

高原鼢鼠和高原鼠兔肺组织磷脂酰胆碱合成关键酶基因的进化及其表达差异分析

王志洁^{①②} 李永晓^② 安志芳^② 陈晓琦^{①②}
张佳钰^② 魏登邦^{②*}

① 青海大学高原医学研究中心 西宁 810016;

② 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

摘要: 肺表面活性物质有助于维持肺泡结构, 促进呼吸作用和对氧的吸收及利用, 磷脂酰胆碱为肺表面活性物质磷脂主要成分。为进一步研究高原动物对低氧环境的适应机制, 本文以青藏高原特有物种高原鼢鼠 (*Eospalax baileyi*) 和高原鼠兔 (*Ochotona curzoniae*) 为研究对象, 应用生物信息学方法对编码磷脂酰胆碱合成途径中关键酶胆碱激酶基因 *Chok-α* 和 *Chok-β*、磷酸胆碱胞苷转移酶基因 *Pcyt-α* 和 *Pcyt-β* 以及胆碱磷酸转移酶基因 *Cpt* 的序列进行进化分析, 并以 SD 大鼠 (*Rattus norvegicus*) 为对照, 测定了这些基因在肺组织中的 mRNA 表达水平。生物信息学结果表明, *Chok-α*、*Chok-β*、*Pcyt-α*、*Pcyt-β* 和 *Cpt* 基因序列高原鼢鼠与以色列鼢鼠 (*Nannospalax galili*) 的同源性最高, 高原鼠兔与北美鼠兔 (*O. princeps*) 的同源性最高, 均高达 90% 以上; 高原鼢鼠 *Cpt* 与以色列鼢鼠, 高原鼠兔 *Chok-β*、*Pcyt-β* 和 *Cpt* 与北美鼠兔有平行进化位点。选择压力分析表明, 高原鼢鼠 *Chok-α* 亚基第 4 位的赖氨酸、第 5 位点的苯丙氨酸和第 10 位的谷氨酸, 高原鼠兔 *Chok-β* 亚基第 4 位蛋氨酸, 高原鼢鼠 *Cpt* 第 163 位谷氨酸, 这些位点均存在显著差异 ($P < 0.05$); SIFT 评估结果发现, 高原鼠兔的 *Chok-β* 亚基中第 212 位氨基酸变异位点和 *Pcyt-β* 亚基第 18 位氨基酸变异位点对其功能有显著影响 ($P < 0.05$)。mRNA 表达水平分析结果表明, 高原鼢鼠 *Chok-α* 和 *Chok-β* mRNA 表达水平均显著高于高原鼠兔与 SD 大鼠 ($P < 0.01$), 高原鼠兔 *Chok-β* mRNA 表达水平显著高于 SD 大鼠 ($P < 0.05$); SD 大鼠 *Pcyt-α*、*Pcyt-β* 和 *Cpt* mRNA 表达水平显著高于高原鼠兔和高原鼢鼠 ($P < 0.01$), 而高原鼠兔与高原鼢鼠间无差异 ($P > 0.05$)。以上结果表明, 与 SD 大鼠相比, 高原鼢鼠和高原鼠兔磷脂酰胆碱合成途径中关键酶氨基酸变异和基因表达水平的差异以及两种高原动物的生理适应, 更利于它们在高寒低氧的独特环境中获取氧并利用氧, 从而促进呼吸作用, 以加强能量代谢并适应低氧环境。

关键词: 肺表面活性物质; 高原鼠兔; 高原鼢鼠; 磷脂酰胆碱

中图分类号: Q955 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263 (2024) 04-545-17

基金项目 国家自然科学基金项目 (No. 31860606), 青海省自然科学基金项目 (No. 2021-ZJ-904);

* 通讯作者, E-mail: weidengbang@163.com;

第一作者介绍 王志洁, 女, 博士研究生; 研究方向: 低氧生理; E-mail: 411126871@qq.com。

收稿日期: 2023-07-21, 修回日期: 2023-12-31 DOI: 10.13859/j.cjz.202423146

Evolution Analysis and Expression Difference of Key Enzyme Genes for Phosphatidylcholine Synthesis in Lung Tissues Among Plateau Zokors and Plateau Pikas

WANG Zhi-Jie^{①②} LI Yong-Xiao^② AN Zhi-Fang^② CHEN Xiao-Qi^{①②}
ZHANG Jia-Yu^② WEI Deng-Bang^{②*}

① Research Center for High Altitude Medicine, Qinghai University, Xining 810016;

② State Key Laboratory of Plateau Ecology and Agriculture, Qinghai University, Xining 810016, China

Abstract: [Objectives] Pulmonary surfactant (PS) can help to maintain the structure of alveoli, improve respiration and oxygen absorption and utilization. Notably, phosphatidylcholine (PC) serves as the principal constituent of pulmonary surfactant phospholipids. In order to shed lights into the adaptation mechanism of plateau animals to hypoxic environments, this study focuses on the endemic species of Plateau Zokor *Eospalax baileyi* and Plateau Pika *Ochotona curzoniae* in the Qinghai Tibet Plateau. **[Methods]** The sequences of *Chok-α*, *Chok-β*, *Pcyt-α*, *Pcyt-β* and *Cpt* genes were analyzed by MEGA 7.0, PAML 4.8 program and Ancestor program. Additionally, the mRNA expression levels of these genes were determined with Real-time PCR in the lung tissues and compared with those in the SD Rat *Rattus norvegicus*. **[Results]** The bioinformatics analysis revealed that the sequences of *Chok-α*, *Chok-β*, *Pcyt-α*, *Pcyt-β* and *Cpt* in *E. baileyi* were highly homologous with those of *Nannospalax galili*, as well as the *O. curzoniae* has the highest level of homology with *O. princeps* (> 90%) (Table 2). *Cpt* of *E. baileyi* and *N. galili*, *Chok-β*, *Pcyt-β* and *Cpt* of *O. curzoniae* and *O. princeps* occurred convergent sites. Selection pressure analyses showed that lysine at sites 4, phenylalanine at sites 5 and glutamic acid at sites 10 of *Chok-α* subunit in Plateau Zokor were significantly different ($P < 0.05$, Table 3); methionine at sites 4 of *Chok-β* subunit in Plateau Pika, glutamic acid at sites 163 of *Cpt* subunit in Plateau Zokor were also significantly different ($P < 0.05$, Table 3). SIFT test showed that No. 212 variation sites of *Chok-β* subunit and No.18 variation sites of *Pcyt-β* subunit in Plateau Pika had significant effects on gene function ($P < 0.05$, Table 4). The mRNA expression levels of *Chok-α*, *Chok-β*, *Pcyt-α* and *Pcyt-β* in Plateau Zokor were significantly higher than those in Plateau Pika and SD Rat ($P < 0.01$), and the mRNA expression level of *Chok-β* in Plateau Pika was higher than SD Rat ($P < 0.05$) (Fig. 6). The expression level of *Cpt* in SD Rat was significantly higher than that in Plateau Pika and Plateau Zokor ($P < 0.01$), while there was no difference between expression levels in Plateau Pika and Plateau Zokor ($P > 0.05$) (Fig. 6). **[Conclusion]** The above results demonstrate that, in comparison to SD Rat, the amino acid structure and gene expression variations of key enzyme genes in phosphatidylcholine pathway of Plateau Zokor and Plateau Pika, along with two plateau animal physiological adaptation make them more conducive to acquire and employ oxygen in the unique environment of high cold and hypoxic environment. Consequently, this reinforces respiration, enhances energy metabolism, and facilitates adaption to low oxygen environments.

Key words: Pulmonary surfactant; *Eospalax baileyi*; *Ochotona curzoniae*; Phosphatidylcholine

高原鼯鼠 (*Eospalax baileyi*) 属啮齿目 (Rodentia) 鼯形鼠科 (Spalacidae) 凸颅鼯鼠属 (Norris et al. 2004, Zhou et al. 2008, Zhang et al. 2022), 栖息于海拔 2 800 ~ 4 200 m 的高原上, 常年生活在完全封闭的地下洞道中 (Shams et al. 2005), 是青藏高原典型的地下鼠。地下鼠洞道生境最显著的特征是低氧及高二氧化碳 (Shams et al. 2005, Nevo 2011), 洞道内氧含量较同地区地面大气中低 20% (王祖望等 1979)。高原鼠兔 (*Ochotona curzoniae*) 属兔形目 (Lagomorpha) 鼠兔科 (Ochotonidae) 鼠兔属 (冯祚建等 1985, 蒋志刚等 2015), 栖息在海拔 3 200 ~ 4 700 m 的高寒草甸及高原荒漠草原 (施银柱等 1980, 沈南英等 1982) 是青藏高原典型的地面动物, 其生境主要特征是低氧。高原低氧可导致肺血管收缩并引起肺动脉高压, 吸气阻力升高, 从而影响肺的气体交换功能 (杨晓静等 1997)。肺气体交换能力不仅取决于肺泡总表面积, 还与肺表面活性物质 (pulmonary surfactant, PS) 有关 (Hawgood et al. 1985)。肺表面活性物质是处于肺泡内气液界面的一层磷脂蛋白复合物, 能有效防止肺泡内积液形成, 利于肺换气, 防止肺水肿产生, 以及参与呼吸系统局部防御等机制 (薛立军 2007)。肺表面活性物质减少或功能改变会导致肺损伤, 高原动物在低氧环境下肺气体交换是它们面临的巨大挑战。

哺乳动物肺表面活性物质由 90% 的脂类和 8% 的蛋白及其他物质组成, 其中磷脂占脂类的 80% ~ 90%, 磷脂酰胆碱 (phosphatidylcholine, PC) 是肺表面活性物质磷脂的主要成分 (Kettel 1969), 是肺表面活性剂, 有助于肺泡的扩张 (朱正美 1985a, 胡小中 2011), 是肺表面活性物质中发挥生物活性的重要物质基础之一 (李涛等 2007)。磷脂酰胆碱在哺乳动物物种之间具有高度保守性 (刘中洋等 2015), 对维持正常的肺功能具有重要作用 (秦环龙等 1996)。胞苷二磷酸 (cytidine diphosphate, CDP)-胆碱途径是合成磷脂酰胆碱的主要途径 (Ishidate

