

# 高原鼯鼠肺组织细胞凋亡相关基因的进化分析及其在不同海拔条件下的表达模式

安志芳<sup>①②</sup> 魏琳娜<sup>③</sup> 王志洁<sup>①②</sup> 李苏华<sup>①②</sup>  
徐波<sup>①③</sup> 魏莲<sup>③</sup> 魏登邦<sup>①②\*</sup>

① 青海大学省部共建三江源生态与高原农牧业国家重点实验室 西宁 810016;

② 青海大学医学院 西宁 810016; ③ 青海大学农牧学院 西宁 810016

**摘要:** 高原鼯鼠 (*Myospalax baileyi*) 是青藏高原特有的地下鼠, 其地下洞道严重缺氧。一般来说, 低氧会促进细胞凋亡。为了探讨高原鼯鼠适应低氧环境的分子机制, 本文应用生物信息学方法对 p53 下游凋亡促进基因 *Pidd*、*Fas*、*Bax*、*Puma*、*Apaf-1*、*Scotin*、*Perp*、*Igfbp3* 和凋亡抑制基因 *Bcl-2* 的序列和编码的氨基酸序列进行了进化分析, 并以 SD 大鼠 (*Rattus norvegicus*) 为对照, 研究了这些基因在不同海拔环境条件下 (3 300 m 和 2 260 m) 的表达模式。结果表明: (1) 高原鼯鼠细胞凋亡基因的序列与以色列鼯鼠 (*Nannospalax galili*) 同源性最高; 预测的 PIDD、PUMA、Apaf-1、IGFBP3 和 BCL-2 编码蛋白结构域与以色列鼯鼠的存在明显的趋同进化位点; SIFT 评估发现, 高原鼯鼠和以色列鼯鼠与其他物种相比, p53、PIDD、PUMA、Apaf-1 和 IGFBP3 氨基酸序列分别在 78、853、157、320 和 285 号位点的变异对其功能有显著影响; (2) 在高海拔条件下 (3 300 m), 高原鼯鼠肺组织中凋亡促进基因 *Pidd*、*Bax*、*Puma* 和 *Apaf-1* 表达水平显著下降, 凋亡抑制基因 *Bcl-2* 表达水平显著升高, 而在 SD 大鼠中凋亡促进基因和凋亡抑制基因的表达水平均没有变化; 高原鼯鼠中 *Bcl-2/Bax* 比值随海拔的升高显著上升, 而在 SD 大鼠中没有变化。以上结果提示, 高原鼯鼠 p53 结构变异可能导致其下游基因表达模式与 SD 大鼠不同, 其中凋亡促进基因 *Pidd*、*Bax*、*Puma* 和 *Apaf-1* 表达水平下降, 凋亡抑制基因 *Bcl-2* 表达水平上升, 从而抑制了细胞在低氧条件下的凋亡; 在长期低氧的作用下, 高原鼯鼠 p53 下游基因产物 PIDD、PUMA、Apaf-1 和 IGFBP3 产生了影响其功能的变异位点, 这可能改变了它们与发挥功能的复合物的结合力, 从而抑制了细胞凋亡。因此, 通过长期的低氧适应, 高原鼯鼠肺组织中与细胞凋亡相关的基因产物结构发生变异, 导致其基因表达水平发生变化, 从而抑制细胞凋亡, 这是高原鼯鼠适应地下低氧洞道生境的分子机制之一。

**关键词:** 高原鼯鼠; 细胞凋亡基因; 进化分析; 表达; 低氧

**中图分类号:** Q786 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263 (2019) 04-549-18

**基金项目** 青海省自然科学基金项目 (No. 2016-ZJ-901) ;

\* 通讯作者, E-mail: weidengbang@163.com;

**第一作者介绍** 安志芳, 女, 博士研究生; 研究方向: 高原医学; E-mail: anzhi Fang90@126.com。

收稿日期: 2018-11-05, 修回日期: 2019-04-02 DOI: 10.13859/j.cjz.201904012

## Evolution Analysis of Apoptotic Genes and Their Expression Patterns in Lung Tissues of Plateau Zokors (*Myospalax baileyi*) Inhabiting at Different Altitudes

AN Zhi-Fang<sup>①②</sup> WEI Lin-Na<sup>③</sup> WANG Zhi-Jie<sup>①②</sup> LI Su-Hua<sup>①②</sup>  
XU Bo<sup>①③</sup> WEI Lian<sup>③</sup> WEI Deng-Bang<sup>①②\*</sup>

① State Key Laboratory of Plateau Ecology and Agriculture, Qinghai University, Xining 810016;

② Medical College of Qinghai University, Xining 810016;

③ College of Agriculture and Animal Husbandry, Qinghai University, Xining 810016, China

**Abstract:** The plateau zokor (*Myospalax baileyi*) is a specialized subterranean rodent living on the Qinghai-Tibet Plateau, which is short of oxygen in burrows. In general, hypoxia can induce apoptosis. In order to shed lights into the molecular mechanism of the plateau zokor adaptation to the hypoxic environment, the sequences of *Pidd*, *Fas*, *Bax*, *Puma*, *Apaf-1*, *Scotin*, *Perp*, *Igfbp3* and *Bcl-2* were analyzed by MEGA 7.0, PAML4.8 program and Ancestor program. In addition, the expression levels of these genes were determined with real-time PCR in the lung tissues of zokors inhabiting at different altitudes (3 300 m and 2 260 m) and compared with the SD rats in this study. The sequences of the apoptotic target genes in plateau zokors were highly homologous those of *Nannospalax galili* (Table 2 and Table 3). PIDD (Fig. 2), PUMA (Fig. 3), Apaf-1 (Fig. 4), IGFBP3 (Fig. 5) and BCL-2 (Fig. 6) in plateau zokor and *Nannospalax galili* showed convergent sites in their functional domains. The SIFT test showed that, compared to other species, 78, 853, 157, 320 and 285 variation sites of plateau zokor and *Nannospalax galili* had effects on the function of p53, PIDD, PUMA, Apaf-1 and IGFBP3, respectively (Table 5). At the high altitude (3 300 m), the expression levels of proapoptotic genes *Pidd*, *Bax* and *Puma* were significantly decreased, while the expression level of antiapoptotic gene *Bcl-2* was significantly increased; instead, the expression levels of proapoptotic and antiapoptotic genes showed no significant difference in SD rats. The expression levels of apoptotic genes in plateau zokor were higher than in the SD rats (Fig. 7, 8). At the high altitude (3 300 m), the ratio of *Bcl-2/Bax* expression was significantly increased in plateau zokor, whereas that of the SD rat was not (Fig. 9). The results above suggested that site variation of p53 in plateau zokor resulted in different expression patterns of p53 targeted apoptotic genes from those in SD rat: the expression levels of proapoptotic genes *Pidd*, *Bax*, *Puma* and *Apaf-1* were decreased, while the expression level of antiapoptotic gene *Bcl-2* was increased, so as to inhibit apoptosis under hypoxic environment. Under the long-term hypoxia conditions, the p53 targeted proteins PIDD, PUMA, Apaf-1 and IGFBP3 had significant variation sites, which might alter their ability to combine with their functional complexes and inhibit apoptosis. Therefore, over the long-term hypoxia adaptation, the apoptotic genes of plateau zokor underwent structural variation, leading to change in the expression levels of these genes, and thereby inhibited apoptosis, which is one of the molecular mechanisms of plateau zokor adaption to the hypoxic burrowing environment.

**Key words:** Plateau zokor (*Myospalax baileyi*); Apoptotic target genes; Evolution analysis; Expression; Hypoxia

地下鼠是一类生活在完全封闭的地下洞道中的啮齿动物, 地下洞道生境的显著特征是严重的低氧和高二氧化碳浓度 (Shams et al. 2005, Nevo 2011)。在长期进化过程中, 地下鼠形成了一系列对低氧环境的适应策略 (Nevo et al. 2001, Fang et al. 2014)。研究表明, 地下鼠具有长寿和抗肿瘤的能力, 以色列鼯鼠 (*Nannospalax galili*) 和裸鼯鼠 (*Heterocephalus glaber*) 的寿命可长达 21 年和 30 年左右 (Edrey et al. 2012), 并且在多年的研究中没有发现肿瘤个体, 即使用致癌药物处理也并未发现患有肿瘤的个体 (Gorbunova et al. 2012, Manov et al. 2013)。说明地下鼠不仅具有有效抑制肿瘤产生的机制, 而且具有延长细胞寿命的机制。

一般来说, 低氧会促进细胞凋亡, 主要通过死亡受体介导的外源凋亡途径和线粒体介导的内源凋亡途径诱导发生 (Pan et al. 2014, Lohberger et al. 2016)。在低氧诱导的细胞凋亡过程中, 凋亡促进基因高表达, 凋亡抑制基因低表达 (McClintock et al. 2002, Gogvadze et al. 2006)。但是, 对以色列鼯鼠基因组和转录组的研究结果表明, 在低氧条件下其组织中与细胞凋亡负调控相关的基因富集表达 (Malik et al. 2011, 2012, Schmidt et al. 2017)。在低氧条件下 (6% O<sub>2</sub>) 处理 5 h 时, 以色列鼯鼠肌肉和心肌组织中 *Bnip3* 基因表达水平未发生显著变化, *Apaf-1* 基因表达水平显著下降 (Band et al. 2009, 2010)。因此, 在低氧条件下, 以色列鼯鼠组织中凋亡基因的表达模式与地面动物和细胞系不同。

已有研究表明, 在地下鼠中蛋白结构的变异对其功能的发挥起着重要作用, 如血红蛋白 (hemoglobin, Hb)、肌红蛋白 (myoglobin, Mb)、p53 等 (Gurnett et al. 1984, Kleinschmidt et al. 1984, Avivi et al. 2007)。p53 是一个肿瘤抑制因子, 它能够通过激活或抑制一系列诱导细胞凋亡的靶基因而抑制肿瘤生长 (Avivi et al. 2005)。在以色列鼯鼠中, p53 的 DNA 结合域中第 172 位由精氨酸突变为赖氨酸, 这种变异

使得凋亡促进基因 *Apaf-1* 不表达, *Puma*、*Noxa* 和 *Bax* 凋亡促进基因低表达, 减缓了细胞的凋亡 (Ashur-Fabian et al. 2004, Avivi et al. 2007)。Apaf-1 是 p53 下游重要的凋亡调控因子, 其启动子区含有 p53 应答元件 (p53 response elements, p53RE) (Kannan et al. 2001, Moroni et al. 2001)。以色列鼯鼠 Apaf-1 的第 4 个 p53 应答元件中缺失 A 和 G, 并且 p53RE 的核心 CWWG 基序中 GG 会抑制 p53 转录激活的作用, 从而使得以色列鼯鼠中 p53 具有较低的凋亡活性 (Wang et al. 2009, Band et al. 2010)。因此, 在以色列鼯鼠组织中细胞凋亡的调控不仅与凋亡相关基因的表达水平有关, 而且与 p53 及其下游基因变异有关。

