

张思源,柴志欣,钟金城. 牦牛高原低氧适应研究进展[J]. 江苏农业科学,2016,44(3):13-17.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.03.004

牦牛高原低氧适应研究进展

张思源^{1,2}, 柴志欣^{1,2}, 钟金城^{1,2}

(1. 动物遗传育种学国家民委-教育部重点实验室/西南民族大学, 四川成都 610041;

2. 西南民族大学青藏高原研究院, 四川成都 610041)

摘要:人们对不同海拔地区的动物进行解剖学比较并利用基因组学等现代生物技术进行系统分析,得到了低氧适应解剖学依据并挖掘出 100 多种与低氧适应相关的重要候选基因,初步揭示了一些高原动物低氧适应的遗传基础和分子机制。牦牛是生活在青藏高原上的特有物种,是研究高原适应极好的模式动物,具有重要的研究价值。本文从牦牛的组织解剖、生理生化、低氧适应基因等方面综合分析了牦牛对低氧环境适应的研究进展,为揭示牦牛低氧适应的分子机制和牦牛遗传育种研究提供理论依据和参考资料。

关键词:牦牛;低氧适应;分子机制;低氧适应基因;研究进展

中图分类号: S823.8⁺52 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)03-0013-05

氧气是大多数生物生存的基础物质,生物有机体的能量供应与代谢都与氧气密不可分,海拔 3 000 m 以上的高原地区空气中氧气的含量是海平面的 73%,海拔 5 000 m 地区氧气含量仅是海平面的一半。当环境中氧气浓度出现变化时,生物有机体会通过一系列调控来适应环境变化,平原地区生活的人或动物在高原生活一段时间,会对高原环境产生适应性,称为“获得性习服”,高原世居的人或动物在生理、生化和机体结构上表现出稳定的遗传特征,对高原环境有较好的适应,称为“遗传性适应”^[1-2]。生物机体对高原环境适应能力不足时,会对动物的生长、发育和繁殖等生理过程造成有害影响。经过数亿年的自然选择与进化,高原哺乳动物以特有的方式在高原低氧环境中生长繁衍^[3]。常见的高原哺乳动物有牦牛、藏羚羊等,研究这些高原动物的低氧适应机制对畜牧业和农业生产都有重要的意义,同时低氧是癌症等重大疾病

产生和发展的重要原因,进行低氧适应原理研究,可为相关疾病的治疗提供重要思路。

牦牛生活在海拔 3 000 m 以上的青藏高原及其周边地区,是高原动物的代表物种之一,经过长期的自然选择与人工选择,牦牛在解剖结构、生理生化指标和基因功能等方面都已获得稳定、独特的高原低氧适应特征与机制,为当地牧民提供了不可或缺的生产、生活资料^[4]。国内外对牦牛低氧适应性的研究已开展了多年,从组织器官水平到细胞分子水平的研究取得了一定的成就,本文从牦牛的组织解剖、生理生化指标、与低氧适应相关的基因等方面综合分析了牦牛对低氧环境适应的研究进展,为揭示牦牛低氧适应的机制和牦牛遗传育种研究提供一些理论依据和参考资料。

1 组织解剖结构与生理生化指标

高原动物长期生活在高原低氧环境中,组织器官形态结构、生理生化指标都有相应的适应性变化。在器官水平上,高原动物具有完善的氧气输送系统和强大的心肺摄氧、储氧能力。在细胞水平上,高原动物相较于移居高原的同一物种在有氧代谢反应中所完成同一做功时耗氧量较少。研究结果表明高原世居动物很大程度上依靠组织适应性。

1.1 肺组织解剖学

肺行使氧和二氧化碳交换功能,还参与机体多种物质的

收稿日期:2015-02-08

基金项目:国家科技支撑计划(编号:2012BAD13B06);中央高校基本科研业务费专项资金(编号:11NZYTH03);西南民族大学研究生学位点建设项目(编号:2014XWD-S071007)。

作者简介:张思源(1992—),硕士研究生,研究方向为分子遗传学与基因组学。E-mail:siyuan92@163.com。

通信作者:钟金城,博士,教授,研究方向为动物遗传学。E-mail:zhongjincheng518@126.com。

[9] 饶 颀,杜尚丰,李道亮,等. 农用传感器网络传输特性研究[C]. 中国农业工程学会 2011 年学术年会论文集. 北京:中国农业工程学会,2011.

[10] 郭秀明,赵春江,杨信廷,等. 苹果园中 2.4 GHz 无线信道在不同高度的传播特性[J]. 农业工程学报,2012,28(12):195-200.

