

复活史前动物

生物技术的发展使我们能够重新构建灭绝动物的古基因，进而研究古生物机体活着的时候如何运转。利用这种方法，科学家揭开了史前巨兽长毛象如何适应冰河时代严酷环境的谜题。

撰文 凯文·L·坎贝尔 (Kevin L. Campbell) 迈克尔·霍夫瑞特 (Michael Hofreiter)
翻译 黄修远 李辉

半个世纪以来，科学家一直主要依靠骨骼和牙齿化石，来重塑史前生物。骨架能够告诉科学家这些古生物的体型大小和身体形态；骨骼上的肌肉附着点显示了这些生物究竟有多么强壮，以及它们可能的移动方式；牙齿形状和磨损程度则揭示了它们的食物种类。总而言之，研究者们必须想方设法从这些坚硬的化石中获取大量的信息。在某些偶然的情况下，他们有机会获得保存完好的干尸或者冻尸。这使得研究者们能够得到更多细节，例如毛发的长度、耳朵的形状、动物最后一顿晚餐所吃的东西等等，来重塑灭绝动物。尽管科学家已经能够推断过去生命体的物理特征，但对于维持它们生存的生理活动，我们却知之甚少。

精彩速览

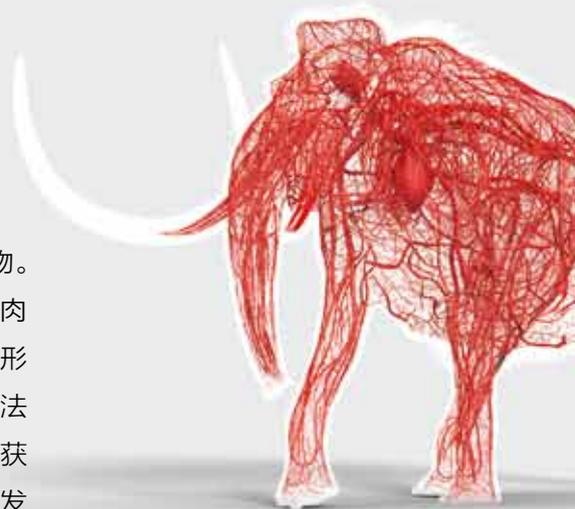
长期以来，科学家对灭绝动物的认识几乎都依赖于它们的骨骼和牙齿化石。

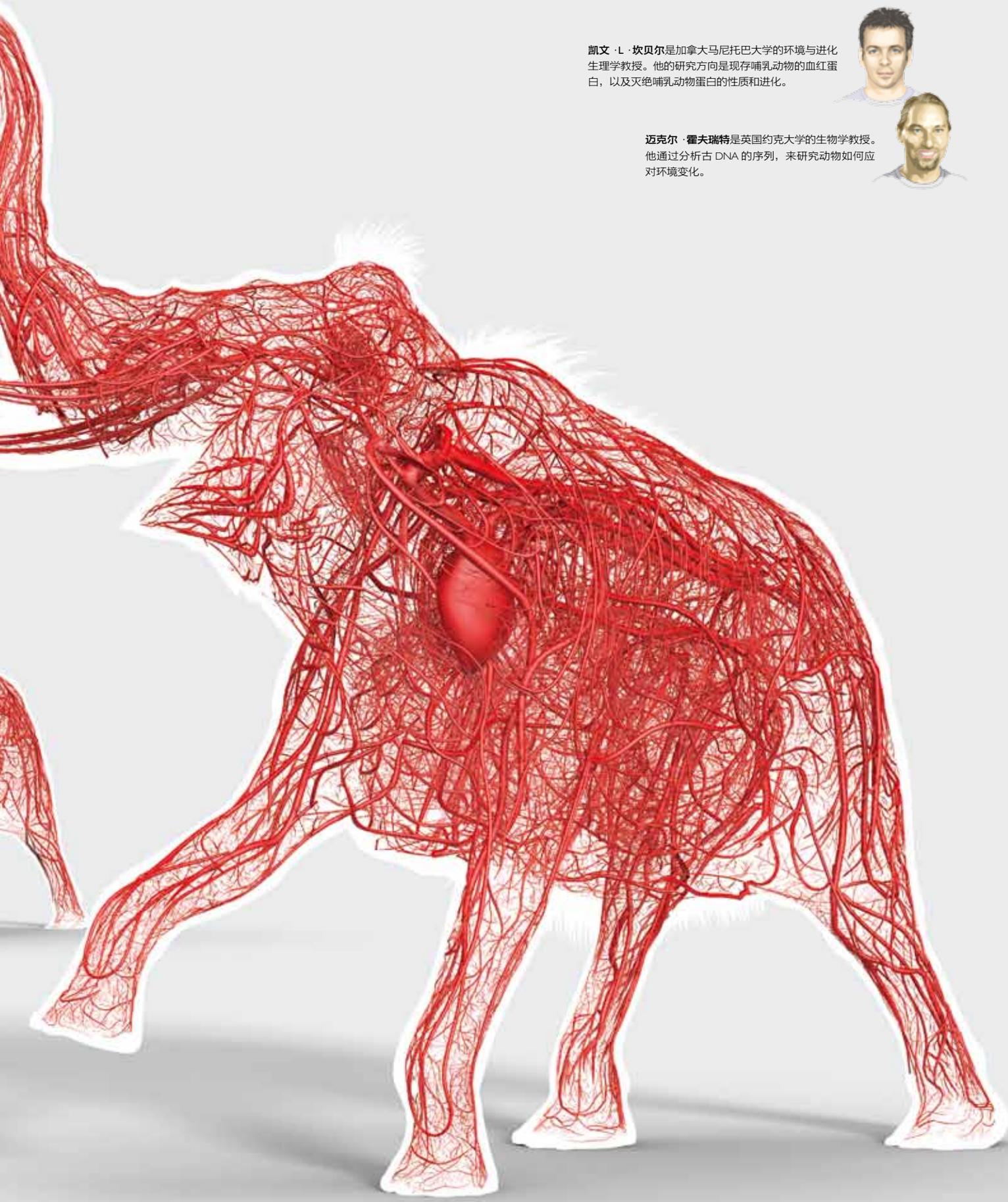
不过，近期关于古DNA研究的新进展使得对古

代野兽的研究发生了革命性的变化。

研究者们现在能够重新构建这些动物的基因，进而研究这些基因所编码的蛋白质。

就在10年前，还没有人能够预料到，有朝一日，科学家能够采用这种方式来研究古生理学。





