胞各组分的损伤（Kohen et al. 2000, 2002）。

2 冬眠哺乳动物活性氧的产生

哺乳动物冬眠期间冬眠阵反复循环，其生理状态不断变化会产生大量的活性氧。综合目前研究，冬眠过程中活性氧的来源主要有以下三个方面：

(1) 冬眠期脂肪氧化代谢过程产生大量活性氧。冬眠期间，动物体内多不饱和脂肪酸（polyunsaturated fatty acids, PUFAs），如亚油酸，水平增加以维持低体温下脂质的流动性（Frank 1992）。然而 PUFAs 易受到自由基的攻击，自由基从 PUFAs 抽提一个氢原子生成脂质自由基（ $LO\cdot$ ）， $LO\cdot$ 进一步与氧反应生成脂类自由基（ $LOO\cdot$ ）， $LOO\cdot$ 再从 PUFAs 抽提一个氢原子从而产生脂质过氧化物（LOOH）（Gunstone 1996）。因此冬眠时脂质氧化过程是冬眠哺乳动物活性氧的重要来源。在冬眠美洲黑熊（*Ursus americanus*）血浆和红细胞膜中发现，脂质过氧化标志物丙二醛（malonyldialdehyde, MDA）水平显著增加（Chauhan et al. 2002）；多纹黄鼠（*Ictidomys tridecemlineatus*）冬眠期小肠平滑肌中脂质过氧化产物共轭双烯（conjugated dienes）的含量也显著增加（Carey et al. 2000）。

(2) 阵间觉醒时线粒体呼吸的增强导致大量活性氧生成。哺乳动物在冬眠期，耗氧量降低至活跃状态时的 2%（Drew et al. 2002），而在阵间觉醒时，耗氧量大幅增加。有研究表明，多纹黄鼠阵间觉醒时的耗氧量是夏季活跃状态的 3 倍，是冬眠状态的 36 倍（Muleme et al. 2006），马铁菊头蝠（*Rhinolopus ferrumequinum*）阵间觉醒时的耗氧量比夏季活跃状态升高了

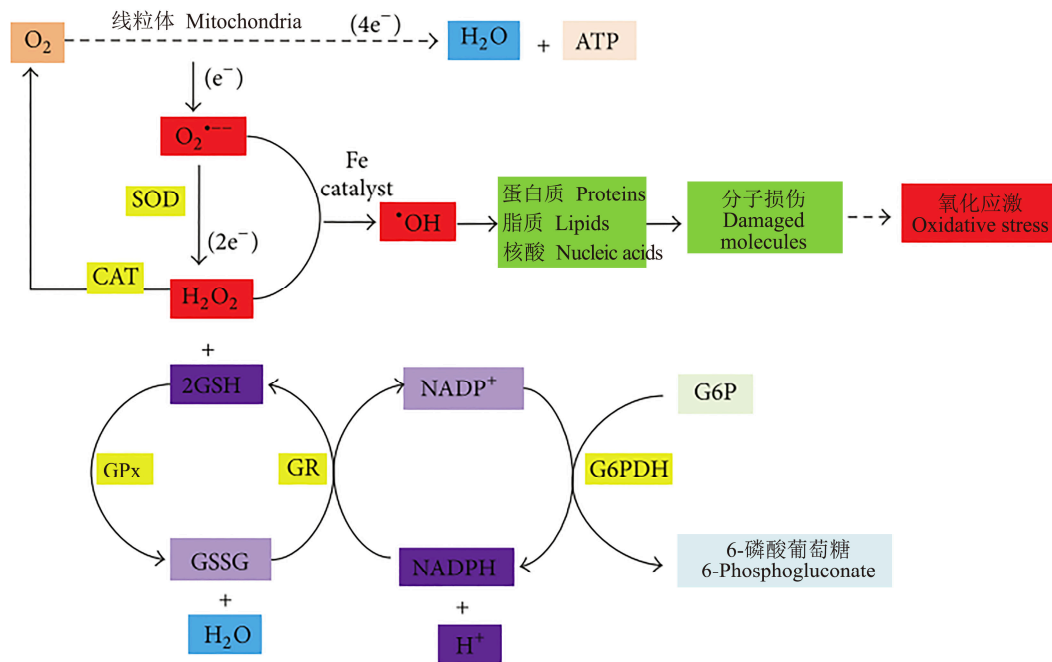


图 1 抗氧化酶清除活性氧 (ROS) 过程 (Chainy et al. 2016)

Fig. 1 The process of antioxidant enzymes scavenging various reactive oxygen species (ROS) (Chainy et al. 2016)

SOD. 超氧化物歧化酶; CAT. 过氧化氢酶; GPx. 谷胱甘肽过氧化物酶; GR. 谷胱甘肽还原酶; GSH. 还原型谷胱甘肽; GSSG. 氧化型谷胱甘肽; $O_2^{\cdot-}$. 超氧阴离子; H_2O_2 . 过氧化氢; OH^{\cdot} . 羟基自由基; NADPH. 还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸; $NADP^+$. 氧化型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸; G6PDH. 6-磷酸-葡萄糖脱氢酶; G6P. 葡萄糖-6-磷酸。

