# 衰老与昼夜节律相互作用的探究:从果蝇到人类

# 摘要

衰老是由各种因素综合作用产生的必然会发生、且依赖于时间的老化过程,这个过程会引起生物体结构与功能的渐近性衰退。然而,衰老的速度具有可塑性,许多因素会改变生物体衰老的进程。其中,昼夜节律钟驱动着生物体从基因到行为的不同层次的周期性活动,对于它是如何与衰老过程相互作用的这一问题引起了广泛的研究与关注。在这次汇报中,我们首先介绍了利用果蝇作为模式生物研究衰老的原因及优势,以及衰老引起果蝇生理和行为节律特别是昼夜节律变化的研究;其次,介绍了衰老与昼夜节律相互作用的可能机制;最后,虽然衰老是不可避免的,但是延缓衰老却是可能的,我们介绍了强化或加强昼夜节律系统减缓衰老相关症状的研究。通过我们的介绍,一方面希望可以加强人们对于昼夜节律与衰老相互作用的认识,对日常的生活能够有所帮助;另一方面,希望果蝇衰老相关的研究可以进一步拓展研究人员对于果蝇昼夜节律等行为的时间尺度上的认知。

# 关键词

黑腹果蝇;衰老;昼夜节律;活性氧;PDF;限时进食;遗传操纵

# 1 衰老改变了果蝇的生理和行为节律

从生物学上讲, 衰老是随着时间推移自发的、且必然会发生的一个过程。生理学上, 往往把衰老看作是从受精卵开始一直进行到老年的个体发育史;病理性衰老是指由各种外来因素包括各种疾病所导致的老年性变化, 两者其实很难区分。总之, 衰老是由各种因素综合作用所产生的必然会发生、并且依赖于时间的一个老化的过程。

伴随衰老的是一系列与年龄有关的功能衰退或疾病,对人们的生活带来了不利的影响。 然而,衰老的速度确是相当可塑的,因此,科研工作者着力于探究衰老相关的机制,希望能够预防或者延缓甚至是逆转与衰老相关的疾病、损伤等。

## 1.1 果蝇作为衰老相关研究的理想模型

到目前为止,我们已经有很多的模式动物可以让我们进行生物学相关研究,而对于衰老相关的研究,综合来讲,果蝇无疑是一个理想的研究模型。果蝇作为研究衰老理想模型的主要原因有以下几点:

- (1) 研究衰老,首先要考虑的就是时间问题,因为衰老过程是"time-dependent",一般来说果蝇的寿命大约是80-100天,从羽化后开始算大约是60-80天(取决于品种和发育条件),再加上果蝇在10多天内就能产生大量的后代,使其成为了研究衰老的理想模型。而像猴子这样的模式动物,较高的时间、经济成本带来的问题就是,难以进行子代的筛选以及样本量太少难以达到群体研究测量的标准;
- (2) 另外,尽管果蝇和哺乳动物在解剖结构和行为复杂性水平上存在明显差异,但行为和生理相关的分子、细胞机制等却相当保守,果蝇和人类保留了 60%以上的同源基因,包括一些与衰老、疾病相关的基因,这使得我们可以利用果蝇相关研究来理解哺乳动物以及人类衰老、疾病相关的机制;
- (3) 在果蝇身上可用的遗传工具可以利用基因表达的时空调控,分析与衰老相关的组织相互作用,以及影响寿命的外界因素和行为互作;
- (4) 最后,也是果蝇作为衰老研究理想模型的十分重要的一点:与衰老相关的行为和生理变化在果蝇和哺乳动物之间是相似的。与人类相似,果蝇表现出与年龄相关的行为表现衰退,从运动技能到学习记忆,衰老也会引起果蝇感觉系统以及心脏等器官的年龄相关的变化,重要的是,衰老还影响了果蝇昼夜节律系统的功能。