凯文·L·坎贝尔是加拿大马尼托巴大学的环境与进化生理学教授。他的研究方向是现存哺乳动物的血红蛋白，以及灭绝哺乳动物蛋白的性质和进化。



迈克尔·霍夫瑞特是英国约克大学的生物学教授。他通过分析古 DNA 的序列，来研究动物如何应对环境变化。



不过，这个空白正在逐渐填补。生物技术的最新发展已经使得我们有办法重新构建灭绝动物的古基因，并进而复原这些基因所编码的蛋白质——这些蛋白质组成并驱动的细胞机器，构成了这些动物生命活动的基础。这项工作预示着一个令人激动的新科学领域即将诞生：古生理学（paleophysiology）。这一学科将研究古生物机体在活着的时候如何运转。虽然我们在这一领域的研究才刚刚开始，但是我们已经有了出色的成果。我们已经了解了一种具有代表性的史前巨兽——长毛象（woolly mammoth）——是如何适应冰河时代严酷的生存环境的。虽然要像电影《侏罗纪公园》中所描绘的那样，从史前动物的遗骸中将它们克隆出来依旧遥不可及；但我们的工作证明，对于那些早已从地球表面消失了生物，我们现在已经有办法去了解曾经在它们体内发生过的一些关键生理活动。

冷冻样本

这个想法来源于坎贝尔。2001年的一个夜晚，当时他正在观看一档纪实节目，节目所拍摄的是从西伯利亚冻土层中挖掘出来的完整长毛象遗骸。由于当时媒体正在铺天盖地对克隆羊多利进行宣传，节目中的专家推测（事后证明是错误的），通过从长毛象体内提取DNA，科学家也许很快就能使这种生物重现于世。与这个过于宏大而且复杂的计划相比，坎贝尔的想法有更加明确的目的，也更具有可行性。他想要知道，这种亚洲象的古代亲戚是如何适应高纬度寒冷气候的。