1997, Aoyama et al. 2004), CDP-胆碱途径中存在三个关键酶, 包括胆碱激酶 (choline kinase, Chok)、磷酸胆碱胞苷转移酶 (phosphate cytidylyltransferase, pcyt) 和胆碱磷酸转移酶 (phosphatidylcholine transfer, Cpt)。胆碱激酶由 *Chok- α* 和 *Chok- β* 两个基因编码 (Aoyama et al. 2000), 催化胆碱的磷脂化 (Vance et al. 1991, Ishidate 1997); 磷酸胆碱胞苷转移酶由 *Pcyt- α* 和 *Pcyt- β* 基因编码 (Lykidis et al. 2001), 催化磷酸胆碱转化为 CDP-胆碱 (Vance et al. 1991, Kent 1997), pcyt 的活性将关系到磷脂酰胆碱的合成速率, 是此过程的限速酶 (Chida et al. 1973, Hogan et al. 1994, Weinhold et al. 1995, Spragg et al. 2000); 胆碱磷酸转移酶由 *Cpt* 基因编码, 催化 CDP-胆碱生成磷脂酰胆碱 (朱正美 1985b, Vance et al. 1991, 查锡良 1994, McMaster et al. 1997)。

Baze 等 (2010) 发现, 缺氧会引起参与脂质代谢的基因差异表达, 表明脂类参与低氧胁迫响应。研究结果表明, 在高原鼯鼠中与肺表面活性物质合成有关的基因发生了显著的正向选择和富集表达 (Shao et al. 2015)。因此, 高原动物从低氧环境中有效获取氧不仅与肺的结构有关, 而且与肺表面活性物质相关基因的进化适应和表达调控等分子机制相关。为了进一步揭示高原鼯鼠和高原鼠兔对低氧环境的适应策略, 本文以 SD 大鼠 (Sprague-Dawley *Rattus norvegicus*) 为对照, 通过对高原鼯鼠和高原鼠兔合成磷脂酰胆碱途径上关键酶基因进行生物信息学分析, 并比较相对表达量, 以期进一步揭示高原动物的低氧适应机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

高原鼯鼠和高原鼠兔各 6 只, 捕捉于青海省海南州贵德县拉脊山 (海拔 3 700 m; 氧分压 13.59 kPa, 含氧量 193.10 g/m³); 同等数量的 SD 大鼠购于兰州大学实验动物中心 (海拔 1 500 m, 氧分压 17.73 kPa, 含氧量 250 g/m³)。

高原鼯鼠和 SD 大鼠体重为 200 ~ 250 g, 高原鼠兔体重为 150 ~ 200 g。所有物种运输至西宁当日即进行组织取样, 用 5% 戊巴比妥钠麻醉动物后, 采集肺组织样品置于液氮中保存, 采样过程中动物处理措施均按照国家《实验动物管理条例 (GB14923-2010)》执行。

1.2 合成磷脂酰胆碱途径关键基因生物信息学分析

1.2.1 序列的获取 从 NCBI 公共数据库中检索并下载高原鼠兔、北美鼠兔 (*O. princeps*) 和穴兔 (*Oryctolagus cuniculus*) 3 个兔形目物种, 以色列鼯鼠 (*Nannospalax galili*)、裸鼯鼠 (*Heterocephalus glaber*)、大鼠、小鼠 (*Mus musculus*)、草原田鼠 (*Microtus ochrogaster*)、金黄地鼠 (*Mesocricetus auratus*)、黑线仓鼠 (*Cricetulus griseus*)、突尼斯非洲跳鼠 (*Jaculus jaculus*)、达马拉兰鼯鼠 (*Fukomys damarensis*)、豚鼠 (*Cavia porcellus*)、毛丝鼠 (*Chinchilla lanigera*)、智利八齿鼠 (*Octodon degus*) 和叙利亚仓鼠 (*Ictidomys tridecemlineatus*) 13 个啮齿目物种, 智人 (*Homo sapiens*) 和黑猩猩 (*Pan troglodytes*) 2 个灵长目物种, 家牛 (*Bos taurus*)、山羊 (*Capra hircus*) 和绵羊 (*Ovis aries*) 3 个偶蹄目物种的 *Chok- α* 、*Chok- β* 、*Pcyt- α* 、*Pcyt- β* 和 *Cpt* 基因的编码区序列。由于高原鼯鼠上述 5 个基因的序列在 NCBI 数据库中没有检索到, 用实验室测序的二代和三代转录组数据构建本地 blast 库。用 NCBI 上检索到的以色列鼯鼠的基因编码区序列作为查询序列从本地 blast 数据库中筛选出同源性最高的编码区序列, 用 MEGA 7.0 软件将筛选出的序列进行同源比对和校正 (Kumar et al. 2016), 最终筛选出一条可信度最高的序列作为高原鼯鼠的基因序列, 并用 Lasergene 程序中的 Editseq 功能 (White et al. 2008) 将高原鼯鼠的基因编码区序列翻译为氨基酸序列。

1.2.2 同源性比对 用 DNAMAN 9.0 软件和 MEGA 7.0 软件 (Kumar et al. 2016) 对高原鼯鼠和高原鼠兔 *Chok- α* 、*Chok- β* 、*Pcyt- α* 、*Pcyt- β*

和 *Cpt* 基因序列与其编码的氨基酸序列分别与以色列鼯鼠、裸鼯鼠、大鼠、小鼠、穴兔、北美鼠兔、黑猩猩及智人的基因序列及相应的氨基酸序列进行同源性比对分析。

1.2.3 同源性建树 采用 ClustalX 1.81 (Larkin et al. 2007) 将 22 个物种的基因编码区序列进行序列比对, 后用 MAGA 7.0 构建极大似然树。采用 Tree Graph 2.7.1 软件 (Stöver et al. 2010) 作图。

1.2.4 平行进化分析 将 22 个物种的 *Chok- α* 、*Chok- β* 、*Pcyt- α* 、*Pcyt- β* 和 *Cpt* 基因序列和蛋白质序列, 使用 DNAMAN 9.0 软件和 PAML 软件中的 codeml 程序分别进行序列比对分析和蛋白祖先序列重建 (Nei et al. 2000), 舍弃后验概率小于 0.9 的位点。应用 converg 2 软件 (Zhang et al. 1997) 检验平行进化位点的显著性, 用 MEGA 7.0 软件中的 Clustal W 比对模式对 22 个物种的氨基酸序列进行比对, 去掉所有空格 gap 后建立分子进化树。输入树文件和序列文件并应用 Jones-Taylor-Thornton (JTT) 距离矩阵模型和泊松校正模型 (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)。

1.2.5 选择压力分析与正向选择位点 应用 ClustalX 1.81 软件对 20 个物种分别与高原鼯鼠和高原鼠兔的基因编码区序列进行比对, 结果经 MEGA 7.0 格式转换之后再使用 PAML 4.8 软件中的 CODEML 程序 (Yang 2007), 根据极大似然树进行选择压力分析。选用该程序中基于最大似然法的分支位点模型进行正向选择分析。分支位点模型将选定的支系作为研究对象, 其余支系作为背景 (background branch), 对前景支系 (foreground branch) 所受选择压力进行分析。分别把高原鼯鼠支和高原鼠兔支设为前景支系, 其余支系设为背景支系, 先用 model A 检测前景支系中是否存在显著的正向选择位点, 再将控制文件 (codeml.ctl) 中的 fix omega 和 omega 都设定为 1, 作为 Null A 进行第二次运算, 提取两次运算时的似然率值 (lnL

值, 分别记为 $\ln L1$ 和 $\ln L0$), 并计算其两倍差值 $2\Delta\ln L$ 。利用 PAML 软件包中的 Chi2 程序 (Liu et al. 1995), 基于 $2\Delta\ln L$ 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。

1.2.6 基因变异位点对其功能影响的评估

从 Ensembl (<http://asia.ensembl.org/>) 数据库下载与高原鼯鼠亲缘关系相近的小鼠 *Chok-α*、*Chok-β*、*Pcyt-α*、*Pcyt-β* 和 *Cpt* 的蛋白 ID 号作查询序列, 采用“Sorting Tolerant From Intolerant” (SIFT) algorithm 程序 (Kumar et al. 2009) 评估平行进化位点对高原鼠兔和高原鼯鼠基因功能的影响, SIFT score 值在 0 ~ 0.05 之间表明该变异位点是有害的 (damaging); 在 0.05 ~ 1 之间表明该变异位点是良性的 (tolerated), 数值越接近 1, 对蛋白的功能影响越小 (Kumar et al. 2009)。

1.3 高原鼯鼠、高原鼠兔和 SD 大鼠合成磷脂酰胆碱途径关键基因表达水平测定

1.3.1 总 RNA 的提取和 cDNA 的合成 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、高原鼠兔和 SD 大鼠肺组织的总 RNA, 用核酸蛋白含量检测仪测定浓度 (>0.4 g/L)。分别取 4 μ g 提取总 RNA, 用第一链 cDNA 合成试剂盒 (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) 制备 cDNA。

1.3.2 引物设计及表达水平的测定 用 Primer 6.0 软件在高原鼠兔、高原鼯鼠和 SD 大鼠同源性较高的区域设计特异性引物用于 PCR (表 1)。实验中所有目的基因和管家基因 *GAPDH*

的引物, 均由上海生物工程有限公司合成。RT-PCR 反应条件为, 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。PCR 产物在 1.5% 琼脂糖凝胶上进行电泳, 用普通琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒 (TIANGEN 生化科技有限公司) 回收 DNA。将回收产物用 EASY dilution 液依次 10 倍梯度稀释 (10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8}), 用于制作标准曲线。Real-time PCR 反应条件为, 95 $^{\circ}$ C 3 min, 40 个循环, 95 $^{\circ}$ C 30 s, 95 $^{\circ}$ C 5 s, 60 $^{\circ}$ C 34 s。使用 BIO-RAD CFX96 荧光 PCR 仪采集和分析数据。各样品目的基因和管家基因的浓度由机器生成。每个样品的目的基因浓度除以其管家基因浓度, 即为该基因校正后的相对含量。