基于以上一些原因, 研究人员越来越重视使用果蝇这种相对简单的模型系统来研究系统级的交互作用。

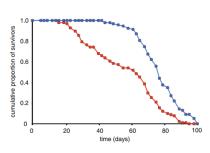
### 1.2 利用果蝇进行衰老研究的方法

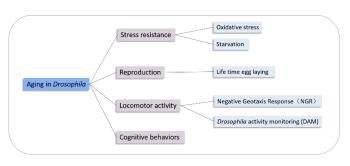
研究人员利用果蝇进行衰老研究的方法可以主要分为两类:直接方法和间接方法。寿命测量是进行果蝇寿命研究的最基本、最直接的方法<sup>[1]</sup>。从图 1(A)life span 测量的例子中可以看到,蓝色表示一个健康果蝇群体的生存特征,在第 60 天之前,死亡的果蝇数目相对较少,而 60 天之后,死亡数迅速增加。相比之下,红线所示的果蝇群体从第 20 天开始就有大量死亡,这里许多果蝇在年轻或中年时死亡,而不是主要在老年时死亡的。这种情况可能是由于外界条件因素或遗传背景导致的。遗传背景和环境因素是影响果蝇衰老的关键因素,也是进行 life span 测定时必须要考虑的因素。在果蝇中,很多遗传方法可以产生突变或者操纵基因表达,这些方法使得实验果蝇有着丰富的遗传背景,所以要选择适当的 control 品系进行 life span 的测量。另外,饮食是影响果蝇寿命的主要环境因素,因此,寿命测量过程中要统一和规范饮食。

除了 life span 测定这种直接方法, 还有一些策略来检测衰老的生理或行为表征。这里在

图 1 (B) 中作以简单的总结<sup>[2]</sup>。一种常用的生理测试是测量果蝇对各种应激源的抗性,比如氧化应激和饥饿。寿命和应激反应往往密切相关,长寿的果蝇往往更能抵抗应激。通过给果蝇喂食特殊的物质可以测量其氧化应激抗性;抗饥饿能力也能评估果蝇应对能量短缺的能力,这也会影响存活率。第二种生理测试是测量果蝇一生中的产卵量,这主要是因为生殖产出和生存率存在负相关的关系。

在果蝇衰老研究中,有两种主要用来评估果蝇运动行为的方法,一种是负趋地性试验,另一个是果蝇活动监测系统,每当果蝇打破穿过仪器中间的活动光束时就被记录下来,通过活动事件的频率来测量果蝇的运动。另外,还有一些高级认知行为比如学习记忆等来研究果蝇的衰老。





- A. Examples of good and poor quality survival data
- By Basic assays to assess lifespan, age-related changes in physiological and behavioral function in Drosophila

图 1、利用果蝇进行衰老研究的方法 (Ref.1)

### 1.3 衰老引起果蝇中与哺乳动物类似的生理和行为节律的改变

与人类相似,果蝇表现出与年龄相关的组织器官和行为表型衰退,从运动技能到学习记忆。在这部分中,将主要介绍一些与年龄相关的表型变化,一方面了解利用果蝇进行衰老相关研究的方法思路与成果,另一方面进一步理解从果蝇到哺乳动物和人类衰老过程中的等效性或者保守性。

### 1.3.1 衰老引起肌肉组织和运动能力的下降

人类和其他哺乳动物衰老的一个显著特征就是骨骼肌的逐渐减少以及运动能力的下降,这些在果蝇中得到了广泛的研究。哺乳动物的肌肉在衰老过程中表现出细胞水平的改变,包括肌节纤维的退化、溶酶体脂褐素沉积以及降解能力的下降,核膜完整性丧失,还有线粒体形态的异常,这些在哺乳动物肌纤维中检测到的形态学变化也出现在衰老的果蝇中。研究人员利用相应的抗体或染料分别对1周龄和8周龄果蝇的肌动蛋白(是肌节的组成成分)、多聚泛素蛋白聚集体以及线粒体进行染色发现,果蝇在衰老过程中表现出广泛的蛋白质损伤和细胞器功能障碍。具体体现为纤维的萎缩、溶酶体的数量和功能下降,导致多泛素蛋白聚集体的积累,另外,线粒体在肌原纤维的分布发生改变,有的区域聚集,有的区域缺失,电镜图也显示出线粒体内部形态的异常,而这些异常通常在年轻果蝇中是没有的<sup>③</sup>。

研究表明<sup>[4,5]</sup>,随着果蝇步入中年或老年,负趋地性运动反应下降,反应了与年龄相关的运动功能的变化,这在很大程度上与果蝇的肌肉随着年龄的增长而退化有关。果蝇负趋地性反应是一种常见的行为,它涉及到应对机械刺激的先天逃避反应。结果显示,4周大的果蝇爬升能力急剧下降,大约只有一开始的一半左右,而随着年龄增长,这一差异会更加明显。以上结果均提示随着年龄增长,果蝇出现了肌肉组织和运动能力的衰退。