化石记录显示，长毛象的祖先全都起源于非洲的亚热带平原，而它们迁徙到西伯利亚地区只不过是距今不到200万年前。当时，地球刚刚进入历史上最为寒冷的时期之一：更新世冰河时代（Pleistocene ice ages）。就像非洲象一样，长毛象的祖先在它们故乡所面临的最大生理问题是如何避免身体过热。可

是，当这一支长毛象迁徙到北方时，由于环境温度下降，保持体温变成了最重要的事情。

我们对于灭绝物种相关的生物学知识，都来自对其化石、冻尸或者干尸的详细研究，因此，对于长毛象如何适应寒冷环境的讨论，主要局限于那些能够从复原尸体上直接观察到的物理性质，比如，长毛象的名称来自那些又厚又长的体毛。物理特征只是这个故事的一部分，而且很可能是非常小的一部分。事实上毫无疑问的是，必定有一系列生理功能对于它们在寒冷环境中的生存而言至关重要。不幸的是，这些生理活动没有在化石记录中留下任何痕迹，因此，我们唯一的希望就是去研究那些从化石中提取出来的破碎的DNA小片段。利用这些基因片段拼凑出一段完整的基因，并将它们植入活细胞中，诱导这些细胞产生那些曾经控制过这些生理活动的蛋白质。然后，我们通过与这些灭绝动物的现代近亲作比较，来仔细研究这些蛋白质是如何在它们体内运转的。

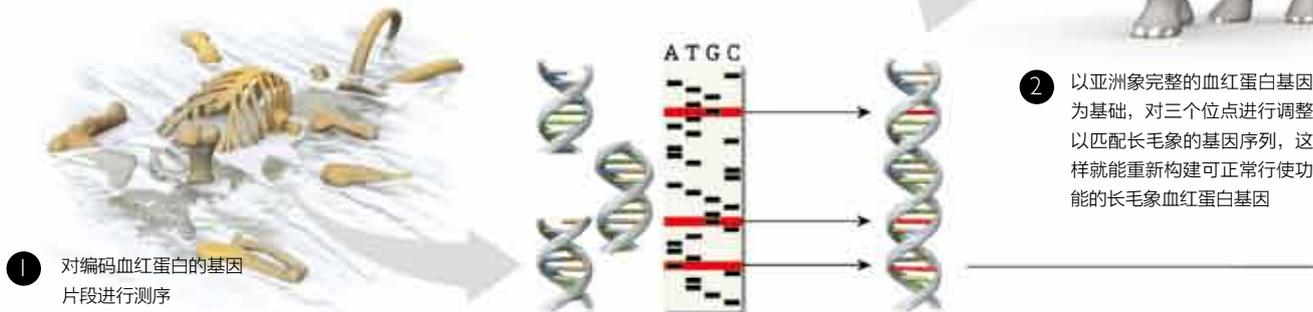
虽然相比起让巨兽复生，坎贝尔所提出的用古DNA研究长毛象如何适应寒冷环境这一想法要简单很多，但是仍然还有很多高难度、基础性的生物技术工作需要去做。幸运的是，这方面的古DNA研究有了很大的进展，为实现这一目标铺平了道路。

不管保存环境如何理想，在死亡很久的样品体内，存留DNA的量都是非常少的。而且，由于化学损伤，DNA会高度片段化，显得支离破碎。在活着的生物体内，存在两种DNA：一种是简单的环状DNA，存在于产生能量的细胞器——线粒体中；另一种则更为复杂，它们存在于细胞核中。早期关于古DNA的研究都集中在线粒体DNA上，因为它们远比核DNA丰富得多：每个细胞拥有上百个线粒体，但却只有一个细胞核。可是，线粒体DNA在一个细胞全部的遗传物质中只占非常小的一部分，它们所编码的蛋白质也屈指可数，而且都仅用于线粒体内。真

研究方法

赋予长毛象以生命

通过重建古基因，科学家能够复原它们所编码的蛋白质，并研究这些蛋白质的功能，从而了解灭绝动物的生理活动。举例来说，通过复原长毛象红细胞中的血红蛋白（下图），科学家揭示了长毛象在面对寒冷环境时，如何演化出适应性特征，使血红蛋白这种对温度非常敏感的蛋白质能在寒冷环境下正常工作，将氧气顺利送达机体组织。



