

第一章 青藏高原环境特征以及土著动物适应特征

新生代印度次大陆与欧亚大陆碰撞的重大地质事件，导致青藏高原隆升而成为“世界屋脊”。与此同时，在其逐步隆升过程中所产生的地质、地貌变迁和气候环境的变化对生活于其中的各种生物的分布、种群结构、生存适应、进化模式等产生了深远的影响。

本章主要通过青藏高原地质变迁和水系演化关系、高原现今气候环境特征，以及主要代表性土著动物的概述，向读者介绍青藏高原独特的环境特征以及主要代表性土著动物的适应特征。

第一节 青藏高原地质变迁和水系演化

青藏高原地貌复杂，江河纵横，咸淡水湖泊棋布，现今高原水系格局的形成，与新生代印度次大陆与欧亚大陆碰撞作用引起的青藏高原隆起、地貌演变及古气候变迁等因素密切相关。研究表明，在漫长的地质时期，青藏地区曾多次经历过广泛的海浸，直到始新世末 37 Ma 前后，印度板块沿雅鲁藏布江缝合线俯冲下插导致冈底斯山脉崛起，特提斯海从藏南全部撤出。在冈底斯山南缘磨拉石带堆积了 2000~4000 m 的沉积，而在喜马拉雅西南麓，老第三纪的穆里组物质主要来源于印度地盾，说明此时喜马拉雅山尚未隆起。青藏高原江河源地区成陆较早，北部昆仑山主脊一带最高海相地层为晚三叠统，南部唐古拉山一带为中侏罗统，它们分别在印支运动和燕山运动中褶皱，并上升成陆。

Klootwijk 等（1985）的研究表明，24 Ma 前后欧亚板块难以再变形缩短消化印度板块的俯冲应力，而转变成造山运动。期间，雄伟的喜马拉雅山首次崛起，淡色花岗岩沿主中央断层侵位，其南麓开始沉积厚达 6000 m 的西瓦利克群堆积。甚至天山南北也不例外，Yin 等（1998）通过库车盆地磁性地层学分析，发现自早期湖相沉积向晚期辫状河流粗碎屑沉积转化的时代发生于约 21~24 Ma，对应于南天山山脉的快速隆升与快速剥蚀事件。中新世中期的喜马拉雅运动表现强烈，唐古拉山和祖尔肯乌拉山西部有中基性火山岩喷发，覆盖在前期形成的夷平面上。早第三纪沉积遭到褶皱断裂，可可西里盆地分裂为楚玛尔河、北麓河、沱沱河、尕斯库勒等规模较小的断陷盆地，并出现一些新的沉降中心。

上新世末，整个青藏地区除喜马拉雅山脉较高外，一般为海拔 1000 m 以下的坦荡低平原。上新世末至第四纪初，才开始强烈的新构造抬升，高原南北边缘

形成巨大的山系,山前堆积了深厚的山麓砾石。在雀莫错等山间盆地,晚第三纪内陆湖相沉积亦因抬升遭到剥蚀,与后期沉积之间存在侵蚀面,而广大湖盆地区较为平静。早更新世高原的强烈隆升使西北气流受到抑制,导致西南季风爆发,气候转向湿润。唐古拉山此时已发育成为长江水系与怒江、澜沧江水系分水岭的雏形。当曲河口经构造变动,岩性组成与当今当曲相似,是早更新世当曲水系也已大体形成的证据。在青藏公路钻孔研究发现,楚玛尔河盆地、沱沱河盆地此期多含淡水藻类,显示当时有湖泊并具有外流性质。

大约 3.6 Ma 开始的青藏运动,使青藏地区主夷平面大幅抬升,高原周边逆冲断层活动强烈,山麓扇砾岩大量堆积。如喜马拉雅山南麓有“巨砾岩”覆盖在细粒沉积的西瓦利克群之上;高原北部有“西域砾岩”、“玉门砾岩”,厚度达 1000 ~ 2000 m 或更厚;川西横断山区发生强大构造运动造成晚第三纪夷平面解体的“横断事件”。高原内外形成一系列拉张断陷盆地,如克什米尔盆地、滇池盆地、昔格达组所在的各个盆地。在青藏运动 B 幕 (2.6 ~ 2.5 Ma),高原平均抬升到 2000 m,黄土开始堆积,显示亚洲季风稳定出现,临夏盆地积石砾岩变形,形成东山古湖。此后大量山麓剥蚀面发育形成,如兰州地区烟洞山山麓剥蚀面。在青藏运动 C 幕 (1.7 Ma) 期间,此前形成的山麓剥蚀面解体,湖相层掀斜,分散的湖泊贯穿成大河,由此开始了青藏高原及外围地区大型水系发育历史,在此期间黄河中游形成两级最老的阶地,金沙江可能也是这时贯通诸昔格达组充填的分散湖盆而成为长江上源的。布曲雁石坪峡谷段的第四级阶地、出峡后的第三级阶地及当曲河口的第三级阶地,都是此间河流下切的产物。在楚玛尔、沱沱河等盆地,沿着盆地长轴流动并与通天河贯通的主干流已经形成。在沱沱河上游,延南北向断裂进行的沟谷溯源侵蚀终于切开祖尔肯乌拉山,使雀莫措盆地成为江源水系的一部分。盆地中的中更新世冰碛亦被切割而成冰碛台地。沱沱河从此出现江塔曲汇口的直角转折。流域北部,柴达木盆地和昆仑山北翼断块下降,西大滩谷地随之为格尔木河所袭夺,而谷地南侧山岭则断块上升为目前的昆仑山主脊,构成江源水系与柴达木盆地水系的分水岭。

在昆黄运动 1.2 Ma 前,因积石峡尚未贯通,中游贯通后的古黄河以湟水河为上游,祁连山为古黄河的发源地,大通河、庄浪河等为古黄河的主要支流,刘家峡水系是古黄河的一支流,但随着高原隆升的不断加强,这一支流发展较快,其源头迅速向高原溯源加长。昆仑—黄河运动开始了黄河上游溯源加长的历史。积石峡以西循化盆地黄河最高阶地 T5 形成于 0.8 Ma 左右,表明 1.2 Ma 的高原隆升导致黄河干流(刘家峡水系)向上游切穿积石峡进入循化盆地。而 0.6 Ma 的高原抬升,使黄河切穿李家峡(李长安等,1998;潘保田等,1996;刘志杰等,2007)。

在昆黄运动约 0.8 ~ 0.6 Ma 期间,高原面抬升到 3000 ~ 3500 m,喜马拉雅

山、西昆仑山等周边高山可达 5000 m 左右, 青藏地区第三阶梯状地貌形成。这次高原抬升造成的降温与称为中更新世剧变的全球性轨道转型导致的降温相耦合, 高原主体全面进入冰冻圈, 青藏高原出现大规模山地冰川, 期间黄河中阶地形成, 如兰州的 T5、T4 以及循化黄河的最高阶地 T5 等。

约 150 ka 左右, 青海共和盆地共和组湖相层褶皱变形, 黄河切穿龙羊峡, 湖水疏干。青海湖水系因日月山上升转为内陆湖, 若尔盖盆地沉积速率剧增。15 万年以来, 龙羊峡地区上升同时被黄河下切, 深达 800~1000 m。此后, 黄河进入兴海盆地, 末次冰期间冰段 (45~25 ka), 兴海—多石峡段黄河连通, 晚更新世末到全新世初期 (11~10 ka), 黄河切开多石峡进入源区, 从此形成现代黄

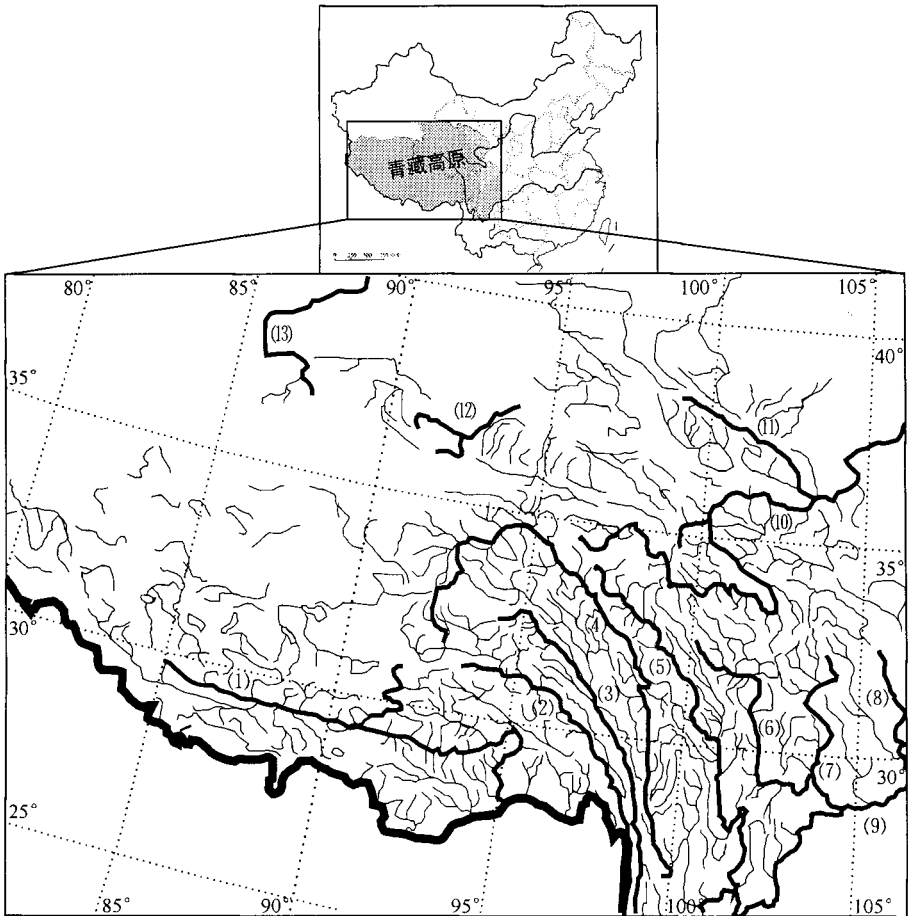


图 1-1 青藏高原主要水系分布图

(1) - (13) 分别代表雅鲁藏布江、怒江、澜沧江、金沙江、雅砻江、大渡河、岷江、嘉陵江、长江、黄河、湟水河、柴达木水系和塔里木水系

河格局。

综上所述,青藏高原水系格局的演化发育,与复杂而又频繁的地质作用下高原隆起、地貌演变,特别是中更新世以来自青藏运动开始的地质学事件密切相关。与此相应,该地区的水系格局从古特提斯海流域密集的河网系统发育形成青藏高原河湖系统,也发生了根本性的变化。现今高原水系不仅包括起源与此的众多外流江河干支流,而且蕴含有许多内流河和众多湖泊(图 1-1)。

第二节 青藏高原的气候环境特征

青藏高原是全球最高大、地形最复杂的高原。平均海拔高度在 4500 m 以上,总面积为 250 万平方公里。高寒、低氧、强紫外线辐射是其最显著的环境特征。独特的气候环境决定了与这种环境相适应的生物类型以及生活方式。而且青藏高原对世界环境的影响也是巨大的,对亚洲、甚至对北半球、南半球的大气环境演变都有极其重要的作用,同时对全球气候变化的响应也是非常敏感的。

大气环流是与地理位置、海陆分布与地貌等有关因素综合作用产生的一种大尺度大气运行的基本状况。青藏高原约占对流层的 $1/3 \sim 1/2$ 的高度,它以强大的热力和地形动力作用,使北起中亚与西伯利亚,南至南亚次大陆与东南亚;东至东亚大陆与阿留申群岛以致日本这样一个广阔范围内的天气和气候都受到影响而发生巨大的变形、改变或生成(张新时, 1978)。受高海拔条件的制约,青藏高原广大区域气温较低,大部分地区最热月气温小于 10°C ,因而只有冬夏两个半年之分。冬半年(10 月中旬至翌年 5 月)地面基本以西伯利亚-蒙古冷高压为气压系统,因而青藏高原冬半年的气候极其严寒、干燥少雨、多大风。夏半年(6~10 月)欧亚大陆强烈增温,形成了深厚广阔的印度低压,使印度洋暖气流从孟加拉湾源源不断地输送至青藏高原,形成明显的夏季风。据徐淑英(1962)的研究,其影响北界一般可达 35°N 左右,表现出青藏高原在夏半年东南部地区被海洋气团所笼罩,而西部及北部地区仍受变性的极地大陆性气团的影响,致使区域雨季短暂,气旋活动频繁。由于高原沟谷纵横,西部植被类型分布各不一致,下垫面性质具有很大的差异性,因而在青藏高原易触发产生由于地区热力差异和动力抬升作用下的对流天气过程,阵性雨、地形雨明显多于平原。气候的变化和地区的分异是与以上的大气环流形势密切联系的,加之青藏高原巨大的山系多呈西北-东南走向,因而气候干湿季、冷暖季变化分明,雨暖同季,春秋季过渡短暂,干冷季长,温湿季短,以及自东南向西北方向气候愈趋干旱寒冷。

气温的日较差和年较差大,也是本地区气候的重要特征之一。白天接收大量的太阳辐射能,使近地面的气温迅速上升,而夜晚,由于冷却强烈,地面散热快,气温剧烈下降,造成每日温差很大。就全区情况来看,日较差小于年较差,

日较差以冬季 1 月份最大, 约 $13\sim 23^{\circ}\text{C}$, 夏季 7 月份最小, 约 $9\sim 16^{\circ}\text{C}$, 柴达木盆地最大, 东部和东南部河谷地区次之, 而青南高原较小。年较差以柴达木盆地较大, 约在 $26\sim 31^{\circ}\text{C}$ 之间。其余地区在 $19\sim 26^{\circ}\text{C}$ 之间。

青藏高原海拔高, 空气稀薄, 空气密度仅约为东南沿海的 $2/3$, 加之水汽和气溶胶含量少, 空气透明度高, 致使到达地面的太阳直接辐射能量大, 明显大于散射辐射, 在总辐射中, 直接辐射占有很大的比例, 约占年总辐射量的 $55\%\sim 78\%$, 表现为光照充足、辐射强烈。高原上日照时间长, 大部分地区日照时间在 $2500\sim 3600\text{ h}$ 之间, 日照时间的月际分布较为复杂, 主要与当地气候湿润状况、夏季云雨分布及雨季来临迟早等天气状况有关。

青藏高原的降水受青藏高原高压、西风急流、东南季风和西南季风等大气环流系统所控制以及地形的影响, 降水量在我国是比较少的地区, 就整个青藏高原年均降水量来看, 不同地区差异很大, 总的趋势是自雅鲁藏布江河谷的多雨地区向西北逐渐减少。如柴达木盆地西北部的冷湖年平均降水量只有 18 mm , 比塔克拉玛干大沙漠还少; 但在青藏高原南部雅鲁藏布江下游, 却是我国的第二个多雨中心, 如巴昔年卡降水量多达 4500 mm 。年降水量主要集中在夏半年, 雨季和干季分明, 降水多分布在 $6\sim 9$ 月, 约占全年降水的 $80\%\sim 85\%$, 而冷季仅占年降水量的 $15\%\sim 20\%$ 左右, 特别是寒冷季节, 降水量只占全年降水量的 5% 左右。

综上所述, 青藏高原气候环境特征是比较复杂的, 这种复杂而独特的环境特征必将对该区域的各种生物产生深刻的影响。在长期的适应进化过程中, 土著动物形成了各自独特的适应机制来应对这种极端的高原环境, 以满足生存需要。

第三节 青藏高原土著动物概述

青藏高原的生物是全球独一无二的珍稀资源, 这里的动植物资源不仅稀有、脆弱, 而且许多都是地方特有种。其动物资源在中国乃至全世界都具有非常独特的地方和区域特征。正是由于青藏高原独特的环境因子及其动态过程, 使得高原生物的发生、发展及其适应机制形成了特有的规律, 从而为人类揭示青藏高原的历史以及极端环境下生物进化适应的奥秘提供了天然的实验地。下面我们就青藏高原的代表性土著动物——牦牛、裂腹鱼类、鼠兔和高原麝鼠作简要概述。

1 牦牛

牦牛 (*Bos grunniens*) 是唯一能在高海拔地区繁衍而延续至今的稀有牛种, 隶属于偶蹄目 (Artiodactyla) 牛科 (Bovidae) 牛亚科 (Bovinae), 分布于西起帕米尔, 东至岷山, 南至喜马拉雅山南坡, 北抵阿尔泰山麓, 海拔 3000 m 以上

的高原、高山、亚高山寒冷半湿润气候区域,因能充分利用高寒草地牧草资源且对高寒生态条件有着极强的适应性而有“高原之舟”之称。牦牛包括野牦牛和家牦牛两种类型。野牦牛是家牦牛的近祖,在分类学上两者是同属同种的不同亚种,一般认为野牦牛是处于优势型的“原生亚种”,而家牦牛是处于退化型的“驯化亚种”。

1.1 家牦牛

我国是世界上家牦牛数量、品种最多的国家,有家牦牛 1400 多万头,约占世界家牦牛总数的 95% 以上(中国畜禽遗传资源状况编委会, 2004),其中大多数集中在西藏、青海、四川与甘肃四个地区,其余少部分分布于新疆、云南、内蒙古等地区。国外分布情况为:蒙古人民共和国 60 万头,牦牛总数居世界第二位;原苏联中亚各国 14 万头;尼泊尔 6 万头;印度 4 万头;不丹 2 万头。

家牦牛主要分布于海拔 3000 m 以上的地区,其草地类型为高寒草甸(包括高山、亚高山草甸)、高寒沼泽及半沼泽。牧区内年平均气温为 $-3 \sim 3^{\circ}\text{C}$;昼夜温差大于 15°C ;年平均降水量仅有 350~500 mm;年平均相对湿度为 50%~60%;枯草期长,一年中通常只有 4 个月适合牧草生长。呈现海拔高、气温低、牧草生长期短等特点。家牦牛可产奶产肉,可骑可驮,可耕可驾,是唯一产毛绒的牛种,其粪便也是牧区不可缺少的燃料。中国是牦牛的主产国,年生产牦牛肉大约 22.56 万吨,毛 1.3 万吨(其中牦牛绒 0.63 万吨),乳 71.5 万吨,皮 17 万张。牦牛肉质鲜美,具有蛋白质含量高、脂肪含量少及氨基酸种类多等特点。

陆仲磷(1990)对我国 25 个地区牦牛资源材料所提供的体尺、生产性能、毛色、角的有无,特别是体尺指数等进行综合分析后,按产地大范围的生态条件将牦牛分为三大类型:西南高山峡谷区类型、青藏高原区类型、祁连山区类型。蔡立等(1992)根据牦牛的形态和毛色特征、生产性能,并结合产区的地形地貌、草地类型等,把我国牦牛分为横断高山型和青藏高原两大生态类型。现阶段,我国公认的牦牛品种(类群)有 11 个,包括:青海高原型牦牛、环湖型牦牛;甘肃天祝白牦牛、甘南牦牛;西藏嘉黎牦牛、帕里牦牛、斯布牦牛;四川九龙牦牛、麦洼牦牛;新疆巴州牦牛;云南中甸牦牛。其中青海高原型牦牛,四川麦洼牦牛、九龙牦牛,甘肃天祝白牦牛和西藏嘉黎牦牛被列入《中国牛品种志》中。

1.2 野牦牛

野牦牛是被载入濒危物种国际贸易公约(Convention on International Trade in Endangered Species, CITES)附录 I (CITES, 2003)及国际自然及自然资源保护联盟(International Union for Conservation of Nature and Natural Resource, IUCN)的物种,也是我国一级保护野生动物。野牦牛现存数量约

15 000头, 其中 7000~7500 头生活在羌塘野生动物保护区 (Schaller, 1998)。

野牦牛体形笨重、粗壮, 成体雄牛肩高可达 1370 mm, 肩部中央有显著凸起的隆肉, 故站立时显得前高后低。体躯较长, 前躯极发达 (具 14 对肋骨, 而黄牛只有 13 对肋骨)。四肢粗短, 蹄大而宽圆。头形稍狭长, 脸面平直, 鼻唇面小, 耳相对亦小, 颈下无垂肉。乳头两对。头脸、上体和四肢下部的被毛短而致密。体侧下部、肩部、胸腹部及腿部均披长毛, 其长可达 400 mm 以上。尾段长毛形成簇状。通体呈现褐黑色, 仅吻周、嘴唇脸面以及脊背一带呈显为灰白色。老年雄体的脊背往往呈微红色。尾色纯黑。雌、雄均具角, 两性角形相似, 但雄性角要比雌性的显著大而粗。头骨略显狭长。鼻骨宽, 泪骨窄, 其前端沿着额骨的外侧前伸, 并与鼻骨外缘相接。上颌骨的背缘和鼻骨及泪骨相联, 其二侧外缘呈平行, 且其前端宽平, 微分离, 显得粗大。上颌无门齿与犬齿, 白齿高冠型。下颌犬齿的形态与鹿科动物相仿, 呈门齿型, 紧靠第三门齿。下白齿窄而具高冠齿, 第一、二枚为 2 齿突组成, 最后一枚下白齿之后方多一枚较小的后叶, 而成了齿突。

野牦牛是一种典型的高寒动物, 性极耐寒。终年以游荡的方式栖息于人迹罕至的高山大岭、山间盆地、高原草原、高寒荒漠草原等各种环境中, 其分布高度在海拔 4000~5000 m 之间。在气温较高的季节内, 常活动于雪线的下缘。除个别雄性有时常单独生活外, 一般总是雌雄老幼活动在一起, 少则数头, 多的可达百头以上。雄牛 3 岁性成熟, 成体体重可达 1200 kg。入秋以后野牦牛陆续进入交配阶段。雄牛之间争雌现象非常激烈, 性情凶猛好斗, 胜者继续率领配偶一起活动, 败者往往离群或者尾随群体单独活动。孤牛性情更为凶狠, 常会主动攻击在它面前经过的各种对象。年老的野牦牛一旦离群后, 往往独自生活终身。雌牛于每年 6~7 月产仔, 怀孕期约为 240~250 天, 每胎 1 仔。幼仔出生后半个月即可随群体活动, 第二年夏季断奶。野牦牛在高原草原上, 或在荒凉的寒漠地区, 每天大部分时间均在进行摄食, 边食边漫游, 无十分固定的栖居地。在气温高的时候, 野牦牛有到湖泊、溪流淋浴的习惯。在严寒的冬季, 由于植被被冰雪覆盖, 因而经常在较大范围内做短距离的迁移。禾本科和莎草科植物是野牦牛食物的主要组成部分。

野牦牛为青藏高原特有种。历史上, 野牦牛广泛分布于青藏高原及其东部边缘地区。由于人为干扰和过度猎捕, 在过去的一个世纪中, 野牦牛的分布范围和数量都大为减少。现存野牦牛生活在包括青海省、西藏自治区、新疆自治区南部边缘及甘肃省西部边缘海拔高于 4000 m 的高山地区, 而主要分布地为西藏羌塘保护区、青海可可西里保护区及新疆阿尔金山保护区。

野牦牛是珍贵的动物资源, 我国野生动物保护条例已把它划为一类保护动物。野牦牛具有与家牦牛相同的使用价值。而且, 野牦牛和家牦牛的杂交后代具

有很强的杂种优势,因此可以充分利用野牦牛资源,对家牦牛进行提纯复壮,以提高其生产性能,并进一步培育出能适应高寒生态环境、生产性能较高、遗传稳定的新品种。

2 裂腹鱼亚科鱼类

裂腹鱼亚科 (Schizothoracinae) 隶属于鲤形目 (Cypriniformes), 鲤科 (Cyprinidae)。包括 15 属, 全球约有 100 多种 (Mirza, 1991)。根据 2000 年陈毅峰和曹文宣在《中国动物志, 硬骨鱼纲, 鲤形目, 下卷》裂腹鱼亚科部分中的描述, 在中国, 裂腹鱼亚科鱼类共有 11 属, 计 76 个种和亚种, 占全球裂腹鱼亚科鱼类的 80% 以上 (武云飞和吴翠珍, 1991)。其中, 以裂腹鱼属 (*Schizothorax*) 的种类最多, 占半数以上, 而扁吻鱼属 (*Aspiorhynchus*)、重唇鱼属 (*Diptychus*)、黄河鱼属 (*Chuanchia*)、扁咽齿鱼属 (*Platypharodon*)、尖裸鲤属 (*Oxygymnocypris*) 和高原鱼属 (*Herzensteinia*) 6 个属, 每属仅有 1 个种, 是青藏高原鱼类区系的主体之一, 也是青藏高原水生生物中最具代表性的类群之一。

裂腹鱼亚科一般是中型或小型鱼类。体长, 体形呈略侧扁或近似圆筒状, 腹部圆。口下位、亚下位或端位, 口裂呈横裂、马蹄形或弧形。须两对或完全退化。体鳞大小及排列不规则, 呈退化状; 或全身被有细鳞, 或胸腹部裸露而其他部位被覆细鳞, 或全身裸露而仅有臀鳞及肩带部有少数不规则的大型鳞片, 甚至肩带部分鳞片消失或仅残留痕迹。侧线平直或在体前部略下弯。下咽骨狭窄, 呈弧形或宽阔略呈三角形; 下咽齿通常为 3 行或 2 行, 个别为 4 行或 1 行。齿的顶端尖而钩曲呈匙状或平截呈铲状。腹膜通常为黑色。

裂腹鱼亚科鱼类分布广泛, 整个亚科的分布范围大体在西北以天山山脉、东北以祁连山脉、东以横断山脉、南以喜马拉雅山脉、西南以兴都库什山脉为界的亚洲高原地区。在我国的主要水系如雅鲁藏布江、伊洛瓦底江、怒江、澜沧江、元江、珠江、长江、黄河、印度河、恒河, 以及新疆、西藏、青海和甘肃等地的内陆水体和湖泊中均有分布。

裂腹鱼亚科鱼类极适应于青藏高原水域的生物条件和非生物条件。与青藏高原环境相适应, 裂腹鱼亚科鱼类具有生长期短, 生长速度缓慢, 性成熟年龄迟等典型的生物学特性。裂腹鱼亚科鱼类的生长极其缓慢, 体型较大的种类, 体重达 500g 时至少有 6~9 龄。因种类和生长发育时期不同, 个体雌雄差异有所不同。根据武云飞和吴翠珍 (1991) 对黄河水系和长江水系裂腹鱼亚科鱼类的研究表明, 在裂腹鱼亚科鱼类中, 裂腹鱼属和扁吻鱼属雌雄差异不明显, 而叶须鱼属、裸重鱼属、裸鲤属、裸裂尻鱼属、黄河鱼属和扁咽齿鱼属雌雄差异较为明显, 特别是在繁殖期, 雄鱼臀鳍最后分枝鳍条明显变硬成为两根刺状鳍条, 其末端常呈

钩曲状，而雌鱼则无此性状。裂腹鱼亚科鱼类性成熟的体长、体重因性别而有所不同，且达到性成熟的时间也因个体而有所差别。一般而言，雄鱼比雌鱼成熟较早，在体长 12 cm 左右即 3 龄时成熟，而雌鱼则要在 15 cm 左右，即 4 龄时才达到成熟。资料表明，裂腹鱼亚科鱼类的繁殖是在河流、湖泊化冰之后即将开始。在青海省海拔 3000 m 以上的地区，产卵旺季集中于 5、6 月份，低于 3000 m 的地区，大约集中在 4、5 月份，而高于 4000 m 以上的地区其产卵旺季则集中于 6、7 月份。裂腹鱼亚科鱼类的怀卵量也因个体而有所差异，一般来讲，怀卵量随年龄的增长、体长和体重的增加而相应增多，但相对怀卵量的变动不太明显。产卵场位于流水砾石底质的河滩处。鱼卵呈黄色，卵径一般为 1.2~3.0 mm，有毒性。

该亚科鱼类主要以高原河、湖浮游动植物、底栖动物和底栖藻类为食。研究表明，齐口裂腹鱼、硬刺裂腹鱼、长丝裂腹鱼、光唇裂腹鱼、前腹裸裂尻鱼、黄河裸裂尻鱼、极边扁咽齿鱼等主食底栖藻类；澜沧裂腹鱼、裸腹叶须鱼、厚唇裸重唇鱼和骨唇黄河鱼主食底栖无脊椎动物和落入水中的各种陆生昆虫；而花斑裸鲤、扁吻鱼、青海湖裸鲤和斜口裸鲤以浮游动物为主兼食藻类。裂腹鱼亚科鱼类消化器官的结构与它们的摄食习性是相适应的。以底栖藻类为主的鱼类，通常具有下位的口，呈弧形或近似横裂，下颌有锐利的角质前缘，具有刮食砾石石面或着生藻类的功能；而以浮游动植物为主的鱼类不具这种性状。

由于青藏高原特殊的地理环境，分布在高原的裂腹鱼亚科鱼类在长期的进化演变过程中逐步形成了耐高寒、抗缺氧等优良特性，在青藏高原淡水生态系统的食物链中具有重要的地位，对维持高原水域生态系统的平衡发挥着不可替代的作用。同时，大多数物种是分布区当地的主要经济鱼类。但是，近年来，由于受栖息地的破坏、繁育环境的改变、水体的污染、引入外来物种和疾病等因素的影响，裂腹鱼亚科鱼类的资源量锐减，有些物种已接近濒临灭绝的地步。

3 高原鼠兔

高原鼠兔 (*Ochotona Curzoniae*) 是一种小型非冬眠的植食性哺乳动物，又称黑唇鼠兔，属兔形目鼠兔科，主要分布于青藏高原及其毗邻的尼泊尔、锡金等地。主要栖居于海拔 3100~5100 m 的高寒草甸、高寒草原地区，喜欢选择滩地、河岸、山麓缓坡等植被低矮的开阔生境，回避灌丛及植被郁闭度高的生境(樊乃昌, 2001; 苏建平, 2000)，是青藏高原的特有种和关键种，对维护青藏高原生物多样性及生态系统的平衡起到重要作用。其作为关键种的意义在于：它所挖掘的洞穴可以为许多小型鸟类和蜥蜴提供赖以生存的巢穴；对微生境造成干扰，引起植物多样性的增加；同时也是草原上大多数中小型肉食动物和几乎所有猛禽的主要捕食对象 (Smith et al., 1986; Smith, 1988; Smith & Wang, 1991; Smith & Foggin, 1999)。

高原鼠兔外被棕黄色绒毛,雌雄两性在大小上是单一形态,外部生殖器官具有微小的差异(Liang, 1981; Smith et al., 1986, 1988; Smith & Wang, 1991; Wang & Dai, 1990; Dobson et al., 2000)。主要取食禾本科、莎草科及豆科植物,平均每日采食鲜草 77.3 g, 约占其体重的一半(蒋志刚和夏武平, 1985)。

高原鼠兔巢居营家庭式生活,雌雄双方共同承担领域防卫责任,具有驱赶外来非家庭成员的行为(王学高和 Smith, 1988; Smith & Wang, 1991)。高原鼠兔的家庭结构因环境及种群密度的差异而有多种表现形式,其家庭成员一般是由可变数量、可变性比的成体和幼体组成,栖居于通常连续并且比较平坦的草地上,其一系列的洞穴通常是相互连通的。高原鼠兔同一家族的成员之间一般比较友好,但是对于其他家族的成员具有较强攻击性(梁杰荣, 1981; Smith, 1988; Smith & Wang, 1991; Dobson et al., 2000)。

高原鼠兔寿命一般比较短,平均生命为 119.9 天,最长寿命达 957 天(王学高和戴克华, 1989)。高原鼠兔冬季死亡率很高(王学高和 Smith, 1988),第二、三胎后代的死亡率可达 100%。施银柱等(1978)在青海省天峻县快尔玛地区对高原鼠兔的繁殖特性进行了研究,结果表明该地区的高原鼠兔一年繁殖 1~2 次,每窝胎仔数为 1~8 个,偶有 9 个,但部分胚胎在其发育的各阶段有被吸收和死亡的现象,当年出生的雌性不直接参与繁殖。王学高(1991)的研究认为高原鼠兔每胎产仔 1~9 只,平均胎仔数为 4.7 ± 1.3 只,种群性比接近 1/1,雄性稍稍多于雌性。殷宝法等(2003)研究了海北站地区高原鼠兔的繁殖情况,发现高原鼠兔每年繁殖 3~4 次,每窝胎仔数为 1~5 只,偶有 6 只。

高原鼠兔不冬眠,是昼行性动物。高原鼠兔的觅食行为在整个活动时期占据突出地位,用于觅食的时间占整个地面活动时间的 63%~78%(Smith et al., 1986)。魏万红等(1994)的研究发现高原鼠兔的天敌动物主要有香鼬(*Mustela altaica*)、艾虎(*Mustela eversmanni*)和一些鹰类等,因而高原鼠兔在觅食过程中伴随有频繁的警戒行为(Smith et al., 1986),同时使得觅食时间在整个地面活动时间段内占据很大的比例。在利用食物资源等方面,高原鼠兔排它性较弱,因而极易达到相当高的栖居密度(魏万红等, 2000; 樊乃昌, 2001)。通过比较高原鼠兔不同性别间攻击行为的差异发现雄性更具有攻击性,攻击性强的个体,在种群内的优势地位比较明显(魏万红等, 2000)。高原鼠兔的睾丸重与其血清中睾酮含量具有正相关性,睾酮能增加攻击行为的频次和强度(李子魏等, 1998),支持雄性在种群内占据优势地位的结论。

在长期的生物进化过程中,高原鼠兔形成了自己独特的生活方式和适应机制来应对青藏高原严酷的环境压力,产生了明显的对低温和低氧环境的耐受能力,已成为小哺乳动物对青藏高原高寒低氧环境生态适应研究的代表性物种。

4 高原鼯鼠

鼯鼠隶属于啮齿目 (Rodentia)、仓鼠科 (Cricetidae)、鼯鼠亚科 (Myospalacinae)。鼯鼠属 (*Myospalax*) 分为平颅亚属 (*Myospalax*) 和凸颅亚属 (*Eospalax*)，全世界共 9 种，原鼯鼠 (*Myospalax myospalax*)、草原鼯鼠 (*M. aspalax*)、东北鼯鼠 (*M. psilurus*)、罗氏鼯鼠 (*M. rothschildi*)、中华鼯鼠 (*M. fontanieri*)、秦岭鼯鼠 (*M. rufescens*)、甘肃鼯鼠 (*M. cansus*)、高原鼯鼠 (*M. baileyi*) 和斯氏鼯鼠 (*M. smithi*)。除原鼯鼠外，其余 8 种在我国均有分布。

鼯鼠类是适应地下生活的啮齿类，尾短，眼小，视力差，外耳退化，仅留下小的皮褶。主要分布于中国，国外见于蒙古和西伯利亚。栖息于林缘、草原和农田。终生营地下生活，偶尔也到地面活动。植食性，有储食习性。鼯鼠挖洞速度极快，洞穴系统复杂，分支多，平时地面没有明显出口，但附近有不规则的土堆。

在我国分布的鼯鼠绝大多数为凸颅亚属的种类。平颅亚属的种类分布于我国的东北地区，如草原鼯鼠和东北鼯鼠。其中草原鼯鼠分布于东北三省、河北省北部及内蒙古自治区，生活在松软的草原及荒漠地区的稀疏草原及农田。国外分布于蒙古东部、俄罗斯贝加尔湖地区。东北鼯鼠分布于我国东北的黑龙江、吉林两省，内蒙古东部，河北，山东，河南及安徽北部的农田、荒草坡、灌丛、草原。国外仅分布于俄罗斯与我国东北毗邻的地区。凸颅亚属的中华鼯鼠分布在河北、山西、内蒙古南部边缘、陕西北部黄土高原的农田、荒地、山坡及草原。甘肃鼯鼠分布于陕西北部延安地区、甘肃、宁夏南部及青海东部的黄土高原、森林、草原地带，为黄土高原特有物种。高原鼯鼠分布于甘肃祁连山地区，甘南高原、青海高原、四川北部及西部的农田、山坡及草甸草原，分布于海拔 2800~4200 m，为青藏高原特有物种之一。斯氏鼯鼠分布在宁夏六盘山、甘肃陇中、甘肃南部、岷山北部的海拔 2500~3300 m 的山地。秦岭鼯鼠则分布在陕西秦岭、宁夏六盘山海拔 1400 m 左右的阴湿山地、森林及森林草甸。罗氏鼯鼠分布于四川北部、陕南大巴山、米仓山、甘南、岷山地区。

鼯鼠的分布范围广，生活环境复杂多样，在平原地区农田、高原地带、荒漠草原、山区森林及草原草甸、草原都有分布。鼯鼠是严格营地下掘土生活的种类，视觉十分退化，视网膜比其他鼠类薄且视细胞较少。相应地，鼯鼠的嗅觉与听觉十分发达，其听泡较大，外耳退化，中耳及内耳发育良好，对空气传导的声波及土壤传导的震动波均十分敏感。此外，鼯鼠的触觉也很发达，在其头部，除上唇端有发达的触毛外，两眼与两耳间也分布发达的触毛，地面鼠类这些部位的触毛常为缺失。

鼯鼠营地下掘土生活，其摄食、休息、繁殖等均在洞道内完成。鼯鼠洞道较

为复杂,一般地面无明显的洞口,只有洞壁上方地表的龟裂纹和土丘。鼯鼠洞道的基本结构有主巢、储食洞、厕所、出巢洞、朝天洞(垂直洞)、交通洞、盲洞和取食洞组成(樊乃昌和谷守勤,1981;刘焕金和李承节,1984)。

鼯鼠一年四季活动,不冬眠。冬季地表封冻以后,鼯鼠主要在主巢内活动,依靠储存的食物越冬。鼯鼠为植食性,其食性与分布区的植被状况有密切的关系。鼯鼠食性较杂,可取食植物的根、皮、茎、叶、果实和种子等,其基本食物为分布区的杂草、农作物或林木的根。据统计,鼯鼠能取食的植物约38科,95种以上,其中木本植物约占40%。

鼯鼠的繁殖期因不同种分布地区的不同而有较大的差别。高原鼯鼠繁殖期为3~7月,交配期为3月下旬至7月下旬,高峰期在4月上、中旬,产子期间在5月,尤以5月中下旬为甚(张道川等,1993)。高原鼯鼠哺乳期约50天左右(张道川等,1993),哺乳时间在5~7月。中华鼯鼠的繁殖期是3~6月(李晓晨等,1991),3月份已有50%的雌鼠怀孕,甘肃鼯鼠的繁殖期在3~7月(李晓晨等,1991;江廷安等,1990),4~5月为繁殖盛期。林区甘肃鼯鼠的繁殖期是3~8月,繁殖盛期在4~6月(李金钢等,2003)。甘肃鼯鼠产仔期在4月中下旬,不同年份略有变化,1998年在陕西富县捕获的甘肃鼯鼠,4月2日即开始产仔,4月中旬及产仔完毕,所捕获的雌鼠均为哺乳鼠,较往年提前。这与当年春季气温偏高有关。分布在甘南杂海地区鼯鼠的繁殖期开始于4月底至5月初,繁殖盛期在5~6月或7月初,其繁殖期比甘肃东部迟1个月,比山东等地迟2~2.5个月(张孚允和杨若莉,1980)。

鼯鼠是偏雌性的种群,种群内雌性个体显著的多于雄性(王祖望,1975;张孚允和杨若莉,1980;江廷安等,1990;张道川等,1993;李金钢等,2003;王俊森等,1997)。东北鼯鼠种群性比(♀/♂)为1.32(王俊森等,1997),而王廷正等(1993)报道了中华鼯鼠性比为1.41。关于甘肃鼯鼠性比,各研究的报道略有不同,王廷正等(1991)报道农作区甘肃鼯鼠种群总性比为2.18;江廷安等(1990)报道总性比为1.76,幼体性比为2.39;李金钢等(2003)报道林区甘肃鼯鼠总性比为1.57,其中幼体性比为0.88、亚成体性比为1.38、成体性比为2.02、老年性比为1.72。张孚允等在甘南工作捕获鼯鼠总性比也为1.30,高原鼯鼠的总性比为1.43,新生鼠性比为1.61(张孚允等,1980;张道川等,1993)。鼯鼠每年繁殖一次,胎仔鼠1~6,每胎2~3仔占多数,而每胎1仔或每胎4~6仔的比例较小。说明鼯鼠的胎仔数少,繁殖力偏低。

新生代印度次大陆与欧亚大陆碰撞的重大地质事件，导致青藏高原隆升而成为“世界屋脊”，与其相应，区内水系格局和气候环境发生了重大变化。裂腹鱼亚科（Schizothoracinae）鱼类作为青藏高原鱼类区系的主体成分之一，在高原广泛分布，探讨其起源、分化、扩散、分布格局、种间关系和种群结构能在很大程度上反映出青藏高原隆升过程中所经历的水系变迁和古气候环境变化事件。本章以青藏高原裂腹鱼亚科鱼类三个分类阶元为对象，利用 Cyt *b* 序列通过分子钟估计、扩散-隔离分析、分子变异等级分析、嵌套进化支序分析等多种方法开展了系统发育、生物地理、种群遗传多样性、种群历史结构等方面的研究工作，探讨不同时间尺度上裂腹鱼亚科鱼类演化与高原隆升和水系变迁之间的关系。

第二章 青藏高原裂腹鱼亚科鱼类的系统 演化和生物地理学

青藏高原现今特有生物物种的起源、分化、扩散、分布格局、种间关系和种群结构是青藏高原隆升过程中的地质变迁、古气候变化和水系演化的直接产物。因此,研究高原特有物种的起源、分化、扩散、分布格局、系统发育关系能在很大程度上反映出青藏高原在抬升过程中所经历的主要地质变迁和古气候环境变化事件,同时也能探讨高原区内河流、湖泊水系的发育演化关系。在这种假设下,水生生物由于受栖息水域和迁移能力的限制而在生物地理学研究中愈来愈显示出其优越性,曾一度被生物学家视为研究生物类群演化与地质变迁、古气候变化和水系演化的理想素材。

裂腹鱼亚科(Schizothoracinae)鱼类作为青藏高原鱼类区系主体之一,在长期的进化演变过程中逐步形成了耐高寒、抗缺氧等优良特性。裂腹鱼亚科鱼类不仅在青藏高原淡水生态系统的食物链中具有重要的地位,而且对维持高原水域生态系统的平衡发挥着不可替代的作用,因此而受到国内外生物学家的关注。

本研究采用DNA测序技术,选择青藏高原裂腹鱼亚科鱼类几个分类阶元开展有关系统发育、生物地理、遗传多样性、种群结构等方面的研究工作。主要研究内容包括:①基于细胞色素*b*(Cyt *b*)序列数据构建裂腹鱼亚科鱼类属间系统发育关系,检验裂腹鱼亚科鱼类单系性及估计该亚科鱼类起源和主要物种分化时间,探讨裂腹鱼亚科鱼类演化与青藏高原隆升之间的关系,为进一步研究青藏高原隆升事件积累科学数据;②从裂腹鱼亚科鱼类中选择一个青藏高原广布属——裸裂尻鱼属(*Schizopygopsis*),通过构建该属鱼类种间系统发育关系和估计相关分子钟,探讨裸裂尻鱼属鱼类的演化过程与青藏高原隆升所致的高原水系变迁和生态环境变化之间的关系;③从裸裂尻鱼属中选择一个青藏高原广布种——黄河裸裂尻鱼(*Schizopygopsis pylzovi*),分析其种群遗传多样性和种群结构,结合历史地理学,探讨青藏高原古气候环境波动和主要水系演化对黄河裸裂尻鱼种群遗传多样性、种群地理结构等的影响;④通过分子系统学与形态学的比较研究,为青藏高原裂腹鱼亚科鱼类形态趋同进化提供有力证据。

第一节 裂腹鱼亚科鱼类分类、系统发育和生物地理学研究概述

青藏高原水系归属不同流域, 格局极为复杂, 但其鱼类区系基本组成却显示出统一性, 为此, 被国内外学者誉为“巨大的、无与伦比的淡水动物地理统一体”而受到关注。裂腹鱼亚科鱼类作为青藏高原鱼类区系的主体之一, 也是青藏高原水生生物中最具代表性的类群之一。自 1838 年 Heckel 在《克什米尔鱼类》中首次描述了 10 种裂腹鱼亚科鱼类以来, 裂腹鱼亚科鱼类研究一直受到国内外生物学家的关注。尤其是进入 20 世纪 80 年代以后, 有关裂腹鱼亚科鱼类分类、系统发育和生物地理学的研究取得了长足的进展。

1 裂腹鱼亚科鱼类的分类学研究简史和分类体系

裂腹鱼亚科鱼类的分类学研究历史记录可追溯到 19 世纪上半叶。1838 年 Heckel 在《克什米尔鱼类》中首次描述了 10 种鲤科鱼类, 并将这些具有高度特化共同特征的鲤科鱼类命名为裂腹鱼属 (*Schizothorax*) 鱼类。据 Heckel 的描述, 裂腹鱼属鱼类具有“体被细鳞、肛门处覆盖有扩大的臀鳞、触须 2 对和咽齿 3 排”的特征, 而所谓高度特化的共同特征就是这些鱼类在两列臀鳞之间的腹部中线上形成一条裂缝。接着, 研究者报道了鲤属 (*Cyprinus*) 的 *Cyprinus richardsoni* 和山神鱼属 (*Oreinus*) 的 *O. guttatus*、*O. progastus* 和 *O. maculatus* (McClelland, 1839)。随后, McClelland (1842) 以裂腹鱼属鱼类为依据, 建立了裂腹鱼亚科, 提出该亚科鱼类具有体被细鳞、臀鳍前有一裸露的间隙和其两侧排列有垂直延长鳞片的典型特征。此后, Bleeker (1860, 1862, 1963)、Steindachner (1866)、Günther (1868, 1873, 1876, 1888, 1889)、Day (1871) 等分别修正和整理了已发表的裂腹鱼亚科鱼类, 并提出许多新属新种, 如副裂腹鱼属 (*Paraschizothorax*)、裸裂尻鱼属 (*Schizopygopsis*)、重唇鱼属 (*Diptychus*)、叶须鱼属 (*Ptychobarbus*)、裸重唇鱼属 (*Gymnocypris*) 等新属名和高原裸裂尻鱼 (*Schizopygopsis stoliczkae* Steindachner)、软刺裸裂尻鱼 (*Diptychus maculatus* Steind)、软刺裸鲤 (*Ptychobarbus conirostris* Steind)、锥吻叶须鱼 (*Gymnocypris dobula* Günther)、塔里木裂腹鱼 (*Schizothorax biddulphi*)、宽头裂腹鱼 (*Schizothorax intermedius* McClelland)、*Schizothorax raulinsii* Günther 等新种, 其中也有我国新疆、青海、西藏、四川、云南等地的许多新属新种。

上述研究为青藏高原裂腹鱼亚科鱼类的分类开创了新局面, 随后, 著名鱼类学家 Kessler 分别于 1872、1874、1876 和 1879 年整理了我国新疆、青海、甘

肃、四川等地区的扁吻鱼属 (*Aspiorhynchus*) 及宽口裂腹鱼 (*Schizothorax eurystomus*)、银色裂腹鱼 (*Schizothorax argentatus*)、新疆裸重唇鱼 (*Gymno-diptychus dybowskii* Kessler)、青海湖裸鲤 (*Gymnocypris przewalskii* Kessler)、黄河裸裂尻鱼 (*Schizopygopsis pyzovi* Kessler) 等。Herzenstein (1888, 1889, 1891, 1892) 提出黄河鱼属 (*Chuanchia*) 和扁咽齿鱼属 (*Platypharodon*) 两个新属名, 同时将裸鲤 (*Gymnocypris*) 属的限定范围从背刺弱锯齿不发达扩大到有发达锯齿的青海湖裸鲤等多种。此外, Herzenstein (1892)、Nikolsky (1903)、Regan (1904, 1908)、Lloyd (1908)、Hora (1937)、Mukerji (1936)、Rendahl (1924, 1926, 1932)、Norman (1923)、Pellegrin (1931) 先后报道了分布于我国青藏高原的多种裂腹鱼亚科鱼类, 为青藏高原裂腹鱼亚科鱼类的分类做出了巨大贡献。

自 20 世纪 30 年代初期起, 国内鱼类学家的分类研究工作逐渐开展起来。朱元鼎 (1935) 通过对中国鲤科鱼类鳞片、咽骨和咽齿的比较研究, 全面整理了中国裂腹鱼亚科鱼类, 发表了《中国鱼类索引》, 记载了青藏高原裂腹鱼亚科鱼类 35 个种名。同时, 提出中国鲤科各亚科和属的代表种的鳞片、咽骨、牙齿的结构特征、变异性与其食性相关, 首次明确地指出山神鱼属 (*Oreinus* McClelland) 属名是裂腹鱼属 (*Schizothorax* Heckel) 的同物异名, 而且又根据当时的资料和单列咽齿的特点提出新的属名赫氏鱼属 (*Herzensteinia* Chu)。朱元鼎教授的《中国鱼类索引》可以说是中国裂腹鱼亚科鱼类总结性的著作, 为中国裂腹鱼亚科鱼类的研究奠定了基础。此后几年中, 我国鱼类学家相继发表了青藏高原裂腹鱼亚科鱼类若干新种以及整理了以前的研究工作。其中, 比较著名的有《中国西部的若干裂腹鱼类》(方炳文, 1936), 发表长须裂腹鱼 (*Schizothorax longibarbus*) 和 *Schizothorax chengi* Fang 两新种;《西康和四川的鱼类》(张春霖, 1944), 记述了 4 种裂腹鱼类;《四川西部及其邻近地区的裂腹鱼类》(曹文宣, 1962), 发表了 1 新种、2 新组合, 并澄清了 1 个属名和 8 个种的同物异名, 以及《中国淡水鱼类分布》(转引自武云飞和吴翠珍, 1991)、《兰州附近的黄河鱼类》(王香亭等, 1956)、《云南的鱼类研究》(成庆泰, 1958)、《中国系统鲤类志》(张春霖, 1959) 等著作涉及有关青藏高原某些地区的裂腹鱼亚科鱼类, 丰富和补充了我国裂腹鱼亚科鱼类的分类学研究工作。

1964 年, 我国著名鱼类学家曹文宣在《中国鲤科鱼类志》(曹文宣, 1964) 的裂腹鱼亚科部分中 (表 2-1), 对中国裂腹鱼亚科鱼类首次进行了较系统的整理, 合并了 20 个同物异名, 发表 1 新属副裂腹鱼属 (*Paraschizothorax*), 1 新亚属尖裸鲤亚属 (*Oxygymnocypris*)、7 新种吸口裂腹鱼 (*Schizothorax myzostomus*)、怒江裂腹鱼 (*Schizothorax nukiangensis*)、光唇裂腹鱼 (*Schizothorax lissolabiatatus*)、小裂腹鱼 (*Schizothorax parvus*)、澜沧裂腹鱼 (*Schizothorax*

lantsangensis)、贡山裂腹鱼 (*Schizothorax gongshanensis*)、中甸叶须鱼 (*Diptychus chungtienensis*) 和 2 新亚种南方裂腹鱼 (*Schizothorax molesworthi meridionalis*)、保山裂腹鱼 (*Schizothorax yunnanensis paoshanensis*)，曹文宣的研究工作大大丰富了裂腹鱼类种类，为进一步研究青藏高原裂腹鱼亚科鱼类奠定了坚实的基础。此外还有《西藏鱼类初篇》(张春霖和王文滨, 1962)、《西藏南部的裸鲤属鱼类》(张春霖等, 1964)、《西藏南部的裸裂尻鱼属鱼类》(张春霖等, 1964)、《中国鲤科鱼类——新属, 新种》(岳佐和等, 1964)、《青海省扎陵湖及大通河的几种鱼类》(张春霖和张玉琳, 1965)、《新疆北部鱼类的调查研究》(李思忠等, 1966)、《甘肃河西走廊鱼类新种及新亚种》(李思忠和张世义, 1974)、《青海湖地区鱼类区系》(朱松泉和武云飞, 1975)、《青海省果洛和玉树地区鱼类》(武云飞和朱松泉, 1979)、《西藏阿里鱼类分类、区系研究及资源概况》(武云飞和朱松泉, 1979)、《西藏纳木错的鱼类》(任慕莲和武云飞, 1982)、《贵州省几种裂腹鱼的分类讨论》(武云飞和吕克强, 1983)、《四川裂腹鱼属一新种的描述》(傅天佑和叶妙荣, 1984)、《云南裂腹鱼类三新种及二新亚种》(黄顺友, 1985)、《黄河源头及星宿海的鱼类》(武云飞和吴翠珍, 1988) 等文章陆续发表了青藏高原裂腹鱼亚科鱼类若干新属、新种和新亚种, 并通过深入研究修正了以往混乱的分类体系, 使得青藏高原裂腹鱼亚科鱼类的物种数量不断增加, 分类日趋完善。

1991 年, 武云飞和吴翠珍系统地整理了以往发表的相关资料, 并通过形态、骨骼及解剖特征的深入比较研究整理了《青藏高原鱼类》一书, 书中对青藏高原裂腹鱼亚科鱼类的分类体系做了相应的调整 (表 2-1)。在该分类体系中, 他们重新使用了弓鱼属 (*Racoma*) 的属名, 并将叶须鱼亚属、裸重唇鱼亚属和尖裸鲤亚属提升为属, 将赫氏鱼属 (*Herzensteinia*) 纳入到裸裂尻鱼属之中, 同时, 废弃了裂鲤属和副裂腹鱼属两个属名。统计数据表明, 截至 1991 年, 中国裂腹鱼亚科鱼类共有 70 个有效种和 9 个亚种, 隶属于 11 个有效属。《青藏高原鱼类》一书对青藏高原裂腹鱼亚科鱼类属、种的界定以及物种分布和栖息环境作了详细的描述, 因而也是青藏高原裂腹鱼亚科鱼类分类学研究中的一个里程碑。

2000 年, 陈毅峰和曹文宣在《中国动物志, 硬骨鱼纲, 鲤形目, 下卷》裂腹鱼亚科部分中 (表 2-1), 再次通过形态、骨骼等特征和生物学特性的分析修正了青藏高原裂腹鱼亚科鱼类属、种的分类体系, 将弓鱼属合并到裂腹鱼属中, 同时又重新使用了高原鱼属 (*Herzensteinia*) 这个属名。提出裂腹鱼亚科鱼类共有 12 属, 在我国有 11 属, 计 76 种和亚种。