### 1.3.2 衰老引起感觉系统(嗅觉)的功能弱化

除了肌肉组织和运动能力的衰退,衰老还会引起果蝇感觉系统的功能弱化,主要是嗅觉。

研究人员通过气味回避实验揭示了果蝇依赖于年龄的嗅觉系统功能的下降[67]。嗅觉能力的下 降也可以在中年雄性中观察到,这影响了其在夜间的求偶活动<sup>⑤</sup>。研究发现,衰老会引起细 胞自噬功能减弱从而引起果蝇神经系统中蛋白聚集体的异常积累, 进而影响行为或表型, 而 Atg8a 是自噬相关基因,在神经组织中转基因过表达该基因可以增强自噬功能,从而挽回部 分衰老果蝇中出现的表型或行为。结果发现, 4 周龄大的 group 饲养的雄性果蝇会在黑暗条 件下进行较为频繁的求偶活动, 这些夜间求偶行为在同样年龄的自噬增强突变果蝇中就不存 在。分别对1周龄、4周龄野生型雄蝇以及4周龄自噬增强突变体雄蝇在光照和黑暗条件下 的平均求偶次数进行统计, 可以发现, 在光照条件下, 3 组雄蝇的求偶水平都比较低, 然而, 在黑暗条件下, 4 周龄 group 饲养的雄蝇表现出大量的求偶行为。这种夜间求偶行为在 1 周 龄的年轻雄蝇和 4 周龄的自噬增强突变体果蝇中被显著抑制或缺失。我们都知道,雄性果蝇 选择求偶对象的能力是由视觉、嗅觉、触觉等所决定的, 前人的研究发现中年果蝇也就是4 周龄大的果蝇保持了视觉信息出处理的能力,因此,其在黑暗条件下的过度活跃特征很可能 是它的另一种感觉系统--嗅觉的退化造成的。研究人员从果蝇头部提取 RNA,发现 4 周龄 野生型雄蝇嗅觉相关蛋白基因的表达显著减少,而 1 周龄的野生型和突变体以及 4 周龄突 变体果蝇这些基因的表达是相对正常的。以上的结果提示,中年雄性果蝇的嗅觉受损,这可 能导致了其在黑暗条件下求偶行为的失调,这一现象在自噬增强突变体果蝇有所挽回,提示 衰老可能通过引起自噬能力的下降从而导致行为的异常。

果蝇嗅觉系统的年龄依赖性变化既发生在分子水平上,如上述介绍的许多嗅觉通路成分的 mRNA 表达显著下降;也发生在结构水平上,衰老诱导嗅觉回路神经元的结构发生变化 以其中,PN 投射神经元对氧化应激和活性氧的脆弱性可能是果蝇嗅觉系统衰老的原因之一。PN 投射神经元功能的下降导致果蝇对气味的敏感度大大降低,从而减少了相应的行为反应。

### 1.3.3 衰老引起学习和记忆能力的衰退

除了以上对于果蝇生理上的改变,衰老还会影响复杂行为比如学习记忆和睡眠节律等。衰老对学习记忆有着广泛的影响。嗅觉条件反射(图 2A)常被用来定义与年龄相关的学习和记忆能力的衰退<sup>®</sup>。研究人员同时将果蝇暴露于气味 A 和电击下,然后在没有电击的情况下暴露于另一种气味 B,果蝇会学会避开气味 A。而如果在没有电击的情况下,将果蝇不断暴露于气味 A 会损害之前形成的条件下厌恶嗅觉记忆,引起记忆消退,对照组是不断暴露于空气,所以很少引起记忆的消退。统计结果表明(图 2B),随着记忆消退周期数 cycle 的增加,实验组偏好指数逐渐下降,当 cycle 数大于 4 时,实验组和对照组的差异也就是二者的差值越来越大,代表有效的记忆消退。为了进一步检查衰老对记忆消退的影响,研究人员对不同年龄的果蝇进行了实验(图 2C),记忆消退周期数 cycle 被固定为 4,结果发现,20日、30 日、和 50 日龄果蝇的记忆消退率在统计学上高于幼龄果蝇,这些结果表明,衰老果蝇的记忆消退比年轻果蝇更严重。另外,研究人员还发现(图 2D),幼龄果蝇中的记忆消退或者说减少可以在 3 小时候自发恢复,而年老的果蝇中没有观察到这种记忆恢复,这表明老年果蝇的记忆缺陷更为严重。以上这些结果提示,衰老加速果蝇的记忆消退,损害记忆的恢复。

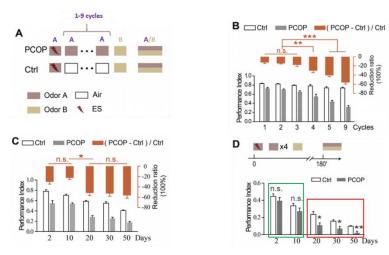


图 2、, 衰老加速果蝇的记忆消退, 损害记忆的恢复 (Ref.8)