正重要的是核DNA。科学家一开始认为，不可能获得足够的核DNA用于研究已经灭绝的古生物。然而在1999年，阿莱克斯·格林伍德（Alex Greenwood，现任职于德国柏林的莱布尼茨研究院，负责动物学和野生动物研究）及其同事发表文章称，他们发现的证据表明，在冻土层中的遗骸里所包含的核DNA小片段能够保存数万年之久，并且其数量足够用于科学分析。

尽管格林伍德的研究表明，从长毛象这样的古老生物体内获取小片段的核DNA序列（最多拥有70个核苷酸）是可能的，但是，每一个完整基因都是由成百上千个核苷酸组成的，要确定完整基因的序列仍然是很不现实的。而且，格林伍德的方法会给好不容易才获得的古DNA造成损伤。不过，霍夫瑞特找到了解决这一问题的方法。他借用了一种叫做多重PCR的技术，分子生物学家经常用这一技术从现存生物体内获得多重DNA拷贝。这使得我们在研究灭绝生物体生理机能的道路上扫清了一个极其关键的障碍。这一实验技术可用于古DNA研究的首个证据，便是霍夫瑞特于2005年所发表的研究成果。他的研究团队首次成功地组装出一头冰河时代长毛象的完整线粒体基因组（16 500个核苷酸序列）。

金毛与红毛

在改进了古DNA测序技术之后，霍夫瑞特的团队开始在德国莱比锡重建第一段完整的灭绝物种核基因。这次研究所使用的DNA也是来源于一头长毛象。他们从一块保存非常好的长毛象股骨中提取了DNA。这块股骨距今42 000年，发现于西伯利亚的大松鸡河（Great Grouse River）。研究者们选择了黑皮质素1受体（melanocortin 1 receptor，缩写是MC1R）基因作为研究对象，人们认为这段基因决定了鸟类羽毛颜色与哺乳动物毛发颜色。研究者们之所以选择MC1R，是因为它的长度很短，

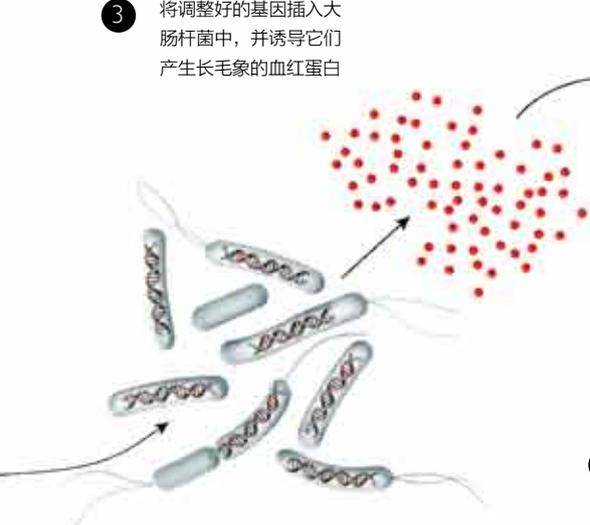
而且很容易插入到用来检测其活性的细胞中。这就使得研究人员可以将DNA序列与可观察的表型联系在一起。

由于从冻土层中保存的长毛象冻尸上复原得到的毛发，既有浅色的，也有深色的，于是，霍夫瑞特及其同事推测，这两种不同的毛发颜色可能就是由于长毛象所拥有的基因不同而造成的，而不是这些毛发在数万年间所接触到的那些化学沉积物导致的。他们对MC1R基因所包含的全部1 236个核苷酸进行了完整的测序，发现有两种不同的基因类型（即等位基因）。他们发现，与非洲象中对应的基因相比，第一种等位基因有一个核苷酸不同，而第二种等位基因则在另外三个位点上也发生了突变。这些突变都会导致其所编码的蛋白质中氨基酸（蛋白质的组成元件）被替换。