SOD. Superoxide dismutase; CAT. Catalase; GPx. Glutathione peroxidase; GR. Glutathione reductase; GSH. Reduced glutathione; GSSG. Oxidized glutathione; $O_2^{\cdot-}$. Superoxide radical; H_2O_2 . Hydrogen peroxide; OH^{\cdot} . Hydroxyl radical; NADPH. Reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; $NADP^+$. Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; G6PDH. Glucose-6-phosphate dehydrogenase; G6P. Glucose-6-phosphate.

8.7 倍 (Lee et al. 2002)。由于线粒体呼吸作用增强会使动物体内氧自由基水平增加, (Ruuge et al. 1991, Hermes-Lima et al. 2002, Sanderson et al. 2013), 另外大量的研究数据表明, 冬眠哺乳动物在阵间觉醒期多种抗氧化酶和小分子抗氧化剂的表达均显著升高 (Buzadzic et al. 1990, 1992, 1997, Toien et al. 2001, Yin et al. 2016)。从而间接表明, 冬眠动物在阵间觉醒期由于耗氧量的极显著增加, 使得线粒体呼吸瞬间增强, 致使动物体内产生了大量的氧自由基。

(3) 另有学者提出, 许多小型哺乳动物冬眠-阵间觉醒周期中全身血液循环的血流速度和各组织器官血液灌流量的剧烈波动, 类似于医

学中的缺血-再灌注过程 (ischemia-reperfusion), 在这个过程中也有大量活性氧产生 (Ma et al. 2005, Morin et al. 2008)。

3 冬眠哺乳动物抗氧化物水平

虽然冬眠哺乳动物在冬眠期及阵间觉醒期均会产生大量活性氧, 但 Ma (2005) 研究表明, 北极黄鼠在出眠后并没有出现细胞应激、炎症反应、神经元病理学反应等氧化损伤迹象, 比如尽管缺氧诱导因子 (hypoxia-inducible factor, HIF) 1 α 在阵间觉醒期黄鼠脑中有所积累, 但并没有检测到炎症介质诱导型一氧化氮和酶 (inducible nitric oxide synthase, iNOS) 的表达;

苏木素伊红 (hematoxylin and eosin, H.E) 染色, 羧甲基赖氨酸 (carboxymethyl lysine, CML) 和 4-羟基-2-壬烯醛 (4-hydroxy-2-nonenal, HNE) 免疫染色也没有检测到神经元病理学变化。我们实验室前期对达乌尔黄鼠 (*Spermophilus dauricus*) 的研究结果显示, 虽然细胞色素 c 在动物出眠时有所升高, 但是促凋亡因子 Bax, 抑制凋亡因子 Bcl-2 以及 Bax 与 Bcl-2 的比例在出眠时的表达水平均与冬眠前相当, 脱氧核糖核苷酸末端转移酶介导的缺口末端标记法 (terminal-deoxynucleotidyl transferase mediated nick end labeling, TUNEL) 也并没有检测到凋亡小体, 动物并未出现细胞凋亡现象 (Fu et al. 2016)。因此冬眠哺乳动物在出眠后并未表现出氧化损伤迹象, 这表明冬眠哺乳动物具有良好的抗氧化防御能力。目前, 对冬眠哺乳动物冬眠及阵间觉醒期的抗氧化能力均有深入研究。

(1) 许多研究表明哺乳动物冬眠期各种抗氧化物含量显著升高。莹鼠耳蝠 (*M. lucifugus*) 在冬眠期心组织中抗氧化物硫氧还原蛋白过氧化物酶样蛋白 (thioredoxin peroxidase-like protein, PAG) 水平比夏季活跃期显著升高了 2 倍, 其 mRNA 水平极显著升高了 5 倍 (Eddy et al. 2005); 多纹黄鼠冬眠期褐色脂肪、心组织以及白色脂肪组织中抗氧化蛋白过氧化物氧化还原酶 (Prdx) 家族成员、硫氧还原蛋白 1 (Trx1) 以及超氧化物歧化酶 (SODs) 的表达水平比夏季活跃状态均极显著上升, 其中, 过氧化物氧化还原酶 1 (Prdx1) 蛋白在褐色脂肪和心组织中分别增加了 4.0 倍和 12.9 倍, 过氧化物氧化还原酶 2 (Prdx2) 蛋白分别增加了 2.4 倍和 3.7 倍, 且过氧化物氧化还原酶 2 (Prdx2) mRNA 表达也分别增加了 1.7 倍和 3.7 倍, 过氧化物氧化还原酶 3 (Prdx3) 蛋白在心组织中显著升高 3.1 倍; 硫氧还原蛋白 1 (Trx1) 的蛋白表达在褐色脂肪组织中显著上调了 1.5 倍; 超氧化物歧化酶 (铜锌超氧化物歧化酶和锰超氧化物歧化酶) 和硫氧还原蛋白 1 (Trx1) 的蛋白表达在白色脂肪中分别极显著升高了 1.5 ~ 1.6 倍和