高原鼯鼠 (*Myospalax baileyi*) 也是一种典型的地下鼠, 主要生活在青藏高原高海拔低氧环境中, 栖息地海拔在 2 800 ~ 4 200 m, 其洞道生境的显著特征也是严重的低氧和高二氧化碳浓度 (曾缙祥等 1984, 周文扬等 1990)。我们前期研究发现, 低氧显著上调高原鼯鼠肺组织中 p53 的表达水平, 但 SD 大鼠 (*Rattus norvegicus*) 对低氧不敏感, 并且高原鼯鼠 p53 与以色列鼯鼠存在两个趋同进化位点 (78 号和 84 号位点) (An et al. 2018)。Zhao 等 (2013) 的研究发现, 高原鼯鼠 p53 在 104 位的点突变虽然激活了下游凋亡促进基因 *Igfbp3*、*Apaf-1* 和 *Bax* 的表达, 但是它失去了对凋亡抑制基因 *Bcl-2* 的转录抑制作用, 使其表达水平升高, 这与对以色列鼯鼠凋亡抑制基因的研究结果一致 (Wang et al. 2009, Band et al. 2010)。目前, 高原鼯鼠细胞凋亡的研究只针对 p53 对其下游个别基因表达调控作用的探讨, 并且高原鼯鼠细胞凋亡因子结构的变异对其功能的影响鲜见报道。因此, 为了进一步深入了解低氧条件下高原鼯鼠组织中细胞凋亡的调控, 本文应用生物信息学方法对 p53 下游细胞凋亡基因 *Pidd*、*Fas*、*Bax*、*Puma*、*Apaf-1*、*Scotin*、*Perp*、*Igfbp3*、*Bcl-2* 的序列和所编码氨基酸序列进行了进化分析, 并以 SD 大鼠为对照, 研究了在不同海

海拔条件下 (3 300 m 和 2 260 m) 上述基因在高原鼯鼠肺组织中的表达模式。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

高原鼯鼠捕捉于青海省西宁市湟源区宗家沟 (北纬 36°43', 东经 101°17', 海拔 3 300 m), 样本量为 16 只, 随机分为 2 组, 每组各 8 只。第 1 组为高海拔组 (海拔 3 300 m); 第 2 组为低海拔组 (海拔 2 260 m), 将捕捉于湟源区宗家沟的高原鼯鼠置于西宁实验室黑暗无光照条件下饲养 8 d, 鼠笼内铺满干草和木屑作为垫料。SD 大鼠购买于甘肃省兰州市 (海拔 1 520 m), 样本量为 16 只, 随机分为 2 组, 每组各 8 只。第 1 组为高海拔组 (海拔 3 300 m), 将从兰州购买的 SD 大鼠在西宁实验室静息 48 h 后运输至青海省西宁市湟源区宗家沟 (海拔 3 300 m) 饲养 8 d; 第 2 组为低海拔组 (海拔 2 260 m), 将购买的 SD 大鼠置于西宁实验室 (海拔 2 260 m) 饲养 8 d。饲养过程中喂食大鼠维持鼠料和水。所有实验动物取样均在实验室进行, 用 5% 戊巴比妥钠麻醉高原鼯鼠和 SD 大鼠后, 采集肺组织样品立即置于液氮中保存, 采样过程中所涉及处理动物的措施均按照国家《实验动物管理条例 (GB14923-2010)》执行。

### 1.2 细胞凋亡基因序列分析

**1.2.1 序列获取** 从 NCBI 公共数据库下载以色列鼯鼠、大鼠、小鼠 (*Mus musculus*)、橙腹草原田鼠 (*Microtus ochrogaster*)、金仓鼠 (*Mesocricetus auratus*)、黑线仓鼠 (*Cricetulus griseus*)、突尼斯非洲跳鼠 (*Jaculus jaculus*)、裸鼯鼠、达马拉鼯鼠 (*Fukomys damarensis*)、豚鼠 (*Cavia porcellus*)、毛丝鼠 (*Chinchilla lanigera*)、智利八齿鼠 (*Octodon degus*)、多纹黄鼠 (*Ictidomys tridecemlineatus*)、北美鼠兔 (*Ochotona princeps*)、野兔 (*Oryctolagus cuniculus*)、家牛 (*Bos taurus*)、绵羊 (*Ovis aries*)、山羊 (*Capra hircus*)、人 (*Homo sapiens*)、黑猩猩 (*Pan troglodytes*) 细胞凋亡基因 *Pidd*、

*Fas*、*Bax*、*Puma*、*Apaf-1*、*Scotin*、*Perp*、*Igfbp3* 和 *Bcl-2* 的碱基及编码的氨基酸序列。高原鼯鼠和高原鼠兔 (*Ochotona curzoniae*) 细胞凋亡基因的碱基序列利用 Blast 程序将三代转录组数据库中全长非嵌合序列文件以及二代转录组数据库中的 Trinity 文件, 构建本地 Blast 数据库。分别用以色列鼯鼠和北美鼠兔上述凋亡基因的编码区序列作为 query 文件进行 Blast 比对筛选。使用 DNASTAR 中的 Lastergene 程序 (Burland 2000) 拼接筛选出的基因片段序列, 最终获得完整的编码区碱基序列。使用 MEGA7.0 软件 (Kumar et al. 2016) 将所有比对以及拼接筛选出的序列进行比对, 挑选与以色列鼯鼠和北美鼠兔同源性最高的一段序列作为目标基因的编码区序列。利用基因探索者软件 (White et al. 2008) 将编码区序列翻译成氨基酸序列。

**1.2.2 同源性分析** 将高原鼯鼠、以色列鼯鼠、裸鼯鼠、大鼠、小鼠、高原鼠兔、北美鼠兔和人的 *Pidd*、*Fas*、*Bax*、*Puma*、*Apaf-1*、*Scotin*、*Perp*、*Igfbp3* 和 *Bcl-2* 的基因序列与编码的氨基酸序列用 DNAMAN 9.0 和 MEGA 7.0 软件进行同源性分析。

**1.2.3 物种树构建方法** 从 NCBI 公共数据库中检索并下载 1.2.1 中包括高原鼯鼠和高原鼠兔在内的 22 个物种 (啮齿目 14 个物种、兔形目 3 个物种、偶蹄目 3 个物种和灵长目 2 个物种) 的线粒体 DNA 全基因组序列, 用贝叶斯算法的 MrBayes3.2 (Huelsenbeck et al. 2001) 软件构建贝叶斯系统进化树。利用 DAMBE 软件进行饱和度检测, 若指标分数 (index score, ISS) 小于临界分数 (critical score, ISS.c), 则表明序列替代没有饱和, 进一步采用 PAUP 4.0 (Swofford 2002) 和 Modeltest 2.3 (Darriba et al. 2012) 程序筛选最优的模型, 以赤池信息量准则 (akaike information criterion, AIC) (Bozdogan 1987) 为标准进行最优模型的筛选与确定, 采用马尔科夫链蒙特卡罗运算 (Markov chain Monte Carlo, MCMC), 以随机数树为起始, 当

运行 2 条和 4 条(1 条冷链和 3 条热链)MCMC 时, 分歧频率的标准差稳定的小于 0.01 为止。在贝叶斯系统发育树构建的过程中, 共进行了 1 000 000 代的 MCMC 运算, 设置每 100 代间隔进行一次抽样, 舍弃起始老化样本数 (burn-in) 占总数的 25% (Wang et al. 2016)。利用 TreeGraph 2.7.1 软件作图。

**1.2.4 选择压力分析** 将 22 个物种的 *Pidd*、*Fas*、*Bax*、*Puma*、*Apaf-1*、*Scotin*、*Perp*、*Igfbp3* 和 *Bcl-2* 基因编码区序列分别用 ClustalX 1.81 软件进行比对。比对后的结果利用 MEGA 7.0 进行格式转换, 应用 PAML 4.8 软件包中的 CODEML 程序 (Zhang et al. 2005, Yang 2007) 中改进的分支位点模型 (“test2”) 对基因序列进行正向选择分析, 该模型是基于最大似然法。将高原鼯鼠设为前景枝 (foreground branch), 其余枝系设为背景枝 (background branch), 先用 model A 检测前景枝中是否存在显著的正选择位点, 检测标准为贝叶斯经验贝叶斯值 (Bayes empirical Bayes, BEB) 大于 0.95; 再将控制文件 (codmel.ctl) 中的 fix omega 和 omega 值都设定为 1, 作为 Null A 进行第二次运算, 提取两次运算得到的 lnL 值, 分别记为 lnL1 和 lnL0, 计算其加倍差值  $2 \times \Delta \ln L$ 。最后利用 PAML 4.8 软件包中的 Chi2 程序, 基于  $2 \times \Delta \ln L$  值计算模型的后验概率  $P$  值 ( $df=1$ ), 当  $P < 0.05$  时, 可认为此模型得到的结果较可靠。

**1.2.5 趋同进化分析** 选用高原鼯鼠、以色列鼯鼠、大鼠、小鼠、裸鼯鼠、高原鼠兔、北美鼠兔、家牛、绵羊、人和黑猩猩等 22 个物种, 对 *PIDD*、*Fas*、*Bax*、*PUMA*、*Apaf-1*、*Scotin*、*PERP*、*IGFBP3* 和 *BCL-2* 的氨基酸序列进行地下鼠趋同进化分析。利用 DNAMAN 9.0 软件进行序列比对, 使用 PAML 4.8 软件包中的 CODEML 程序 (Yang 2007) 对每一组蛋白序列进行了祖先序列重建。用重建后祖先位点的后验概率 (posterior probability) 来评估重建结果的准确性。由于祖先位点多态性会干扰后续

的分析, 因此舍弃后验概率小于 0.9 的位点。应用 converg2 软件 (Zhang et al. 1997) 检验趋同进化位点的显著性; 应用 MEGA 7.0 程序中的 ClustalW 模式对 22 个哺乳动物的氨基酸序列进行比对, 去掉所有空格 (gap), 并按指定格式做出系统发育树, 然后输入树文件和序列文件并应用 JTT 距离矩阵模型 (Jones-Taylor-Thornton, JTT) 和泊松校正模型 (Poisson correction model) 分别计算, 参数使用默认值, 舍弃  $P > 0.05$  的结果 (Zhang et al. 1997)。

**1.2.6 变异位点对基因功能影响的评估** 从 NCBI 和 Ensembl 数据库中下载得到小鼠 p53、PIDD、Fas、Bax、PUMA、Apaf-1、Scotin、PERP、IGFBP3 和 BCL-2 的蛋白 ID, 以该氨基酸序列作为 query 序列采用 “Sorting Tolerant From Intolerant” (SIFT) algorithm 程序评估氨基酸变异位点对该基因功能的影响, 其中参数的设置使用默认值 (Kumar et al. 2009)。

### 1.3 高原鼯鼠细胞凋亡基因表达水平测定

利用总 RNA 抽提试剂盒 (天根生化科技有限公司) 提取高原鼯鼠和 SD 大鼠肺组织总 RNA, 核酸蛋白含量检测仪测定  $A_{260}/A_{280}$  值及浓度, 其中  $A_{260}/A_{280}$  的值在 1.8 至 2.0 之间, 浓度均大于 0.4 g/L, 1% 甲醛变性凝胶电泳检测其质量。取 1.9  $\mu\text{g}$  总 RNA 采用 First Strand cDNA Synthesis kit (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) 试剂盒制备 cDNA。高原鼯鼠 *Pidd*、*Fas*、*Bax*、*Puma*、*Apaf-1*、*Scotin*、*Perp*、*Igfbp3* 和 *Bcl-2* 基因的序列从三代转录组数据库中全长非嵌合序列文件以及二代转录组数据库中的 Trinity 文件中拼接比对得到, SD 大鼠基因的序列从 NCBI 下载得到。在高原鼯鼠和 SD 大鼠基因序列的同源区利用 Beacon Designer 7.7 软件设计荧光定量特异性引物 (表 1), 并由南京金斯瑞生物科技有限公司进行引物合成。

