

中国达乌尔黄鼠的夏季诱发冬眠 ——对有否冬眠触发物质的探讨*

蔡益鹏 金宗濂** 郑为民

(北京大学生物系生理教研室)

摘 要

用中国北方草原地区的季节性冬眠动物达乌尔黄鼠,经1981和1984两年的工作,重复了Dawe(1969)注射冷藏的冬眠动物血清,诱发夏季活跃黄鼠冬眠的原始实验。实验成功地实现了在非冬眠季节诱发达乌尔黄鼠冬眠,发现禁食在人工诱发冬眠中起重要作用,却不能证实血源性冬眠触发物(HIT)的存在。

自然冬眠是一种由动物内源性年周期节律所控制的生理活动。它的机制虽然至今未明,但是动物在冬眠前经历着长时期的准备性生理变化,预示着这个活动有复杂的体液调节参与。1969年Dawe实验室首次报道了注射冬眠的美洲多纹黄鼠全血,可诱发夏季活跃动物的冬眠。其后这个实验室陆续地完成了注射异种动物的冬眠血清,诱发美洲多纹黄鼠的冬眠。给妊娠母鼠注射冬眠血清,诱发仔鼠冬眠及注射出眠时动物的尿诱发美洲多纹黄鼠冬眠等一系列实验并提出存有血源性冬眠触发物(HIT)的假设。经过对冬眠血清的分析、检定,查明了HIT的某些理化特性。它可能是分子量为5000左右的与清蛋白相结合的一种活性物质(Oeltgen, 1978)。这一工作近年虽有深入,如(Oeltgen等, 1981、1982)在灵长类脑室注射HIT研究其对神经系统和代谢的作用。但是,血源性冬眠触发物诱发夏季冬眠的最基本的实验现象,尚未得到普遍的公认。许多实验室不能在自己的冬眠动物上得以复证,得不到清晰的有说服力的结果,因而在国际冬眠学界引起了激烈的论争。

综上所述,HIT的问题的提出虽已15年,目前仍处在探索阶段。影响实验重复的因素之一是非季节性冬眠动物,如金仓鼠不是适宜的实验对象;而季节性冬眠动物也可能有一定比数的动物,在非冬眠季节,在适当条件下冬眠。其次是如有些报告提出,可能HIT仅是多纹黄鼠所独有,即是种的特异性。

我们用我国北方草原地区的冬眠动物达乌尔黄鼠(*Citellus dauricus*)重复了Dawe的原始实验。试图探索HIT能否在该动物身上得以验证。1981年6月,曾用冬眠黄鼠的全血注射15只动物。由于实验开始稍晚,动物冬眠出现在8月份,与正常夏眠相混。无法作严格判断,因而1984年作重复实验。

• 工作过程中赵以炳教授提出了有益的意见,谨此致谢。
• • 现在北京大学分校生物系。

一、材料与方法

实验用达乌尔黄鼠由京郊延庆县康庄附近农村收购,在实验室单笼饲养。充分供应鼠用标准料块和圆白菜,不另给水。动物房温度和光照随自然季节和昼夜变化,严寒月份适当供暖,室温维持在 5°C 左右。经过冬眠的黄鼠3月底左右全部出眠。早春季节黄鼠采食积极,增重明显。经过一个余月的精心饲养,选择体重在200克左右健康的个体供实验用。

实验动物分3组:分别经隐静脉注射冷藏的冬眠黄鼠血清(H组10只动物);冷藏的活泼黄鼠血清(A组9只动物)和生理盐水(S组7只动物)。冬眠血清的制备按Dawe实验室原始工作的要求,于1984年2月初取自深眠的黄鼠。不用麻醉快速开胸,直刺心脏取血。取血手术在1分钟内完成。整个手术过程皆在零下的气温环境中进行。使用无菌手术器械经过 -2°C 条件下预冷。注射器先用肝素盐水处理防凝。取出后的血液随即注入灭菌的离心管,管内先放冷肝素盐水1C.C.。血液经冷冻离心15分钟(转速5,000周/分,温度 $0-2^{\circ}\text{C}$),分离血球,吸取血清放入安瓶中。 -40°C 低温冰箱保存。活泼黄鼠血清取自1984年4月从康庄购进的黄鼠,选择健壮者观察饲养2周。拉断颈髓,心脏取血。其余处理同冬眠血清。

血清注射于1984年5月7日在冷室内进行。冷藏的血清在 5°C 冷室内预融,注射器也经过预冷。每只动物注射上述经肝素盐水混合的血清2毫升(含纯血清1毫升)。注射后动物放在全日黑暗的, $5\pm 1^{\circ}\text{C}$ 的低温室饲养,无异常反应。