虽然, 以上研究通过形态特征的比较分析为确定裂腹鱼类的分类学地位方面做出了巨大贡献。但是, 由于受模糊特征及分析性状数量等的限制, 在裂腹鱼亚科鱼类个别种属的界定方面仍存在较大的争议。

表 2-1 青藏高原裂腹鱼亚科鱼类以往分类体系

作者/年份	属	亚属	种
曹文宣, 1964	裂腹鱼属	裂腹鱼属	11
	<i>Schizothorax</i> , Heckel 1838	<i>Schizothorax</i> , Heckel 1838	
		裂尻鱼亚属	18
		<i>Schizopyge</i> , Heckel 1838	
	扁吻鱼属		1
	<i>Aspiorhynchus</i> , Kessler 1879		
	副裂腹鱼属		1
	<i>Paraschizothorax</i> , Lloyd 1914		
	重唇鱼属	重唇鱼亚属	1
	<i>Diptychus</i> , Steindachner 1866	<i>Diptychus</i> , Steindachner 1866	
		叶须鱼亚属	4
		<i>Ptychobarbus</i> , Steindachner 1866	
		裸重唇鱼亚属	2
		<i>Gymndiptychus</i> , Herzenstein 1892	
	裸鲤属	裸鲤亚属	5
	<i>Gymnocypris</i> , Günther 1868	<i>Gymnocypris</i> , Günther 1868	
		尖裸鲤亚属	1
		<i>Oxygymnocypris</i> , Lloyd 1908	
	裸裂尻鱼属		7
	<i>Schizopygopsis</i> , Steindachner 1866		
	黄河鱼属		1
	<i>Chuanchia</i> , Herzenstein 1891		
	扁咽齿鱼属		1
	<i>Platypharodon</i> , Herzenstein 1891		
	赫氏鱼属		1
	<i>Herzensteinia</i> , Chu 1935		
合计	9		54
武云飞和吴翠珍, 1991	弓鱼属	弓鱼亚属	18
	<i>Racoma</i> , McClelland 1842	<i>Racoma</i> , McClelland 1842	
		裂尻鱼亚属	12
		<i>Schizopyge</i> , Heckel 1838	
	裂腹鱼属		9
	<i>Schizothorax</i> , Heckel 1838		
	扁吻鱼属		1
	<i>Aspiorhynchus</i> , Kessler 1879		
	叶须鱼属		4
	<i>Ptychobarbus</i> , Steindachner 1866		
	重唇鱼属		1
	<i>Diptychus</i> , Steindachner 1866		

续表

作者/年份	属	亚属	种
	裸重唇鱼属		3
	<i>Gymndiptychus</i> , Herzenstein 1892		
	裸鲤属		10
	<i>Gymnocypris</i> , Günther 1868		
	尖裸鲤属		1
	<i>Oxygymnocypris</i> , Tsao 1964		
	裸裂尻鱼属		9
	<i>Schizopygopsis</i> , Steindachner 1866		
	黄河鱼属		1
	<i>Chuanchia</i> , Herzenstein 1891		
	扁咽齿鱼属		1
	<i>Platypharodon</i> , Herzenstein 1891		
合计	11		70
陈毅峰和曹文宣, 2000	裂腹鱼属	裂腹鱼亚属	19
	<i>Schizothorax</i> , Heckel 1838	<i>Schizothorax</i> , Heckel 1838	
		裂尻鱼亚属	20
		<i>Racoma</i> , McClelland 1842	
	扁吻鱼属		1
	<i>Aspiorhynchus</i> , Kessler 1879		
	重唇鱼属		1
	<i>Diptychus</i> , Steindachner 1866		
	叶须鱼属		5
	<i>Ptychobarbus</i> , Steindachner 1866		3
	裸重唇鱼属		
	<i>Gymndiptychus</i> , Herzenstein 1892		
	裸鲤属		11
	<i>Gymnocypris</i> , Günther 1868		
	尖裸鲤属		1
	<i>Oxygymnocypris</i> , Tsao 1964		
	裸裂尻鱼属		12
	<i>Schizopygopsis</i> , Steindachner 1866		
	黄河鱼属		1
	<i>Chuanchia</i> , Herzenstein 1891		
	扁咽齿鱼属		1
	<i>Platypharodon</i> , Herzenstein 1891		
	高原鱼属		1
	<i>Herzensteinia</i> , Chu 1935		
合计	11		76

2 青藏高原裂腹鱼亚科鱼类的系统发育及生物地理学研究现状

2.1 基于形态学的研究在探讨腹鱼亚科鱼类的系统发育关系和生物地理学方面取得了巨大成就

曹文宣等(1981)系统地论证了裂腹鱼亚科鱼类中体鳞和触须趋于退化,下咽齿行数趋于减少等是与青藏高原的自然条件改变相关的性状变化,是整个亚科的演化方向。并以此将裂腹鱼亚科鱼类划分成适应于高原环境的三个特化等级:包含裂腹鱼属(*Schizothorax*)、裂鲤属(*Schizocypris*)和扁吻鱼属(*Aspiorhynchus*)的原始等级,包括重唇鱼属(*Diptychus*)、叶须鱼属(*Ptychobarbus*)和裸重唇鱼属(*Gymndiptychus*)的特化等级,以及包括裸鲤属(*Gymnocypris*)、尖裸鲤属(*Oxygymnocypris*)、裸裂尻鱼属(*Schizopygopsis*)、黄河鱼属(*Chuanchia*)、扁咽齿鱼属(*Platypharodon*)和高原鱼属(*Herzensteinia*)在内的高度特化等级。他们根据裂腹鱼类三大类群现代分布的不同海拔高度、古生物证据等,探讨了裂腹鱼各演化阶段与青藏高原隆起的相互关系,得出青藏高原可能经历了三次急剧上升和相对稳定的交替阶段,而每次高原隆起后达到的高度与裂腹鱼三个类群目前分布的海拔高度大体一致的结论,即每一等级分别代表了青藏高原在隆起过程中的一个特定的历史阶段。该结论为腹鱼亚科鱼类系统发育关系和生物地理学的研究奠定了基础,激发了其他研究者的极大兴趣。

长期以来,鱼类学家认为裂腹鱼亚科鱼类起源于某些鲃亚科鱼类(Hora, 1937; 曹文宣等, 1980)。武云飞(1984)通过对裂腹鱼类、鲃类和化石鱼类大头近裂腹鱼(*Plesioschizothorax macrocephalus*)的外部形态、主要骨骼结构的详细比较之后,认为裂腹鱼类与鲃亚科鱼类有着极近的亲缘关系。因此,武云飞以分布于雅鲁藏布江的墨脱四须鲃(*Barbodes hexagonolepis*)作为裂腹鱼类的近似祖先型,通过25项外形和主要骨骼特征构建了裂腹鱼亚科鱼类属间系统发育关系,将该亚科鱼类划分为三个类群。类群Ⅰ包括弓鱼属、裂腹鱼属和扁吻鱼属三属,具有尾神经骨、3或4排下咽齿、性别差异不明显等共同祖征和舌颌管细小的共同离征。其中扁吻鱼属具有须一对,口亚上位,副蝶骨弯曲向下等症状,成为自在离征而成为弓鱼属和裂腹鱼属两属的姐妹群。在裂腹鱼属和弓鱼属两属中,前者具有完整唇,齿骨方形,下颌角质圆弧形等征状而区别于弓鱼属,而弓鱼属在许多征状方面近似于祖先型,说明它是本亚科的原始属;类群Ⅱ包括叶须鱼属、重唇鱼属和裸重唇鱼属三属,对应于类群Ⅰ的共同离征是无尾神经骨、性成熟时雌雄差异明显以及咽齿2或1排等征状。在类群Ⅱ和Ⅲ这一对姐妹群中,类群Ⅱ以须一对、较细狭呈圆弧形的第三神经棘以及长而狭的舌颌管等不同征状而区别于类群Ⅲ。在类群Ⅱ中,重唇鱼属被认为是较早分化的一支,组成

叶须鱼属和裸重唇鱼属二属的一个姐妹群。叶须鱼属和裸重唇鱼属关系密切，组成一对姐妹群，因为两者在上颌骨和第二前筛骨等方面具有许多共同特征；类群Ⅲ包括其余几属，认为具有更高的分化和最大的离典型征状，显示它在裂腹鱼亚科鱼类的演化过程中更进一步的特化。其须完全退化、舌颌管更加发达等征状为共同特征，区别于类群Ⅱ。武云飞（1984）认为，随着环境的改变和对新环境的适应，类群Ⅲ在演化过程中先分为两支，一支的代表接近裸鲤属，另一支的代表接近裸裂尻鱼属。在其后的演化过程中，各自在新而独特的环境条件下发展形成一对代表高级特化的姐妹群，其中原始的裸鲤分化出尖裸鲤属，而自身演化为现代裸鲤属，构成包括裸鲤和尖裸鲤的一支。原始的裸裂尻鱼属则首先分化出扁咽齿鱼属，而后分化出黄河鱼属，构成包括裸裂尻鱼属、黄河鱼属和扁咽齿鱼属在内的现代类群。之后，武云飞和吴翠珍（1991）通过主要形态和骨骼特征的分析，探讨了裂腹鱼亚科鱼类各属种间系统发育关系，提出裸裂尻鱼属的演化首先分化为下颌前缘角质宽狭不同的两支，其中下颌角质狭细的一支仅有嘉陵裸裂尻鱼（*Schizopygosis kialingensis*）一种，该种被认为保留有更多的祖先特征而位于系统发育树的基底部；而下颌角质宽平的一支包括其他 8 个种，随后的演化过程中，又分化出以高原裸裂尻和小头裸裂尻为代表的咽骨和咽齿特化的一支以及以大渡裸裂尻和黄河裸裂尻为代表的咽骨和咽齿未特化的一支，其中小头裸裂尻鱼（*S. microcephalus*）因某些特征表现出特化现象而置于系统发育树的最顶端分支中。结合裸裂尻鱼属鱼类分布水域的海拔高度，他们认为该属鱼类特化程度与海拔高度向顺应，反映了青藏高原的不断隆起对青藏高原鱼类的演化发展有着极其重要的影响。

武云飞（1984）的研究是裂腹鱼亚科鱼类研究史上最为系统的、最为全面的、最为客观的一次创举。他的结论进一步证实，裂腹鱼亚科鱼类的起源、演化、扩散等的确与青藏高原的不断隆升事件具有密切关系，同时，他的研究极大地推进了该亚科鱼类的系统发育研究和生物地理学领域的研究进程。

2.2 基于分子数据的研究不断为腹鱼亚科鱼类系统发育和生物地理学的研究积累相关数据

黄顺友和陈宜瑜（1986）对中甸重唇鱼和裸腹重唇鱼的系统发育关系及其动物地理学进行了研究，标志着腹鱼亚科鱼类分子系统发育学和生物地理学研究的开始。他们在研究中指出重唇鱼属的出现可能是在晚第三纪上新世末高原处于相对平静，形成湖盆或湖泊，到高原继续上升，河流深切时的第四纪，即更新世。随后，陈自明和陈毅峰（2000）对 7 种 22 个裂腹鱼个体进行随机扩增多态性 DNA（RAPD）研究。通过构建分子系统树，将特化等级裂腹鱼类划分为 3 个属级分类单元。Chen 和 Chen（2001）通过 41 个外部和骨骼特征对特化级裂腹鱼

进行了种间系统发育研究,结果与上述采用形态学特征进行系统分析所得出的结论一致。

随着 PCR 技术的发展,特别是各种试剂盒和全自动序列分析技术在分子系统学领域的推广, DNA 序列分析在动物种群系统发育研究中逐步发挥出其巨大的潜力。近年来,应用 DNA 测序技术探讨裂腹鱼亚科鱼类的文献不断涌现出来,特别是以中国科学院水生生物研究所陈毅峰和何德奎为主的研究小组在这方面取得了较大的成功。何德奎等(2003)采用线粒体细胞色素 *b* (Cyt *b*) 基因序列系统地分析了特化级裂腹鱼 3 属 9 种和亚种的系统发育关系。该研究结果表明,特化级裂腹鱼类并不是一个单系群,叶须鱼属 (*Ptychobarbus*) 的 5 个种和亚种构成了一个单系群,而裸重唇鱼属 (*Gymndiptychus*) 的 3 个种并不形成单系群,其中, *Gymndiptychus integrigymnatus* 与高度特化级的裂腹鱼类构成姐妹群的关系;而 *Gymndiptychus pachycheilus* 与 *Gymndiptychus dybowskii* 具有较近的亲缘关系,它们一起与 *Diptychus maculatus* 形成姐妹群。通过黄河上游与青海湖隔离的地质时间,推算出特化级裂腹鱼可能起源于中新世约 10 Ma 左右,三个属的分歧时间发生在晚中新世 (8 Ma),而主要的物种分化时间发生在晚上新世和更新世 (3.54~0.42 Ma)。研究认为,特化级裂腹鱼的主要分支发生事件与晚新生代青藏高原在 8、3.6、2.5 和 1.7 Ma 发生的地质构造事件及气候重大转型时期基本吻合。

赵凯等(2005)对来自青海湖、黄河和柴达木水系特有的青海湖裸鲤、花斑裸鲤和斜口裸鲤 149 个个体的 Cyt *b* 基因全序列进行了测定和分析,表明以上 3 个物种并未形成 3 个独立的单系群,而是分为 3 个谱系:谱系 A 包括青海湖裸鲤、斜口裸鲤和黄河花斑裸鲤的一部分;谱系 B 由黄河花斑裸鲤的另一部分组成;谱系 C 则由来自柴达木盆地格尔木河的花斑裸鲤形成单系群。进一步研究发现,该地区裸鲤属鱼类存在 3 个多样化谱系。青海湖裸鲤与其甘子河亚种在 Cyt *b* 水平没有形成分化,不支持青海湖裸鲤为多型种,也不支持斜口裸鲤作为独立的种或作为花斑裸鲤的一个亚种。黄河花斑裸鲤有 2 个谱系来源,群体内的遗传分化表明,黄河上游峡谷对裸鲤的基因交流有一定的限制。黄河花斑裸鲤的另一谱系(谱系 B)很可能是黄河在最近一次溯源过程中,融合了当地的土著裂腹鱼类而在遗传上留下了族源印迹。柴达木盆地花斑裸鲤形成单系群(谱系 C),与黄河花斑裸鲤间高于 0.98 的 F_{ST} 值表明基因交流在它们之间长期被阻断,暗示生态隔离可能已经使柴达木盆地花斑裸鲤独立进化成不同的种。另外, He 和 Chen (2006) 利用 Cyt *b* 基因序列的测定,构建了裂腹鱼属 30 个种的系统发育关系,并探讨了该属鱼类起源、分化、扩散与青藏高原隆升和水系发育之间的关系。结果表明,裂腹鱼属是一个单系群,共分成 7 个族群,第一族群包括分布于中亚水系和塔里木河的三个种;第二族群包括仅为来自中亚水系的 *Schizothorax*

argentatus, 其余五个族群均来自青藏高原水系（印度洋水系、雅鲁藏布江、伊洛瓦底、长江等）。他们认为, 裂腹鱼属 (*Schizothorax*) 主要分支发生事件与水系发育有着紧密的联系, 通过分子钟估计, 推测裂腹鱼属所分布的青藏高原主要水系隔离事件发生于晚中新世 (7.1~6.2 Ma), 而青藏高原古河道的变迁和青藏高原隆起事件对裂腹鱼属鱼类的进化产生了深刻的影响, 提出基于隔离事件的物种分化对裂腹鱼属鱼类目前的分布格局具有重要作用。

毋庸置疑, 以上研究无论从形态学上还是从分子水平上都证明了裂腹鱼亚科鱼类的起源与青藏高原的隆升事件具有密切关系, 其分化、扩散等似乎反映了青藏高原的不同隆升阶段的某些地质构造变化、古气候变迁和水系演化事件。

第二节 裂腹鱼亚科属间系统发育关系及生物地理学研究

物种分化的驱动因素是进化生物学研究领域的一个中心问题 (Willis & Whittaker, 2002; Willis & Niklas, 2004; Qian et al., 2005)。近年来, 越来越多的研究通过分子系统学和分子钟来解决这一问题, 希望将古气候环境与某一时期或某地域的物种分化联系起来, 试图获得物种分化的驱动因素 (Avise, 2000; Willis & Whittaker, 2000; Richardson et al., 2001; Liu et al., 2001; Pennington et al., 2004)。然而, 以往研究并未完全澄清物种分化过程中相应形态特征的进化机制。青藏高原是全球海拔最高的一个独特的生态系统, 高原面积广袤、地势高昂、空气稀薄缺氧、气候严酷多变, 特别是, 由于山川的阻隔, 高程的巨大变化, 其中分布的生物在长期的进化过程中必将演化出一系列极适应于高原特殊环境的形态特征和生理特点。更为重要的是, 青藏高原的不同部分在不同时期的隆升高度不同, 而且高原整体在隆升过程中不止一次达到现在高度。青藏高原的早期隆升开始于印度次大陆与欧亚大陆的大碰撞 (Chung et al., 1998), 其第一次隆升发生在 30~40 Ma, 上升 2000 m 左右, 后因侵蚀而降低; 其南部被认为是在 15 Ma 达到现在高度 (Spicer et al., 2003), 而其整体被认为在 7~8 Ma (Harrison et al., 1992) 或晚上新世~早更新世 (Shi et al., 1998) 达到现在高度。青藏高原的多次隆升过程及其不同的隆升高度可能为物种逐步分化以适应于相应环境提供了可能, 同时生物在漫长的演化过程中由于受地球内外因素 (如地质运动、气候改变等) 的影响, 其发生、发展的过程必然留下了遗传或形态特征方面的历史印记。

青藏高原素有“世界屋脊”之称, 区内江河纵横, 咸淡水湖泊棋布, 是世界上海拔最高的一个独特的生态系统。由于其特有物种的丰富性, 该区域连同中国东南部和喜马拉雅生物多样性区组成了世界最重要的 34 个物种多样性焦点区之一 (Wilson, 1992; Myers et al., 2000)。在青藏高原无论是棋布的湖泊、沼泽地、

纵横交错的江河水系、山涧小溪，还是峡谷激流或洞穴暗流都有高原特有鱼类的踪迹（武云飞和吴翠珍，1991）。裂腹鱼亚科（Schizothoracinae）鱼类是青藏高原鱼类三大类群之一，被认为是研究青藏高原不同隆升阶段物种分化的模式群体，因此通过对该亚科鱼类系统学研究探讨青藏高原的地质变迁和水系演化事件具有现实意义。

不同物种的外形特征在极端干旱的相同环境选择压力下可能表现为趋同进化，建立在此基础上的分类学研究可能产生诸多弊端（Nei & Kumar, 2000）。事实上，性状趋同进化现象在高原植物中普遍存在（Wang et al., 2004, 2005）。在鱼类中也有相似的报告，Xiao 等（2005）对青藏高原及其毗邻地区（云贵高原）所特有的云南金钱鲃属（*Sinocyclocheilus*）鱼类，包括穴居种、中间型种（具有穴居和非穴居特性）和非穴居种进行了系统发育及其形态进化研究。研究指出穴居鱼类拥有较发达的感觉系统（包括感觉器官和附属肢体），但其视觉器官逐步退化，甚至有些穴居鱼类不再具有视觉细胞。进一步的研究发现，并非所有的穴居鱼类源自同一广泛分布的穴居鱼祖先，也就是说，穴居鱼类的物种形成是分阶段多起源的，而其持续的黑暗环境是导致穴居鱼类感觉和视觉系统趋同进化的重要环境因子。裂腹鱼亚科鱼类在长期的进化过程中是否也产生了相似的趋同进化现象尚需进一步考证。尽管鱼类学家共同提示，裂腹鱼亚科鱼类对高海拔环境表现出外部性状的适应性进化趋势（曹文宣等，1981；武云飞，1984；武云飞和吴翠珍，1991），但是对该亚科鱼类各属的界定各持己见，不尽相同。如，McClelland (1839) 建立了新属名——弓鱼属（*Racoma*），但是，曹文宣（1964）未提及该属名。在曹文宣（1964）的分类体系中，裂腹鱼亚科包括 10 个属，即裂腹鱼属（*Schizothorax*）、扁吻鱼属（*Aspiorhynchus*）、裂鲤属（*Schizocypris*）、副裂腹鱼属（*Paraschizothorax*）、重唇鱼属（*Diptychus*）、裸鲤属（*Gymnocypris*）、裸裂尻鱼属（*Schizopygopsis*）、黄河鱼属（*Chuan-chia*）、扁咽齿鱼属（*Platypharodon*）和赫氏鱼属（*Herzensteinia*），其中裂腹鱼属下分裂腹鱼亚属（*Schizothorax*）和裂尻鱼亚属（*Schizopyge*）；重唇鱼属下分重唇鱼亚属（*Diptychus*）、叶须鱼亚属（*Ptychobarbus*）和裸重唇鱼亚属（*Gymnodiptychus*）；裸鲤属下分裸鲤亚属（*Gymnocypris*）和尖裸鲤亚属（*Oxygymnocypris*）。随后，武云飞（1984）以及武云飞和吴翠珍（1991）通过对外部形态和骨骼特征的比较分析，重新使用了弓鱼属的属名，并将叶须鱼亚属、裸重唇鱼亚属和尖裸鲤亚属提升为属，将赫氏鱼属纳入到裸裂尻鱼属之中，同时，废弃了裂鲤属和副裂腹鱼属两个属名。然而，陈毅峰和曹文宣（2000）在近期的修正中将弓鱼属合并到裂腹鱼属中，同时又使用了赫氏鱼属名。由以上可见，不同分类学家在界定物种种名或属名时有所不同，导致此结果的主要原因可能是裂腹鱼类在长期进化中由于受相同环境压力的选择而发生了形态的趋

同进化。

分子水平的数据，特别是 DNA 序列，在深入探讨物种进化、分类和系统发育关系等领域具有很大的贡献，对于形态特征模糊或经历过形态趋同进化物种的分类学地位的研究更为重要。近期，许多研究通过 DNA 序列的分析有效地解决了传统方法难以界定的属或种 (Lovejoy & Araújo, 2000; Xiao et al., 2001; Crespi & Fulton, 2004; Outlaw & Voelker, 2006)。何德奎等 (2003) 利用 Cyt *b* 序列探讨了特化级裂腹鱼亚科鱼类的系统发育关系，提出通过形态特征界定的有些属并非形成单系群。他们的研究结果显示，裂腹鱼亚科鱼类的分化似乎与青藏高原的不同隆升阶段存在着密切的联系，但是，由于受样本量的限制，尚未解决裂腹鱼亚科鱼类是否是单系群的问题。另外，该类群在形态上是如何进化的尚不清楚，同时也未澄清存在争议的物种的分类学地位。本节以陈毅峰和曹文宣 (2000) 提出的分类体系为参照，通过利用 Cyt *b* 序列构建裂腹鱼亚科鱼类及其鲤科鱼类其他近缘属的系统发育关系，旨在解决以下几个方面的问题：①裂腹鱼亚科鱼类是否是一个单系群？如果裂腹鱼亚科鱼类起源于同一祖先，则其姐妹群如何？②在界定种和属的问题上分子系统发育关系与形态分类是否相符合？假如不符合，则其原因何在？③主要物种分化时间的估计是否与青藏高原隆升的地质学研究相符合？这些问题为探讨青藏高原物种多样性与青藏高原隆关系积累科学数据。

1 样品采集

裂腹鱼亚科鱼类种的鉴定主要依据陈毅峰和曹文宣 (2000) 的分类体系及其对各物种的形态描述。本节采集裂腹鱼亚科鱼类共 18 个种，加之来自 GenBank 的 18 个序列，共计 36 个种，代表除扁吻鱼属 (*Aspiorhynchus* Kessler) 以外的其他各属 (表 2-2 和图 2-1)。武云飞和吴翠珍 (1991) 以及陈毅峰和曹文宣 (2000) 详细描述了扁吻鱼属新疆扁吻鱼 (*Aspiorhynchus laticeps*) 的形态特征和主要分布水系，但是在采样过程中始终未能采集到新疆扁吻鱼的样本。在构建裂腹鱼亚科鱼类系统发育关系时，还包括鲤科鱼类其他 10 个相关亚科的 13 个种，序列均来自于 GenBank。本节所测物种均采集于 2002~2005 年间。野外采样时，取肌肉或鳍组织暂时保存在液氮或 -20℃ 车载冰箱中，带回实验室后保存于 -70℃ 备用。鉴于 *Phenacogrammus interruptus* 和 *Astyanax mexicanus* 与鲤科鱼类有着较近的亲缘关系 (Zardoya & Doadrio, 1999)，本节将它们作为构建裂腹鱼亚科鱼类系统发育关系的外群 (outgroup)。

表 2-2 本节所涉及鱼类的采集地点、水系及基因库序列号

物种	采集地点	水系	序列号
脂鲤科 Charcidae			
断线脂鲤 <i>Phenacogrammus interruptus</i>	GenBank		AY791434
墨西哥丽脂鱼 <i>Astyanax mexicanus</i>	GenBank		AF045997
鱼丹亚科 Danioninae			
马口鱼 <i>Opsariichthys bidens</i>	GenBank		AY646648
鲃亚科 Barbinae			
宽头四须鲃 <i>Barbodes laticeps</i>	GenBank		AY854739
抚仙金线鲃 <i>Sinocyclocheilus tingi</i>	GenBank		AY854701
九圩金线鲃 <i>Sinocyclocheilus jiu xuensis</i>	GenBank		AY854737
野鲮亚科 Labeoninae			
泉水鱼 <i>Semilabeo prochilus</i>	GenBank		AY051881
鲤亚科 Cyprininae			
黑鲫 <i>Carassius carassius</i>	GenBank		AY714387
雅罗鱼亚科 Leuciscinae			
瓦氏雅罗鱼 <i>Leuciscus waleckii</i>	GenBank		AY026395
鲴亚科 Xenocyprinae			
棱似鲴 <i>Xenocyprionides carinatus</i>	GenBank		AF036201
云南鲴 <i>Xenocypris yunnanensis</i>	GenBank		AF036208
鮡亚科 Gobioninae			
蛇鮡 <i>Saurogobio dabryi</i>	GenBank		AY245091
鲃亚科 Cultrinae			
长春鲃 <i>Parabramis pekinensis</i>	GenBank		AF051874
鲮亚科 Acheilognathinae			
兴凯鲮 <i>Acheilognathus chankaensis</i>	GenBank		AF051854
鮡亚科 Gobiobotinae			
南方长须鮡			
<i>Gobiobotia longibarba meridionalis</i>	GenBank		AF375867
裂腹鱼亚科 Schizothoracinae			
异齿裂腹鱼	西藏拉萨	拉萨河(雅鲁藏布江)	
<i>Schizothorax schizothorax o'connori</i> Lloyd			EF533719
短须裂腹鱼			
<i>S. schizothorax wangchiachii</i> Fang	GenBank		AY463521
齐口裂腹鱼	青海班玛	班玛河(大渡河)	
<i>S. schizothorax prenanti</i> Tchang			EF533726

续表

物种	采集地点	水系	序列号
银色裂腹鱼			
<i>S. racoma argentatus</i> Kessler	GenBank		AF180861
伊犁裂腹鱼			
<i>S. racoma pseudaksaiensis</i> Herzenstein	GenBank		AF180827
巨须裂腹鱼	西藏拉萨	拉萨河(雅鲁藏布江)	
<i>S. racoma macropogon</i> Regan			EF533720
拉萨裂腹鱼	西藏拉萨	拉萨河(雅鲁藏布江)	
<i>S. racoma waltoni</i> Regan			EF533721
澜沧裂腹鱼	青海杂多	扎曲河(澜沧江)	
<i>S. racoma lantsangensis</i> Tsao			DQ646882
贡山裂腹鱼			
<i>Schizothorax racoma gongshanensis</i> Tsao	GenBank		AY954280
怒江裂腹鱼			
<i>Schizothorax schizothorax nukiangensis</i> Tsao	GenBank		DQ126125
灰裂腹鱼			
<i>Schizothorax racoma griseus</i> Pellegrin	GenBank		AY954253
光唇裂腹鱼			
<i>Schizothorax schizothorax lissolabius</i> Tsao	GenBank		DQ126127
细鳞裂腹鱼			
<i>Schizothorax schizothorax chongi</i> Fang	GenBank		DQ126118
长丝裂腹鱼			
<i>Schizothorax schizothorax dolichonema</i>	GenBank		DQ126116
软刺裂腹鱼			
<i>Schizothorax schizothorax malacanthus</i> Huang	GenBank		AY954277
南方裂腹鱼			
<i>Schizothorax schizothorax meridionalis</i> Tsao	GenBank		AY954285
独龙裂腹鱼			
<i>Schizothorax schizothorax dulongensis</i> Huang	GenBank		AY954284
双须叶须鱼			
<i>Ptychobarbus dipogon</i> Steindachner	GenBank		AY463510
锥吻叶须鱼			
<i>Ptychobarbus conirostris</i> Steindachner	GenBank		AY463509
裸腹叶须鱼	青海杂多	扎曲河(澜沧江)	

续表

物种	采集地点	水系	序列号
<i>Ptychobarbus kaznakovi</i> Nikolsky			EF533722
格咱叶须鱼			
<i>Ptychobarbus chungtienensis gezaensis</i>	GenBank		AY463506
中甸叶须鱼			
<i>Ptychobarbus chungtienensis chungtienensis</i>	GenBank		AY463508
斑重唇鱼			
<i>Diptychus maculatus</i> Steindachner	GenBank		AY463514
厚唇裸重唇鱼	青海兴海	黄河	
<i>Gymnodiptychus pachycheilus</i> Herzenstein			DQ309348
新疆裸重唇鱼	新疆和硕	龙卡河(塔里木河水系)	
<i>Gymnodiptychus dybowskii</i> Kessler			EF533724
全裸重唇鱼			
<i>Gymnodiptychus integrigymnatus</i> Huang			AY463526
花斑裸鲤	青海玛多	扎陵湖(黄河)	
<i>Gymncypris eckloni</i> Herzenstein			DQ309350
青海湖裸鲤	青海共和	青海湖	
<i>G. przewalskii przewalskii</i> Kessler			DQ309362
尖裸鲤	西藏拉萨	拉萨河(雅鲁藏布江)	
<i>Oxygymnocypris stewartii</i> Tsao			DQ309358
黄河裸裂尻鱼	青海大通	湟水河(黄河)	
<i>Schizopygopsis pylzovi</i> Kessler			DQ646897
软刺裸裂尻鱼	青海称多	雅砻江(长江)	
<i>Schizopygopsis malacanthus</i> Herzenstein			DQ646900
前腹裸裂尻鱼	青海杂多	吉曲河(澜沧江)	
<i>Schizopygopsis anteroventris</i>			DQ309365
拉萨裸裂尻鱼	西藏拉萨	拉萨河(雅鲁藏布江)	
<i>Schizopygopsis younghusbandi</i> Regan			DQ646894
骨唇黄河鱼	青海玛多	扎陵湖(黄河)	
<i>Chuanchia labiosa</i> Herzenstein			EF533725
极边扁咽齿鱼	青海兴海	黄河	
<i>Platypharodon extremus</i> Herzenstein			DQ309349
小头高原鱼	青海格尔木	沱沱河(长江)	
<i>Herensteinia microcephalus</i> Herzenstein			DQ309356

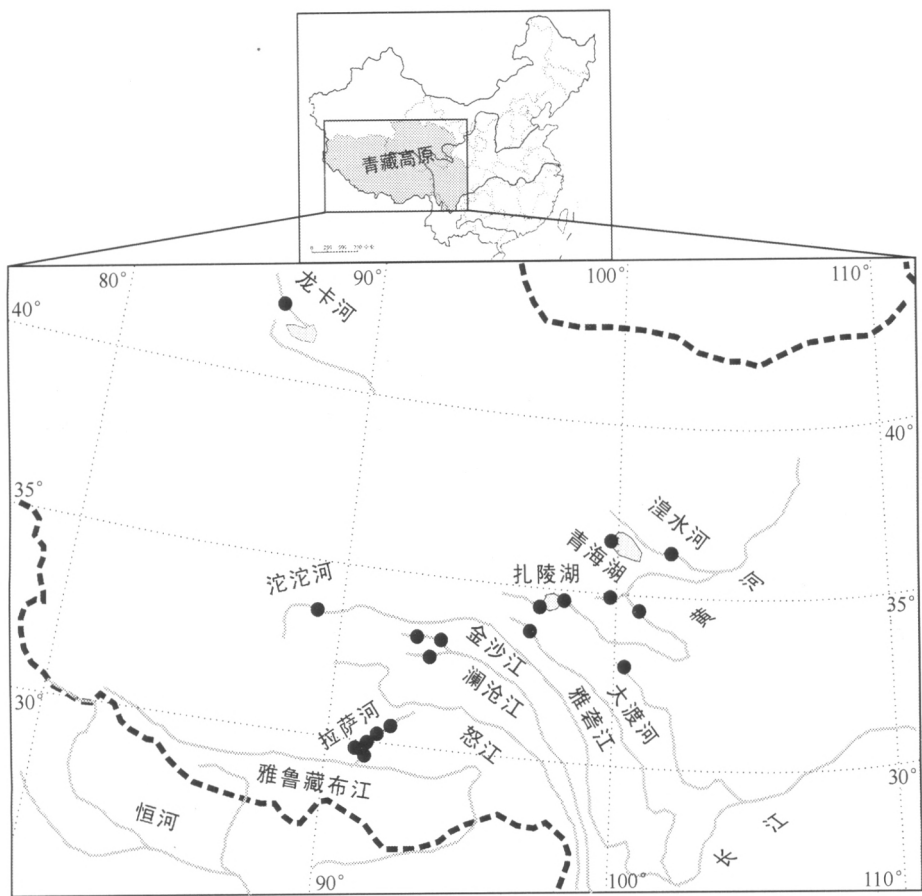


图 2-1 裂腹鱼亚科鱼类鱼类的采集地点
●表示采集地点

2 线粒体 DNA 细胞色素 *b* 基因扩增及测序

采用常规方法提取组织 DNA，选用表 2-3 所示通用引物对裂腹鱼亚科鱼类 Cyt *b* 基因全序列进行扩增，PCR 扩增产物经纯化后采用 Megabase 500 自动测序仪（Amersham Pharmacia Biotech Inc.）进行测序。

表 2-3 裂腹鱼亚科鱼类 Cyt *b* 基因扩增和测序引物

引物名称	序 列
L14724	5'-GACTTGAAAAACCACCGTTG-3'
L15138	5'-ATGATGACCGCCTTCGTGGGCTA-3'
H15560	5'-GCGTAGGCAAATAGGAAGTATC-3'
H15915	5'-CTCCGATCTCCGGATTACAAGAC-3'

3 数据处理

3.1 序列比对和序列特征分析

分段进行正反链双向测序的数据经 CHROMAS 软件比对后, 适当进行人工校对, 然后用 DNAMAN 软件进行分段数据的拼接形成完整的 Cyt *b* 序列。所有 Cyt *b* 序列利用 CLUSTAL X (Thompson et al., 1997) 的默认参数设置 (default setting) 为基础进行同源序列的多重比对, 并实施人工校对。比对后的序列通过 Mega ver. 3.0 (Kumar et al., 2004) 软件分析序列的碱基组成及其变异位点等统计数据。核苷酸替代的饱和程度通过将转换和颠换的绝对数目与非校正的 p 距离分别作散点图进行分析, 其推断机理是如果某密码子达到饱和, 则在散点图上可以观察到一个峰, 否则散点图呈线性趋势。一般而言, 线粒体基因的第三密码子容易达到饱和, 因此本节仅对 Cyt *b* 基因第三密码子和所有位点的替代饱和进行了检测。

利用 PAUP* 4.0b10 (Swofford, 2000) 和 Mr Bayes 3.0b4 (Huelsenbeck & Ronquist, 2001) 软件分别构建最大似然树 (maximum likelihood tree, MLT)、最大简约树 (maximum parsimony tree, MPT) 和贝叶斯 (Bayesian) 系统发育树。在 ML 和贝叶斯系统发育分析中, 采用 Modeltest 3.06 (Posada & Crandall, 1998) 所确定核苷酸进化的最适模型。选择前, 利用 PAUP* 4.0b10 软件分别计算 56 种模型的 $-\ln L$ 和转换/颠换 (transition/transversion, ti/tv) 值, 产生一个 .scores 文件, 然后利用 Modeltest 程序执行一组等级似然率检验 (hierarchical likelihood ratio test, hLRT), 由此从 56 种模型中选择出最适模型。

在 ML 分析中, 选择启发式搜索算法 (heuristic search) 和简单叠加序列 (simple addition sequence) 及 TBR (tree-bisection-reconnection) 分支交换选项构建进化树。

在 MP 分析中, 使用启发式搜索算法和 100 次逐步随机叠加序列 (random-addition-sequence) 及 TBR 分支交换选项构建进化树。同时应用自举检验 (bootstrap test) 估计系统树中节点的支持率, ML 和 MP 重复次数分别为 100 和 1000 次, 并且对下颌角质性性状作了分子系统树标记。

Bayesian 分析中以后验概率 (posterior probability, PP) 来表示各分支的可信性。以随机树 (random) 开始分析, 马尔科夫链的蒙特卡洛方法 (Markov chain Monte Carlo process) 设置 4 条链同时运行, 3 条热链 1 条冷链, 共执行 500 万代 (generation), 每 100 代保存一颗树, 由此总共可获得 50 000 颗树。根据可能性值 (likelihood value) 及经验估计, 舍弃前 5000 颗树老化样本 (burn-in sample), 而后面的 45 000 颗树用于计算 50% 一致性树 (consensus tree)。

为了重新评估武云飞和吴翠珍 (1991) 及陈毅峰和曹文宣 (2000) 对裂腹鱼亚科鱼类不同的分类体系, 本节利用 PAUP 程序的 STRAITS 选择项分别对以下几种分类假设进行了 Kishino-Hasegawa (KH) 和 Shimodaira-Hasegawa (SH) 检验。根据武云飞和吴翠珍 (1991) 的分类体系假设将陈毅峰和曹文宣 (2000) 分类体系中的裂腹鱼属 (*Schizothorax*) 下分为弓鱼属 (*Racoma*) 和裂腹鱼属, 即在构建 ML 系统发育树时将裂腹鱼属约束为两个单系群 (monophyly); 或将其根据陈毅峰和曹文宣 (2000) 的分类体系约束为裂腹鱼亚属和裂尻鱼亚属两个单系群; 根据武云飞和吴翠珍 (1991) 的分类体系假设将陈毅峰和曹文宣 (2000) 分类体系中的高原鱼属 (*Herzensteinia*) 约束到裸裂尻鱼属 (*Schizopygopsis*) 中; 或仅将裸裂尻鱼属约束为一个单系群。通过计算未受约束和受约束的 ML 系统发育树的似然率值 ($-\ln L$) 并比较, 作出相应的 KH 和 SH 检验, 由此确定不同分类体系的合理性。

3.2 分子钟估计

估计物种间分化时间之前, 首先利用 PAUP* 4.0b10 分别计算裂腹鱼亚科鱼类 Cyt *b* 序列分子钟约束和未约束系统发育树的最大似然率, 然后通过似然率检验 (likelihood ratio test, LRT) 法确定即将进行分子钟估计的各物种在该基因的进化中具有相同的碱基替换率 (匀速)。假如似然率检验结果不否定无效假设, 则认为参与分子钟估计的物种在该基因的进化中具有相同的碱基替换率, 可直接进行分化时间的估计; 反之, 构建不受分子钟约束的最大似然树, 保留其枝长, 利用 NPRS (nonparametric rate smoothing) 方法 (Sanderson, 1997) 在 TreeEdit ver. 1.0 估计物种间的分化时间。

4 结果

4.1 细胞色素 *b* 序列特征

裂腹鱼亚科鱼类 Cyt *b* 基因全序列长度为 1140 bp。在包括外群所分析的 51 个序列 1140 位点中, 有 557 个可变位点 (无缺失或插入), 其中 483 个为简约性位点, 74 个为单突变位点, 信息位点最多的是第三位密码子 (352 个简约性信息位点), 第一位密码子次之 (100 个简约性信息位点), 而第二位密码子最少 (31 个简约性信息位点); 序列的碱基组成为 A=26.8%、T=29.1%、C=27.8% 和 G=16.3%, 平均转换/颠换值为 2.4。裂腹鱼亚科鱼类 36 个序列的 1140 位点中, 有 457 个可变位点 (无缺失或插入), 其中 383 个是简约性位点, 74 个是单突变位点; 平均转换/颠换值为 3.3; 序列碱基组成为 A, 26.1%; T, 29.5%; C, 27.4%; 和 G, 17.0%, 碱基表现出反 G 偏倚的线粒体基因组的典型特性

(Cantatore et al., 1994) (表 2-4)。在外群与内类群间, 基于 Kimura 双参数 (Kimura 2-parameter) 的序列差异在 17.32% [九圩金线鲃 (*Sinocyclocheilus jiuxuensis*) 与银色裂腹鱼 (*Schizothorax argentatus*)] 到 32.43% (*Phenacogrammus interruptus* 与 *Gymnodiptychus dybowskii*) 之间。内类群间序列差异变异范围在 0.44% 银色裂腹鱼与长丝裂腹鱼 (*Schizothorax dolichonema*) 到 22.53% (*Gymnodiptychus dybowskii* 与 *Schizothorax dolichonema*), 内类群间平均序列差异为 15.46%。

表 2-4 裂腹鱼亚科鱼类不同密码子位碱基组成及其偏倚*

	第一密码子位(380bp)				第二密码子位(380bp)				第三密码子位(380bp)			
	A	T	C	G	A	T	C	G	A	T	C	G
范围	24.7~ 26.8	22.0~ 25.5	23.6~ 27.0	24.4~ 26.2	18.5~ 19.8	41.7~ 43.8	23.0~ 25.3	13.7~ 14.5	30.3~ 41.6	18.9~ 26.8	18.9~ 36.1	4.2~ 16.1
平均	25.5	23.6	25.5	25.4	19.3	42.4	24.4	14.0	33.6	22.7	32.3	11.5
(A+T)%	49.1				61.7				56.3			
偏倚	0.019				0.231				0.211			

* 碱基组成偏倚根据公式 $C = (2/3) \sum (C_i - 0.25)$ 计算, 其中 C 为碱基偏倚值, 而 C_i 为第 i 碱基的频率 (Irwin et al., 1991)。

用 PAUP* 软件统计出 Cyt b 序列中转换和颠换的绝对数目以及非校正的两两序列 p 距离, 并绘制出饱和性检测散点图 (图 2-2)。本节中所有散点图中并未观察到峰, 表明裂腹鱼亚科鱼类 Cyt b 序列第一、二、三密码子并未达到饱和, 因此在后续分析中不必剔出饱和位点或在简约性分析中不需加权处理。

4.2 裂腹鱼亚科鱼类属间系统发育关系

通过似然率测验由 ModelTest 3.06 软件 (Posada & Crandall, 1998) 获得的最适分子进化模型为 GTR+I+G, 其参数设置如下: base = (0.3096 0.3392 0.0941), Nst = 6, Rmat = (0.7438 16.7716 0.7152 1.0309 8.7471), rate = gamma, shape = 0.9058, Pinvar = 0.4691。该参数用于构建 ML 和贝叶斯系统发育。在 ML 分析中, 启发式搜索获得唯一一棵最大似然发育树, 其 loglikelihood (-lnL) 值为 16 028.93 (图 2-3)。简约性分析中启发式搜索共获得 2 棵最简约树, 其树长 (tree length, TL) 为 3007, 一致性系数 (consistency index, CI) 0.3116, 存留系数 (retention index, RI) 0.6493, 同质性系数 (homoplasy index, HI) 0.6884。支持率分析后所获得的 50% 多数一致性树的拓扑结构与 ML 系统发育树相同 (图 2-4)。基于最适模型 GTR+I+G 构建贝叶斯 50% 一致性树同样获得了与 ML 系统发育树相同的拓扑结构 (图 2-5)。

三种分析方法获得了一致的系统发育关系拓扑结构, 在该拓扑结构中, 裂腹

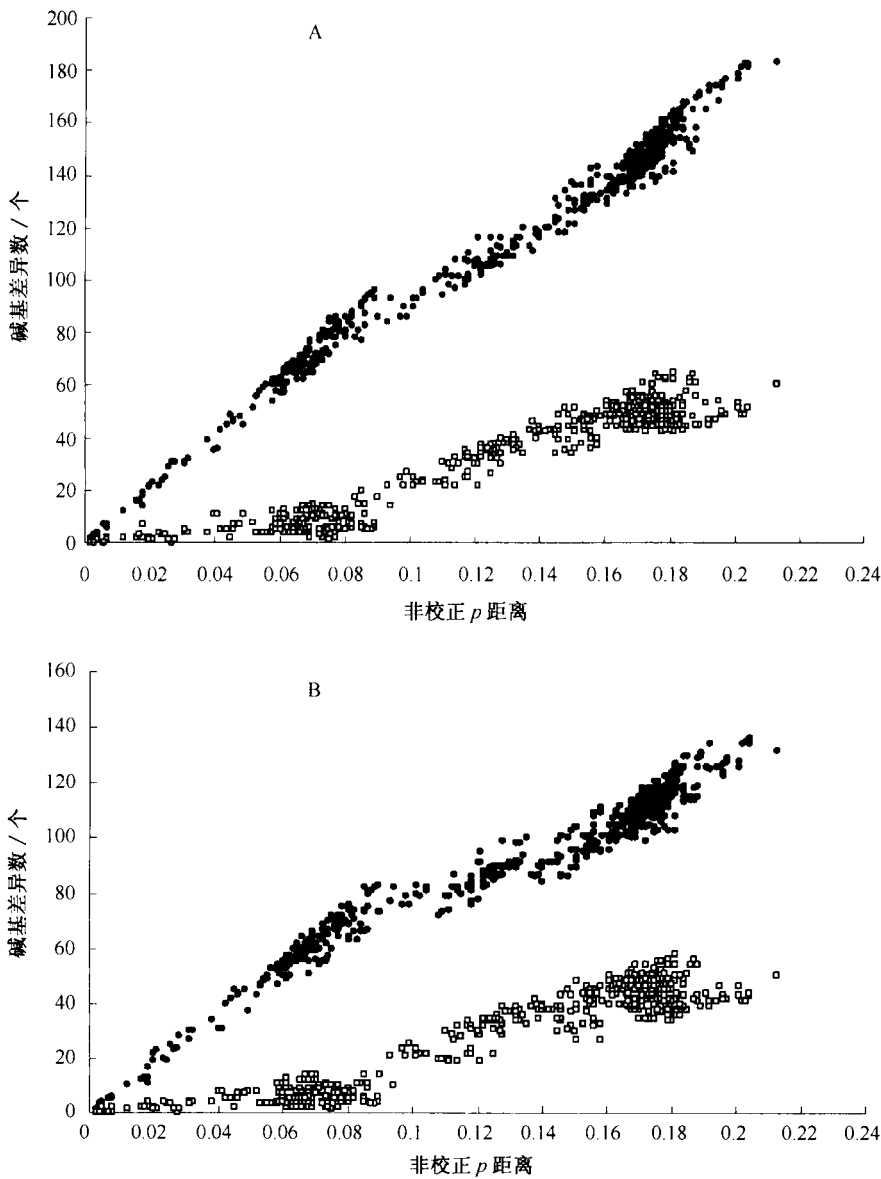


图 2-2 青藏高原裂腹鱼亚科鱼类 Cyt *b* 基因转换和颠换数与非校正 *p* 距离之间关系的散点图
A. 所有位点; B. 第三密码子。●表示转换; □表示颠换

鱼亚科鱼类形成一个支持率较高的单系群 [ML 和 MP 的支持率分别为 86%和 83%; 贝叶斯的后验概率 (PP) =98%], 并且与鲃亚科鱼类有着极为密切的关系。裂腹鱼亚科鱼类形成三个主要族群, 第一族群仅包括裂腹鱼属 (*Schizothorax*) (ML 和 MP 的支持率分别为 98 %和 100%; PP=98%), 第二族群包括重唇鱼属 (*Diptychus*) 和裸重唇鱼属 (*Gymnodiptychus*) (ML 和 MP 的支持率

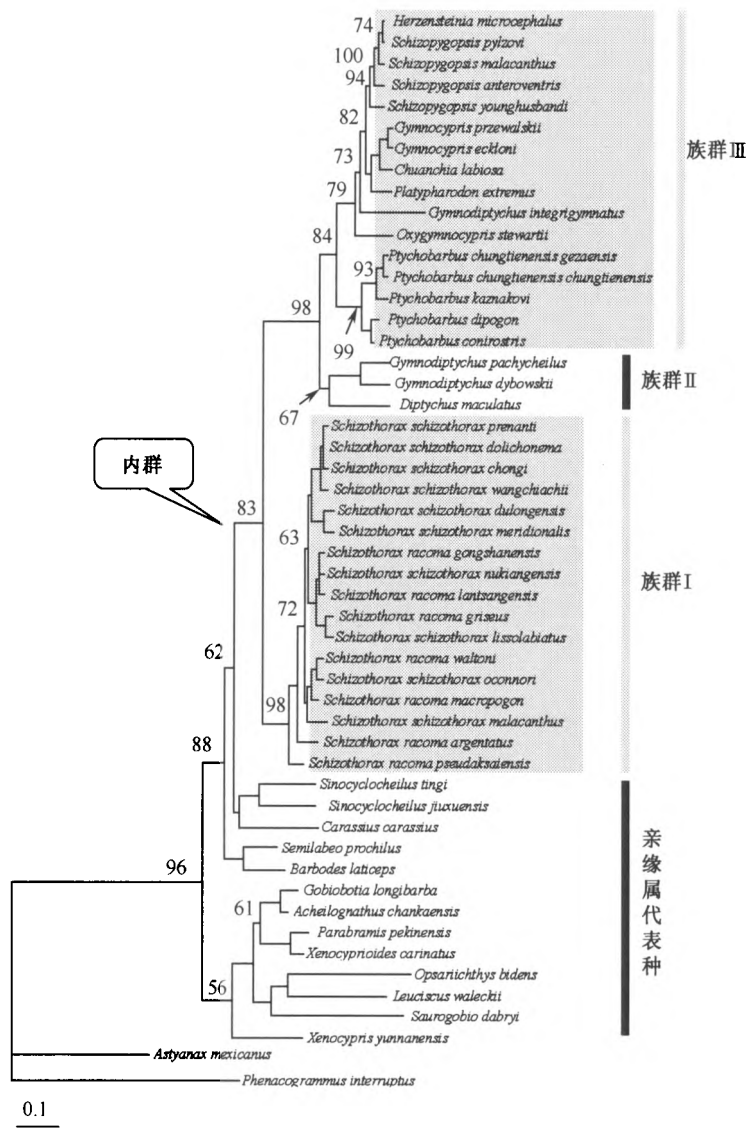


图 2-3 青藏高原裂腹鱼亚科鱼类基于 Cyt b 基因构建的最大似然发育树
-lnL (unconstrained) = 16 028.93。相关参数来自于 Modeltest 3.06 所确定的最佳模型
GTR+I+G, 节点上数据表示 100 次重复的支持率 (%，仅显示 $\geq 50\%$ 的值)

分别为 67 %和 63 %; PP=63 %), 第三族群包括叶须鱼属 (*Ptychobarbus*)、裸鲤属 (*Gymnocypris*)、尖裸鲤属 (*Oxygymnocypris*)、裸裂尻鱼属 (*Schizopygopsis*)、黄河鱼属 (*Chuanchia*)、扁咽齿鱼属 (*Platypharodon*) 和高原鱼属 (*Herzensteinia*) (ML 和 MP 的支持率分别为 84 %和 86 %; PP=99 %)。第一族群作为原始群置于发育树底部, 而第三族群的裸裂尻鱼属以特化群置于发育树顶部。在第三族群中, 裸鲤属 (*Gymnocypris*)、黄河鱼属 (*Chuanchia*) 和扁咽齿鱼属 (*Platypharodon*)