按照 Premix Ex Taq Version 试剂盒 (Takara, Japan) 说明配置 PCR 反应体系进行 PCR 扩增, 将产物切胶回收, 用回收后的产物进行 10 倍梯度稀释, 设定原 PCR 产物的浓度

表 1 荧光定量引物序列

Table 1 Quantitative PCR primers for genes

引物名称 Primer names	引物序列 Primer sequences (5'-3')
<i>Pidd</i> -F	CTACCGTGAAC TACAGCGTATC
<i>Pidd</i> -R	ACCTCTTCAGCCACATCCT
<i>Fas</i> -F	GCCAGTTCTGCTGCTTACC
<i>Fas</i> -R	GAATAATGCTCCTTGCCGTGTA
<i>Bax</i> -F	GCGATGAACTGGACAACAACA
<i>Bax</i> -R	CTGCCACACGGAAGAAGAC
<i>Puma</i> -F	CAGGGTGGTGGGTGGTAA
<i>Puma</i> -R	CGGGCGACTCTAGGTGTT
<i>Apaf</i> -1-F	GGAGACTGAGGAGTTGAAGA
<i>Apaf</i> -1-R	GCGTATGCGGCTGGTAAT
<i>Scotin</i> -F	CTGCTCCTGCTGCTGCTA
<i>Scotin</i> -R	CGGTGTGAACCACGGTAGTA
<i>Perp</i> -F	GCAGTCTAGCAACCACATC
<i>Perp</i> -R	GCAGCCATCGTCGTAGGA
<i>Igfbp3</i> -F	TGGTGTGTGGACAAGTATG
<i>Igfbp3</i> -R	AGTTCACTTCGCTCTCC
<i>Bcl</i> -2-F	TGTTACGGTGGTGGAGGA
<i>Bcl</i> -2-R	CGGTTCAGGTAGTCAGTCATC
$\beta$ - <i>actin</i> -F	TCACCAACTGGGACGATATG
$\beta$ - <i>actin</i> -R	GTTGGCCTTAGGGTTACAGAG

为 1, 分别稀释为  $1 \times 10^{-1}$ 、 $1 \times 10^{-2}$ 、 $1 \times 10^{-3}$ 、 $1 \times 10^{-4}$ 、 $1 \times 10^{-5}$ 、 $1 \times 10^{-6}$ 、 $1 \times 10^{-7}$ 、 $1 \times 10^{-8}$

共 8 个梯度, 作为标准品备用。荧光定量 PCR 按照 SYBR®Premix Ex Taq™ II 试剂盒 (Takara, Japan) 在 iQ5 Multicolor Real-Time PCR Detection System (美国伯乐公司) 上进行。荧光定量 PCR 反应体系: 12.5  $\mu$ l SYBR Premix Ex Taq II, 10 mol/L 特异引物 F、R 各 1  $\mu$ l, 1  $\mu$ l cDNA (0.2 g/L), 加水至总体积 25  $\mu$ l。反应条件: 95  $^{\circ}$ C 3 min; 95  $^{\circ}$ C 30 s, 60  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 30 s, 40 个循环。BIO-RAD connect 软件采集和分析数据, 根据软件采集到的数据得到目的基因和管家基因的浓度。每个样品的目的基因浓度除以其管家基因的浓度, 即为此样品基因校正后的相对含量。实验数据均以平均值  $\pm$  标准差 (Mean  $\pm$  SD) 表示, 采用 SAS 8.2 统计软件进行数据统计分析, 采用独立样本 *t* 检验方法进行相对表达量的比较, *P* < 0.05 为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 高原鼢鼠细胞凋亡基因同源性比对结果

同源性比较发现, 高原鼢鼠细胞凋亡基因 *Pidd*、*Fas*、*Bax*、*Puma*、*Apaf*-1、*Scotin*、*Perp*、*Igfbp3* 和 *Bcl*-2 编码区序列及编码的氨基酸序列与以色列鼢鼠同源性最高 (表 2, 3)。

表 2 高原鼢鼠与其他物种细胞凋亡基因序列同源性比较 (%)

Table 2 Sequence homology of apoptosis genes between Plateau Zokor and other species

基因 Genes	以色列鼢鼠 <i>Nannospalax galili</i>	裸鼢鼠 <i>Heterocephalus glaber</i>	大鼠 <i>Rattus norvegicus</i>	小鼠 <i>Mus musculus</i>	高原鼠兔 <i>Ochotona curzoniae</i>	北美鼠兔 <i>O. princeps</i>	人 <i>Homo sapiens</i>
<i>Pidd</i>	91.50	88.05	85.05	85.78	74.90	75.41	79.78
<i>Fas</i>	84.02	68.32	68.26	68.63	65.10	49.90	68.32
<i>Bax</i>	95.02	73.36	91.88	91.19	84.97	72.19	90.33
<i>Puma</i>	95.19	79.37	92.27	90.89	87.80	87.69	90.89
<i>Apaf</i> -1	94.00	88.39	87.54	88.23	78.22	80.38	88.98
<i>Scotin</i>	91.29	78.37	—	78.32	75.75	76.05	80.30
<i>Perp</i>	95.19	89.69	90.89	89.00	88.14	87.46	90.55
<i>Igfbp3</i>	93.64	68.97	87.95	87.39	—	—	82.57
<i>Bcl</i> -2	95.92	89.58	90.72	91.14	84.91	84.91	89.03

表中 “—” 表示该物种的细胞凋亡基因的序列未从 NCBI 公共数据库中查询到。

The short dashes in the table indicated that the sequences of apoptosis genes of this species were not found from the NCBI.

表 3 高原鼢鼠与其他物种细胞凋亡基因编码的氨基酸序列同源性比较 (%)

Table 3 Amino acid sequence homology of apoptosis genes between Plateau Zokor and other species

基因 Genes	以色列鼢鼠 <i>Nannospalax galili</i>	裸鼢鼠 <i>Heterocephalus glaber</i>	大鼠 <i>Rattus norvegicus</i>	小鼠 <i>Mus musculus</i>	高原鼠兔 <i>Ochotona curzoniae</i>	北美鼠兔 <i>Ochotona princeps</i>	人 <i>Homo sapiens</i>
<i>Pidd</i>	91.56	79.85	85.87	86.60	74.40	74.84	79.62
<i>Fas</i>	77.58	55.56	56.59	54.01	53.96	31.85	55.56
<i>Bax</i>	97.93	76.06	95.83	96.88	85.94	71.88	93.23
<i>Puma</i>	96.37	80.86	95.34	94.82	87.56	86.60	92.75
<i>Apaf-1</i>	94.00	88.39	90.71	91.51	77.10	79.02	88.15
<i>Scotin</i>	90.42	78.84	-	72.65	73.88	75.31	76.76
<i>Perp</i>	97.41	89.64	93.78	90.67	91.71	91.19	93.26
<i>Igfbp3</i>	96.23	69.28	84.59	85.96	-	-	90.94
<i>Bcl-2</i>	97.88	90.38	90.25	92.37	86.78	86.36	89.54

表中“-”表示该物种的细胞凋亡基因的序列未从 NCBI 公共数据库中查询到。

The short dashes in the table indicated that the sequences of apoptosis genes of this species were not found from the NCBI.

## 2.2 物种树的构建

基于线粒体 DNA 全基因组序列构建物种进化树。DAMBE 饱和度检测结果显示, ISS < ISS.c (ISS = 0.685, ISS.c = 0.830,  $P < 0.01$ ), 说明核酸替换未达到饱和, 适合建树。最佳 DNA

进化替代模型采用 with gamma- distributed rate variation across sites 和 a proportion of invariable sites 的 GTR 模型。所得的贝叶斯树各枝的支持率都大于 85% (图 1), 说明构建的该物种树准确度高, 可以用于后续研究。

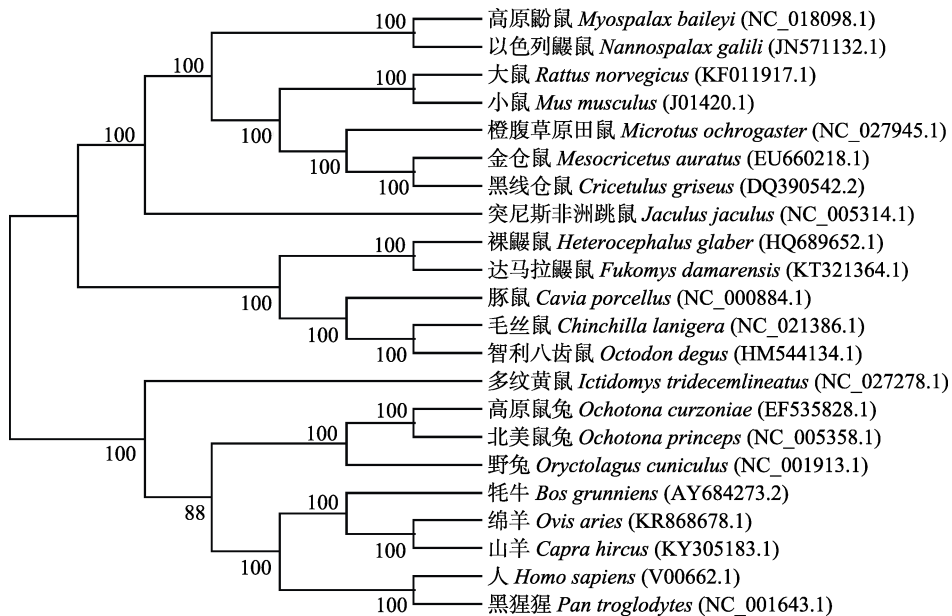


图 1 22 种哺乳动物的 mtDNA 系统进化树

Fig. 1 Phylogenetic tree of 22 mammalian species based on mtDNA

节点上数据表示 1 000 次重复的支持率 (%), 括号内字符为该物种 GenBank 登录号。

Numbers at the nodes the bootstrap values of 1 000 replicates (%), the GenBank numbers of species are shown in brackets.