实验头4周饲以葵花籽、鼠料块和圆白菜,不给水。第5周开始逐渐减少精料,圆白菜供给量增加。至第45天全不给精料。每晚9点用半导体点温计(上海医用仪表厂7151-2型)测鼠蹊部皮肤温度(T_s)。检查食料消耗情况。对冬眠个体每日上午7时复查一次体温。每周称体重一次。7月11日结束实验。

二、结果

1. 在非冬眠季节,诱发了达乌尔黄鼠的夏季冬眠

实验历时65天,此期间在26只动物中有16只先后出现了冬眠。最早的一只(S39)潜伏期19天。最晚的(H20)潜伏期54天。冬眠最少的1阵(S6、S39、S17),最多的9阵(H18)。冬眠的总天数最多达22天(S9)。在出现冬眠的动物中,有一部分在经过少数冬眠阵后,出现持续的低体温状态,终至死亡。有9只动物自始至终未出现冬眠,限食后仍保持正常体温,全禁食后1—2周死亡。因此,整个实验动物的反应可分为三大类(图1):

第一类反应,动物在经历了40天左右的潜伏期(平均41.4天),即在开始限食后1—2周内,陆续进入冬眠。这些动物有和正常秋季入眠期相似的表现。普遍经过一个或几个试降的浅低温阵,逐渐进入深冬眠状态。冬眠总天数7—22天,平均14.5天,冬眠阵2—9阵,平均5阵。最低体温达到 5°C 或稍高于环境温度(表1)。

表1表明,H组、A组和S组都有正常冬眠的个体。H组和A组有相似的比数。冬眠的潜伏期和总天数都无显著差异。看不到冬眠血清有触发冬眠的作用。

第二类反应,动物在低温室中始终维持正常的体温(不低于 32°C)。在限食后无冬眠迹象,仍然维持正常体温。直到禁食(6月21日即第45天)后1—2周,陆续出现短期的临死

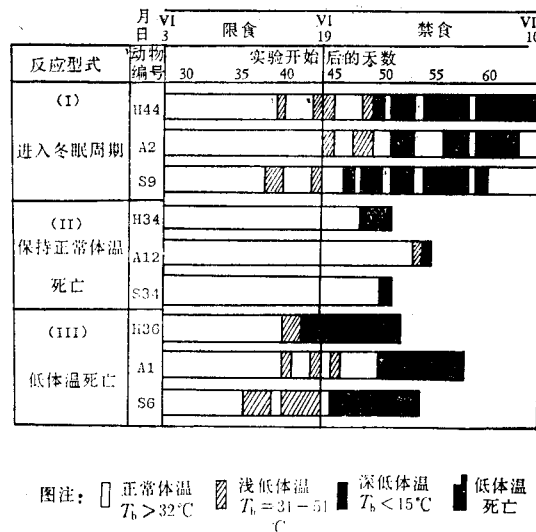


图 1 达乌尔黄鼠在非冬眠季节对低温-黑暗和限食处理的三种反应

Ffig. 1 Three kinds of responses in *Citellus dauricus* to restriction of food in dark-cold room in nonhibernation season

前低体温。以后死亡。如最早的 H34, 经过 3 天低体温。在第 51 天死亡。最晚的 H21, 经历 2 天低体温, 于第 64 天即实验结束前 1 天死亡。

这一类动物的反应说明一部分黄鼠并不轻易因低温、黑暗及限食乃至禁食而改变体温调节的型式。说明种系发生中形成的季节性, 在它们的生活年周期中难于动摇。因而在能源枯竭的寒冷环境中死亡。属于这一类动物在 H 组、A 组和 S 组各占 3 只, 也不反映冬眠血清的特殊作用。

第三种反应, 动物在限食开始后 1—2 周内即 40 天左右开始出现多次浅低体温冬眠阵。一旦体温下降至深冬眠水平, 即进入深低体温状态, 不再自动苏醒。连续维持 10—20 天深低体

温后死亡。如 H38 在 6 月 13 日和 16 日两次出现 31°C 浅低体温。到 6 月 18 日体温降到 7.4°C , 持续 10 天到 6 月 28 日死亡。值得注意的是这种低体温恒较环境温度稍高。因此这些动物的反应开始与第一种相似, 与限食的诱发作用有关。但它们的死亡则与第二种不相同, 即死亡与禁食无关。因为它们大多数在禁食以前即进入低体温麻痹状态。似乎表明了周期性醒觉的必要性。我们检查了最早出现这种持续低体温 H32 动物的状态。H32 在 5 月 18 日, 即实验开始