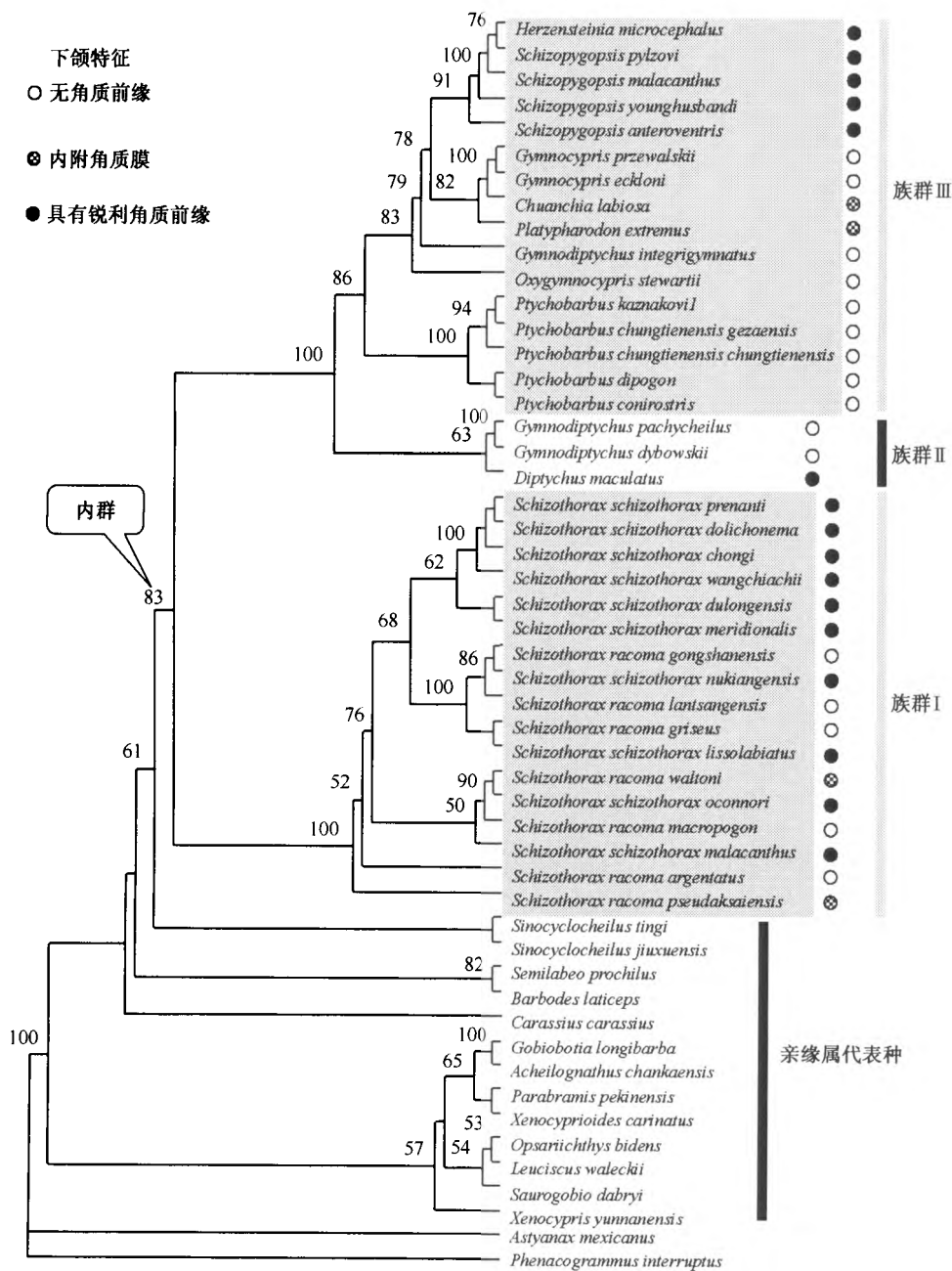
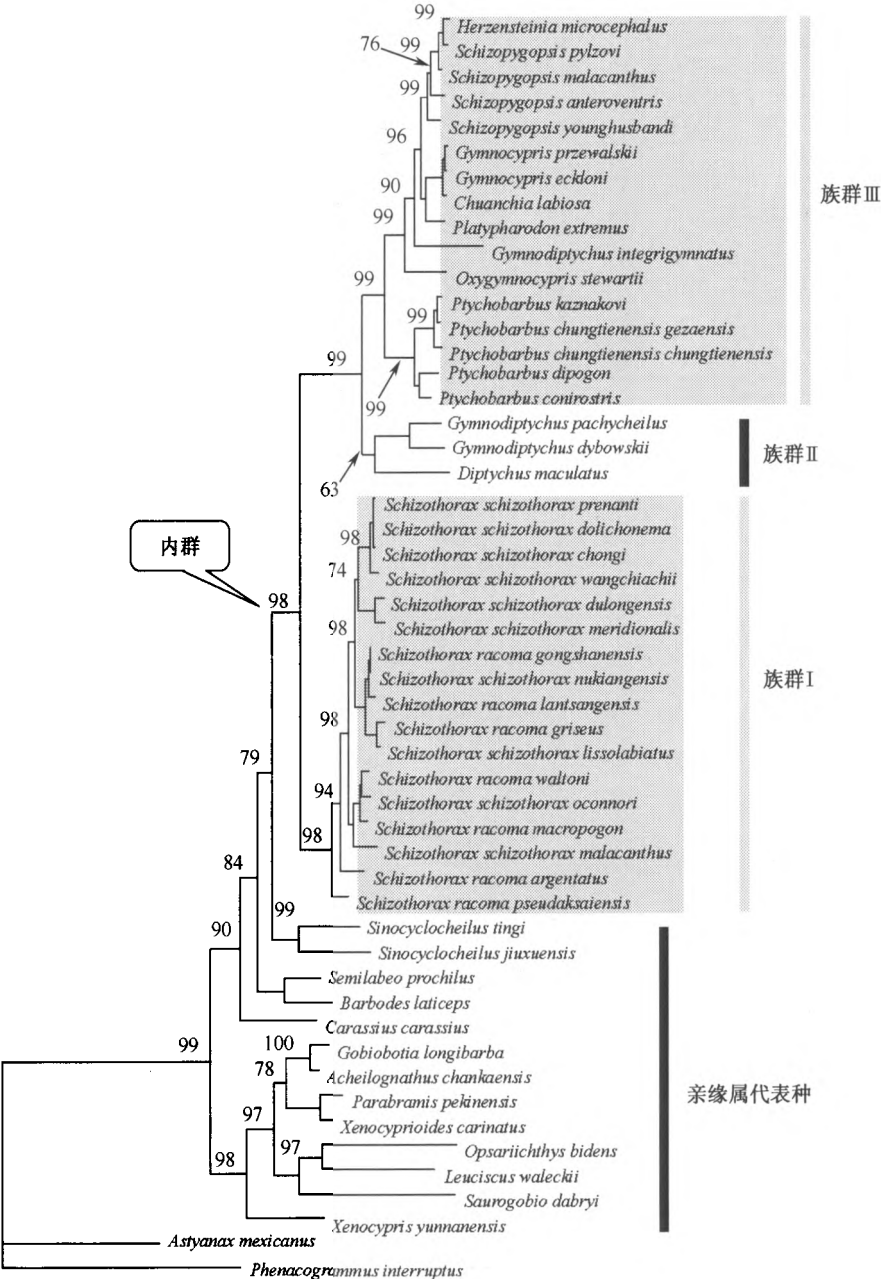


图 2-4 青藏高原裂腹鱼亚科鱼类基于 Cyt *b* 基因构建的最大简约树
tree length=3007, CI=0.3116, HI=0.6884, RI=0.6493。节点上数据表
示 1000 次重复的支持率（%，仅显示≥50%的值）



0.1

图 2-5 青藏高原裂腹鱼亚科鱼类基于 Cyt b 基因构建的贝叶斯 50%多数一致树
GTR+I+G 碱基替代模型，节点上处统计数据表示贝叶斯的后验概率 (PP, %)

首先聚在一起,组成由裸裂尻鱼属 (*Schizopygopsis*) + 高原鱼属 (*Herzensteinia*) 单系群 (ML 和 MP 的支持率分别为 94 % 和 91%; PP=99%) 的姐妹群,然后与尖裸鲤属 (*Oxygymnocypris*) 和全裸重唇鱼 (*Gymnodiptychus integrigymnatus*) 共同形成一个单系群 (ML 和 MP 的支持率分别为 79 % 和 83%; PP=99%)。在所有系统发育树中,裸重唇鱼属 (*Gymnodiptychus*) 并未形成单系群。

图 2-4 显示,下颌具有锐利角质前缘这一性状在裂腹鱼亚科鱼类中是多次发生的,多数下颌具有锐利角质前缘的物种之间并不存在系统发育上的联系,而且有些种在下颌有无角质前缘性状上存在间型——下颌内附角质膜,说明这种性状是为适应高原特殊生态环境趋同进化而产生的。

裂腹鱼亚科不同分类体系的 KH 和 SH 检验见表 2-5。当按照武云飞和吴翠珍 (1991) 的分类体系将齐口裂腹鱼 (*Schizothorax schizothorax prenanti*)、异齿裂腹鱼 (*Schizothorax schizothorax o'connori*)、怒江裂腹鱼 (*Schizothorax schizothorax nukiangensis*)、光唇裂腹鱼 (*Schizothorax schizothorax lissolabiatatus*)、短须裂腹鱼 (*Schizothorax schizothorax wangchiachii*)、细鳞裂腹鱼 (*Schizothorax schizothorax chongi*)、长丝裂腹鱼 (*Schizothorax schizothorax dolichonema*)、巨须裂腹鱼 (*Schizothorax racoma macropogon*)、拉萨裂腹鱼 (*Schizothorax racoma waltoni*)、澜沧裂腹鱼 (*Schizothorax racoma lantsangensis*)、贡山裂腹鱼 (*Schizothorax racoma gongshanensis*)、灰裂腹鱼 (*Schizothorax racoma griseus*)、银色裂腹鱼 (*Schizothorax racoma argentatus*)、伊犁裂腹鱼 (*Schizothorax racoma pseudaksaiensis*) 约束为弓鱼属 (*Racoma*) 时,其似然率 ($-\ln L = 16074.14410$) 与非约束似然率 ($-\ln L = 16028.93242$) 相比,差异不大, KH ($P=0.05$) 和 SH ($P=0.152$) 检验均不显著;同样,将软刺裂腹鱼 (*Schizothorax schizothorax malacanthus*), 南方裂腹鱼 (*Schizothorax schizothorax meridionalis*) 和独龙裂腹鱼 (*Schizothorax schizothorax dulongensis*) 约束为一个单系群 (裂腹鱼属) 时,其似然率 $-\ln L = 16040.46079$, KH ($P=0.564$) 和 SH ($P=0.683$) 检验也不显著;反之,将以上类群按照陈毅峰和曹文宣 (2000) 约束为两个单系群 (裂腹鱼亚属和裂尻鱼亚属) 时, KH ($P<0.01$) 和 SH ($P<0.01$) 检验极显著。将裸重唇鱼属 (*Gymnodiptychus*) 约束为一个单系群时, KH 和 SH 检验均显著;而仅仅将裸裂尻鱼属 (*Schizopygopsis*) 作为一个单系群时 (不包括高原鱼属), KH 检验显著 ($P<0.05$), 但是 SH 检验不显著 ($P=0.137$)。

表 2-5 裂腹鱼亚科不同分类体系的 KH 和 SH 检验

系统发育树	-ln L	差异	KH 检验	SH 检验
非约束的 ML 树	16 028.932 42	best		
裂腹鱼亚属约束 ML 树(陈毅峰和曹文宣,2000)	16 314.269 39	285.336 96	0.000*	0.000*
裸尻鱼亚属约束 ML 树(陈毅峰和曹文宣,2000)	16 338.712 84	309.780 42	0.000*	0.000*
弓鱼属约束 ML 树(武云飞和吴翠珍,1991)	16 074.144 10	45.211 68	0.050	0.152
裂腹鱼属约束 ML 树(武云飞和吴翠珍,1991)	16 040.460 79	11.528 37	0.564	0.683
裸重唇鱼属约束 ML 树	16 094.351 16	65.418 74	0.013*	0.047*
裸裂尻鱼属约束 ML 树	16 074.322 88	45.390 46	0.040*	0.137

* $P < 0.05$.

4.3 分歧时间估计

在计算受分子钟约束和不受约束最大似然率值时，仍使用由 ModelTest 3.06 分析获得的最适分子进化模型 GTR+I+G，其参数设置为 base= (0.3096 0.3392 0.0941)，Nst=6，Rmat= (0.7438 16.7716 0.7152 1.0309 8.7471)，rate=gamma，shape=0.9058，Pinvar=0.4691。当包括所有序列时，分子钟约束和未约束系统发育树的似然率检验否定了各物种碱基替换率相同的无效假设 (-lnL nonclock = 4852.89，-lnL clock = 4961.70， $\chi^2 = 97.62$ ， $df = 49$ ， $P < 0.01$)，即否定了分子钟假设。采用何德奎等 (2003) 确定的裂腹鱼亚科鱼类 0.91%/Ma 的进化速率，通过 NPRS 法计算获得裂腹鱼亚科鱼类起源于 11.4 Ma，族群 I 与 II 和 III 之间的分化时间在 11.2 Ma，族群 II 与 III 之间的分化时间在 9.5 Ma，而其主要物种的分化发生于 6.1~0.4 Ma。

5 主要结论

- (1) 裂腹鱼亚科鱼类是一个存在于自然界的单系群，并且与鲃亚科鱼类有着较近的亲缘关系，支持裂腹鱼亚科鱼类源自鲃亚科鱼类的观点。
- (2) 裂腹鱼亚科鱼类分为三个大的族群，第一族群仅有裂腹鱼属 (*Schizothorax*)，第二族群包括重唇鱼属 (*Diptychus*) 和裸重唇鱼属 (*Gymnodiptychus*)，第三族群包括叶须鱼属 (*Ptychobarbus*)、裸鲤属 (*Gymnocypris*)、尖裸鲤属 (*Oxygymnocypris*)、裸裂尻鱼属 (*Schizopygopsis*)、黄河鱼属 (*Chuanchia*)、扁咽齿鱼属 (*Platypharodon*) 和高原鱼属 (*Herzensteinia*)。其中，第一族群作为原始群置于发育树底部，而第三族群的裸裂尻鱼属 (*Schizopygopsis*) 以特化群置于发育树顶部，该结果与形态特征构建的系统发育不一致，其主要原因可能是裂腹鱼亚科鱼类在长期的演化过程中发生了形态的趋同进化。

(3) 序列差异、系统发育关系和 KH 和 SH 检验均支持将高原鱼属 (*Herzensteinia*) 合并到裸裂尻鱼属 (*Schizopygopsis*) 的观点, 同时不支持将 *Schizothorax* 下分两个亚属的观点。

(4) 分子钟估计显示裂腹鱼亚科鱼类起源于 11.4 Ma, 主要族群分化时间在 11.2 Ma 和 9.5 Ma, 而其主要种化事件发生于 6.1~0.4 Ma, 推测青藏高原自 6.1 Ma 以后所发生的强烈隆升事件对裂腹鱼亚科鱼类的物种分化、扩散产生了深远的影响。综合青藏高原裂腹鱼亚科鱼类现今分布格局, 表明青藏高原是在 6.1 Ma 以后才达到 2000 m 以上的海拔高度。

第三节 裸裂尻鱼属的系统发育及其隔离事件 在进化中的主导作用

淡水生物在地理隔离水系中的广泛分布暗示这些水系可能有过古河道联系, 其发生机理在于生物栖息地曾经历过历史地质变迁或古河道演化事件 (McGlashan & Hughes, 2000)。青藏高原现存生物物种的演化必然经受过高原古气候环境、地质变迁和水系演化的影响, 因此, 研究高原特有物种的起源、分化、扩散、分布格局和系统发育关系能在很大程度上反映出青藏高原在抬升过程中所经历的主要地质变迁和古气候环境变化事件, 同时也能澄清高原湖泊、内外流江河水系的发育关系。在这种假设下, 水生生物, 特别是淡水水生动物, 由于受栖息水域和迁移能力的限制而在生物地理学研究中愈来愈显示出其优越性, 曾一度被生物学家视为研究生物类群演化与气候环境变迁和水系发育关系的理想素材 (McGlashan & Hughes, 2000; Perdices et al., 2004; Guo et al., 2005; Cook et al., 2006; Zakšek et al., 2007)。近年来, 以水生动物为材料, 通过分子系统学方法在探讨地质变迁事件、气候环境变化和水系演化方面取得了巨大的成功。如, McGlashan 和 Hughes (2000) 对澳大利亚淡水虾 *Paratya australiensis* 的研究中指出, 强烈的地质活动引起的沿海和内陆水系的演化可能对其种群的分化具有重要作用; Perdices 等 (2005) 通过对分布于中国三个主要水系的鲤科鱼类马口鱼 (*Opsariichthys bidens*) 的研究, 提出长江与珍珠河水系曾经有过近期的河道联系; Guo 等 (2005) 在中国鲃科 (sisorid catfishes) 鱼类的研究中提出雅鲁藏布江与伊洛瓦底水系之间可能有过河道的连通, 但是随着藏东地区地质事件的变迁, 该联系可能在中新世期间被中断, 此结果与现有的地质资料相一致。Cook 等 (2006) 构建了 *Troglocaris* 属的种间系统发育关系, 通过分子钟估计等方法阐明巴尔干半岛与高加索地区曾经在近期发生过联系; 近几年, 以中国科学院武汉水生所何舜平研究员领导的研究小组以及中国科学院昆明动物所张亚平院士的研究小组利用高原特有鱼类的分子系统地理学研究在阐述青藏高原生物

类群演化与青藏高原隆升和水系发育之间的关系方面进行了有效尝试（何德奎等，2003；Xiao et al.，2005），为进一步确定青藏高原隆升时间和水系演化关系提供了分子依据。

裸裂尻鱼属（*Schizopygopsis*）是由 Steindachner 于 1866 年建立，是裂腹鱼亚科鱼类的一个广布属，分布于青藏高原主要水系，其栖息地涵盖 1300～5200 m 的不同海拔梯度，被认为是裂腹鱼亚科鱼类中研究物种进化与青藏高原隆升之间关系的理想属。根据 Steindachner（1866）的描述，身体几乎裸露无鳞、下颌具有角质前缘和无须是该属的典型特征。曹文宣（1964）通过对外形特征的比较研究，首次提出该属包括 6 个种，即高原裸裂尻鱼（*Schizopygopsis stoliczkae*；Steindachner 1866）、柴达木裸裂尻鱼（*Schizopygopsis kessleri*；Herzenstein 1891）、黄河裸裂尻鱼（*Schizopygopsis pylzovi*；Kessler 1876）、软刺裸裂尻鱼（*Schizopygopsis malacanthus*；Herzenstein 1891）、热裸裂尻鱼（*Schizopygopsis thermalis*；Herzenstein 1891）、嘉陵裸裂尻鱼（*Schizopygopsis kialingensis*；Tsao & Tun 1962）和软刺裸裂尻鱼的一个亚种大渡软刺裸裂尻鱼（*Schizopygopsis malacanthus chengi*；Fang 1936）。之后，武云飞和吴翠珍（1991）通过 12 个主要形态和解剖特征构建了裸裂尻鱼属鱼类的种间系统发育关系，并对该属的分类重新做了修正。他们将 *Herzensteinia* 的赫氏小头鱼（*Herzenstein microcephalus*；Herzenstein 1891）视为小头裸裂尻鱼（*Schizopygopsis microcephalus*）纳入到本属；将大渡软刺裸裂尻鱼（*Schizopygopsis malacanthus chengi*）提升为独立种大渡裸裂尻鱼（*Schizopygopsis chengi*）；将柴达木裸裂尻鱼视为黄河裸裂尻鱼的同物异名而合并到其中，并加入了一新种前腹裸裂尻鱼（*Schizopygopsis anteroventris*；Wu, Tsao, Zhu & Chen 1979）和一指名种拉萨裸裂尻鱼（*Schizopygopsis younghusbandi*；Regan 1905），因此，共确定了 9 个种。在系统发育分析中，他们将这 9 个种分为 4 个族群（图 2-6）：①仅包括嘉陵裸裂尻鱼，以下颌具有狭窄而纤细的角质前缘和狭窄的下咽骨为主要特征，栖息水系海拔 2000～3000 m；②包括黄河裸裂尻鱼、大渡裸裂尻鱼和软刺裸裂尻鱼，以下颌具有宽平的角质前缘、宽阔的下咽骨和第一鳃耙弓耙数大于 16 为主要特征，栖息水系海拔 2000～4000 m；③包括前腹裸裂尻鱼、拉萨裸裂尻鱼和热裸裂尻鱼，以下颌具有宽平的角质前缘、较宽阔的下咽骨和第一鳃耙弓耙数小于 14 为主要特征，栖息水系海拔 3000～5000 m；④包括高原裸裂尻鱼和小头裸裂尻鱼，以下颌具有宽阔的角质前缘、极宽阔的下咽骨为主要特征，栖息水系海拔 3500～5500 m。在他们的研究中，嘉陵裸裂尻鱼由于保留有诸多祖征被认为是该属的最原始种，置于系统发育树的基底部，而高原裸裂尻鱼和小头裸裂尻鱼因具有诸多特化性状而被认为是该属的特化级物种，置于系统发育树的顶部。

然而，在近期研究中，陈毅峰和曹文宣（2000）将高原赫氏鱼（*Herzenstein microcephalus*）从裸裂尻鱼属中划出，再次恢复了赫氏鱼属（*Herzenstein*; Chu 1935），并且鉴于柴达木裸裂尻鱼（*Schizopygopsis kessleri*）个体性状的多变性将其重新界定为独立种柴达木裸裂尻鱼，同时，将大渡裸裂尻鱼作为亚种归到软刺裸裂尻鱼；将先前被武云飞和吴翠珍（1991）界定为小头裸裂尻鱼的亚种的纳木错小头裸裂尻鱼（*Schizopygopsis microcephalus namensis*; Wu & Ren 1982）视为独立种归入到裸鲤属（*Gymncypris*; Günther 1868）中。另外，本分类体系中，并未提及分布于澜沧江上游干流水系的裸裂尻鱼属鱼类，似乎又否定了前腹裸裂尻鱼（*Schizopygopsis anteroventris*）种名的有效性。鉴此，陈毅峰和曹文宣（2000）重新修正的裸裂尻鱼属仅包括 7 个种，即高原裸裂尻鱼、柴达木裸裂尻鱼、黄河裸裂尻鱼、软刺裸裂尻鱼、热裸裂尻鱼、拉萨裸裂尻鱼和嘉陵裸裂尻鱼。

以往研究通过形态和解剖特征的比较分析为确定裸裂尻鱼属鱼类的分类学地位和揭示种间系统发育关系提供了很有价值的信息。但是，由于受模糊特征及分析性状数量等的限制，始终未能妥善地解决裸裂尻鱼属鱼类在分类学中存在的争议。因此，寻找一种实际可行的方法，重新评价裸裂尻鱼属鱼类物种的分类学地位，探讨种间系统发育关系，揭示裸裂尻属物种起源、分化、扩散与青藏高原地质变迁和水系演化之间的关系，具有重大意义。现代分子生物学的飞速发展、基因测序的方便快捷为我们提供了这种可能。这种方法的应用会有效地降低趋同进化性状在物种分类、系统发育研究中的影响，从而能揭示物种演化过程（Nei & Kumar, 2000）。

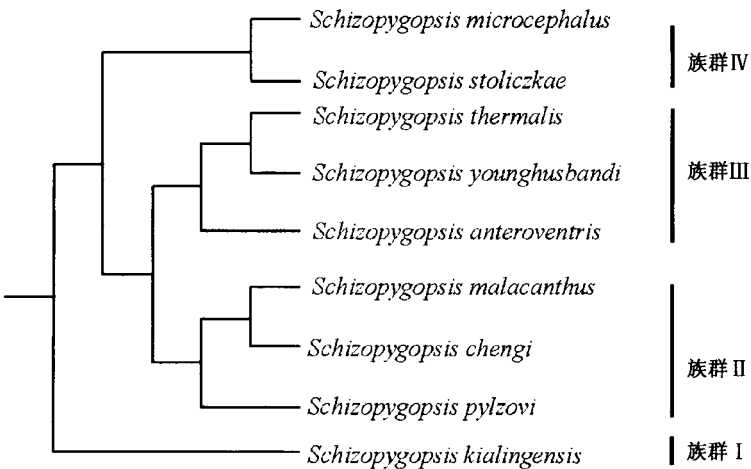


图 2-6 基于 12 个形态和解剖特征构建的裸裂尻鱼属 9 个种的系统发育关系图（武云飞和吴翠珍，1991）

本节以裸裂尻鱼属鱼类和分类中存在争议的物种,以及其他亲缘属的若干种为材料,通过 Cyt *b* 基因全序列的测序,检测武云飞和吴翠珍(1991)提出的裸裂尻鱼属鱼类的种间系统发育关系,解决若干种的分类学地位,同时,借助系统发育树、分子钟估计和扩散-隔离分析的联合使用,探讨裸裂尻鱼属鱼类物种起源、分化、扩散等与青藏高原隆升和高原水系演化之间的关系,确定扩散或隔离事件在裸裂尻鱼属鱼类演化过程中的作用。

1 样品采集

一直以来裸裂尻鱼属鱼类的分类存在较大的争议,因此,本节中标本鉴定在使用陈毅峰和曹文宣(2000)的检索系统的基础上,又参考武云飞和吴翠珍(1991)提出的检索系统。研究样品包括所有存在争议的种和陈毅峰和曹文宣(2000)所废弃的种。共采集 31 个个体,包括裸裂尻鱼属鱼类的 10 个种(*Schizopygopsis kessleri*、*Schizopygopsis pylzovi*、*Schizopygopsis malacanthus*、*Schizopygopsis chengi*、*Schizopygopsis thermalis*、*Schizopygopsis younghusbandi*、*Schizopygopsis anteroventris*、*Schizopygopsis kialingensis*、*Herzenstein microcephalus*、*Gymncypris namensis*)和 2 个亚种(*Schizopygopsis younghusbandi wui*、*Schizopygopsis younghusbandi himalayensis*) (表 2-6 和图 2-7)。所采集样品的分布地涵盖了青藏高原的主要水系,包括黄河、湟水河、澜沧江、岷江、雅砻江、大渡河、金沙江、雅鲁藏布江、纳木错湖、托素湖及柴达木盆地的格尔木河和托素湖。

黄河裸裂尻鱼(*S. pylzovi*)在青藏高原分布较为广泛,并且不同栖息地种群间存在较大的形态差异,为了进一步澄清各种群间的遗传差异和系统发育关系,本节中实施了多种群多样本采集(表 2-6 和图 2-7)。澜沧裂腹鱼(*Schizothorax lantsangensis*)以及裂腹鱼亚科鱼类(*Schizothoracinae*)中与裸裂尻鱼属鱼类亲缘关系相近的其他 5 属共 6 个种[厚唇裸重唇鱼(*Gymnodiptychus pachycheilus*)、尖裸鲤(*Oxygymnocypris stewartii*)、花斑裸鲤(*Gymnocypris eckloni*)、青海湖裸鲤(*Gymnocypris przewalskii*)、极边扁咽齿鱼(*Platypharodon extremus*)]和 1 个亚种青海湖裸鲤甘子河亚种(*Gymnocypris przewalskii ganzihonensis*)的鱼类选作外群,它们作为多外群策略的目的在于,一方面可以避免不适当外群选择带来的麻烦,另一方面可以验证裸裂尻鱼属鱼类是否形成单系群体。由于采样困难,本节的研究对象不包括高原裸裂尻鱼(*Schizopygopsis stoliczkai*)。

野外采样时,样品取自背鳍侧方肌肉,暂时保存于-20℃车载冰箱中或 95%的乙醇中,实验后统一用 95%乙醇固定,保存于青海省鱼类环境监测站。

表 2-6 裸裂尻鱼属鱼类及其相关种采样信息和 GenBank 登录号

物种	命名人和年份	采集地点(样本量)	水系	单倍型	标本编号	GenBank 登录号
嘉陵裸裂尻鱼 <i>Schizopygopsis kialingensis</i>	Tsao & Tun 1962	四川郎木寺(1)	金沙江	<i>S. kialingensis</i>	200480	DQ646888
黄河裸裂尻鱼 <i>S. pylzovi</i>	Kessler 1876	青海玛多(2)	扎陵湖	<i>S. pylzovi</i> ZL	200335-36	DQ646897
		青海玛多(1)	托索湖	<i>S. pylzovi</i> TS	200332	DQ646896
		青海大通(2)	湟水河	<i>S. pylzovi</i> DT	200473-74	DQ646905
		青海互助(2)	湟水河	<i>S. pylzovi</i> HZ1-2	200469-70	DQ646904, 09
		青海乐都(2)	湟水河	<i>S. pylzovi</i> LD1-2	200476-77	DQ646907-08
		青海海晏(1)	湟水河	<i>S. pylzovi</i> HY	200478	DQ646906
柴达木裸裂尻鱼 <i>S. kessleri</i>	Herzenstein 1891	青海柴达木盆地(3)	托素湖	<i>S. kessleri</i> T1-3	200343-45	DQ646911-13
		青海柴达木盆地(4)	格尔木河	<i>S. kessleri</i> G1-2	200339-42	DQ646902-03
软刺裸裂尻鱼 <i>S. malacanthus</i>	Herzenstein 1891	青海称多(2)	雅砻江	<i>S. malacanthus</i> Z1-2	200467-68	DQ646898-99
		青海称多(1)	清水河	<i>S. malacanthus</i> QS	200466	DQ646900
大渡裸裂尻鱼 <i>S. chengi</i>	Fang 1936	青海班玛(2)	大渡河	<i>S. chengi</i> 1-2	200471-72	DQ646890, 910
前腹裸裂尻鱼 <i>S. anteroventris</i>	Wu, Tsao, Zhu & Chen 1979	青海杂多(1)	澜沧江	<i>S. anteroventris</i> 1	200461	DQ646901
拉萨裸裂尻鱼 <i>S. younghusbandi</i>	Regan 1905	西藏拉萨(4)	雅鲁藏布江	<i>S. younghusbandi</i> 1-3	200462-65	DQ646893-95
拉萨裸裂尻鱼昂仁亚种 <i>S. younghusbandi ruui</i>	Wu, Tsao, Chen & Zhu 1979	西藏昂仁金湖(1)	昂仁金湖	<i>S. younghusbandi ruui</i>	200460	DQ646891
拉萨裸裂尻鱼喜马拉雅亚种 <i>S. younghusbandi himala-yensis</i>	Tsao 1974	西藏定日(1)	明曲	<i>S. younghusbandi hima-la-yensis</i>	200459	DQ646892

续表

物种	命名人 and 年份	采集地点(样本量)	水系	单倍型	标本编号	GenBank 登录号
热裸裂尻鱼 <i>S. thermalis</i>	Herzenstein 1891	青海唐古拉(1)	怒江	<i>S. thermalis</i>	200479	DQ646911
高原赫氏鱼 <i>Herzensteinia microcephalus</i>	Herzenstein 1891	青海格尔木(3)	金沙江	<i>H. microcephalus</i>	200418-20	DQ309354, 56, 57
澜沧裂腹鱼 <i>Schizothorax lantsangensis</i>	Tsao 1964	青海杂多(1)	澜沧江	<i>Schizothorax lantsangensis</i>	200431	DQ646882
厚唇裸重唇鱼 <i>Gymnodiptychus pachycheilus</i>	Herzenstein 1892	青海兴海(1)	黄河	<i>Gymnodiptychus pachycheilus</i>	200342	DQ646883
尖裸鲤 <i>Oxygymnocypris stewartii</i>	Lloyd 1908	西藏拉萨(1)	拉萨河	<i>O. stewartii</i>	200458	DQ646884
花斑裸鲤 <i>Gymnocypris eckloni</i>	Herzenstein 1891	青海玛多(1)	扎陵湖	<i>G. eckloni</i>	200348	DQ646885
青海湖裸鲤 <i>G. przewalskii</i>	Kessler 1876	青海共和(1)	青海湖	<i>G. przewalskii</i>	200349	DQ646886
青海湖裸鲤 甘子河亚种 <i>G. przewalskii ganzihonensis</i>	G. Zhu & Wu 1982	青海海晏(1)	甘子河	<i>G. przewalskii ganzihonensis</i>	200351	DQ646887
纳木错裸鲤 <i>G. namensis</i>	Wu & Ren 1982	西藏拉萨(1)	纳木错湖	<i>G. namensis</i>	200417	DQ309353
极边扁咽齿鱼 <i>Platypharodon extremus</i>	Herzenstein 1891	青海兴海(1)	黄河	<i>P. extremus</i>	200360	DQ646889

标本编号: 表示保存于青海省渔业环境监测站标本室的证据标本号。

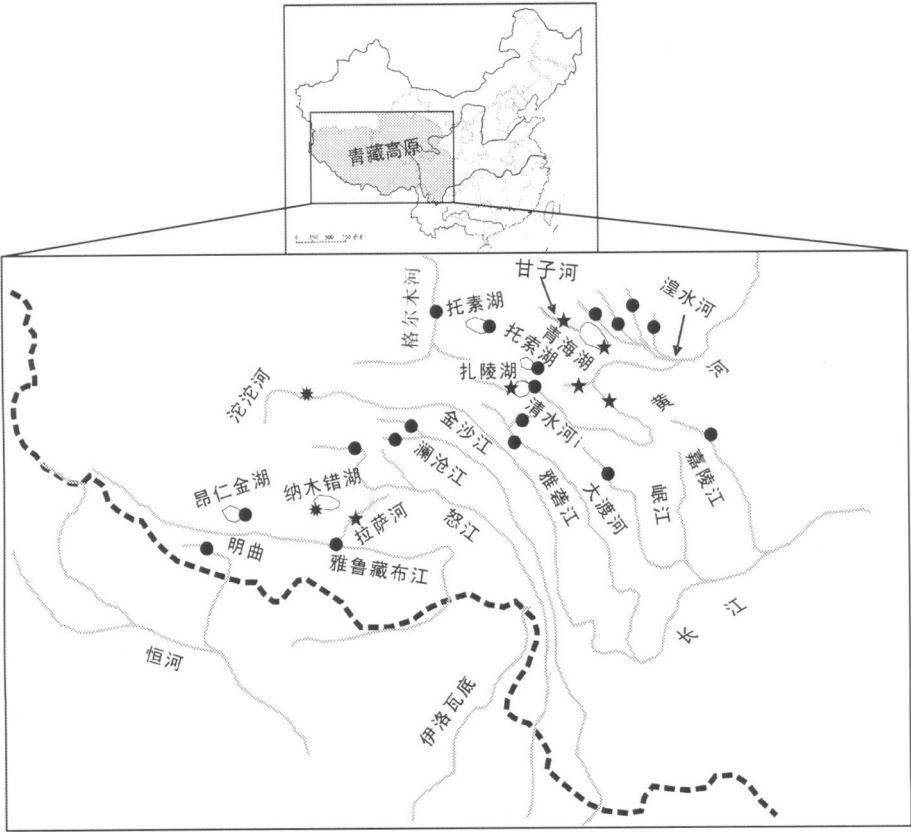


图 2-7 裸裂尻鱼属鱼类及其相关种的采集地点
●裸裂尻鱼属鱼类；★小头裸裂尻鱼和纳木错裸裡；★外群

2 线粒体 DNA 细胞色素 *b* 基因扩增及测序

方法同第二节。

3 数据处理

3.1 序列比对和序列特征分析

方法同第二节。

3.2 构建系统发育树

利用 PAUP* 4.0b10 和 Mr Bayes 3.0b4 软件分别构建最大似然树、最大简约树、邻接树和贝叶斯系统发育树。

在 ML 分析中, 采用 Modeltest 3.06 所确定的最适模型, 选择启发式搜索算法和简单叠加序列及 TBR 分支交换选项构建进化树。

在 MP 分析中, 使用启发式搜索算法和逐步随机叠加序列 (random-addition-sequence) 及 TBR 分支交换选项构建进化树。NJ 分析仍采用 Modeltest 3.06 所确定的最适模型的参数设置。由于 MrBayes 3.0 中无法补充最适模型, 因此贝叶斯分析采用常用模型 GTR+I+ Γ 。同时应用自举检验 (bootstrap test) 估计系统树中节点的支持率, ML、MP 和 NJ 重复次数分别为 100、1000 和 1000 次。为了验证裸裂尻鱼属鱼类的形态特征的进化趋势假设, 以及探讨主要外形特征在裸裂尻鱼属鱼类中的分类学价值, 研究中对主要形态特征 (下颌角质性状和咽骨性状) 进行了分子系统树的标记。

3.3 分子钟估计

估计物种间分化时间之前, 首先利用 Puzzle version 4.0.1 (Strimmer & von Haeseler, 1996) 软件进行分子钟约束和未约束系统发育树的似然率检验, 以确保即将进行分子钟估计的各物种在该基因的进化中具有相同的碱基替换率 (匀速)。假如似然率检验结果不否定无效假设, 则认为参与分子钟估计的物种在该基因的进化中具有相同的碱基替换率, 可直接进行分化时间的估计; 反之, 要进一步检测引起碱基替换率异质的序列。由于 Puzzle version 4.0.1 软件无法具体确定引起碱基替换率异质的序列, 因此本节又利用 Phyltest (Kumar, 1996) 软件进行基于 Kimura's (1980) 距离的二簇检验 (two-cluster test; Takezaki et al., 1995), 抛弃碱基替换率差异显著大或小 ($P < 5\%$) 的序列。剩余序列经 Modeltest 3.06 程序重新确定最适模型, 并用 PAUP* v4.0b10 构建具有分子钟约束的 ML 系统发育树, 其枝长将用于估计物种间的分化时间。

3.4 扩散-隔离分析

目前, 扩散-隔离事件分析 (dispersal-vicariance analysis, DIVA) 是一种全新的生物地理学推理方法。DIVA 通过简单的生物地理模式重建物种的祖先分布区域和确定扩散或隔离事件在物种形成过程中的作用, 在分析中通常无需考虑物种分布域的关系。通过优化方案, DIVA 以简单的隔离模型能重建物种的祖先分布区域, 同时允许扩散、复制 (同域成种) 和物种灭绝事件的发生 (Ronquist, 1997)。在 DIVA 分析中, 隔离事件赋值为 0, 而扩散和灭绝事件每增减一个地理单元赋值 1 (Ronquist, 1996), 这是因为扩散和灭绝事件是不可预知的, 可能会掩盖受系统发育约束的事件, 如隔离分化事件或复制事件 (Sanmartín, 2003)。与传统的生物地理分析策略相比较, DIVA 具有许多优点 (Ronquist, 1996), 比如, 无需物种分布区域形成关系的假设, 同时能够节省分析时间。但

是, DIVA 的缺点也不容忽视, 比如, 越接近根基节点时优化结果越不可靠; 分类层次越高 (如属间或科间), 则单一物种的分布域代表性受限制而结果越不可靠。当然, DIVA 也提供了相应的改善措施, 如引入外群或利用 DIVA 软件优化命令项 optimize 的 maxareas 选择项限制祖先分布域的最大地理单元数。然而, 第二个方案的应用可能会引发这样一个问题, 是否该类群鱼类已往的分布只局限于个别地理单元或哪个地理单元是该类群鱼类最有可能的祖先分布域? 考虑到裸裂尻鱼属鱼类不连续的地理分布格局以及其地理分布区域逐步萎缩的现状, 认为隔离事件可能在该属鱼类的物种分化中发挥了重要作用, 因此, 做出裸裂尻鱼属鱼类可能源自一个小区域或有一个起源中心的假设是不现实的 (Sanmartin, 2003)。鉴于此, 为了获得更可靠的根基节点分布域的优化结果, 本节采用第一种引入外群的方案以改善 DIVA 分析的不足。

本节裸裂尻鱼属鱼类分别被分配到 11 个地理单元 (水系): 伊洛瓦底江、怒江、澜沧江、雅鲁藏布江、金沙江、雅砻江、嘉陵江、大渡河、黄河、柴达木盆地、恒河。在 DIVA 分析中, 以该亚科近缘种澜沧裸裂尻鱼 (*Schizothorax lantsangensis*) 为外群, 致使分析物种的节点不长于外群所在的根基节点, 参数设置为: maxareas=11, bound=250, hold=32 767, weight=1.000, age=1.000。

4 结果

4.1 序列特征

Cyt *b* 基因总长度为 1140 bp, 其中有 371 个变异位点, 209 个简约性信息位点。信息位点最多的是第三位密码子 (175 个简约性信息位点), 第二位密码子次之 (27 个简约性信息位点), 而第一位密码子最少 (7 个简约性信息位点)。序列的碱基组成为 A=25.7%、T=30.7%、C=26.7% 和 G=16.9%, 表现出反 G 偏倚的线粒体基因组的典型特性 (Cantatore et al., 1994)。在外群与内类群间, 基于 Kimura 双参数 (Kimura 2-parameter) 的序列差异为 6.10% (*Platypharodon extremus* 与 *Schizopygopsis chengi* 2) 到 21.19% (*S. lantsangensis* 与 *S. pylzovi* HZ2)。内类群间序列差异变异范围为 0.09% (*S. kessleri* T1 与 *S. kessleri* T2) 到 5.53% (*S. anteroventris* 与 *S. pylzovi* HZ2)。

4.2 裸裂尻鱼属鱼类系统发育分析

通过似然率测验由 ModelTest 3.06 软件获得的最适分子进化模型为 TrN+G, 其参数设置如下: base = (0.2647 0.2896 0.1562), Nat = 6, Rmat = (1.0000 25.2244 1.0000 1.0000 7.7723), rate = gamma, shape = 0.2271, 和 Pinvar=0。该参数用于构建 NJ 和 ML 系统发育树。在 ML 分析中, 启发式搜索获

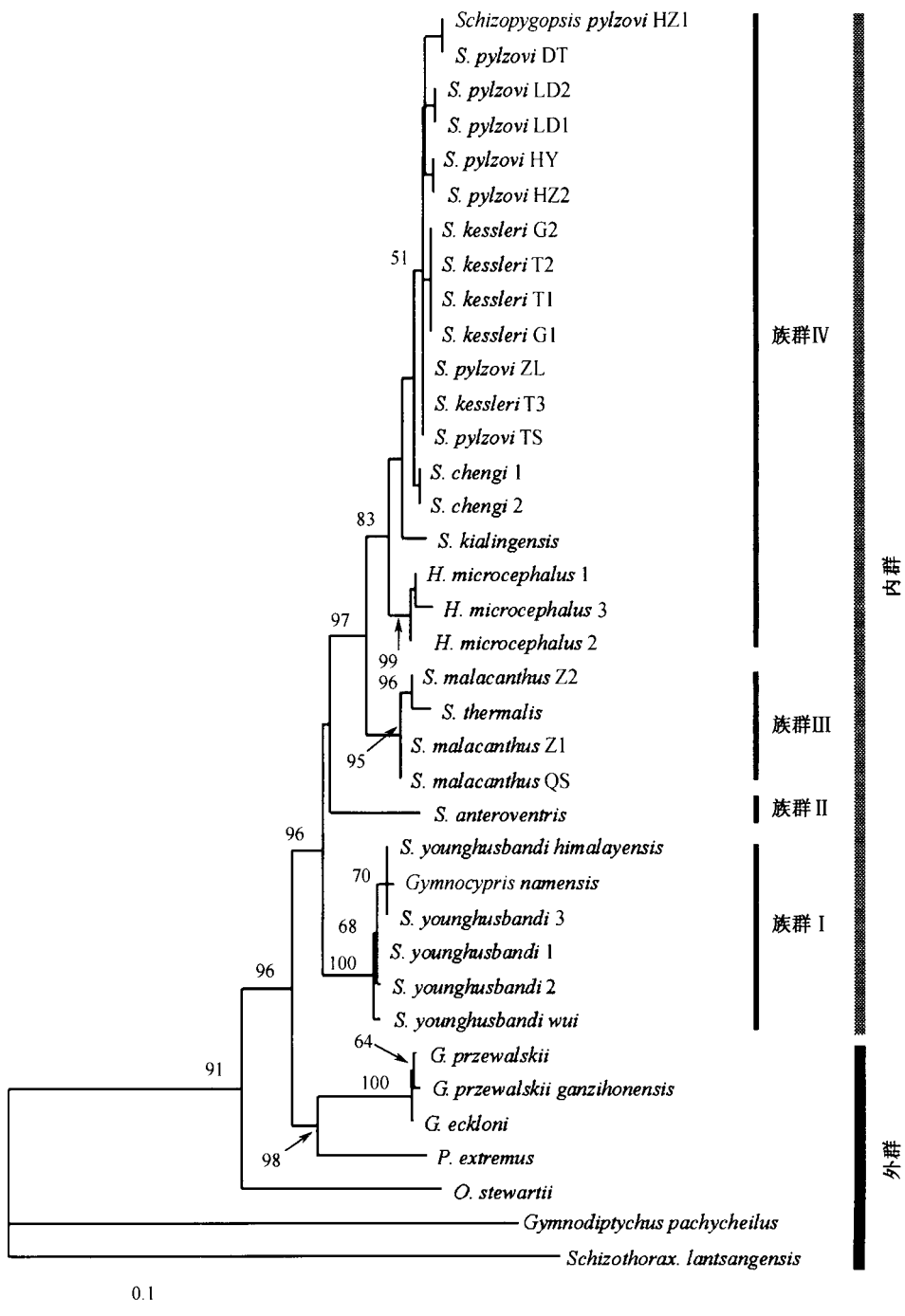


图 2-8 裸裂尻鱼属鱼类基于 Cyt b 基因构建的最大似然发育树

-ln L (unconstrained) = 3618.91。相关参数来自于 Modeltest 3.06 所确定的最佳模型 TrN+G，节点上数据表示 100 次重复的支持率（%，仅显示≥50%的值）

得唯一一棵最大似然树 (MLT), 其 loglikelihood ($-\ln L$) 值为 3618.91 (图 2-8)。在该拓扑结构中, 所有裸裂尻鱼属鱼类分成四个支持率较高的族群 (I、II、III 和 IV), 第一族群包括来自西藏的纳木错裸鲤 (*Gymnocypris namensis*)、拉萨裸裂尻鱼 (*Schizopygopsis younghusbandi*)、拉萨裸裂尻鱼昂仁亚种 (*S. younghusbandi wui*) 和拉萨裸裂尻鱼喜马拉雅亚种 (*S. younghusbandi himalayensis*) 共四个种及亚种; 第二族群只有前腹裸裂尻鱼 *S. anteroventris* 一个种, 该种仅分布在澜沧江上游干支流; 第三族群由软刺裸裂尻鱼 (*S. malacanthus*) 和热裸裂尻鱼 (*S. thermalis*) 两个种组成, 前者分布在雅砻江上游干流水系, 后者仅分布在怒江上游支流中; 第四族群包括 5 个种和亚种, 即高原赫氏鱼 (*Herzensteinia microcephalus*)、大渡裸裂尻鱼 (*Schizopygopsis chengi*)、嘉陵裸裂尻鱼 (*S. kialingensis*)、黄河裸裂尻鱼 (*S. pylzovi*) 和柴达木裸裂尻鱼 (*S. kessleri*), 该族群鱼类分布广泛, 其分布地涵盖青藏高原诸多水系 (如金沙江、嘉陵江、大渡河、柴达木水系、湟水河及黄河)。在裸裂尻鱼属鱼类四个族群中第一族群处于进化树的基底部, 其中拉萨裸裂尻鱼最为原始。

非加权简约化分析共获得 36 个等到的最大简约树 (MPT), 其树长 (tree length) 为 641, 一致性系数 (consistency index, CI) 0.5601, 存留系数 (retention index, RI) 0.7779, 同质性系数 (homoplasy index, HI) 0.4399。36 个 MP 的严格一致发育树与贝叶斯系统发育树和 NJ 具有相同的拓扑结构 (图 2-9)。与 ML 相似, 在 MP、NJ 和贝叶斯分析中同样获得了支持率较高的四个族群。所有的系统发育分析法都支持拉萨裸裂尻鱼在系统发育树中的基底部地位, MP、NJ、贝叶斯和 ML 系统发育树的不同之处表现在分支的支持率中。无论如何, 不同方法构建的系统发育树一致表明裸裂尻鱼属鱼类是一个单系群 (ML、MP、NJ 的支持率分别为 96%、89%、91%; PP=98%)。

图 2-9 表明, 在裸裂尻鱼属鱼类中被认为保持有祖先特征 (狭细的下颌角质和下咽骨) 的物种, 如嘉陵裸裂尻鱼并没有在分子系统发育树中处于较低的地位, 同样, 拥有宽平的下颌角质和下咽骨的物种也并不始终处于较高的位置。换言之, 这两个主要外形特征相同或相似的物种并不在分子系统树中聚在一起或形成单系群, 如, *S. younghusbandi*、*S. malacanthus* 和 *S. ohengi* 都具有相对适中的下咽骨, 但它们分别分布于族群 I、III 和 IV 中。

4.3 分歧时间估计

当包括所有 37 个序列时, 分子钟约束和未约束系统发育树的似然率检验否定了各物种碱基替换率相同的无效假设 ($-\ln L_{\text{nonclock}} = 4852.89$, $-\ln L_{\text{clock}} = 4961.70$, $\delta = 97.62$, $df = 35$, $P < 0.01$)。在这种情况下, 就要进行二簇检验 (two-cluster test), 找出与碱基替换率显著大和小 ($P < 0.05$) 的序列。根

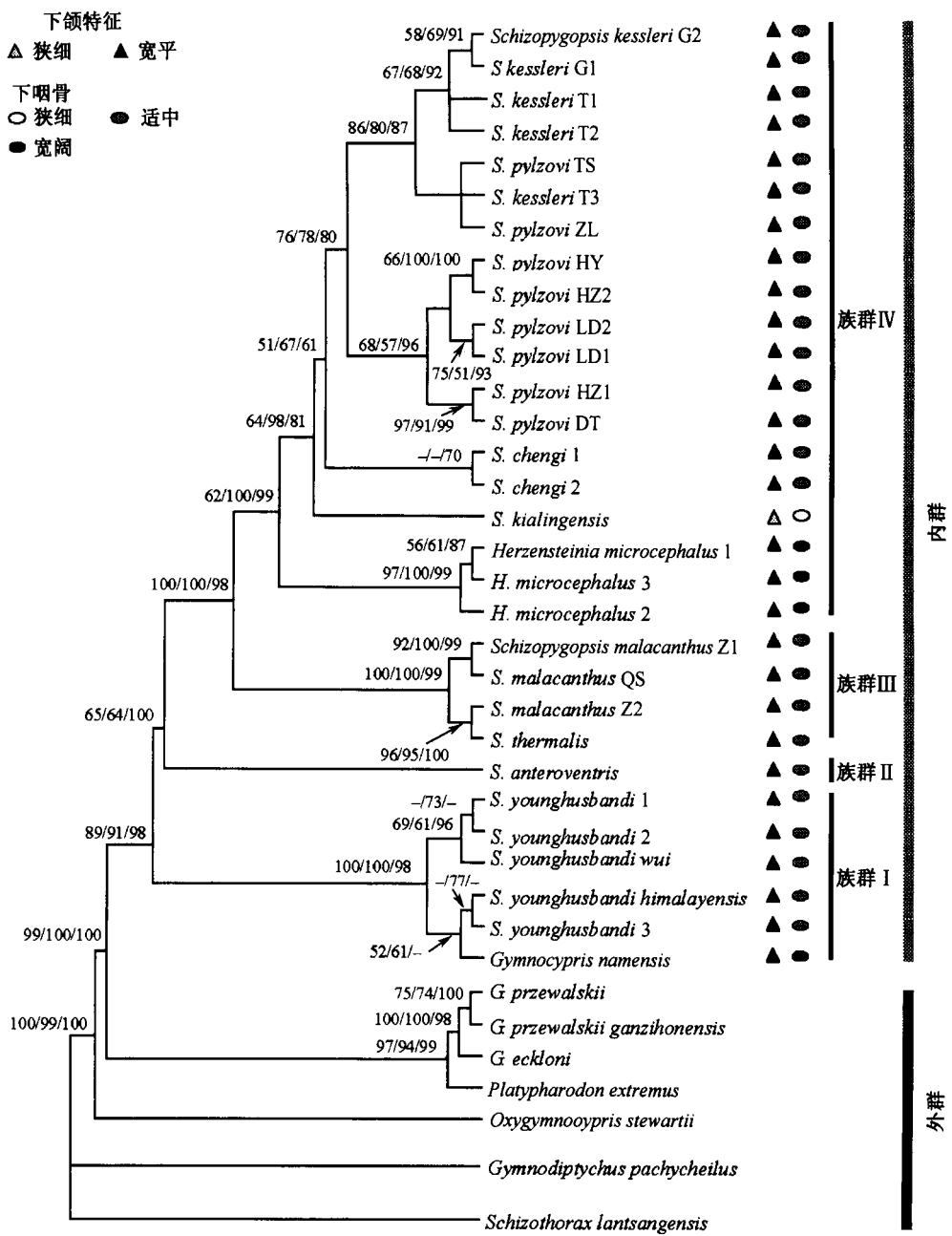


图 2-9 裸裂尻鱼属鱼类基于细胞色素 *b* 基因构建的最大简约树、贝叶斯和邻接系统发育树

图为 36 个等同最大简约树 (tree length=641, CI=0.5601, HI=0.4399, RI=0.7779, RC=0.5291) 的严格一致树; 基于常规模型 GTR+I+ Γ 的 50% 严格一致的贝叶斯系统发育树; 基于最佳模型 TrN+G 的邻接树。节点上数据从左到右依次为 MP、NJ 的 BP 值 (%) 和贝叶斯分析法的 PP 值 (%)。

“—” 表示该节点处统计数据低于 50%

据 Kimura (1980) 距离执行的二簇检验表明 8 个序列 (*Schizopygopsis lantsangensis*, *Gymnodiptychus pachycheilus*, *Platypharodon extremus*, *Schizopygopsis thermalis*, *S. malacanthus* Z2, *Herzensteinia microcephalus* 1, *H. microcephalus* 3 和 *Schizopygopsis kialingensis*) 表现出明显偏大或偏小的碱基替换率。当这 8 个序列被剔除后, 似然率检验不再否定无效假设 ($-\ln L_{\text{nonclock}} = 3515.90$, $-\ln L_{\text{clock}} = 3529.82$, $\delta = 27.84$, $df = 27$, $P = 0.4191$), 换言之, 各进化支间碱基替换率差异不显著, 此时可以估计分子钟。

由于至今没有关于裸裂尻鱼化石的报道, 本研究采用 $0.91\%/Ma$ 的分子钟进化速率估计主要分支的分化时间, 该分子钟标准由本亚科鱼类青海湖裸鲤和花斑裸鲤不同分布水系的地理隔离事件计算而得 (何德奎等, 2003)。结果表明, 青藏高原裸裂尻鱼属鱼类起源于 2.65 Ma 左右 (晚上新世), 而主要物种的形成发生于晚上新世至更新世期间 (1.60~0.17 Ma)。

4.4 扩散-隔离分析 (DIVA)

由于似然率检验表明最大似然法构建的树是最佳系统发育树, 因此本节以 ML 树的拓扑结构为基础, 进行裸裂尻鱼属鱼类的扩散-隔离事件分析。尽管 DIVA 无法获得未分叉的物种形成的准确信息, 如 *Schizopygopsis malacanthus* 和 *S. thermalis* 两物种的关系, 但是由于这两个物种的栖息水域分别只限于雅鲁藏布江和怒江水系, 而这两个物种的栖息水域并不与本节中其他物种的栖息水域存在地理重叠, 所以物种间的这种关系并不影响 DIVA 分析结果。通过 optimize 命令的 maxareas 选择项 DIVA 共搜索到 40 个理想祖先分布领域的组合 (图 2-10a), 每个重建需要 4 步扩散事件。进一步优化获得了图 2-10b 所示的祖先分布域, 当不考虑外群时, 其结果表明裸裂尻鱼属鱼类具有广泛的祖先分布域, 其祖先分布域涵盖除伊洛瓦底水系以外的所有主要的高原水系, 而栖息水域间只有两次扩散事件, 表明隔离事件在青藏高原裸裂尻鱼属鱼类的物种形成、分化及其现存地理分布格局中发挥了主导作用。

5 主要结论

通过裸裂尻鱼属鱼类种间系统发育关系的研究、分子钟的估计和扩散-隔离事件分析, 本节得出以下主要结论:

(1) 为确定大渡裸裂尻鱼 (*Schizopygopsis chengi*)、前腹裸裂尻鱼 (*S. anteroventris*)、柴达木裸裂尻鱼 (*S. kessleri*) 和纳木错裸鲤 (*Gymnocypris namensis*) 的分类学地位提供了遗传学证据。

(2) 裸裂尻鱼属鱼类是一个存在于自然界的单系群, 所有裸裂尻鱼属鱼类在系统发育树上形成四个支持率较高的族群, 第一族群包括来自西藏的纳木错裸鲤、

拉萨裸裂尻鱼 (*Schizopygopsis younghusbandi*)、拉萨裸裂尻鱼昂仁亚种 (*S. younghusbandi wui*) 和拉萨裸裂尻鱼喜马拉雅亚种 (*S. younghusbandi himalayensis*) 共 2 个种及 2 个亚种；第二族群只有前腹裸裂尻鱼一个种，该种仅分布在澜沧江上游干支流；第三族群由软刺裸裂尻鱼 (*S. malacanthus*) 和热裸裂尻鱼 (*S. thermalis*) 2 个种组成，前者分布在雅砻江上游干流水系，后者仅分布在怒江上游支流中；第四族群包括 5 个种和亚种，即高原赫氏鱼 (*Herzensteinia microcephalus*)、大渡裸裂尻鱼、嘉陵裸裂尻鱼 (*Schizopygopsis kialingensis*)、黄河裸裂尻鱼 (*S. pylzovi*) 和柴达木裸裂尻鱼，该族群鱼类分布广泛，其分布地涵盖青藏高原诸多水系（如金沙江、嘉陵江、大渡河、柴达木水系、湟水河及黄河）。在裸裂尻鱼属鱼类四个族群中第一族群处于进化树的基底部，其中拉萨裸裂尻鱼最为原始。

(3) 裸裂尻鱼属鱼类在长期的演化过程中发生了某些形态特征的趋同进化，利用这些性状进行分类学地位研究和构建系统发育关系要慎重。

(4) 本节所估计的裸裂尻鱼属鱼类的物种起源在 2.65 Ma 左右，对应于青藏运动 A 幕晚期，而主要物种的形成时间对应于青藏运动 C 幕，表明裸裂尻鱼

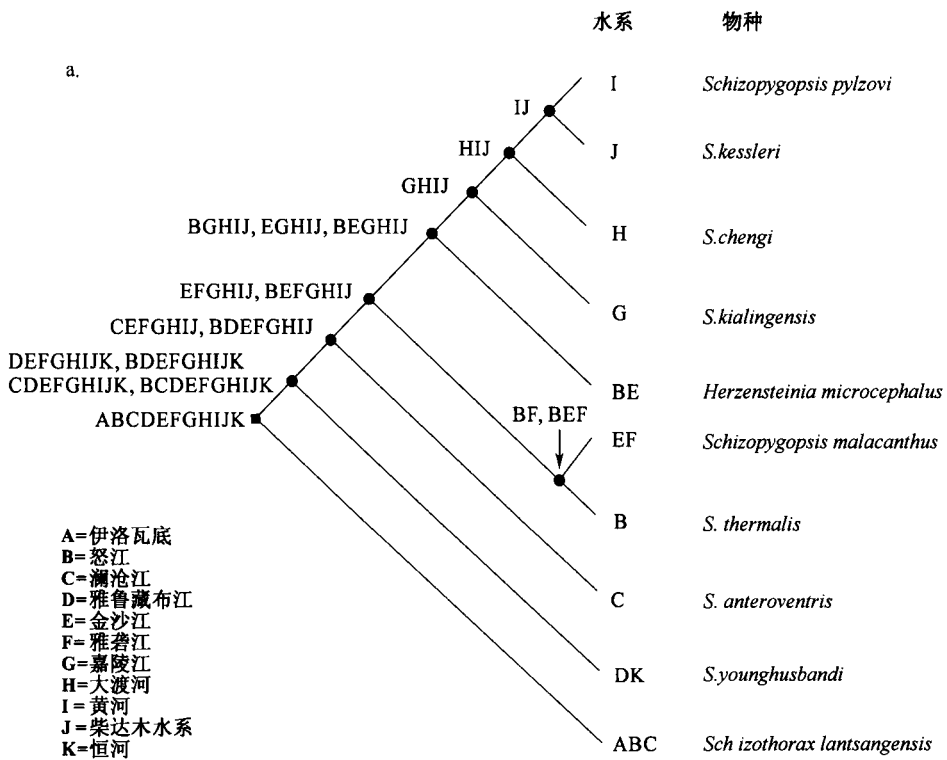


图 2-10 裸裂尻鱼属鱼类物种形成过程中扩散-隔离事件的分析

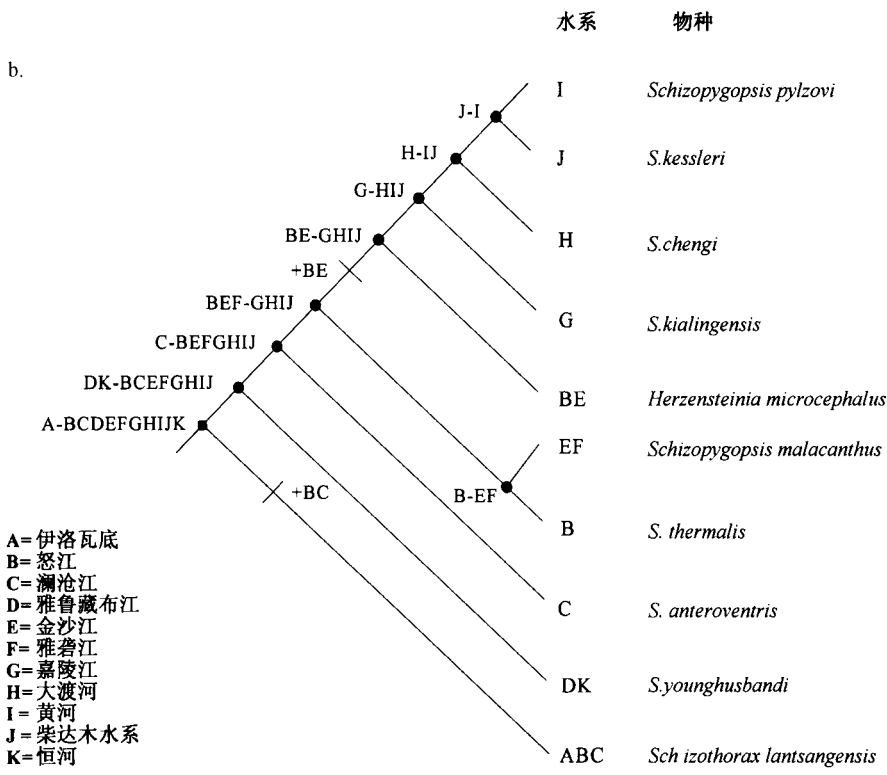


图 2-10 裸裂尻鱼属鱼类物种形成过程中扩散-隔离事件的分析（续）

a. 利用扩散-隔离法（DIVA）并引入外群重建的裸裂尻鱼属鱼类 40 个最优祖先分布域概况。每个节点前，显示了隔离事件前的最佳祖先分布域，等同分布域由逗号分开。分析显示裸裂尻鱼在物种形成过程中共发生 4 次隔离事件；b. 重建的裸裂尻鱼属鱼类生物地理发生过程。扩散事件显示在对应支上，每一扩散事件赋值为 1，隔离事件由“-”表示。该图显示裸裂尻鱼属鱼类具有较广的祖先分布域，且在较短的时间内引发了多数物种的形成

属鱼类的物种起源和分化等进化事件，可能与青藏高原自 3.6 Ma 前开始的强烈隆升所致的高原水系变迁和生态环境的变化有着密切的关系。

（5）裸裂尻鱼属鱼类目前离散的分布格局可能源自祖先广泛分布域的地理隔离，即在物种分化和形成中隔离事件发挥了主导作用，而并不是通过扩散来自于局限的起源中心。

第四节 黄河裸裂尻鱼的遗传多样性和种群历史结构

古气候环境的变迁必将对生物种群的演化产生深刻的影响，从而在现今种群的遗传多样性、种群结构、分布格局等方面遗留下历史的痕迹，通过研究现今种群的遗传多样性、种群结构和分布格局将会在一定程度上反映出气候环境的变迁

历史,因此,分子系统地理学的建立和发展为研究两者间的关系提供了一个绝好的机会,在阐明种群随之古气候环境变迁的演化方面具有重要意义(Hewitt, 1996, 2004; Pavlova et al., 2005; Zaccara et al., 2005)。淡水鱼类,受其栖息水系和迁移能力的限制,将是研究种群演化与古气候环境变迁间关系的一种理想材料(Murphy & Collier, 1996; Xiao et al., 2001; Hewitt, 2004)。青藏高原的强烈隆升,特别是中更新世以来的地质学事件对高原水系的演化和形成产生了深刻影响这一观点被研究者广为接受(李长安等, 1998, 1999; 朱筱敏等, 2003),由此所导致的栖息地的变更深刻影响了高原物种,特别是高原淡水鱼类种群的演化进程(曹文宣等, 1981; 武云飞和吴翠珍, 1991)。青藏高原东北部水系格局大约形成于15万年前“共和运动”期间(李长安等, 1999; 朱筱敏等, 2003),其中包括柴达木内流水系(格尔木河)与外流水系(黄河)的地理隔离及许多湖泊的形成(如托素湖和托索湖)。加之,更新世以来青藏高原一直处于干旱环境之下,分布于这些水系的淡水鱼类可能由此而出现种群隔离。在这种假设之下,即使是如今所分布的淡水鱼类也会反映出过去所建立的种内群体间的遗传结构(Avise, 1994)或可以检测到由于古气候环境变迁所致的种群分化。黄河裸裂尻鱼(*Schizopygopsis pylzovi*; Kessler 1876)是一种广泛分布于柴达木水系、黄河干支流和湟水河各支流的淡水鱼类,作为一个自然种群,它为我们研究种群演化与青藏高原水系变迁和气候环境变化的关系方面提供了绝好的机会。

黄河裸裂尻鱼食性杂,通常以浮游动植物或底栖动植物为食料,在青藏高原淡水生态系统的食物链中具有重要的地位。作为一种重要的渔业资源,其分布在地理上呈离散状,即局限于相互独立的水系中,如柴达木内流水系(格尔木河)、封闭湖泊(托素湖和托索湖)、黄河干支流及其湟水河各支流(南门峡河、大通北川河、海晏东大滩河和乐都黑水滩河)。尽管黄河裸裂尻鱼在局部地区资源量较丰富,但是由于受栖息地的破坏、繁育环境的改变、引入外来物种和疾病等因素的影响,近年来其种群数量锐减,栖息水域明显萎缩。

鉴于黄河裸裂尻鱼的生态重要性和当前的状况,青海省政府多次组织相关部门制定相应的种群恢复计划。但是,由于缺乏详尽的种群遗传信息,致使多年来保护部门只能依据形态学研究实施不太完善的管理措施。Herzenstein (1891)根据采自柴达木诺木洪的标本建立了柴达木裸裂尻鱼(*S. kessleri*)的种名,即柴达木裸裂尻鱼。曹文宣(1964)通过形态特征分析,支持Herzenstein的以上分类。但是,武云飞和吴翠珍(1991)利用12个主要形态和解剖特征构建了裂尻鱼属鱼类的系统发育关系,指出*S. kessleri*应该是黄河裸裂尻鱼(*S. pylzovi*)的同物异名。近期,陈毅峰和曹文宣(2000)再次恢复了*S. pylzovi*的种名,认

为该种在形态特征上所存在的变异是 *Schizopygopsis kessleri* 与 *Schizopygopsis pylzovi* 早期分化的结果。因此，基于以上未能完全界定的物种信息而制订的保护策略无法客观的保护鱼类的遗传多样性，从而会影响到保护策略的效率和物种的进化进程 (Alpers et al., 2004)。

本节中，我们通过对采自于青藏高原外流水系（黄河和湟水河各支流）、柴达木内流水系（格尔木河）、封闭湖泊（托素湖和托索湖）黄河裸裂尻鱼 mtD-NA Cyt *b* 基因测序，探讨不同水系裸裂尻鱼的分类学地位，分析其种群结构，阐明由于水系演化和古气候环境变迁而引起的种群间的遗传分化，并为制订该土著鱼类的保护策略提供遗传学依据。

1 样品采集

黄河裸裂尻鱼共 133 个个体，分别采集于 9 个样点。采集样点包括柴达木盆地内陆水系格尔木河（种群代码为 QG）和托素湖（QT）、外流水系黄河（YR）、湟水河（HD、HB、HH 和 HN）、扎陵湖（YZ）和托索湖（TU）（表 2-7 和图 2-11）。在构建系统发育树时，以采集于西藏拉萨河的尖裸鲤（*Oxygymnocypris stewartii*）和青海黄河的厚唇裸重唇鱼（*Gymnodiptychus pachycheilus*）作为外群。野外采样时，样品取自背鳍侧方肌肉或少许尾鳍，暂时保存于-20℃车载冰箱中或 95%的乙醇中，实验后统一用 95%乙醇固定，保存于青海省鱼类环境监测站。

表 2-7 青藏高原黄河裸裂尻鱼的采样点:采集地点(括号内数字为个种群样本量)、单倍型数目和水系

种群代码	采集地点(<i>n</i>)	采集湖河	单倍型数目	水系
QG	青海柴达木盆地(13)	格尔木河	7	柴达木内陆水系
QT	青海柴达木盆地(13)	托素湖	6	柴达木内陆水系
HB	青海大通(21)	北川河	15	湟水河
HD	青海海晏(23)	东大滩河	14	湟水河
HH	青海乐都(16)	黑水滩河	8	湟水河
HN	青海互助(18)	南门峡河	10	湟水河
YR	青海兴海(4)	黄河	3	黄河
YZ	青海玛多(12)	扎陵湖	6	黄河
TU	青海玛多(13)	托索湖	8	托索湖
外群	∑133		∑77	

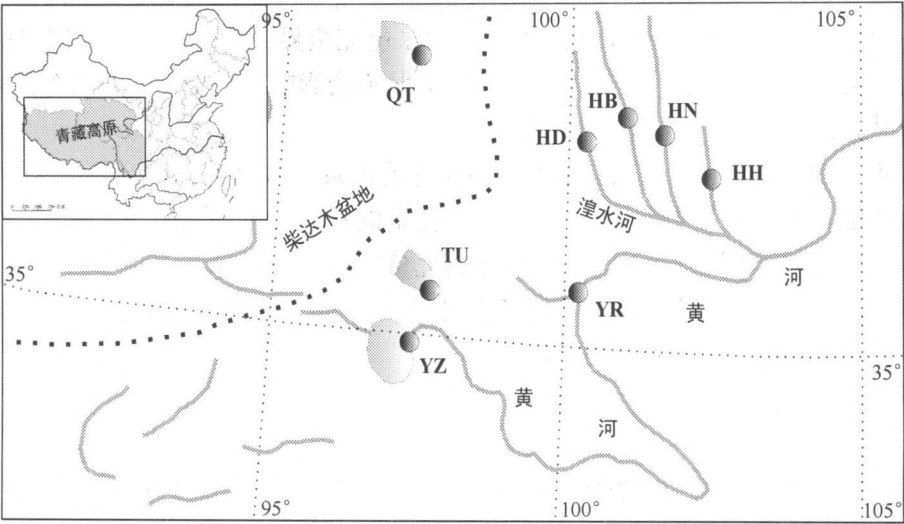


图 2-11 青藏高原黄河裸裂尻鱼采样点

虚线为柴达木盆地内流水系与外流水系的分界线；图中种群代码同表 2-7

2 实验方法（同第二节）

新测定序列 GenBank 登录号 DQ491113~DQ491191。

3 数据处理

3.1 遗传多样性及种群扩张分析

利用 Arlequin 2.0 软件进行中性选择假设的 Tajima's D (Schneider et al., 2000) 和 Fu (1997) 的 F_s 检验，两者置换数均为 10 000。同时运用该软件计算种群单倍型多样性 (haplotype diversity, h) (Nei, 1987)、核苷酸多样性 (nucleotide diversity, π) (Nei et al., 1989) 以及种群间的平均净遗传距离 (average pairwise difference, D_a)。公式如下：

单倍型多样性 (h)

$$h = \frac{n}{n-1} \left(1 - \sum_{i=1}^k p_i^2 \right)$$

其中， p_i 为第 i 种 DNA 序列在群体中的频率； n 为序列数。

核苷酸多样性 (π)

$$\pi_n = \frac{\sum_{i=1}^k \sum_{j<i}^k p_i p_j d_{ij}}{L}$$

其中, p_i 、 p_j 分别为第 i 、第 j 种 DNA 序列在群体中的频率; d_{ij} 为第 i 种与第 j 种序列之间在每个核苷酸位置上相异核苷酸平均概率; L 为序列长度。

$$D_a = p_i X Y - (p_i X + p_i Y) / 2$$

利用 Dna SP 3.0 (DNA sequence polymorphism) (Rozas, 1999) 软件分析种群扩张事件。种群扩张时间可由公式 $\tau = 2ut$ 计算而得, 公式中 u 表示碱基突变率, t 表示世代间隔 (Rogers & Harpending, 1992)。

3.2 构建系统发育树 (同第二节)

3.3 黄河裸裂尻鱼种群分子变异等级分析 (AMOVA)

黄河裸裂尻鱼水系间和水系内分子变异等级分析采用 AMOVA 方法由 ARELQUIN 2.0 软件 (Schneider et al., 2000) 完成。分析中采用两个等级, 一是根据分布水系不同将黄河裸裂尻鱼划分成四个地理组: ①柴达木盆地组, 包括格尔木河种群 (QG) 和托素湖种群 (QT); ②湟水河组, 包括来自大通北川河 (HB)、海晏东大滩河 (HD)、乐都黑水滩河 (HH) 和互助南门峡河 (HN) 四个种群; ③黄河组, 包括采集于扎陵湖 (YZ) 和黄河上游干流 (YR) 的两个种群; ④托素湖组, 仅包括来自托素湖 (TU) 的一个种群。二是根据陈毅峰和曹文宣 (2000) 提出的分类体系, 将来自柴达木盆地与其余外流水系及托素湖的种群视为两个独立种——柴达木裸裂尻鱼 (*Schizopygopsis kessleri*) 和黄河裸裂尻鱼 (*Schizopygopsis pylzovi*), 即划分成物种意义上的两个组: ①内陆水系组 (柴达木种群) 或 *Schizopygopsis kessleri* 组, 包括格尔木河种群 (QG) 和托素湖种群 (QT); ②外流水系组或 *Schizopygopsis pylzovi* 组, 包括所有剩余种群 (HB、HD、HH、HN、YZ、YR 和 TU)。这种预先指定的等级将产生 3 种分子变异变量: Φ_{ST} 是相对于整个物种的种群间统计量, Φ_{SC} 为同一组内种群间的统计量, Φ_{CT} 为不同组间的统计量, 所有统计量都接受排列测验法检验其显著性 (置换次数为 1000)。

3.4 嵌套进化支序系统地理分析

应用嵌套进化支序分析法 (nested clade phylogeographical analysis, NCPA) (Templeton, 1998) 探讨黄河裸裂尻鱼种群生物地理发生关系, 以便找出造成现今 mtDNA 变异分布格局的根本缘由。本节首先应用 TCS ver. 1.13 软件 (Clement et al., 2000) 以最大简约原则构建单倍型间 95% 可信度的网络关系图。然后按照 Crandall 和 Templeton (1993, 1998) 所提出的嵌套进化规则将所有末端单倍型 (tip haplotype) 与最近的内部单倍型 (internal haplotype) 连接起来, 形成 1-step 进化支。当所有相关的 1-step 进化支连起来后形成 2-step 进

化支，依次连接直到形成代表所有单倍型进化树的最高级别支序（total cladogram）。完成以上嵌套进化支序图的构建后，利用 GEODIS ver. 2.2 (Posada et al., 2000) 软件按其规则检测单倍型间和不同级别支序间的地理学联系。同时可以获得两个统计量—— D_c 和 D_n ，其中 D_c 称为支序距离（clade distance），代表一定条件下某个支序的地理学范围；而 D_n 称为嵌套支序距离（nested clade distance），是指某个支序相对于其最近姐妹进化支序的地理分布范围 (Templeton et al., 1995; Templeton, 1998)。通过这两个距离值，又能获得两个统计量—— $I-TD_c$ 和 $I-TD_n$ ，前者表示某个嵌套支序顶端进化支与内部进化支的支序距离的差额，后者则表示顶端进化支与内部进化支的嵌套支序距离的差额。所有 D_c 和 D_n 值经过显著性检验（置换数为 1000）后，就可采用 Templeton (2004) 所给出的推断方法（inference key）推断具有显著 D_c 或 D_n 值的支序的进化史。

4 结果

4.1 多态位点和遗传多样性

黄河裸裂尻鱼 133 个个体均扩增获得全长为 1140 bp 的 Cyt *b* 基因，共检测到 77 个单倍型（表 2-8）。在 1140 个位点中，有 83 个变异位点，37 个简约性位点。其中第三密码子位最具简约性信息（24 个简约性位点），第一密码子位次之（8 个简约性位点），第二密码子位最少（5 个简约性位点）。平均碱基组成为 A=25.5%、T=30.8%、C=26.7%、G=17.0%，表现出明显的反 G 偏倚特点。

遗传多样性分析显示，所有群体均具有较高的单倍型多样性，在 0.83~0.98 之间，而具有相对较低的核苷酸多样性，在 0.0018~0.0045 之间。各种群间平均碱基序列差异为 0.40%~0.91%（表 2-9）。

表 2-8 青藏高原黄河裸裂尻鱼 9 个种群 Cyt *b* 单倍型分布

单倍型	QG	QT	HB	HD	HH	HN	YR	YZ	TU
1	1								
2	1								
3	5								
4	3	4							
5	1								
6	1								
7	1								
8		1							
9		2							
10		2							

续表

单倍型	QG	QT	HB	HD	HH	HN	YR	YZ	TU
11		1							
12		2							
13		1							
14			2						
15			1						
16			1						
17			3	3		2			
18			1						
19			1						
20			1						
21			1						
22			4	4					
23			1						
24			1						
25			1						
26			1						
27			1						
28			1						
29				1					
30				1					
31				1					
32				1					
33				1					
34				1					
35				1					
36				1					
37				2					
38				1					
39				2					
40				1					
41				1					
42				1					
43					4				
44					3				

续表									
单倍型	QG	QT	HB	HD	HH	HN	YR	YZ	TU
45					2				
46					1				
47					1				
48					2				
49					2				
50					1				
51						5			
52						2			
53						1			
54						1			
55						1			
56						2			
57						1			
58						1			
59						1			
60						1			
61							1		
62							1		
63							2		
64								3	
65								1	
66								1	
67								1	
68								1	
69								1	
70									5
71									1
72									2
73									1
74									1
75									1
76									1
77									1
总计	13	13	21	23	16	18	4	12	13

表 2-9 青藏高原黄河裸裂尻鱼种群内核苷酸多样性($\pi \pm SD$, 对角线)、种群间平均距离(%, 上三角)、种群间两两 F_{ST} (下三角, * $P < 0.001$) 及种群内单倍型多样性($h \pm SD$)[#]

种群	QG	QT	HB	HD	HH	HN	YR	YZ	TU	单倍型多样性
QG	0.0018 $\pm$ 0.0012	0.40	0.54	0.47	0.86	0.71	0.52	0.55	0.62	0.83 $\pm$ 0.09
QT	0.1966*	0.0024 $\pm$ 0.0015	0.51	0.46	0.77	0.65	0.43	0.46	0.51	0.88 $\pm$ 0.06
HB	0.3241*	0.2216*	0.0041 $\pm$ 0.0023	0.47	0.76	0.58	0.60	0.68	0.70	0.98 $\pm$ 0.02
HD	0.3036*	0.2157*	0.0669*	0.0032 $\pm$ 0.0019	0.65	0.58	0.56	0.61	0.60	0.92 $\pm$ 0.04
HH	0.6150*	0.5431*	0.4327*	0.4283*	0.0041 $\pm$ 0.0024	0.73	0.87	0.91	0.75	0.90 $\pm$ 0.05
HN	0.4615*	0.3640*	0.1216*	0.2334*	0.3696*	0.0045 $\pm$ 0.0026	0.73	0.82	0.81	0.91 $\pm$ 0.05
YR	0.5477*	0.3681*	0.3452*	0.4175*	0.5578*	0.4008*	0.0031 $\pm$ 0.0023	0.60	0.63	0.83 $\pm$ 0.22
YZ	0.1942*	0.0666	0.2565*	0.2379*	0.5129*	0.3747*	0.3349*	0.0038 $\pm$ 0.0022	0.63	0.86 $\pm$ 0.09
TU	0.6286*	0.5098*	0.4994*	0.4978*	0.5278*	0.5300*	0.6131*	0.4512*	0.0021 $\pm$ 0.0013	0.85 $\pm$ 0.07

[#] 种群间平均序列距离由 Kimura 双参数模型计算而得。

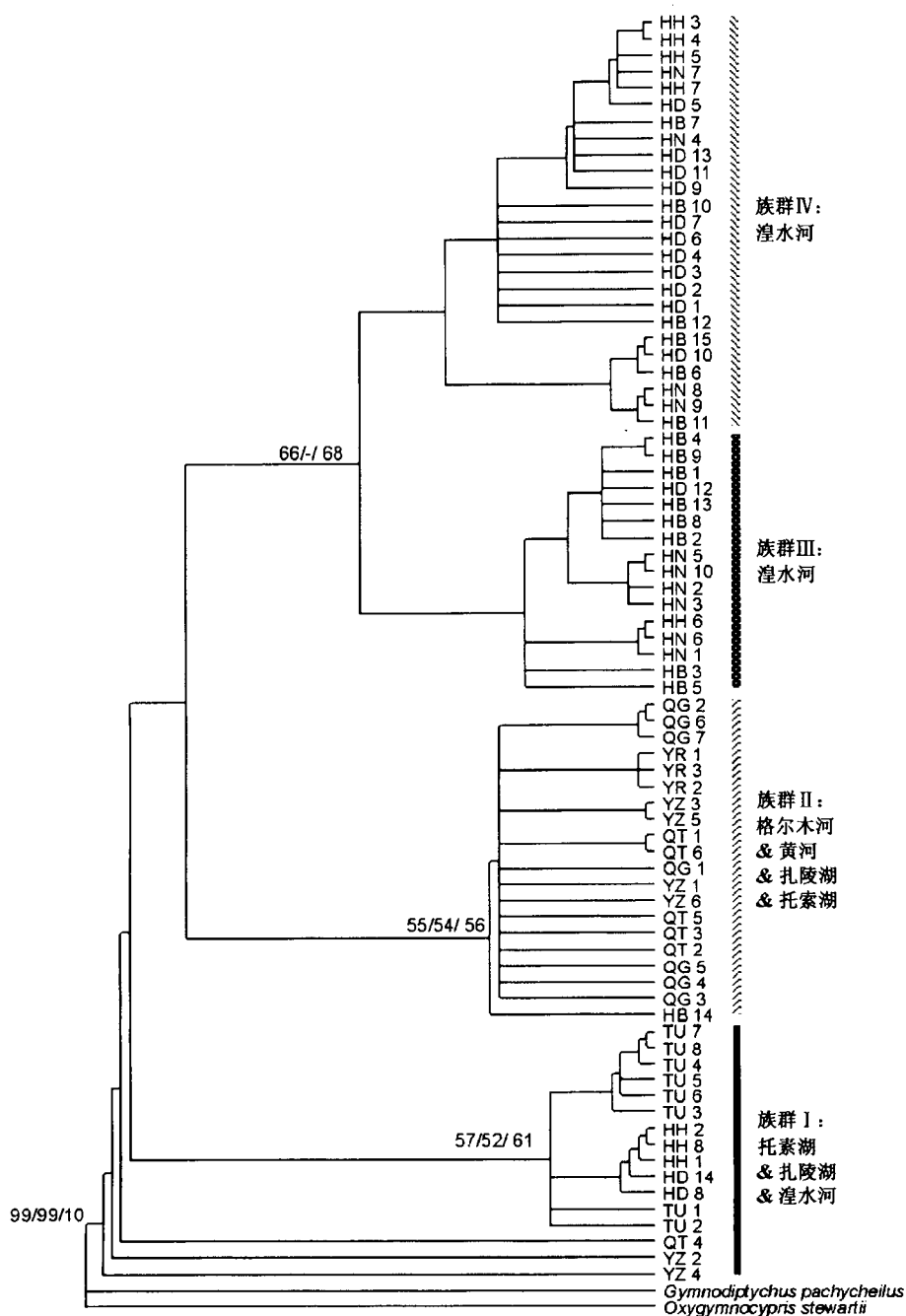
4.2 种群系统发育关系

利用 ModelTest 3.06 (Posada & Crandall, 1998) 软件通过似然率测试获得最佳分子进化模型为 TrN+I+G, 其相应参数设置如下: 碱基频率 ($A=0.2513$, $C=0.2697$, $G=0.1754$ 和 $T=0.3036$); 转换/颠换值为 29.8245; $\text{Pinvar}=0.7577$; $\text{shape}=1.0573$ 。NJ 和 ML 系统发育树的构建均采用以上参数。

三种方法 (MP、NJ 和 ML) 构建的系统发育树获得了大致相同的拓扑结构, 黄河裸裂尻鱼 77 个单倍型的系统发育关系显示在由 200 个等同最大简约树 ($\text{tree length}=347$, $\text{CI}=0.8530$, $\text{HI}=0.1470$, $\text{RI}=0.8223$, $\text{RC}=0.7014$) 获得的严格一致性进化树上 (图 2-12)。系统发育关系显示, 所有的黄河裸裂尻鱼形成四个主要族群, 但是所有分支的支持率相对较低。第一族群包括所有来自托素湖的单倍型 (TU)、5 个来自湟水河的单倍型 (HD 和 HH)、2 个来自扎陵湖的单倍型 (YZ) 和 1 个来自托素湖的单倍型 (QT)。第二族群由来自格尔木河的所有单倍型 (QG)、黄河的所有单倍型 (YR)、托素湖的 5 个单倍型 (QT) 和扎陵湖的 4 个单倍型 (YZ) 组成。第三和第四族群只有来自湟水河的单倍型 (HB、HD、HH 和 HN)。

4.3 种群结构

除托素湖种群与托素湖种群间的 F_{ST} 检验值不显著外, 其余各种群间两两成对的 F_{ST} 均为显著, 表明种群间存在一定程度的遗传差异。将所有种群不按水系或物种划分等级时, 种群分子变异分析显示黄河裸裂尻鱼 61.52% ($P<0.001$) 的变异来自于各种群内, 而只有 38.48% ($P<0.001$) 的变异来自于种群间。当根据分布水系不同将黄河裸裂尻鱼划分成四个地理组 (柴达木、湟水河、黄河、托素湖) 时 (表 2-10), 58.4% 的变异来自于各种群内 ($\Phi_{ST}=0.4185$, $P<0.001$), 同时水系内种群间 (24.6%; $\Phi_{SC}=0.2986$, $P<0.001$) 和水系间 (组间) (17.0%; $\Phi_{CT}=0.1709$, $P<0.05$) 的变异也是显著的。而当所有种群按物种分类或内外流水系划分成两个组时 (表 2-10), 其大部分变异来自于各种群内 (59.5%; $\Phi_{ST}=0.4051$, $P<0.001$), 水系间或物种间的差异只占有很小比例 (5.2%; $\Phi_{CT}=0.0517$, $P=0.172$), 同时水系内种群间再次表现出显著差异 (35.3%; $\Phi_{SC}=0.3727$, $P<0.001$), 表明黄河裸裂尻鱼种群显著的遗传差异是由水系内种群间或种群内的差异引起的, 而不是来自于内外流水系间或不同物种间的变异。



tree length=347, CI=0.8530, HI=0.1470, RI=0.8223, RC=0.7014。厚唇裸重唇鱼 (*Gymnodiptychus pachycheilus*) 和尖裸鲤 (*Oxygymnocypris stewartii*) 作为外群。该拓扑结构与邻接 (NJ) 和最大似然 (ML) 发育树基本相同。节点上数据从左到右依次为 MP、NJ 和 ML 树的支持率 (仅显示 ≥ 50)。单倍型名称以种群代码+数字表示

表 2-10 青藏高原黄河裸裂尻鱼 mtDNA 单倍型分子变异等级分析(AMOVA)

组群	变异来源	变异百分比/%	Φ 统计值	显著性检验 P
无物种划分	水系间	17.0	$\Phi_{CT}=0.1709$	0.025
	水系内种群间	24.6	$\Phi_{SC}=0.2986$	<0.001
	种群内	58.4	$\Phi_{ST}=0.4185$	<0.001
物种划分	种间	5.2	$\Phi_{CT}=0.0517$	0.172
	种内种群间	35.3	$\Phi_{SC}=0.3727$	<0.001
	种群内	59.5	$\Phi_{ST}=0.4051$	<0.001

4.4 嵌套进化支序分析

在嵌套进化支序分析中，黄河裸裂尻鱼 77 个单倍型共形成 42 个 1-step 进化支、17 个 2-step 进化支和 5 个 3-step 进化支，单倍型间这种嵌套关系基本与系统发育树相一致（图 2-13）。显著性检验显示 10 个不同级别的进化支与地理分布具有显著的联系，其中包括 1 个 1-step、4 个 2-step、4 个 3-step 和整体进化支序（表 2-11）。根据 Templeton 的推断方法，通过置换分析对所有显著支序确定了其进化模式，这些进化模式包括种群间基因交流受阻、毗邻分布域扩张以及种群逐步扩张伴随分布域的片段化（表 2-12）。在所有显著进化支序中，3 个 2-step（进化支 2—12，2—13，和 2—15）和 1 个 3-step（进化支 3—2）进化支序显示出由距离引起隔离或地理隔离抑制了种群间的基因交流。进化支序 2—17 和 3—1 由来自湟水河支流的个体组成，其推断结果为毗邻分布域扩张，暗示湟水河各支流分布的黄河裸裂尻鱼可能来自同一个主要分布中心，而青藏高原隆升过程中其地质地貌和水系格局的波动可能促进了黄河裸裂尻鱼在湟水河各支流间邻分布域的扩张。相同的毗邻分布域扩张模式也表现在进化支序 3—3 中，该支序主要来自于柴达木盆地托素湖、托素湖及其扎陵湖的个体组成，表明在过去某一时期柴达木内陆水系河湖可能与外流水系河湖有过暂时的通道。对应于整个进化支序的最为古老的事件则是种群逐步扩张伴随分布域的片段化，青藏高原的地质变迁及其水系格局的变化可能为高原鱼类种群扩张和分布领域的扩展发挥了极其重要的作用，同时现今水系格局和地理隔离也是青藏高原隆升事件的产物，致使已经扩散的鱼类发生分布域的片段化，造成种群间基因交流受阻，从而形成了本节中系统发育所示的四个主要族群（Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ和Ⅳ），并分布于内外流水系及其湖泊中。由于在支序 1—29 和 3—4 中未检测到显著的 D_c 和 D_n ，或无法判断其端部或内部支序而没有获得相关的进化模式。

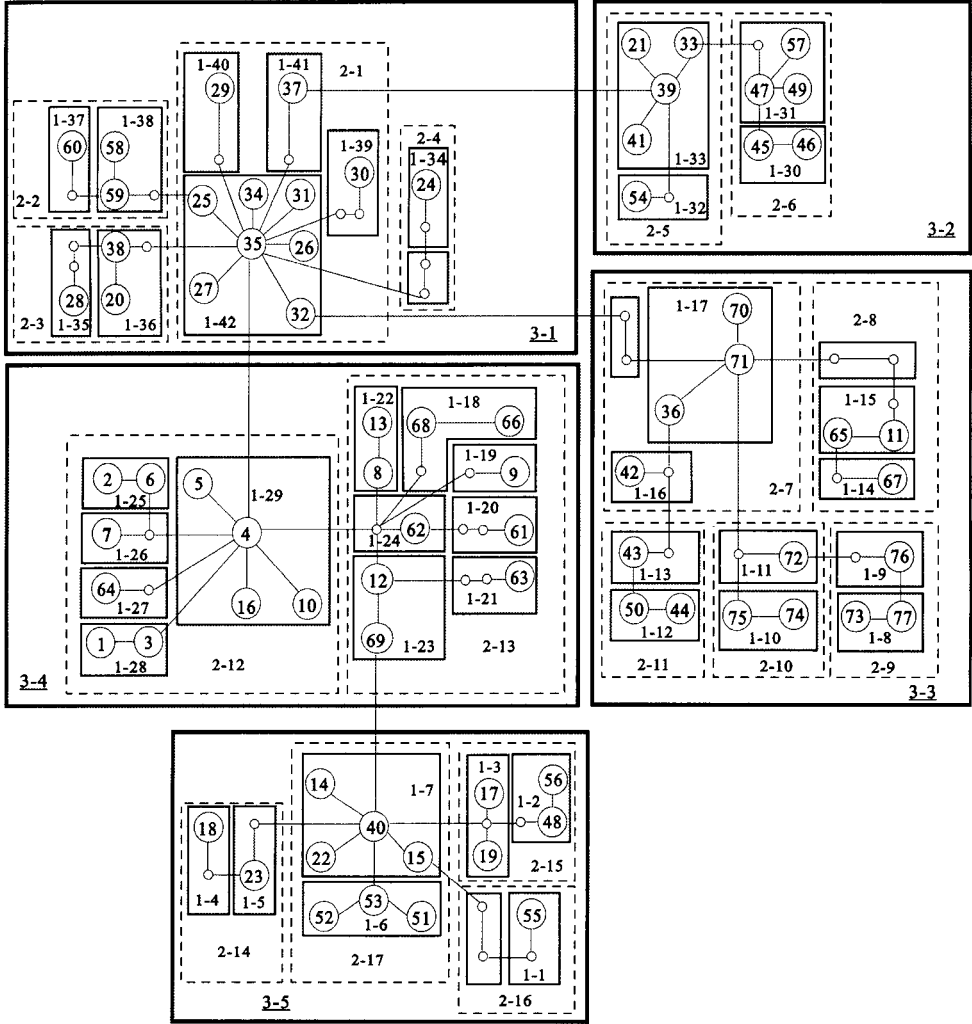


图 2-13 青藏高原黄河裸裂尻鱼 9 个种群基于细胞色素 *b* 基因的最大简约网络关系及其相应的嵌套支序设计

网络关系中每条短线代表一个碱基突变，空心小圈代表实际并未检测到的期望单倍型。圈内数字代表实际检测到的单倍型，同表 2-8。细线框内为 1-step 支序，虚线框内为 2-step 支序，最外层粗线框内为 3-step 支序，整个进化支序构成一个 4-step 支序

表 2-11 青藏高原黄河裸裂尻鱼基于细胞色素 *b* 基因的嵌套支序显著性分析
(无遗传或地理变异的支序不包括其中)

支序	卡方统计值	<i>P</i> 值
1—2	4.0	0.310
1—3	1.4	1.000
1—7	3.8	0.558
1—15	2.0	1.000
1—17	7.0	0.279
1—23	3.0	0.329
1—29	20.9	0.033
1—31	4.0	0.477
1—33	5.0	0.612
1—36	2.0	1.000
1—42	7.0	1.000
2—1	2.4	0.756
2—3	0.8	1.000
2—5	6.0	0.330
2—6	0.9	1.000
2—7	3.4	0.266
2—8	0.8	1.000
2—12	23.5	0.038
2—13	21.7	0.014
2—15	8.3	0.048
2—17	20.0	<0.001
3—1	21.8	0.002
3—2	11.0	0.002
3—3	55.5	<0.001
3—4	16.8	<0.001
3—5	9.1	0.381
整体进化支序	229.1	<0.001

注:黑体表示统计显著。

表 2-12 青藏高原黄河裸裂尻鱼基于细胞色素 *b* 基因的嵌套支序、*Dc*、*Dn*、*I-T Dc*、*I-T Dn* 以及推断结果(仅包含卡方检验显著的支序)

嵌套支序	支序	位置	支序距离 <i>Dc</i>	嵌套距离 <i>Dn</i>	推断结论
1—29	5	tip	0	168.9	1-2-11-17 否:无绝对结果
	10	tip	0	113.3	
	16	tip	0	445.2	
	4	interior	146.1	146.5	
		I-T	146.1	—63.7	
2—12	1-25	tip	0	115.6	1-2-3-4 否:由于距离或地理 隔离引起种群间基因交流 受阻
	1-26	interior	0	115.6	
	1-27	tip	0	169.7	
	1-28	tip	0^S	115.6^S	
	1-29	interior	155.9	162.9^L	
2—13		I-T	137.6	27.0	1-2-3-4 否:由于距离或地理 隔离引起种群间基因交流 受阻
	1-18	tip	0	204.0	
	1-19	tip	0	251.4	
	1-20	tip	0	142.9	
	1-21	tip	0	142.9	
	1-22	tip	0	251.4	
	1-23	interior	120.0	234.7	
	1-24	interior	0	142.9	
2—15		I-T	90.1^L	7.1	1-2-3-4 否:由于距离或地理 隔离引起种群间基因交流 受阻
	1-2	tip	21.4^S	52.4	
	1-3	interior	40.0	48.9	
		I-T	18.7	—3.4	
2—17	1-6	tip	0^S	44.0	1-2-11-12 否:邻域扩张
	1-7	interior	29.3^S	43.2	
		I-T	29.3^L	—0.9	
3—1	2-1	interior	25.3^S	35.9^S	1-2-11-12 否:邻域扩张
	2-2	tip	0	69.5^L	
	2-3	tip	26.4	31.1	
	2-4	tip	0	27.3	
		I-T	14.0	—11.1^S	
3—2	2-5	interior	40.5	73.6^L	1-2-3-4 否:由于距离或地理 隔离引起种群间基因交流 受阻
	2-6	tip	9.6^S	43.5^S	
		I-T	30.9^L	30.1^L	
3—3	2-7	interior	95.3^S	154.4^S	1-2-11-12 否:邻域扩张
	2-8	tip	113.8	199.4	
	2-9	tip	0	142.7	
	2-10	interior	0^S	142.7^S	

续表

嵌套支序	支序	位置	支序距离 Dc	嵌套距离 Dn	推断结论
3—4	2-11	tip	0^S	322.5^L	1-2-11-17 否;无绝对结果
		I-T	39.2	-107.1^S	
	2-12	interior	148.7^S	192.4	
整个支序	2-13	interior	181.1	229.8	1-2-3-5-6-13-21 否;早期地 域扩张,随后栖息地片断化 或长距离运动
	3-1	interior	41.2^S	195.2^S	
	3-2	tip	55.3^S	239.2	
	3-3	tip	202.9	225.5	
	3-4	interior	209.2	260.0^L	
	3-5	tip	45.6^S	223.6	
		I-T	55.3^L	12.9	

上标 S 和 L 分别表示实际距离比期望值显著小和显著大,采用 Templeton(2004)所给出的推断方法(inference key)推断各支序的进化史,黑体代表统计检验显著。

4.5 黄河裸裂尻鱼种群扩张事件

为检测黄河裸裂尻鱼的种群爆发事件,本节利用 DnaSP3.0 分析软件计算了黄河裸裂尻鱼种群 133 个体的单倍型歧点分布,单倍型间碱基差异数 0~32,结果见图 2-14。由图可见,黄河裸裂尻鱼种群的单倍型歧点分布呈单峰,表明青藏高原黄河裸裂尻鱼在历史上曾经历过种群的突然爆发。当黄河裸裂尻鱼合并成为一个大群体时,基于无限突变位点模型的中性检验——Tajima's D 和 Fu's F_s 检验均支持以上结论。Tajima's D 为 -1.79 ($P<0.01$),而 Fu's F_s 为 -24.91 ($P<0.01$),表明黄河裸裂尻鱼的确在近期发生过种群扩张事件。然而,当根据水

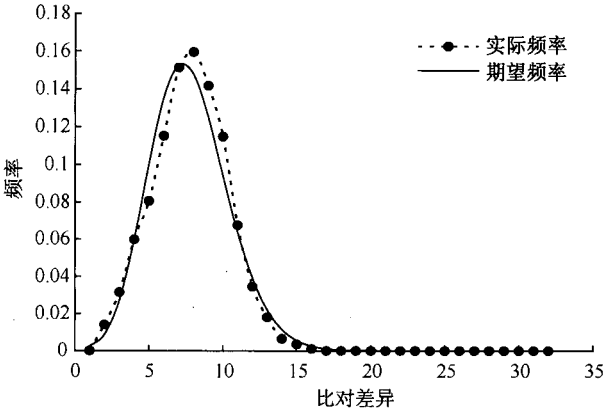


图 2-14 青藏高原黄河裸裂尻鱼 133 个体 mtDNA 细胞色素 *b* 序列的单倍型歧点分布

系分成四组,并对每个组分开检测其 F_u 's F_s 时,其他各组的 F_s 值仍为负值,而黄河组却为正值,表明栖息于黄河水系的黄河裸裂尻鱼种群相对于其他各种群较为稳定,并且表现出种群增长的趋势 (F_u , 1997)。

另外,在种群单倍型歧点分布分析时, τ 的估计值是 6.77,采用第四节裂腹鱼亚科鱼类的碱基替代速率 0.91% (何德奎等, 2004) 和裂腹鱼亚科鱼类的平均世代间隔为 3 年的数据,由公式 $\tau = 2ut$ 可计算出黄河裸裂尻鱼的种群扩张大概发生在 110 000 年前。

5 结论

(1) 外流水系和托索湖黄河裸裂尻鱼种群核苷酸多样性显示为中等水平,而来自柴达木盆地的种群表现出非常低的核苷酸多样性,这可能与柴达木盆地古气候环境的波动有关,推测柴达木盆地的黄河裸裂尻鱼种群可能经历过某种瓶颈效应。

(2) 黄河裸裂尻鱼在水系内种群间或水系间具有显著的遗传差异,反映出黄河裸裂尻鱼具有显著的种群结构。黄河裸裂尻鱼种群结构现状与古气候环境的变迁和水系变化有关,即古气候环境的波动和主要水系的演化可能促进了黄河裸裂尻鱼种群的邻域扩张,但是后续水系间的地理隔离导致了黄河裸裂尻鱼分布域的片断化,从而使种群间的基因交流受阻。

(3) 黄河裸裂尻鱼各种群间的隔离事件相对较晚,致使在分子系统发育树中没有形成各种群相应的单系群。整个种群在青藏高原运动和运动后曾经历了一次种群大爆发事件。

(4) 就黄河裸裂尻鱼目前种群结构和各种群间基因交流受阻的状况而言,各种群因该独立管理和保护,从而达到保存种群遗传完整性的目的。

遗传证据在探究水牛、狗、驴、绵羊、猪等有蹄家养动物的起源问题上发挥了重大作用，并取得了很大进展。牦牛 (*Bos grunniens*) 是牛家族中的稀有牛种，分布于海拔 2000~5000 m 的高寒地区，因能充分利用高寒草地牧草资源及对高寒生态条件极强的适应性，素有“高原之舟”之称。因此，对家牦牛起源驯化历史的阐明将填补人类文明进程中有蹄家养动物驯化历史的最后空白。本章采用 DNA 测序技术对牦牛 mtDNA D 环部分序列进行测序，分析了我国野、家牦牛共 304 个样本的遗传多样性，并通过构建系统发育树对家牦牛的母系特征、起源驯化历史及牦牛分类学地位进行了系统研究，旨在为牦牛驯化历史的研究提供分子证据，为家牦牛的选种和遗传繁育积累理论数据。

第三章 牦牛多样性与驯化历史的研究

牦牛 (*Bos grunniens*) 是青藏高原的景观物种之一, 隶属于偶蹄目 (Artiodactyla) 牛科 (Bovinae) 牛亚科 (Bovinae), 因能充分利用高寒草地牧草资源且对高寒生态条件极强的适应性而有“高原之舟”之称。牦牛可分为家牦牛和野牦牛两种, 均起源于原始牦牛。作为我国宝贵的畜种资源, 家牦牛是广大藏区人民重要的生产、生活资源, 也是当地民族经济发展的资源依托。

自 20 世纪 70 年代以来, 经过广大科学工作者的努力, 我国牦牛科学研究取得了极大进展, 尤其是在与牦牛生产直接相关的生产性能、饲养、繁殖等方面获得了丰富积累, 但在牦牛遗传多样性研究方面, 仍存在一些不足, 如, ①遗传多样性研究局限于少数品种 (类群), 且鲜见 DNA 水平的遗传分化、遗传结构等研究, 缺乏系统性。②我国牦牛的体形、外貌、血液蛋白、DNA 分子具有多样性, 但目前我国对牦牛遗传多样性、开发利用潜力的研究还处于较低水平; 同时, 牦牛作为特色畜种, 目前正面临着草地超载过牧、近交退化等问题, 在其多样性保护等方面亟待大力加强。③目前, 野牦牛种群数量总体上仍呈下降趋势并引起基因库丰富度降低, 尽管前人已在野牦牛的生态适应性、染色体特征、血液生化指标、杂交利用、栖息地环境及种群行为等方面开展了一些工作, 但关于野牦牛遗传多样性、遗传分化方面的研究至今未见报道。

人类历史上, 动植物的驯化对人类生活、经济方式的转变起着重要作用。在人为选择作用下, 驯化可以将某些于人类有益的遗传突变从野生群体中固定下来, 并用以产生新的性状组合。因此, 对驯化过程遗传基础的进一步理解无疑将有助于进一步提高驯养物种各方面的性能, 也将为新的物种驯化提供借鉴。不仅如此, 牦牛驯化历史的研究具有重要的学术意义。尽管形态学资料表明牦牛起源于中国, 但牦牛何时何地首次驯化仍然缺少直接的证据。在考古资料无法获得的情况下, 物种的遗传证据在揭示驯化物种的起源及早期历史等方面显得尤为重要。近年来, 应用分子生物学技术, 水牛、牛、马、狗、驴、绵羊、山羊、猪等有蹄家养动物的驯化起源已相继得到证明。因此, 对家牦牛起源驯化历史的阐明将填补人类文明进程中有蹄家养动物驯化历史的重大空白。

此外, 在分类学上, 尽管分类学家将牦牛纳入偶蹄目牛科牛亚科, 但牦牛的属级分类学位置仍存在争议。

基于以上存在的问题, 本研究采用 DNA 测序技术, 通过对牦牛线粒体 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA) D 环部分序列的遗传变异分析, 以期解决

如下 5 个科学问题：①家、野牦牛遗传多样性水平调查；②家牦牛母系特征；③形态高度分化的家牦牛品种是否来源于不同的野生祖先；④人类何时何地开始驯化牦牛；⑤牦牛的属级分类学位置。

第一节 牦牛遗传多样性、起源驯化及分类学地位研究进展

随着全球科技发展，青藏高原已逐步成为国内外众多学科和学者的关注重点，牦牛作为该地区的标志性动物，它的科学技术发展已不仅仅是畜牧学科的重点。目前，大约有近 30 个国际组织和国家的不同学科专家参与了牦牛科技发展研究，牦牛科技发展正呈现出国际性和多学科共同参与的特点。我国牦牛科学的科学研究自 70 年代末成立“中国牦牛科研协作组”之后才正式起步，先后取得了多项学术成就和科研成果。10 余年来更是成功地主办了四届（1994、1997、2000、2004）国际牦牛学术研讨会，并收录了遗传多样性、营养与饲养、繁殖育种、产品与市场等方面的论文，为牦牛科研生产积累了大量资料，使牦牛研究更为系统化，同时扩大了交流范围。

多年来，经过广大科学工作者的努力，基本摸清了我国牦牛、野牦牛的资源状况，区分了 11 个地方优良类群（中国科学院青藏高原科学考察队，1973～1976；蔡立，1992），为牦牛科学的发展奠定了基础。

1 遗传多样性研究概况

进入 20 世纪 90 年代，牦牛遗传多样性主要是从以下两方面展开：①生化水平的研究，主要以蛋白质（同工酶）为遗传标记，对血红蛋白（Hb）、血清转铁蛋白（Tf）、血清白蛋白（Alb）、前蛋白（Pr）、后白蛋白（Pa）、血清淀粉酶（Am）、碱性磷酸酶（APK）、酯酶（Es）、乳酸脱氢酶（LDH）等位点进行了研究。陈智华等（1995）以西藏牦牛为对象，发现在 Hb、Alb、Pa、AKP 位点上均表现为多态性，其中 HbAB、AKPSS 为优势基因型，HbA、AKPS 为优势基因。对九龙牦牛、麦洼牦牛、嘉黎牦牛、亚东牦牛、环湖牦牛、天祝牦牛 6 个类群的 Tf 与 Hb 位点的多态性研究及聚类分析表明九龙牦牛与嘉黎牦牛首先聚在一起，然后再依次与环湖牦牛、天祝牦牛、麦洼牦牛相聚（张才俊，1991）。张才俊（1991，2000）、郑玉才（1991，1996）、赵兴波（1995）、祁学斌（2000）等分别对牦牛乳蛋白多态性进行了检测。涂正超（1996）对 6 个品种（类型）共 179 头牦牛的 32 个血液蛋白座位进行了多态性分析。据 Nei 标准遗传距离，UP-GM 法聚类分为 A、B、C 三类，A 类：包括青海环湖型牦牛、中甸牦牛和巴州牦牛；B 类：包括天祝牦牛、九龙牦牛；C 类：麦洼牦牛，这一研究结果表明群体间亲缘关系与地理分布无关。②DNA 水平的研究。Liu（1994）以两个小卫星 DNA 探针对牦牛进行了 DNA 指纹分析。Zhao 等（1994）应用 mtDNA RFLP

技术,分析了九龙牦牛、麦洼牦牛的种群关系,认为两个种群分别属于不同品种。涂正超等(1998)以我国西北和西南地区5个群体的90头牦牛为对象进行mtDNA的RFLP分析,结果显示牦牛群体间分化程度较低,并估算出牦牛和普通牛、瘤牛的分化时间分别在1.1~2.2 Ma和1.01~2.02 Ma。Qi等(2002)以3个Y染色体微卫星标记对10个群体共252头雄性牦牛进行多态性分析,在三个位点共扩增出9个等位基因,以此定义的10种单倍型聚为两支,表明家牦牛中至少存在两个公牦牛血统。赖松家等(2005)测定了5个类群共35个样本线粒体DNA控制区(D环)全序列,发现我国牦牛D环单倍型类型丰富,单倍型多样性平均为 0.9697 ± 0.0180 ,且各单倍型在品种间分布不平衡;AMOVA分析揭示天祝牦牛与其他四个品种(类群)间存在显著遗传分化。Qi等(2004)以微卫星技术对7个家牦牛类群(蒙古5个、俄罗斯1个、中国1个)的15个位点进行遗传多样性研究,结果表明各类群之间存在极显著的遗传分化($P < 0.001$),认为在保种育种计划中宜将其视为不同的遗传实体,以上研究为合理制订牦牛可持续发展战略和保护对策做出了积极的贡献。