[11] 何 勇,聂鹏程,刘 飞. 农业物联网与传感仪器研究进展[J]. 农业机械学报,2013,44(10):216-226.

[12] 程 静,贾银江,关 静. RFID 中间件在肉牛养殖溯源系统中的应用[J]. 农机化研究,2015,37(5):224-228.

[13] 陈旭辉,王 馨,柯 铭,等. 一种改进的基于 RFID 中间件的冗余数据清洗算法[J]. 微电子学与计算机,2013,30(7):154-158.

[14] 罗元剑,姜建国,王思叶,等. 基于有限状态机的 RFID 流数据过滤与清理技术[J]. 软件学报,2014,25(8):1713-1728.

[15] 耿 技,聂 鹏,秦志光. 软件可靠性模型现状与研究[J]. 电子科技大学学报,2013,42(4):565-570.

[16] 许海洋,王 萍. 高可靠性智能灌溉系统的形式化验证方法[J]. 农机化研究,2015,37(5):62-65.

[17] Kempf J, Arkko J, Beheshti N, et al.. Thoughts on reliability in the internet of things[R/OL]. [2015-01-20]. <https://www.iab.org/wp-content/IAB-uploads/2011/03/Kempf.pdf>.

[18] 杨 林. 农业物联网标准体系框架研究[J]. 标准科学,2014(2):13-16.

合成与代谢,是呼吸系统中重要的功能器官。牦牛的肺质量约占体质量的 1.1% ~ 1.7%,肺脏有 6 个肺叶,左侧 2 个——尖叶、膈叶,右侧 4 个——尖叶、中叶、膈叶和副叶,肺表面有浆膜组成的胸膜脏层覆盖,血管与淋巴管等间质结缔组织深入肺内,将实质分为许多完整的肺小叶。肺脏由导气部和呼吸部 2 个部分组成,肺导气部包括叶支小管、小支气管、细支气管和终末细支气管,肺呼吸部则由呼吸性细支气管、肺泡管、肺泡囊和肺泡组成。牦牛肺部气管粗大,呼吸性细支气管结构明显,管壁由假复层柱状上皮和单层立方上皮交错排列,上有肺泡开口^[5]。肺泡管的断面数量多,其管壁具有典型的膨大结节。肺泡是构成肺和肺进行气体交换的主要结构。牦牛肺泡表面积大且多为多面形囊泡、球形或半球形状,大多数是扁平的 I 型肺泡上皮细胞,位于肺泡壁,其上皮出现小孔,而立方的 II 型肺泡上皮细胞突出在肺泡腔。肺泡隔有 2 种,一种是肺泡隔厚的区域呈淡红色半透明薄膜状,中间可以观察到一些红细胞,偶尔可见其他细胞成分,另一种是肺泡隔薄的区域呈线状,可见扁平的细胞核,无红细胞^[6]。

对不同海拔地区牦牛肺脏解剖学研究表明,高海拔地区牦牛明显比低海拔地区牦牛单位面积内肺泡数目多,高海拔牦牛肺泡隔的厚度明显增加,同时也观察到肺泡隔内毛细血管明显而丰富,在肺泡隔中占很大的比例。高原牦牛较平原黄牛,气管短而粗大,软骨环距离较大,含有较丰富的肌肉、纤维组织和支气管软骨。牦牛肺泡隔厚度显著大于黄牛,且肺泡发育速度较快。牦牛气-血屏障随日龄逐渐减小,黄牛则不断增厚。牦牛肺泡隔充分呼吸呈细线状,肺泡的快速发育,气管的形态学特点,气-血屏障厚度的变化等都为了满足牦牛在生长发育的过程中对氧气的需求,更方便于牦牛肺部的气体交换,便于牦牛个体发育与适应高原低氧环境^[7]。

1.2 心血管形态学与血液生理指标

心脏是血液循环的动力器官,血液循环是携带氧气供应全身的唯一循环系统,在能量代谢上起着重要的生理功能。牦牛心脏占总体质量的 0.5% ~ 0.8%,对牦牛心脏解剖显示牦牛右心室内肉柱侧壁与室间相连处较明显,左心室内肉柱较少且位于隔壁下部,心脏主动脉半月瓣比较发达,在心脏主动脉口的纤维环处出现心骨^[9]。红细胞(RBC)、血红蛋白(HB)和红细胞压积容量(PCV)是反映动物呼吸、运输等机体性能的重要生理指标,采用显微镜法和氰化高铁法对牦牛血液进行测定发现 RBC、HB 和 PCV 含量在公、母牦牛间无显著差异;而不同海拔地区牦牛进行比较,生活在高海拔地区的牦牛血液中 RBC、HB 和 PCV 明显偏高^[10]。心脏解剖发现牦牛左心室壁较厚且还拥有粗大的心肌纤维索。微循环是血液循环中的最小功能单位,针对牦牛心肌微动脉研究认为:心室壁微动脉走行弯曲甚至扭曲成团、入肌束后呈“T”形甚至呈“Y”形,这些都与狗等平原家畜相似,是经典的“树皮样”结构^[11]。牦牛心室壁毛细血管的前微动脉表面有明显的环状缩窄,同一动脉分出的毛细血管很少汇入同一静脉,牦牛微静脉以其独特的“树根样”区别于其他家畜的“生姜根样”,微静脉血管肌束间比肌束内粗大,且微静脉垂直于心肌纤维,有利于血液循环^[11-12]。