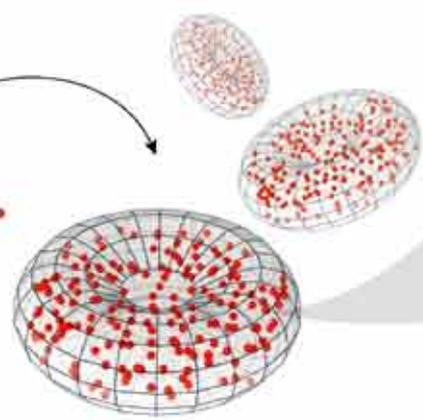
让霍夫瑞特及其同事感到很兴奋的是，他们发现这些氨基酸发生替换的位置中，有两处在进化过程中很少发生改变，但由于其他哺乳动物中缺少可以进行比对的突变，因此他们无法判断这些不常见的氨基酸替换是否会影响到长毛象的毛色。不过，进一步的分析发现，第二种等位基因的三个突变中，有一个突变会导致色素沉着基因活性降低。通过参考其他哺乳动物中色素沉着基因的分子活性，研究者们认为，这个弱化突变可能是导致一些长毛象的毛色变为金色的原因。

非常巧合的是，在美国加利福尼亚大学圣迭戈分校工作的霍皮·福斯查（Hopi Hoekstra）及其同事也同时发现，现存的白额白足鼠某些种群中存在一种MC1R基因的变异。这种变异与在长毛象第二种等位基因中发现的突变一样，会导致同一个关键的氨基酸被替换掉。更为重要的是，带有这种突变的白额白足鼠毛色为浅色。在沙地环境中，这种浅色毛发为它们提供了一种天然的保护色。然而，长毛象能从这种浅色毛发中获得什么优势，现在还不是很清楚，因为在远古的西伯利亚，即使

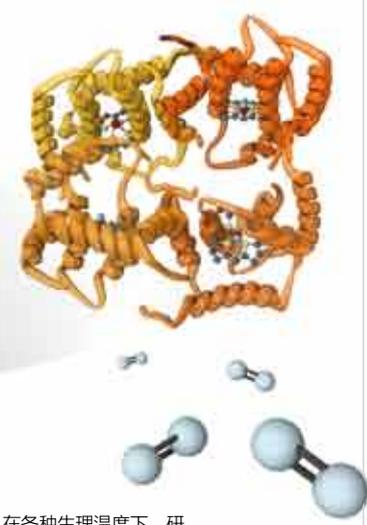
3 将调整好的基因插入大肠杆菌中，并诱导它们产生长毛象的血红蛋白



4 将这些血红蛋白纯化，并将其置于与红细胞内部类似的化学环境中



5 在各种生理温度下，研究长毛象的血红蛋白释放氧气的能力





罕见的冻尸：这具在俄罗斯发现的非常罕见的小长毛象冻尸距今已有 42 000 年，包含大量有用的信息。不过，想要了解这种动物曾经赖以生存的生物机能的精确细节，只能依靠 DNA。

是金色毛发的个体在那片寸草不生的土地上依旧会显得很显眼。不过，可以想象的是，这种较浅的毛皮能够帮助这些动物在寒冷多风的环境里保持温暖。这已经在现存的浅色鸟类和哺乳动物中得到证实。虽然这听起来很违反常理，因为浅色毛发会反射很多太阳辐射，但是这些毛发也同样能够零星地将一些辐射分散给皮肤，在那里这些辐射将被吸收而转换为热量。相比之下，深色毛发只会将太阳辐射吸收到它的表面，而这些热量很快就会被大风吹散。

在成功地重构出长毛象的核基因之后，霍夫瑞特的团队将注意力集中到了尼安德特人（Neandertals）身上。尼安德特人是智人（*Homo sapiens*）的近亲，曾经生活在欧亚大陆上，在距今约 28 000 年前灭绝。霍夫瑞特的团队获得了一段由 128 个核苷酸组成的 MC1R 基因片段，其所编码的氨基酸替换在现代人类中并不存在。同长毛象的等位基因一样，分析表明这个替换会使其编码的蛋白质的活性比标准现代人的更低。在现代欧洲人中，MC1R 的突变也同样导致了类似的蛋白质活性下降，使得这些人的毛发变为红色，皮肤变白，因此，我们推测，一部分尼安德特人可能也拥有红色头发和白色皮肤（虽然其蛋白质活性下降是由另一种突变造成的）。尼安德特人生活在高纬度地区，在那里，用于合成维生素 D 的紫外线非常稀少。由于紫外线不太容易穿透深色肌肤，因此白皙的肌肤可能有利于尼安德特人吸收足够的紫外线。