2.6 倍 (Morin et al. 2007, Rouble et al. 2014); 另对多纹黄鼠骨骼肌研究发现, 锰超氧化物歧化酶 (MnSOD) 蛋白表达水平在冬眠早期 (体温降至 5 ~ 7 °C 且稳定时间在 24 h 之内) 显著上升, 并且在整个冬眠阵中都维持高水平表达, 锰超氧化物歧化酶的表达有助于在基础代谢率减退的条件下长期保护细胞 (Allan et al. 2012); 北极黄鼠血液中小分子抗氧化剂抗坏血酸水平在冬眠早期上升了 3 ~ 5 倍 (Toien et al. 2001)。以上文献表明, 哺乳动物在冬眠中, 当出现氧化应激时, 机体可通过上调各种抗氧化物 (包括超氧化物歧化酶、过氧化物氧化还原酶、硫氧还原蛋白、抗坏血酸等) 的表达抵御氧化应激带来的损伤。

(2) 阵间觉醒期抗氧化物水平亦有更多的报道。Buzadzic 等 (1990, 1992, 1997) 对地黄鼠 (*S. citellus*) 的一系列研究指出, 阵间觉醒期褐色脂肪组织中多种抗氧化酶 (铜锌超氧化物歧化酶、锰超氧化物歧化酶和谷胱甘肽过氧化物酶) 的活性以及抗坏血酸的含量均显著升高, 肝和心组织中谷胱甘肽过氧化物酶 (GPx) 和抗坏血酸的表达水平也显著增加; 抗坏血酸作为一种重要的小分子抗氧化剂, 其表达水平在阵间觉醒期的升高也见于北极黄鼠肝和脾组织中 (Toien et al. 2001)。另外, 对金色中仓鼠 (*Mesocricetus auratus*) 脑组织和大脑纹状体细胞外液的微量分析显示, 阵间觉醒期抗坏血酸和还原型谷胱甘肽 (GSH) 的水平显著上升, 尿酸在大脑纹状体细胞外液中增加了 100% (Osborne et al. 2006); 对多纹黄鼠骨骼肌的研究发现, 抗氧化酶血红素加氧酶 1 (heme oxygenase 1, HO-1) 蛋白水平在阵间觉醒期极显著增加, 出眠后又恢复至冬眠前水平, 这表明骨骼肌中血红素加氧酶 1 (HO-1) 的抗氧化作用主要集中在阵间觉醒期 (Allan et al. 2012); 对两种具有冬眠习性的蝙蝠——大足鼠耳蝠 (*Myotis ricketti*) 和马铁菊头蝠脑组织氧化与抗氧化研究发现, 大多数抗氧化酶的表达量在阵间觉醒期均显著上调, 包括铜锌超氧化物歧化

酶、锰超氧化物歧化酶、过氧化氢酶、谷胱甘肽过氧化物酶 1、醌氧化还原酶 1[NAD(P)H quinone oxidoreductase 1, NQO1]、硫氧还蛋白 2, 结果表明, 冬眠蝙蝠在阵间觉醒期能通过快速上调抗氧化酶的表达清除脑组织内过多的活性氧 (Yin et al. 2016)。这些抗氧化物水平的变化不仅仅是低温环境的结果, 更重要的是表明冬眠动物在阵间觉醒时能通过大量抗氧化物表达的上调清除机体产生的大量活性氧, 将机体内的氧化还原状态维持在一个稳定状态, 以此保护组织免受活性氧带来的损伤。

4 氧化应激和抗氧化防御信号通路

动物体内活性氧增加会激活多种抗氧化防御信号通路, 调节抗氧化转录因子活化, 上调抗氧化酶的表达从而清除多余的活性氧以保护

组织免受氧化损伤。冬眠哺乳动物抗氧化防御通路主要包括 Nrf2/ARE 通路、NF- κ B 通路、MAPK 通路、JNK/FoxO3a 通路以及 JAK/SATA 通路 (Pantano et al. 2006, Sykiotis et al. 2011)。

4.1 Nrf2/ARE 通路

Nrf2/ARE 信号通路是公认的抗氧化损伤的重要通路。正常条件下, 核因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2) 以非活化状态存在于细胞质中。当受到活性氧等刺激时, Nrf2 易位至细胞核与抗氧化应答元件 (antioxidant response element, ARE) 结合, 启动下游抗氧化靶基因 (如超氧化物歧化酶、过氧化氢酶、醌氧化还原酶 1、血红素加氧酶 1、硫氧还蛋白等) 的表达, 提高机体抗氧化能力 (图 2) (Park et al. 2002, Jing et al. 2013, 王宁等 2015)。