自20世纪70年代以来,我国牦牛科学研究取得了很大进展,但还存在以下不足,如,①以往研究大多侧重于基础资料的获得及与牦牛生产直接相关的生产性能、饲养、繁殖等方面。②家牦牛是我国西部地区的主要畜种,也是高寒地区经济发展的资源依托,但以往有关家牦牛DNA水平的遗传多样性、遗传分化研究仍局限于少数品种(类群),且缺乏系统性。③我国牦牛的体形、外貌、血液蛋白、DNA均存在丰富的多样性,但有关家牦牛遗传多样性、开发利用潜力的研究还处于较低水平;同时,牦牛作为特色畜种,目前正面临着草地超载过牧、近交退化等问题,在其遗传多样性研究和保护等方面尚待大力加强。

2 家牦牛的起源与驯化研究进展

人类历史上,动植物的驯化对人类生活、经济方式的转变起着重要作用(Qian, 1979; Harris, 1996; Diamond, 2002; Harter et al., 2004; Gupta, 2004)。在人为选择作用下,驯化可以将某些于人类有益的遗传突变从野生群体中固定下来,并用以产生新的性状组合。因此,对驯化过程遗传基础的进一步理解无疑将有助于进一步提高驯养物种各方面的性能,也将为新的物种驯化提供借鉴。在考古资料无法获得的情况下,物种的遗传证据在揭示驯化物种的起源及早期历史等方面显得尤为重要。迄今为止,遗传证据在探究水牛(Lau et al., 1998; Kierstein et al., 2004)、牛(Troy et al., 2001)、马(Jansen et al., 2002)、狗(Savolainen et al., 2002)、驴(Beja-Pereira et al., 2004)、绵羊(Hiendleder et al., 2002; Pedrosa et al., 2005)、山羊(Zeder et al., 2000; Luikart et al., 2001; Mannen et al., 2001; Sultana et al., 2003; Joshi et al.,

2004)、猪 (Giuffra et al., 2000; Larson et al., 2005) 等有蹄家养动物的起源问题上发挥了重大作用, 并取得很大进展。因此, 对家牦牛起源驯化历史的阐明将填补人类文明进程中有蹄家养动物驯化历史的最后空白。

形态学资料表明牦牛起源于中国 (Schaller, 1998; Weiner et al., 2003)。根据最早的人类活动及牦牛放牧记载资料, Qian (1979) 推测牦牛最早在西藏被驯化, 时间为 10 000 年前左右。根据考古发现及“牦牛”一词的由来与发展, 张容昶 (1989)、Wiener 等 (2003) 进一步认为牦牛驯化于西藏北部。大约在距今 4500 年前, 在青藏高原上已经较好地建立起以牦牛放牧为主的牧业社会 (张容昶, 1989)。尽管如此, 牦牛何时何地首次驯化仍然缺少直接的证据 (Olsen, 1990)。

3 牦牛的分类学地位的研究进展

牦牛 (*Bos grunniens*) 为牛家族中的稀有牛种, 隶属于偶蹄目牛科牛亚科, 但牦牛的属级分类学位置一直存在争议。根据 Simpson 等 (1945)、Ansell (1971) 及 Vaughan 等 (1978) 的研究, 牛族 (Bovini) 包括四个属, 即牛属 (*Bos*)、野牛属 (*Bison*)、水牛属 (*Boselaphus*) 与非洲水牛属 (*Syncerus*)。Linnaeus (1766) 将野牦牛置于牛属中, 这一处理也得到了 Bohlken (1958, 1961) 的支持, 他们还认为牛属物种 (含牦牛) 是单系发生群, 较早就已经与野牛属分离, 各自进化为现代的各物种。但是, 根据头盖骨形态学分析, Groves (1981) 认为牦牛与野牛属亲缘较近, 而与其他牛属物种的亲缘关系较远; Olsen (1990) 进一步指出牦牛的前颌骨、上颌骨和鼻骨之间的形态特征组合不同于牛属、野牛属, 应独立为一个单种属——牦牛属 (*Poephagus*)。

Miyamoto 等 (1989) 根据部分 mtDNA 序列 (16s, 12s rRNA, 3 个 tRNA 基因及部分 D 环序列), Wall 等 (1992) 利用核糖体 DNA (rDNA) 限制性内切酶位点图谱建立了牛族的系统发育关系表明牛族中存在两支, 野牛属—牛属支与水牛属—非洲水牛属支, 但牛属、野牛属均不是单系群。基于线粒体 CO II 基因序列的分析, Janecek 等 (1996) 进一步发现野牛属—牛属为一单系群, 但两个属的物种各自并不成为单系群; 同时, 他们的研究结果还表明非洲水牛属与水牛属为一单系群。Hassanin 和 Douzery (1999) 根据 Cyt *b* 基因序列构建了牛科动物的系统发育, 牛族仍然获得了两个分支, 即野牛属—牛属支和水牛属—非洲水牛属支。Hassanin 和 Ropiquet (2004) 进一步利用 3 套 DNA 序列 (lactoferrin 基因启动子、Cyt *b* 基因及 CO II 基因) 探讨了牛族系发育与灭绝种柬埔寨野牛 (Kouprey, *B. sauveli*) 的系统位置和分类学地位, 结果显示野牛属—牛属支、水牛属—非洲水牛属均为单系群, 牦牛与美洲野牛 (American bison, *B. bison*) 的亲缘关系较近。这些研究均不支持长期以来把牦牛作为牛属成员的观点 (Linnaeus, 1766; Bohlken, 1958, 1961), 似乎应该把该物种作为野牛属中的成员,

或者独立为一个单种属 (Olsen, 1990), 或者是作为一个广义牛属 (包括野牛属) 的成员。然而, 在这些利用分子证据建立的系统发育树中, 关键分支的支持率均不是很高; 特别是他们的研究结果显示牛族的水牛支与野牛属—牛属支的亲缘关系没有得到很好的支持 (Janecek, 1996; Hassanin & Douzery, 1999; Hassanin & Ropiquet, 2004), 从而暗示牛族可能不是一单系发生群。

草原野牛 (*Bos priscus*) 是一种已灭绝、外形与美洲野牛相似的大型野牛属动物, 曾广泛分布于全北区, 引起包括草原野牛在内的大型动物灭绝的主要原因可能与人类活动及气候变化有关 (Alroy, 2001; Guthrie, 2003; Brook & Bowman, 2004; Shapiro et al., 2004)。而美洲野牛系广泛分布于北美地区的野牛属现存物种, 包括森林野牛 (*B. bison athabasca*) 与平原野牛 (*B. bison bison*) 两个亚种 (Boyd, 2003)。关于美洲野牛的进化存在多种假说, van Zyll de Jong (1986, 1993) 认为美洲野牛系由草原野牛进化而来, 这也是较为流行的观点之一。尽管已有的分子系统进化研究表明牦牛与美洲野牛之间的亲缘关系较近 (Hassanin & Ropiquet, 2004), 来自化石与分子标记资料也表明牦牛与野牛的分化可能发生于 180 万年前 (Flerow, 1980; Hassanin & Ropiquet, 2004), 但美洲野牛、草原野牛以及牦牛三者之间的关系仍不清楚。

综上所述, 有必要进一步从 DNA 水平揭示牦牛的遗传多样性, 以全面地了解各品种 (类群) 遗传变异的大小及与环境条件的关系、遗传分化与遗传结构, 并对家牦牛品种进行聚类分析, 探讨其遗传关系, 为牦牛的多样性保护、可持续利用提供理论依据。在此基础上, 开展牦牛驯化历史与分类学位置研究, 对牦牛的起源、演化、驯化等科学问题进行探讨与阐述。

第二节 家牦牛线粒体 DNA 遗传多样性 与分类研究

家畜的遗传多样性是生物多样性的重要组成部分。作为我国宝贵的生物资源和品种基因库, 家牦牛丰富的遗传多样性是我国乃至世界牦牛产业持续发展的基础, 且家牦牛分类的正确与否对家牦牛遗传资源的合理利用具有重要意义。

长期以来, 家牦牛的遗传多样性与分类研究因而也成为牦牛科学研究的重点和热点问题。分类上, 陆仲磷 (1990) 依据牦牛的体型结构、毛色、发展历史、产区的生态环境等将我国家牦牛划分为西南高山峡谷型、青藏高原型和祁连山型三个类型。蔡立 (1992) 则依据产区的生态环境条件和牦牛的特征特性, 将我国 8 个地方品种或类群的家牦牛分为横断高山型和青藏高原型两大生态类型。其中, 属于横断高山型的有九龙牦牛、中甸牦牛、西藏高山牦牛等; 青藏高原型则包括麦洼牦牛、青海高原牦牛、天祝牦牛、巴州牦牛、西藏高原牦牛等。随后, 研究者先后采

用蛋白多态、mtDNA RFLP、微卫星、测序技术等对部分家牦牛品种的遗传多样性和聚类关系（钟金城等，2001，2006；涂正超等，1998；赖松家等，2005）进行了研究，但由于涉及品种少、样本量不足，且研究手段、方法不一，研究结果也不尽相同。当前，尽管基于分子标记的研究倾向于支持将我国牦牛划分为两种生态类型（钟金城等，2001，2006；赖松家等，2005），但基于家牦牛遗传结构研究的家牦牛类型划分至今未见报道。mtDNA 由于具有母系遗传、变异速度快等特征，是遗传多样性、遗传结构和聚类关系研究等的有效标记。基于此，本实验以我国 10 个家牦牛品种（类群）为研究对象，通过对牦牛 mtDNA 的 D 环区进行测序与序列变异分析，目的在于从 DNA 水平揭示牦牛的遗传多样性，并在此基础上进行家牦牛的遗传差异、遗传结构分析，探讨品种（类群）之间的聚类关系，为我国家牦牛类型的划分、遗传多样性评估及其可持续利用提供理论依据。

1 样品采集

以我国青海、西藏、甘肃、新疆、四川五个地区的家牦牛共 10 个品种（类群）为研究对象，包括 250 份采集样品与 GenBank 中下载的 46 条家牦牛 D 环序列（accession number: AY521137 ~ AY521161; DQ007210 ~ DQ007214; DQ007219 ~ DQ007224; DQ856594 ~ DQ856600; DQ856602 ~ DQ856604）。采样地点、样本信息见图 3-1 和表 3-1。

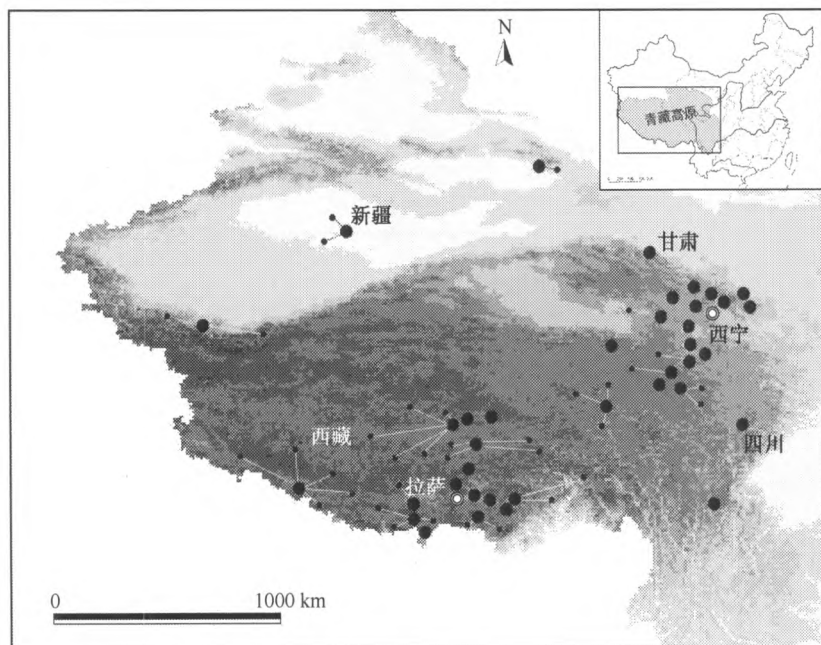


图 3-1 采样地点

表 3-1 采样信息表

地区	品种/类群	采样地点	样本数	总数
甘肃	未知类群	肃南	8	27
	天祝	天祝	19(12*)	
青海	大通	门源	31	125
	环湖	共和	3	
	环湖	海晏	2	
	环湖	刚察	2	
	环湖	黑马河	2	
	环湖	都兰	3	
	青海高原	玉树	13	
	青海高原	玛沁	32	
	青海高原	达日	37	
西藏	嘉黎	雁石坪	5	84
	嘉黎	那曲	4	
	嘉黎	安多	9	
	嘉黎	羊八井	9	
	嘉黎	当雄	9	
	斯布	拉萨	1	
	斯布	贡嘎	2	
	斯布	达孜	8	
	斯布	泽当	10	
	帕里	日喀则	11	
	帕里	亚东	4	
	帕里	仲巴	5	
	未知类群	未知	7(7*)	
四川	麦洼	红原	17(17*)	27
	九龙	九龙	10(10*)	
新疆	未知类群	伊吾	10	33
	未知类群	叶城	8	
	巴州	和静	15	

* 括号内数字为 GenBank 中下载序列数。

2 D 环部分序列的扩增及测序

总 DNA 提取参照《分子克隆实验指南》(萨姆布鲁克和拉塞尔, 2002) 进行, 采用 premier 5.0 (Premier Biosoft) 自行设计引物, 由上海生物工程有限公司

司合成, 序列为: YDF 5'-GTAAAGAGCCTCACCAGTAT-3' 与 YDR 5'-TC-CTGTAGCCATTGACTAT-3'。PCR 扩增产物经纯化后采用 Megabase 500 自动测序仪 (Amersham Pharmacia Biotech Inc.) 进行测序。

3 数据处理

3.1 序列比对、分型

同一序列的两条单链测序数据在 CHROMAS 程序上人工校对后, 再以 DNAMAN 软件 alignment 程序进行比对, 最大程度保证序列的可靠性。以 Clustal X (1.8) (Thompson et al., 1997) 软件进行同源排序, 并适当手动校对。单倍型分型采用实验室自行开发的 AWA 程序进行。

3.2 位点信息分析及 Tajima 中性检验

以 Dna SP 3.0 (DNA sequence polymorphism) (Rozas & Rozas, 1999) 统计序列总变异位点、单突变位点及简约信息位点; 同时采用该程序的 Tajima's D 值统计进行序列变异中性检验 (neutrality test)。

3.3 遗传距离计算

群体间遗传距离采用 MEGA 3 (molecular evolutionary genetics analysis) (Kumar et al., 2004) 进行计算。

3.4 多样性参数计算及遗传结构分析

采用 Arlequin Ver2.000 (Schneider et al., 2000) 计算种群单倍型多样性 (h)、核苷酸多样性 (π) 及种群间固定指数 (F_{ST})。

遗传结构分析采用其 AMOVA (analysis of molecular variance) 模块进行, 通过等级剖分组间、组内/群体间及群体内的方差组分 σ_a^2 、 σ_b^2 、 σ_c^2 的期望值, 分别计算各个等级对总遗传变异的百分比。 Φ -statistics 计算公式如下

$$\Phi_{ST} = (\sigma_a^2 + \sigma_b^2) / \sigma^2; \Phi_{CT} = \sigma_a^2 / \sigma^2; \Phi_{SC} = \sigma_b^2 / (\sigma_b^2 + \sigma_c^2)$$

Φ_{ST} 、 Φ_{CT} 、 Φ_{SC} 分别反映群体间、组间、群体内的遗传分化, 并检测群体各个等级对遗传变异影响的显著水平。

4 结果

4.1 序列分析

经测序得各序列有效长度为 636 bp 或 637 bp, 所有序列均已提交至 Gen-

Bank (accession number: DQ138998~DQ139201; DQ139215~DQ139260)。对上述序列与所下载序列进行的核苷酸组成分析表明家牦牛中 T、C、A、G 四种核苷酸的平均比例分别为 27.6% (27.0%~28.1%)、25.1% (24.6%~25.6%)、31.7% (31.4%~32.4%)、15.7% (14.8%~16.0%)，表明牦牛中 mtDNA 所测区段富含碱基 A+T，表现出一定的碱基偏倚性，显示出牛科动物 mtDNA D 环序列碱基组成的共同特征。

全序列共有 62 个变异位点，存在 4 种变异类型，即转换 (ts)、颠换 (tv)、插入 (insert) /缺失 (indel)。其中两核苷酸之间突变位点有 59 个，包括转换位点 56 个 (A↔G 转换 24 个；C↔T 转换 32 个)，颠换位点 3 个 (均为 A↔T)；此外，还存在两处三核苷酸之间的突变，即 G↔—↔A 与 T↔A↔C。

4.2 家牦牛遗传多样性

家牦牛丰富的遗传多样性是我国乃至世界牦牛产业持续发展的基础。衡量群体 DNA 遗传多样性的重要指标有单倍型多样性 (h) 与核苷酸多样性 (πn)，前者指群体中随机抽取的序列互不相同的概率，后者定义为某一群体内两个随机抽取的 DNA 序列间每个位点的核苷酸差异数。

依据 62 个变异位点共定义了 77 种家牦牛单倍型。采用 Arlequin Ver3.11 对我国家牦牛单倍型多样性及核苷酸多样性进行统计分析，遗传多样性参数见表 3-2。

表 3-2 家牦牛单倍型多样性及核苷酸多样性

地区	品种/类群	单倍型数	h (平均值±S. D)			πn (平均值±S. D)		
			品种	地区	平均	品种	地区	平均
甘肃	TZ	9	0.8665±	0.9212±	0.9249±	1.0991±	1.4547±	1.4931±
			0.0561	0.0289	0.0095	0.6087	0.7662	0.7599
青海	DT	19	0.9419±	0.9272±		1.6271±	1.4056±	
			0.0297	0.0142		0.8487	0.7218	
	HH	11	0.9848±			1.0596±		
			0.0403			0.6050		
	GY	28	0.9091±			1.3811±		
			0.0186			0.7131		
西藏	JLi	17	0.9143±	0.9171±		1.7466±	1.8577±	
			0.0308	0.0193		0.9027	0.9409	

续表

地区	品种/类群	单倍型数	h(平均值±S. D)			πn(平均值±S. D)		
			品种	地区	平均	品种	地区	平均
四川	SB	15	0.9571±			2.2582±		
			0.0311			1.1767		
	PL	9	0.8474±			1.2635±		
			0.0613			0.6841		
	JL	7	0.9111±	0.9117±		1.6044±	1.6130±	
			0.0773	0.0327		0.9060	0.8462	
	MW	4	0.8676±			1.6902±		
			0.0684			0.9059		
新疆	BZ	7	0.8000±	0.8220±		0.6856±	0.5838±	
			0.0825	0.0350		0.2476	0.3364	

由表 3-2 可知，我国牦牛存在丰富的遗传多样性，其单倍型多样性、核苷酸多样性分别为 0.9249 ± 0.0095 和 1.4931 ± 0.7599（%），表明我国牦牛存在丰富的 mtDNA 遗传多样性，与赖松家等以我国 4 个家牦牛品种（类群）和 4 头牦牛共 35 个样本为研究对象得出的结论相符（赖松家等，2005）。

遗传多样性对种群维持繁衍、抵抗疾病和适应生境变化具有重要意义。对各种品种（类群）的单倍型多样性分析表明：青海环湖牦牛是单倍型多样性最高的品种，单倍型多样性值高达 0.9848 ± 0.0403；而巴州牦牛单倍型多样性最低，仅为 0.8000 ± 0.0825；斯布牦牛单倍型多样性略低于环湖牦牛，为 0.9571 ± 0.031；大通、嘉黎、九龙、青海高原型牦牛单倍型多样性则分别为 0.9419 ± 0.0279、0.9143 ± 0.0308、0.9111 ± 0.0773、0.9091 ± 0.0186，高于天祝牦牛、帕里、麦洼牦牛。核苷酸多样性方面，斯布牦牛、嘉黎牦牛核苷酸多样性分别为 2.2582±1.1767（%）和 1.7466±0.9027（%），表明品种内存在丰富的核苷酸序列变异；而巴州牦牛仅为 0.6856±0.2476（%），序列间核苷酸差异平均为 2.46 碱基。此外，本研究还对新疆哈密地区伊吾县家牦牛的遗传多样性进行了分析，在 10 头家牦牛中仅发现 2 种单倍型，单倍型多样性为 0.5333 ± 0.0947，远低于家牦牛单倍型多样性的平均值（0.9249 ± 0.0095），遗传多样性水平与该类种群规模较小和长期生境隔离造成的基因流受阻相符。因此，采取诸如人为的种群间个体交换等措施以提高该种群的遗传多样性显得尤为迫切。

从地区来看，青海家牦牛单倍型多样性较高（0.9272）而核苷酸多样性较低，四川家牦牛单倍型多样性较低而核苷酸多样性较高，西藏家牦牛则单倍型多样性与核苷酸多样性均较高，而新疆家牦牛二者均处于较低水平。此外，我

们对各地区的单倍型、特有单倍型数进行统计，单倍型数分布为青海 46 种、西藏 31 种、甘肃 13 种、四川 13 种、新疆 8 种；而特有单倍型分布为青海 31 种、西藏 16 种、甘肃 5 种、四川 3 种、新疆 5 种。家养动物在驯化后均会经历一个群体扩张过程（Luikart et al.，2001；Savolainen et al.，2002）。种群增长能提高其对新突变的保持（Avisé et al.，1984；Rogers，1995）并产生新的单倍型，而对于提高核苷酸多样性而言，时间尚短（Avisé，2000；Nei et al.，1975）。以上结果与青海地区作为家牦牛驯化中心（Guo et al.，2006）的地位相符。

4.3 牦牛品种（类群）间距离与聚类分析

用 MEGA 3 软件计算各家牦牛品种（类群）间的距离，并进行自举检验分析，以估计标准误差。我国牦牛品种（类群）间遗传距离见表 3-3。

表 3-3 牦牛品种(类群)间遗传距离(下三角)与标准误差(上三角)*

品种/类群	TZ	DT	HH	GY	JLi	SB	PL	JL	MW	BZ
TZ		0.0025	0.0021	0.0023	0.0027	0.0037	0.0023	0.0024	0.0027	0.0018
DT	0.0137		0.0024	0.0025	0.0028	0.0037	0.0025	0.0027	0.0037	0.0020
HH	0.0103	0.0131		0.0022	0.0025	0.0036	0.0021	0.0023	0.0036	0.0015
GY	0.0124	0.0149	0.0121		0.0026	0.0035	0.0023	0.0024	0.0035	0.0017
JLi	0.0140	0.0162	0.0138	0.0150		0.0036	0.0026	0.0027	0.0036	0.0021
SB	0.0207	0.0215	0.0208	0.0207	0.0207		0.0036	0.0036	0.0039	0.0035
PL	0.0117	0.0142	0.0112	0.0129	0.0144	0.0204		0.0024	0.0035	0.0015
JL	0.0131	0.0154	0.0127	0.0142	0.0154	0.0208	0.0135		0.0036	0.019
MW	0.0143	0.0161	0.0137	0.0152	0.0163	0.0212	0.0145	0.0156		0.0033
BZ	0.0077	0.0111	0.0069	0.0094	0.0117	0.0203	0.0084	0.0103	0.0114	

* 种群间遗传距离由 Kimura 双参数模型计算而得。

数据分析显示我国家牦牛各品种（类群）间遗传距离变异范围为 0.0069～0.0215。其中，斯布牦牛与其余品种（类群）间的遗传距离较大，环湖牦牛、巴州牦牛与其他牦牛的遗传距离较小。以 Kimura 双参数距离构建邻接树，得到各品种（类群）的聚类关系见图 3-2。

聚类关系图显示青海环湖牦牛与巴州牦牛最先聚在一起，然后与除斯布牦牛外的其余 7 个品种（类群）聚为一支，而斯布牦牛单独构成一支，这与以往研究存在较大出入。鉴于已有聚类关系研究均未涉及斯布牦牛，且本研究中斯布牦牛独立形成一支，遗传背景较为特殊，有必要对除斯布牦牛之外的其余 9 个家牦牛品种（类群）的聚类关系再进行分析，以进一步明确各品种之间的聚类关系。聚

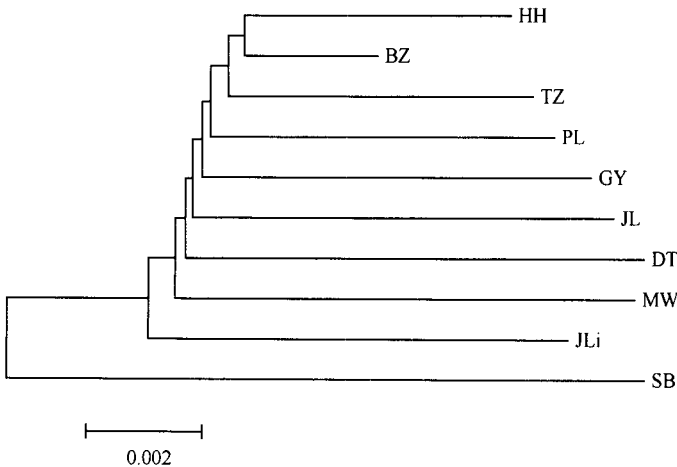


图 3-2 品种（类群）间 Kimura 双参数邻接树

类分析显示：在斯布牦牛未加入分析的情况下，聚类关系仍将 9 个品种（类群）聚为两支——麦洼牦牛与大通牦牛聚为一类，其余 7 个品种（类群）聚为一类，与王玲、钟金城（2001）依据 Tf 和 Hb 基因频率构建的聚类格局基本一致，而与钟金城（2006）依据微卫星多态得出的聚类关系差异较大。以上研究表明，除斯布牦牛在外的 9 个品种在斯布牦牛加入、未加入分析的情况下，其聚类格局发生了明显变化，暗示尽可能地涵括更多品种是构建准确的家牦牛聚类关系的重要前提。

以 Kimura 双参数距离对各家牦牛品种（类群）进行聚类分析未能显示出同一地理区域的种群聚为一类的趋势，如斯布牦牛与西藏其他 3 个家牦牛品种（类群）分别位于不同的两个聚类簇，表明线粒体 D 环序列的差异与品种（类群）的地理分布无明显相关。这可能与家牦牛的单一起源（Guo et al., 2006）有关，但更有可能是品种（类群）间基因交流的结果。我们随即进行的基因流分析也证明了这一点——基于 F_{ST} 计算的基因流（Nm）显示大多数品种（类群）间存在较大的基因交流。

4.4 遗传结构与遗传分化

家牦牛品种的分类一直是牦牛科学研究的重点和热点问题。自 20 世纪 90 年代以来，先后有学者从不同水平（如形态、生化遗传标记、分子遗传标记等）对家牦牛品种（类群）的遗传分化和分类问题进行了广泛的研究，但至今仍无定论（钟金城等，2006）。而且，尽管基于分子标记的研究倾向于支持将我国家牦牛划分为两种生态类型（钟金城等，2001，2006；赖松家等，2005），但对何种家牦牛品种（类群）应归入何种生态类型均未能做出明确阐述。

采用 Arlequin Ver3.11 (Schneider et al., 2000) 对 10 个家牦牛品种 (类群) 进行分子变异分析 (analysis of molecular variance, AMOVA), 并做统计显著性检验。除将所有品种作为 1 组 (分组 I) 进行分析外, 本研究还分别参照蔡立 (1992) 与陆仲磷 (1990) 的分类方法, 即①分为两个类型——横断高山类型和青藏高原类型; ②三种类型——西南高山峡谷型、青藏高原型与祁连山型, 对 10 个家牦牛品种做了 3 种不同的分组。鉴于有关帕里牦牛的分类信息极为有限, 在划分为 2 组进行 AMOVA 时, 我们尝试将帕里牦牛分别置于不同组合 (分组 II、III) 中。通过等级剖分, 本研究计算出不同分组情况下各等级变异在总变异中所占的比例, 并做统计显著性检验。分析结果见表 3-4。

表 3-4 牦牛品种 (类群) 分组及各分组情况的 AMOVA

组	变异来源	自由度	方差总和	变异组分	变异比率	Φ 统计值	显著性检验
I: (TZ, DT, HH, GY, JLi, SB, PL, JL, MW, BZ)	群体间	9	74.631	0.148 10	3.09	0.030 87	0.023 46
	群体内	253	1 176.223	4.649 10	96.91	/	/
II: (JL, SB, JLi), (TZ, DT, HH, GY, PL, MW, BZ)	组间	1	31.703	0.261 11	5.29	0.052 85	0.004 89
	群体间/组内	8	42.928	0.030 32	0.61	0.006 48	0.271 75
	群体内	253	1176.223	4.649 10	94.10	0.058 99	0.034 21
III: (JL, SB, JLi, PL), (TZ, DT, HH, GY, MW, BZ)	组间	1	21.946	0.124 77	2.57	0.025 69	0.036 17
	群体间/组内	8	52.685	0.082 48	1.70	0.017 43	0.154 45
	群体内	253	1176.223	4.649 10	95.73	0.042 68	0.030 30
IV: (JL, SB, JLi, PL), (GY, MW, BZ), (TZ, DT, HH)	组间	2	25.906	0.052 47	1.09	0.010 91	0.135 78
	群体间/组内	7	48.725	0.107 77	2.24	0.022 65	0.117 30
	群体内	253	1176.223	4.649 10	96.67	0.022 65	0.017 60

Φ_{ST} 相当于分化指数, Wright (1978) 认为分化指数介于 0~0.05 之间说明分化很弱, 0.05~0.15 之间中等分化, 0.15~0.25 之间分化大, 大于 0.25 表明分化极大。将所有家牦牛品种 (类群) 作为 1 组 (分组 I) 进行分析时, 品种 (类群) 间方差组分、 F_{ST} 分别为 0.148 10 和 0.030 87, 并达到显著水平 ($0.01 < P < 0.05$), 表明品种 (类群) 间存在显著的遗传差异。然而, 进一步的分析表明品种间遗传分化仅发生于斯布牦牛与天祝牦牛、环湖牦牛、大通牦牛、高原牦牛、帕里牦牛、巴州牦牛及巴州牦牛与大通牦牛、九龙牦牛、嘉黎牦牛之间, 而其余品种两两间遗传分化不显著。在多分组的情况下, 通过等级剖分, 可知分为

2 组（分组Ⅱ、Ⅲ）的家牦牛组间变异均大于其组内变异，组间方差组分分别达到 0.261 11、0.124 77，对应的 F_{CT} 则分别为 0.052 85 和 0.025 69，分组Ⅱ达到中等分化水平，且组间遗传分化极显著（ $P < 0.01$ ），分组Ⅲ则达到显著水平（ $0.01 < P < 0.05$ ）；分为 3 组（分组Ⅳ）时家牦牛组间遗传差异不显著（ $P > 0.05$ ），组间变异组分仅为 0.052 47。以上表明 4 种分组方案中，分组Ⅱ最为合理。

此外，尽管 AMOVA 显示分组Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ的品种间/组内遗传差异不显著（ $P > 0.05$ ），但无论采用何种分组方法，品种（类群）内遗传变异对遗传分化的贡献率均在 90% 以上，且达到显著水平（ $0.01 < P < 0.05$ ），表明牦牛品种（类群）内遗传变异对遗传结构影响显著。

根据产区的生态环境条件和牦牛的特征特性，蔡立将我国 8 个地方品种或类群的家牦牛分为横断高山型和青藏高原型两种生态类型（蔡立，1992）。其中，横断高山型包括九龙牦牛、西藏高山牦牛、中甸牦牛等，青藏高原型包括麦洼牦牛、青海高原牦牛、天祝牦牛、巴州牦牛、西藏高原牦牛等。依据分布地生态、地理条件及血液蛋白多态研究结果，斯布牦牛与嘉黎牦牛均属于西藏高山型（陈智华等，1999；《中国牦牛学》编写委员会，1989）。可见，在两大类型的品种组成上，本文获得了与蔡立一致的研究结果（本文未对中甸牦牛进行研究），表明 DNA 变异支持将我国 10 个家牦牛品种（类群）划分为两种类型——横断高山型和青藏高原型，首次为家牦牛类型的合理划分提供了源自分子遗传学的证据。

基因流和突变是导致遗传分化产生的主要因素。由于分组Ⅱ的品种间/组内遗传分化不显著，且分组Ⅰ大多数品种间存在较大的基因流，基本上可以排除基因流受阻这一因素，这也表明突变是造成横断高山型与青藏高原型家牦牛间产生遗传分化的主要原因。从所处环境来看，家牦牛生活在高海拔地区，受强紫外线辐射，易发生突变。而横断高山型牦牛与青藏高原型牦牛生境的异质性——横断高山型牦牛分布于高山峡谷地区，为寒冷半湿润型地区，草场以高山灌丛草场为主，局部地区为高山草甸草场，牧草以杂草类为主；而青藏高原型牦牛分布于高原地带，系寒冷半干旱型地区，草场以高山、亚高山草甸草场为主，牧草以禾本科和莎草科草类为主，使突变朝不同方向积累，并最终导致彼此显著遗传分化的产生（《中国牛品种志》编写组，1986）。鉴于横断高山型与青藏高原型家牦牛之间显著的遗传分化及其生境的异质性，在以后的家牦牛遗传资源保护和利用中，宜将这两个类型视作不同的基因库。

5 主要结论

(1) 我国家牦牛均表现出较高的遗传多样性, 其单倍型多样性、核苷酸多样性分别为 0.9249 ± 0.0095 和 0.014931 ± 0.007599 。我国家牦牛遗传多样性存在地域差异, 以青海牦牛遗传多样性最高, 而新疆牦牛为最低。

(2) 将九龙牦牛、嘉黎牦牛、斯布牦牛归为一组而其余 7 个品种(类群)划为一组时, 分子变异分析 (AMOVA) 检测到组间存在极显著的遗传结构差异 ($F_{CT}=0.04662$, $P<0.01$), 支持依据遗传分化程度将我国家牦牛划分为两大类型。

第三节 家牦牛的起源与驯化研究

青藏高原占地 $2\,500\,000\text{km}^2$, 是全球最大且连续的高海拔生态系统, 气候、环境条件极为恶劣, 而牦牛是唯一能适应青藏高原特殊生态环境而延续至今的牛种, 其分为两种类型: 家牦牛和野牦牛。我国是世界上家牦牛数量、品种最多的国家, 有家牦牛 1400 万头, 约占世界家牦牛总数的 95% (耿社民和刘小林, 2003), 其中 90% 以上分布在青藏高原的中心地带及青海、甘肃及四川西北部, 家牦牛不仅是该地区广大牧民重要的生产、生活资源 (食物、皮革、燃料与运力), 也是当地民族经济发展的资源依托 (张容昶, 1989; Schaller, 1998; Weiner et al., 2003)。

对家养动物起源的研究不仅具有其自身的意义, 而且对于了解人类社会的发展也有重要的价值。人类历史上, 动植物的驯化对人类生活、经济方式的转变起着重要作用 (Qian, 1979; Harris, 1996; Diamond, 2002; Harter et al., 2004; Gupta, 2004)。在人为选择作用下, 驯化可以将某些于人类有益的遗传突变从野生群体中固定下来, 并用以产生新的性状组合。因此, 对驯化过程遗传基础的进一步理解无疑将有助于进一步提高驯养物种各方面的性能, 也将为新的物种驯化提供借鉴。在考古资料无法获得的情况下, 物种的遗传证据在揭示驯化物种的起源及早期历史等方面显得尤为重要。迄今为止, 遗传证据在探究水牛 (Lau et al., 1998; Kierstein et al., 2004)、牛 (Troy et al., 2001)、马 (Jansen et al., 2002)、狗 (Savolainen et al., 2002)、驴 (Beja-Pereira et al., 2004)、绵羊 (Hiendleder et al., 1998, 2002; Pedrosa et al., 2005)、山羊 (Zeder et al., 2000; Luikart et al., 2001; Mannen et al., 2001; Sultana et al., 2003; Joshi et al., 2004)、猪 (Giuffra et al., 2000; Larson et al., 2005) 等有蹄家养动物的起源问题上发挥了重大作用, 并取得很大进展。因此, 对家牦牛起源驯化历史的阐明将填补人类文明进程中有蹄家养动物驯化历史的最

后空白。

形态学资料表明牦牛起源于中国 (Schaller, 1998; Weiner et al., 2003)。根据最早的人类活动及牦牛放牧记载资料, Qian (1979) 推测牦牛最早在西藏被驯化, 时间为 10 000 年前左右; 根据考古发现及“牦牛”一词的由来与发展, 张容昶 (1989)、Wiener 等 (2003) 进一步认为牦牛驯化于西藏北部。大约在距今 4500 年前, 青藏高原上已经较好地建立起以牦牛放牧为主的牧业社会 (张容昶, 1989)。尽管如此, 牦牛何时、何地被首次驯化仍然缺少直接的证据 (Olsen, 1990)。

尽管以往的研究揭示了一个总的趋势, 即家畜 (禽) 往往包含几个高度分歧的母系 (Troy et al., 2001; Vila et al., 2001; Luikart et al., 2001; Jansen et al., 2002; Savolainen et al., 2002; Beja-Pereira et al., 2004; Chen et al., 2005; Pedrosa et al., 2005; Larson et al., 2005; Liu et al., 2006), 对于野生祖先分布广泛的物种来说, 这表明当前的家畜 (禽) 各品种 (类群) 源于遗传上分布不连续的野生群体的多次独立驯化事件 (MacHugh & Bradley, 2001; Bruford et al., 2003), 但对于某些祖先仅分布于局部地区物种 (如水牛), 高度分歧的母系可能来源于单个基因库 (Lau et al., 1998; Kierstein et al., 2004)。通过分析来自世界上不同地区的家猪、野猪 mtDNA 控制区部分序列 (Larson et al., 2005), 猪的多地区起源已得到了令人信服地证明。但对于大多数家畜 (禽), 由于缺少足够的野生样本 (如牛, Troy et al., 2001) 或系统地理结构 (如狗, Savolainen et al., 2002), 这些假设很少得到验证。而生活在青藏高原上的大约 15 000 头野牦牛为我们分析家牦牛的起源, 阐明其驯化过程提供了良好机会。

通过对家牦牛及野牦牛 mtDNA 控制区序列的变异分析, 目的在于: ①揭示家牦牛母系多样性的特征; ②分析主要世系、分支的起源及各世系、分支与形态学品种 (类群) 之间的相关性; ③确定牦牛驯化的地点与大致时间。

1 实验材料

家牦牛样品采集与第二节同, 共获得家牦牛样品 250 份; GenBank 下载家牦牛 D 环序列 30 条; 此外, 本研究获得野牦牛样本 13 份 (青海西部地区 8 份、锡金乌兰湖 3 份、野牦牛标本 2 份)。

2 实验方法

同第二节实验方法部分。

3 数据处理

3.1 单倍型比对、分型

同第二节数据处理部分 3.1。

3.2 构建系统进化树

采用 PAUP* 4.0b10 重建系统发育关系，分别构建邻接树、最大简约树、最大似然树。构建最大似然树时，先在 Modeltest 3.06 (Posada & Crandall, 1998) 上对所有单倍型序列进行模型测试，获得最适模型及相应的统计学参数。此外还以贝叶斯方法构建系统发生树 (参数为: Nst=6, rate=gamma, ngen=5 000 000, nchains=6, printfreq=1000, samplefreq=100)。

3.3 单倍型网络图构建

单倍型之间的关系 Network 4.1.1.2 中 median-joining (Bandelt, 1999) 算法进行计算。

3.4 遗传多样性分析、单倍型歧点分布分析与中性检验

以 Arlequin Ver2.000 (Schneider et al., 1999) 进行遗传多样性计算、单倍型歧点分布分析及 Fu's F_s (Fu, 1997) 中性检验。

3.5 分子钟计算

以牦牛与美洲野牛 (U12864、U12936、U12946、U12948、U12955、U12956 与 U12959) 的分歧时间为 180 万年计算 (Flerow, 1980; Hassanin & Ropiquet, 2004)，采用 Beast 程序分别估算在种群稳定和指数增长情况下的宽松分子钟 (突变速率) 与母系分歧的溯祖时间。

4 结果

4.1 单倍型分布

在野牦牛、家牦牛中共检出 87 种单倍型，以 H1 (haplotype 1) 为标准进行多态位点分析，全序列共存在 68 个变异位点 (单倍型类型及变异位点见表 3-5)，单倍型省 (区) 分布及发生频次如表 3-6 所示，其中 H8 为家牦牛和野牦牛所共享。

表 3-5 单倍型序列变异位点

	1	1111111111	1111112222	2222222222	2222222222	2222222222	2333333334	44444456
3445667780		0001133566	6999990011	1222344555	5555667777	8003346683	34458870	
8044175962		3486728823	5234580101	8038708034	5689130238	3015628958	95630316	
H1	ACTAGATCGG	G-CATATGTA	ATCCCTAAAG	GGAGGCCATC	ACCTGTCCAC	CTTAATCTTT	TTTGTATG	
H2	...TA..TA.	..-....CA.T	...T.....	AA.T.....	...C.C.T.T	C	C...A...	
H3	A..TA..	-....CA..	...T.....	A..T.....	...C.C.T.T	C	C...A...	
H4	...TA..TA.	..-....CA.T	...T.....	A..T.....	...C.C.T.T	C	C...A...	
H5		A...G.A.	G.T...G...	AA.TA...CT	...CACT...	.C.GG....C	CC..AG..	
H6		..-....G.A.	G.T...G..A	AA.TAT..CT	...CACTT.T	.C.GG....C	CC..AG..	
H7		..-....G.A.	G....G...	AA.TA...CT	ACTT..	.C..G....C	CC..AG..	
H8		A...G.A.	G.T...GG..	AA.TAT..CT	...CACTT..	.C.GG....C	CC..AG..	
H9	..C.....	A...G.A.	G....GG..	AA.TAT..CT	...CA.TT..	.C.GG....C	CC..AG..	
H10		..-....G.A.	G.T...G..A	AA.TA...CT	...CACTT..	T...GC...C	CC..AG..	
H11		A...G.A.	G....GG..	AA.TAT..CT	...CACTT..	.C.GG....C	CC..AG..	
H12		..-....G.A.	G.T...G..A	AA.TA...CT	...CACTT..	.C.GG....C	CC..AG..	
H13		.AT.CG.A..	G.T...GG..	AA.TAT..CT	...CACTT..	TC.GG....C	CC..AG..	
H14	...TA..TA.	..-....CA..	...T.....	A..T.....	...C.C.T.T	C	C...A...	
H15		A..CG.A..	G.T...GG..	AA.TAT..CT	...CACTT..	.C.GG....C	CC..AG..	
H16		A...G.A.	G..T.CGG..	AA.TAT..CT	...CACTT..	.C.GG....C	CC..AG..	
H17	TA.	..-....CA.	.G.....	A..T.....	G..C.C.T..	C	C...A...	
H18		A...G.A.	G.T...GG..	AA.TAT..CT	...CACTT..	.C.GG...C.C	CC..AG..	
H19		..-....G.A.	G.T...G...	AA.TA...CT	...CACTTG.	.C.GG....C	CC..AG..	

续表

1	1111111111	1111112222	2222222222	2222222222	2333333334	44444456
3445667780	0001133566	6999990011	1222344555	5555667777	8003346683	34458870
8044175962	3486728823	5234580101	8038708034	5689130238	3015628958	95630316
H20		.-...G.A..	AA.TA...CT	...CACTT..	.C.GC...C	CC..AG.
H21		.A...G.A..	AA.TAT..CT	ACTT..	.C.GG....C	CC...G..
H22		.A...G.A..	AA.TAT..CT	..TCACTT..	.C.GG....C	CC..AG.A
H23		.A...G.A..	AA.TAT..CT	ACT...	.C.GG....C	CC..AG..
H24		.A...G.A..	AA.TA...CT	...CACTT..	.C.GGC...C	CC..AG..
H25		-....G.A..	AA.TAT..CT	...CACTT..	.C.GC...C	CC..AG..
H26		.G...G.A..	AA.TA...CT	...CACTT..	.C.GGC...C	CC..AG..
H27	...TA.TA.	-....CA..	A..T.....	...C.C.T.T	CC	C...A...
H28		.A...G.A..	AA.TAT..CT	..TCACTT..	.C.G....C	CC..AG..
H29		.G...G.A..	AA.TAT..CT	...CACTT..	.C.GG....C	CC..AG..
H30		.A...G.A..	AA.TAT..CT	...CACTT.T	.C.GG....C	CC..AG..
H31		-.CG.A..	AA.TAT..CT	...CACTT..	.C.GG....C	CC..AG..
H32		-....G.A..	AA.TA...CT	...CACTT.T	.C.GGC...C	CC..AG..
H33		.A...G.A..	AA.TAT..CT	..TCACTT..	.C.GG....C	CC..AG..
H34	...TA.TA.	-....CA.T	A..T.....	...C.C.T.T	C	C...A...
H35	...TA.TA.	-....CA..	A..T.....	...C.C.T.T	G....C	C...A...
H36	TA	-....CA..	A..T.....	...C.C.T..	C	C...A...
H37		.A...G.A..	AA.TAT..CT	ACTT..	.C.GG....C	CC..AG..
H38		A-...G.A..	AA.TAT..CT	...CACTT	...C.GG....C	CC..AG..

续表

	I	1111111111	1111112222	2222222222	2222222222	2333333334	44444456
3445667780		0001133566	6999990011	1222344555	5555667777	80033346683	34458870
8044175962		3486728823	5234580101	8038708034	5689130238	3015628958	95630316
H39		. -... G. A..	G. T... G.. A	AA. TA... CT	... CACTT..	. C. GC... C	CC.. AG..
H40		. AT. CG. A..	G. T... GG..	AA. TAT.. CT	... CACTT..	. C. GG.... C	CC.. AG..
H41	 G....	. -... G. A..	G. T... G.. A	AA. TA... CT	... CACTT..	. C. GGC... C	CC.. AG..
H42	... TA.. TA.	. -... CA..	... T.....	AA. T.....	... C. C. T. T	 CC	C... A...
H43	 TA.	. -... CA..	G.....	A. T.....	G.... C. T..	 C	C... A...
H44		. -... G. A..	GCT... G.. A	AA. TA... CT	... CACTT..	. C. GGC... C	CC.. AG..
H45	 TA.	. -... CA..	G.....	A. T.....	... C. C. T. T	 G.... C	C... A...
H46		. A... G. A..	G..... GG..	AA. TAT.. CT	.. TCACTT..	. C. GG.... C	CC.. AG..
H47	 C...	. -... G. A..	GCT... G.. A	AA. TA... CT	... CACTT..	. C. GGC... C	CC.. AG..
H48		. A... G. A..	G. T... GG..	AA. TAT. GCT	.. TCACTT. T	. C. GG.... C	CC.. AG..
H49	 TAA	. -... CA..	G.....	A. T.....	G.. C. C. T. T	 C	C... A...
H50	.. CTA.. TA.	. -... CA..	... T.....	A. T.....	... C. C. T. T	 C	C... A...
H51	... TA.. TA.	. -... CA..	... T.....	A. T.....	... C. C. T..	 C	C... A...
H52		. A... G. A..	G. T... GG..	AA. TAT.. CT	... CA. TT. T	. C. GG.... C	CC.. AG..
H53		. -... G. A..	.. T... G...	AA. TA... CT	... CACTTG.	. C. GG.... C	CC.. AG..
H54		. -... G. A..	GC... G.. A	AA. TA... CT	... CACTT..	. C. GGC... C	CC.. AG..
H55		. A... G. A..	G. T... GG..	AA. TAT.. CT	... CACT...	. C. GG.... C	CC.. AG..
H56		. A... G. A..	G. T... GG..	AA. TAT. GCT	.. TCACTT..	. C. GG.... C	CC.. AG..
H57	. T.....	. A... G. A..	G. T... GG..	AA. TAT.. CT	... CACTT..	. C. GG.... C	CC.. AG..

续表

	1	1111111111	1111112222	2222222222	2222222222	2333333334	44444456
3445667780	0001133566	6999990011	1222344555	5555667777	8003346683	34458870	
8044175962	3486728823	5234580101	8038708034	5689130238	3015628958	95630316	
H58	...TA..TA.	.-....CA..	...T.....	A..T.....	.T.C.C.T.T	C	C...A...
H59	G...A..TA.	.-...A.CA..	...T.....	A..T.....	...C.C.T.T	C	C.C.A.C.
H60	G...A..TA.	.-..AGCA..	G..T.....	A..T.....	...C.C.T.T	G....C	C.C.A.C.
H61	TA.	.-....CAC.	G.....	A..T.....	G....C.T..	C	C...A...
H62	TA.	.-....CA..	G.....	A..T.....	G..C.C.T.T	.C.....C	C...A...
H63		.A...G.A..	G.T...GG..	AAGTAT..CT	...CACTT..	.C.GG....C	CC..AG..
H64		.A..CG.A..	G.T...GG..	AA.TAT..CT	ACTT..	.C.GG....C	CC..AG..
H65		.A..CG.A..	G.T...GG..	AA.TAT..CT	...CACTT..	.C.GG.T..C	CC..AG..
H66		.-....G.A..	.CT...G..A	AA.TA...CT	...CACTT..	.C.GGC...C	CC..AG..
H67		.A...G.A..	G.T...GG..	AAGTAT..CT	..TCACTT..	.C.GG....C	CC..AG..
H68		.A...G.A..	G.....GG..	AA.TAT..CT	...CACTT..	.C.GG....C	CC.CAG..
H69		.-....G.A..	G.T...G...	AA.TA...CT	...CACTTG.	.C.GGC...C	CC..AG..
H70		.-....G.A..	GC....G..A	AA.TA...CT	...CACTT..	.C.GGCT..C	CC..AG..
H71		.A...G.A..	G.T...GGG.	AA.TAT..CT	...CACTT..	.C.GG....C	CC..AG..
H72		.A...G.A..	G.T...GG..	AA.TATT.CT	...CACTT.T	.C.GG....C	CC..AG..
H73		.A...G.A..	G.T...GG..	AA.TAT..CT	...CACTT..	.C..G....C	CC..AG..
H74	...TA..TA.	.-....CA..	...T.....	A..T.....	...C.C.T.T	G.T..C	C...A...
H75		.A...G.A..	G.T...GG..	AA.TAT..CT	...CACTTG.	.C.GG....C	CC..AG..
H76	...TA..TA.	.-....C...	...T.....	A..T.....	...C.C.T.T	CC	C...A...

续表

1	1111111111	1111112222	2222222222	2222222222	2333333334	44444456	
3445667780	0001133566	6999990011	1222344555	5555667777	80033346683	34458870	
8044175962	3486728823	5234580101	8038708034	5689130238	3015628958	95630316	
H77		.A...G.A..	GC....GG..	AA.TAT..CT	...CACTT..	.C.GG....C	CC..AG..
H78		G.A..	G.T...G..A	AA.TA...CT	...CACTT.T	.CCGGC..CC	CC..AG..
H79		G.A..	G.T...G..A	AA.TA...CT	..TCACTT..	.C.GC...C	CC..AG..
H80		G.A..	G.T...G..A	AA.TA...CT	ACTT..	.C.GGC...C	CC..AG..
H81		G.A..	..T...G..A	AA.TA...CT	...CACTT..	.C.GC...C	CC..AG..
H82		.A...G.A..	G.T...GG..	AA.TAT..CT	..TCACTT..	.C.GG....C	CC..AG..
H83		G.A..	G.T...G..A	AA.TA...CT	...CACTTG.	.C.GG....C	CC..AG..
H84		.A..CG.A..	G.TT..GG..	AA.TAT..CT	ACTT..	.C.GG....C	CC..AG..
H85		G.A..	GCT...G..A	AA.TA...CT	...CACTT...	.C.GGC...C	CC..AG..
H86	T..	.A..CG.A..	G.T...GG..	AA.TAT..CT	ACTT..	.C.GG....C	CC..AG..
H87		.A.TAG.A..	G.....GG..	AA.TAT..CT	...CACTT..	.C.GG....C	CC..AG..