这些开创性的研究明确证实，可见表型的基因重现如今是可行的。我们现在准备用这些有力的新工具，去研究灭绝物种

的生活过程——这是真正的古生理学。

战胜寒冷

无论是驯鹿还是麝牛，所有这些适应寒冷环境的大型哺乳动物都拥有一个密集的动脉和静脉系统：动脉血管和静脉血管挤在一起，两者血流方向相反，不停地流淌在四肢和手足之间。这种结构通常被称为细脉网（rete mirabile），或者“神奇网络”（wonderful net），这是一种高效的反向热交换结构。温热、含氧的动脉血从身体中心流出，将自己大部分的热量转移给返回心脏的较冷的静脉血。这样两者之间便形成热量梯度，使脚掌这类接触寒冷表面的器官能够将温度保持在 0°C 左右。这样，需要额外热量来温暖手足的情况就大大减少了。当冬天来临，很难从外界获得热量时，这一点对极地动物来说就很有优势了。不过，这种生理上的适应却使得手足部失去了用于维持血红蛋白正常工作的热能。在脊椎动物中，红细胞中的血红蛋白从肺部获取氧气，并将它们运送到组织里。因为切断血红蛋白与氧气之间的弱化学键时需要能量，因此，当温度下降时，红细胞的输氧能力就会下降。

为了弥补这个缺陷，这些在寒冷地带生活的哺乳动物需要辅助热源，给血红蛋白提供热量。虽然这一过程的精确分子机制尚不明确，但是一般都涉及红细胞中的其他分子与血红蛋白的结合。这些分子与血红蛋白形成化学键时便会释放热能，从而帮助血红蛋白将氧气释放到组织中。

在还没有与霍夫瑞特的团队合作之前，坎贝尔的团队就认

为，长毛象的血红蛋白也可能进化出了类似的机制，用来在寒冷环境中促进氧气释放。对长毛象的血红蛋白基因进行测序，并将其与亚洲象的血红蛋白基因进行对比，可能有助于揭示是否存在类似的机制，并且了解这种机制具体是什么样。

坎贝尔最早与澳大利亚阿德莱德大学的阿兰·库珀（Alan Cooper）进行了合作，并对两段长毛象基因进行了测序。这两段基因用于产生两种不同的球蛋白肽链，它们是组成血红蛋白的主要成分。在合作中，研究团队遇到的主要困难是：他们手上大多数的长毛象样本质量都不太好，以至于无法提取到足够的可用DNA片段。这时，霍夫瑞特的团队加入了进来，并且采用了与提取MC1R基因相同的技术。很快，我们就得到了这两种长毛象血红蛋白基因的完整序列，并由此了解到球蛋白肽链的氨基酸序列。

第一批DNA测序结果显示，在146个氨基酸位点中，长毛象的球蛋白肽链与亚洲象的相比，有三个位点存在不同。这一发现让我们兴奋不已，因为我们确信，在这三个被替换的氨基酸中，一定包含着与长毛象在生理活动层面适应寒冷环境有关的基因特征。支持我们这个猜测的最初证据来源于一个罕见的人类血红蛋白变异。这种被称为拉什血红蛋白（hemoglobin Rush）的变异中，有一个突变与在长毛象序列中发现的一样。虽然，拉什血红蛋白与正常人的血红蛋白相比只有一个氨基酸位点的差异，但是这种差异却完全改变了血红蛋白的生物化学性质。这一突变使得拉什血红蛋白对温度的敏感性显著下降，从而在寒冷环境中更容易释放氧气。在那些适应寒冷环境的哺乳动物体内，血红蛋白也是这样运作的。

为了进一步弄清楚那些在长毛象血红蛋白中发现的变异是否与适应寒冷气候有关，我们着手复原古血红蛋白，并观察它如何工作。为了能够复制编码长毛象血红蛋白各条肽链的基因，我们获取了完整的亚洲象血红蛋白基因，并改变了那三个突变位置，使之与长毛象的序列一致。然后，我们将这样得到的类长毛象基因插入大肠杆菌中，诱导它们合成并组装出长毛象的血红蛋白。与那些曾经流淌在43 000年前长毛象血液中的血红蛋白相比，这些人工诱导产生的血红蛋白无论从结构还是功能上，都达到了以假乱真的地步。