1.4 统计分析

实验数据均以平均值 $\pm$ 标准差 (Mean $\pm$ SD) 表示, 采用 SPSS 20.0 对数据进行统计分析, 采用 Kolmogoro-Smirnov 和 Levene 分别检验数据的正态性和方差齐性。数据符合正态分布并具有同质性, 采用单因素方差分析 (one-way ANOVA), $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 同源性比对分析

同源性比对发现, 高原鼯鼠 *Chok-α*、*Chok-β*、*Pcyt-α*、*Pcyt-β* 和 *Cpt* 基因编码区序列及所编码的氨基酸序列与以色列鼯鼠的同源性最高, 而高原鼠兔与北美鼠兔上述基因编码区序列及所编码氨基酸序列的同源性最高 (表 2)。

表 1 PCR 引物

Table 1 PCR primers

基因 Gene	上游引物 Forward primer (5'-3')	下游引物 Reverse primer (5'-3')	序列长度 Sequence length (bp)
<i>Chok-α</i>	GCCATTCTTGCTGAGAGGTC	ACGCAATTCTTCAGTGTCAG	108
<i>Chok-β</i>	AGTGTTGTGTCAGCAGCCATTG	AGTGAGGCTCCTTGGTGAA	77
<i>Pcyt-α</i>	TTACGACAGCCAGCTCCTT	CCTCTTCCATAGTTACCCTGACAT	79
<i>Pcyt-β</i>	CCGCTTAGGAACACCAGTTG	ACAAGTAGCTGTTGGGAAATAGTG	125
<i>Cpt</i>	CGAGTGAAGCAGTATAATCAGAGT	GTTAATGAGCCAGGACGGAAT	117
<i>GAPDH</i>	GGCTACACTGAGGACCAGGTTG	GTCCACCACCTGTTGCTGTA	156

表 2 高原鼠兔及高原鼢鼠与其他物种合成磷脂酰胆碱途径关键基因序列及氨基酸序列同源性比对 (%)

Table 2 Sequence homology of key genes and amino acids in synthetic phosphatidylcholine pathway between Plateau Pika and Plateau Zokor with other species

物种 Species	基因 Gene				
	<i>Chok-α</i>	<i>Chok-β</i>	<i>Pcyt-α</i>	<i>Pcyt-β</i>	<i>Cpt</i>
高原鼠兔 <i>Ochotona curzoniae</i>					
北美鼠兔 <i>O. princeps</i>	97.93\98.22	93.99\95.47	98.01\100.00	98.65\100.00	97.98\98.13
穴兔 <i>Oryctolagus cuniculus</i>	—	74.07\75.19	94.02\98.09	94.05\98.64	91.01\90.19
大鼠 <i>Rattus norvegicus</i>	75.34\76.51	78.54\81.01	88.95\95.64	90.45\97.83	80.62\77.57
小鼠 <i>Mus musculus</i>	75.27\75.43	77.69\81.77	88.50\95.37	90.72\97.83	81.86\78.97
黑猩猩 <i>Pan troglodytes</i>	80.37\80.90	82.41\85.57	90.67\97.00	92.16\97.29	86.82\85.98
智人 <i>Homo sapiens</i>	80.10\80.56	82.24\85.57	90.76\97.28	91.98\97.29	86.67\85.05
高原鼢鼠 <i>Eospalax baileyi</i>					
以色列鼢鼠 <i>Nannospalax galili</i>	95.34\97.01	95.88\95.35	94.84\96.19	97.30\100.00	94.42\94.86
裸鼢鼠 <i>Heterocephalus glaber</i>	82.15\82.85	61.87\62.53	88.77\94.28	93.33\99.46	72.15\68.26
大鼠 <i>R. norvegicus</i>	79.99\81.90	61.62\62.28	92.12\98.09	94.32\99.73	85.74\82.71
小鼠 <i>M. musculus</i>	79.81\79.91	60.86\62.78	92.03\97.28	94.23\99.73	86.36\85.98
黑猩猩 <i>P. troglodytes</i>	81.36\81.10	62.12\63.54	89.95\95.10	92.70\98.37	84.50\81.78
智人 <i>Homo sapiens</i>	81.22\80.96	62.12\63.54	90.13\95.37	92.70\98.37	84.03\80.84

表中“—”代表在 NCBI 数据库中没有找到编码区序列。表中“\”前后的数据分别表示基因序列和氨基酸序列同源性。

The “—” in the table represents that no coding region sequence was found in the NCBI database. The data before and after “\” in the table indicate gene sequence and amino acid sequence homology, respectively.

2.2 平行进化分析

平行进化分析显示，高原鼠兔和北美鼠兔比较，*Chok-β* 存在 6 处平行进化位点，分别为 52 His、74 Gln、212 Pro、257 Arg、331 Ala 和 334 Ser 位点，*Pcyt-β* 存在 18 Pro 和 339 Ala 两处平行进化位点，*Cpt* 存在 2 Asp、14 Leu 和 91 Asp 三处平行进化位点。高原鼢鼠和以色列鼢鼠比较，*Cpt* 存在 21 Arg 一处平行进化位点（图 1~5）。

2.3 选择压力分析与正向选择位点

基于物种进化树检测高原鼠兔和高原鼢鼠 *Chok-α*、*Chok-β*、*Pcyt-α*、*Pcyt-β* 和 *Cpt* 是否有正向选择位点，并用似然比检验法检验其差异显著性。高原鼢鼠 *Chok-α* 共有 3 处正向选择位点，分别为 4 Lys、5 Phe 和 10 Glu 位点，且每个位点差异显著 ($P < 0.05$)。高原鼠兔 *Chok-α* 共有 3 处正向选择位点，分别为 135 Asp、401 Ser 和 405 Arg 位点，但这些位点差异均不显著

($P > 0.05$)。高原鼠兔 *Chok-β* 有 4 处正向选择位点，分别为 4 Met、7 Glu、9 Leu 和 92 Tyr 位点，仅 4 Met 位点差异显著 ($P < 0.05$)。高原鼢鼠 *Cpt* 中共有 2 处正向选择位点，分别为 163 Glu 和 175 Tyr 位点，其中仅 163 Glu 位点差异显著 ($P < 0.05$)（表 3）。

2.4 高原鼢鼠和高原鼠兔合成磷脂酰胆碱途径关键基因变异位点的 SIFT 评估

SIFT 结果表明，高原鼠兔 *Chok-β* 的 212 Arg 位点对其基因功能有显著影响 ($P < 0.05$)，而 52 His、74 Gln、257 Arg、331 Ala 和 334 Ser 位点对其功能影响不显著 ($P > 0.05$)；高原鼠兔 *Pcyt-β* 的 18 Pro 位点对其基因功能有显著影响 ($P < 0.05$)，而 339 Ala 对其功能影响不显著 ($P > 0.05$)，高原鼢鼠 *Pcyt-β* 的 21 Arg 位点对其功能影响不显著 ($P > 0.05$)；高原鼠兔 *Cpt* 的 2 Asp、14 Leu 和 91 Asp 位点对其功能影响不显著 ($P > 0.05$)（表 4）。

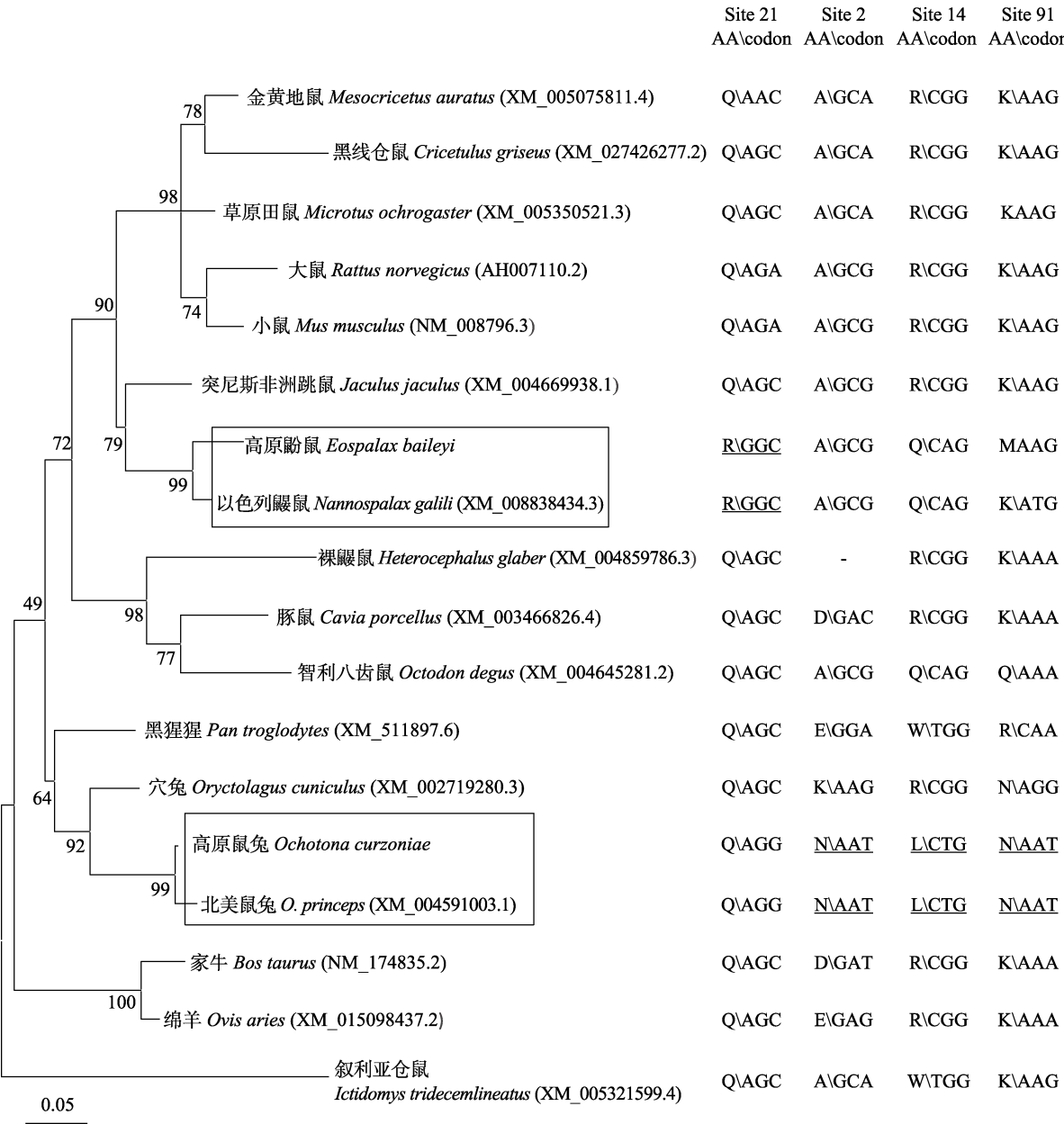


图 1 基于 *Cpt* 基因编码区序列构建的最大似然法系统发育树和平行进化位点

Fig. 1 Maximum likelihood tree based on coding sequences of *Cpt* gene and convergent evolution sites