### 2.3 高原麝鼠细胞凋亡基因选择压力分析

基于图 1 构建的 22 个物种的进化树,检测高原麝鼠细胞凋亡基因 *Pidd*、*Fas*、*Bax*、*Puma*、*Apaf-1*、*Scotin*、*Perp*、*Igfbp3* 和 *Bcl-2* 是否具有正向选择位点。*Fas*、*Bax*、*Apaf-1*、*Scotin*、*Igfbp3* 和 *Bcl-2* 基因未发现正向选择位点; *Pidd* 基因有 2 个潜在的正向选择位点, 分别为 853 位的精氨酸 (Arg) 和 898 位的缬氨酸 (Val);

*Puma* 基因有 1 个潜在的正向选择位点, 为 161 位的谷氨酰胺 (Gln); *Perp* 有 1 个潜在的正向选择位点, 为 21 号位的半胱氨酸。但是似然比检验法显示这些位点的差异不显著 ( $2\Delta\ln L = 0, P = 1$ ) (表 4)。

### 2.4 细胞凋亡基因趋同进化分析

选用图 1 中的 22 个物种,对细胞凋亡基因 *PIDD*、*Fas*、*Bax*、*PUMA*、*Apaf-1*、*Scotin*、

表 4 高原麝鼠 p53 下游与细胞凋亡调控相关靶基因的选择压力似然比检验

Table 4 Likelihood ratio test (LRT) of branch-site models for p53 target genes related to apoptosis in Plateau Zokor

基因 Genes	模型 Model	参数估计 Estimate of parameters	似然率值 - lnL <sup>a</sup>	模型比较 Model comparison	正向选择位点 Positively selected sites	2 倍差值(P 值) 2ΔlnL (P-value)
<i>Pidd</i>	Null A	$p_0 = 0.76, p_1 = 0.24, (p_2 + p_3 = 0.00), \omega_0 = 0.07, \omega_1 = 1.00, \omega_2 = 1.00$	- 19 516.5	Model A vs. Null A	853 R, 898 V	0 ( $P = 1$ )
	Model A	$p_0 = 0.76, p_1 = 0.24, (p_2 + p_3 = 0.00), \omega_0 = 0.07, \omega_1 = 1.00, \omega_2 = 1.00$	- 19 516.5			
<i>Fas</i>	Null A	$p_0 = 0.42, p_1 = 0.58, (p_2 + p_3 = 0.00), \omega_0 = 0.14, \omega_1 = 1.00, \omega_2 = 1.00$	- 12 646.2	Model A vs. Null A		0 ( $P = 1$ )
	Model A	$p_0 = 0.42, p_1 = 0.58, (p_2 + p_3 = 0.00), \omega_0 = 0.14, \omega_1 = 1.00, \omega_2 = 1.00$	- 12 646.2			
<i>Bax</i>	Null A	$p_0 = 0.97, p_1 = 0.03, (p_2 + p_3 = 0.00), \omega_0 = 0.08, \omega_1 = 1.00, \omega_2 = 1.00$	- 3 354.35	Model A vs. Null A		0 ( $P = 1$ )
	Model A	$p_0 = 0.97, p_1 = 0.03, (p_2 + p_3 = 0.00), \omega_0 = 0.08, \omega_1 = 1.00, \omega_2 = 1.00$	- 3 354.35			
<i>Puma</i>	Null A	$p_0 = 0.93, p_1 = 0.07, (p_2 + p_3 = 0.00), \omega_0 = 0.09, \omega_1 = 1.00, \omega_2 = 1.00$	- 2 809.95	Model A vs. Null A	161 Q	0 ( $P = 1$ )
	Model A	$p_0 = 0.93, p_1 = 0.07, (p_2 + p_3 = 0.00), \omega_0 = 0.09, \omega_1 = 1.00, \omega_2 = 1.00$	- 2 809.95			
<i>Apaf-1</i>	Null A	$p_0 = 0.86, p_1 = 0.13, (p_2 + p_3 = 0.03), \omega_0 = 0.10, \omega_1 = 1.00, \omega_2 = 1.00$	- 21 934.7	Model A vs. Null A		0 ( $P = 1$ )
	Model A	$p_0 = 0.86, p_1 = 0.13, (p_2 + p_3 = 0.03), \omega_0 = 0.10, \omega_1 = 1.00, \omega_2 = 1.00$	- 21 934.7			
<i>Scotin</i>	Null A	$p_0 = 0.72, p_1 = 0.28, (p_2 + p_3 = 0.00), \omega_0 = 0.11, \omega_1 = 1.00, \omega_2 = 3.12$	- 6 192.31	Model A vs. Null A		0 ( $P = 1$ )
	Model A	$p_0 = 0.72, p_1 = 0.28, (p_2 + p_3 = 0.00), \omega_0 = 0.11, \omega_1 = 1.00, \omega_2 = 3.12$	- 6 192.31			
<i>Perp</i>	Null A	$p_0 = 0.91, p_1 = 0.09, (p_2 + p_3 = 0.00), \omega_0 = 0.03, \omega_1 = 1.00, \omega_2 = 1.00$	- 3 393.72	Model A vs. Null A	21 C	0 ( $P = 1$ )
	Model A	$p_0 = 0.91, p_1 = 0.09, (p_2 + p_3 = 0.00), \omega_0 = 0.03, \omega_1 = 1.00, \omega_2 = 1.00$	- 3 393.72			
<i>Igfbp3</i>	Null A	$p_0 = 0.90, p_1 = 0.10, (p_2 + p_3 = 0.00), \omega_0 = 0.09, \omega_1 = 1.00, \omega_2 = 1.00$	- 5 777.96	Model A vs. Null A		0 ( $P = 1$ )
	Model A	$p_0 = 0.90, p_1 = 0.10, (p_2 + p_3 = 0.00), \omega_0 = 0.09, \omega_1 = 1.00, \omega_2 = 1.00$	- 5 777.96			
<i>Bcl-2</i>	Null A	$p_0 = 0.84, p_1 = 0.16, (p_2 + p_3 = 0.00), \omega_0 = 0.07, \omega_1 = 1.00, \omega_2 = 1.00$	- 3 962.37	Model A vs. Null A		0 ( $P = 1$ )
	Model A	$p_0 = 0.84, p_1 = 0.16, (p_2 + p_3 = 0.00), \omega_0 = 0.07, \omega_1 = 1.00, \omega_2 = 1.00$	- 3 962.37			

$p_0$  表示纯化选择的比例,  $p_1$  表示中性选择的比例,  $p_2 + p_3$  表示正选择的比例;  $\omega_0$ 、 $\omega_1$  和  $\omega_2$  分别表示纯化选择、中性选择和正向选择的非同义替换与同义替换比值。

$p_0, p_1$  and  $p_2 + p_3$  are the proportion of purifying, neutral and positive selection, respectively;  $\omega_0, \omega_1$  and  $\omega_2$  are the nonsynonymous/synonymous substitution ratios to determine purifying, neutral and positive selection, respectively.



PERP、IGFBP3 和 BCL-2 在地下鼠中进行趋同进化分析。结果表明, 只有 PIDD、PUMA、Apaf-1、IGFBP3 和 BCL-2 在高原鼯鼠与以色列鼯鼠中存在趋同进化位点 (图 2~6)。

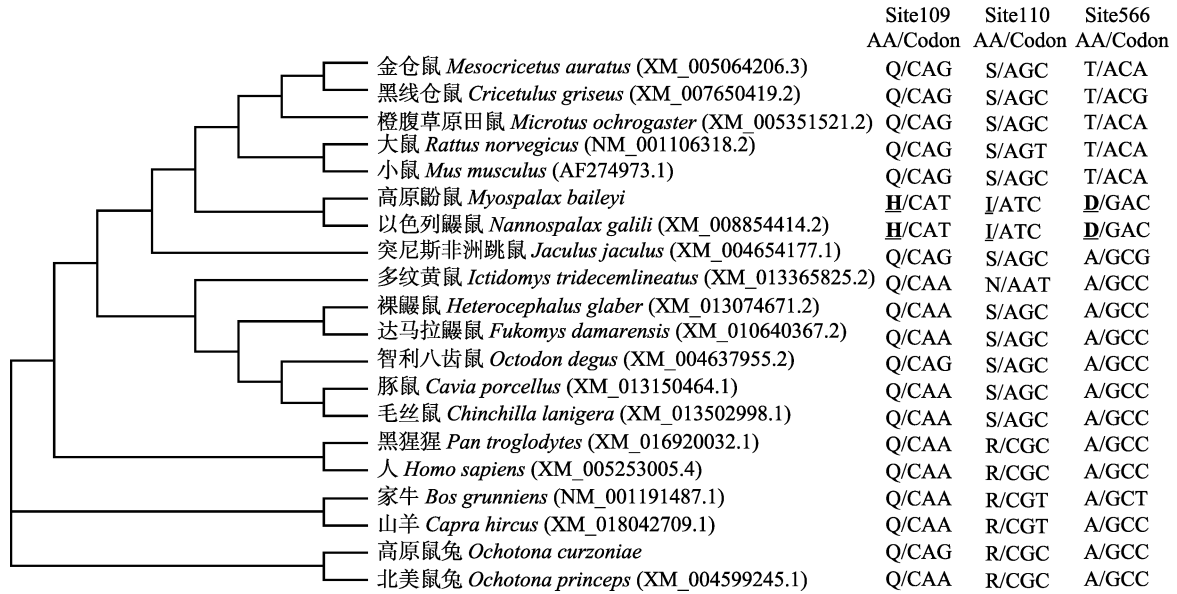


图 2 基于邻接法构建的 PIDD 系统发育树和趋同进化位点

Fig. 2 The neighbor-joining (NJ) phylogenetic tree of the PIDD sequences and the convergent sites

系统发育树后的序列分别表示氨基酸和对应的碱基序列, 加粗及下划线的氨基酸表示高原鼯鼠和以色列鼯鼠共有的趋同进化位点。The amino acids and codons of the convergent sites are shown. Amino acids in *Myospalax baileyi* and *Nannospalax galili* are highlighted in bold underlined.

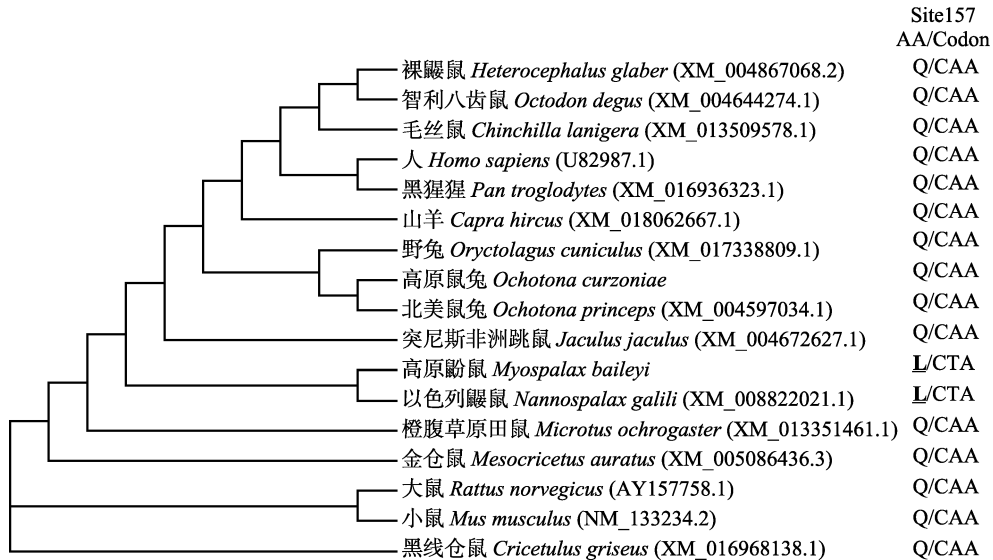


图 3 基于邻接法构建的 PUMA 系统发育树和趋同进化位点

Fig. 3 The neighbor-joining (NJ) phylogenetic tree of the PUMA sequences and the convergent sites

系统发育树后的序列分别表示氨基酸和对应的碱基序列, 加粗及下划线的氨基酸表示高原鼯鼠和以色列鼯鼠共有的趋同进化位点。The amino acids and codons of the convergent sites are shown. Amino acids in *Myospalax baileyi* and *Nannospalax galili* are highlighted in bold underlined.