牦牛机体血液中含氧量下降时,造血功能增强促使 RBC、HB 和 PVC 升高,以满足机体对氧的需求。牦牛微动脉

的扭曲有效地增加了血流阻力,从而调节血流量,微静脉的形状结构有利于血液的回流,肌束内外大小的差异是承受不同压力的结果。牦牛同时还存在肺泡内毛细血管多而明显,血管壁较薄和肺动脉不高等特点。这些形态结构有利于血液循环和氧气的输送,增加氧气利用率,为牦牛高原低氧适应提供解剖形态学和生理生化依据^[10,12-13]。

2 低氧适应分子基础研究

2.1 血管内皮生长因子(VEGF)基因

血管是动物血液流动的生命管道,起着运输氧气、营养物质和代谢废物的作用,血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF) 又称血管通透因子(vascular permeability factor, VPF),广泛分布于人和动物各个组织,有完整的血小板衍生生长因子(plate-derived growth factor, PDGF) 家族蛋白结构功能域,是内皮细胞增殖和血管再生的关键调控因子,该蛋白质是亲水性分泌蛋白,N 端有分泌信号。VEGF 蛋白的不同亚型是由基因的不同剪接方式决定的,是唯一一对血管能特异性形成的生长因子。据研究 VEGF 是最强的血管通透性因子,比组织胺强 5 000 倍,不受组织胺抑制剂抑制,能形成纤维素网络,为毛细血管芽生长延伸提供基质。给兔静脉滴注 VEGF 可导致动脉压下降,低氧环境可以刺激 VEGF-A 及其受体在动物和人组织细胞、内皮细胞中发挥促进新生血管内皮细胞生长增殖及增加血管通透性的功能。VEGF 是通过小泡囊形状的细胞器(vesicular vacuolar organelle, VVO)引起内皮细胞窗子开放,进而导致血管通透性增加。VEGF 对心肌收缩基本无影响,却能降低血管外周阻力,增加心率和心输出量^[16]。

利用分子克隆技术和生物信息学等方法对牦牛 VEGF-A 基因进行分析,VEGF-A 基因序列长度为 653 bp,开放阅读框长 573 bp,可编码 190 个氨基酸;编码的多肽链具有亲水性,该蛋白是一种表面蛋白,有 4 个磷酸化位点。牦牛 VEGF-A 基因中检测到 2 个 SNP,PCR-RFLP 分型认为在 SNP g. 15853G > A 位点上 G > A 可更好地适应高原低氧,中性检测证实 2 个位点受牦牛所处地理环境的选择作用。Real-time PCR 技术对高原牦牛和高原黄牛不同组织比较发现,牦牛 VEGF-A 基因在肺部、胰腺中表达量更高一些。牦牛与黄牛 VEGF-A 基因蛋白序列相同,肺部表达量不同说明低氧适应可能与基因表达量有关,且低氧适应调节主要在肺和脾^[17]。

2.2 内皮 PAS1 蛋白(EPAS1)基因

红细胞是携带氧气,供机体代谢的运输载体。各个组织器官的氧气交换都与血管和红细胞密不可分,通过对世居高原人和动物的全基因组扫描(whole genome scans)以及候选基因分析^[18],挖掘出 3 个与低血红蛋白(Hb)浓度有关的基因:EPAS1、EGLN1(EGL nine homolog1)和 PPARA(peroxisome proliferator activated-α)基因。内皮 PAS1 蛋白(EPAS1)又称缺氧诱导因子 2(hypoxia induced factor-2, HIF-2),其主要存在于内皮细胞,大多数由低氧引起的因子或酶的变化均通过 EPAS1 作用,EPAS1 是应激缺氧的关键转录因子^[19]。EPAS1 蛋白是由 HIF-1β 和 HIF-2α 组成的异二聚体蛋白质复合物,HIF-2α 是调节亚基^[20],由 bHLH(Basic helix-loop-helix)、PAS(Per/Arnt/Sim)、ODD(oxygen-dependent