注：•表示为碱基相同；-表示为碱基缺失。

表 3-6 家牦牛、野牦牛单倍型分布频率

单倍型(H)	甘肃	青海	西藏	四川	新疆	野牦牛	个体数	分支
H1						1	1	
H2						1	1	C
H3						2	2	
H4						1	1	C
H5						1	1	
H6						1	1	B
H7						1	1	
H8	5	27	20	3	7	2	64	A
H9						2	2	A
H10						1	1	B
H11	3	14	8	1	4		30	A
H12	3	9	6				18	B
H13	2						2	A
H14	1	8	8	1			18	C
H15	1	5	1	1			8	A
H16	2						2	A
H17	1	6	6				13	D
H18	1						1	A
H19		5	3	1			9	E
H20		1					1	B
H21		1					1	A
H22		1					1	A
H23		2					2	A
H24		1					1	B
H25		1					1	B
H26		1					1	B
H27		1	2				3	C
H28		1					1	A
H29		1					1	A
H30		6	2				8	A
H31		1					1	A
H32		1					1	B

								续表
单倍型(H)	甘肃	青海	西藏	四川	新疆	野牦牛	个体数	分支
H33		1					1	A
H34		1					1	C
H35		1					1	C
H36		1					1	D
H37		1	1				2	A
H38		1					1	A
H39	1	2	3				6	B
H40		3		1			4	A
H41			1				1	B
H42			1				1	C
H43			1				1	D
H44		1	1		10		12	B
H45		1	2				3	D
H46			1				1	A
H47			1				1	B
H48			1				1	A
H49			1				1	D
H50			1				1	C
H51			1				1	C
H52			1				1	A
H53			1				1	E
H54			1				1	B
H55			1				1	A
H56			1				1	A
H57		1					1	A
H58				3			3	C
H59					1		1	F
H60					1		1	F
H61			1				1	D
H62				1			1	D
H63					1		1	A
H64					1		1	A

续表

单倍型(H)	甘肃	青海	西藏	四川	新疆	野牦牛	个体数	分支
H65					1		1	A
H66					2		2	B
H67					7		7	A
H68	1						1	A
H69	1						1	E
H70	1						1	B
H71		1					1	A
H72		1					1	A
H73		1					1	A
H74		1					1	C
H75		1					1	A
H76		1					1	C
H77		1					1	A
H78		2					2	B
H79		1					1	B
H80		1					1	B
H81		1					1	B
H82		1					1	A
H83		1					1	E
H84		2					2	A
H85		2					2	B
H86			1				1	A
H87			1				1	A
总计	23	125	80	12	35	13	288	

4.2 系统发育分析

所有系统发育分析均以美洲野牛为外群。利用 PAUP* 4.0b10 做 MP 分析时，空位 (gap) 始终作为缺失状态，使用启发式 (heuristic) 搜索最简约树，采用 1000 次重复的随机加入 (addseq = random) 寻找最简约树的岛屿 (island) 分布 (Maddison, 1991)，得到的 MP 树见图 3-3；经 Modeltest 3.06 (Posada & Crandall, 1998) 模型测试，选择碱基替代模型 K81uf + I + G 为所有牦牛 mtDNA 单倍型的最适模型，相应的统计学参数：shape=0.6168，Pinvar=0.7074。根据最适模型及参数，使用 PAUP 软件构建的 ML 树如图 3-4 所示；贝叶斯分析产生的系统发育树见图 3-5。

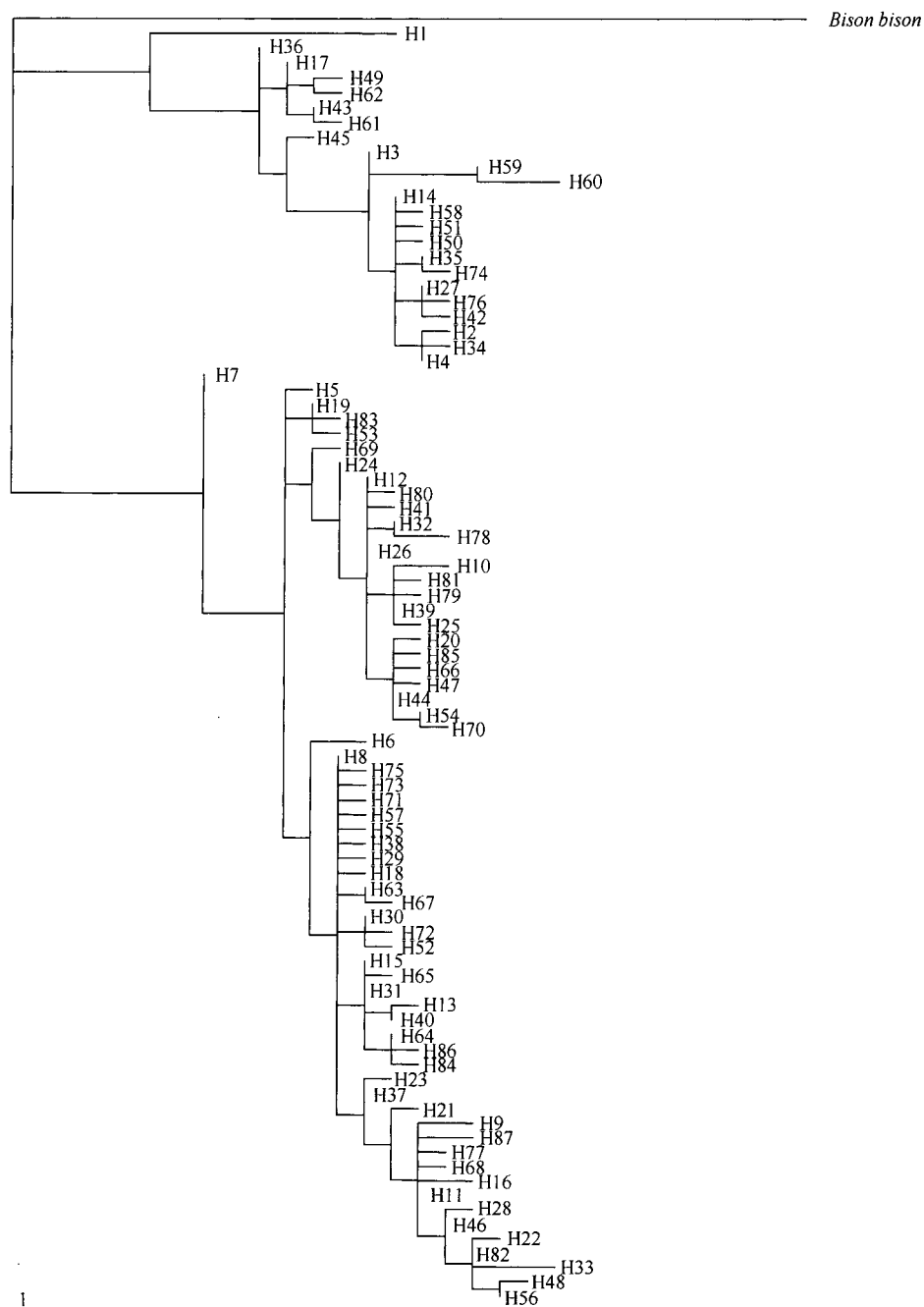


图 3-3 牦牛 MP 系统发育树

从系统发育树可以看出，采用各种方法建立的系统发育树的拓扑结构基本相同，特别是在大支系的划分上完全一致，即 87 个单倍型聚为两个大的母系支

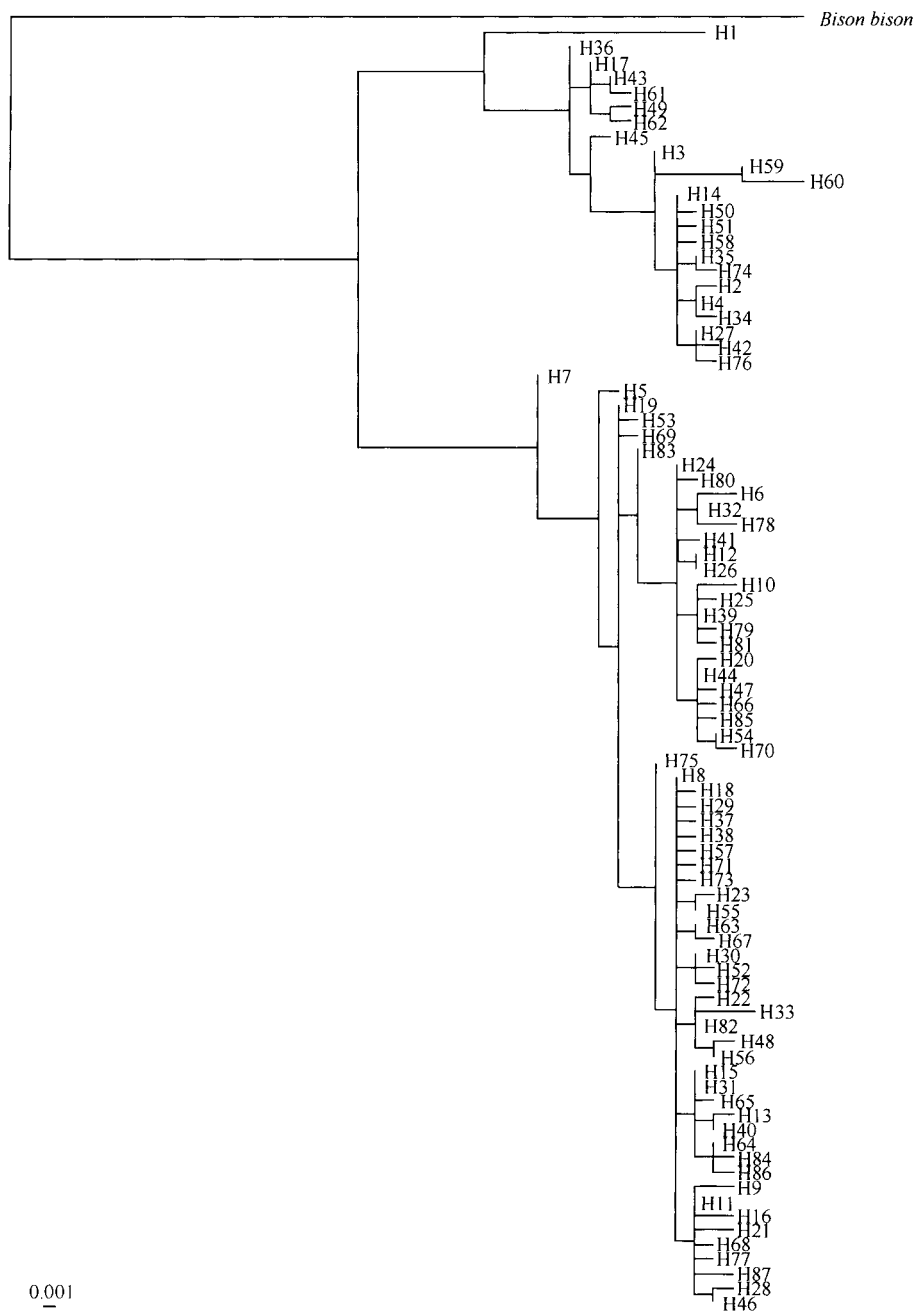


图 3-4 牦牛 ML 系统发育树

(图 3-6)，这与大多数家养动物的多母系起源相符 (Lau et al. , 1998; Luikart et al. , 2001; Troy et al. , 2001; Savolainen et al. , 2002; Jansen et al. , 2002; Kier-

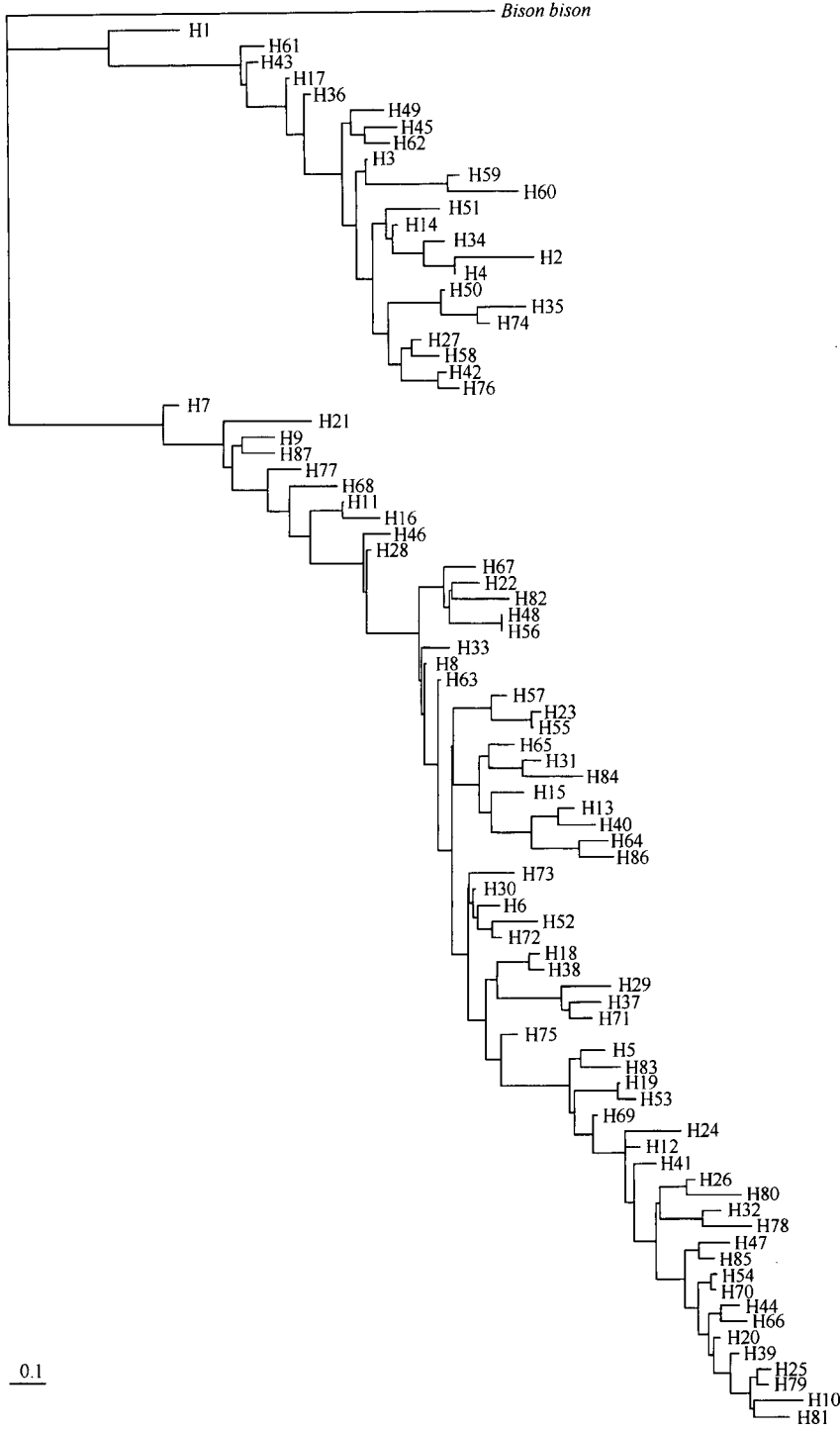


图 3-5 牦牛 Bayesian 系统发育树

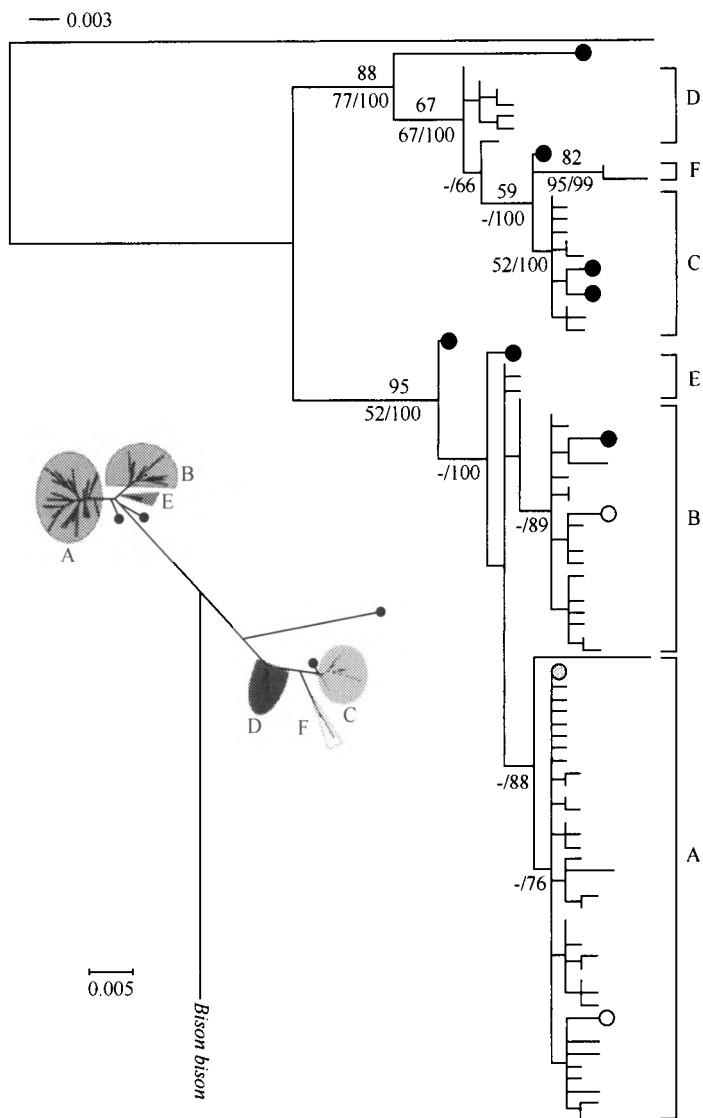


图 3-6 单倍型系统发育一致性树

图中家牦牛单倍型未进行标注；圆圈表示野牦牛单倍型，其中实心圆表示来自同一群体的 8 种野牦牛单倍型，灰色圆代表共享单倍型 H8；空心圆代表其余的野牦牛单倍型，其中灰色空心圆代表共享单倍型 H19；分支上下方数字表示分支置信度

stein et al. , 2004; Larson et al. , 2005; Pedrosa et al. , 2005), 表明“来源于高度分歧的母系”可能代表了家畜(禽)驯化进程的通则(如牛、绵羊、猪、马、狗等)(图 3-7)。图 3-6 为基于以上四种系统进化树的大多数一致性树, 分支上下方数字分别为最大似然自举检验分析值(fast stepwise-addition search, replicate=100)与贝叶斯分析支持率, 显示两个母系支均获得了很高的支持率。

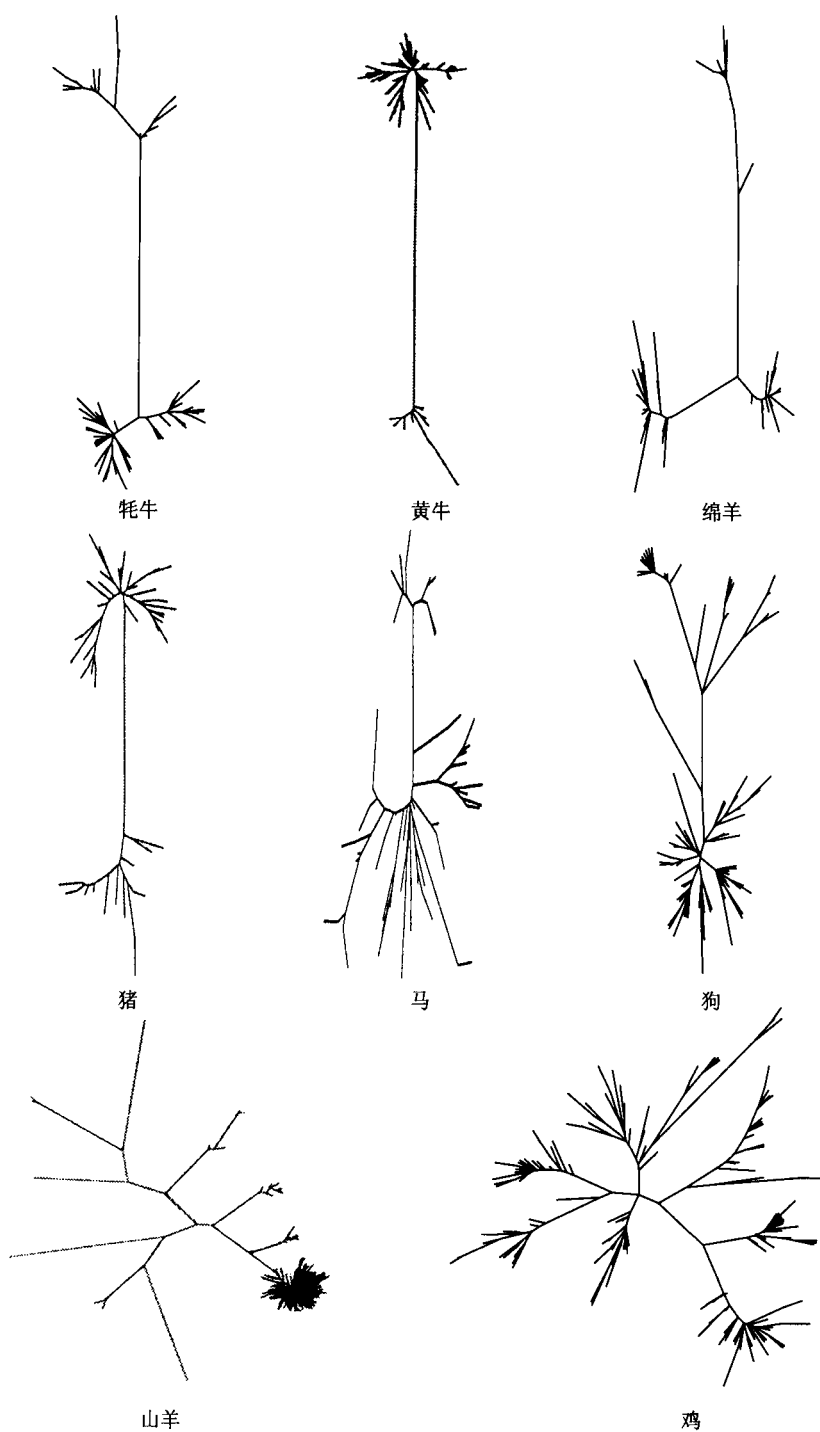


图 3-7 牦牛及其他家养动物的邻接树

由一致性树（图 3-6）可知两个母系支均包含了来自家牦牛、野牦牛的单倍

型类型,且 11 种野牦牛单倍型分散于整个系统发育树中。进一步的分析显示高度分歧的母系分支格局特征亦存在于来自同一群体的 8 头野牦牛(共产生 8 种单倍型)当中,表明家牦牛极有可能起源于一个大的野生群体(基因库)。

4.3 主要分支单倍型网络关系与分支单倍型间变异

根据系统发育拓扑结构,本研究将两大母系支中的单倍型分为 7 个分支(图 3-6),即分支 A、B、C、D、E、F、G,其中分支 A、B、C 获得了很好支持,但其余 4 个分支未能获得较高的支持率,可能与这 4 个分支样本数及单倍型类型较少有关。7 个分支中,分支 A 包含了最多的单倍型种类,占单倍型总数的 43.68% (38/87),其中家牦牛单倍型为 37 种;分支 B 包含了 22.99% 的单倍型数 (20/87),包括 18 种家牦牛单倍型;分支 C 有 12 种单倍型,占单倍型总数的 13.79%,包括 10 种家牦牛单倍型;而分支 D、分支 E、分支 F 3 个分支仅包括 13 种单倍型(单倍型数分别为 7、4、2 种),占单倍型总数的 14.94%。野牦牛单倍型中,有 7 种单倍型分布于分支 A、B、C、E 中(其中 H8、H19 为家牦牛、野牦牛共享单倍型),3 种(H1、H5 与 H7)位于两个母系支基部,1 种(H3)与分支 F 邻接。各群体特异单倍型在分支 A~C 的分布情况均以青海为最高,分别为 16、9 与 4 种。

在近期国内外的研究报道中,采用网络法分析家养动物系统发育关系是最为有效的方法之一。本研究以 Network (Version 4.1.1.2) 程序中 median-joining (Bandelt, 1999) 算法构建的单倍型网络关系图如图 3-8 所示。从网络关系图可知,各分支的主体单倍型数目存在一定差异,分支 C、D、E 均只有一种主体单倍型,分别是 H14、H17、H19,而分支 A、B 存在 2 或 3 种主体单倍型,其中分支 A 的主体单倍型为 H8 与 H11,分支 B 的三种主体单倍型则分别为 H12、H39、H44。根据分支 A 与分支 B 的主体单倍型,相应地将分支 A 分为两个亚支——A1 与 A2,分支 B 分为 B1、B2 与 B3 三个亚支。

假定各主体单倍型为所在分支(亚支)潜在的根,从网络关系图可以看出,主体单倍型到其余单倍型之间的距离均在 4 步突变以内,以 1 步突变居多,2 步突变与 3 步突变次之,而 4 步突变仅发生 1 次(H8 与 H33 之间)。

依据图 3-8 对各省区单倍型之间的突变步数进行计算,可知除分支 D 外,各主要分支中以青海群体的突变方式最为丰富。例如在分支 A 中,青海群体变异步数为 1~7,最大变异发生在单倍型 H33 与 H21、H28 及 H84 之间,而其他省区均小于 7 步;在分支 B 中、C 中,青海群体的最大步数分别为 5 步与 4 步,高于西藏的最大变异步数(均是 3 步)。

4.4 分支地理分布及其与品种(类群)间的相关性分析

6 个分支中,除分支 F 仅包括来自新疆的 2 种单倍型外,其余 5 个分支的地

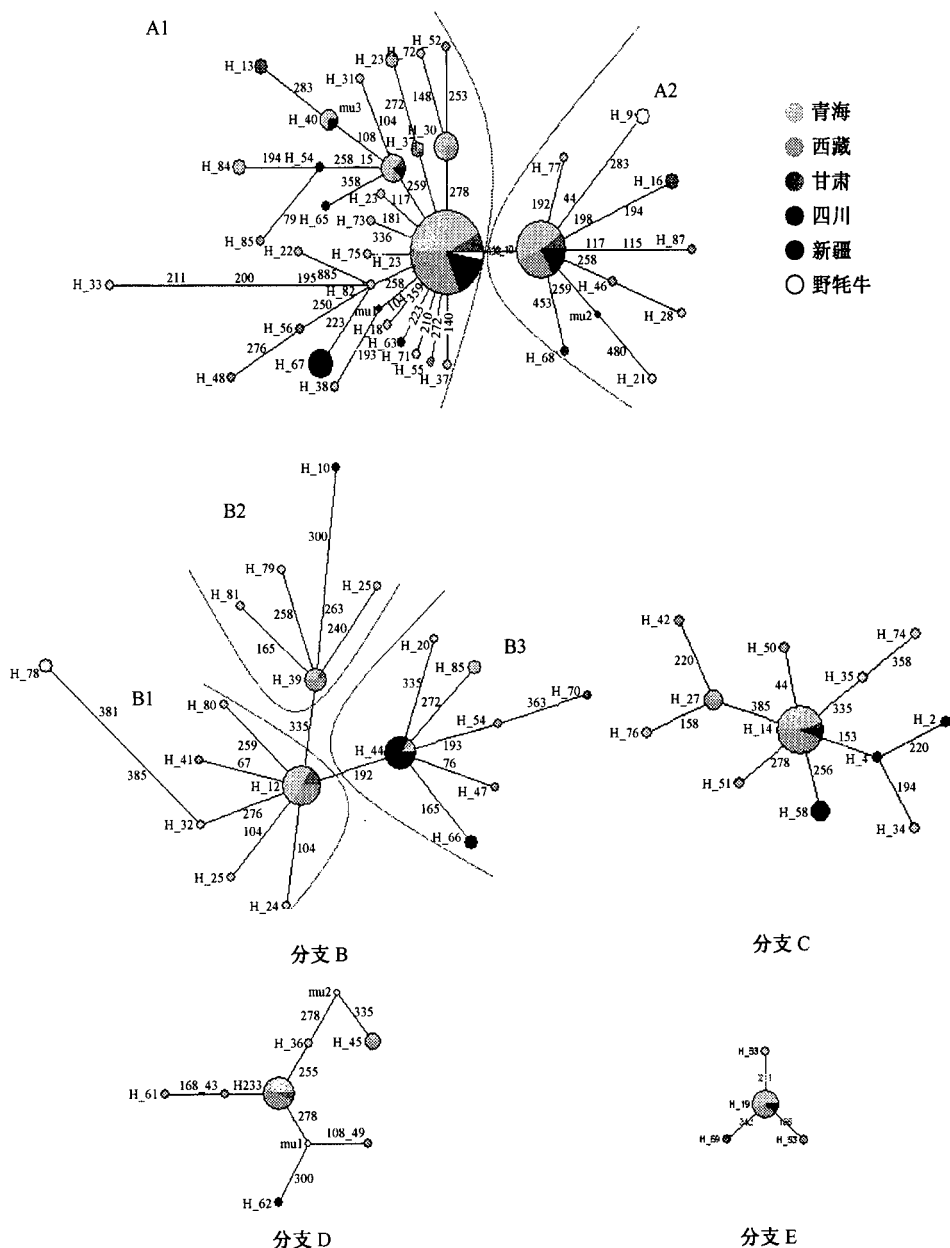


图 3-8 主要分支的单倍型网络关系图 (另见彩版)

连线上数字为突变位点; 圆的大小表示单倍型频率; 颜色表示不同地区或类型

理分布特征为: 分支 A、B 中的单倍型分布最为广泛, 存在于每个地区, 而分支 C、D、E 中的单倍型则分布于除新疆之外的其余四个地区。对各分支所包括的个体数、单倍型数/百分比、特异单倍型数/百分比依照地区分布进行统计, 并列于表 3-7 中。

表 3-7 各分支个体数、单倍型数(频率)、特异单倍型数(频率)地区分布表

类型	样本量	Nh(U)	Hd	分支 A		分支 B		分支 C		分支 D		分支 E		分支 F	
				N(P)	Nh(U)	N(P)	Nh(U)	N(P)	Nh(U)	N(P)	Nh(U)	N(P)	Nh(U)	N(P)	Nh(U)
青海家牦牛	125	46(32)	0.93± 0.01	74(59.2)	22(16)	24(19.2)	13(10)	13(10.4)	6(4)	8(6.4)	3(1)	6(4.8)	2(1)	0	0
西藏家牦牛	80	30(16)	0.91± 0.02	39(48.8)	12(7)	13(16.3)	6(3)	13(16.3)	5(3)	11(13.8)	5(3)	4(5.0)	2(1)	0	0
甘肃家牦牛	23	13(6)	0.93± 0.03	15(65.2)	7(4)	5(21.7)	3(1)	1(4.4)	1(0)	1(4.4)	1(0)	1(4.4)	1(0)	0	0
四川家牦牛	12	8(2)	0.91± 0.06	6(50.0)	4(0)	0	0	4(33.3)	2(1)	1(8.3)	1(1)	1(8.3)	1(0)	0	0
新疆家牦牛	35	10(7)	0.84± 0.03	21(60.0)	6(4)	12(34.3)	2(1)	0	0	0	0	0	0	2(5.7)	2(2)
家牦牛	275	78(77)	0.92± 0.01	155(56.4)	37	54(19.6)	18	31(11.3)	10	21(7.6)	7	12(4.4)	4	2(0.7)	2(2)
野牦牛 小群体(WYP)	8	8(7)	1.0± 0.06	2	1(0)	1	1(1)	2	2(2)	0	0	0	0	0	0
野牦牛	13	10(9)	0.96± 0.04	4	2(1)	2	2(2)	2	2(2)	0	0	0	0	0	0

注: WYP 为来自可可西里地区的野牦牛小群体; 野牦牛包括 8 个样本, 2 个野牦牛标本和可可西里地区西金乌兰湖的 3 个野牦牛样本。

统计数字显示：分支 A 包含了家牦牛序列总数的 56.4% (155/275)，而分支 A、B、C、D 4 个分支则更是涵盖了高达 94.9% (261/275) 的家牦牛序列，构成了绝大多数家牦牛 mtDNA 控制区变异的共同来源。结合图 3-3，可知家牦牛各单倍型分支均存在一个或一个以上分布广、频率高的主体单倍型，而其余单倍型则由这些主体单倍型发散出去，且多为特异单倍型；此外，家牦牛主要分支 A~E 几乎分布于各个省区，且各支在各省区的分布频率大致相近，这与家犬的分支分布特征 Savolainen et al. (2002) 极为类似，而与牛 (Loftus et al., 1994)、山羊 (Luikart et al., 2001)、猪 (Larson et al., 2005)、鸡 (Liu et al., 2006) 的多起源中心不同，表明家牦牛极有可能共同起源于同一基因库。

在品种（类群）的分支分布上，除环湖牦牛仅分布于两母系支中的一支外，其余各家牦牛品种（类群）交错分布于两大分歧母系中（图 3-6、图 3-7、表 3-8），特别是天祝牦牛这一形态上分化明显的品种，其单倍型不是局限于某一支，而是散布于两大母系中，这表明：①说明分支与品种（类群）之间并不存在明显相关，各品种（类群）缺乏独特的遗传基础。②品种（类群）的形态多样化发生于母系分歧之后，这一点已在 Liu 等 (2006) 以鸡为对象的研究中得到了证实。其可能的情况是：在早期的家鸡饲养中，由于人类商贸活动而导致家鸡母系间的广泛交换。然而，该假设成立的前提条件是各分歧世系来自于对不同野生群体的独立驯化事件。对于家牦牛来说，由于任何驯化事件中，作为客体的野牦牛均来自于两大分歧母系，因此，各形态品种（类群）的分散分布主要与祖先野牦牛群体中两大母系的共存状态及其栖息地的区域性有关。此外，即使野牦牛在不同的时间、不同的地点被驯化，由于放牧活动的高流动性，属于不同分支的牦牛仍将产生混合。在 6 个分支中，分支 D、E、F 位于系统发生树的基部，表明这三支较其他三支分化更早。分支 A、B、C、E 四个分支中均包含野牦牛单倍型，而分支 D、F 中无野牦牛单倍型分布，这主要与供试的野牦牛样本较少有关。综上所述，家牦牛品种（类群）的形态多样化发生在稳定的牧业社会建立之后，这也表明家养动物形态学品种（类群）进化与选种压力有关 (Ho & Larson, 2006)。

表 3-8 品种(类群)的分支分布

品种	分支 A	分支 B	分支 C	分支 D	分支 E	分支 F
天祝	9	4		1	1	
大通	17	7	4	2	1	
环湖	5	4				
高原	52	13	9	6	5	
嘉黎	18	5	4	6	3	

续表

品种	分支 A	分支 B	分支 C	分支 D	分支 E	分支 F
斯布	2				1	
帕里	14	4	4	3		
麦哇	2		3			
九龙	4		1	1	1	
巴州	21	12				2

4.5 分支遗传多样性与群体扩张

如表 3-5 所示，我们用 Arlequin 2.000 软件得出家牦牛各分支的核苷酸多样性 (π_n) 表明分支 A 的核苷酸多样度最高，分支 B 次之，而分支 C、D、E 的 π 值较低。若将野牦牛计算在内，则分支 B 的核苷酸多样性最高，这主要是由野牦牛单倍型 H6、H10 与其他单倍型的序列歧异度较大造成的。

种群历史动态对 mtDNA 遗传变异有着深远影响 (Harpending et al., 1998; Reich & Goldstein, 1998; Shriver et al., 1997)，而家养动物在驯化后均会经历一个群体扩张过程 (Savolainen et al., 2002; Luikart et al., 2001; MacHugh et al., 2001; Bradley et al., 1996)。本研究得出的星形发育关系 (图 3-8) 表明家牦牛可能经历过急剧的群体扩张，为此，我们采用 Fu's F 统计 (F_s) (Fu, 1997) 与序列间核苷酸的差异分布 (单倍型歧点分布, mismatch distribution) (Rogers & Harpending, 1992; Rogers, 1995) 分析两种手段对群体在过去是否发生扩张或经受了多重瓶颈效应展开进一步检验。由于分支 F、G 样本数过少，本研究仅对分支 A~E 进行分析。

表 3-9 各分支核苷酸多样性(π_n)及 Fu's F_s 中性检验值

分支	包括野牦牛			不包括野牦牛		
	个体数	π	F_s	个体数	π	F_s
A	159	0.00262±0.00171	-27.888**	155	0.00258±0.00169	-27.906**
B	56	0.00272±0.00178	-16.429**	54	0.00249±0.00167	-14.246**
C	33	0.00180±0.00133	-9.005**	31	0.00163±0.00124	-6.583**
D	18	0.00136±0.00112	-2.916**	18	0.00136±0.00112	-2.916**
E	12	0.00079±0.00061	-2.124**	12	0.00079±0.00061	-2.124**

** Fu's F_s 统计检验显著水平 ($P<0.01$)。

中性检验表明，F 统计检验值在家牦牛的 5 个主要分支 (分支 A~E) 均为负数，依次为 -27.906、-14.246、-6.583、-2.916、-2.124 (表 3-9)，表

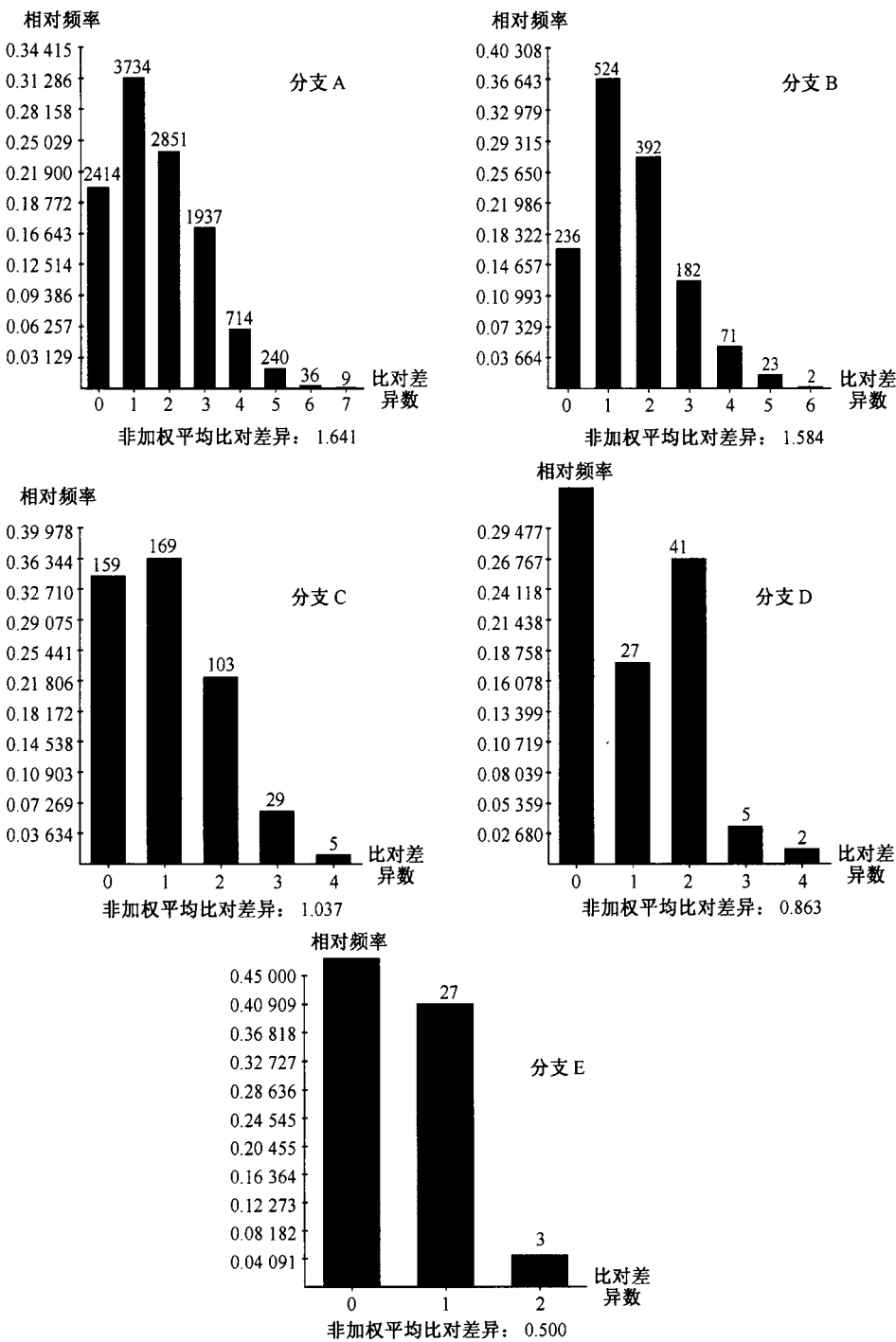


图 3-9 分支的单倍型歧点分布分析

明五个分支均极显著地偏离中性突变 ($P < 0.01$) (表 3-9)。一般认为: 单倍型歧点曲线呈单峰分布 (unimodal), 且 F_s 中性检验显著偏离中性突变, 则群体在过去经历了扩张; 如果单倍型歧点分布曲线呈现多峰 (multimodal) 分布, 且 F_s 检验不显著, 则群体大小保持稳定或者经受了多重瓶颈效应 (Tajima, 1989; Roger & Harpending, 1992; Fu, 1997)。我们随即对以上分支进行单倍型歧点分布分析, 单倍型歧点分布结果显示分支 A、B、C、E 均为单峰分布 (图 3-9), 与 Fu's F_s 中性检验结果相符。根据上述检验结果, 我们认为分支 A、B、C、E 曾经历过种群爆发。

4.6 驯化历史

遗传物质 DNA 为我们研究家养动物的起源问题提供了另一有力的工具。分子钟理论假定进化过程中各进化单元的 DNA 突变速率大致保持恒定。基本的估计分子时间的方法是: 计算出物种之间的遗传距离, 然后以校正的突变速率将该遗传距离转换为时间 (Forster et al., 1996; Bromham & Penny, 2003)。本研究以牦牛与美洲野牛之间的分歧来计算突变速率。

根据化石记录, 牦牛与美洲野牛 (*Bison bison*) 之间的分歧时间约为 180 万年 (Flerow, 1980; Hassanin & Ropiquet, 2004)。据此, 我们得到宽松分子钟条件下牦牛所测区段的突变速率为 14.6%/Ma (稳定种群模式下) 或 19.3%/Ma (指数增长种群模式下) (表 3-10), 而两大母系分支的溯祖时间则分别为 131 ka 和 109 ka。

表 3-10 突变速率与溯祖时间

	恒定种群			指数增长		
	下限	平均	上限	下限	平均	上限
root height (kyr)	104.46	131.38	157.45	86.77	109.36	131.59
Ln (posterior)	-1853.44	-1889.38	-1927.60	-1899.76	-1862.21	-1826.97
位点模型 α	0.18	0.69	1.38	0.19	0.61	1.3
位点模型 pInv	0.60	0.72	0.83	0.58	0.70	0.80
突变率 (%/Ma)	9.1	14.6	21.0	11.9	19.3	28.2

采用平均突变距离 (mean mutational distance) 来推算一组个体的核苷酸序列的溯祖时间 (coalescent time), 进而估算出最近共同祖先 (most recent common ancestor, MRCA) 的年代, 这是目前人类起源、进化研究中用于推算群体年龄的最为常用和相对准确的方法。由于驯化通常伴随着群体的扩张, 因此可以依据主体序列与衍生序列之间的平均突变距离并结合标准突变速率来估计驯化发生的时间。

假定分支 A 最初起源于两种野牦牛单倍型，分支 B 起源于三种野牦牛单倍型（图 3-8），参照 Savolainen 等（2002）的计算方法，我们获得各分支（亚支）单倍型与主体单倍型之间的平均突变距离。在分支 A 中，A1、A2 亚支的平均突变距离分别为 0.76 ± 0.09 与 0.44 ± 0.12 ；分支 B 中，B1、B2 与 B3 的平均突变距离为 0.54 ± 0.09 、 0.50 ± 0.22 和 0.45 ± 0.14 ；其余 3 个分支，分支 C、分支 D 与分支 E 的平均突变距离则分别为 0.61 ± 0.13 、 0.44 ± 0.18 和 0.25 ± 0.13 。根据平均突变距离，引入稳定种群模式下（19.3%/Ma）、指数增长种群模式下（19.3%/Ma）的突变速率和美洲野牛 D 环区突变速率（32%/Ma）（Shapiro et al.，2004），我们得到各分支的驯化时间如表 3-11 所示。从该表可知，最早的驯化大致发生在 8000~10 000 年，即全新世早期。

表 3-11 各分支(亚支)突变距离

分支	到中节点的突变距离(平均± S. E.)	平均突变率/(%/Ma)		
		14.6 (恒定种群)	19.3 (指数增长)	32(bison,30)
A1	0.76 ± 0.09	8360 ± 900 年	6080 ± 720 年	3728 ± 441 年
A2	0.44 ± 0.12	4840 ± 1320 年	3930 ± 960 年	2158 ± 589 年
B1	0.54 ± 0.09	5940 ± 900 年	4320 ± 720 年	2649 ± 441 年
B2	0.50 ± 0.22	5500 ± 2420 年	4000 ± 1760 年	2453 ± 1079 年
B3	0.45 ± 0.14	4950 ± 1540 年	3600 ± 1120 年	2207 ± 687 年
C	0.61 ± 0.13	6710 ± 1430 年	4880 ± 1040 年	2992 ± 638 年
D	0.44 ± 0.18	4840 ± 3080 年	3920 ± 1440 年	2158 ± 883 年
E	0.25 ± 0.13	2750 ± 1430 年	2000 ± 1040 年	1226 ± 638 年

通常认为，首先被驯化的家养动物群体与随后扩散所形成的群体相比，在遗传结构上存在明显的差别（Savolainen et al.，2002）。主要表现在以下几个方面：①单倍型多样性不同，起源地的群体单倍型类型最为丰富；②单倍型间的变异程度不同，起源地的单倍型应该具有更大的变异、更丰富的变异方式；③单倍型的共享程度不同，起源地具有更多的特异单倍型；④单倍型的网络结构的复杂度不同，起源地的单倍型网络结构相对较为复杂；⑤群体的形成时间不同。

由于分支 A 的形成时间最早、关系最为复杂，因此，我们将分支 A 作为重点进行分析。由结果与分析部分可知，在分支 A 中，青海群体拥有最为丰富的单倍型种类（31 种）、单倍型多样性（0.8252）；单倍型间变异程度也以青海群体为最大，突变步数从 1 步到 7 步，且最大变异以较高频次发生（3 次）；此外，在分支 A，青海群体的特异单倍型种类高达 16，大于其他群体（表 3-7、图 3-8）。综合以上分析，可知分支 A 中的青海家牦牛存在如下特征：①单倍型和特异单倍型多，单倍型多样性高；②单倍型之间变异程度大；③在网络关系图中

分布范围广、覆盖度大。与其他家畜（禽）类似（Troy et al., 2001; Savolainen et al., 2002; Beja-Pereira et al., 2004; Larson et al., 2005; Liu et al., 2006）。以上特征符合“起源中心拥有最大的遗传多样性，并且随群体的向外迁移，群体的多样性不断降低”的一般规律。因此，我们推断家牦牛分支 A 的起源地为青海。类似地，我们从分支 B、C 也得到了相同的结论。此外，从第二节的分析可知：青海地区家牦牛单倍型多样性（表 3-2）要高于其他省区。因此，以上结果符合《中国牛品种志》中“牦牛为单元来源说，而无他论”这一结论。综上所述，我们推断：家牦牛起源于青海，即青藏高原东部地区。这也与 Qi (2004) 根据微卫星及 mtDNA 遗传标记获得的研究结论相符。

尽管家牦牛来自于单一基因库，但在牦牛驯化事件是多次发生还是单次发生这一问题上，我们的数据仍没有一个确切的结论。假设现存家牦牛来源于单次驯化事件，那么所有分支应该具有相似的遗传方式及种群爆发时间。然而，家牦牛各分（亚）支的爆发时间存在较大差异，以分支 A 的爆发时间最早，分支 E 最晚。因此，我们的研究结果显然倾向于前者，即家牦牛来源于同一基因库在不同时期的多次驯化事件。即便如此，由于野牦牛数量有限，我们仍无法弄清究竟有多少野牦牛单倍型参与到各分支的建群中，由此造成的建群单倍型数目差异无疑会影响到各分支的网络关系格局，进而影响时间计算。以分支 A 为例，在所有分（亚）支中，A1 是最早驯化的亚支，然而网络关系格局暗示一个以上的单倍型参与了该亚支的最初建群，如将其进一步细分无疑将降低该亚支的（驯化）估算时间。以上也表明，在能获得更多野牦牛、家牦牛样本的前提下，驯化事件是多次发生还是单次发生将得到确证。

尽管在多次或单次驯化问题上无法得到确切结论，但无论是哪种情况，我们仍可以估算出大多数建群单倍型的爆发时间大约在 8000~12 000 年前，处于末次冰盛（last glacial maximum, LGM）期（18~23 ka）之后，与家犬的驯化时间大体一致（Savolainen et al., 2002）。值得注意的是，牦牛的驯化时间与最后冰盛期后青藏高原气候转暖的时间相符。根据古里雅冰芯 $\delta^{18}\text{O}$ 值记录，16~10 ka 是气候波动变暖，向全新世过渡的冰消阶段；紧接着在经历短暂的新仙女木事件（降温）后，末次冰期结束进入全新世（姚檀栋等，1997；孙鸿烈等，1998；郑度等，2004）。气候变暖导致：①冰期后人类进入青藏高原成为可能。②升温对植物生长条件的改善产生了重要影响，使牦牛的食物问题得到解决。已有研究表明青藏高原东北边缘在 16~12 ka 间草原草甸植被已逐渐恢复，部分出现灌丛草甸；稍后至 11 ka 植被进一步改善，甚至出现了岛状森林（王富葆等，1995）。③由于牦牛的特殊生活习性，冰期结束后，牦牛原有分布地区的温度升高，不适合牦牛生活，牦牛开始从这些地区消失，并局限分布在比较寒冷的青藏高原。

在牦牛驯化时间与地点这一问题上, 我们的结论也得到了其他方面证据的支持。在 12 000 年甚至更早以前, 狩猎者(民族)对青藏高原的冰期后再殖民活动起始于高原东北部(青海)(Brantingham et al., 2003), 10 000 年前结束于西藏地区(Brantingham et al., 2001), 以上表明早期的牦牛驯化活动极有可能起始于青海地区, 牦牛畜牧业文明也因人类活动范围的扩大而传播到周边地区, 这也与来自 mtDNA、Y 染色体的研究结果——藏族来源于北亚、中亚及西伯利亚地区(Qian et al., 2000)相符。近几十年来, 随着考古的发掘, 与牦牛有关的文物(距今 5000~10 000 年)数量增长了好几倍, 表明该时期的牦牛生产已达到相当规模; 蔡立先生(1989)也认为在 4500 年前, 青藏高原上就已建立较好的牧业体系。尤为有趣的是, 家牦牛主要分支(A、B、C)的驯化时间与全新世早期青藏高原东部植被快速演替的时间大体一致, 冰期后青藏高原上森林被高山草地植被迅速替代的原因仍未可知(Zhang et al., 2005), 牦牛的驯养可能是导致森林消失的主要原因之一。因此, 这为研究青藏高原生态系统的形成历史, 特别是近万年来人类活动以及气候变化如何影响该地区生态系统的演变提供了一个全新的方向, 对追溯青藏高原地区人类活动、文明史等具有重要价值。

综上所述, 本研究在综合种群统计、考古与地质资料的基础上, 对牦牛高度分歧母系的特征、成因及牦牛驯化历史进行了深入分析与探讨。然而, 要阐明牦牛高度分歧母系及野牦牛中分支的具体形成过程, 还有待对更多的野牦牛样本进行分析; 而更多的考古学证据无疑将有助于我们对家牦牛驯化过程进行更详细的阐述。

此外, 尽管有蹄家养动物呈现出多母系起源的共同特征, 但它们各自的种群统计历史显然比预期更为复杂多变。长久以来, 人们普遍认为家养动物的首次驯化发生于近东(Harris, 1996), 然而, 实际情况并非如此, 人类对家养动物的驯化活动发生于世界的不同地区, 如家犬起源于东亚(Savolainen et al., 2002); 山羊起源于近东和中东地区(Luikart et al., 2001); 家驴起源于非洲(Beja-Pereira et al., 2004); 家猪、马均起源于亚欧大陆的多个野生种群(Jansen et al., 2002; Larson et al., 2005)。从以上及本次研究可知: 随着冰期后的再殖民活动, 人类对有蹄动物野生种群的驯化已成为当时的一种普遍现象, 即使在环境、气候条件极为恶劣的青藏高原也不例外, 而由于人类的迁移, 这些动物也得以扩散到其他地区甚至全世界。

5 主要结论

(1) 与大多数家养动物类似, 我国家牦牛起源于两个高度分歧的母系。与其他家养动物不同的是, 这两个高度分歧的母系来自同一个大的基因库, 而不是遗传上的不连续群体。

(2) 参与家牦牛建群的母系数量为 7 个。其中分支 A 存在 2 个建群者, 分

支 B 存在 3 个建群者，其余各母系均只有一个建群者。分支与品种（类群）间无明显相关性，各品种（类群）缺乏独特的遗传基础。

(3) 分子数据显示家牦牛的起源地为青海省，大致的驯化时间为距今 8000~10 000 年。

第四节 牦牛的分类学地位及起源研究：mtDNA
D 环序列的分析

牦牛 (*Bos grunniens*) 是牛亚科动物中的稀有种，其分类学研究受到国内外生物学家的广泛关注，但是如前所述（第一节），关于牦牛的属级分类仍然存在很大的争议。因此，选择适当的基因片段进一步从 DNA 水平开展牦牛的分类学位置研究具有深远意义。

相对于细胞色素 *b* (Cyt *b*)、12S rRNA 等线粒体编码基因多用于探讨动物种以上分类等级的系统发育关系 (Kuznetsov, 2002; Hassanin & Ropiquet, 2004)，mtDNA 控制区 (D 环) 主要是用于种以下的种群遗传、谱系关系和谱系地理学 (phylogeography) 的研究 (如 Troy et al., 2001; Jansen et al., 2002; Savolainen et al., 2002; Liu et al., 2006)。由于利用 Cyt *b* 建立的牛亚科或牛族部分物种的系统发育关系没有得到很好地区分，而灭绝种草原野牛又未获得 Cyt *b* 的全序列，因而牛族的系统发育以及现存种与灭绝种之间的亲缘关系仍需要进一步从其他分子片段进行深入研究。本研究尝试利用变异速率较快的 D 环构建牛族的系统发育树，在此基础上探讨牦牛、美洲野牛以及灭绝种草原野牛之间的系统关系，为牦牛的分类地位及起源提供分子遗传学证据。

1 实验材料

我们在本研究中使用了两头家牦牛的肌肉组织和一头野牦牛的皮张组织作为实验材料，其中家牦牛分别采自青海玉树县与西藏日喀则，野牦牛采自可可西里地区。其余物种的 D 环序列下载于 GenBank，各基因序列号见表 3-12。

表 3-12 研究物种、D 环序列 GenBank 登录号

分类	种名	登录号(D 环)
牛科, 羊亚种, 山羊属 Bovi- dae, Caprinae, <i>Capra</i>	野山羊 <i>Capra aegagrus</i>	AB110591
牛科, 羊亚种, 山羊属 Bovi- dae, Caprinae, <i>Capra</i>	山羊 <i>Capra hircus</i>	DQ121611
中科, 牛亚科 Bovidae, Bovinae		