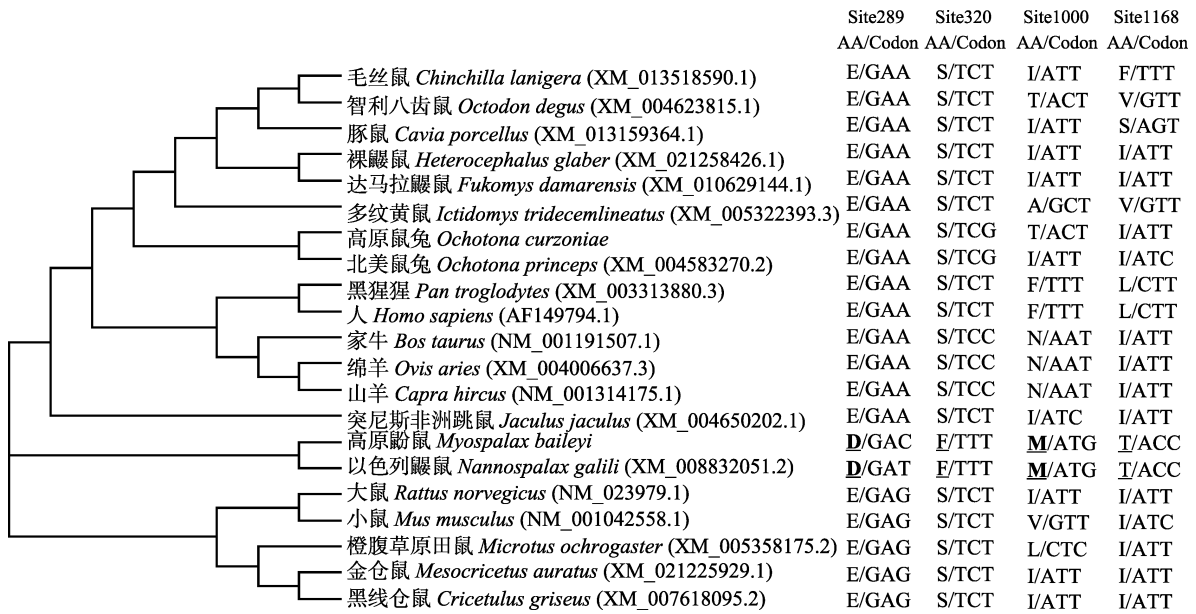


图 4 基于邻接法构建的 Apaf-1 系统发育树和趋同进化位点

Fig. 4 The neighbor-joining (NJ) phylogenetic tree of the Apaf-1 sequences and the convergent sites

系统发育树后的序列分别表示氨基酸和对应的碱基序列，加粗及下划线的氨基酸表示高原鼯鼠和以色列鼯鼠共有的趋同进化位点。

The amino acids and codons of the convergent sites are shown. Amino acids in *Myospalax baileyi* and *Nannospalax galili* are highlighted in bold underlined.

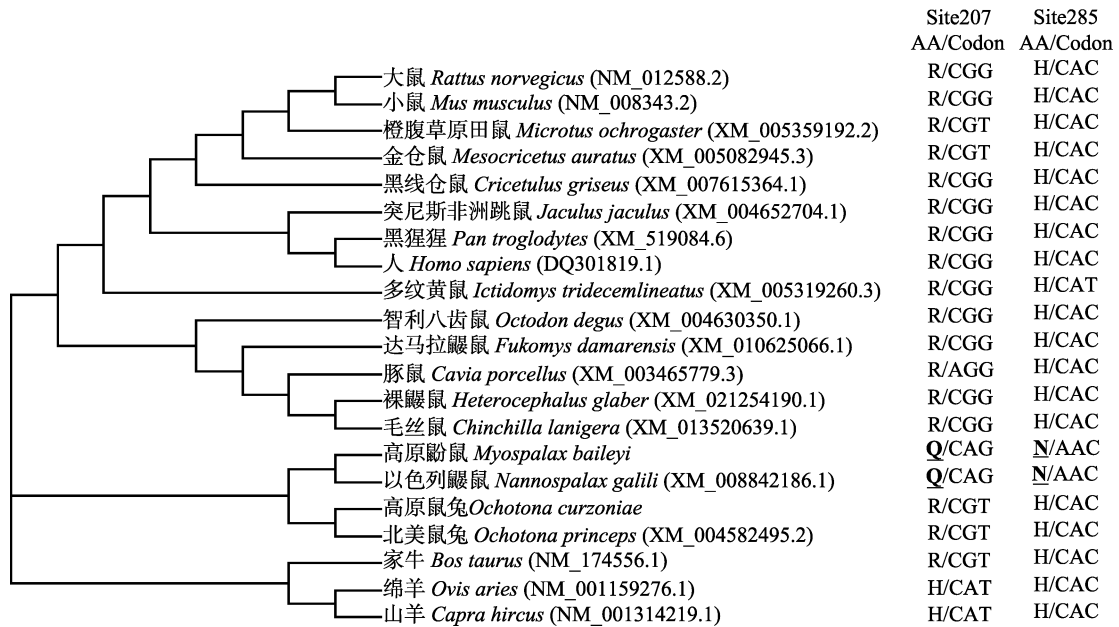


图 5 基于邻接法构建的 IGFBP3 系统发育树和趋同进化位点

Fig. 5 The neighbor-joining (NJ) phylogenetic tree of the IGFBP3 sequences and the convergent sites

系统发育树后的序列分别表示氨基酸和对应的碱基序列，加粗及下划线的氨基酸表示高原鼯鼠和以色列鼯鼠共有的趋同进化位点。

The amino acids and codons of the convergent sites are shown. Amino acids in *Myospalax baileyi* and *Nannospalax galili* are highlighted in bold underlined.

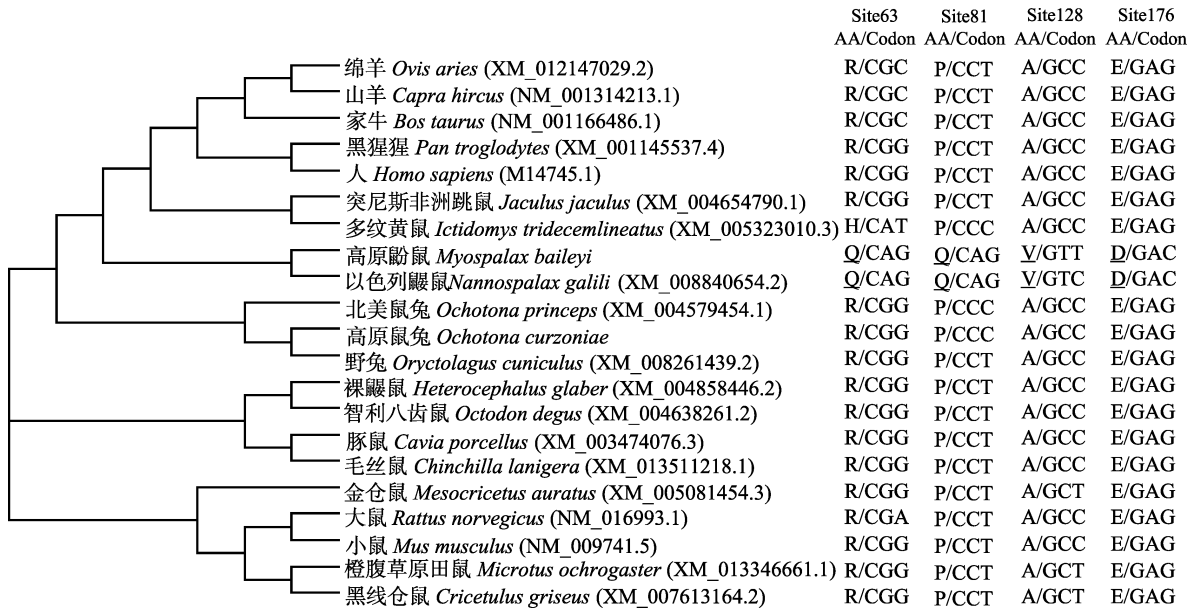


图 6 基于邻接法构建的 BCL-2 系统发育树和趋同进化位点

Fig. 6 The neighbor-joining (NJ) phylogenetic tree of the BCL-2 sequences and the convergent sites

系统发育树后的序列分别表示氨基酸和对应的碱基序列，加粗及下划线的氨基酸表示高原鼯鼠和以色列鼯鼠共有的趋同进化位点。

The amino acids and codons of the convergent sites are shown. Amino acids in *Myospalax baileyi* and *Nannospalax galili* are highlighted in bold underlined.

PIDD 趋同进化分析结果显示，在高原鼯鼠和以色列鼯鼠中存在三处趋同进化位点，祖先序列 109、110 和 566 位的氨基酸分别为谷氨酰胺 (Gln, Q)、精氨酸 (Arg, R) 和丙氨酸 (Ala, A)，而在高原鼯鼠和以色列鼯鼠分支上这三个位点的氨基酸分别为组氨酸 (His, H)、异亮氨酸 (Ile, I) 和天冬氨酸 (Asp, D) (图 2)。

PUMA 在高原鼯鼠和以色列鼯鼠中存在一处趋同进化位点，祖先序列 157 位的氨基酸为谷氨酰胺 (Gln, Q)，而在高原鼯鼠和以色列鼯鼠分支上 157 位的氨基酸为亮氨酸 (Leu, L) (图 3)。

Apaf-1 在高原鼯鼠和以色列鼯鼠中存在四处趋同进化位点，祖先序列 289、320、1000 和 1168 位的氨基酸分别为谷氨酸 (Glu, E)、丝氨酸 (Ser, S)、异亮氨酸 (Ile, I) 和异亮氨酸 (Ile, I)，而在高原鼯鼠和以色列鼯鼠分支上这四个位点的氨基酸分别为天冬氨酸

(Asp, D)、苯丙氨酸 (Phe, F)、甲硫氨酸 (Met, M) 和苏氨酸 (Thr, T) (图 4)。

IGFBP3 在高原鼯鼠和以色列鼯鼠中存在两处趋同进化位点，祖先序列 207 和 285 位的氨基酸分别为精氨酸 (Arg, R) 和组氨酸 (His, H)，而在高原鼯鼠和以色列鼯鼠分支上这两个位点的氨基酸分别为谷氨酰胺 (Gln, Q) 和天冬酰胺 (Asn, N) (图 5)。

BCL-2 在高原鼯鼠和以色列鼯鼠中存在四处趋同进化位点，祖先序列 63、81、128 和 176 位的氨基酸分别为精氨酸 (Arg, R)、脯氨酸 (Pro, P)、丙氨酸 (Ala, A) 和谷氨酸 (Glu, E)，而在高原鼯鼠和以色列鼯鼠分支上这四个位点的氨基酸分别为谷氨酰胺 (Gln, Q)、谷氨酰胺 (Gln, Q)、缬氨酸 (Val, V) 和天冬氨酸 (Asp, D) (图 6)。

### 2.5 高原鼯鼠 p53 及细胞凋亡基因变异位点对其功能影响的评估

SIFT 评估结果表明，高原鼯鼠 p53 第 78

位的丝氨酸 (Ser, S)、PIDD 第 853 位的精氨酸 (Arg, R)、PUMA 第 157 位的亮氨酸 (Leu, L)、Apaf-1 第 320 位的苯丙氨酸 (Phe, F) 和 IGFBP3 第 285 位的天冬酰胺 (Asn, N) 的变异对其功能有显著影响, 其余变异位点对基因功能均没有显著影响 (表 5)。

表 5 高原鼯鼠 p53 及细胞凋亡基因氨基酸序列中突变位点对其功能的影响

Table 5 The effects of mutation sites on the function of apoptosis target genes in Plateau Zokor