degradation) 和 TAD(transactivation domain)4 个结构域组成,其中前 2 个结构域可以介导 α 和 β 亚基形成二聚体,与缺氧反应元件(HRE)结合,ODD 结构域被脯氨酰羟化酶羟化后使 HIF-2 α 泛素化被蛋白水解酶降解,从而在正常氧浓度情况下细胞内含量较少,处于动态平衡。缺氧条件下,HIF-2 α 泛素化降解途径被抑制,形成稳定 EPAS1 诱导靶基因发挥作用,TAD 结构域在 HIF-1 α 和 HIF-2 α 特异调节靶基因中起主导作用。EPAS1 作用的靶基因主要是与能量代谢、血管生长和骨髓造血等相关的基因,这些靶基因中都含有缺氧反应元件(HRE),EPAS1 通过识别核心序列与结合诱导靶基因的转录,介导细胞对缺氧的应答^[21]。Morita 等发现 EPAS1 是 EPO 的主要调节者^[22],随后研究发现,环境中氧气浓度下降时,细胞会上调 VEGF-A 和 EPO 等一系列低氧调节基因的表达量,其中 EPO 的表达量增加是由于 EPAS1 的高表达导致的,在上调表达量的过程中 EPAS1 蛋白起着纽带作用,所以多数低氧引起上述酶或因子的变化 EPAS1 蛋白起关键作用。关于人类进入高原肠内铁的吸收量增加,经研究发现也与 EPAS1 有关^[23]。

吴晓云等对牦牛 *EPAS1* 基因的研究显示,该基因开放阅读框长 2 613 bp,可编码 870 个氨基酸,蛋白表现为亲水性,是非分泌蛋白。基因中检测到 3 个特异性的 SNP,群体中的 SNP 位点都是高度连锁的状态,某一基因型表现显著的海拔差异性。*EPAS1* 基因可作为低氧适应的分子信标,该基因在肺部的表达量丰富,在牦牛体内表达量显著低于平原黄牛,同时 *EPAS1* 基因对 *VEGF-A* 基因也有调控作用^[17]。

2.3 促红细胞生成素(EPO)基因

促红细胞生成素(EPO)主要由肾脏合成,少部分由肝脏和有核红细胞等合成。EPO 促进进入红细胞系的骨髓多能造血干细胞的增生、分化,进而调节红细胞数量的主要刺激因子,由低氧诱导和雌激素诱导产生,基因的 3'非编码区包含低氧诱导因子反应元件^[24]。EPO 的促进红细胞生成生物学功能是通过特异的促红细胞生成素受体(EPOR)介导完成的;两者相互结合后,通过信号传导途径来调节红细胞系的增生与分化^[25]。EPOR 是造血细胞因子受体超家族成员之一,属于细胞因子受体,其结构可分为 3 个部分:胞质部分,跨膜区域,细胞外部分。胞质部分不具有酪氨酸激酶活性,是因为缺少酪氨酸激酶的特征排列顺序,所以只有 1 种亚单位与 EPO 作用形成同源二聚体,再通过 JAK/STAT 途径和 Ras/MAP 途径等来传导信号^[26]。色氨酸-丝氨酸-X-色氨酸-丝氨酸结构(WSXWS)是造血细胞超家族共有的特征,而 EPOR 是此家族中的一员。研究认为 WSXWS 结构对 EPOR 正确构象的形成、蛋白体的组装、配体的激活等具有重要的作用^[27]。

牦牛 *EPO* 基因由 5 个外显子和 4 个内含子组成,不同地区牦牛该基因大小约在 3 260 bp 左右,编码区长 1 527 bp,编码 508 个氨基酸,彼此同源性较高,但有差异。对不同地区牦牛 *EPO* 基因多态性分析发现其遗传多样性比较丰富,基因型与牦牛所处海拔有明显关系^[28-29]。

2.4 低氧诱导因子 1(HIF-1)基因

低氧诱导因子 1(Hypoxia inducible factor-1 alpha, HIF-1)是参与缺氧诱导适应性反应中重要的蛋白转录调节因子^[30],具有 DNA 结合活性。HIF-1 是氧浓度敏感性元件,