这些由衰老导致的记忆损伤可以在神经元结构层面上被进一步地阐明(图 3)<sup>[9]</sup>。研究人员发现,衰老特异性地改变了 DPM 和 Mushroom body 神经元在 $\alpha$ 端的连接(接触)。利用 GRASP 的方法可以量化神经元之间接触的相对数量,具体的做法是,在 247lexA 的 Mushroom body 神经元中表达 lexAop split GFP11 亚基,在 C316-Gal4 的 DPM 神经元中表达 UAS split GFP1-10 亚基,如果这两种神经元足够接近,两种 GFP 亚基会形成功能性的 GFP,GFP 信号便可以被检测到。结果发现,10 日龄和 30 日龄果蝇的 GRASP 信号在整个 Mushroom body 中非常密集,而通过进一步对 $\alpha$ 、 $\alpha$  '以及 $\beta$ 、 $\beta$  '、 $\gamma$ 中区域的信号进行量化发现,与 10 日龄相比,30 日龄果蝇 $\alpha$ 区域中 DPM 和 Mushroom body 神经元的接触或者说连接减少,重要的是,这种减少是特异性的,只发生在 $\alpha$ 端区域,而不发生在 $\alpha$  '以及 $\beta$ 、 $\beta$  '、 $\gamma$ 中的区域。因此,研究人员认为,嗅觉相关长期记忆的形成需要 DPM 神经元正常的突触传递,以及 DPM 神经元与位于 Mushroom body  $\alpha$ 端神经元(轴突)的突触接触,而在衰老果蝇中,DPM 神经元与 Mushroom body  $\alpha$ 端神经元的这种突触接触丢失,导致相应的记忆痕迹无法正常形成,引起记忆的受损。

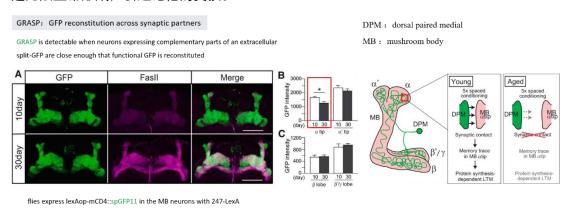


图 3、衰老特异性地改变了 DPM 和 Mushroom body 神经元在α端的连接(Ref.9)

#### 1.3.4 衰老引起睡眠稳态的改变

flies express uas-mCD4::spGFP1-10 in the DPM neurons with c316-gal4

研究发现, 衰老对睡眠无论是从质量还是数量上都有着不同程度的影响, 对睡眠稳态的调节也体现出年龄依赖性。通过对不同年龄的果蝇进行睡眠监测, 发现, 随着年龄增长, 果蝇的总睡眠时间显著减少, 睡眠碎片化程度增加。具体表现为, 在黑暗条件下, 平均睡眠次数显著增加, 每一段睡眠的平均时间显著减少<sup>[10]</sup>。所以, 随着年龄增长, 果蝇总睡眠时间减

# 2 衰老与昼夜节律相互作用机制的研究

保持正常的睡眠对于人们维持健康状态和投入正常生活尤为重要,长期的睡眠不足会带来很多负面影响,包括精神不振,脾气变差,难以集中注意力,记忆问题,出现幻觉等等,严重睡眠不足甚至可能会危及生命。睡眠问题越来越成为人们所关注的重要健康问题,老年人普遍出现的睡眠数量和质量的下降,以及年轻人各种原因引起的睡眠缺乏导致的衰老相关症状的提早出现,让我们感兴趣于衰老与睡眠或者说昼夜节律系统的相互作用。

生物钟是细胞自主的分子反馈循环,在基因表达、细胞功能、生理过程和行为中产生每日节律。在年轻的黑腹果蝇中,昼夜节律钟的机制已经被很好地了解,但在机体衰老过程中昼夜节律系统是如何变化的却知之甚少。从果蝇到人类,随着年龄的增长(图 4),其行为节律逐渐发生改变,昼夜节律基因的表达阶段及水平会发生异常,神经回路活动减少以及产生睡眠片段化等。昼夜节律性随着年龄的增长而减弱,昼夜节律性功能障碍加剧了与年龄有关的疾病等等[11]。在这部分,我们重点介绍了以果蝇为模式动物的研究,这些研究有助于我们理解昼夜节律系统与衰老之间的相互作用,包括衰老是如何削弱昼夜节律系统的,以及昼夜节律功能障碍是如何导致衰老病理的。