蛋白 Protein	变异位点 Substitution	SIFT 分值 SIFT score	SIFT 预测结果 SIFT Prediction (cutoff = 0.05)
p53	P78S	0.029	有影响 Damaging
	A84P	0.386	良性的 Tolerated
PIDD	Q109H	0.363	良性的 Tolerated
	S110I	0.232	良性的 Tolerated
	A566D	0.308	良性的 Tolerated
	G853R	0.002	有影响 Damaging
PUMA	A898V	0.058	良性的 Tolerated
	Q157L	0.008	有影响 Damaging
	H161Q	1.000	良性的 Tolerated
Apaf-1	E289D	0.123	良性的 Tolerated
	S320F	0.001	有影响 Damaging
	I1000M	0.142	良性的 Tolerated
	I1168T	0.395	良性的 Tolerated
PERP	S21C	0.216	良性的 Tolerated
IGFBP3	R207Q	0.588	良性的 Tolerated
	H285N	0.012	有影响 Damaging
BCL-2	R63Q	0.607	良性的 Tolerated
	P81Q	0.147	良性的 Tolerated
	A128V	0.375	良性的 Tolerated
	E176D	0.350	良性的 Tolerated

### 2.6 高原鼯鼠和 SD 大鼠细胞凋亡基因 mRNA 表达水平

荧光定量 PCR 结果表明, 在高海拔 (3 300 m) 条件下, 高原鼯鼠肺组织中凋亡促进基因 *Pidd*、*Bax*、*Puma* 和 *Apaf-1* 的表达水平显著低于低海拔 (2 260 m) 条件下的表达水平 ( $P <$

0.05), 而在 SD 大鼠肺组织中上述 4 个基因的表达水平没有显著差异 ( $P > 0.05$ )。在不同海拔条件下, 高原鼯鼠和 SD 大鼠肺组织中凋亡促进基因 *Fas*、*Scotin*、*Perp* 和 *Igfbp3* 的表达水平都没有显著差异 ( $P > 0.05$ ) (图 7)。在高海拔条件下, 高原鼯鼠肺组织中凋亡促进基因 *Pidd*、*Fas*、*Bax*、*Puma*、*Apaf-1*、*Scotin*、*Perp* 和 *Igfbp3* 表达水平均显著高于 SD 大鼠肺组织中的表达水平 ( $P < 0.05$ ) (图 7)。

在高海拔 (3 300 m) 条件下, 高原鼯鼠肺组织中凋亡抑制基因 *Bcl-2* 的表达水平显著高于低海拔 (2 260 m) 条件下的表达水平 ( $P < 0.05$ ), 而在 SD 大鼠中则没有变化 ( $P > 0.05$ ), 并且高原鼯鼠肺组织中 *Bcl-2* 基因的表达水平显著高于 SD 大鼠肺组织中的表达水平 ( $P < 0.05$ ) (图 8)。

### 2.7 高原鼯鼠和 SD 大鼠肺组织中 *Bcl-2/Bax* 比值

在高海拔 (3 300 m) 条件下, 高原鼯鼠肺组织中 *Bcl-2/Bax* 相对表达量比值显著高于低海拔 (2 260 m) 条件下的比值 ( $P < 0.05$ ); 而在不同海拔条件下, SD 大鼠肺组织中 *Bcl-2/Bax* 比值没有显著变化 ( $P > 0.05$ ) (图 9)。

## 3 讨论

一般来说, 低氧会促进细胞凋亡 (Pan et al. 2014, Lohberger et al. 2016)。细胞凋亡的过程受多种基因的共同调控, *Pidd* 和 *Fas* 基因是死亡受体介导的外源凋亡途径中的凋亡促进基因, *Bax*、*Puma*、*Apaf-1*、*Scotin* 和 *Perp* 是线粒体介导的内源凋亡途径中重要的凋亡促进基因, *Bcl-2* 是关键性的凋亡抑制基因, 它能够阻止细胞凋亡, 延长细胞寿命 (Gogvadze et al. 2006, Brooks et al. 2007, Chipuk et al. 2009)。研究表明, *Bcl-2* 与 *Bax* 相对表达量之比会决定细胞的命运, 当细胞内 *Bcl-2* 表达较多时, *Bax* 与 *Bcl-2* 易形成稳定的 *Bax/Bcl-2* 异源二聚体, 从而抑制细胞凋亡; 若 *Bax* 表达水平增加, 可以拮抗 *Bcl-2* 的作用, 促进细胞凋亡 (Brooks et al.

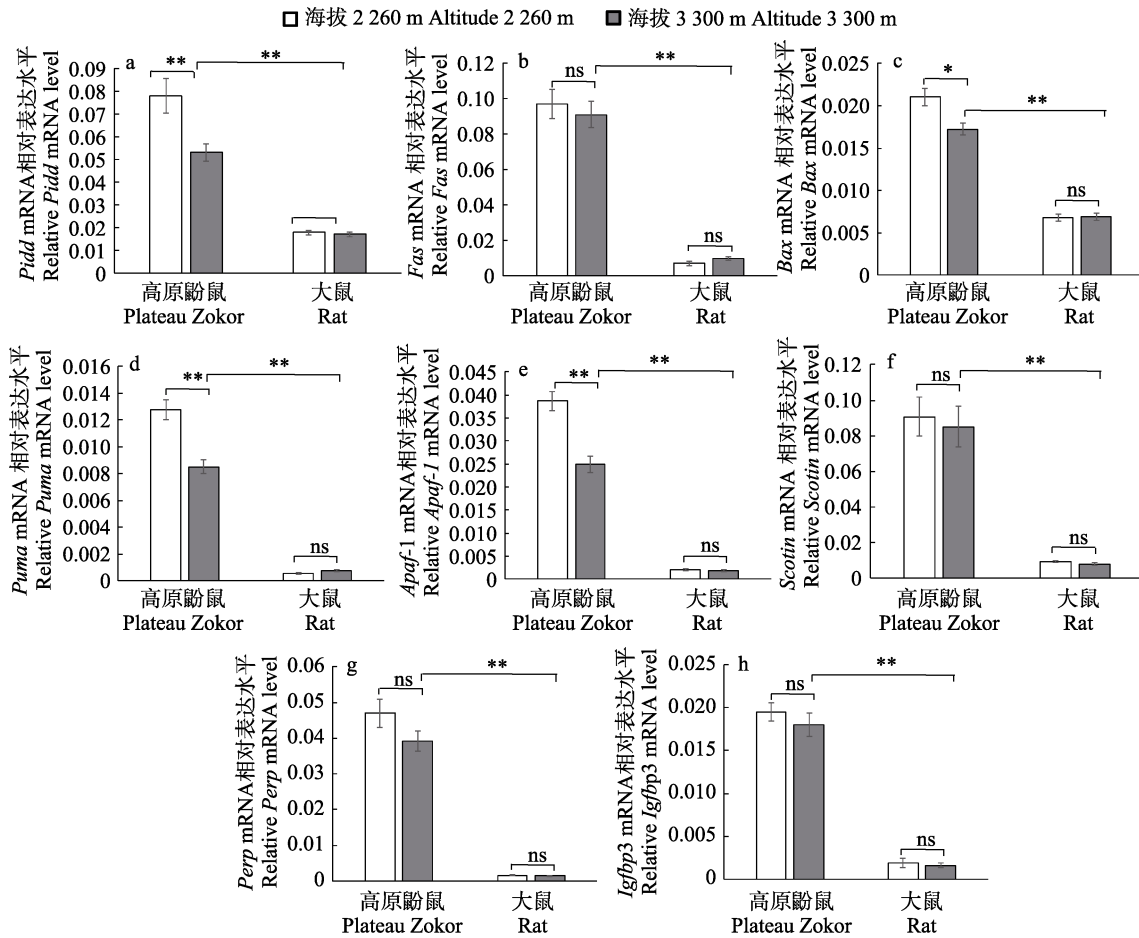


图 7 高原鼢鼠和 SD 大鼠肺组织中凋亡促进基因在不同海拔条件下的 mRNA 表达水平

Fig. 7 The mRNA expression levels of proapoptotic target genes in lung tissues of Plateau Zokors at different altitudes and in the SD rat

a. *Pidd* 基因表达水平; b. *Fas* 基因表达水平; c. *Bax* 基因表达水平; d. *Puma* 基因表达水平; e. *Apaf-1* 基因表达水平; f. *Scotin* 基因表达水平; g. *Perp* 基因表达水平; h. *Igfbp3* 基因表达水平. \*\*表示差异极显著, \*表示差异显著, ns 表示无显著差异。

a. Relative mRNA levels of *Pidd* gene; b. Relative mRNA levels of *Fas* gene; c. Relative mRNA levels of *Bax* gene; d. Relative mRNA levels of *Puma* gene; e. Relative mRNA levels of *Apaf-1* gene; f. Relative mRNA levels of *Scotin* gene; g. Relative mRNA levels of *Perp* gene; h. Relative mRNA levels of *Igfbp3* gene. \*\*,  $P < 0.01$ ; \*,  $P < 0.05$ ; ns, not significant ( $P > 0.05$ ).

2007, 付倩梅等 2014)。在低氧诱导的细胞凋亡过程中, 凋亡促进基因高表达, 凋亡抑制基因低表达 (McClintock et al. 2002, Gogvadze et al. 2006)。本研究中, 以 SD 大鼠为对照, 研究了高原鼢鼠肺组织中 p53 下游凋亡促进基因 *Pidd*、*Fas*、*Bax*、*Puma*、*Apaf-1*、*Scotin*、*Perp*、*Igfbp3* 和凋亡抑制基因 *Bcl-2* 在不同海拔环境

条件下 (3 300 m 和 2 260 m) 的表达模式。研究表明, 与 2 260 m 海拔条件下的高原鼢鼠相比, 3 300 m 海拔条件下高原鼢鼠肺组织中凋亡促进基因 *Pidd*、*Bax*、*Puma* 和 *Apaf-1* 的表达水平显著下降, 凋亡抑制基因 *Bcl-2* 的表达水平显著升高, 并且 *Bcl-2/Bax* 相对表达量比值明显上升, 而在 SD 大鼠中没有变化。王

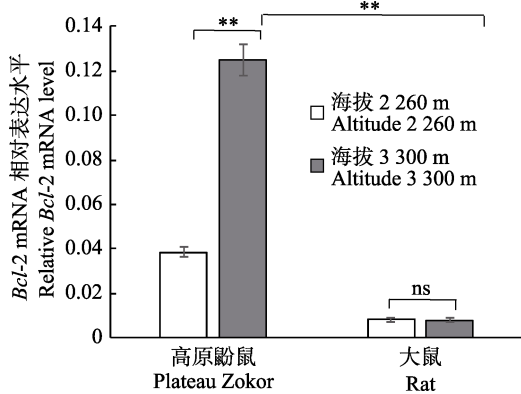


图 8 高原鼢鼠和 SD 大鼠肺组织中凋亡抑制基因 *Bcl-2* 在不同海拔条件下的 mRNA 表达水平

Fig. 8 The mRNA expression levels of antiapoptotic gene *Bcl-2* level in lung tissues of Plateau Zokors at different altitudes and in the SD rat

\*\* 表示差异极显著 ( $P < 0.01$ ); ns 表示无显著差异 ( $P > 0.05$ ).  
 \*\*. significant difference ( $P < 0.01$ ); ns. not significant ( $P > 0.05$ ).