系统发育树中的方框表示同源性最高的高原鼢鼠和以色列鼢鼠，高原鼠兔和北美鼠兔。系统发育树后的序列分别表示氨基酸和对应的碱基序列，加下划线的氨基酸表示高原鼢鼠和以色列鼢鼠、以及高原鼠兔和北美鼠兔共有的趋同进化位点。图中各支上的数字以及标尺分别表示自展值和距离标尺。

The boxes in the phylogenetic tree show the *Ochotona curzoniae* and *O. princeps* with the highest homology, as well as the *Eospalax baileyi* and *Nannospalax galili*. Amino acids and codons of parallel evolutionary sites are shown in the right of each panel, and amino acids in *E. baileyi* and *N. galili*, and between *O. curzoniae* and *O. princeps* with the highest homology are underlined. The numbers and scales on each branch represent the bootstrap value and the distance scale, respectively.

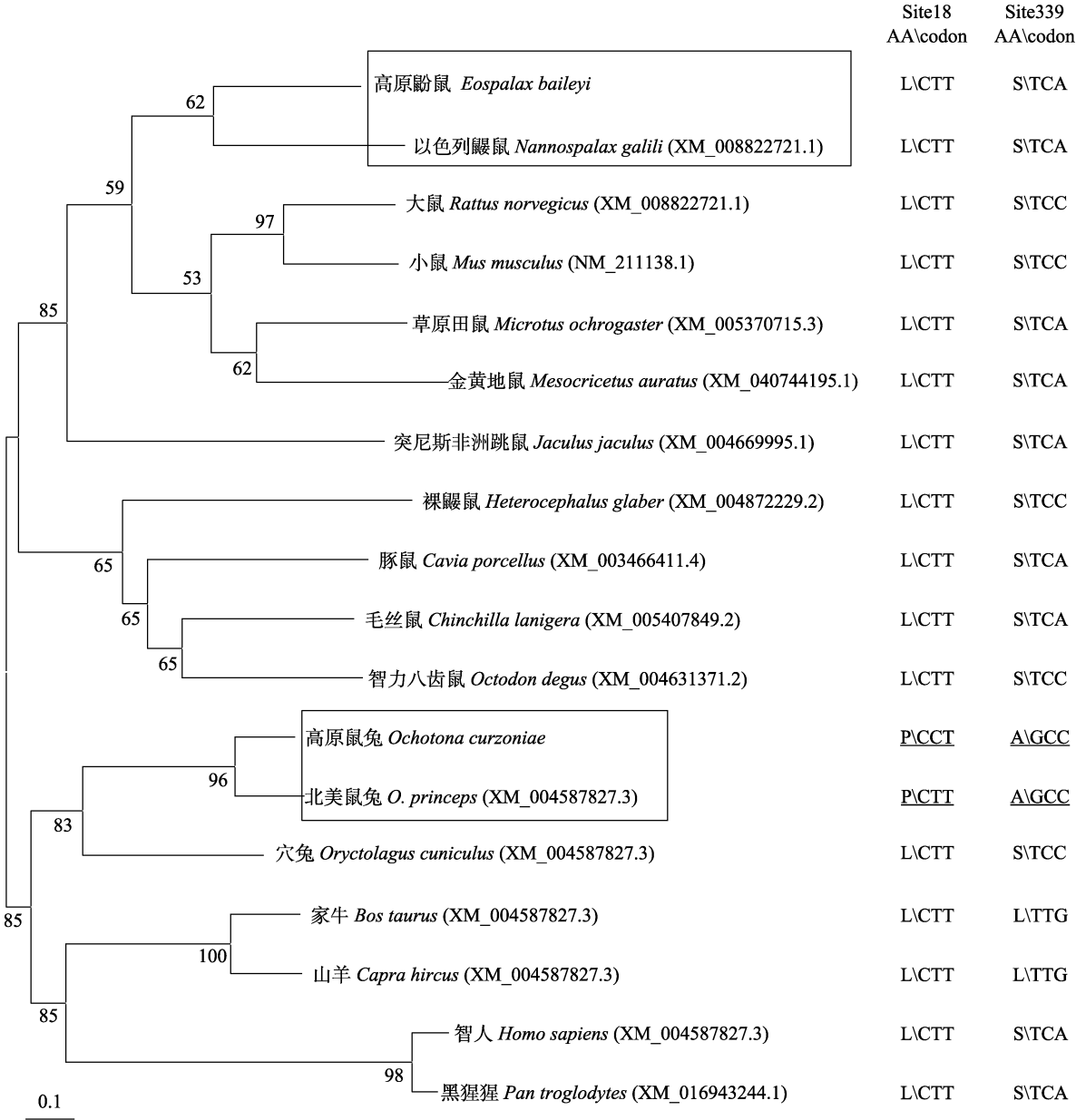


图 2 基于 *Pcyt-β* 基因编码区序列构建的最大似然法系统发育树和平行进化位点

Fig. 2 Maximum likelihood tree based on coding sequences of *Pcyt-β* gene and convergent evolution sites

系统发育树中的方框表示同源性最高的高原麝鼠和以色列鼯鼠，高原鼠兔和北美鼠兔。系统发育树后的序列分别表示氨基酸和对应的碱基序列，加下划线的氨基酸表示高原麝鼠和以色列鼯鼠、以及高原鼠兔和北美鼠兔共有的趋同进化位点。图中各支上的数字以及标尺分别表示自展值和距离标尺。

The boxes in the phylogenetic tree show the *Ochotona curzoniae* and *O. princeps* with the highest homology, as well as the *Eospalax baileyi* and *Nannospalax galili*. Amino acids and codons of parallel evolutionary sites are shown in the right of each panel, and amino acids in *E. baileyi* and *N. galili*, and between *O. curzoniae* and *O. princeps* with the highest homology are underlined. The numbers and scales on each branch represent the bootstrap value and the distance scale, respectively.

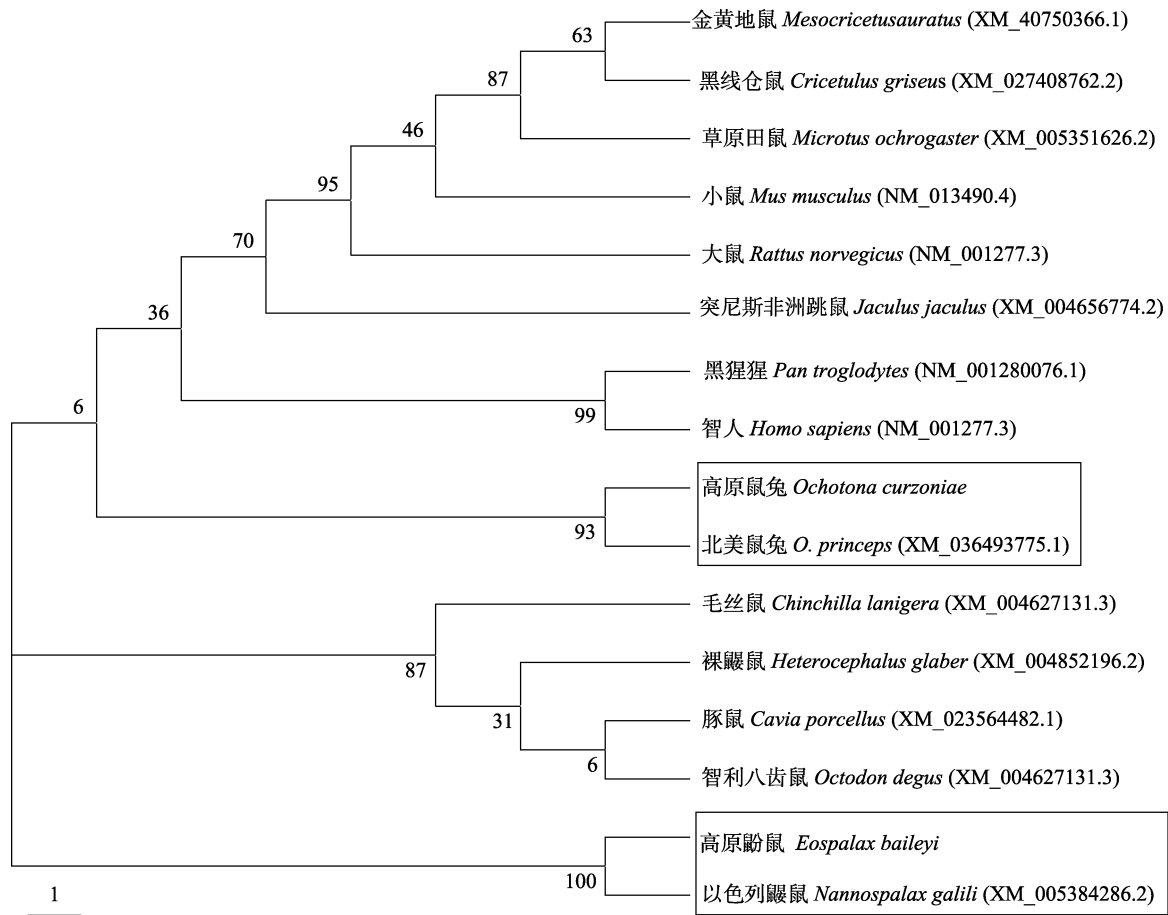


图 3 基于 *Chok-α* 基因编码区序列构建的最大似然法系统发育树
Fig. 3 Maximum likelihood tree based on coding sequences of *Chok-α* gene

系统发育树中的方框表示同源性最高的高原鼠兔和北美鼠兔，以及高原鼢鼠和以色列鼢鼠。图中各支上的数字以及标尺分别表示自展值和距离标尺。

The boxes in the phylogenetic tree show the *Ochotona curzoniae* and *O. princeps* with the highest homology, as well as the *Eospalax baileyi* and *Nannospalax galili*. The numbers and scales on each branch represent the bootstrap value and the distance scale, respectively.