续表

分类	种名	登录号(D 环)
牛族,野牛属 Bovini, <i>Bison</i>	美洲野牛 <i>Bison bison</i>	U12948,U12959
	欧洲野牛 <i>B. bonasus</i>	AF083356
	草原野牛 <i>B. priscus</i>	AY748659,AY748663
牛族,牛属 Bovini, <i>Bos</i>	瘤牛 <i>Bos indicus</i>	L27714,L27733
	家牛 <i>B. taurus</i>	AY378117,AF409056
	大额牛 <i>B. frontalis</i>	AF405068
	印度野牛 <i>B. gaurus</i>	AF485067
	野牦牛 <i>B. grunniens</i>	DQ139204 *
	家牦牛 <i>B. grunniens</i>	DQ139009 *,DQ139176 *
	爪哇野牛 <i>B. javanicus</i> - <i>Banteng</i>	AF162490
	原始牛 <i>B. primigenius</i>	AF162488
牛族,水牛属 Bovini, <i>Bubalus</i>	印度水牛 <i>Bubalus bubalis</i>	AF475239,AF475170
蓝牛羚族,蓝牛羚属 <i>Boselaphini</i> , <i>Boselaphus</i>	蓝牛 <i>Boselaphus tragocamelus</i>	AJ235316

* 为本次新测序列。

2 实验方法

同第二节实验方法部分。

3 数据处理

牛亚科动物的分族采用 Simpson (1945)、Vaughanet 等 (1978) 根据形态所做的分类标准进行划分。序列经 Clustal X (1.8) (Thompson et al. , 1997) 软件排序,再适当手动校对。以 Dna SP3.0 (Rozas & Rozas, 1999) 进行多态位点分析,并在 Modeltest 3.06 (Posada & Crandall, 1998) 上进行模型测试,最后采用 PAUP* 4.0b10 进行系统发育分析。采用启发式搜索 (heuristic search),以最大简约法 (maximum Parsimony, MP)、最大似然法 (maximum Likelihood, ML) 重建系统发生树,MP 树各节点的置信度以自举检验分析 Bootstrap 进行 1000 次重复;在 ML 树中则为 200 次重复。此外,本研究还采用 Mrbayes 3.0b4 (Huelsenbeck & Ronquist, 2004) 以贝叶斯法构建系统发育树 (参数为: Nst=6, rate=gamma, ngen=5000 000, nchains=6, printfreq=1000, samplefreq=100)。

4 结果

4.1 系统发育关系

牦牛 D 环区全长 892 bp 左右。本实验所测为牦牛线粒体 D 环区部分碱基序列, 长度为 637 bp, 与 GenBank 下载序列 (表 3-12) 排序后得到 605 bp 可比较序列, 其中可分析长度为 480 bp (空位作为缺失处理), 包括 190 个突变位点, 其中简约信息位点 161 个, 为总长的 39.58%。以野山羊 (*Capra aegagrus*) 和山羊 (*C. hircus*) 为外群构建了牛族包括灭绝种草原野牛在内的 11 个种 18 个个体以及蓝牛羚族 (*Boselaphini*) 中蓝牛 (*Boselaphus tragocamelus*) 的系统发育树。其中, 启发式搜索得到 1 个最简约树, length = 553; 采用最适模型 (GTR+I) 构建最大似然树, 其 $-\ln L = 3211.22$; 此外, 获得 1 个 50% 一致性贝叶斯树。图 3-10 为基于以上 3 种系统树的大多数一致性树。

4.2 牛族的系统发育及牦牛的分类学地位与起源

从图 3-10 可知, 蓝牛羚族的蓝牛羚作为牛族的姐妹支, 获得了较高的支持率, 该节点的 MP、ML 支持率及 Bayesian 后验概率均为 100%。牛族分支中所有物种组成一个单系群, 获得了很好的统计支持, 其 MP、ML 支持率分别为 80% 与 91%, Bayesian 后验概率则高达 100%。从图 3-10 可知: 牛族中水牛属最早分化出来, 形成一个独立的分支; 另一支则由野牛属与牛属的物种组成。在野牛属—牛属分支上, 牛属的四个物种大额牛 (*B. frontalis*)、印度野牛 (*B. gaurus*)、爪哇野牛 (*B. javanicus*) 和原始牛 (*B. primigenius*) 组成一个亚分支, 为其余野牛属、牛属物种的姐妹群, 该分支的 MP、ML 及 Bayesian 支持率分别为 90%、98% 与 100%。另一亚分支上, 瘤牛 (*B. indicus*)、家牛 (*B. taurus*) 和欧洲野牛 (*B. bonasus*) 组成一个单系群, 与 Hassanin 和 Ropiquet (2004) 的研究结果相符, 且瘤牛的一个个体和家牛结合在一起; 而牦牛、草原野牛和美洲野牛结合成单系群, 其中牦牛的个体形成独立分支, 草原野牛与美洲野牛组成另一分支, 且草原野牛的一个个体和美洲野牛聚成的分支结合在一起, 并得到较高统计支持。

系统发育关系显示牛族中水牛属最早分化出来, 然后是牛属—欧洲野牛与牦牛—美洲野牛支的分歧。同时, 系统发育树表明欧洲野牛与瘤牛、家牛的亲缘关系最近, 美洲野牛与牦牛之间亲缘关系较近, 以上研究结果与前人的结论基本一致 (Bohlken, 1958, 1961; Groves 1981; Miyamoto et al., 1989; Wall et al., 1992; Ward et al., 2000; Boyd, 2003; Hassanin & Ropiquet, 2004)。综合这些研究结果, 由于野牛属、牛属均不是单系, 但野牛属和牛属共同构成单系群,

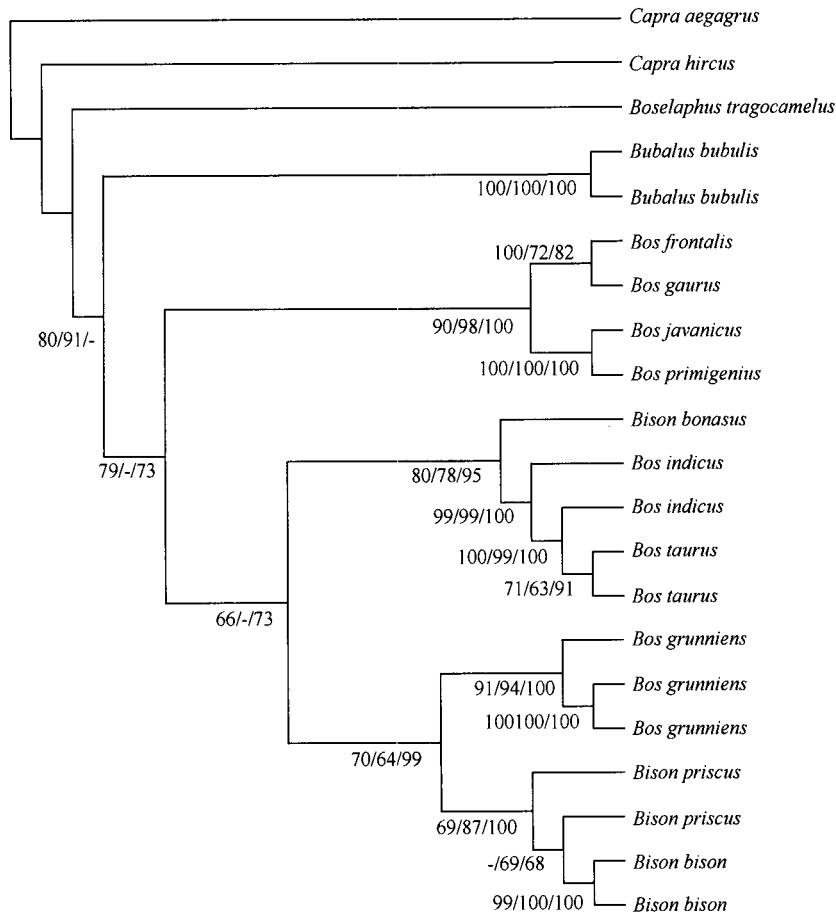


图 3-10 基于 D 环部分序列的牛亚科 12 个种系统发育树

节点数值依次为 MP、ML 自举检验分析的支持率（MP 与 ML）以及贝叶斯后验概率

因此，将这两个属合并为一个属可能更为合理。同时，我们的研究结果也不支持将牦牛作为一个独立属（Olsen, 1990）的分类意见。系统发育分析中，牛族作为一个单系群，获得了较高的统计支持，但牛族以外仅有一个类群参与分析，因此，该族在牛亚科更多类群参与的分析中是否仍保持为单系还值得进一步研究。

草原野牛曾广泛分布于全北区，引起包括草原野牛在内的大型动物灭绝的主要原因可能与人类活动及气候变化有关（Alroy, 2001; Guthrie, 2003; Brook & Bowman, 2004; Shapiro et al., 2004）。美洲野牛系分布于北美地区的野牛属现存物种，关于其进化存在多种理论（COSEWIC, 2004），较为一致的观点是：草原野牛曾至少两次通过白令陆桥进入北美地区——分别发生于伊里诺冰期（始于约 60 万年前）与威斯康星冰期（约 9 万年前），在气候变化、地理隔离等因素作用下，进入北美的草原野牛发生分化并演化为现今美洲野牛的两个亚种

(van Zyll de Jong, 1986, 1993)。我们以 D 环序列构建的包括灭绝物种草原野牛在内的牛族 11 个物种的系统发育树显示草原野牛的一个个体与美洲野牛结合在一起, 表明美洲野牛有可能起源于草原野牛, 与 van Zyll de Jong (1986, 1993) 的观点相符。

化石记录表明牦牛的祖先——原始牦牛曾广泛分布于内蒙古、中国北部、东西伯利亚、阿拉斯加和中亚北部 (Weiner, 2003)。来自化石及分子标记的资料表明牦牛与野牛的分化发生于 180 万年前 (Flerow, 1980; Hassanin & Ropiquet, 2004), 晚于牦牛与其他物种的分化时间。我们以 D 环部分序列构建的系统发育树显示牦牛、草原野牛及美洲野牛具有最近共同祖先, 与上述研究结果相符。第四纪的欧亚大陆气候反复波动, 造成物种分布在不同的冰川 (或冰期) 避难所, 或者气候变化造成物种占据不同的生态位, 进而发生物种分化 (Hewitt, 1996)。牦牛和野牛之间的分化可能发生在欧亚大陆, 与气温下降、冰川发育形成不同的生态位有关。第三纪以后, 由于受第四纪冰川的作用, 致使牦牛的近祖向南迁移而进入现在的青藏高原地带, 演化为现今野牦牛的分布区域, 并在欧亚大陆的东北部灭绝 (蔡立, 1992)。

4.3 D 环序列在高级分类单位系统发育分析中的意义

Cyt *b*、12S rRNA 等线粒体编码基因变异较慢, 常用于动物种以上分类等级的系统发育关系重建; 而 D 环序列因变异较快, 主要用于种下水平的谱系关系和谱系地理学研究。在 Hassanin 和 Ropiquet (2004) 利用 Cyt *b* 序列构建的牛亚科部分物种的系统树中, 欧洲野牛—家牛—瘤牛支的 MP Bootstrap 支持率、Bayesian 后验概率分别为 70%、92%; 而以 D 环构建的系统树则分别达到了 80%、95%。此外, 仅以 Cyt *b* 构建的系统发育树中, 牛族的单系关系未能得到支持 (Hassanin & Douzery, 1999)。而我们以 D 环部分序列得到的系统发育关系显示: ①蓝牛羚族的蓝牛羚作为牛族的姐妹支获得了有力支持; ②尽管没有更多牛族以外的类群参与分析, 系统发育分析表明水牛属与牛属、野牛属形成单系群 (MP、ML 支持率及 Bayesian 后验概率分别达 80%、91% 和 100%), 是牛族的自然成员, 这与形态上的证据相吻合 (Simpson et al., 1945; Ansell, 1971)。基于以上结果, 我们认为线粒体控制区与 Cyt *b* 基因序列在构建牛族的系统发育具有同样重要的价值, 能构建分辨率更高的系统进化树。

近年来, 动物分类学家越来越重视获得灭绝动物的 DNA 信息, 并以此来解决一些仅用形态学信息、历史记录及现存物种 DNA 无法解决的分類与进化问题。迄今为止, 已经对十几种灭绝动物的 DNA 进行了研究, 并取得了丰硕的成果 (Hanni et al., 1994; Hoss & Paabo, 1996)。然而, 灭绝种往往较难扩增和测序较长的 DNA 序列, 而哺乳动物线粒体 D 环相对较短, 能较为容易地扩增

和测序 (Krings et al. , 1997, 1999; Ovchinnikov et al. , 2000), 且具有更快突变速率与更高的解析力, 对研究灭绝动物与野牛现存种之间的系统发育与进化关系具有重要的应用前景。在本研究中, 我们根据 D 环部分序列构建的系统发育树, 推测草原野牛可能是美洲野牛的直接祖先, 为草原野牛的系统发育关系提供了初步的分子遗传学证据。

5 主要结论

在分类学位置上, 本研究不支持将牦牛作为一独立属; 同时, 由于牦牛 (*Bison grunniens*) 与美洲野牛 (*B. bison*) 具有最近的亲缘关系, 且野牛属与牛属构成单系群, 因此, 宜将这两个属合并为一个属, 并将牦牛纳入该属。

本章以具有高能量代谢水平和高产热能力的青藏高原特有种鼠兔为研究对象，从调节能量代谢的关键因子 leptin 蛋白为切入点，探讨了鼠兔 leptin 蛋白的分子特征及表达特征，同时分析了青藏高原的环境压力与鼠兔 leptin 蛋白进化之间的关系。研究结果显示：鼠兔 leptin 蛋白中存在 20 个正向选择位点（即适应性功能进化位点），其中 9 个位点发生于 leptin 蛋白的关键功能区；寒冷而非低氧是驱动鼠兔 leptin 蛋白发生适应性进化的重要环境因子；随着鼠兔分布海拔高度增加，体内 *ob* 基因的表达量增加。首次提出一个观点：“在青藏高原极端压力环境下，经过长期自然选择，鼠兔 leptin 蛋白可能发生了适应性功能进化，可能产生了新的功能或原有功能的加强”。这种进化及表达特征提示我们 leptin 蛋白可能在鼠兔适应极端高原环境具有重要的生态学意义。

第四章 鼠兔对青藏高原高寒环境生态适应机制研究

环境压力可以加速特定压力敏感蛋白的进化速率,创建针对这种特定环境下新的功能或原有功能的加强,从而提高动物对这种压力环境的适合度。鼠兔作为现代全北区特有物种,呈现出特殊的分布现象:在全球现存的 26 种鼠兔中,除 3 种之外,其余均分布于亚洲,其中大部分分布于青藏高原,占全球鼠兔种类的 80% 以上,且几乎所有鼠兔都分布于高海拔或高纬度的寒冷地区,是一种典型的冷适应动物。高氧利用率、高基础代谢率、高产热能力是高原鼠兔对高寒低氧高原环境最明显的适应特征。leptin 蛋白是白色脂肪组织分泌的激素,在维持机体能量平衡中起到关键作用。

关于鼠兔 leptin 与鼠兔这种高能量代谢水平及高产热能力的生存特征之间的关系,目前还不十分清楚,然而这一问题却是研究高原鼠兔对青藏高原极端环境压力的生态适应机制的重要内容之一。鉴于鼠兔在青藏高原极端环境下所表现出明显的能量代谢特征及其对低温低氧环境的敏感性,以及 leptin 在调节能量代谢中所起的重要作用,我们推测 leptin 可能作为一种低温敏感蛋白,在鼠兔对高寒低氧的高原环境的生态适应中起到了重要的作用。关于鼠兔 leptin 的分子特征及其在鼠兔适应极端的青藏高原环境压力下的作用机制目前还不十分清楚。在长期的生物进化过程中,青藏高原极端的环境压力是否引起高原鼠兔 leptin 发生了适应性功能进化?也就是说这种压力环境是否赋予了高原鼠兔 leptin 新的功能或原有功能的增加?以上也是高原鼠兔生态适应机制研究中的关键所在。

本研究就鼠兔 leptin 的分子特征、分子进化及其在不同海拔的生存环境下的表达特征以及不同组织的分布等方面展开深入的研究,目的在于全面揭示鼠兔 leptin 的特征,为进一步研究鼠兔对青藏高原极端压力环境生态适应机制奠定基础。

第一节 鼠兔对青藏高原高寒环境的生态适应

生物生存在一定的环境中。一方面,其生存时时刻刻受到环境的制约和影响,面对改变的环境,绝大部分生物均能做出适应性的调整,从而在适应中达到物种发展与进化的目的;另一方面,环境也会因为生物的存在而发生或大或小的变化,在环境变化与生物适应进化的交互发展中,生命得以延续。从生物的生态适应角度来讲,生物在与环境长期相互作用中,形成了与其特定生存环境相适应的具有重要生存意义的特征。根据这些特征,生物能够免受各种环境因素的不利

影响与伤害,同时还能更为有效地从其生境中获取所需的物质和能量,以维持生存繁殖的正常进行。

1 动物对低温环境的生态适应

温度是一种重要的生态因子,任何生物都生活在具有一定温度的外界环境并受环境变化的影响。地球表面的温度条件总是在不断变化的,在空间上随纬度、海拔高度、生态系统的垂直高度和各种小生境而变化;在时间上温度随一年四季和一天昼夜变化而变化。这些变化都会给生物带来深刻的影响。生物体内的生物化学过程必须在一定的温度范围内才能正常进行。一般来说,生物体内的生理生化反应会随着温度的升高而加快,从而加速生长发育;生化反应也会随着温度的下降而变缓,从而减慢生长发育。当环境温度高于或低于生物所能耐受的温度范围时,生物的生长发育就会受阻,甚至死亡。虽然生物只能生活在一定的温度范围内,但不同生物和同一生物的不同发育阶段所能耐受的温度范围却有很大不同。生物所能耐受的温度范围是由于它们长期生活在一定的温度下所形成的一种生理适应反应。(戈峰,2005)。

生活在低温环境下的生物通过自然选择,在行为、形态、生理等方面表现出很多明显的适应性。比如通过迁徙、冬眠或蛰伏等行为适应特征来逃避寒冷。冷环境下的形态适应特征通常表现在生活于高纬度地区的恒温动物,其往往比生活在低纬度地区的同类个体大,因为个体大的动物,其单位体重散热量相对较少,这就是 Bergman 定律。另外。恒温动物身体的突出部分,如四肢、尾巴和外耳等在低温环境中有变小变短的趋势,这也是减少散热的一种形态适应,这一适应常被称为 Allen 规律(苏建平和刘季科,2000)。例如,北极狐的外耳明显短于温带的赤狐,赤狐的外耳又明显短于热带的大耳狐。恒温动物的另一形态适应是在寒冷地区和寒冷季节增加皮毛和羽毛的数量和质量或增加皮下脂肪的厚度,从而增强身体的隔热性能。

恒温动物对低温环境的生理适应策略主要是增加产热能力,如增加基础代谢率、非颤抖性产热、颤抖性产热和活动产热等。此外恒温动物还表现在逆流热交换和局部异温性。在低温环境中减少身体散热的另一种适应就是大大降低身体终端部位的温度,而身体中央的温暖血液则很少流到这些部位。气候环境还可以影响机体与外环境之间的温度梯度从而决定动物的能量消耗,而动物只有在能量储存和能量消耗保持平衡的条件下,才能维持正常的体重和繁殖功能。生活在青藏高原高寒地区的小哺乳动物由于长年暴露于低温环境下,与热带和亚热带地区的小哺乳动物相比,其基础代谢率(basal metabolic rate, BMR)水平明显偏高;自身维持的能量代价也比较高;产热能力也长年维持在高水平(王德华和王祖望,1990)。

2 小哺乳动物机体产热的分子机制

机体的产热方式主要有两种类型：即专性产热（obligatory thermogenesis）和兼性产热（facultative thermogenesis）。专性产热包括基础代谢率产热（产生于所有器官）和食物的热效应（产生于小肠、肝脏及白色脂肪）；兼性产热包括活动引起的产热（产生于骨骼肌）、寒冷引起的颤抖性产热（shivering thermogenesis）（骨骼肌）、冷诱导的非颤抖性产热（nonshivering thermogenesis, NST）[产生于褐色脂肪组织（brown adipose tissue, BAT）]和食物诱导产热（产生于 BAT）。哺乳动物产热包含三种不同形式：BMR、颤抖产热及 NST。NST 是恒温动物中没有肌肉活动而增加产热能力的方式。颤抖性产热是恒温动物中通过不随意性的肌肉收缩而增加产热能力的方式。在冷暴露期间，小型哺乳动物首先动用的机制是 NST，颤抖性产热只是在极度寒冷时作为附加热源。小型哺乳动物，尤其是体重在 200 g 以下者，NST 比颤抖性产热的作用重要得多。而体重超过 3 kg，NST 的作用就很小了。食物诱发产热以及冷诱导的产热又被称为适应性产热（adaptive thermogenesis）。机体主要的产热器官是由交感神经调节的褐色脂肪组织和骨骼肌。小型哺乳动物体内的 BAT 是最主要的适应性产热器官（Lowell & Spiegelman, 2000）。

适应性产热主要是通过下丘脑控制的交感神经兴奋释放的去甲肾上腺素作用于 BAT 上 β_3 -肾上腺素受体（ β_3 -adrenal receptor, β_3 -AR）激活 BAT 引起的。当去甲肾上腺素与 BAT 表面上的 β_3 -AR 结合后激活 G 蛋白介导的信号传导通路，导致细胞内环磷酸腺苷（cAMP）水平上升，cAMP 激活一系列蛋白激酶后，激活激素敏感脂肪酶（hormone-sensitive lipase, HSL）以及抑制围脂滴蛋白（perilipin）的活性，分解甘油三酯为脂肪酸。perilipin 可以保护甘油三酯免于脂肪酶的分解，当激活的蛋白激酶 A 磷酸化 perilipin 后，使其失活，解除了对甘油三酯的保护作用，使甘油三酯易于被脂肪酶分解。脂肪酸作为底物参与线粒体呼吸链反应，导致质子从线粒体内膜泵出，形成驱动质子回流线粒体膜的电化学势能，通过激活线粒体膜上的解偶联蛋白 1（uncoupling protein 1, UCP1）促使质子回漏至线粒体膜内，以热能形式释放能量（Cannon & Nedergaard, 2004）。可见 BAT 线粒体内膜上 UCP1 的表达是其产热的分子基础。

3 调节机体能量平衡的重要分子——leptin 蛋白

3.1 *ob* 基因的分子特征及其表达调节

1950 年，Ingalls 等发现一只近亲繁殖的小鼠食欲亢进，过度肥胖，体重可达正常小鼠的 3 倍，脂肪超过体重的 50%，并且患有糖尿病和不育症。研究表

明这种小鼠的肥胖是由于一个基因发生了隐性突变引起的,遂将此基因命名为肥胖基因 (obese gene, *ob* gene) (Ingalls et al., 1950)。1994 年, Zhang 等 (1994) 首次从先天性肥胖 C57BL/6J *ob/ob* 小鼠第 6 号染色体上发现了 *ob* 基因, 将其克隆, 并命名为 leptin 蛋白。他们发现了两种先天性肥胖小鼠 C57BL/6J *ob/ob* (简称 *ob*₁ 小鼠) 和 SM/Cc-+Dac *ob2J/ob2J* (简称 *ob*₂ 小鼠) 发展成肥胖的根本原因在于: *ob*₁ 小鼠体内尽管脂肪组织中 leptin mRNA 的表达水平比正常小鼠高近 20 倍, 但由于其 *ob* 基因编码序列的第 105 个密码子发生突变, 由 C 突变为 U (由编码 Arg 的 CGA 变成编码终止子的 UGA), 致使 leptin 蛋白表达缺失, 抑制进食能力, 能量调节紊乱而发生肥胖; 而对于 *ob*₂ 小鼠, *ob* 基因编码序列正常, 但启动子序列出现突变, 脂肪组织无 *ob* 基因 mRNA 和 leptin 蛋白的生成, 从而导致肥胖。进一步研究发现, 给 *ob/ob* 小鼠肌肉注射 leptin, 能够明显抑制食欲, 促进代谢, 4 周后小鼠脂肪下降近 75%, 而且没有明显的副作用, 这一发现从分子水平阐明了造成肥胖的基因因素。1997 年, 剑桥大学 Montague 等报道了超级肥胖儿童的病因, 首次在人类患者中发现 leptin 蛋白编码基因的病理性变异。研究发现两例由血缘关系的超级肥胖儿童, 血清 leptin 蛋白水平很低, 其 *ob* 基因编码序列中第 133 个密码子处缺失了一个 G, 导致表达产物从第 132 位甘氨酸 (Gly) 后直到终止子之间的一段 14 个氨基酸的误译。这两名儿童都是 *ob/ob* 纯合子, 出生体重正常, 但不久表现为食欲亢进, 体重猛增, 伴随着高胰岛素血症, 与 *ob/ob* 小鼠表型十分相似, 但其家族中携带 *ob* 基因的杂合子均无明显肥胖表现, 这与 *ob/ob* 小鼠隐性遗传规律是一致的。

小鼠 *ob* 基因位于第 6 号染色体上, 人 *ob* 基因位于第 7 号染色体上, 由三个外显子和两个内含子组成。在结构基因上游含有的启动子序列包括: cAMP 和糖皮质激素反应元件, 以及 CCATT 增强子和 SP-1 结合位点等, 它们负责 *ob* 基因的表达调节 (Gong et al., 1996; Hwang et al., 1996; Miller et al., 1996)。 *ob* 基因编码区由 504 bp 组成, 编码 167 个氨基酸, N 端含有由 21 个氨基酸组成的信号肽, 其成熟蛋白的分子质量为 16 kDa。结构分析表明: leptin 蛋白类似于细胞因子, 由 4 股螺旋形成束状结构 (Zhang et al., 1994)。 *ob* 基因合成部位最初认为仅在脂肪组织中, 随着研究的深入, *ob* 基因还可以在胎盘组织、胃基底黏膜、骨骼肌、乳房上皮细胞等部位合成表达 (Grunfeld et al., 1996; Sarraf et al., 1997; Janik et al., 1997; Bornstein et al., 1998)。

机体的能量储存状况与 *ob* 基因表达相关。体脂与血清 leptin 成正相关, 脂肪细胞体积决定 leptin 合成, 体积越大, 表达量越高 (Hamilton et al., 1995; Lonnqvist et al., 1995)。餐后或过食数天后, 血清中 leptin 水平上升, 禁食数小时后, leptin 水平下降, 这种反应可能与胰岛素调节有关, 胰岛素可以直接刺激脂肪细胞合成 leptin, 因此餐后胰岛素达到高峰后, 血清中 leptin 上升。相

反,低胰岛素状态时,leptin 水平下降 (Saladin et al., 1995; Boden et al., 1996)。青春期 leptin 水平的上升先于睾丸激素和雌激素水平的上升,可能与性腺轴的成熟有关。青春期,女性体内 leptin 水平高于男性个体,其原因一方面在于女性皮下脂肪丰富,可以分泌更多的 leptin;另一方面是由于睾丸激素可抑制 leptin 合成,而雌激素不影响该蛋白的合成 (Rosenbaum et al., 1996; Mantzoros et al., 1997),因而导致男女两性个体内 leptin 水平的差异。感染、内毒素和一些细胞因子可刺激 leptin 合成,如肿瘤坏死因子 (TNF)、白血病抑制因子 (LIF)、白介素-1 (IL-1) 等 (Grunfeld et al., 1996; Sarraf et al., 1997; Bornstein et al., 1998)。此外胰岛素长效剂、冷暴露、儿茶酚胺通过激活 β -肾上腺素能受体抑制 leptin 表达 (Trayhurn et al., 1995; Kallen et al., 1996; Mantzoros et al., 1996; Danahoo et al., 1997),而低氧可以促进 leptin 的表达。

3.2 leptin 受体

leptin 作用于其相应受体发挥生物学功能。leptin 受体由 *db* 基因编码,属 I 型细胞因子受体超家族成员之一,与 IL-2、IL-3、IL-4、IL-6、IL-7、LIF、人粒细胞集落刺激因子 (G-CSF)、促生长激素释放激素 (GRH)、催乳素等受体具有相似的结构 (Tartaglia et al., 1995)。leptin-R 是一种跨膜受体,由胞外配体结合区、跨膜区和胞内区三部分组成。其典型的特征是胞外部分由 4 个半胱氨酸组成的基序和 WSXWS 基序组成,其中含有数量不等的纤维连接蛋白 III 型结构域以及两个细胞因子结构域,即使在没有 leptin 存在的情况下也可以形成二聚体,主要通过配体诱导的空间构象的改变而被激活 (Bazan, 1990; Devos et al., 1997; Heshka & Jones, 2001)。leptin-R 在胞质内没有酪氨酸激酶结构域,因此必须结合胞质内激酶,主要是 JAK 酪氨酸激酶。leptin-R 含有一个高度保守的富含脯氨酸的 Box1 基序和 2 个相对保守的 Box2 基序。Box1 及其邻近的氨基酸是激活 JAK 所必需的。Box2 基序是诱导 STAT (信号转录激活因子) 信号通路所必需的 (Murakami et al., 1997; Kloeck et al., 2002)。

leptin-R 由 *db* 基因经过 RNA 转录的可变剪切形成 6 种类型的受体分子 leptin-Ra、leptin-Rb、leptin-Rc、leptin-Rd、leptin-Re、leptin-Rf。它们都含有一个相同的胞外的配体结合位点以及典型的 4 个半胱氨酸残基组成的基序和 WSXWS 基序。其中 leptin-Ra-d 含有跨膜区以及胞质内区域。跨膜区以及近端胞内 29 个氨基酸残基,包括 Box1 基序是完全相同的,而在胞内区,长度有所不同。leptin-Rb 含有 301 个氨基酸残基组成的胞内区,被称为长型受体,而短型受体:leptin-Ra、leptin-Rc、leptin-Rd 分别含有 34、32、40 个氨基酸的胞内区。leptin-Re 缺少跨膜区以及胞内区部分,被认为是一种可溶性受体。只有长型受体含有 Box2 基序及特定的氨基酸残基,才可能作为一种功能信号 (Bjor-

baek et al. , 1997)。尽管膜结合型的短型受体只含有 Box1 基序, 但可以招募 JAK 酪氨酸激酶, 激活特定信号的级联反应, 但其主要功能与 leptin 的内吞与降解有关, 参与 leptin 的清除或者受体所介导的转运 leptin 至大脑的功能 (Hileman et al. , 2000; Lammert et al. , 2001)。可溶性受体 leptin-Re 不是通过剪切方式产生的, 而是跨膜受体的胞外区脱落形成的。在血循环中可以与 leptin 高度亲和从而调节血浆中游离的 leptin 水平 (Lammert et al. , 2001; Chan et al. , 2002)。图 4-1 显示 6 种受体结构。

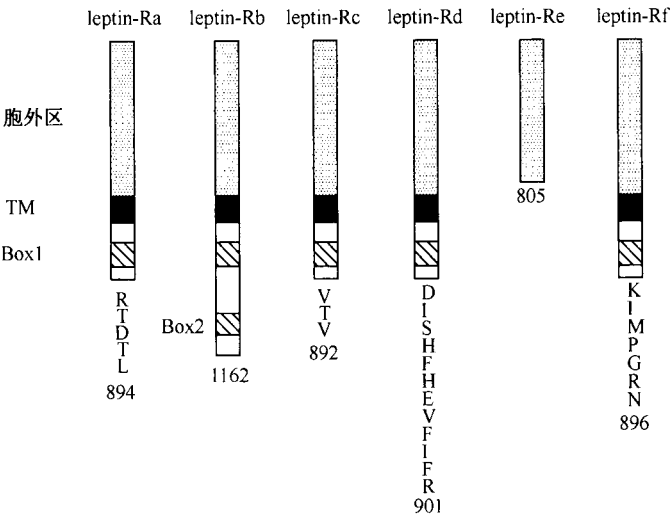


图 4-1 leptin 受体可变剪切形成的 6 种分子

3.3 leptin 蛋白在维持机体能量平衡中的作用

leptin 与分布于中枢神经和外周组织中的 leptin 受体结合, 发挥多种重要生物学功能, 包括调节机体能量平衡、调节葡萄糖代谢、脂类代谢、动物生殖发育, 调节血压、大脑和骨骼发育、伤口愈合、细胞分化增殖, 参与造血、机体免疫调节等功能 (Cherhab et al. , 1997; Zamorano et al. , 1997; Lord et al. , 1998; Thierry et al. ; 1997)。leptin 主要通过抑制食欲, 减少能量摄取, 增加能量消耗, 抑制脂肪合成等调节机体能量平衡。

3.3.1 leptin 可抑制食欲, 减少能量摄入

leptin 对进食活动的调节是通过神经机制来完成的。leptin 敏感的神经元位于下丘脑的弓状核、腹内侧核。leptin 由脂肪细胞分泌入血之后, 与血中的 leptin-Re 结合, 转运至脉络膜, 在此处与 leptin-Ra 结合, 被转运入脑脊液, 与下丘脑中的受体结合, 分别通过两个独立通路: 黑皮质素 4 (melanocortin4, MC4) 受体系统和神经肽 Y (neuropeptide Y, NPY) 递质系统, 分别在高和低

leptin 水平时, 调节能量代谢和体重。leptin-Rb 表达于两种神经元类群中, 一种是促进食欲的 NPY 和 AgRP, 另一种是抑制食欲的 POMC 和 CART。leptin 抑制促进食欲的 NPY/AgRP 神经元的活性, 减少 NPY 和 AgRP 的表达, 激活 POMC/CART 神经元, 促进抑食因子 POMC 和 CART 的表达。当 leptin 水平降低时, 解除了对 NPY 和 AgRP 的抑制作用, 通过作用于 NPY 递体系统, 引起饥饿反应, 增加摄食, 降低能量消耗。相反, 当 leptin 水平升高时, 促进 POMC 和 CART 蛋白表达, 通过作用于 MC4 受体系统, 引起饱食反应, 减少摄食, 增加能量消耗 (Ahima & Flier, 2000)。

3.3.2 褐色脂肪组织是 leptin 完成机体能量调节的重要器官

leptin 是调节 BAT 产热的最关键的细胞因子之一, 而 leptin 对增加机体能量代谢功能的实现也主要通过 BAT 来完成。leptin 对 BAT 产热的调节主要是通过中枢神经系统进行的。leptin 与下丘脑的弓状核 (ARC) 和腹正中区 (VMH) 中的 leptin-Rb 结合, 引起促黑激素 (melanocyte stimulating hormone, MSH) 表达量增加, 然后与黑皮质素 4 受体 (melanocortin-4 receptor, MCR4) 结合, 从而使促肾上腺皮质激素释放因子 (corticotropin-releasing factor, CRF) 分泌增加, 使交感神经兴奋释放去甲肾上腺素 (Haynes et al., 1997; Correia et al., 2001; Cannon & Nedergaard, 2004)。leptin 可以影响下丘脑—垂体—甲状腺轴, 引起甲状腺激素分泌的增加 (Nillni et al., 2000)。去甲肾上腺素作用于 BAT 细胞膜上的 β -AR 受体, 甲状腺激素作用于甲状腺素受体, 激活 BAT, 引起由 UCP1 介导的产热过程 (Cannon & Nedergaard, 2004)。

3.3.3 leptin 通过交感神经系统参与能量调节

交感神经系统在稳定内环境、调节血压、心率、能量平衡和中间代谢中起重要作用。脂肪组织作为一个多功能的内分泌器官, 与中枢神经系统构成了一个双向闭合的信息反馈环路。交感神经系统从下丘脑向脂肪组织传入信号, 对脂肪组织的分解、内环境稳定起重要作用。交感神经兴奋对 leptin 合成起抑制作用。拟交感神经胺、寒冷暴露、空腹可刺激白色脂肪组织交感神经兴奋, 引起 *ob* 基因的表达量下降, 而交感阻滞剂可提高循环中的 leptin 水平 (Rayner et al., 1998)。leptin 可作用于中枢神经系统, 脑室内注射 leptin 后可使摄食减少, 循环中儿茶酚胺增加, 增加交感神经系统的输出 (Tang-Christensen et al., 1999)。促皮质释放素 (corticotrophin-releasing factor, CRF) 是 leptin 作用于交感神经系统的关键因素。leptin 受体共表达于下丘脑室旁核 (paraventricular nucleus, PVN) 中含 CRF 的神经元中, leptin 可增加 CRF 表达量, 从而刺激交感神经系统的兴奋。由 CRF 激活的交感神经系统激活褐色脂肪组织, 引发 BAT 的产热代谢。

3.3.4 leptin 通过下丘脑—垂体—甲状腺轴参与机体能量调节

leptin 与下丘脑—垂体—甲状腺轴 (HPTA) 共同参与机体的进食、体重、能量代谢调节, 正常 HPTA 存在着精密的调节机制以维持血中甲状腺激素水平的稳定。它主要通过下丘脑室旁核 (PVN) 发挥调节作用, PVN 中含有分泌前促甲状腺激素释放激素 (TRH) 的神经元, 而 TRH 通过调节促甲状腺激素 (TSH) 维持血中 T3 和 T4 水平的正常。例如, 当循环血中 T3、T4 浓度下降时, PVN 中分泌 TRH 的神经元可以分泌 TRH 进入垂体门脉毛细血管丛, TRH 可以上调甲状腺激素抑制 TSH 分泌的阈值从而促使垂体 TSH 的分泌 (Orban et al., 1998)。leptin 可以调节下丘脑 PVN 中前 TRH 基因的表达。leptin 经过血脑屏障进入下丘脑的 PVN, 在 PVN 中 leptin 与受体结合直接影响前 TRH 神经元中 TRH 基因的表达 (legradi et al., 1997)。leptin 通过对下丘脑—垂体—肾上腺轴的作用而间接影响前 TRH 基因的表达 (Hisano et al., 1993; Schwartz et al., 1996)。leptin 也可通过对下丘脑弓状核的作用而影响前 TRH 基因的表达。弓状核分泌 NPY 的神经元由神经纤维投射到 PVN 中, 而且 NPY 轴突末梢在 PVN 中与前 TRH 神经元的核周体、树突发生广泛的突触联系。血 leptin 水平降低时, NPY 表达增加, 而 NPY 可以抑制前 TRH 神经元中 TRH 基因的表达 (Legradi et al., 1998)。

3.3.5 leptin 通过 AMPK 信号转导途径调节细胞内能量代谢

近年来, 通过 AMPK (5'-AMP-activated protein kinase) 信号转导途径所介导的 leptin 对细胞内能量代谢作用引起了广泛重视。leptin 可通过中枢和外周两条途径激活 AMPK, 参与细胞内脂肪酸的氧化, 作用的靶器官主要为肝脏和骨骼肌。leptin 作用于下丘脑, 抑制 AMPK 激活, 从而抑制食欲, 同时 leptin 调节交感神经释放去甲肾上腺素与骨骼肌或肝细胞表面 β 3-AR 结合, 激活 AMPK, 此外 leptin 可以直接作用于骨骼肌和肝细胞表面的 *ob-Rb* 受体, 激活 AMPK, 被激活的磷酸化的 AMPK 作用于下游相关蛋白, 从而促进线粒体脂肪酸的氧化, 同时还可诱发线粒体的生物合成, 为细胞提供能量 (Kahn, 2005; Hardie et al., 2006)。

3.3.6 leptin 蛋白诱导 BAT 中的 UCP1 蛋白提高产热能力

这是动物产热的一条重要途径。外源 leptin 蛋白可以明显提高 BAT 中 UCP1 mRNA 的表达, 且与营养状态和环境温度等影响有关。自由取食的大鼠注射 leptin 蛋白后 UCP1 mRNA 的表达量提高了 2.3 倍, 而饥饿状态下 UCP1 mRNA 的表达低于自由取食的大鼠。在冷驯化条件下, 给大鼠注射外源 leptin 蛋白后, UCP1 基因表达虽然仍然高于对照, 但却低于冷驯化未注射组动物。说明 leptin 通过提高 UCP1 mRNA 的表达加速底物氧化和解偶联过程, 促进产热。leptin 还可以提高肌肉中 UCP3 和白色脂肪组织中 UCP2 和 UCP3 蛋白的表达,

而对 BAT 中 UCP2 的表达没有影响。leptin 对产热的分子调控主要是通过交感神经系统诱导 UCP1 表达, 此外, leptin 也可通过与 NPY 的拮抗作用促进 UCP1 基因的表达。注射外源 leptin 蛋白后, NPY mRNA 表达水平下降, 而外源性 NPY 又可导致 BAT UCP1 mRNA 的表达下降 29%, 这样 leptin 可以通过抑制 NPY 的表达间接促进产热 (Margareto et al., 2001; Canello et al., 1998)。

4 鼠兔对青藏高原高寒环境的生态适应特征

鼠兔是一种兔形目动物属鼠兔科, 是现代全北区的特有动物 (Corbet, 1978; Hoffmann, 1993)。全世界共有 26 种, 除 3 种外其余大部分分布在亚洲。在北美洲只有 2 种鼠兔: American pika (*Ochotona Princes*) 和 Collared pika (*O. Collaris*), 它们呈现不连续的分布于北美洲西部的高山地区。在欧洲的 steppe pika (*O. Pusilla*) 延伸至乌拉尔山脉的西部。在亚洲, 鼠兔主要分布在整個中亚地区, 包括喜马拉雅山脉及其周边山脉, 西西伯利亚到库叶岛, 以及日本北海道等。在亚洲大约有 18 种鼠兔分布于青藏高原及其周边地区, 大约占全球鼠兔的 80% 以上 (Smith et al., 1990; Hall, 1981)。青藏高原上多种类的鼠兔的分布特征暗示了青藏高原的气候与环境是鼠兔最适宜的生存环境。化石资料显示, 鼠兔起源于亚洲, 最早的化石记录在大约中新世晚期 (late Miocene) 的中亚, 在上新世中期 (mid-Pliocene) 随着白令海峡的开放, 一部份鼠兔迁移至北美洲, 在上新世 (Pliocene, 5.3~1.8 Ma) 物种分化加剧, 许多新的物种形成。鼠兔家族的分化时间也与青藏高原的地质地理时间一致, 在 3.4~1.6 Ma 期间由于青藏高原的频繁抬升, 引起环境的强烈变化及波动, 产生强的选择压力导致了鼠兔的分化加剧 (Mead, 1987; Dong et al., 1995; Fang et al., 1995)。随着全球气候的变暖, 鼠兔的分布范围逐渐缩小, 分布的海拔高度逐渐升高, 在有些地区甚至由于气温的升高导致一些物种消失。很明显大多数鼠兔分布在高海拔及高纬度的寒冷地区, 栖居于寒冷的气候环境中, 是一种典型的冷适应动物。

在长期的生物进化过程中, 高原鼠兔形成了自己独特的生活方式和适应机制来应对青藏高原严酷的环境压力, 产生了明显的对低温和低氧环境的耐受能力。有关高原鼠兔对高寒环境的生态适应特征, 国内外开展了许多深入的研究。高原鼠兔对于低温环境的耐受能力通常表现为比较高的基础代谢率及非颤抖性产热 (nonshivering thermogenesis, NST) 能力。高原鼠兔体内常年存在 BAT, 且 BAT 含量及其显微结构随着季节产生适应性变化, 表现为严寒冬季 BAT 含量增多, 线粒体体积增大, 嵴的数量增多, 线粒体蛋白含量增加以及细胞色素 C 氧化酶活性增强 (王德华和王祖望, 1990, 1992)。在对高原鼠兔进行冷驯化以及脱冷驯化的实验中也表现为与自然环境下相一致的生理变化: 冷驯化中, 鼠兔的非颤抖性产热能力增强, BAT 线粒体蛋白含量明显增加, 细胞色素 C 氧化酶活

力显著升高；而在脱冷驯化过程中，NST 和 BAT 线粒体蛋白含量明显下降（柳劲松和李庆芬，1996）。自然野外实验和室内低温驯化实验均表明：在冬季或低温刺激下，尽管高原鼠兔的 NST 增加，但与温带动物相比，其增加的幅度（40%）要远远低于其他动物，例如，大鼠（364%）、小鼠（331%）（柳劲松和李庆芬，1996）。王等也获得了相似的结果：NST 在冬夏两季仅增加了 54%（王德华和王祖望，1990）或 24.6%（Wang et al., 2006）。这些均表明高原鼠兔是通过 BMR 和 NST 的调节，维持恒定体温，形成对高原地区气温变化的适应。高原鼠兔的体重、BMR 和体温均没有显著的季节性变化，而且鼠兔的体温较高，通常在 39.4~40.5℃ 范围内波动，可见高原鼠兔可以在季节变化的环境中维持能量的平衡状态，且在较冷环境中保持较高的体温，这对于高原鼠兔来说则需要更大的能量代价（MacArthur & Wang, 1973; Wang & Wang, 1996）。因此高能量代谢率、高产热能力是高原鼠兔最明显的对青藏高原极端压力环境的适应特征。

第二节 高原鼠兔 *ob* 基因全长 cDNA 克隆及其序列分析

本工作主要采用 RT-PCR 以及 3'RACE 和 5'RACE 方法克隆出高原鼠兔 *ob* 基因全长 cDNA 序列并对其序列及分子结构进行分析。为进一步研究高原鼠兔 leptin 功能及其对高原鼠兔生态适应机制作用研究提供重要的工作基础。

1 标本采集与保存

高原鼠兔采集于青海省门源县中国科学院海北高寒草甸生态系统研究站（简称海北站）附近区域（37°29'N, 101°12'E, 海拔 3200~3600 m）。采用绳套活捕法捕捉高原鼠兔，以 0.6 ml/（100 g 体重）腹腔注射 20% 乌拉坦，麻醉后，断颈处死后就地解剖，迅速将各组织器官投入液氮中，回实验室置 -70℃ 低温冰箱长期保存备用。

2 克隆策略

高原鼠兔 *ob* 基因为一个未知基因，为尽快得到其序列，我们采用 RT-PCR 及 RACE 技术获得其 cDNA 全长。根据 GenBank 中其他物种的 *ob* 基因 cDNA 序列可知：该基因全长约为 3.0 kb 左右，5'端非编码区（5'untranslated region, 5'UTR）约为 50~60 bp，编码区为 504 bp，大部分序列为 3'端非编码区（3'untranslated region, 3'UTR）约为 2.5 kb，因此在克隆高原鼠兔 *ob* 基因过程中，我们采用了分段逐步扩增策略：首先获得高度保守的编码区部分序列，在此基础上设计下游片段的上游引物，而下游引物仍然由不同物种的保守序列设计而来，这样所扩增出的片段与其相邻的上游片段之间形成了大约 70~100 bp 的重叠区，以此类推，直至扩增延伸至 3'端。克隆策略与相应引物的位置如图 4-2 所示。

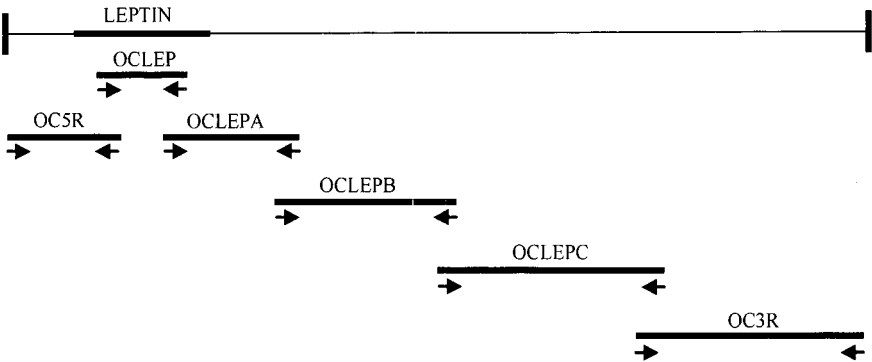


图 4-2 高原鼠兔 *ob* 基因 cDNA 克隆策略

3 引物设计

我们在 NCBI 里的 GenBank 数据库中找到人 leptin cDNA 全序列 (NM_000230)，在 BLASTn 中执行 BLAST 同源检索，找到小鼠 (NM_008493)、牛 (EU313203)、猪 (NM_213840) 等的 leptin cDNA 序列，输入到 CLISTAL X (1.81) 软件中，执行同源序列比对，在保守区中利用 Primer Premier 5.0 软件设计引物。

基于高原鼠兔 *ob* cDNA 的克隆策略以及引物设计的基本原则（寡核苷酸片段长度一般在 18~25 bp 之间；G+C 含量在 40%~60%；引物自身和引物间不易形成二聚体，3'端一般不能为 A 或 T 碱基；上下游引物的退火温度要接近）设计引物，由上海生工生物工程公司合成，工作浓度为 10 μmol/L。引物序列参见表 4-1。

表 4-1 高原鼠兔 leptin cDNA 克隆引物

克隆名称	引物名称	引物类型	用途	序列信息(5'-3')
OCLEP	LEP _f	正向	RT-PCR	CCT CAT CAA GAC CAT TGT CAC
	LEP _r	反向	RT-PCR	TGC TCA AAG CCA CCA CCT
OCLEPA	LEPA _f	正向	RT-PCR	AAA AGT CCA GGA TGA CAC CA
	LEPA _r	反向	RT-PCR	CCA GAA TAA AAC GCA TAA TAA AT
OCLEPB	LEPB _f	正向	RT-PCR	TCT GGG GAA GCG TGT CTT GAA GG
	LEPB _r	反向	RT-PCR	CCT GCT CTG GGG ATT TCC TAA GT
OCLEPC	LEPC _f	正向	RT-PCR	GGT TCA GAA TGG ATT TCC TAA GT
	LEPC _r	反向	RT-PCR	GCT TCA AAG GGA TGT GGC
OC5R	OC5 _r	反向	5'RACE	GGG AAG GCA GAC TGG TGA GGA T
OC3R	OC3 _f	正向	3'RACE	TGG CAT GTG CAT ACT TTC AGG ACA

4 序列分析

将逐段克隆测序结果分别进行 BLAST 检索，以确定是否为 leptin 部分序列。根据这些片段之间的交叉重叠部分进行拼接后，得到长 3015bp 的序列，全长序列见图 4-3。该序列已递交至 GenBank 中，接受号为 DQ268537。

图 4-3 高原鼠兔 leptin 的全长 cDNA 序列及其推导的氨基酸序列

灰色底纹表示被预测的功能基序；加框部分为预测的 ATP 合成酶 α 和 β 亚基识别位点；下划线处为起始密码子 ATG 和终止密码子 TGA；N-glycosylation 表示 N-糖基化的作用位点。图中基序简称如下：CK-2 表示酪蛋白激酶 II 磷酸化作用位点；PKC 表示 蛋白激酶 C 磷酸化作用位点

对该序列进行分析,发现其 5'端非编码序列长 65 bp, 3'端非编码序列长 2446 bp, 可读框位于该序列的 66~569 bp 之间 (504 bp), 起始密码子为 ATG, 终止密码子为 TGA。3'UTR 末端含有 PolyA 尾, 其上游 13 bp 处含有一个加尾信号序列 (AAAAT)。对编码区序列进行 BLAST 检索显示: 鼠兔 leptin cDNA 与猪、狗、牛、猫、人、鼠的序列同源性分别为 83%、82%、81%、81%、81%和 79%。推导出的蛋白质氨基酸序列显示, 高原鼠兔 leptin 由 167 个氨基酸组成, 在其 N 端含有一个由 21 个氨基酸组成的信号肽序列, 位于 21 位 Ala 和 22 位的 Val 之间。信号肽预测结果如图 4-4。编码的成熟蛋白的相对分子质量为 16.086, 等电点为 6.3。成熟高原鼠兔 leptin 与上述物种比对的同源性达 70%~72%。

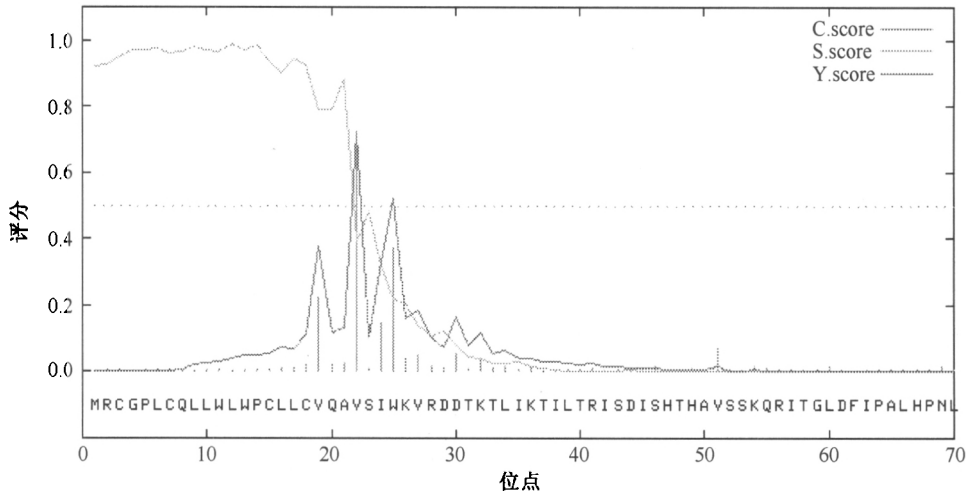


图 4-4 高原鼠兔 leptin 蛋白信号肽预测结果图 (另见彩版)

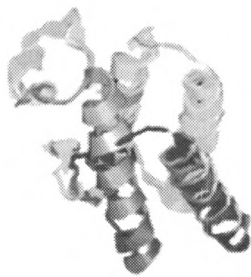


图 4-5 高原鼠兔 leptin 三级结构模拟图

预测的功能基序结果显示高原鼠兔 leptin 序列含有一个 N-糖基化位点 (N-glycosylation), 五个酪蛋白激酶 II 磷酸化作用位点 (casein kinase II phosphorylation site), 一个蛋白激酶 C 磷酸化作用位点 (protein kinase C phosphorylation site) 和一个 ATP 合成酶 α 和 β 亚基识别位点。如图 4-3 所示。

所预测的二级结构显示: 高原鼠兔 leptin 由 4 个超螺旋结构组成, 在第 117 位和第 167 位分别含有一个 Cys 残基, 形成二硫键以稳定蛋白分子结构。三维分子结构与人 leptin 晶体结构高度一致 (人 leptin 三维分子模型参照 SWISS-MOELD server 中所提供的 lax8_ 模型)。预测的高原鼠兔 leptin 三维结构如图 4-5。

5 结论

通过对高原鼠兔 *ob* 基因全长 cDNA 进行克隆及序列分析,得出如下结论:

1. 高原鼠兔 *ob* 基因全长 cDNA 序列由 3015 bp 组成,编码区由 504 bp 组成,位于 66~569 bp 之间,编码 167 个氨基酸组成的蛋白质,其 N 端含有 21 个氨基酸组成的信号肽,成熟分泌型蛋白质由 146 个氨基酸组成。