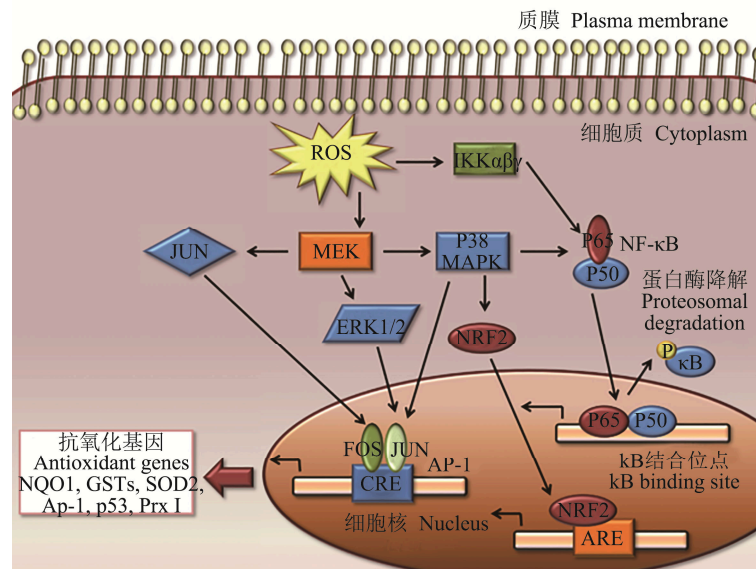


图 2 活性氧介导的细胞抗氧化信号转导通路 (Espinosa-Diez et al. 2015)

Fig. 2 Induction of antioxidant responses by ROS-mediated activation of cytosolic cell signaling pathway (Espinosa-Diez et al. 2015)

ROS. 活性氧; MEK. 促分裂原激活的蛋白激酶的激酶; ERK. 细胞外调节蛋白激酶; p38MAPK. p38 丝裂原活化蛋白激酶; JUN、FOS. AP 家族早期转录因子; NRF2. 核因子 E2 相关因子 2; NF- κ B. 核转录因子- κ B; IKK $\alpha\beta\gamma$. 核转录因子- κ B 抑制剂 α 、 β 、 γ ; CRE. 环腺苷酸反应元件; AP-1. 激活蛋白 1; ARE. 抗氧化反应元件; NQO1. 醌氧化还原酶; GSTs. 谷胱甘肽 s-转移酶; SOD2. 锰超氧化物歧化酶; Prx1. 过氧化氢酶 1; p53. 肿瘤抑制基因。

ROS. Reactive oxygen species; MEK. MAPK kinase kinase; ERK. Extracellular regulated protein kinases; p38MAPK. p38 mitogen-activated protein kinase; JUN, FOS. Early response transcription factor of AP family; NRF2. Nuclear factor erythroid 2-related factor 2; NF- κ B. Nuclear factor of kappa B; IKK $\alpha\beta\gamma$. Inhibitor of nuclear factor kappa B kinase α , β , γ ; CRE. Cyclic AMP responsive element-binding; AP-1. Activator protein 1; ARE. Antioxidant response element; NQO1. NAD(P)H quinone oxidoreductase 1; GSTs. Glutathione S-transferase; SOD2. Mn-superoxide dismutase; Prx1. Peroxiredoxin 1; p53. Tumor suppressor gene.

多纹黄鼠心组织中 Nrf2 蛋白在整个冬眠阵中比夏季活跃状态增高 1.4~1.5 倍, 其下游抗氧化物铜锌超氧化物歧化酶 (Cu/ZnSOD)、黄曲霉素醛还原酶 (aflatoxin aldehyde reductase, AFAR1) 蛋白水平与 Nrf2 蛋白表达趋势相同 (Morin et al. 2008)。还有研究表明, 多纹黄鼠冬眠期间, 肝、肾、心、脑和骨骼肌中血红素加氧酶 1 (HO-1) mRNA 和蛋白水平均显著升高, 同时 Nrf2 转录因子和其异二聚体蛋白 MafG 的水平也显著增加; 肝亚细胞分布还表明, Nrf2 和 MafG 核易位增加, 表明 Nrf2 介导的血红素加氧酶 1 (HO-1) 表达的上调对冬眠哺乳动物增强抗氧化防御具有非常重要的作用 (Ni et al. 2010)。从而表明, Nrf2 通过介导抗氧化酶表达上调对各类冬眠哺乳动物冬眠阵中多余活性氧的清除具有重要作用。

4.2 NF- κ B 通路

氧化还原敏感性转录因子 NF- κ B 属于核转录因子 (nuclear transcription factor) 家族, 非应激状态下, NF- κ B 以同源二聚体 (p50-p50) 或异源二聚体 (p65-p50) 形式存在于细胞质中, 当受到 H₂O₂ 等活性氧刺激时, I κ B 激酶 (inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase, IKK) 被激活, 进一步激活转录因子 NF- κ B, 使其易位至细胞核从而启动下游抗氧化基因表达, 主要包括锰超氧化物歧化酶 (MnSOD)、硫氧还蛋白 (Trx) 和血红素加氧酶 1 (HO-1) 等 (Lin et al. 2007, Kinningham et al. 2008)。