正氧(normoxia)条件下不稳定,半衰期低于 5 min,一直处于被合成和降解的状态,在缺氧环境培养的细胞核中可以检测到。HIF-1 由 α 和 β 2 种亚基构成,2 个亚基均为含有 PAS 和 bHLH 结构的转录因子家族成员, α 与 β 亚基还包括入核信号(NLS)和羧基末端的反应活化结构域(TAD),可能参与转录起始复合物反应,从而影响基因转录。 α 亚基是调节 HIF-1 活性的功能单位,而 β 亚基则是组成性表达,与保持 HIF-1 结构稳定和活性构象转变有关^[31]。目前发现 α 亚基有 HIF-1 α 、HIF-2 α 和 HIF-3 α 3 种,三者表现形式均不相同,都受氧气浓度调节,与 β 结合发挥不同的靶基因调控功能,并能够作为核心与基因产物一起组成复杂的低氧调控网络。对高原人群全基因组扫描(GWADS)^[32]发现 HIF-2 α 基因在人对低氧环境中的调节起核心作用。HIF-1 作为低氧适应的主要调控因子(表 1)^[33],可以参与调控血管形成和红细胞生成、糖酵解与糖代谢、应激反应等过程。

利用半定量反转录 PCR 和实时定量反转录 PCR 技术研究表明,在牦牛心、肝、肺和肌肉等组织中 HIF-1 均有表达,其中睾丸与脾中表达量最高,肌肉表达量最低^[34]。

表 1 低氧适应相关基因及其转录调控因子

调控基因	调控因子
血管与红细胞	
内皮细胞生长因子(VEGF)	HIF-1
VEGF 受体 1(Flt-1)	HIF-1
内皮素-1	HIF-1
诱导型 NO 合成酶(iNOS)	HIF-1
促红细胞生成素(EPO)	HIF-1
转铁蛋白(离子转运)	HIF-1
转铁蛋白受体(离子吸收)	HIF-1
血红素合成酶(HO)	HIF-1
应激相关	
氨基酸羟化酶(TH)	HIF-1
肾上腺髓质素	HIF-1
$\alpha 1\beta$ -肾上腺素能受体	HIF-1
c-jun	AP-1
c-fos	AP-1
糖酵解与代谢	
磷酸果糖激酶 L(PFKL)	HIF-1
醛缩酶 A	HIF-1
甘油醛-3-磷酸脱氢酶	HIF-1
磷酸甘油酸激酶 1(PGK-1)	HIF-1
烯醇化酶 1	HIF-1
乳糖脱氢酶 A(LDHA)	HIF-1
己糖激酶 II	HIF-1
葡萄糖转运蛋白-1(GLUT-1)	HIF-1
胰岛素样生长因子 2	HIF-1
其他	
P35 ^{srj}	HIF-1
鸟苷酸脱羧酶	未定
Retrotransposon VL30	未定
环氧合酶 2	NF- κ BHMG1(Y)

2.5 线粒体基因

线粒体是一个半自主细胞器,细胞内约 90% 的 O₂ 被线粒体的氧化磷酸化过程消耗,线粒体处于能量传递的中心,是生物体代谢的主要能量供应“工厂”^[35]。线粒体基因组编码区有 37 个基因,包括 12S rRNA 和 16S rRNA 等 2 个 rRNA、TA 和 TR 等 22 个 tRNA,包含 3 个细胞色素 C 氧化酶的 13 个编码蛋白质的功能基因。这些基因都参与到呼吸链中构成酶或反应复合物的组成,这些基因的突变与表达量的差异都会

直接或间接影响呼吸链的正常运转,在低氧适应中起着重要作用。作为动物中对低氧反应最敏感的细胞器,线粒体在低氧环境应激反应中起重要作用,高原动物线粒体基因通过多态性来适应高原低氧的环境。细胞在低氧环境中应激时最大的威胁是电子传递链中电子受体氧分子供应不足导致大量的活性氧(reactive oxygen species, ROS)产生^[36]。ROS 可以使蛋白质、脂类和 DNA 等一些大分子物质氧化损伤,甚至有些细胞器也被氧化,进而影响细胞及机体的正常代谢。科学家研究发现线粒体通过自噬的方式解决这一难题,来增加生物机体的高原低氧适应,同时线粒体还可以改变自身的形态结构、数目^[37]以及优化呼吸链反应体系提高呼吸链作用效率来应对低氧环境^[38-39]。

通过测定牦牛心肌、骨骼肌线粒体总抗氧化能力(T-AOC)、乳酸脱氢酶(LDH)和超氧化物歧化酶(SOD)等的含量来研究线粒体氧自由基代谢,结果显示线粒体抗氧化能力随海拔升高而不断增强。对牦牛骨骼肌线粒体的平均截面积、平均体积和面数密度等超微结构与平原黄牛对比研究,发现牦牛线粒体小而多,密度大,面积随年龄有先降后升的特点,在出生和发育过程线粒体结构形态的变化都表现出良好的遗传学特点^[40-41]。