有史以来，我们是第一批站在这个令人羡慕的位置上的人。我们能准确地对一种灭绝物种的重要生理活动进行分析，就像我们研究现存动物的生理活动一样。我们模拟了红细胞内的化学环境，测量了在各种生理温度下，长毛象血红蛋白和现代象血红蛋白各自结合氧气及释放氧气的的能力。正如我们在拉什血红蛋白的研究中所预测的那样，在低温下，长毛象的血红蛋白确实比亚洲象的血红蛋白更容易释放氧气（当温度维持在大象正常的核心体温，即约37℃时，两种血红蛋白结合氧气和释放氧气的的能力相同）。有趣的是，虽然长毛象的血红蛋白也是依靠结合其他分子来获取额外热量，从而提升其运送氧气的有效负荷，但是帮助实现这一功能的突变基因却与现代极地动物体内的完全不同。这一结果是通过比较两者相关基因序列而发现的。这也就能够解释，为什么长毛象的突变能够帮助它们适应寒冷环境，而在人体中的拉什变异却没有类似的效果，因为

拉什变异会导致血红蛋白不稳定，并进而使其携带者患上慢性贫血症。至于为什么这种不受欢迎的变异会出现在人类中，而没有出现在长毛象中，这还需要进一步研究来解答。

复活长毛象？

当然，血红蛋白的适应性变化只是长毛象适应寒冷环境的冰山一角，它们演化出来的很多其他生物化学适应机制还有待阐明。更何况，除了长毛象之外，还有几十种灭绝物种的适应机制也尚不明晰。不幸的是，近些年来，科学家通过测序所得到的大量古基因组好像对这项研究没有太大帮助。因为这种用鸟枪法测序技术得到的序列会有随机混合的现象存在，虽然测序结果对于宏观分析很有用，但是对于研究生理机制来说却显得不够精确和完整。虽然多次重复测序能够解决这一问题，但资金消耗却非常庞大。

一种名为杂交捕获（hybridization capture）的新技术，能够以更低的价格来更好地覆盖目标基因。这可能有助于解决这个问题，并使我们有可能通过大规模的研究，来比较西伯利亚长毛象的重要基因网络在温暖的间冰期和寒冷的盛冰期之间有什么区别。通过杂交捕获，研究者们还能比较同一物种在地理分布上不同的两个群体——比如西伯利亚长毛象和哥伦比亚长毛象。这些研究不仅能使我们分析种内的基因差异，而且也有可能使我们发现它们为了适应当地的地理与气候条件而形成的新生理机制。虽然这样的未来让人非常兴奋（想象一下，过去5万年的进化历程将在你的眼前展开），但是我们分析古生理学的能力实际上非常有限。理想的情况是，我们能够在生物体内研究那些灭绝了的蛋白质。因为，蛋白质的很多性质都只有在活体中才能观察到。可是，短期内我们却没有办法实现这种研究，因为这需要让灭绝物种复活过来。

到目前为止，我们只能让自己满足于在试管和人工培养的细胞中观察古蛋白。我们已经着手运用这些技术，去研究其他灭绝生物的生理活动，包括乳齿象（mastodon）以及不久之前刚刚灭绝的极地海洋哺乳动物——史德拉海牛（Steller's sea cow）。不得不说，要克隆这些动物是一项极为复杂的工作，即使在不远的将来，这一切也应该只能存在于幻想之中。同时，我们将会继续一个蛋白质接着一个蛋白质地，赋予这些早已从地球上消失了的野兽们以生命。■

本文译者 李辉是复旦大学生命科学学院人类学系的教授、博士生导师；黄修远是李辉教授的研究生。

扩展阅读

Multiplex Amplification of the Mammoth Mitochondrial Genome and the Evolution of Elephantidae. Johannes Krause et al. in *Nature*, Vol. 439, pages 724–727; February 9, 2006.

A Melanocortin 1 Receptor Allele Suggests Varying Pigmentation among Neanderthals. Carlos Lalueza-Fox et al. in *Science*, Vol. 318, pages 1453–1455; November 30, 2007.

Substitutions in Woolly Mammoth Hemoglobin Confer Biochemical Properties Adaptive for Cold Tolerance. Kevin L. Campbell et al. in *Nature Genetics*, Vol. 42, pages 536–540; June 2010.