2.5 高原鼢鼠、高原鼠兔和 SD 大鼠肺组织中磷脂酰胆碱合成关键酶基因的 mRNA 表达水平

荧光定量 PCR 结果显示，高原鼢鼠 *Chok-α* 和 *Chok-β* mRNA 表达水平均显著高于高原鼠兔与 SD 大鼠 ($P < 0.01$)，高原鼠兔 *Chok-β* mRNA 表达水平显著高于 SD 大鼠 ($P < 0.05$)；SD 大鼠 *Pcyt-α*、*Pcyt-β* 和 *Cpt* mRNA 表达水平显著高于高原鼠兔和高原鼢鼠，且高原鼠兔与高原鼢鼠间均无差异 ($P > 0.05$) (图 6)。

3 讨论

低氧会导致肺血管收缩，引起肺动脉高压 (Heath et al. 1973, Hopkins et al. 2002)。经过长期的进化，高原动物形成了一系列有效适应低氧环境的生理和分子机制 (魏登邦等 2006, 王晓君等 2008, 朱世海等 2009)。与 SD 大鼠相比，高原鼢鼠和高原鼠兔的单个肺泡面积小，肺泡总表面积大；同时微血管密度高，气血屏障中毛细血管数量多、增加了肺部

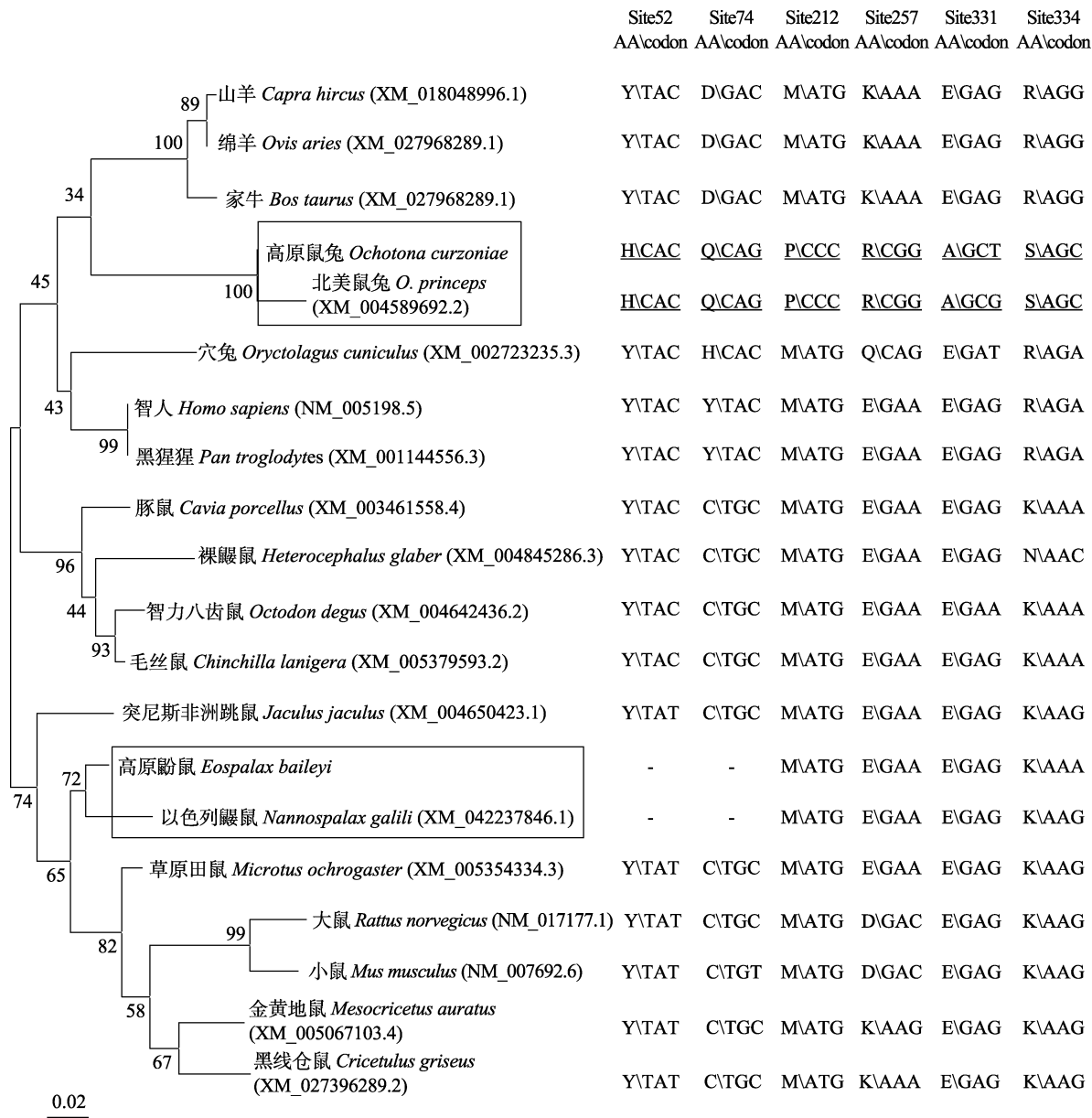


图 4 基于 *Chok-β* 基因编码区序列构建的最大似然法系统发育树和平行进化位点

Fig. 4 Maximum likelihood tree based on coding sequences of *Chok-β* gene and convergent evolution sites

系统发育树中的方框表示同源性最高的高原鼠兔和北美鼠兔，以及高原鼯鼠和以色列鼯鼠。系统发育树后的序列分别表示氨基酸和对应的碱基序列，加下划线的氨基酸表示高原鼯鼠和以色列鼯鼠、以及高原鼠兔和北美鼠兔共有的趋同进化位点。图中各支上的数字以及标尺分别表示自展值和距离标尺。

The boxes in the phylogenetic tree show the *Ochotona curzoniae* and *O. princeps* with the highest homology, as well as the *Eospalax baileyi* and *Nannospalax galili*. Amino acids and codons of parallel evolutionary sites are shown in the right of each panel, and amino acids in *E. baileyi* and *N. galili*, and between *O. curzoniae* and *O. princeps* with the highest homology are underlined. The numbers and scales on each branch represent the bootstrap value and the distance scale, respectively.

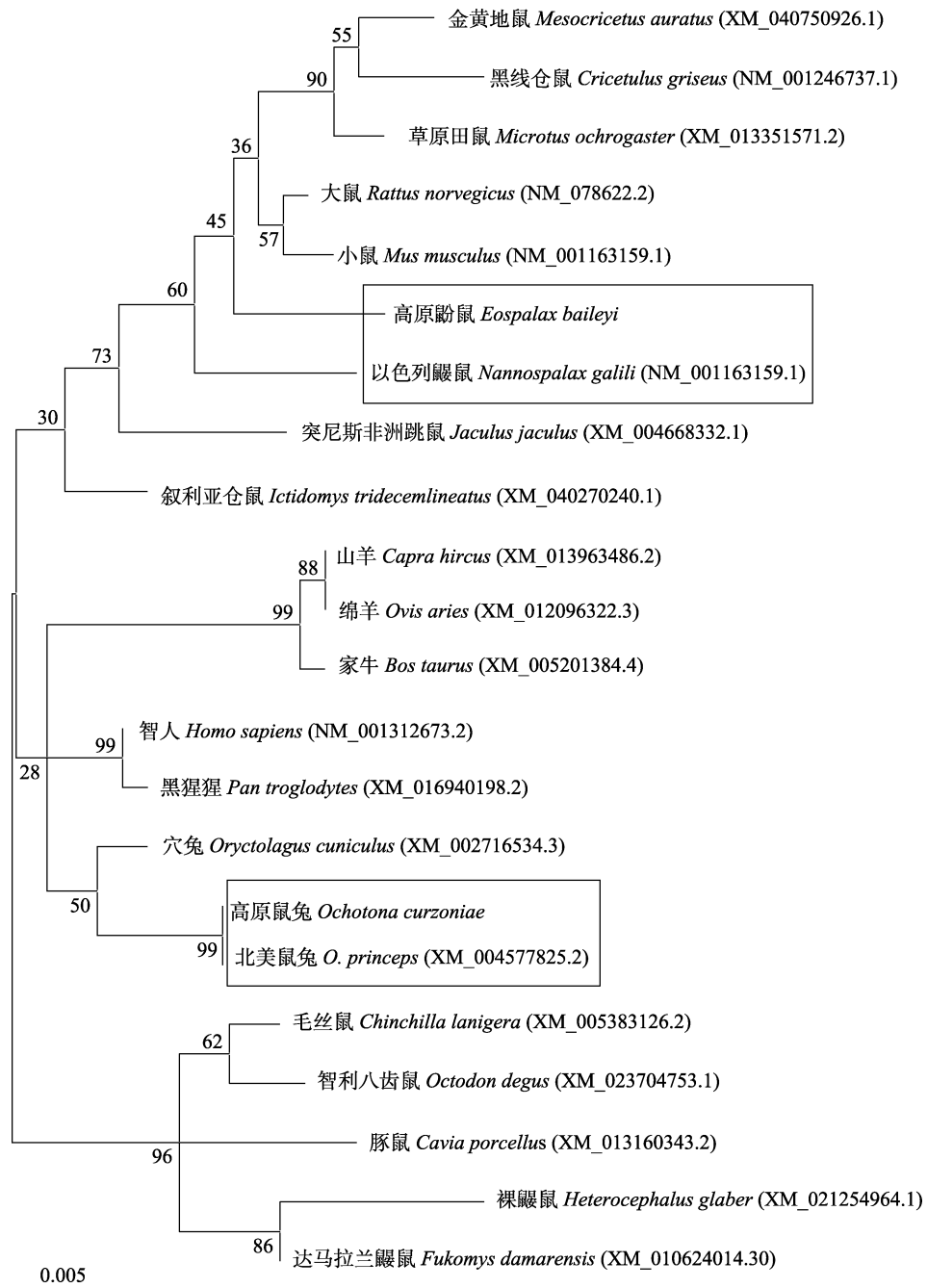


图 5 基于 *Pcyt-α* 基因编码区序列构建的最大似然法系统发育树

Fig. 5 Maximum likelihood tree based on coding sequences of *Pcyt-α* gene

系统发育树中的方框表示同源性最高的高原鼠兔和北美鼠兔，高原麝鼠和以色列鼯鼠。图中各支上的数字以及标尺分别表示自展值和距离标尺。

The boxes in the phylogenetic tree show the *Ochotona curzoniae* and *O. princeps* with the highest homology, as well as the *Eospalax baileyi* and *Nannospalax galili*. The numbers and scales on each branch represent the bootstrap value and the distance scale, respectively.