2.6 其他重要基因

在低氧环境中,细胞中一部分控制糖代谢的酶类和相关基因的表达量将上调,使得细胞内主要通过糖酵解来维持 ATP 的供应。研究发现因谷胱甘肽硫转移酶(glutathione S-transferase, GST)基因的存在使得长期生活在高海拔地区的人或动物体内并未产生过多引起脂质氧化的活性氧。闫惠琴等^[3]研究发现 *GSTT1* 缺失基因型频率在高原与平原人之间存在着显著差异, *GSTT1-105* 变异基因型频率差异也十分显著,所以 *GSTT1* 和 *GSTP* 这 2 种基因可能与高原低氧适应有关。通过群体遗传学统计的方法用基因组扫描和外显子测序技术对藏族人高海拔环境适应性进行研究,挖掘出 EPAS1、过氧化物酶体增殖物激活受体(PPARA)和脯氨酸羟化酶-2(EGLN2)等候选基因参与能量代谢通路调控过程,与低氧诱导因子活性也密切相关^[18,32]。热休克蛋白(heat shock protein, HSP)基因具有保护机体或细胞的功能,其中 *HSP70* 基因与高原低氧环境下是否患高山病有很大关系。研究显示肺泡表面活性物质相关蛋白(pulmonary surfactant-associated protein, SP)基因 *SP-A* 能够增强Ⅱ型肺泡细胞的氧化能力。对 *SP* 的多态性分析发现 *SP* 基因多个多态性位点与高原低氧适应相关联。葡萄糖转运体 1(glucose transporter 1, GLUT-1)在低氧环境中其数量与活性会明显升高,对该基因进行 SNP 检测,同样也发现与高原低氧适应相关联的 SNP^[42]。

3 低氧适应基因组学研究

为全面了解与低氧适应相关基因的调节作用, Karen 等利用抑制性消减杂交技术(subtractive suppression hybridization, SSH)创建了 1 个 cDNA 文库来确定低氧反应信号转换通路和相关基因,并使用该文库创立微阵列检测,筛选与缺氧耐受能力相关的基因型。该文库涵盖了 300 多个低氧上调表达的表达序列标记和基因。SSH 文库除拥有低氧适应主要相关基因外还涵盖了参与糖代谢、细胞凋亡和神经传导等方面

的相关基因,这些低氧调节相关基因已通过微阵列分析法、实时 PCR 法和蛋白印迹法得到验证^[43]。

对牦牛基因组水平的进化分析,可以识别进化过程中自然选择对牦牛基因组的影响,并能进一步解析牦牛多种抗逆特性的分子机制及其适应高原环境的能力。使用共线性的方法,从人、黄牛和牦牛等 7 个物种中鉴定了 8 923 个高质量的同源基因,对这些同源基因做抗逆适应性进化分析,结果显示牦牛中与能量代谢和低氧应答相关的基因进化速率明显快于黄牛。将同源基因进行自然选择分析,识别了 5 个(*Camk2b*、*Gcnt3*、*Hsd17b12*、*Whscl*、*Glul*)与营养能量代谢以及 3 个(*Adam17*、*Arg2*、*Mmp3*)与低氧应答相关的正选择基因,这些基因可能与牦牛在高原地区牧草资源稀缺的环境下维持高效的能量代谢以及低氧环境生存密切相关。此外,分子钟方法估算表明牦牛和黄牛大约在 500 万年前分化,这与人和黑猩猩的分化时间基本相同^[44]。

4 展望

我国有上千万人生活在面积约 250 万 km² 的高原之上,每年有大量的游客去高原,游客中有很多为高原不适应者。对低氧适应分子机制的研究将有助于对这些人的体质进行判断,并进行相应的治疗。低氧代谢通路与多种疾病如心血管疾病、肿瘤的发生发展密切相关^[45]。随着全球人口的快速增长,高原的战略地位也愈显重要。人们在过去的 30 年里投入了大量的人力物力进行低氧分子机制的研究,高海拔适应是许多基因调控和蛋白结构的协调变化,同时也需这些基因相互作用。目前,对藏羚羊的低氧适应“遗传基础”^[46]与藏獒低氧适应机制^[47]研究有了突破性进展,对牦牛低氧适应的研究虽已经取得一定的成绩,但就揭示牦牛高原低氧适应生理机理和分子机制还有一定距离,有许多问题需要进一步研究与探讨,如基因组分析中基因组的充分注释、相关候选基因试验验证和转录组的研究等。为更全面了解高海拔适应的分子机制,需扩大基因组研究的范围,并对序列多态性与转录变异分析等进行整合分析。全基因组基因表达变化的分析增加我们对高原适应转录调控变异的了解,总的来说研究牦牛对高原低氧适应,应该多领域、多学科共同分析与研究。