对多纹黄鼠骨骼肌研究发现, NF- κ B 在冬眠-阵间觉醒过程中周期性变化, 在冬眠早期 NF- κ B 被活化, p65 核易位增加, 磷酸化的 I κ B α 显著增加, 而且在进入冬眠晚期 (体温降至 5~7 °C 且稳定时间大于 5 d) 核 NF- κ B 的 DNA 结合能力显著增加, 其下游抗氧化应激靶基因锰超氧化物歧化酶 (MnSOD) 和血红素加氧酶 1 (HO-1) 在冬眠期和阵间觉醒期也出现显著上调 (Allan et al. 2012)。另有研究发现, 多纹黄鼠冬眠期小肠平滑肌脂质过氧化产物的水平增加并伴随着 NF- κ B 和线粒体应激蛋白

(glucose-regulated protein 75, GRP75) 显著上调 (Carey et al. 2000)。

因此, 在冬眠-阵间觉醒周期中, 活性氧激活 NF- κ B 信号通路从而不同程度上调下游抗氧化酶的表达, 是冬眠动物对氧化应激采取的适应性抵抗。

4.3 MAPK 通路

丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 通路 (包括 ERK、c-Jun 和 p38) 可以被活性氧激活后易位至细胞核进而与激活蛋白 1 (activator protein 1, AP1) 和环腺苷酸反应元件 (cyclic AMP responsive element-binding protein, CREB) 结合启动下游抗氧化基因的表达。

MAPKs 家族成员对动物成功冬眠具有关键作用。多纹黄鼠褐色脂肪组织中, 阵间觉醒期 p-ERK1/2 和 p-p38 蛋白表达显著上升, 转录因子环腺苷酸反应元件 (CREB-1) 蛋白的磷酸化水平显著增加, 下游抗氧化酶 (超氧化物歧化酶和硫氧还蛋白) 的表达水平也显著上调, 表明冬眠期间活性氧可以激活 MAPK 通路, 通过介导下游抗氧化酶表达上调从而对抗氧化损伤, 这种现象在瑞氏黄鼠 (*U. richardsonii*) 和莹鼠耳蝠骨骼肌及心组织中也同样存在 (MacDonald et al. 2005, Eddy et al. 2007, Rouble et al. 2014)。由此表明, 在冬眠过程中 MAPK 通路也参与了抗氧化应激防御的调控。

4.4 其他通路

在冬眠-阵间觉醒循环周期中, 伴随着活性氧的增加, 多种信号通路被激活, 使叉头框蛋白 (forkhead box protein, Fox) 家族 O 亚型的转录因子 FoxO3a 发生磷酸化被激活, 核易位增加, 促进抗氧化蛋白表达, 包括过氧化氢酶 (CAT)、锰超氧化物歧化酶 (MnSOD)、过氧化物氧化还原酶 (Prdx) 等 (图 3) (Wang et al. 2012, Wu et al. 2014, 李昂等 2016)。

对多纹黄鼠骨骼肌研究表明, FoxO3a 的总蛋白表达在冬眠早期和冬眠晚期分别比夏季活跃期升高了 3.6 倍和 4.5 倍, 磷酸化的 FoxO3a

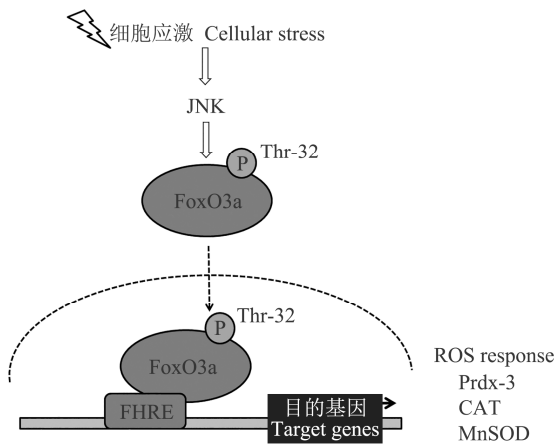


图3 JNK 介导的 FoxO3a 的激活机制

(Wu et al. 2014)

Fig. 3 The mechanism of JNK-mediated FoxO3a activation (Wu et al. 2014)

JNK. c-Jun N 端激酶; FoxO3a. 叉头框蛋白 O3a; FHRE. 叉头框识别元件; Prdx3. 过氧化还原酶 3; CAT. 过氧化氢酶; MnSOD. 锰超氧化物歧化酶。

JNK. c- Jun N-terminal kinase; FoxO3a. Forkhead box O3a; FHRE. Forkhead recognition element; Prdx3. Peroxiredoxin 3; CAT. Catatase; MnSOD. Mn-superoxide dismutase.