表 3 选择压力与正向选择位点
Table 3 Selection pressure and positive selection sites

基因/物种 Gene/species	模型 Model	参数估计 Estimate of parameters	似然率值 Likelihood value (- lnL ^a)	正向选择位点 Positively selected sites	2 倍差值 (P 值) 2ΔlnL (P value)
<i>Chok-α</i>					
高原麝鼠	Null A	$p_0 = 0.730\ 52, p_1 = 0.120\ 92, (p_2 + p_3 = 0.148\ 56), \omega_0 = 0.056\ 55, \omega_1 = 1, \omega_2 = 1$	- 7 466.746 865		
<i>Eospalax baileyi</i>	Mode A	$p_0 = 0.815\ 31, p_1 = 0.138\ 94, (p_2 + p_3 = 0.045\ 75), \omega_0 = 0.058\ 91, \omega_1 = 1, \omega_2 = 1$	- 7 438.334 444	4 K*, 5 F*, 10 E*	0 (P = 0.5)
高原鼠兔	Null A	$p_0 = 0.601\ 56, p_1 = 0.104\ 44, (p_2 + p_3 = 0.294\ 00), \omega_0 = 0.070\ 96, \omega_1 = 1, \omega_2 = 1$	- 7 485.985 657		
<i>Ochotona curzoniae</i>	Mode A	$p_0 = 0.755\ 17, p_1 = 0.130\ 82, (p_2 + p_3 = 0.114\ 01), \omega_0 = 0.071\ 04, \omega_1 = 1, \omega_2 = 1$	- 7 485.934 260	135 D, 401 S, 405 R	0 (P = 1.0)
<i>Chok-β</i>					
高原麝鼠	Null A	$p_0 = 0.816\ 11, p_1 = 0.183\ 89, (p_2 + p_3 = 0.000\ 00), \omega_0 = 0.051\ 90, \omega_1 = 1, \omega_2 = 1$	- 6 653.830 261		
<i>E. baileyi</i>	Mode A	$p_0 = 0.816\ 11, p_1 = 0.183\ 89, (p_2 + p_3 = 0.000\ 00), \omega_0 = 0.051\ 90, \omega_1 = 1, \omega_2 = 1$	- 6 653.830 261		0 (P = 1.0)
高原鼠兔	Null A	$p_0 = 0.742\ 13, p_1 = 0.162\ 58, (p_2 + p_3 = 0.095\ 28), \omega_0 = 0.052\ 18, \omega_1 = 1, \omega_2 = 1$	- 6 653.181 205		
<i>O. curzoniae</i>	Mode A	$p_0 = 0.817\ 35, p_1 = 0.173\ 86, (p_2 + p_3 = 0.008\ 79), \omega_0 = 0.053\ 18, \omega_1 = 1, \omega_2 = 1$	- 6 644.418 585	4 M*, 7 E, 9 L, 92 Y	0 (P = 1.0)
<i>Pcyt-α</i>					
高原麝鼠	Null A	$p_0 = 0.929\ 78, p_1 = 0.054\ 21, (p_2 + p_3 = 0.016\ 01), \omega_0 = 0.025\ 24, \omega_1 = 1, \omega_2 = 1$	- 4 575.813 144		
<i>E. baileyi</i>	Mode A	$p_0 = 0.929\ 78, p_1 = 0.054\ 21, (p_2 + p_3 = 0.016\ 01), \omega_0 = 0.025\ 24, \omega_1 = 1, \omega_2 = 1$	- 4 575.813 144		0 (P = 1.0)
高原鼠兔	Null A	$p_0 = 0.944\ 39, p_1 = 0.055\ 61, (p_2 + p_3 = 0.000\ 00), \omega_0 = 0.025\ 78, \omega_1 = 1, \omega_2 = 1$	- 4 575.969 654		
<i>O. curzoniae</i>	Mode A	$p_0 = 0.944\ 39, p_1 = 0.055\ 61, (p_2 + p_3 = 0.000\ 00), \omega_0 = 0.025\ 78, \omega_1 = 1, \omega_2 = 1$	- 4 575.969 654		0 (P = 1.0)
<i>Pcyt-β</i>					
高原麝鼠	Null A	$p_0 = 0.988\ 98, p_1 = 0.011\ 02, (p_2 + p_3 = 0.000\ 00), \omega_0 = 0.011\ 99, \omega_1 = 1, \omega_2 = 1$	- 4 030.928 753		
<i>E. baileyi</i>	Mode A	$p_0 = 0.988\ 98, p_1 = 0.011\ 02, (p_2 + p_3 = 0.000\ 00), \omega_0 = 0.011\ 99, \omega_1 = 1, \omega_2 = 1$	- 4 030.928 750		0 (P = 1.0)
高原鼠兔	Null A	$p_0 = 0.988\ 98, p_1 = 0.011\ 02, (p_2 + p_3 = - 0.000\ 00), \omega_0 = 0.011\ 99, \omega_1 = 1, \omega_2 = 1$	- 4 030.928 750		
<i>O. curzoniae</i>	Mode A	$p_0 = 0.988\ 98, p_1 = 0.011\ 02, (p_2 + p_3 = - 0.000\ 00), \omega_0 = 0.011\ 99, \omega_1 = 1, \omega_2 = 1$	- 4 030.928 750		0 (P = 1.0)
<i>Cpt</i>					
高原麝鼠	Null A	$p_0 = 0.749\ 65, p_1 = 0.165\ 36, (p_2 + p_3 = 0.084\ 99), \omega_0 = 0.095\ 64, \omega_1 = 1, \omega_2 = 1$	- 3 654.767 769		
<i>E. baileyi</i>	Mode A	$p_0 = 0.807\ 49, p_1 = 0.176\ 68, (p_2 + p_3 = 0.015\ 83), \omega_0 = 0.095\ 69, \omega_1 = 1, \omega_2 = 1$	- 3 652.522 235	163 E*, 175 Y	0 (P = 0.5)
高原鼠兔	Null A	$p_0 = 0.814\ 43, p_1 = 0.185\ 57, (p_2 + p_3 = 0.000\ 00), \omega_0 = 0.097\ 43, \omega_1 = 1, \omega_2 = 1$	- 3 656.062 361		
<i>O. curzoniae</i>	Mode A	$p_0 = 0.814\ 43, p_1 = 0.185\ 57, (p_2 + p_3 = 0.000\ 00), \omega_0 = 0.097\ 43, \omega_1 = 1, \omega_2 = 1$	- 3 656.062 361		0 (P = 1.0)

^a 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; ω_0 、 ω_1 和 ω_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 和 $p_2 + p_3$ are the proportion of purifying, neutral and positive selection, respectively; ω_0 , ω_1 and ω_2 are the nonsynonymous/synonymous substitution ratios to determine purifying, neutral and positive selection, respectively.

表 4 高原鼢鼠和高原鼠兔磷脂酰胆碱合成途径中突变位点对其功能的影响

Table 4 The effects of mutation sites on the function of phosphatidylcholine synthesis pathway in *Eospalax baileyi* and *Ochotona curzoniae*

蛋白 Protein	物种 Species	变异位点 Substitution	SIFT 分值 SIFT score	SIFT 预测结果 SIFT prediction (cutoff = 0.05)
Chok-β	高原鼠兔 <i>Ochotona curzoniae</i>	Y 52 H	0.170	良性的 Tolerated
		C 74 Q	0.304	良性的 Tolerated
		M 212 P	0.048	有影响 Damaging
		D 257 R	0.403	良性的 Tolerated
		E 331 A	0.131	良性的 Tolerated
		K 334 S	0.686	良性的 Tolerated
Pcyt-β	高原鼠兔 <i>O. curzoniae</i>	L 18 P	0.001	有影响 Damaging
		S 339 A	0.255	良性的 Tolerated
Cpt	高原鼢鼠 <i>Eospalax baileyi</i>	Q 21 R	0.052	良性的 Tolerated
	高原鼠兔 <i>O. curzoniae</i>	A 2 N	0.055	良性的 Tolerated
		R 14 L	0.233	良性的 Tolerated
		K 91 N	0.392	良性的 Tolerated