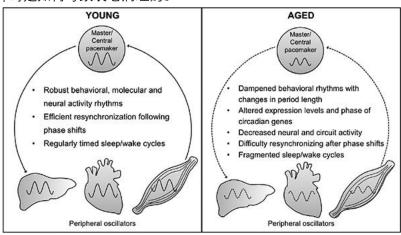


图 4、衰老与昼夜节律(Ref.11)

### 2.1 睡眠不足可以通过肠道内活性氧的积累导致死亡

研究人员以果蝇为研究对象,说明了严重睡眠不足会在肠道累积活性氧引发肠道氧化应激,进而导致果蝇死亡[12]。这项最新的研究(图 5),为改善睡眠不足带来的健康问题提供了新的思路,也有助于我们进一步理解衰老与昼夜节律的关系。

通过在果蝇体内表达抑制睡眠的热敏蛋白,可以在一定的温度下对果蝇进行睡眠剥夺。研究人员首先证明了在 29°C、热激条件下,睡眠剥夺的果蝇出现了显著的睡眠时间减少。那么果蝇在这种生理状态下的寿命发生了怎样的改变呢?结果发现,果蝇在这种生理状态下生存率及生存天数都显著下降,且睡眠时长和生存时间呈正相关的关系,说明当严重睡眠不足时会加速果蝇的死亡。随后,研究人员在 29°C、热激 10 天的前提下重新放回低温,果蝇的生存率和睡眠觉醒周期均回复到正常水平,说明这种睡眠剥夺引发的提前死亡是可逆的。

实验组果蝇死亡率在睡眠不足的第 10 天左右增加,为了进一步探究睡眠剥夺给果蝇造成了怎样的影响, 研究人员在睡眠剥夺第十天解剖观察了实验组和对照组果蝇的各个组织和器官, 发现睡眠不足的果蝇和对照组果蝇相比, 包括大脑在内的大部分身体组织都没有明显的区别, 而通过活性氧荧光探针 DHE 检测到在肠道有活性氧的大量荧光信号。同时活性氧

荧光探针也在肠道有很高的密度。随后对肠道特写发现,荧光主要集中在中肠的部位。如果将 ROS 累积果蝇放回 21°挽回,随着时间的延长,果蝇肠道 ROS 累积会逐渐消失,探针密度也随着挽回时间逐渐减小。ROS 可以通过氧化破坏细胞大分子,缺乏睡眠的果蝇的肠道显示出广泛的氧化应激证据,研究人员通过检测睡眠剥夺十天后细胞损伤及凋亡信号,发现这些标志信号都显著上升,意味着在睡眠剥夺果蝇的肠道发生了氧化应激。

以上的结果揭示了睡眠剥夺、ROS 积累以及过早死亡之间的相关性。为了检验因果关系,作者想要探究清除 ROS 是否可以延长生存时间而不增加睡眠本身。通过添加食品补充剂,作者测试了 53 种已知具有抗氧化特性的化合物,确定了 11 种化合物,可以作为食品补充剂有效延长睡眠不足的果蝇的寿命,使其恢复到、或接近正常水平。结果发现喂食其中三种化合物的果蝇的生存曲线变高,肠道内的 ROS 信号被清除,但该化合物并不会挽回果蝇的睡眠时间。

以上结果提示,睡眠剥夺会使得活性氧在肠道内累积,并且引发肠道细胞的氧化应激,通过喂食或者过表达抗氧化物的方式,清除活性氧的累积,可以在不影响失眠的前提下延长果蝇的寿命。

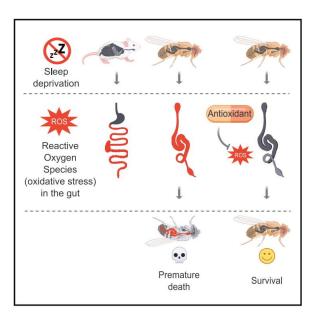


图 5、睡眠不足可以通过肠道内活性氧的积累导致死亡(Ref.11)

## 2.2 衰老与昼夜节律系统的相互作用

### 2.2.1 衰老在不同层面上削弱昼夜节律系统的功能

果蝇的运动活动节律可以作为中央脑节律钟的评估标准。研究发现<sup>[13]</sup>,中老年果蝇的活动变得分散,节律强度显著下降。行为节律强度的下降促使研究人员探究时钟基因的分子循环是否会在衰老过程中发生改变,结果发现,两个核心时钟基因 *per* 和 *tim* 的表达有所降低,这表明,昼夜节律钟相关基因的表达随着衰老过程发生了改变。