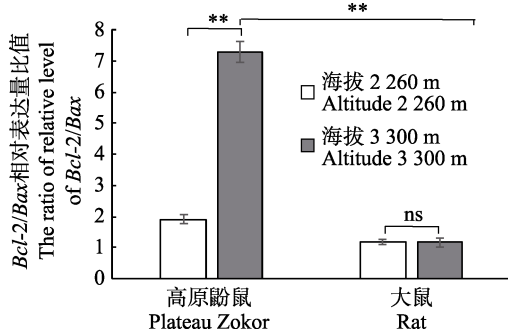


图 9 在不同海拔条件下高原鼢鼠和 SD 大鼠肺组织中 *Bcl-2/Bax* 比值

Fig. 9 The ratio of *Bcl-2/Bax* expression in Plateau Zokors at different altitudes and in the SD rat

\*\* 表示差异极显著 ( $P < 0.01$ ); ns 表示无显著差异 ( $P > 0.05$ ).  
 \*\*. significant difference ( $P < 0.01$ ); ns. not significant ( $P > 0.05$ ).

铭洋等 (2013) 模拟在 2 000 m、5 000 m 和 7 000 m 三个海拔条件下 SD 大鼠中凋亡促进基因 *Igfbp3*、*Bax* 和凋亡抑制基因 *Bcl-2* 的表达模式发现, 与对照组相比, 在 2 000 m 海拔条件下 *Igfbp3*、*Bax* 和 *Bcl-2* 基因的 mRNA 表达都没有变化, 在 5 000 m 海拔条件下 *Igfbp3* 和

*Bcl-2* 基因的 mRNA 表达没有变化, 在 7 000 m 时, *Igfbp3*、*Bax* 和 *Bcl-2* 基因的 mRNA 表达水平才显著下降。我们推测, SD 大鼠中凋亡基因的表达水平没有显著变化, 可能与 SD 大鼠从海拔 2 260 m 至 3 300 m 时对海拔高度的增加并不敏感有关。Band 等 (2010) 的研究发现, 在低氧条件下以色列鼢鼠组织中 *Apaf-1* 基因的表达水平显著下降; Zhao 等 (2013) 对于高原鼢鼠的研究发现, 低氧显著下调 *Puma* 和 *Bax* 基因的表达水平, 这与本研究结果一致。说明, 高原鼢鼠在低氧环境中通过下调凋亡促进基因、上调凋亡抑制基因的表达来抑制细胞凋亡。

在以色列鼢鼠的研究中发现, p53 下游基因的表达与 p53 结构变异有关, DNA 结合域第 172 位氨基酸的变异使得 *Apaf-1* 不表达, *Puma*、*Noxa* 和 *Bax* 凋亡促进基因低表达, 减缓了细胞的凋亡 (Ashur-Fabian et al. 2004, Avivi et al. 2007)。我们前期研究发现, 高原鼢鼠 p53 与以色列鼢鼠在 78 和 84 号存在两个趋同进化位点 (An et al. 2018)。在本研究中, SIFT 评估发现, 高原鼢鼠 p53 第 78 号位点的变异对其功能有显著影响, 该位点由脯氨酸变异为丝氨酸。说明, 高原鼢鼠 p53 结构变异可能导致其下游基因表达模式与 SD 大鼠不同, 其中凋亡促进基因 *Pidd*、*Bax*、*Puma* 和 *Apaf-1* 表达水平下降, 凋亡抑制基因 *Bcl-2* 表达水平上升, 从而抑制了细胞在低氧条件下的凋亡。

已有研究表明, 在地下鼠中蛋白结构的变异对其功能的发挥起着重要的作用 (Gurnett et al. 1984, Kleinschmidt et al. 1984, Band et al. 2010)。在本研究中, 我们应用生物信息学方法对高原鼢鼠细胞凋亡相关基因进行进化分析发现, 高原鼢鼠与以色列鼢鼠间细胞凋亡基因序列的同源性最高, 高原鼢鼠 *PIDD*、*PUMA*、*Apaf-1*、*IGFBP3* 和 *BCL-2* 与以色列鼢鼠存在共同的趋同进化位点, SIFT 评估结果表明, *PIDD* 第 853 号位点、*PUMA* 第 157 号位点、*Apaf-1* 第 320 号位点以及 *IGFBP3* 第 285 号位

点的变异对其功能有显著影响。

PIDD 是细胞存活和凋亡调节中的关键因子 (Wu et al. 2005), 它由 N 端的 7 个富含亮氨酸重复序列 (LRRs)、2 个 ZO-1 和 Unc5-like (ZU-5) 区域和一个 C 端的死亡结构域组成, PIDD 蛋白分子 C 末端序列可在胞质中与 RAIDD [receptor-interacting protein (RIP)-associated ICH-1/CED-3 homologous protein with a death domain] 和天冬氨酸半胱氨酸蛋白酶 2 (cysteine aspartic acid specific protease 2, Procaspase-2) 形成胞质 PIDD 复合体 (PIDDosome), 该复合体诱导 Procaspase-2 活化, 通过线粒体途径促进细胞凋亡 (Tinel et al. 2004, Berube et al. 2005)。SIFT 评估结果表明, 高原鼯鼠 PIDD 位于 C 端死亡结构域中的 853 号位点的变异对其功能发挥有显著影响, 此位点由非极性的甘氨酸 (Gly) 变异为极性带正电的精氨酸 (Arg), 这种变异可能导致 PIDD 与 RAIDD、Procaspase-2 形成 PIDDosome 复合物的结合力减弱, 从而使得促进细胞凋亡功能减弱。

PUMA 是 BH3-only 家族中的重要成员, 也是一个重要的凋亡促进因子, 它由 BH3 结构域、N 端的磷酸化修饰区域和 C 末端跨膜结构组成, 其中 C 端位于第 151 ~ 193 位的氨基酸为线粒体定位序列 (Nakano et al. 2001, Yu et al. 2001)。PUMA 能够通过其 BH-3 结构域与 Bcl-2 家族抗凋亡蛋白结合, 从而活化天冬氨酸半胱氨酸蛋白酶 (cysteine aspartic acid specific protease, Caspase), 导致细胞凋亡的发生 (Steckley et al. 2007, Yu et al. 2007, Chipuk et al. 2009)。Yu 等 (2001) 的研究发现, PUMA 促进细胞凋亡的活性不仅取决于 BH3 结构域, 也取决于 C 末端的线粒体定位序列, 这段序列缺失则不能定位于线粒体, 使得 PUMA 丧失促进细胞凋亡的活性。高原鼯鼠 PUMA 的 157 号位点由极性的谷氨酰胺 (Gln) 变异为非极性的亮氨酸 (Leu), 该位点位于 PUMA 线粒体定位结构域中, SIFT 评估结果表明, 高原鼯鼠该

位点的变异对其功能有显著影响。因此, 我们推测高原鼯鼠 PUMA 中 157 号位点的变异可能不利于线粒体的定位, 从而减小了 PUMA 促进细胞凋亡的能力。

Apaf-1 是线粒体凋亡途径中重要的凋亡促进因子, 它主要与线粒体释放的细胞色素 C (cytochrome C, Cyt C) 结合并激活天冬氨酸半胱氨酸蛋白酶 9 (cysteine aspartic acid specific protease-9, Caspase-9), 启动细胞凋亡 (Zou et al. 2003, Bratton et al. 2010, Yuan et al. 2013)。Apaf-1 由 N 末端半胱氨酸酶募集域 (caspase recruitment domain, CARD)、CED-4 同源结构域和 C 末端 12 个 WD-40 重复片段形成的 Y 形调节域组成 (Yuan et al. 2013)。研究表明, CED-4 同源结构域可以促进 Apaf-1 发生自身寡聚化, 促进凋亡小体的形成 (Leo et al. 2005, Yuan et al. 2013)。高原鼯鼠 Apaf-1 的 CED-4 同源结构域中第 320 号位点由极性的丝氨酸 (Ser) 变异为非极性的苯丙氨酸 (Phe), 该位点的变异对其功能有显著影响, 它可能影响凋亡小体的形成。BCL-2 家族成员是启动 Cyt C、Apaf-1 和 Caspase-9 介导的细胞凋亡所必须的关键因子, Bcl-2 的高表达会抑制线粒体释放 Cyt C, 从而抑制细胞凋亡 (Kim et al. 1997, Huang et al. 1998, Finucane et al. 1999)。本研究结果发现, 在高海拔条件下, 高原鼯鼠肺组织中 *Bcl-2* 基因表达水平显著升高, 这会抑制线粒体释放 Cyt C, 从而影响 Cyt C 与 Apaf-1 的结合。因此, 高原鼯鼠 Apaf-1 第 320 号位点的变异以及 *Bcl-2* 的高表达使得 Apaf-1 促进细胞凋亡减小。

IGFBP3 也是一个重要的凋亡促进因子, 它包括富集半胱氨酸的氨基区、羧基区以及中央可变区 3 个结构域, 其中氨基区和羧基区有胰岛素样生长因子 (insulin-like growth factor, IGF) 的结合位点, 是 IGF 结合的重要结构域, IGFBP3 以依赖 IGF 和非依赖 IGF 的作用方式诱导细胞凋亡 (Devi et al. 2000, Imai et al. 2000, Buckway et al. 2001)。本研究发现, 高

原鼯鼠 IGFBP3 在 285 号位点由带正电的组氨酸 (His) 变异为不带电的天冬酰胺 (Asn), SIFT 评估结果表明, 该位点的变异对其功能有显著影响。因此, 推测该位点的变异可能会改变 IGFBP3 与 IGF 的结合力, 进而改变 IGFBP3 诱导细胞凋亡的能力。

综上所述, 高原鼯鼠 p53 结构发生变异可能导致其下游基因表达模式与 SD 大鼠不同, 其中凋亡促进基因 *Pidd*、*Bax*、*Puma* 和 *Apaf-1* 表达水平下降, 凋亡抑制基因 *Bcl-2* 表达水平上升, 从而抑制了细胞在低氧的凋亡; 在长期低氧的作用下, 高原鼯鼠 p53 下游基因产物 PIDD、PUMA、Apaf-1 和 IGFBP3 产生了影响其功能的变异位点, 这可能改变了它们与发挥功能的复合物的结合力, 从而抑制了细胞凋亡。因此, 通过长期的低氧适应, 高原鼯鼠肺组织中与细胞凋亡相关的基因产物结构发生变异, 导致基因表达水平发生变化, 从而抑制细胞凋亡, 这是高原鼯鼠适应地下低氧高二氧化碳洞道生境的分子机制之一。