表 1 达乌尔黄鼠的诱发冬眠。动物在 5 月 7 日注射后移入 5°C 冷室第 5 周开始限食 (见图 1)Table 1 Induced hibernation of *Citellus dauricus* after transfusion and transfer to 5°C on May 7., food were restricted from 5th week

动物编号	首次冬眠日期	注射后的天数	冬眠阵数	冬眠总天数	最低体温 ($^\circ\text{C}$)
H44	6 月 15 日	39	6	19	5.4
H18	6 月 8 日	32	9	19	6.2
H20	7 月 1 日	54	2	7	6.4
H16	6 月 18 日	42	4	11	5
H23	6 月 18 日	42	4	13	5
A 2	6 月 20 日	44	5	14	7.2
A13	6 月 26 日	50	3	10	6
A27	6 月 16 日	40	6	14	5.4
A10	6 月 10 日	34	6	16	4.9
S 9	6 月 14 日	37	7	22	5
平均 $\bar{M} \pm \text{SD}$		41.4 $\pm$ 6.8	5.2 $\pm$ 2.0	14.5 $\pm$ 4.6	5.65 $\pm$ 0.77

的第12天(尚未限食)开始出现低体温,体温经常在7—8℃左右,很象是深冬眠,但始终无冬眠阵。于是5月20日从冷室取出,在室温(20℃左右)下被动复温后,有正常的进食活动。21日放回低温室,隔一日,体温又降至30℃。5月23日体温降至8℃,持续到6月1日,第二次取出,室温下饲养到6月10日,第三次放回低温室开始一直维持正常体温,6月22日体温下降至30℃,23日又降至6—8℃。一周后,于6月29日又从低温室取出复温,至今存活。属于这一类的动物H组2只,A组2只,S组3只,同样看不出组间差别(表2)。

表 2 三种反应型式在各组内的分布

Table 2 Responses observed in all the groups

反应型式	动物数及占本组的百分数						备 注				
	H (n=10)		A (n=9)		S (n=7)			1981 (n=15) ¹⁾	1985 (n=14) ²⁾		
I	5	50%	4	44%	1	14.3%	8	53%	5	36%	反应型式和实验分 组见图 I
II	3	30%	3	33%	3	42.9%	2	13%	6	43%	
III	2	20%	2	22%	3	42.9%	5	33%	3	21%	

1) 1981年实验在8月24日结束,已进入动物的自然夏季,2)1985年实验动物不作注射,单纯限食。

综上所述,低温、黑暗和限食能诱发部分动物出现夏季冬眠。部分未能诱发冬眠的动物,由于禁食,饥饿死亡。还有一些动物不能正常冬眠,进入持续的低温状态,最终死亡。三类动物中,注射冬眠动物血清,非冬眠动物血清和盐水都有,看不出冬眠动物血清中存在特异的冬眠触发物质的迹象。

2. 诱发冬眠的节能作用

在寒冷和食物短缺的条件下,上述三种反应的动物的体重变化说明冬眠具有重要的节能作用(表3)。正常冬眠动物和不冬眠动物在实验前的平均体重相似。前者 220.90 ± 9.83 克,

表 3 三种反应的动物体重变化

Table 3 Change of body weight in animals with different responses

反应型式	动物头数	实验前体重(克)	限食前体重为原体重的%	全禁食5天后体重为原体重的%	结束实验时的体重丧失%
I	10	220	132.1	106.3	8.1
II	9	213.5	121.4	87.3	31.2
III	7	173	129	91	12

后者 213.57 ± 5.78 克,差异不显著($p > 0.5$)。入冷室后的前4周,普遍都有明显的增重。在限食和禁食以后(第50天),前者虽然比限食前失重,但仍有原体重的106%,而后的体重已降到原体重的87.25%。在实验结束后即第65天,前者平均失重8.12%,而后者在第50—60天间死亡时平均失重31.2%。

出现深低温死亡反应的动物实验开始时的平均体重较前两种为低,在体温下降到深冬眠水平后,不能主动从深低温下复温。显示正常冬眠阵和维持高体温都是体温调节的正常表现。但是由于它们较长时期处于低体温状态,减少了能量消耗。因而经过相似的存活天数死亡时,体重失重的百分数仍比第二种反应的动物少得多。