参考文献:

- [1] Ge R L, Chen Q H, Wang L H, et al. Higher exercise performance and lower VO₂max in Tibetan than Han residents at 4 700 m altitude [J]. *Journal of Applied Physiology*, 1994, 77(2): 684-691.
- [2] Ge R L, He G W, Chen Q H, et al. Comparisons of oxygen transport between Tibetan and Han residents at moderate altitude [J]. *Wilderness & Environmental Medicine*, 1995, 6(4): 391-400.
- [3] Hassanin A, Ropiquet A, Couloux A, et al. Evolution of the mitochondrial genome in mammals living at high altitude: new insights from a study of the tribe Caprini (Bovidae, Antilopinae) [J]. *Journal of Molecular Evolution*, 2009, 68(4): 293-310.
- [4] Cai L, Wiener G. The yak [R]. Bangkok, Thailand: FAO Regional Office for Asia and the Pacific, 1995: 47-52.
- [5] 杨波. 不同年龄牦牛肺脏支气管系的形态结构 [D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2010.
- [6] 成令忠, 钟翠平, 蔡文琴. 现代组织学 [M]. 上海: 上海科学技术

- 文献出版社,2003.
- [7] 杨 琨. 牦牛胎儿肺脏发育的形态学研究[D]. 兰州:甘肃农业大学,2012.
 - [8] 魏 青. 不同发育阶段高原牦牛和平原黄牛肺泡显微结构的研究[D]. 西宁:青海大学,2007.
 - [9] 俞红贤,莫重存. 青海牦牛心脏的比较解剖学特点[J]. 黑龙江畜牧兽医,2000(6):4-5.
 - [10] 李春生. 大通牦牛生理生化指标的测定[J]. 黑龙江畜牧兽医,2014,2(3):168-170.
 - [11] Brown R E. The pattern of the microcirculatory bed in the ventricular myocardium of domestic mammals[J]. The American Journal of Anatomy,1965,116(2):355-374.
 - [12] 贺延玉. 牦牦牛和成年牦牛心脏微血管构筑的研究[D]. 兰州:甘肃农业大学,2007.
 - [13] 伊平昌,顾冬花. 大通县高原型牦牛12项血液指标的测定[J]. 四川畜牧兽医,2014(2):29-30.
 - [14] Toi M,Matsumoto T,Bando H. Vascular endothelial growth factor: its prognostic, predictive, and therapeutic implications[J]. The Lancet Oncology,2001,2(11):667-673.
 - [15] Olofsson B,Jeltsch M,Eriksson U,et al. Current biology of VEGF-B and VEGF-C[J]. Current Opinion in Biotechnology,1999,10(6):528-535.
 - [16] Mäkinen T,Jussila L,Veikkola T,et al. Inhibition of lymphangiogenesis with resulting lymphedema in transgenic mice expressing soluble VEGF receptor-3[J]. Nature Medicine,2001,7(2):199-205.
 - [17] 吴晓云. 牦牛 *EPAS1* 和 *VEGF-A* 基因的克隆、SNPs 检测及其表达分析[D]. 兰州:甘肃农业大学,2012.
 - [18] Simonson T S,Yang Y Z,Huff C D,et al. Genetic evidence for high-altitude adaptation in Tibet[J]. Science,2010,329(5987):72-75.
 - [19] Favier J,Kempf H,Corvol P,et al. Coexpression of endothelial PAS protein 1 with essential angiogenic factors suggests its involvement in human vascular development[J]. Developmental Dynamics,2001,222(3):377-388.
 - [20] Hu C J,Wang L Y,Chodosh L A,et al. Differential roles of hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) and HIF-2 α in hypoxic gene regulation[J]. Molecular and Cellular Biology,2003,23(24):9361-9374.
 - [21] Asikainen T M,Ahmad A,Schneider B K,et al. Stimulation of HIF-1 α ,HIF-2 α ,and VEGF by prolyl 4-hydroxylase inhibition in human lung endothelial and epithelial cells[J]. Free Radical Biology and Medicine,2005,38(8):1002-1013.
 - [22] Morita Masanobu,Ohneda O,Yamashita T,et al. HLF/HIF-2 α is a key factor in retinopathy of prematurity in association with erythropoietin[J]. The EMBO Journal,2003,22(5):1134-1146.
 - [23] Reynafarje C,Lozano R,Valdivieso J. The polycythemia of high altitudes:Iron metabolism and related aspects[J]. Blood,1959,14(4):433-455.