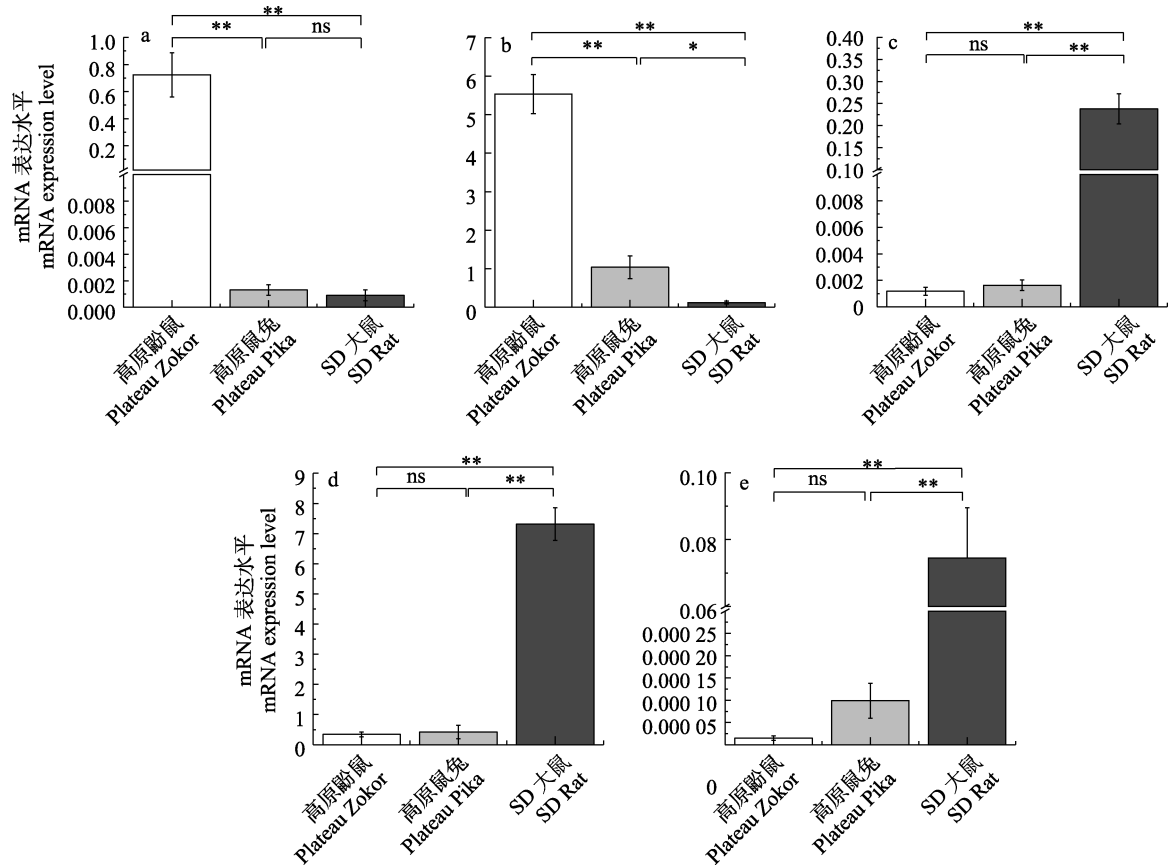


图 6 高原鼢鼠、高原鼠兔及 SD 大鼠磷脂酰胆碱合成关键酶基因的 mRNA 表达水平

Fig. 6 The mRNA expression levels of key genes in synthetic phosphatidylcholine of *Eospalax baileyi*, *Ochotona curzoniae* and *Rattus norvegicus*

a. *Chok-α*; b. *Chok-β*; c. *Cpt*; d. *Pcyt-α*; e. *Pcyt-β*. ** $P < 0.01$; * $P < 0.05$; ns 表示差异无统计学意义。
a. *Chok-α*; b. *Chok-β*; c. *Cpt*; d. *Pcyt-α*; e. *Pcyt-β*. ** $P < 0.01$; * $P < 0.05$; ns indicates not significantly different.

气血交换的面积,具有较高的肺气体扩散容量,这些对生境的适应性变化有利于高原鼯鼠和高原鼠兔从低氧环境中获取氧(王晓君等 2008)。肺是气体交换的场所,肺表面活性物质对于维持肺气体交换功能发挥着重要作用(Schoel et al. 1994, Zuo et al. 2008)。肺表面活性物质磷脂通过降低肺泡表面张力维持肺泡正常结构,从而增加肺的稳定性,保证哺乳动物的正常呼吸(Haagsman et al. 2008, Glasser et al. 2012)。饱和二棕榈酰磷脂酰胆碱(dipalmitoylphosphatidylcholine, DPPC)富集在肺表面活性物质膜上,是磷脂酰胆碱中主要成分(曹栋等 2002, Bernardino de la Serna et al. 2012),并可改变肺表面张力防止肺泡在呼气末发生肺不张,从而改善呼吸功能(朱光发等 2000, 曹栋等 2002, 刘中洋等 2015)。Chander 等(1975)发现,低氧降低了肺组织中总脂质量、总磷脂量和磷脂酰胆碱量,肺泡表面活性物质脂质含量也减少;Yatsu 等(1971)发现,暴露于缺氧环境的大鼠脑磷脂含量减少;胡琳等(1997)研究表明,高原鼠兔肺表面活性物质磷脂构成比明显低于大鼠;陈华伟(2004)通过与移居高原 Wistar 大白鼠相比,发现高原鼯鼠和高原鼠兔肺灌洗液中肺表面活性物质磷脂含量显著升高,且高原鼯鼠总磷脂含量高于高原鼠兔,表明低氧会导致磷脂含量明显下降。

以色列鼯鼠隶属鼯形鼠亚科(Spalacidae),主要分布在以色列南部加利利山上,和高原鼯鼠一样都终身生活在封闭的地下洞道中,其生境最大特点为低氧和高二氧化碳(Nevo et al. 2011);北美鼠兔属鼠兔科,主要分布在美国西部的高山地区,和高原鼠兔生境相似,海拔在 3 000 m 以上,面临的挑战是低氧(Peacock et al. 1997, Smith et al. 2015)。研究表明,地下鼠蛋白结构的变异对其功能影响显著(Gurnett et al. 1984, Band et al. 2010),本研究通过物种进化树和同源性比对结果可以看出,高原鼠兔与北美鼠兔以及高原鼯鼠与以色列鼯鼠合成磷脂酰胆碱途径关键基因序列的同

源性最高;高原鼯鼠 *Chok-α*、高原鼠兔 *Chok-β* 和高原鼯鼠 *Cpt* 基因有正向选择位点;对 *Chok-α*、*Chok-β*、*Pcyt-α*、*Pcyt-β* 和 *Cpt* 蛋白氨基酸序列分析发现,高原鼠兔与北美鼠兔,高原鼯鼠与以色列鼯鼠存在共同的平行进化位点,通过 SIFT 评估发现,高原鼠兔 *Chok-β* 第 212 号位点、*Pcyt-β* 第 18 号位点的变异对其功能有显著影响。*Chok-α*、*Chok-β*、*Pcyt-α*、*Pcyt-β* 和 *Cpt* 基因的部分氨基酸位点发生正向选择,导致氨基酸的结构发生变化,酶与底物结合能力有效增强,从而影响基因功能。

高原鼯鼠与高原鼠兔作为青藏高原土著动物,在缺氧情况下,由于生活环境的差异,高原鼯鼠的洞道生境氧含量明显低于高原鼠兔的生境氧含量,导致磷脂合成供能方式发生改变(陈华伟 2004)。研究发现,缺氧降低了 *Chok* 活性以及 *Chok-α* mRNA 和蛋白水平, *Chok* 表达和活性的降低有助于胆碱磷酸化水平的降低(Bansal et al. 2012)。代贝贝(2021)通过检测磷脂含量发现, *Chok-β* 下降导致了线粒体中的磷脂酰胆碱含量显著下降; *Pcyt* 是合成磷脂酰胆碱途径的限速酶, *Pcyt-α* 是 *Pcyt* 的主要亚型,已有研究证实增强 *Pcyt-α* 的表达能促进磷脂酰胆碱的合成(路法超等 2018); *Cpt* 是参与肺表面活性物质磷脂合成途径的最后一步反应,可直接控制合成磷脂酰胆碱。本文荧光定量 PCR 结果表明,高原鼯鼠 *Chok-α* 和 *Chok-β* mRNA 表达水平均显著高于高原鼠兔与 SD 大鼠,SD 大鼠 *Pcyt-α*、*Pcyt-β* 和 *Cpt* mRNA 表达水平均显著高于高原鼯鼠与高原鼠兔。

由于脂类和蛋白质共同构成肺表面活性物质,它们协同工作以降低肺表面张力和提高肺免疫功能,维持正常的肺功能。先前研究表明,与 SD 大鼠相比,高原鼯鼠和高原鼠兔肺表面活性物质中总磷脂含量减少,总蛋白含量显著增加(李永晓等 2021)。魏登邦课题组分别在高原鼠兔和高原鼯鼠肺表面活性物质中发现了高含量的同源四聚体血红蛋白 HBD(δ)和 HBy-like,它们增强了肺表面活性物

质的溶氧量, 提高了氧气从肺泡向血液扩散的速度, 这是高原鼯鼠和高原鼠兔适应低氧环境的重要机制 (An et al. 2022, Li et al. 2022)。总之, 与 SD 大鼠相比, 高原鼯鼠和高原鼠兔肺表面活性物质的异同加强了它们肺气体交换能力, 从而增强了对低氧环境的适应性。