三、讨 论

在这次实验中，我们尽可能地按 Dawe 实验室的要求条件处理冬眠血清和进行注射。在 5—7 月的初夏季节成功地诱发了达乌尔黄鼠的夏季冬眠，并且从冬眠的过程和深度足以证实与冬季自然冬眠无差异。但是我们却无法证实这是冬眠血清的特异的触发作用。有趣的是在我们成功地诱发了冬眠的实验中，冬眠的潜伏期大多在 35—45 天左右。这样比较整齐的诱发冬眠的动因可能与限食的作用有关，尽管这种估计仍需作进一步的实验来分析证实。刺猬在夏季人工诱发冬眠较容易。在低温条件下，大约仅需几天。而且禁食与否关系似乎也不大。可见种间差别是显著的。

Wang (1979) 选用已经充分肥育的地松鼠 (*Richardson sp.*) 重复 Dawe 的工作，未能实现诱发冬眠，得不到冬眠触发物存在的证据。我们使用肥育和限食相结合，实现了诱发冬眠，同样未能证实触发物质的存在。诚如 Lyman (1982) 指出的“难题可能正在于很难精确地检测到这种触发物质，因为虽然人们估计季节性冬眠的动物不会在夏季冬眠。如果在这时冬眠，必然意味着动摇了正常的年周期。事实上不论在季节性的或非季节性的冬眠动物中，个体差异是很大的”。我们的实验正是反映了这一点。因此，触发物存在与否的问题，至少用这样的实验是不能澄清的。

Wang (1978) 用遥测的方法研究地松鼠在野外的冬眠活动，得到最早的夏眠记录在 7 月 17 日。我们以前的工作，证实在实验室里达乌尔黄鼠 4—7 月上旬无 32℃ 以下的体温。说明在这季节黄鼠无自然冬眠或夏眠的迹象。

全面分析实验记录可以看出，在实验开始的 4 周，所有动物无一冬眠 (H32 的特殊情况前面已详述)。说明仅仅低温和黑暗的影响不能使达乌尔黄鼠在非冬眠季节诱发冬眠。从第二种反应的 9 只动物看，甚至 44 天的低温和黑暗也完全是无效的。而 16 天限食使全部 26 只动物中的 11 只 (占 42%) 出现 32—15℃ 之间的浅低体温阵，而禁食使 38% (10/26) 进入深冬眠，并使其余 62% (16/26) 的动物或迟或早地死亡，特别是在限食期间并未出现低体温的 9 只动物。可见，是限食和禁食促进了在低温和黑暗环境下的诱发冬眠。

1985 年 5—6 月份我们单纯研究禁食在非冬眠季节诱发冬眠中的作用，温度和光照条件与以前相同。14 只动物，在未禁食的 14 (或 35) 天期间体温全保持正常，在禁食后的 26 (或 14) 天内，5 只进入深冬眠阵而存活；3 只经长期低体温后死亡；6 只始终保持正常体温，其中 3 只在实验结束前死亡 (表 2) 验证了上述论断。

Pengelly 等 (1963) 指出出眠后已经连续活动 20—25 天后的动物，禁食不能再促使冬眠延长；剥夺食物只能使即将结束的冬眠期延长，而不能诱发冬眠。Wolff 等 (1978) 看到食物短缺和低温引起黄小囊鼠 (*Perognathus flavus*) 代谢率减低，动物失重和蛰眠时间增加。

Montoya 等 (1979) 用缺少蛋白质的食物诱发圆睡鼠 (*Eliomys quercinus*) 冬眠，多数动物在实验第 6 天进入第一次低温相。Walker 等 (1979) 在 7—8 月用剥夺食物诱发夏眠，潜伏期为 2、3、5 和 19 天。这些工作都提示了食物的产热作用和禁食引起产热改变而诱发冬眠。但是 Wolff 等研究的黄小囊鼠和 Montoya 研究的圆睡鼠都不是季节性冬眠动物；Walker 等人的工作是在动物夏眠的适当月份进行的。在非冬眠季节，诱发季节性冬眠动物

的冬眠未见报道。我们的实验表明,限制精饲料供应,诱发冬眠与动物自然冬眠的前兆基本相同。Montoya等(1979)认为停食,蛋白质缺乏导致中枢肾腺能神经元活动减少。交感紧张抑制,促进了低体温的发生。Wang(1981)指出:禁食使大鼠葡萄糖和脂肪代谢降低,使总产热和最大产热明显减少。至于冬眠前食欲的自发性变化原因是什么尚属未知。我们的实验提出了为什么部分个体在同样环境和饲养条件下未能诱发冬眠,可能是同一问题的两种表现形式。