 - [24] Jacobson L O,Goldwasser E,Fried W,et al. Role of the kidney in erythropoiesis[J]. Nature,1957,179(4560):633-634.
 - [25] Sawyer S T,Penta K. Association of JAK2 and STAT5 with erythropoietin receptors. Role of receptor phosphorylation in erythropoietin signal transduction[J]. The Journal of Biological Chemistry,1996,271(50):32430-32437.
 - [26] Mulcahy L. The erythropoietin receptor[J]. Seminars in Oncology,2001,28:19-23.
 - [27] Yoshimura A,Zimmers T,Neumann D,et al. Mutations in the Trp-Ser-X-Trp-Ser motif of the erythropoietin receptor abolish processing,ligand binding, and activation of the receptor[J]. The Journal of Biological Chemistry,1992,267(16):11619-11625.
 - [28] 钟金城. 牦牛几个功能基因的结构及其系统进化研究[D]. 成都:电子科技大学,2008.
 - [29] 许海霞,吴建平,张利平,等. 牦牛、黄牛和绵羊 *EPO* 基因部分片段遗传多态性分析[J]. 中国兽医学报,2013,33(6):950-955.
 - [30] Semenza G L. Hypoxia-Inducible factors in physiology and medicine[J]. Cell,2012,148(3):399-408.
 - [31] Makino Y,Cao R,Svensson K,et al. Inhibitory PAS domain protein is a negative regulator of hypoxia-inducible gene expression[J]. Nature,2001,414(6863):550-554.
 - [32] Yi X,Liang Y,Huerta-Sanchez E,et al. Sequencing of 50 human exomes reveals adaptation to high altitude[J]. Science,2010,329(5987):75-78.
 - [33] 钱令嘉. 低氧适应相关基因及其研究策略的思考[J]. 中国基础科学,2001(9):10-15.
 - [34] 王德朋,李红阁,郭松长,等. 青海家牦牛 *HIF-1 α* 基因组织特异性表达[J]. 安徽农业科学,2007,35(29):9173-9175.
 - [35] Papa S. Mitochondrial oxidative phosphorylation changes in the Life span. Molecular aspects and physiopathological implications[J]. Biochimica et Biophysica Acta:Bioenergetics,1996,1276(2):87-105.
 - [36] Kaelin W G. ROS: really involved in oxygen sensing[J]. Cell Metabolism,2005,1(6):357-358.
 - [37] Rumsey W L,Abbott B,Bertelsen D,et al. Adaptation to hypoxia alters energy metabolism in rat heart[J]. The American Journal of Physiology,1999,276(1/2):H71-H80.
 - [38] Ali S S,Hsiao M,Zhao H W,et al. Hypoxia-adaptation involves mitochondrial metabolic depression and decreased ROS leakage[J]. PLoS One,2012,7(5):e36801.
 - [39] 左清清,姚 娜,董坤哲,等. 低氧适应的线粒体调控机制研究进展[J]. 畜牧兽医学报,2013,44(7):993-999.
 - [40] 王 勇,李 莉. 不同海拔地区牦牛组织线粒体 LDH 活性测定[J]. 安徽农业科学,2008,36(33):14536-14537.
 - [41] Amano T,Yamado W,Nabika T. Polymorphism of blood protein in native cattle, yaks and their hybrids in Tibet[J]. Report of the Society for Researches on Native Livestock,1990,13:1-11.
 - [42] 韩树鑫,苟 潇,杨舒黎. 动物低氧适应的生理与分子机制[J]. 中国畜牧兽医,2010,37(9):29-34.
 - [43] Seta Karen A,Millhorn D E. Functional genomics approach to hypoxia signaling[J]. Journal of Applied Physiology,2004,96(2):765-773.
 - [44] 胡泉军. 牦牛基因组数据库建设[D]. 兰州:兰州大学,2014.
 - [45] Lendahl U,Lee K L,Yang H,et al. Generating specificity and diversity in the transcriptional response to hypoxia[J]. Nature Reviews Genetics,2009,10(12):821-832.
 - [46] Ma L,Shao X J,Wang Y P,et al. Molecular cloning, characterization and expression of myoglobin in Tibetan antelope (*Pantholops hodgsonii*), a species with hypoxic tolerance[J]. Gene,2014,533(2):532-537.
 - [47] Gou X,Wang Z,Li N,et al. Whole-genome sequencing of six dog breeds from continuous altitudes reveals adaptation to high-altitude hypoxia[J]. Genome Research,2014,24(8):1308-1315.