参 考 文 献

- An Z F, Wei L N, Xu B, et al. 2022. A homotetrameric hemoglobin expressed in alveolar epithelial cells increases blood oxygenation in high-altitude Plateau Pika (*Ochotona curzoniae*). *Cell Reports*, 41(1): 111446.
- Aoyama C, Liao H N, Ishidate K. 2004. Structure and function of choline kinase isoforms in mammalian cells. *Progress in Lipid Research*, 43(3): 266–281.
- Aoyama C, Yamazaki N, Terada H, et al. 2000. Structure and characterization of the genes for murine choline/ethanolamine kinase isozymes alpha and beta. *Journal of Lipid Research*, 41(3): 452–464.
- 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): 3347–3352.
- Bansal A, Harris R A, DeGrado T R. 2012. Choline phosphorylation and regulation of transcription of choline kinase α in hypoxia. *Journal of Lipid Research*, 53(1): 149–157.
- Baze M M, Schlauch K, Hayes J P. 2010. Gene expression of the liver in response to chronic hypoxia. *Physiological Genomics*, 41(3): 275–288.
- Bernardino de la Serna J, Vargas R, Picardi V, et al. 2012. Segregated ordered lipid phases and protein-promoted membrane cohesivity are required for pulmonary surfactant films to stabilize and protect the respiratory surface. *Faraday Discussions*, 161: 535–548.
- Chander A, Viswanathan R, Venkitesubramanian T A. 1975. Effect of acute hypobaric hypoxia on 32-P incorporation into phospholipids of alveolar surfactant, lung, liver and plasma of rat. *Environmental Physiology & Biochemistry*, 5(1): 27–36.
- Chida N, Hirono H, Nishimura Y, et al. 1973. Choline phosphokinase, phosphorylcholine cytidyltransferase and CDP-choline:1,2-diglyceride cholinephosphotransferase activity in developing rat lung. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine*, 110(3): 273–282.
- Glasser J R, Mallampalli R K. 2012. Surfactant and its role in the pathobiology of pulmonary infection. *Microbes and Infection*, 14(1): 17–25.
- 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.
- Haagsman H P, Hogenkamp A, van Eijk M, et al. 2008. Surfactant collectins and innate immunity. *Neonatology*, 93(4): 288–294.
- Hawgood S, Benson B J, Jr Hamilton R L. 1985. Effects of a surfactant-associated protein and calcium ions on the structure and surface activity of lung surfactant lipids. *Biochemistry*, 24(1): 184–190.
- Heath D, Edwards C, Winson M, et al. 1973. Effects on the right ventricle, pulmonary vasculature, and carotid bodies of the rat of exposure to, and recovery from, simulated high altitude. *Thorax*, 28(1): 24–28.
- Hogan M, Zimmermann L J, Wang J, et al. 1994. Increased expression of CTP: phosphocholine cytidyltransferase in maturing type II cells. *The American Journal of Physiology*, 267(1): L25–L32.
- Hopkins N, McLoughlin P. 2002. The structural basis of pulmonary hypertension in chronic lung disease: remodelling, rarefaction or angiogenesis? *Journal of Anatomy*, 201(4): 335–348.
- Ishidate K. 1997. Choline/ethanolamine kinase from mammalian tissues. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1348(1/2): 70–78.
- Kent C. 1997. CTP: phosphocholine cytidyltransferase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*, 1348(1/2): 79–90.
- Kettel L J. 1969. The surfactant system of the lung. *JAMA*, 207(12): 2287.
- 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: 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.

- Larkin M A, Blackshields G, Brown N P, et al. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23(21): 2947–2948.
- Li J M, An Z F, Wei L N, et al. 2022. A new homotetramer hemoglobin in the pulmonary surfactant of Plateau Zokors (*Myospalax baileyi*). *Frontiers in Genetics*, 13: 824049.
- Liu H, Setiono R. 1995. Chi2: feature selection and discretization of numeric attributes. *Proceedings of 7th IEEE International Conference on Tools with Artificial Intelligence*, 388–391.
- Lykidis A, Jackowski S. 2001. Regulation of mammalian cell membrane biosynthesis. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, 65: 361–393.
- McMaster C R, Bell R M. 1997. CDP-ethanolamine: 1, 2-diacylglycerol ethanolaminephosphotransferase. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1348(1/2): 117–123.
- Nei M, Kumar S. 2000. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford: Oxford University Press, 385–386.
- Nevo E. 2011. Evolution under environmental stress at macro- and microscales. *Genome Biology and Evolution*, 3: 1039–1052.
- Norris R W, Zhou K, Zhou C, et al. 2004. The phylogenetic position of the zokors (*Myospalacinae*) and comments on the families of muroids (Rodentia). *Molecular Phylogenetics & Evolution*, 31(3): 972–978.
- Peacock M M, Smith A T. 1997. The effect of habitat fragmentation on dispersal patterns, mating behavior, and genetic variation in a pika (*Ochotona princeps*) metapopulation. *Oecologia*, 112(4): 524–533.
- Schoel W M, Schürch S, Goerke J. 1994. The captive bubble method for the evaluation of pulmonary surfactant: surface tension, area, and volume calculations. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1200(3): 281–290.
- 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.
- Shao Y, Li J X, Ge R L, et al. 2015. Genetic adaptations of the Plateau Zokor in high-elevation burrows. *Scientific Reports*, 5: 17262.
- Smith A T, Nagy J D. 2015. Population resilience in an American pika (*Ochotona princeps*) metapopulation. *Journal of Mammalogy*, 96(2): 394–404.
- Spragg R G, Li J L. 2000. Effect of phosphocholine cytidyltransferase overexpression on phosphatidylcholine synthesis in alveolar type II cells and related cell lines. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 22(1): 116–124.
- Stöver B C, Müller K F. 2010. TreeGraph 2: combining and visualizing evidence from different phylogenetic analyses. *BMC Bioinformatics*, 11: 7.
- Vance D E, Vance J E. 1991. *Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes*. Elsevier Science.
- Weinhold P A, Feldman D A. 1995. Fatty acids promote the formation of complexes between choline-phosphate cytidyltransferase and cytidyltransferase binding protein. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 318(1): 147–156.
- 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.
- Yang Z H. 2007. PAML 4: phylogenetic analysis by maximum likelihood. *Molecular Biology and Evolution*, 24(8): 1586–1591.
- Yatsu F M, Moss S A. 1971. Brain lipid changes following hypoxia. *Stroke*, 2(6): 587–593.
- 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 T, Lei M L, Zhou H, et al. 2022. Phylogenetic relationships of the zokor genus *Eospalax* (Mammalia, Rodentia, Spalacidae) inferred from whole-genome analyses, with description of a new species endemic to Hengduan Mountains. *Zoological Research*, 43(3): 331–342.
- Zhou C Q, Zhou K Y. 2008. The validity of different zokor species and the genus *Eospalax* inferred from mitochondrial gene sequences. *Integrative Zoology*, 3(4): 290–298.
- Zuo Y Y, Veldhuizen R A W, Neumann A W, et al. 2008. Current perspectives in pulmonary surfactant: inhibition, enhancement and evaluation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1778(10): 1947–1977.
- 曹栋, 裘爱泳, 王兴国. 2002. 磷脂及磷脂酰胆碱生物学功能. 粮

- 食与油脂, 15(11): 23–24.
- 陈华伟. 2004. 高原鼯鼠、鼠兔肺表面活性物质的研究. 高原医学杂志, 14(3): 10–12.
- 代贝贝. 2021. *CHKB* 的新发突变通过影响磷脂稳态导致扩张型心肌病. 武汉: 华中科技大学博士学位论文.
- 冯祚建, 郑昌琳. 1985. 中国鼠兔属 (*Ochotona*) 的研究: 分类与分布. 兽类学报, 5(4): 269–289.
- 胡琳, 陈华伟, 许子俊. 1997. 高原鼠兔肺表面活性物质的研究. 高原医学杂志, 7(1): 27–29.
- 胡小中. 2011. 磷脂酰胆碱的生理功能和作用机理. 粮油食品科技, 19(4): 42–44.
- 蒋志刚. 2015. 中国哺乳动物多样性及地理分布. 北京: 科学出版社.
- 李涛, 肖玉, 王宏伟, 等. 2007. 血管内皮生长因子对肺表面活性物质磷脂合成的影响. 中国新生儿科杂志, 22(5): 285–288.
- 李永晓, 徐波, 安志芳, 等. 2021. 高原鼯鼠、高原鼠兔和大鼠肺表面活性物质组成和含量的比较. 生理学报, 73(1): 51–61.
- 刘中洋, 杨阳, 裘荣刚, 等. 2015. 肺表面活性物质及其在肺感染作用中的研究进展. 现代生物医学进展, 15(2): 376–379.
- 路法超, 谢小燕, 尹晓敏, 等. 2018. 磷酸胆碱胞苷酰转移酶 α 在口腔鳞状细胞癌中的表达及潜在临床意义. 中华口腔医学杂志, 53(4): 254–258.
- 秦环龙, 吴静怡. 1996. 急性肺损伤家兔肺表面活性物质磷脂含量、活性与肺功能关系的研究. 镇江医学院学报, 6(3): 232–233.
- 沈南英, 王朝华, 刘国生, 等. 1982. 一六〇五的毒力测定及其防治草原害鼠的药效试验. 中国草原, 4(3): 52–56.
- 施银柱, 樊乃昌. 1980. 草原害鼠及其防治. 西宁: 青海人民出版社.
- 王晓君, 魏登邦, 魏莲, 等. 2008. 高原鼯鼠和高原鼠兔肺细叶的结构特征. 动物学报, 54(3): 531–539.
- 王祖望, 曾缙祥, 韩永才. 1979. 高原鼠兔和中华鼯鼠气体代谢的研究. 动物学报, 25(1): 75–85.
- 魏登邦, 张建梅, 魏莲, 等. 2006. 高原鼯鼠对低氧高二氧化碳环境适应的相关血液生理指标的季节变化. 动物学报, 52(5): 871–877.
- 薛立军. 2007. 人源性肺表面活性物质制备和研究. 广州: 第一军医大学博士学位论文.
- 杨晓静, 毛宝龄, 钱桂生, 等. 1997. 肺动脉高压大鼠模型的复制. 上海实验动物科学, 17(4): 199–202.
- 查锡良, 蔡镇潮. 1994. 胆碱摄取及磷脂酰胆碱合成的调节研究. 生物化学与生物物理学报, 26(5): 459–467.
- 朱光发, 钮善福, 蔡映云, 等. 2000. 肺表面活性物质在急性油酸性肺损伤时的变化. 中国危重病急救医学, (9): 525–528.
- 朱世海, 齐新章, 王晓君, 等. 2009. 高原鼯鼠和高原鼠兔骨骼肌摄氧功能差异. 生理学报, 61(4): 373–378.
- 朱正美. 1985a. 磷脂酰胆碱的生物合成及其调节(一). 国外医学: 分子生物学分册, 7(5): 224–228, 232.
- 朱正美. 1985b. 磷脂酰胆碱的生物合成及其调节(二). 国外医学: 分子生物学分册, 7(6): 274–279.