除了分子层面,研究人员还在神经元层面上探究了衰老是如何昼夜削弱节律的。在果蝇的大脑中分布着一些时钟神经元,其被认为在驱动果蝇的节律性行为中发挥着重要作用。这些神经元可以被分为两类,Morning cell 被认为是早上活动高峰期所必需的,而 Evening cell 是晚上活动高峰期所必需的<sup>[14]</sup>。在果蝇中,PDF 是连接 M-cells 和 E-cells 的主要神经递质,并且为整个大脑的许多神经元提供昼夜节律输出的机制。光直接或仅通过视觉系统或其他时钟神经元直接或间接激活 M-cells,并诱导 PDF 分泌,PDF 然后作用于下游的 E-cells,以通过不依赖 CRY 和 CUL-3 的途径促进细胞质 TIM 降解,从而引起相位或周期调节<sup>[15]</sup>。果蝇昼

夜节律活动节律的年龄依赖性变化正是与老年果蝇的 PDF 信号减少相关,提示昼夜节律神经回路减弱或者其与下游目标神经元的沟通减弱<sup>[16]</sup>。研究人员进一步发现,与年龄相关的 PDF 减少引起果蝇的节律变化<sup>[16]</sup>。

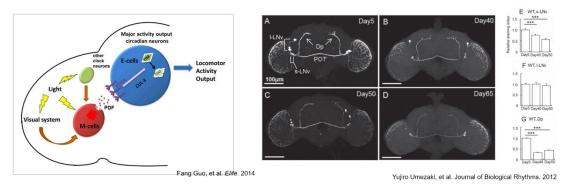


图 6、PDF 信号以年龄依赖的方式降低(Ref.15,16)

除了上述神经元外,神经胶质细胞还具有昼夜节律性振荡器<sup>[17]</sup>。衰老可以调节昼夜节律系统的一种机制是通过改变神经胶质细胞或神经胶质细胞亚群中时钟基因表达的节律。研究人员探究了大脑中不同类型的胶质细胞中 per 蛋白的表达量, 结果发现多数的胶质细胞中的per 都会随着年龄的变化而改变,但并不是所有类型的胶质细胞都有这种表型<sup>[18]</sup>。

## 2.2.2 昼夜节律功能障碍导致衰老病理

研究表明, 昼夜节律失同步或心律失常会加速衰老。由于智能手机和个人电子产品的普 及, 导致夜间人造光照射的增加, 削弱了人们生活中昼夜节律的稳定性。越来越多的人群由 于压力等原因引起昼夜节律失常而产生了不同程度的衰老相关病理症状,因此,了解昼夜节 律障碍或失同步对衰老过程的影响是很重要的。对仓鼠的研究表明[11] 由光-暗周期和自由 奔跑周期之间的不匹配导致的昼夜节律紊乱会导致严重的心脏病理和肾脏疾病。在动物模型 中,利用光-暗周期的相位变化来模拟急性和慢性时差反应的实验范式通常被用于研究昼夜 节律失同步。对果蝇的研究利用一种慢性时差模型阐释了昼夜节律失同步与年龄相关损伤的 相互作用[11], 在这种模型中, 具有 16 小时短昼夜节律周期的果蝇饲养在 24 小时周期 (12:12 LD 周期)。在这些条件下,与心律失常的 per01 果蝇和野生型 CS 果蝇相比,持续经历相移 的短周期果蝇表现出与年龄相关的运动障碍加速下降,寿命也缩短。然而,当短周期突变体 果蝇被安置在 16 小时周期 (8:8 LD) 中时, 与年龄相关的运动功能下降的增加率得到缓解, 而野生型果蝇在与年龄相关的运动功能下降中表现出更大的下降率, 这表明恒定的相移和昼 夜节律失同步加速了与年龄相关运动功能下降的表型。在对人类相关的统计研究中[11],更长 的时间参与倒班工作会增加对健康产生不利影响的程度,以及增加认知障碍和记忆能力等 等。以上这些研究均提示我们昼夜节律障碍或失同步会加速衰老,导致衰老相关病理症状的 产生。

# 3 强化或加强昼夜节律系统减轻衰老相关症状的研究

昼夜节律系统功能紊乱会加速衰老,而衰老又会削弱昼夜节律功能,因此,一方面,昼夜节律与衰老相互作用的结果会加重由年龄引起的疾病;另一方面,两者相互作用也提示我们加强昼夜节律可能会减轻与年龄相关的衰退和病理。事实上,从果蝇到人类,已经有一些有趣的研究表明,通过一些干预手段或是进食、活动等的改变来强化生物钟,可以在衰老过程中为健康带来益处。