蛋白水平在浅冬眠期升高了 1.5 倍, 并伴随着下游过氧化氢酶 (CAT) 的蛋白表达增加了 1.4 倍 (Wu et al. 2014)。Yin 等 (2016) 通过信号网络分析 (ingenuity pathway analysis, IPA) 数据库对冬眠蝙蝠脑组织多种抗氧化酶以及 Nrf2 和 FoxOs 分析亦指出, Nrf2 和 FoxOs 对抗氧化酶的调控发挥了关键作用。从而表明, FoxO3a 亦参与哺乳动物抗氧化防御的调控, 这是对冬眠动物在整个冬眠期的保护性反应, 对冬眠的维持具有重要作用。

另有研究表明, Janus 激酶-信号转导和转录激活子 (Janus kinase-signal transducer and activator transcription, JAK/SATA) 信号通路在氧化应激中具有保护作用。JAK 可以使 SATA 磷酸化, 磷酸化的 SATA 易位至细胞核, 调控下游靶基因的表达 (Boengler et al. 2008)。在冬眠多纹黄鼠心和骨骼肌中发现, STAT3 和 STAT5 磷酸化水平升高, 表明冬眠期间心和骨

骼肌中 JAK/STAT 通路的激活是对应激的一种保护性反应 (Logan et al. 2016)。

5 总结

综上所述, 冬眠哺乳动物在冬眠-阵间觉醒循环中虽然会产生大量的活性氧, 但由于其可以通过各种有效的抗氧化防御途径上调多种抗氧化酶和小分子抗氧化剂的表达, 清除多余的活性氧, 从而达到体内氧化与抗氧化平衡, 使动物在冬眠期间能够有效抵御氧化应激带来的损伤。

但是, 动物不同的组织器官具有不同的氧化应激水平和抗氧化防御能力 (Venditti et al. 2014)。同是骨骼肌, 快缩肌与慢缩肌在线粒体产能、能量代谢方式以及对机体的作用等方面也存在差异, 那么不同类型的肌纤维 (快缩肌、慢缩肌、混合肌) 在整个冬眠阵中活性氧的生成和抗氧化防御策略是否不同? 另外, 有研究表明, 当细胞发生氧化应激时, 细胞内的 Ca^{2+} 会增多, 增多的 Ca^{2+} 又可以刺激线粒体呼吸链, 产生更多的活性氧 (Gorlach et al. 2015), 而我们课题组最近的研究发现, 冬眠期达乌尔黄鼠不同类型肌纤维的线粒体和内质网钙离子水平在同一时期表现出不同变化 (未发表数据)。这一结果提示, 活性氧可能会通过调节钙稳态的方式启动不同的抗氧化防御机制。

总之, 对冬眠动物氧化应激机制的深入研究是揭示动物对特殊生态环境适应机制的重要组成部分, 并有望为临床上自由基相关疾病的治疗与抗氧化损伤策略的制定提供理论依据和新的思路。

参 考 文 献

- Allan M E, Storey K B. 2012. Expression of NF-kappaB and downstream antioxidant genes in skeletal muscle of hibernating ground squirrels, *Spermophilus tridecemlineatus*. *Cell Biochemistry and Function*, 30(2): 166-174.
- Blagojevic D P. 2007. Antioxidant systems in supporting environmental and programmed adaptations to low temperatures.