## 参 考 文 献

- An Z F, Zhao K, Wei L N, et al. 2018. p53 gene cloning and response to hypoxia in the plateau zokor, *Myospalax baileyi*. *Animal Biology*, 68(3): 289–308.
- Ashur-Fabian O, Avivi A, Trakhtenbrot L, et al. 2004. Evolution of p53 in hypoxia-stressed *Spalax* mimics human tumor mutation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(33): 12236–12241.
- Avivi A, Ashur-Fabian O, Amariglio N, et al. 2005. p53: A key player in tumoral and evolutionary adaptation: a lesson from the Israeli blind subterranean mole rat. *Cell Cycle*, 4(3): 368–372.
- Avivi A, Ashur-Fabian O, Joel A, et al. 2007. P53 in blind subterranean mole rats-loss-of-function versus gain-of-function activities on newly cloned *Spalax* target genes. *Oncogene*, 26(17): 2507–2512.
- Band M, Ashur-Fabian O, Avivi A. 2010. The expression of p53-target genes in the hypoxia-tolerant subterranean mole-rat is hypoxia-dependent and similar to expression patterns in solid tumors. *Cell Cycle*, 9(16): 3367–3372.
- Band M, Joel A, Hernandez A, et al. 2009. Hypoxia-induced BNIP3 expression and mitophagy: *in vivo* comparison of the rat and the hypoxia-tolerant mole rat, *Spalax ehrenbergi*. *The FASEB Journal*, 23(7): 2327–2335.
- Berube C, Boucher L M, Ma W, et al. 2005. Apoptosis caused by p53-induced protein with death domain (PIDD) depends on the death adapter protein RAIDD. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(40): 14314–14320.
- Bozdogan H. 1987. Model selection and Akaike's information criterion (AIC): The general theory and its analytical extensions. *Psychometrika*, 52(3): 345–370.
- Bratton S B, Salvesen G S. 2010. Regulation of the Apaf-1-caspase-9 apoptosome. *Journal of Cell Science*, 123(19): 3209–3214.
- Brooks C, Dong Z. 2007. Regulation of mitochondrial morphological dynamics during apoptosis by Bcl-2 family proteins: a key in Bak? *Cell Cycle*, 6(24): 3043–3047.
- Buckway C K, Wilson E M, Ahlsen M, et al. 2001. Mutation of three critical amino acids of the N-terminal domain of IGF-binding protein-3 essential for high affinity IGF binding. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 86(10): 4943–4950.
- Burland T G. 2000. DNASTAR's Lasergene sequence analysis software. *Bioinformatics Methods and Protocols*. 132: 71–91.
- Chipuk J E, Green D R. 2009. PUMA cooperates with direct activator proteins to promote mitochondrial outer membrane permeabilization and apoptosis. *Cell Cycle*, 8(17): 2692–2696.
- Darriba D, Taboada G L, Doallo R, et al. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*, 9(8): 772. DOI: 10.1038/nmeth.2109.
- Devi G R, Yang D H, Rosenfeld R G, et al. 2000. Differential effects of insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-3 and its proteolytic fragments on ligand binding, cell surface association, and IGF-I receptor signaling. *Endocrinology*, 141(11): 4171–4179.
- Edrey Y H, Casper D, Huchon D, et al. 2012. Sustained high levels of neuregulin-1 in the longest-lived rodents; a key determinant of rodent longevity. *Aging Cell*, 11(2): 213–222.
- Fang X D, Nevo E, Han L J, et al. 2014. Genome-wide adaptive



- complexes to underground stresses in blind mole rats *Spalax*. Nature Communications, 5: 3966. DOI:10.1038/ncomms4966.
- Finucane D M, Bossy-Wetzel E, Waterhouse N J, et al. 1999. Bax-induced caspase activation and apoptosis via cytochrome c release from mitochondria is inhibitable by Bcl-xL. Journal of Biological Chemistry, 274(4): 2225–2233.
- Gogvadze V, Orrenius S. 2006. Mitochondrial regulation of apoptotic cell death. Chemico-Biological Interactions, 163(1): 4–14.
- Gorbunova V, Hine C, Tian X, et al. 2012. Cancer resistance in the blind mole rat is mediated by concerted necrotic cell death mechanism. Proceedings of the National Academy of Sciences, 109(47): 19392–19396.
- Gurnett A M, O'Connell J P, Harris D E, et al. 1984. The myoglobin of rodents: *Lagostomus maximus* (viscacha) and *Spalax ehrenbergi* (mole rat). Journal of Protein Chemistry, 3(5): 445–454.
- Huang D C S, Adams J M, Cory S. 1998. The conserved N-terminal BH4 domain of Bcl-2 homologues is essential for inhibition of apoptosis and interaction with CED-4. The EMBO Journal, 17(4): 1029–1039.
- Huelsenbeck J P, Ronquist F. 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. Bioinformatics, 17(8): 754–755.
- Imai Y, Moralez A, Andag U, et al. 2000. Substitutions for hydrophobic amino acids in the N-terminal domains of IGFBP-3 and-5 markedly reduce IGF-I binding and alter their biologic actions. Journal of Biological Chemistry, 275(24): 18188–18194.
- Kannan K, Kaminski N, Rechavi G, et al. 2001. DNA microarray analysis of genes involved in p53 mediated apoptosis: activation of Apaf-1. Oncogene, 20(26): 3449–3455.
- Kim C N, Wang X, Huang Y, et al. 1997. Overexpression of Bcl-xL inhibits Ara-C-induced mitochondrial loss of cytochrome c and other perturbations that activate the molecular cascade of apoptosis. Cancer Research, 57(15): 3115–3120.
- Kleinschmidt T, Nevo E, Braunitzer G. 1984. The primary structure of the hemoglobin of the mole rat (*Spalax ehrenbergi*, rodentia, chromosome species 60). Hoppe-Seyler's Zeitschrift Für Physiologische Chemie, 365(1): 531–538.
- Kumar P, Henikoff S, Ng P C. 2009. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. Nature Protocols, 4(7): 1073–1081.
- Kumar S, Stecher G, Tamura K. 2016. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. Molecular Biology and Evolution, 33(7): 1870–1874.
- Leo C, Richter C, Horn L C, et al. 2005. Expression of Apaf-1 in cervical cancer correlates with lymph node metastasis but not with intratumoral hypoxia. Gynecologic Oncology, 97(2): 602–606.
- Lohberger B, Steinecker-Frohnwieser B, Stüendl N, et al. 2016. The proteasome inhibitor bortezomib affects chondrosarcoma cells via the mitochondria-caspase dependent pathway and enhances death receptor expression and autophagy. PLoS One, 11(12): e0168193. DOI:10.1371/journal.pone.0168193.
- Malik A, Korol A, Hübner S, et al. 2011. Transcriptome sequencing of the blind subterranean mole rat, *Spalax galili*: utility and potential for the discovery of novel evolutionary patterns. PLoS One, 6(8): e21227. DOI:10.1371/journal.pone.0021227.
- Malik A, Korol A, Weber M, et al. 2012. Transcriptome analysis of the spalax hypoxia survival response includes suppression of apoptosis and tight control of angiogenesis. BMC Genomics, 13(1): 615. DOI:10.1186/1471-2164-13-615.
- Manov I, Hirsh M, Iancu T C, et al. 2013. Pronounced cancer resistance in a subterranean rodent, the blind mole-rat, *Spalax*: *in vivo* and *in vitro* evidence. BMC Biology, 11(1): 91. DOI:10.1186/1741-7007-11-91
- McClintock D S, Santore M T, Lee V Y, et al. 2002. Bcl-2 family members and functional electron transport chain regulate oxygen deprivation-induced cell death. Molecular & Cellular Biology, 22(1): 94–104.
- Moroni M C, Hickman E S, Denchi E L, et al. 2001. Apaf-1 is a transcriptional target for E2F and p53. Nature Cell Biology, 3(6): 552.
- Nakano K, Vousden K H. 2001. PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. Molecular Cell, 7(3): 683–694.
- Nevo E, Ivanitskaya E, Beiles A. 2001. Adaptive Radiation of Blind Subterranean Mole Rats: Naming and Revisiting the Four Sibling Species of the *Spalax ehrenbergi* Superspecies in Israel: *Spalax galili* (2n = 52), *S. golani* (2n = 54), *S. carmeli* (2n = 58) and *S. judaei* (2n = 60). Leiden, Netherlands: Backhuys

- Publishers.
- Nevo E. 2011. Evolution under environmental stress at macro-and micro-scales. *Genome Biology and Evolution*, 3: 1039–1052.
- Pan W L, Wong J H, Fang E F, et al. 2014. Preferential cytotoxicity of the type I ribosome inactivating protein alpha-momorcharin on human nasopharyngeal carcinoma cells under normoxia and hypoxia. *Biochemical Pharmacology*, 89(3): 329–339.
- Schmidt H, Malik A, Bicker A, et al. 2017. Hypoxia tolerance, longevity and cancer-resistance in the mole rat *Spalax*-a liver transcriptomics approach. *Scientific Reports*, 7(1): 14348. DOI:10.1038/s41598-017-13905-z.
- Shams I, Avivi A, Nevo E. 2005. Oxygen and carbon dioxide fluctuations in burrows of subterranean blind mole rats indicate tolerance to hypoxic-hypercapnic stresses. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 142(3): 376–382.
- Steckley D, Karajgikar M, Dale L B, et al. 2007. Puma is a dominant regulator of oxidative stress induced Bax activation and neuronal apoptosis. *Journal of Neuroscience*, 27(47): 12989–12999.
- Swofford D. 2002. PAUP: phylogenetic analysis using parsimony, version 4.0 b10. Sinauer Associates, Sunderland.
- Tinel A, Tschopp J. 2004. The PIDDosome, a protein complex implicated in activation of caspase-2 in response to genotoxic stress. *Science*, 304(5672): 843–846.
- Wang B, Xiao Z, Ren E C. 2009. Redefining the p53 response element. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(34): 14373–14378.
- Wang Z, Xu S, Du K, et al. 2016. Evolution of digestive enzymes and RNASE1 provides insights into dietary switch of cetaceans. *Molecular Biology and Evolution*, 33(12): 3144–3157.
- White B T, Bolker E D. 2008. Interactive computer simulations of genetics, biochemistry, and molecular biology. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 36(1): 77–84.
- Wu Z H, Mabb A, Miyamoto S. 2005. PIDD: a switch hitter. *Cell*, 123(6): 980–982.
- Yang Z. 2007. PAML 4: phylogenetic analysis by maximum likelihood. *Molecular Biology and Evolution*, 24(8): 1586–1591.
- Yu J, Wang P, Ming L, et al. 2007. SMAC/Diablo mediates the proapoptotic function of PUMA by regulating PUMA-induced mitochondrial events. *Oncogene*, 26(29): 4189–4198.
- Yu J, Zhang L, Hwang P M, et al. 2001. PUMA induces the rapid apoptosis of colorectal cancer cells. *Molecular Cell*, 7(3): 673–682.
- Yuan S, Akey C W. 2013. Apoptosome structure, assembly, and procaspase activation. *Structure*, 21(4): 501–515.
- Zhang J, Kumar S. 1997. Detection of convergent and parallel evolution at the amino acid sequence level. *Molecular Biology and Evolution*, 14(5): 527–536.
- Zhang J, Nielsen R, Yang Z. 2005. Evaluation of an improved branch-site likelihood method for detecting positive selection at the molecular level. *Molecular Biology and Evolution*, 22(12): 2472–2479.
- Zhao Y, Ren J L, Wang M Y, et al. 2013. Codon 104 variation of p53 gene provides adaptive apoptotic responses to extreme environments in mammals of the Tibet plateau. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(51): 20639–20644.
- Zou H, Yang R, Hao J, et al. 2003. Regulation of the Apaf-1/caspase-9 apoptosome by caspase-3 and XIAP. *Journal of Biological Chemistry*, 278(10): 8091–8098.
- 付倩梅, 李晓明. 2014. Bcl-2 基因的研究进展. *西南军医*, 16(1): 76–79.
- 王铭洋, 赵阳, 张圣婷, 等. 2013. 模拟高原低氧对 p53 及其靶基因表达的调节. *中国应用生理学杂志*, 29(2): 136–138.
- 曾缙祥, 王祖望, 师治贤. 1984. 高山地区高原鼯鼠的代谢特点及若干生理指标的观察//中国科学院西北高原生物研究所. 高原生物学集刊. 北京: 科学出版社, 163–171.
- 周文扬, 窦丰满. 1990. 高原鼯鼠活动与巢区的初步研究. *兽类学报*, 10(1): 31–39.