## 3.1 利用限时饮食干预昼夜节律来缓解年龄相关的衰退

昼夜节律系统和新陈代谢是紧密联系在一起的,新陈代谢和寿命之间的联系也是如此。研究发现<sup>[21]</sup>,当果蝇停止在夜晚进食的时候,它们的睡眠得到改善、心脏衰老减缓。限时喂养模式中,食物供应限制在每天白天 12 小时,与果蝇的活动同步,这加强了昼夜节律振荡器的协调与同步。对 35 日龄的中年果蝇进行 7 天的限时喂食,改善了睡眠-觉醒活动周期。当中年果蝇被限时喂食两周后,与年龄匹配的对照组相比,其与年龄相关的心脏功能下降显著减弱。这些研究表明,限制时间进食的昼夜节律强化可能是一个可行的选择,以减轻与年龄相关的昼夜节律功能的下降。除此之外,研究人员还解析了其中具体的分子机制,通过分析编码生物钟的基因元件,发现 TCP-1 环状复合物伴侣,以及线粒体电子传递链复合物是这一过程中的主要监控调控元件。这些研究强调了饮食节律对于健康的重要性。

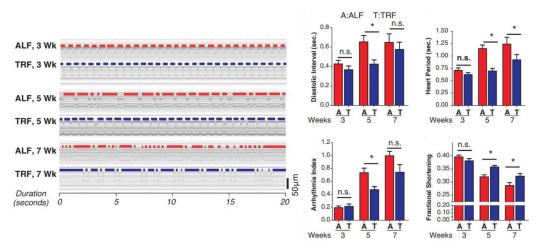


图 7、限时喂食后,与年龄相关的心脏功能下降显著减弱 (Ref.21)

### 3.2 利用昼夜节律钟相关基因遗传操纵的方法来缓解年龄相关的衰退

在果蝇中,一些研究分析了核心时钟基因过表达对长寿和衰老相关病理的影响。研究人员发现,这些基因在全身的过表达显著延长了寿命(图 8)。通过组织特异性基因表达方法,研究人员发现单个组织过表达 tim 增加的寿命并没有达到整个组织过表达 tim 所达到的程度,这表明衰老和长寿受到多个外周振荡的整合影响<sup>[23]</sup>。通过在老龄果蝇的中央和外围时钟细胞中过度表达 cry 来强化昼夜节律振荡器,导致 per, tim, Pdp1e 和 vri mRNA 的昼夜节律振荡器,这与在年轻果蝇中观察到的类似。除了加强分子振荡器,在老年果蝇的中央和外围振荡器中 cry 的过表达抑制了与年龄相关的运动活动表型,并降低了与年龄相关的氧化应激的脆弱性。有趣的是,仅仅在中央脑振荡器中过度表达 cry 并不足以挽救年龄依赖性的运动缺陷或年龄诱导的氧化应激易感性。这些来自果蝇的研究强调了外周振荡器在抵御年龄诱发的疾病方面的关键作用。另外,增强特定昼夜节律神经元群输出信号活性的遗传策略也被用于对抗年龄引起的衰退<sup>[11]</sup>。

| Genetic rescue of circadian function |  |  |  |                          |
|--------------------------------------|--|--|--|--------------------------|
| Gene                                 | Problem  | Manipulation   | Outcome  | Reference                |
| cry                                  | Reduced cry mRNA expression and<br>protein levels with aging | Overexpression of cry in all clock cells in the body | Increased resistance to oxidative stress.  Increased rhythmicity and life span     | Rakshit et al.<br>(2013) |
| tim                                  | Age-related problems with metabolism                         | Overexpression of <i>tim</i> in peripheral tissues   | Increased life span, metabolism and resistance to pathogens on a protein rich diet | Katewa et al.<br>(2016)  |

图 8、昼夜节律钟相关基因的遗传操纵缓解年龄相关的衰退(Ref.12)

# 4 结语

果蝇作为一个理想的研究模型,对于我们理解昼夜节律系统和衰老之间的双向相互作用提供了诸多益处。目前,尽管对于衰老和昼夜节律系统相互作用的研究已经有了不同层面的研究,然而,还需要更多的研究来阐释衰老对于个体组织中时钟基因的分子节律的精确影响,以识别潜在操纵的分子和节点。另外,关于昼夜节律性衰退如何促进细胞衰老、增加疾病风险和神经退化的也需要进一步的研究来说明。最后,理解衰老和昼夜节律的相互作用,对于我们的健康生活具有十分重要的意义。