参 考 文 献

- 赵以炳,叶甲壬 1955 刺猬冬眠的人工改变 I.在非冬眠季节用低温处理导致冬眠的出现。北京大学学报(自然科学)(1):127—134.
- Abbotts, B., L.C.H.Wang *et al.* 1979 Absence of evidence for a hibernation "trigger" in blood dialyate of Richardson's ground squirrel. *Cryobiol.* 16:179—183.
- Dawe, A.R. and W.A.Spurrier 1969 Hibernation induced in ground squirrels by blood transfusion *Science* 163:298—299.
- Dawe, A.R. and J.A.Armouy 1970 Summer hibernation induced by cryogenical preserved blood "Trigger". *Science* 168:497—498.
- Dawe, A.R. 1972 The blood borne "Trigger" for natural hibernation in the 13-lined ground squirrel and the woodchuck. *Cryobiol.* 9:163—172.
- Galster, W.A. 1978 Failure to initiate hibernation with blood from the hibernating arctic ground squirrel, *Citellus undulatus* and Eastern woodchuck, *Marmota monax*. *J. Therm. Biol.* 3:93.
- Lyman, C.P., J.S.Willis *et al.* 1982 In: "Hibernation and Torpor in Mammals and Birds" p.294—299. Academic Press.
- Montoya, R., L.Ambid *et al.* 1979 Torpor induced at any season by suppression of food proteins in a hibernator, the garden dormouse (*Eliomys Quercinus* L). *Comp. Biochem. Physiol.* 62A:371—376.
- Myers, R.D., P.R.Oeltgen *et al.* 1981 Hibernation "Trigger" injected in brain induces hypothermia and hypophagia in the monkey. *Brain Research Bulletin.* 7:691—695.
- Oeltgen, P.R., W.A.Spurrier *et al.* 1978 Chemical characterization of a hibernation inducing trigger(s) in the plasma of hibernating woodchucks and ground squirrels. *J. Therm. Biol.* 3:94.
- Pengelley, E.T. and K.C.Fisher 1963 The effect of temperature and photoperiod on the yearly hibernating behavior of captive golden-mantled ground squirrel (*Citellus lateralis*). *Can. J. Zool.* 41:1103—1120.
- Wolff, J.O. and G.C.Bateman 1978 Effects of food availability and ambient temperature on torpor cycles of *Perognathus flavus* (Heteromyidae). *J. Mamm.* 59(4):707—716.
- Walker, J.M., A. Garber *et al.* 1979 Sleep and estivation (shallow torpor): continuous processes of energy conservation. *Science*. 204.8 June.
- Wang, L.C.H. 1978 Energetic and field aspects of mammalian torpor, The Richardson's ground squirrel. In: "Strategies in cold: Natural torpidity and thermogenesis". p. 119—145.
- 1981 Effect of fasting on maximum thermogenesis in temperature-acclimated rats. *Int. J. Biometeor.* 25(3):235—241.

INDUCED SUMMER HIBERNATION IN A CHINESE SEASONAL HIBERNATOR *CITELLUS DAURICUS*—DETECTION FOR THE EXISTENCE OF BLOOD BORNE HIBERNATION INDUCTION TRIGGER

Cai Yipeng Jin Zonglian Zheng Weiming

(Department of Biology, Peking University, Beijing)

In an attempt to confirm Dawe-Spurrier's original report of blood borne hibernation induction trigger (HIT), an experiment was designed on a Chinese seasonal hibernator, *Citellus dauricus*.

26 animals were divided into 3 groups for transfusion: group H (10 squirrels), was transfused with preserved sera from deeply hibernating animals in winter; group A (9 squirrels), with preserved sera from active animals in spring; and group S (7 squirrels), with 0.9% saline. After transfusions, the animals were kept in individual cages and transferred to cold dark room at 5 °C between May 7 and July 10. Rat chow, sun-flower seeds and fresh cabbage were supplied and daily records of each animal's Tb and state of activities were kept. At the beginning of 5th week, supplies of seeds and chow were reduced gradually and the animals were completely fasted after the 45th day.

As a result, three kinds of responses occurred in animals of all the three groups. 10 animals (5H, 4A, 1S) entered hibernation cycles after 2 weeks of restriction of food, 9 animals (3H, 3A, 3S) remained euthermic for 1—2 weeks following the complete fast and died, and 7 animals (2H, 2A, 3S) became deep hypothermic but never aroused spontaneously and died 10—20 days later. It is interesting to note that the number of animals that show normal hibernation bouts are approximately the same in the test group H (5 out of 10) and control group A (4 out of 9).

Preliminary conclusions drawn from the experiment were: 1) Summer hibernation was successfully induced by restriction of food in dark cold room in a seasonal hibernator, *Citellus dauricus*. 2) Seasonal hibernating species has its own pattern of circannual rhythm of body temperature, not all of the individuals may be induced into hibernation in nonhibernating season. 3) The data provided no satisfactory evidence for the existence of HIT.