- Cryo Letters, 28(3): 137–150.
- Boengler K, Hilfiker-Kleiner D, Drexler H, et al. 2008. The myocardial JAK/STAT pathway: from protection to failure. *Pharmacology & Therapeutics*, 120(2): 172–185.
- Buzadzic B, Blagojevic D, Korac B, et al. 1997. Seasonal variation in the antioxidant defense system of the brain of the ground squirrel (*Citellus citellus*) and response to low temperature compared with rat. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology & Endocrinology*, 117(2): 141–149.
- Buzadzic B, Spasic M B, Saicic Z S, et al. 1992. Seasonal dependence of the activity of antioxidant defence enzymes in the ground squirrel (*Citellus citellus*): the effect of cold. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 101(4): 547–551.
- Buzadzic B, Spasic M, Saicic Z S, et al. 1990. Antioxidant defenses in the ground squirrel *Citellus citellus*. 1. A comparison with the rat. *Free Radical Biology and Medicine*, 9(5): 401–406.
- Carey H V, Andrews M T, Martin S L. 2003. Mammalian hibernation: cellular and molecular responses to depressed metabolism and low temperature. *Physiological Reviews*, 83(4): 1153–1181.
- Carey H V, Frank C L, Seifert J P. 2000. Hibernation induces oxidative stress and activation of NF-kappaB in ground squirrel intestine. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*, 170(7): 551–559.
- Chainy G B, Paital B, Dandapat J. 2016. An overview of seasonal changes in oxidative stress and antioxidant defence parameters in some invertebrate and vertebrate species. *Scientifica*, 2016(6): 1–8.
- Chauhan V P, Tsiouris J A, Chauhan A, et al. 2002. Increased oxidative stress and decreased activities of Ca²⁺/Mg²⁺-ATPase and Na⁺/K⁺-ATPase in the red blood cells of the hibernating black bear. *Life Sciences*, 71(2): 153–161.
- Circu M L, Aw T Y. 2010. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radical Biology and Medicine*, 48(6): 749–762.
- Dickinson B C, Chang C J. 2011. Chemistry and biology of reactive oxygen species in signaling or stress responses. *Nature Chemical Biology*, 7(8): 504–511.
- Drew K L, Toien O, Rivera P M, et al. 2002. Role of the antioxidant ascorbate in hibernation and warming from hibernation. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 133(4): 483–492.
- Eddy S F, McNally J D, Storey K B. 2005. Up-regulation of a thioredoxin peroxidase-like protein, proliferation-associated gene, in hibernating bats. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 435(1): 103–111.
- Eddy S F, Storey K B. 2007. p38 MAPK regulation of transcription factor targets in muscle and heart of the hibernating bat, *Myotis lucifugus*. *Cell Biochemistry and Function*, 25(6): 759–765.
- Espinosa-Diez C, Miguel V, Mennerich D, et al. 2015. Antioxidant responses and cellular adjustments to oxidative stress. *Redox Biology*, 6: 183–197.
- Frank C L. 1992. The influence of dietary fatty acids on hibernation by golden-mantled ground squirrels (*Spermophilus lateralis*). *Physiological Zoology*, 65(5): 906–920.
- Fu W, Hu H, Dang K, et al. 2016. Remarkable preservation of Ca²⁺ homeostasis and inhibition of apoptosis contribute to anti-muscle atrophy effect in hibernating Daurian ground squirrels. *Science Report*, 6: 27020.
- Gorlach A, Bertram K, Hudecova S, et al. 2015. Calcium and ROS: A mutual interplay. *Redox Biology*, 6: 260–271.
- Gunstone F D. 1996. *Fatty Acid and Lipid Chemistry*. Maryland: Aspen Publishers, 173–179.
- Halliwell B C, Cross C E. 1994. Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress. *Environmental Health Perspectives*, 102(10): 5–12.
- Hermes-Lima M, Zenteno-Savin T. 2002. Animal response to drastic changes in oxygen availability and physiological oxidative stress. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & pharmacology*, 133(4): 537–556.
- Hofmann B, Hecht H J, Flohe L. 2002. Peroxiredoxins. *Biological Chemistry*, 383(3/4): 347–364.
- Jing X, Ren D, Wei X, et al. 2013. Eriodictyol-7-O- glucoside activates Nrf2 and protects against cerebral ischemic injury. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 273(3): 672–679.
- Kinningham K K, Cardozo Z A, Cook C, et al. 2008. All-trans-retinoic acid induces manganese superoxide dismutase in human neuroblastoma through NF-kappaB. *Free Radical Biology &*