# 参考文献

- 1、Matthew D W Piper, Linda Partridge. Protocols to Study Aging in Drosophila. Methods Mol Biol . 2016;1478:291-302.
- 2 Yaning Sun et al. Aging studies in Drosophila melanogaster. Methods Mol Biol . 2013;1048:77-93.
- 3. Fabio Demontis et al. Mechanisms of skeletal muscle aging: insights from Drosophila and mammalian models. Dis Model Mech . 2013 Nov;6(6):1339-52.
- 4. Sifang Liao et al. Behavioral Senescence and Aging-Related Changes in Motor Neurons and Brain Neuromodulator Levels Are Ameliorated by Lifespan-Extending Reproductive Dormancy in Drosophila. Front Cell Neurosci . 2017 Apr 20;11:111.
- 5. Ratliff EP et al. Aging and Autophagic Function Influences the Progressive Decline of Adult Drosophila Behaviors. PLoS One . 2015 Jul 16;10(7):e0132768.
- 6. Eric Cook-Wiens et al. Dissociation between functional senescence and oxidative stress resistance in Drosophila. Exp Gerontol . 2002 Dec;37(12):1347-57.
- 7. Ashiq Hussain et al. Inhibition of oxidative stress in cholinergic projection neurons fully rescues aging-associated olfactory circuit degeneration in Drosophila. Elife . 2018 Jan 18;7:e32018.
- 8 Nannan Chen et al. Aging accelerates memory extinction and impairs memory restoration in Drosophila. Biochem Biophys Res Commun. 2015 May 15;460(4):944-8.
- 9. Ayako Tonoki et al. Aging impairs protein-synthesis-dependent long-term memory in Drosophila. J Neurosci . 2015 Jan 21;35(3):1173-80.
- 10. Julie Vienne et al. Age-Related Reduction of Recovery Sleep and Arousal Threshold in Drosophila. Sleep . 2016 Aug 1;39(8):1613-24.
- 11. Aliza K De Nobrega et al. Aging and the clock: Perspective from flies to humans. Eur J Neurosci . 2020 Jan;51(1):454-481.
- 12. Alexandra Vaccaro et al. Sleep Loss Can Cause Death through Accumulation of Reactive Oxygen Species in the Gut. Cell . 2020 Jun 11;181(6):1307-1328.e15.
- 13、Kuntol Rakshit et al. Effects of aging on the molecular circadian oscillations in Drosophila. Chronobiol Int . 2012 Feb;29(1):5-14.
- 14、Michael N Nitabach at al. Organization of the Drosophila circadian control circuit. Curr Biol . 2008 Jan 22;18(2):R84-93.
- 15, Fang Guo et al. PDF neuron firing phase-shifts key circadian activity neurons in Drosophila. Elife . 2014 Jun 17;3:e02780.
- 16. Yujiro Umezaki et al. Pigment-dispersing factor is involved in age-dependent rhythm changes in Drosophila melanogaster. J Biol Rhythms . 2012 Dec;27(6):423-32.
- 17. Dani M Long et al. Age-Related Changes in the Expression of the Circadian Clock Protein PERIOD in Drosophila Glial Cells. Front Physiol . 2018 Jan 9;8:1131.
- 18 Fanny S Ng et al. Glial cells physiologically modulate clock neurons and circadian behavior in a calcium-dependent manner. Curr Biol . 2011 Apr 26;21(8):625-34.
- 19 F Rob Jackson et al. Glial cell regulation of rhythmic behavior. Methods Enzymol . 2015;552:45-73.
- 20. Judith Campisi et al. From discoveries in ageing research to therapeutics for healthy ageing. Nature . 2019 Jul;571(7764):183-192.
- 21. Shubhroz Gill et al. Time-restricted feeding attenuates age-related cardiac decline in

Drosophila. Science . 2015 Mar 13;347(6227):1265-9.

- 22. Subhash D Katewa et al. Intramyocellular fatty-acid metabolism plays a critical role in mediating responses to dietary restriction in Drosophila melanogaster. Cell Metab . 2012 Jul 3;16(1):97-103.
- 23 Subhash D Katewa et al. Peripheral Circadian Clocks Mediate Dietary Restriction-Dependent Changes in Lifespan and Fat Metabolism in Drosophila. Cell Metab . 2016 Jan 12;23(1):143-54.