- Medicine, 44(8): 1610–1616.
- Kohen R, Gati I. 2000. Skin low molecular weight antioxidants and their role in aging and in oxidative stress. *Toxicology*, 148(2/3): 149–157.
- Kohen R, Nyska A. 2002. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicologic Pathology*, 30(6): 620–650.
- Lambeth J D. 2004. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nature Reviews Immunology*, 4(3): 181–189.
- Lee M, Choi I, Park K. 2002. Activation of stress signaling molecules in bat brain during arousal from hibernation. *Journal of Neurochemistry*, 82(4): 867–873.
- Lin C C, Chiang L L, Lin C H, et al. 2007. Transforming growth factor-beta1 stimulates heme oxygenase-1 expression via the PI3K/Akt and NF-kappaB pathways in human lung epithelial cells. *European Journal of Pharmacology*, 560(2/3): 101–109.
- Logan S M, Tessier S N, Tye J, et al. 2016. Response of the JAK-STAT pathway to mammalian hibernation in 13-lined ground squirrel striated muscle. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 414(1/2): 115–127.
- Ma Y L, Zhu X, Rivera P M, et al. 2005. Absence of cellular stress in brain after hypoxia induced by arousal from hibernation in Arctic ground squirrels. *American Journal of Physiology: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 289(5): R1297–R1306.
- MacDonald J A, Storey K B. 2005. Mitogen-activated protein kinases and selected downstream targets display organ-specific responses in the hibernating ground squirrel. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 37(3): 679–691.
- McNamara M C, Riedesel M L. 1973. Memory and hibernation in *Citellus lateralis*. *Science*, 179(4068): 92–94.
- Morin P Jr, Ni Z, McMullen D C, et al. 2008. Expression of Nrf2 and its downstream gene targets in hibernating 13-lined ground squirrels, *Spermophilus tridecemlineatus*. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 312(1/2): 121–129.
- Morin P, Jr, Storey K B. 2007. Antioxidant defense in hibernation: cloning and expression of peroxiredoxins from hibernating ground squirrels, *Spermophilus tridecemlineatus*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 461(1): 59–65.
- Muleme H M., Walpole A C., Staples J F. 2006. Mitochondrial metabolism in hibernation: metabolic suppression, temperature effects, and substrate preferences. *Physiological and Biochemical Zoology*, 79(3): 474–483.
- Murphy M P. 2009. How mitochondria produce reactive oxygen species. *The Biochemical Journal*, 417(1): 1–13.
- Ni Z, Storey K B. 2010. Heme oxygenase expression and Nrf2 signaling during hibernation in ground squirrels. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 88(3): 379–387.
- Osborne P G, Hashimoto M. 2006. Brain antioxidant levels in hamsters during hibernation, arousal and cenothermia. *Behavioural Brain Research*, 168(2): 208–214.
- Pantano C, Reynaert N L, van der Vliet A, et al. 2006. Redox-sensitive kinases of the nuclear factor-kappaB signaling pathway. *Antioxidants & Redox Signaling*, 8(9/10): 1791–1806.
- Park E Y, Rho H M. 2002. The transcriptional activation of the human copper/zinc superoxide dismutase gene by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin through two different regulator sites, the antioxidant responsive element and xenobiotic responsive element. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 240(1/2): 47–55.
- Raha S, Robinson B H. 2000. Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing. *Trends in Biochemical Sciences*, 25(10): 502–508.
- Rouble A N, Tessier S N, Storey K B. 2014. Characterization of adipocyte stress response pathways during hibernation in thirteen-lined ground squirrels. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 393(1/2): 271–282.
- Ruczynski I, Siemers B M. 2011. Hibernation does not affect memory retention in bats. *Biology Letters*, 7(1): 153–155.
- Ruuge E K, Ledenev A N, Lakomkin V L, et al. 1991. Free radical metabolites in myocardium during ischemia and reperfusion. *American Journal of Physiology*, 261(Suppl 4): 81–86.
- Sanderson T H, Reynolds C A, Kumar R, et al. 2013. Molecular mechanisms of ischemia-reperfusion injury in brain: pivotal role of the mitochondrial membrane potential in reactive oxygen species generation. *Molecular Neurobiology*, 47(1): 9–23.
- Storey K B. 2010. Out cold: biochemical regulation of mammalian hibernation—a mini-review. *Gerontology*, 56(2): 220–230.
- Sykiotis G P, Habeos I G, Samuelson A V, et al. 2011. The role of the

- antioxidant and longevity-promoting Nrf2 pathway in metabolic regulation. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 14(1): 41–48.
- Toien O, Drew K L, Chao M L, et al. 2001. Ascorbate dynamics and oxygen consumption during arousal from hibernation in Arctic ground squirrels. *American Journal of Physiology: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 281(2): R572–R583.
- Tu B P, Weissman J S. 2002. The FAD- and O₂-dependent reaction cycle of Ero1-mediated oxidative protein folding in the endoplasmic reticulum. *Molecular Cell*, 10(5): 983–994.
- Turrens J F. 2003. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *The Journal of Physiology*, 552(Pt2): 335–344.
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, et al. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39(1): 44–84.
- Venditti P, Napolitano G, Barone D, et al. 2014. Vitamin E supplementation modifies adaptive responses to training in rat skeletal muscle. *Free Radical Research*, 48(10): 1179–1189.
- Wang X, Chen W R., Xing D. 2012. A pathway from JNK through decreased ERK and Akt activities for FOXO3a nuclear translocation in response to UV irradiation. *Journal of Cellular Physiology*, 227(3): 1168–1178.
- Wu C W, Storey K B. 2014. FoxO3a-mediated activation of stress responsive genes during early torpor in a mammalian hibernator. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 390(1–2): 185–195.
- Yin Q, Ge H, Liao C C, et al. 2016. Antioxidant defenses in the brains of bats during hibernation. *PLoS One*, 11(3): e0152135.
- Zhang K, Kaufman R J. 2008. From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response. *Nature*, 454(7203): 455–462.
- 葛勤敏, 边帆, 苏青. 2007. NADPH 氧化酶在氧化应激中的作用. *国际内分泌代谢杂志*, 27(6): 395–398, 402.
- 李昂, 邢雅琪, 李晓霞, 等. 2016. 氧化应激中 ROS 对 FOXO3a 转录因子的调控作用研究进展. *中国药理学通报*, 32(9): 1203–1207.
- 冉茂良, 高环, 尹杰, 等. 2013. 氧化应激与 DNA 损伤. *动物营养学报*, 25(10): 2238–2245.
- 王宁, 马惠萍, 漆欣筑, 等. 2015. Nrf2-ARE 信号通路在机体氧化应激损伤防护中的研究进展. *解放军医药杂志*, 27(12): 21–27.