2. 高原鼠兔 *ob* 基因编码区核苷酸序列与猪、狗、牛、猫、人、鼠同源性分别为 83%、82%、81%、81%、81% 和 79%,推导出的氨基酸序列同源性达 70%~72%。

3. 推导出的氨基酸序列经比对发现高原鼠兔 leptin 中有 20 个氨基酸位点为高原鼠兔所特有。

第三节 青藏高原高寒环境对鼠兔 leptin 蛋白的适应性功能进化研究

生存环境是自然选择最重要的驱动因子。稳定环境下生物进化速度相对较慢,而面对压力环境或是在频繁波动的环境下,生物很快进化为不同环境下所特有的分类群或生存特征 (Huntley & Webb, 1989)。生物在进化过程中,要不断地面对不利的环境压力,产生特定压力环境下独特的代谢方式,如此反复地进行调节。这种针对变化的环境所产生的适应性反应可以导致生物谱系的进化加快或者特定压力敏感蛋白的功能进化。因此环境压力可以加速特定压力敏感蛋白的进化速率,创建针对这种特定环境下新的功能或原有功能的加强,从而提高动物对这种压力环境的适合度 (Nei, 2005),然而所有的表型进化均源于与特定压力相关的基因突变率的改变 (Wright, 1997, 2004)。

鉴于鼠兔生存环境的特殊性及其显著的高的能量代谢水平、*ob* 基因在能量代谢调节中的关键作用,以及我们前面所揭示的高原鼠兔 *ob* 基因的 cDNA 的序列特征,启发我们思考如下问题:鼠兔 leptin 对低温低氧的高原环境是否敏感?在这种环境压力下鼠兔 leptin 本身是否发生了功能进化?本部分研究工作通过对几种鼠兔 *ob* 基因的完整编码区进行克隆测序,将鼠兔与其他脊椎动物的 leptin 的核苷酸及氨基酸序列进行比较,从进化、选择压力以及空间结构等角度进行比较分析,同时确定引起 leptin 适应性进化的主要环境因素。目的在于揭示鼠兔家族 leptin 的变异程度及其分子进化特征及性质。

1 标本采集

实验用动物分别于 2006 年 6 月采集于青海省和内蒙古几个地区,这些地区

的采样地点以及当地的气候环境特征如表 4-2 所示。实验用的新西兰大白兔购于河北医科大学实验动物中心。

表 4-2 本研究中所用鼠兔的采样地及气候特征资料

物种 名称	地点	样地 特征	纬度	经度	海拔 /m	年平均 温度/℃	1月平均 温度/℃	7月平均 温度/℃	无霜期 /天	年均降水 量/mm
达 乌 尔 鼠兔	中国科学院内 蒙古草原生态 系统研究站	草原	43° 38′	116° 42′	1100	—0.4	—22.3	18.7	110	350.0
奴 布 拉 鼠兔	青海省久治县	岩石 灌丛	33° 27′	101° 29′	3600	0.2	—10.9	9.8	38	764.1
甘 肃 鼠 兔 1	青海省久治县	灌丛	33° 27′	101° 55′	3470	0.2	—10.9	9.8	38	764.1
甘 肃 鼠 兔 2	青海省河南县	灌丛	34° 31′	102° 01′	3380	—2.4	—14.8	8.6	12	460.2
青海鼠兔	青海省贵南县	高山 草甸	35° 30′	101° 06′	3370	2.1	—11.4	13.4	90	403.1
高原鼠兔	中国科学院海 北高寒草甸生 态系统研究站	高山 草甸	37° 29′	101° 12′	3200	—1.7	—15.2	9.8	20	582.1
高原鼠兔	青海省果洛州	高山 草甸	37° 25′	100° 30′	3900	—0.6	—12.6	9.7	23	573.2
高原鼠兔	青海昆仑山口	高山 草甸	35° 42′	94° 04′	4790	—5.6	—16.9	5.3	10	262.2
高原兔	中国科学院海 北高寒草甸生 态系统研究站	高山 草甸	37° 29′	101° 12′	3200	—1.7	—15.2	9.8	20	582.1

2 物种鉴定

通过 mtDNA 细胞色素 *b* (Cyt *b*) 基因序列确定鼠兔物种。依据已公开发表的鼠兔的 Cyt *b* 基因扩增引物 (Yu et al., 2000), 并新设计了一对内侧引物。内侧引物设计采用 Primer Priemer 5.0 软件, 根据高原鼠兔 (*Ochotona curzoni-ae*, AF326273)、甘肃鼠兔 (*Ochotona cansus*, AF273003)、西藏鼠兔 (*Ochoto-na thibetana*, AF272986) 和黄河鼠兔 (*Ochotona huangensis*, AF272995) Cyt *b* 基因序列的高度保守区设计而来 (表 4-3)。

表 4-3 mtDNA 细胞色素 *b* 基因扩增引物

引物名称	引物类型	用途	序列(5'—3')
Cyt <i>b</i> F	正向	PCR	CGA AGC TTG ATA TGA AAA ACC ATC GTT G
Cyt <i>b</i> R	反向	PCR	CGG AAT TCC ATT TTT GGT TTA CAA GAC
Cyt <i>b</i> NF	正向	巢式-PCR	ACT AAC CGC ATT CTC ATC
Cyt <i>b</i> NR	反向	巢式-PCR	TAG TTG TCT GGG TCT CCT

3 *ob* 基因引物设计

据高原鼠兔 *ob* 基因的全长序列设计鼠兔家族的 *ob* 基因扩增引物，参考 GenBank 中人 (NM_000230)、小鼠 (NM_008493)、牛 (EU313203)、猪 (NM_213840) 的 leptin cDNA 序列的保守区设计兔 *ob* 基因扩增引物 (表 4-4)。

表 4-4 *ob* 基因编码区扩增引物序列

克隆名称	引物名称	引物类型	用途	序列
PikaLEP	PKLEPFOR	正向	鼠兔	AGG AAG GAA GGT GCG GTG
	PKLEPREV	反向	鼠兔	TGC GGC TTT GAA CGC CAA CAA A
RabbitLEP	RBLEPFOR	正向	兔	AGG AAG GAA AAT GCG GTG
	RBLEPREV	反向	兔	GCT TTG GAA GGG CTT GGA G

4 鼠兔物种鉴定

将鼠兔 Cyt *b* 基因测序结果提交至 GenBank 中进行序列检索比对，以确定鼠兔种类。比对结果显示所采集的鼠兔分别为高原鼠兔、奴布拉鼠兔、甘肃鼠兔、达乌尔鼠兔、青海鼠兔。

5 鼠兔、高原兔、大白兔 *ob* 基因克隆

鼠兔 *ob* 基因完整编码区长度为 646bp，兔 *ob* 基因完整编码区为 565 bp，序列递交至 GenBank 数据库，获得如下接受号：DQ983189 (高原鼠兔)、EF091861 (奴布拉鼠兔)、EF091863 (甘肃鼠兔 1)、EF091864 (甘肃鼠兔 2)、EF091862 (青海鼠兔)、EF091860 (达乌尔鼠兔)、DQ983190 (高原兔)、DQ983191 (实验大白兔)。

6 *ob* 基因一般序列分析

leptin 由 167 个氨基酸组成，N 端均含有一个由 21 个氨基酸组成的信号肽，位于 21 位 Ala 和 22 位 Val 之间。编码的成熟蛋白的相对分子质量为 16.086，等电点为 6.3。蛋白质序列的多重比对结果如图 4-6；预测的功能基序结果显示：所有被比较的物种 leptin 均含有蛋白激酶 C 磷酸化作用位点和酪蛋白激酶 II 磷酸化作用位点，只有鼠兔和兔的 leptin 中含有 N-糖基化位点，而 ATP 合成酶 α 和 β 亚基识别位点只存在于鼠兔 leptin 中。

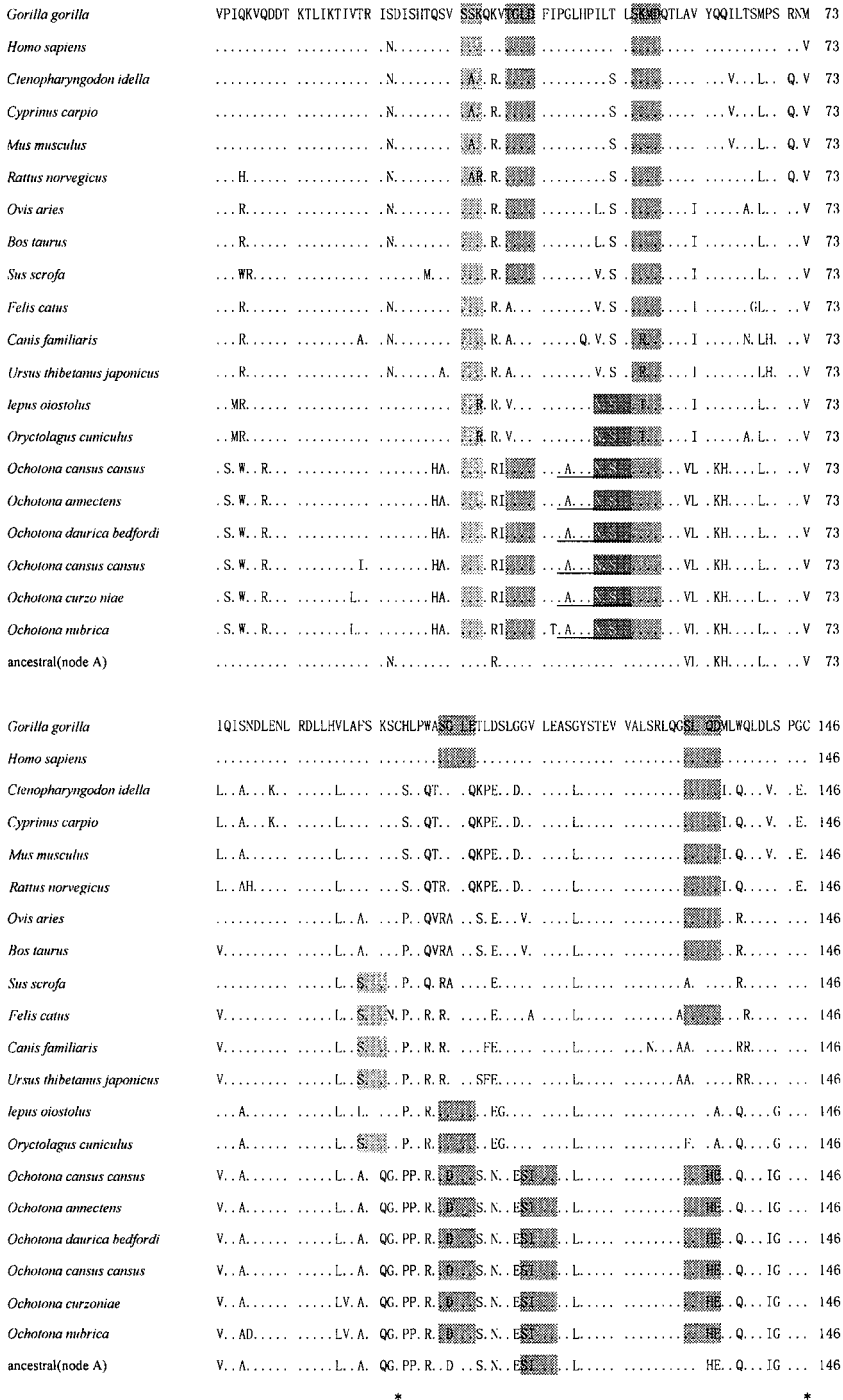


图 4-6 ob 基因推导的氨基酸序列比对图

图中 **SG** 为酪蛋白激酶 II 磷酸化作用位点, **SG** 为蛋白激酶 C 磷酸化作用位点, **SG** 为 N-糖基化位点, 下划线为 ATP 合成酶 α 和 β 亚基识别位点

7 *ob* 基因进化分析

由 ModelTest3.7 和 PAUPb10 软件计算得出的最佳进化分析模型为 HKY+G 模型, 在估计的参数中, 碱基频率分别为: 腺嘌呤 (A) 为 0.2162, 胞嘧啶 (C) 为 0.3242, 鸟嘌呤 (G) 为 0.2663, 胸腺嘧啶 (T) 为 0.1933; 转换/颠换比值 (ti/tv) 为 2.3015; 估计的 γ 分布参数为 0.7012。

选取 20 个脊椎动物物种, 利用 PHYLIP 软件分别对核苷酸和氨基酸序列采用距离法、最大似然法和最大简约法构建系统进化树, 三者拓扑结构相似。通过 *Cyt b* 基因构建的系统最大似然树, 以显示物种间传统的分类学关系 (图 4-7A); 同样, 以 *ob* 基因的核苷酸序列构建最大似然树 (图 4-7B)。因 *ob* 基因和 *Cyt b* 基因进化树拓扑结构相同, 说明在这些物种中, *ob* 基因的进化关系符合传统的分类学特征; 但在进化树中, 鼠兔家族的进化树内部支长明显长于其他物种, 这提示鼠兔家族的 leptin 变异比较大。

为进一步验证鼠兔 leptin 进化是中性进化还是自然选择的进化模式, 我们采用 RRTree 软件进行了进化相对率检验, 我们选用三个评价指标: 同义突变 (synonymous)、非同义突变 (nonsynonymous) 和氨基酸变异。通过两两比计算所有被比较物种中的 *ob* 基因的进化速率 (表 4-5, 表 4-6)。结果显示, 物种间的同义突变差异不显著, 而对于非同义突变和氨基酸变异而言, 鼠兔与其他所有被比较的动物谱系均具有显著性差异 ($P < 0.05$), 而其他物种间的差异却不显著。

鼠兔与兔同属于兔形目, 两者的亲缘关系最近, 而 leptin 进化相对率分析结果显示, 鼠兔与兔之间的非同义突变和氨基酸变异显著, 而兔与其他物种间的差异则不显著。该现象说明, 兔和其他物种的 leptin 为匀速进化, 而鼠兔家族与兔系谱分离之后, 其 leptin 蛋白产生了加速进化。

8 选择压力分析

采用 PAML 软件的 CODEML 程序分析鼠兔 leptin 正向选择概率, 以确定其变异位点的性质, 核苷酸的最大似然系统进化树经修饰后用于所有的 CODEML 分析。为提高正向选择的分析强度, 我们将鱼类和啮齿类大鼠和小鼠的序列去除。将鼠兔支系 (branch B) 作为 foreground branch, 而其他物种的支系作为 background branch (图 4-7 和表 4-7、表 4-8)。

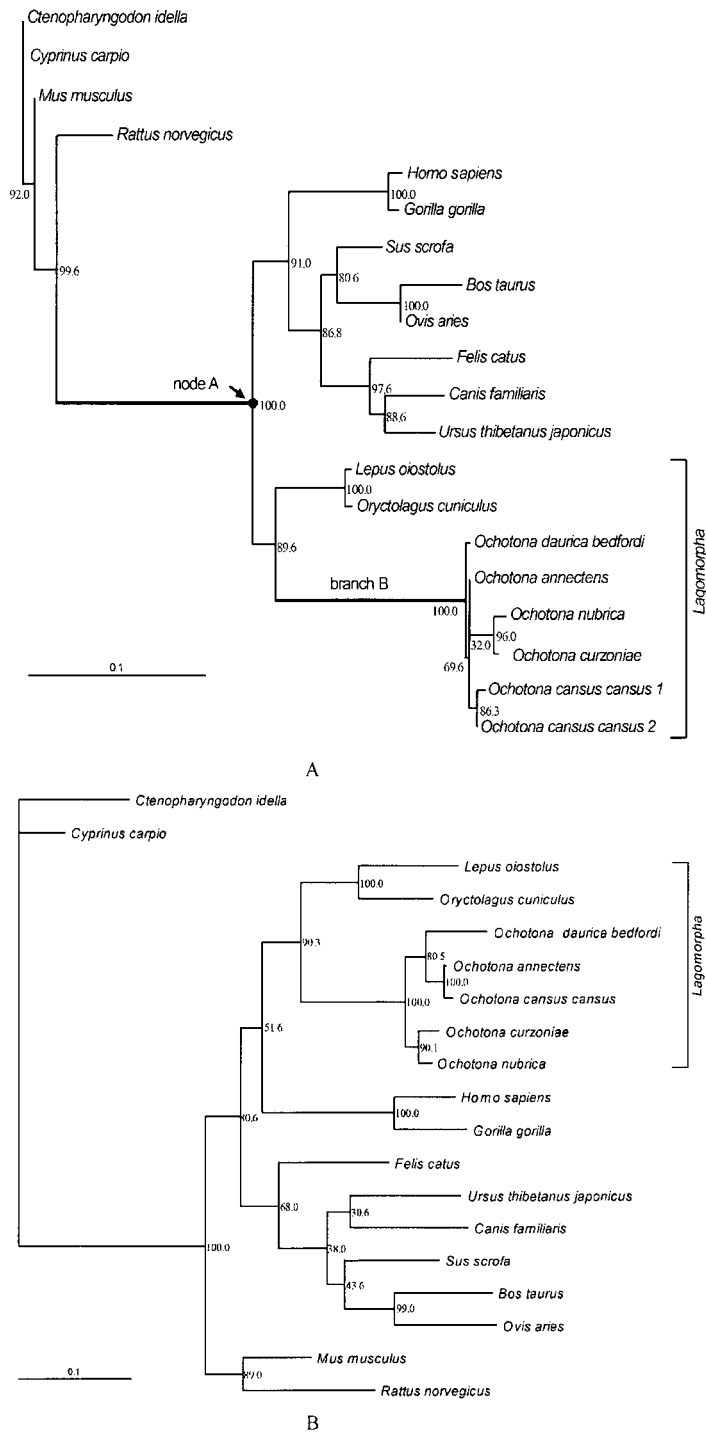


图 4-7 *ob* 基因和 *Cyt b* 基因最大似然进化树

A 为 *ob* 基因核苷酸序列构建的最大似然进化树；B 为 *Cyt b* 基因核苷酸序列构建的最大似然进化树

表 4-5 物种间同义突变率与非同义突变率两两比较

	大猩猩	人	羊	牛	猪	狗	喜马拉雅 黑熊	猫	甘肃鼠 兔 1	甘肃鼠 兔 2	高原 鼠兔	奴布拉 鼠兔	青海 鼠兔	达尔 鼠兔	高原兔	家兔
大猩猩		0.2178	0.5206	0.1844	0.6731	0.4555	0.1589	0.5087	0.6428	0.7563	0.6237	0.6275	0.7645	0.9015	0.7586	0.3574
人	0.1488		0.7439	0.3201	0.4659	0.3073	0.2649	0.7112	0.8494	0.9711	0.8292	0.8360	0.9833	0.8766	0.9886	0.5307
羊	0.8221	0.7893		0.1707	0.2183	0.1524	0.3964	0.9565	0.9259	0.8078	0.9451	0.9361	0.7929	0.6638	0.7865	0.7639
牛	0.6024	0.9628	0.3867		0.0633	0.0491	0.8381	0.5562	0.5270	0.4341	0.5414	0.5307	0.4188	0.3270	0.4082	0.7982
猪	0.8929	0.7235	0.8937	0.5781		0.6970	0.0594	0.2707	0.4202	0.5118	0.4071	0.4078	0.5166	0.6307	0.5242	0.2377
狗	0.3455	0.1530	0.1710	0.0702	0.1891		0.0075	0.0874	0.2599	0.3240	0.2459	0.2464	0.3229	0.4089	0.3460	0.1446
喜马拉雅 黑熊	0.5737	0.2899	0.3191	0.1370	0.3823	0.3466		0.3733	0.4144	0.3330	0.4272	0.4167	0.3193	0.2423	0.3017	0.6666
猫	0.7104	0.3843	0.4934	0.2714	0.5623	0.3802	0.7541	0.8920	0.7766	0.9090	0.8993	0.8993	0.7620	0.6369	0.7647	0.8063
甘肃鼠 兔 1	0.0252	0.0099	0.0109	0.0040	0.0124	0.1601	0.0650	0.0537		0.3105	0.9392	0.9615	0.5191	0.2589	0.8400	0.6574
甘肃鼠 兔 2	0.0174	0.0067	0.0073	0.0026	0.0083	0.1201	0.0461	0.0382	0.3128		0.5428	0.5154	0.9414	0.4681	0.9790	0.5367
高原鼠兔	0.0140	0.0052	0.0056	0.0019	0.0064	0.1034	0.0380	0.0316	0.1450	0.7725		0.9375	0.3388	0.1588	0.8154	0.6728
奴布拉 鼠兔	0.0064	0.0023	0.0024	0.0008	0.0028	0.0548	0.0181	0.0152	0.0422	0.2113	0.1408		0.2215	0.1073	0.8232	0.6604
青海鼠兔	0.0252	0.0099	0.0109	0.0040	0.0124	0.1601	0.0650	0.0537	no	0.3128	0.1450	0.0422		0.2752	0.9932	0.5146
达尔	0.0172	0.0066	0.0072	0.0025	0.0082	0.1188	0.4546	0.0378	0.2949	0.9786	0.7936	0.2186	0.2949		0.8443	0.3944
鼠兔																
高原兔	0.9052	0.5643	0.7281	0.5205	0.7927	0.3760	0.6319	0.7972	0.0193	0.0130	0.0101	0.0044	0.0193	0.0128		0.1917
家兔	0.5063	0.2767	0.3199	0.2257	0.3873	0.7688	0.8934	0.7409	0.0713	0.0503	0.0413	0.0193	0.0713	0.0496	0.1499	

注: 1) 表中对角线以上为同义突变率, 对角线以下为非同义突变率;

2) 数值代表两两比较所计算出的显著检验的 P 值;

3) 本表由 RRTree 进化分析软件计算得出。

表 4-6 物种间氨基酸变异两两比较

	高原兔	家兔	大猩猩	人	羊	牛	猪	狗	喜马拉雅 黑熊	猫	达尔尔 鼠兔	甘肃鼠 兔 1	青海 鼠兔	高原 鼠兔	如布拉 鼠兔	甘肃鼠 兔 2
高原兔																
家兔	0.2038															
大猩猩	0.6463	0.3789														
人	0.3610	0.1891	0.1255													
羊	0.4587	0.2156	0.8152	0.8063												
牛	0.3244	0.1593	0.6409	no	0.4435											
猪	0.7987	0.4425	0.8048	0.4605	0.5140	0.3289										
狗	0.2563	0.4836	0.1537	0.0580	0.0470	0.0220	0.1125									
喜马拉雅黑熊	0.6356	no	0.3987	0.1891	0.1763	0.0833	0.3991	0.1746								
猫	0.8033	0.8076	0.4905	0.2297	0.2798	0.1493	0.5746	0.2036	0.7283							
达尔尔鼠兔	0.0109	0.0358	0.0087	0.0031	0.0027	0.0010	0.0092	0.1756	0.0450	0.0269						
甘肃鼠兔 1	0.0169	0.0527	0.0131	0.0048	0.0042	0.0017	0.0141	0.2306	0.0646	0.0396	0.2475					
青海鼠兔	0.0169	0.0527	0.0131	0.0048	0.0042	0.0017	0.0141	0.2306	0.0646	0.0396	0.2475	no				
高原鼠兔	0.0070	0.0240	0.0057	0.0020	0.0017	0.0006	0.0060	0.1319	0.0309	0.0181	0.5026	0.1022	0.1022			
如布拉鼠兔	0.0028	0.0105	0.0024	0.0083	0.0065	0.0002	0.0024	0.0716	0.0142	0.0079	0.1193	0.0210	0.0210	0.0992		
甘肃鼠兔 2	0.0109	0.0358	0.0087	0.0031	0.0027	0.0010	0.0092	0.1700	0.0450	0.0269	no	0.2475	0.2475	0.5026	0.1193	

注: 1) 数值代表两两比较所计算出的显著性检验的 P 值;

2) 本表由 RRTree 进化分析软件计算得出。

表 4-7 leptin 基因进化分析参数

模型	参数估计值	ℓ	正向选择位点
M0: one-ratio	$\omega=0.2125$	-1369.756 072	none
branch-specific model			
two-ratio	$\omega_0=0.1767, \omega_1=0.5360$	-1366.409 742	
site-specific model			
M1a: nearly neutral (K=2)	$p_0=0.9044, (p_1=0.095\ 56)$	-1365.192 539	not allowed
M2a: positive selection (K=3)	$p_0=0.9044, p_1=0.048\ 40$ $(p_2=0.047\ 16) \omega_2=1.0000$	-1365.192 539	none
M3: discrete (K=3)	$p_0=0.323\ 56, p_1=0.646\ 93$ $(p_2=0.029\ 50) \omega_1=0.008\ 60, \omega_2=0.296\ 57,$ $\omega_3=1.253\ 33$	-1363.230 57	92F ($p=0.890$)
M7: beta	$p=0.732\ 08, q=2.408\ 34$	-1363.617 625	none
M8: beta& ω	$p_0=0.982\ 33, p=0.883\ 93,$ $q=3.207\ 74 (p_1=0.017\ 67), \omega=1.229\ 61$	-1363.536 255	92F ($p=0.571$)
branch-site model			
model A	$p_0=0.556\ 65, p_1=0.054\ 78$ $(p_2+p_3=0.388\ 57), \omega_2=1.0$	-1362.731 102	2P 60V 63Q 95S 103G 106T (at $0.5 < p < 0.6$); 7Q 28Q 29S 44G 62Q 94K 98L (at $0.6 < p < 0.7$); 108D (at $p > 0.8$)
model B	$p_0=0.474\ 59, p_1=0.231\ 94$ $(p_2+p_3=0.293\ 48), \omega_0=0.070\ 01, \omega_1=0.451\ 33,$ $\omega_3=1.310\ 07$	-1361.723 013	4Q 95S 103G 106T 111G 113V (at $0.5 < p < 0.6$); 29S 59A 60V (at $0.6 < p < 0.7$); 2P 7Q 28Q 36V 44G 62Q 63Q 92F 94K 98L (at $0.7 < p < 0.8$); 108D (at $p > 0.8$)

表 4-8 leptin 进化分析似然比检验统计值

检验项目	$2\Delta\ell$	自由度	P 值
LRTs of ω at branch B			
one ratio vs. two ratio	6.692 66	1	0.009 681
LRTs of variable ω values among sites			
M1a vs. M2a	0	2	1
M7 vs. M8	0.162 74	2	0.9219
one ratio vs. M3	13.051 004	2	0.001 466
LRTs of variable ω values along branch B			
M1a vs. model A	4.922 874	2	0.085 31
M3 vs. model B	3.015 114	2	0.2215

在 branch-specific 分析模型中, one-ratio 模型显示, 序列中所有位点均含有相同的 ω 值 (0.2125), 而 two-ratio 模型显示: branch B 的 ω 值为 0.5360, 而其他背景支系的 ω 为 0.1767。one-ratio 模型与 two-ratio 模型两者似然比检验统计参数 ($2\Delta\ell$) 为 6.692 66, $P=0.009\ 681$, 因此鼠兔支系的 ω 值与其他支系相比具有显著性差异。为进一步检验鼠兔支系的 ω 值是否大于 1, 将 two-ratio 中的 ω_B 固定为 1, 将固定后的与未经固定的 two-ratio 进行比较, 结果显示 $2\Delta\ell$ 为 2.94, $P=0.086$, 因此在 branch-specific 分析模型下鼠兔 ω 值并不大于 1。在 site-specific 分析模型下, M2a 模型与 M1a 模型产生相同的最大似然值, 因此 M1a 与 M2a 比较不具有统计学意义; M3 离散模型建议有 2.95% 的位点处于正向选择下, 估计的 ω 值为 1.2533, 同时确定了一个正向选择位点, 其概率为 89.0%; M3 模型显著性好于 one-ratio 模型, 其 $2\Delta\ell$ 为 13.041 004, $P=0.001\ 466$; M8 模型建议 1.767% 的位点处于正向选择下, ω 估计值为 1.229 61, 同时确定了一个与 M3 模型相同的一个正向选择位点。M7 模型与 M8 模型不具有显著性差异, $2\Delta\ell$ 值为 0.162 74, $P=0.9219$ 。在 branch-site 分析模型下, model A 模型确立了鼠兔 leptin 序列中有 14 个位点处于正向选择; model A 与 M1a 比较结果显示二者不具有显著性差异, $2\Delta\ell$ 值为 4.922 874, $P=0.0853$ 。model B 建议在鼠兔支系中有 29.372% 的位点处于正向选择压力下, ω 估计值为 1.310 07, 确定了 20 个正向选择位点; model B 模型与 M3 离散模型二者不具有显著性差异, $2\Delta\ell$ 值为 3.015 114, $P=0.2215$, 由于这两个模型均允许正向选择的存在, 因此这两种比较不具有生物学意义。我们的进化分析确立了 20 个正向选择位点: 2S、4W、7R、28H、29A、36I、44A、59V、60L、62K、63H、92A、94Q、95G、98P、103D、106S、108N、111E、113I。进化树推导的祖先序列 (node A, 图 4-6) 确定了鼠兔支系的特异性变异位点: 2SP、4WQ、7RQ、

28HQ、29AS、36IV、44AG、59VA、60LV、62KQ、63HQ、94QK、95GS、98PL、103DG、108NE、113IV、134HQ。显然采用贝叶斯方法预测的位点与重建的祖先序列产生的结果一致。我们的进化分析结果支持了前面的假设：鼠兔 leptin 发生了适应性进化。

9 ob 基因二级结构和三级结构比较分析

为与进化分析相一致，我们去除信号肽序列，只留下 146 个氨基酸残基的成熟蛋白进行比较分析。二级结构分析显示，鼠兔 leptin 与其他所有物种的 leptin 一样由 4 个双螺旋组成，在 96 和 146 位点处含有两个半胱氨酸残基，可形成二硫键用于稳定 leptin 蛋白分子。鼠兔 leptin 蛋白分子三级结构模型参照人 leptin 的三维结构搭建而成（人 leptin 三维分子模型参照蛋白质数据库中的 1ax8_ 模型（Zhang et al. , 1997）（图 4-8）。

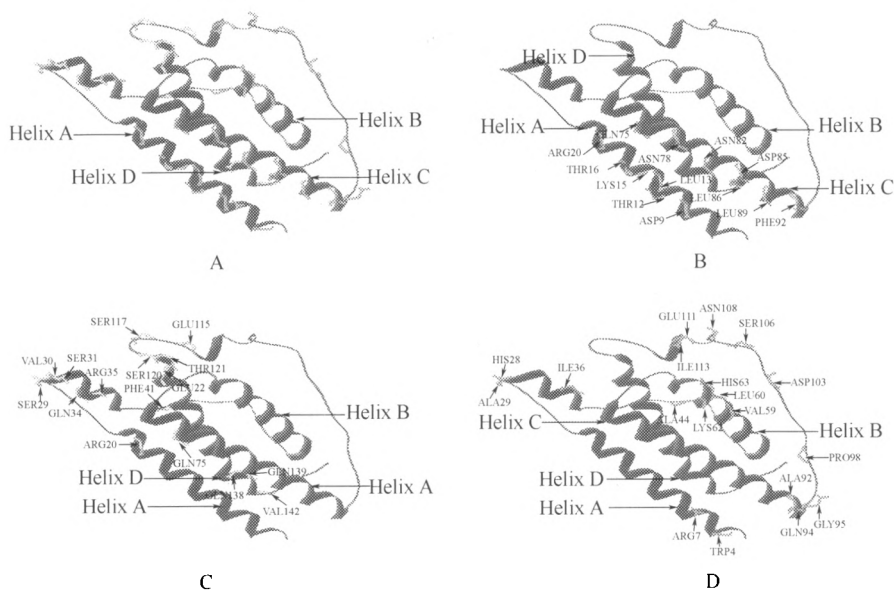


图 4-8 leptin 蛋白空间结构中结合受体的关键位点、激活受体的关键位点以及鼠

兔家族 leptin 蛋白特异的适应性功能进化氨基酸变异位点分布情况（另见彩版）

本图显示的为 leptin 蛋白分子空间结构，leptin 蛋白分子由 4 股螺旋组成，标记为：Helix A，Helix B，Helix C，Helix D。A 图显示所有与受体结合的关键位点、激活受体的关键位点以及鼠兔家族 leptin 蛋白特异适应性功能进化的氨基酸变异位点在分子空间结构中的分布情况。图中蓝色位点代表与 leptin 受体结合的关键位点；黄色位点代表激活 leptin 受体的关键位点；绿色位点表示发生于鼠兔家族 leptin 蛋白中的适应性功能进化的氨基酸变异位点；B 图只显示了与受体结合的关键位点；C 图只显示了激活受体的关键位点；D 图只显示了发生于鼠兔家族 leptin 蛋白分子中的适应性功能进化的氨基酸变异位点

特定压力下蛋白质新功能的建立或原有功能的加强,源于该蛋白发生了适应性进化。鼠兔 leptin 的二级结构与三级结构与其他物种的 leptin 一致,为 4- α 螺旋束状结构。以往研究表明:leptin 与其受体之间有三个相互结合的位点: I、II、III。I 分布在 D 螺旋的 C 端, II 分布于 A 螺旋和 C 螺旋表面, III 分布于 D 螺旋的 N 端。其中 leptin 与受体结合的最关键部位位于 leptin 的结合位点 II 以及受体的 CRH2 区 (cytokine receptor homology) (Peelman et al., 2004, 2006; Zabeau et al., 2004; Iserentant et al., 2005)。在 Leptin 表面与受体结合的关键点分别为螺旋 A 中的 9D、12T、13N、15K、16T、20R, 以及螺旋 C 中的 75Q、78N、82N、85D、86L、89L、92F。突变分析显示: 9D、12T、15K、16T、82N、85D、86L 的突变可以明显降低与受体 CRH2 的亲合力; 13L、78N、89L、92F 并不能明显改变与 CRH2 的亲合力。leptin 对受体激活能力的关键位点分别为: 位于结合位点 I 上的 41F、138Q、139Q、142V, 结合位点 II 上的 20R 和 75Q 以及结合位点 III 上的 29S、30V、31S、34Q、35R、115E、117S、120S、121T、122E。突变分析显示 S120A/T121A 突变会完全丧失对信号激活能力。20R 和 75Q 是结合受体与激活受体的关键位点。在鼠兔 leptin 中的 20 个正向选择位点中, 其中第 29 位对信号激活的关键位点由 S 替换为 A。这种突变对信号激活的影响需要我们进一步研究。在鼠兔 leptin 中, 如果第 44 位由 G 突变为 A, 则会形成一个鼠兔特有的功能基序 ATP 合成酶 α 和 β 亚基信号识别位点。由于 ATP 合成酶中 α 亚基主要提供 ATP 和 ADP 的结合位点, 而 β 亚基具有催化活性, ATP 合成酶主要负责细胞内能量传递。鼠兔 leptin 中出现的 ATP 合成酶 α 和 β 亚基识别位点可能与极端压力环境下能量调节与能量需求有关, 因此我们推测鼠兔 leptin 中 ATP 合成酶 α 和 β 亚基识别信号的出现可能是鼠兔生活在严酷的高原环境下适应性进化的结果。那么 ATP 合成酶 α 和 β 亚基识别信号是否真正存在于鼠兔 leptin 中? 其作用如何? 这都是值得我们进一步深入探讨的。已有研究显示 leptin 蛋白中第 85~119 位之间的片段是行使重要功能的片段, 该片段在人与啮齿类动物中对减轻体重以及能量代谢的调节方面, 其功能存在着差异 (Grasso et al., 1997, 1999a, 1999b; Imagawa et al., 1998)。在鼠兔 leptin 序列中, 其中有 9 个正向选择位点发生在这部分片段中, 分别为: F92A、K94Q、S95G、L98P、G103D、T106S、D108N、G111E、V113I, 这提示我们, 鼠兔 leptin 的功能可能不同于所比较的其他脊椎动物的 leptin。因此, 对于鼠兔 leptin 来说, 在功能重要的第 85~119 位片段中, 其中 9 个位点发生了适应性进化, 以及鼠兔 leptin 中独特的功能基序 ATP 合成酶 α 和 β 亚基识别位点, 这预示鼠兔 leptin 功能可能发生了变化。

10 鼠兔 leptin 蛋白适应性进化的环境因素

为确定鼠兔 leptin 蛋白适应性进化的主要环境因素，我们分别采集了来自不同海拔高度分布的鼠兔（海拔 1100~4700 m），并以大鼠和家兔为对照（图 4-9）。选用 RRTree 软件以人 leptin 作为外群，分别计算同义替代、非同义替代以及氨基酸替代这三个参数。以逐步多元回归分析方法来确定引起鼠兔 leptin 发生适应性进化的环境因素（表 4-9）。结果显示，温度越低，非同义替代以及氨基酸替代率越高，而不同的海拔环境（即不同空气含氧量）对同义替代、非同义替代以及氨基酸替代的影响不显著。三个不同海拔高度的高原鼠兔 leptin 序列在核苷酸序列中仅有一个发生同义突变，且氨基酸序列仍保持一致。现鼠兔 leptin 蛋白对寒冷的环境压力较为敏感低温而非低氧是驱动鼠兔 leptin 蛋白产生适应性进化的主要环境因素。

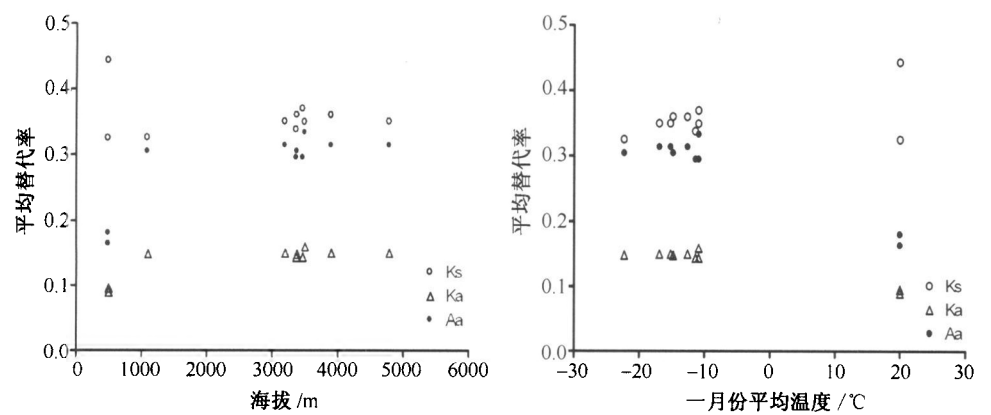


图 4-9 海拔和一月份平均温度与鼠兔同义突变 (Ks)、非同义突变 (Ka) 及氨基酸突变 (Aa) 的相关关系

表 4-9 以一月份平均温度和海拔为自变量,对鼠兔、大鼠和兔的同义突变 (Ks)、非同义突变 (Ka) 及氨基酸突变 (Aa) 的逐步多元回归分析

因变量	β	B±SE	t	P
非同义突变				
截距	-0.954	0.126±0.00	45.601	<0.001
一月份平均温度		-0.002±0.00	-9.018	<0.001
氨基酸突变				
截距		0.253±0.01	36.595	<0.001
一月份平均温度	-0.951	-0.004±0.00	-8.667	<0.001

注:大鼠和兔来自标准饲养条件,海拔为 500m,温度为 20℃。

在我们的本次研究中还发现了青藏高原与内蒙古草原两地鼠兔 leptin 产生了相似的适应性进化的变异,这给了我们一个重要的启示:由于鼠兔共同的亚洲起源的进化史以及它们所相似的生存的寒冷环境,我们推测鼠兔家族 leptin 可能均出现了这种相似的适应性功能进化的特征。

11 结论

通过对不同鼠兔 *ob* 基因及其他物种 *ob* 基因的进化分析及选择压力分析,我们得出如下结论:

- (1) leptin 对冷环境压力较为敏感,可以看作为冷压力反应蛋白。
- (2) 寒冷的环境压力驱动冷适应动物鼠兔 leptin 蛋白发生了适应性功能进化,从而提高其在压力环境下生存的适合度。
- (3) 这种 leptin 适应性功能进化可能是全世界鼠兔家族的共同进化特征。

第四节 高原鼠兔 *ob* 基因不同组织表达特征以及不同海拔下高原鼠兔 *ob* 基因表达特征

高海拔地区的土著动物长期生活在持续低温和低氧的环境中,能量代谢调整是其生存中最重要的特征 (Sheafor, 2003)。许多研究表明,随着海拔的升高,人或小型哺乳动物的体重随之降低 (Westerterp, 2001; Morel et al., 2005),如大鼠在低氧暴露后体重显著降低 (Raff et al., 1999, 2001),这种体重的降低主要由低氧引起的摄食量降低所致 (Westerterp, 2001)。对人类的研究发现随着海拔高度的增加, leptin 蛋白含量显著降低 (Bailey et al., 2004; Cabrera et al., 2004; Zaccaria et al., 2004);大鼠暴露于高海拔条件下,血浆 leptin 含量降低 (Norese et al., 2002)。然而,也有研究发现高海拔地区的人体内 leptin 含量显著高于低海拔地区,认为随着海拔的升高, leptin 含量增加 (Tschop et al., 1998; Woolcott et al., 2002)。低氧可以增加 leptin 的合成与释放,同样低温可以抑制 leptin 的表达。由于在不同海拔状态下,其氧含量随着海拔的增加逐渐降低,而温度同样随着海拔的增加也会降低,因此在不同海拔环境下对动物的生理以及能量代谢的影响是不同的。高原鼠兔作为栖息于青藏高原上的土著动物,主要分布于海拔 3100~5100 m 的范围内,作为一种典型的高的低氧和低温耐受动物,高的能量代谢率是其最明显的生理特征,那么高原鼠兔在不同海拔下,能量代谢的变化特征,目前还不十分清楚,而这部分内容却是研究高原鼠兔生态适应机制的重要内容。

我们采用实时荧光定量 PCR 技术对高原鼠兔 *ob* 基因的组织分布特征进行描述,以及描述 *ob* 基因 mRNA 在不同海拔高度高原鼠兔体内的表达特征,目的在于揭示高原鼠兔在自然生活条件下, *ob* 基因的表达特征及其对动物生存适应的意义。

1 标本采集与保存

实验用高原鼠兔于 2004 年 7~8 月分别在青海省门源县境内中国科学院海北高寒草甸生态系统研究站（简称海北站）附近区域（37°29'N, 101°12'E 海拔 3200~3600 m）和青海省果洛州大武军牧场（34°21'N, 100°29'E 海拔 3960 m）的矮蒿草草甸中分别选取一块面积为 4 hm²（200 m × 200 m）的样方进行绳套活捕法捕捉高原鼠兔。鉴定性别、观察毛色、称重并测量体长，选取有代表性的高原鼠兔（体重、毛色等相近的雄性个体），以腹腔注射 20% 乌拉坦 0.6 ml/100 g 体重进行麻醉后，施与断颈处死后就地解剖，迅速将各组织器官投入液氮中，回实验室置 -70℃ 低温冰箱长期保存备用。

2 引物及 Taqman 探针设计

实时 PCR 中高原鼠兔 *ob* 基因及内源基因 β -*actin* 所使用的 Taqman 探针及引物由 ABI 公司开发的 Primer Express 软件设计。Taqman 探针的 5' 端连接荧光基团 FAM，3' 端连接淬灭剂 TAMRA。引物及 Taqman 探针序列见表 4-10。

表 4-10 实时 PCR 中所使用的引物及探针序列

目的基因	引物(探针)名称	引物(探针)类型	引物(探针)序列	预期片段长度
<i>ob</i>	270F	正向	CCC GGA ATG TGG TCC AAA	66 bp
	335R	反向	CAG CTA CCA GGT GCA GAA GGT	
	289T	Taqman 探针	TGC CAA TGA CCT GGA GAA CCT CCG	
β - <i>actin</i>	BT277F	正向	GCG AGA TCG TGC GTG ACA T	67 bp
	BT343R	反向	GCC ATC TCC TGC TCG AAG TC	
	BT297T	Taqman 探针	AAG GAG AAG CTG TGC TAC GTC GCC C	

3 高原鼠兔内源基因 β -*actin* 克隆

根据 GenBank 中不同物种的 β -*actin* 基因序列，通过序列比对后，在其高度保守区设计引物。比对的 β -*actin* 基因来自：羊（U39357）、牛（NM_173979）、猪（AY550069）、人（AK223032）、猫（XM_845524）。用于扩增高原鼠兔 β -*actin* 基因的引物序列如下：正向引物（Cbeta）5'-GCC AAC AGG GAG AAG ATG-3'；反向引物（Dbeta）5'-TGG AAG GTG GAC AGG GAG-3'。经克隆测序后，得到长度为 718 bp 的序列，该序列已提交至 GenBank 数据库中，接受号为 DQ205446（图 4-10）。

高原鼠兔 β -actin基因序列 (接受号为DQ205446)						
1	GCCAACAGGG	AGAAGATGAC	CCAGATCATG	TTCGAGACTT	CAACACGCCG	GCCATGTACG
61	TGGCCATACA	GGCCGTGCTG	TCTCTGTACG	CCTCCGGCCG	TACCACGGGT	ATCGTGATGG
121	ACTCCGGCGA	CGGCGTCACC	CACACGGTGC	CCATCTATGA	GGGCTACGCC	CTCCCCACG
181	CCATCCTGCG	TCTGGACCTG	GCCGGCCGGG	ACCTGACCGA	CTACCTCATG	AAGATCCTCA
241	CGGAGCGCGG	CTACAGCTTC	ACCACCACGG	CCGAGCGCGA	GATGGTGGGT	GACATCAAGG
301	AGAAGCTGTG	CTACGTCGCC	CTGGACTTGG	AGCAGGAGAT	GGCCACGGCC	GCGTCCTCCT
361	CCTCGCTGGA	GAAGAGCTAC	GAGCTGCCCG	ACGGCCAGGT	CATCACCATC	GGCAACGAGC
421	GCTTCGCGTG	CCCCGAGGCG	CTCTTCCAGC	CCTCCTTCTT	GGGCATGGAG	TCCTGTGGCA
481	TCCACGAGAC	GACCTTCAAC	TCCATCATGA	AGTGGCAGCT	GGACATCCGT	AAGGACCTGT
541	ACGCCAACAC	CGTGCTGTCC	GGTGGCACCA	CCATGTACCC	GGGCATTGCT	GACCGCATGC
601	AGAAGGAGAT	CACCGCCCTG	GCGCCAGCA	CCATGAAGAT	CAAGATCATC	GCTCCCCCTG
661	AGCGCAAGTA	CTCGGTGTGG	ATCGGCGGCT	CCATCCTGGC	CTCCCTGTCC	ACCTTCCA

高原鼠兔ob基因序列						
1	ATGCGGTGCG	GACCCCTGTG	CCAGTCTCTG	TGGCTGTGGC	CCTGTCTGTT	GTGTGTTCAA
61	GCTGTGTCCA	TCTGAAAGT	CCGGGATGAC	ACCAAAACCC	TCATCAAAAC	CATCCTCACC
121	AGGATCAGCG	ACATTTTACA	CACGCATGCA	GTTTCTCTCA	AACAGAGGAT	CACCGGTTTG
181	GACTTCAATC	CTGCACTCCA	CCCGAACCTG	AGCTTGTCCA	AGATGGATCA	GACGTTGGTC
241	CTCTACAAAC	ACATCCTCAC	CAGTCTGCCT	TCCCGGAATG	TGGTCCAAAT	TGCCAATGAC
301	CTGGAGAACC	TCCGGGACCT	TCTGCACCTG	GTAGCTGCCT	CCCAAGGCTG	CCCCCACC
361	CGGGCCAGTG	ATCTGGAGAG	CCTGAACAGT	CTGGAAGCA	TCCTGGAAGC	CTCCCTCTAC
421	TCCACAGAGG	TGGTGGCCCT	GAGCAGGCTG	CAGGATCTC	TGCATGAGAT	GCTTCAGCAG
481	CTGGACATTG	GCCCTGGGTG	CTGA			

图 4-10 高原鼠兔 ob 基因及 β -actin 基因荧光定量 PCR 引物及 Taqman 探针位置图

4 荧光定量 PCR 标准曲线

采用紫外分光光度计测定 ob 基因和 β -actin 基因的重组质粒浓度，按照每微克 1000 bp 的 DNA 相当于 9.1×10^{11} 个分子来计算其拷贝数 (Overbergh et al., 1999)，估算每微升 DNA 中所含的质粒拷贝数，将质粒用 TE 缓冲液稀释 $10^3 \sim 10^7$ 倍，采用 real time RT-PCR (Taqman 探针) 方法进行扩增，两个基因的扩增曲线和标准曲线如图 4-11 和 4-12 所示。

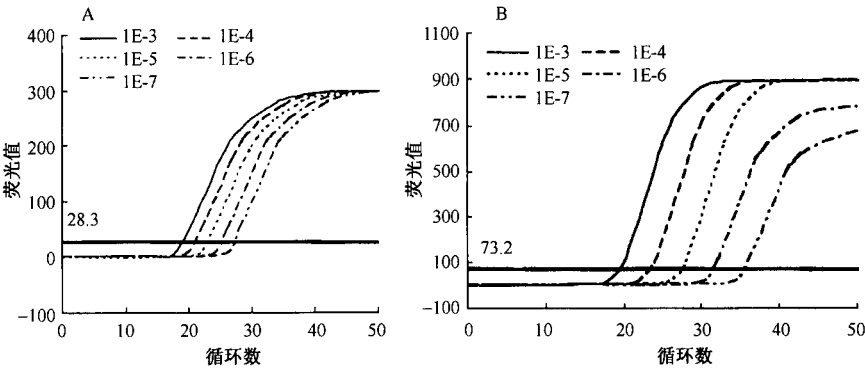


图 4-11 高原鼠兔 ob 基因及 β -actin 基因 real-Time PCR 扩增曲线图
A 为 ob 基因扩增曲线图；B 为 β -actin 基因扩增曲线图

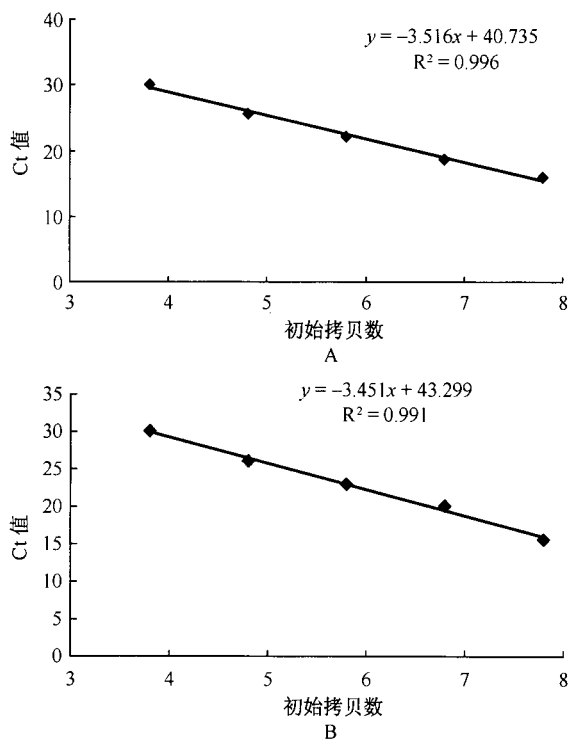


图 4-12 高原鼠兔 *ob* 基因及 β -actin 基因实时 PCR 标准曲线

A 为高原鼠兔 *ob* 基因实时 PCR 标准曲线；B 为高原鼠兔 β -actin 基因实时 PCR 标准曲线

5 高原鼠兔不同组织 *ob* 基因的分布特征

荧光定量 PCR 分析高原鼠兔不同组织 *ob* 基因 mRNA 表达量，其结果显示：不同组织 *ob* 基因的相对表达量存在显著差异（图 4-13），*ob* 基因可在脑、心脏、肺、肝脏、脾脏、肾脏、骨骼肌、白色脂肪组织中表达，其中白色脂肪组织表达量最高，心脏和肺中 *ob* 基因的表达量次之，肝脏和肾脏中 *ob* 基因的表达量最低。

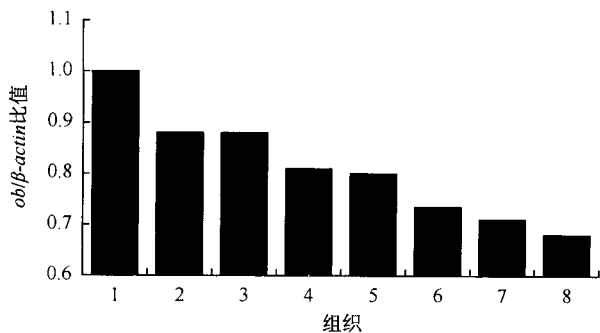


图 4-13 高原鼠兔 *ob* 基因组织分布比较

1. 白色脂肪；2. 心脏；3. 肺；4. 脾脏；5. 骨骼肌；6. 脑；7. 肾脏；8. 肝脏

6 不同海拔下高原鼠兔体重指数 (body mass index, BMI) 比较

不同海拔下高原鼠兔体重指数比较结果显示, 海北站高原鼠兔的 BMI (0.0423 ± 0.00241 , 平均值 $\pm$ S.D) 明显低于果洛地区高原鼠兔 (0.0469 ± 0.0040 , 平均值 $\pm$ S.D): $t = -3.106$, $P = 0.006$ (图 4-14)。

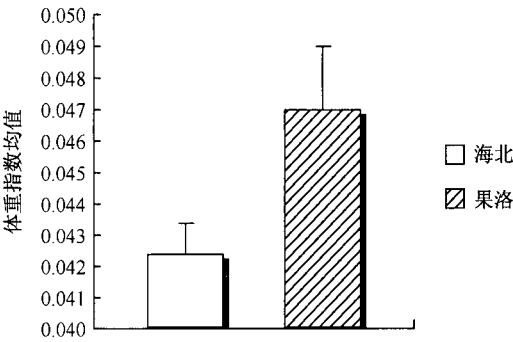


图 4-14 两地高原鼠兔体重指数比较

7 不同海拔下高原鼠兔 *ob* 基因的表达量比较

海北站高原鼠兔的 *ob* 基因表达量 (0.43 ± 0.06494 , 平均值 $\pm$ S.D) 明显低于果洛地区高原鼠兔 (0.60 ± 0.0887 , 平均值 $\pm$ S.D): $t = -5.053$, $P = 0.000$ (图 4-15、表 4-11)。

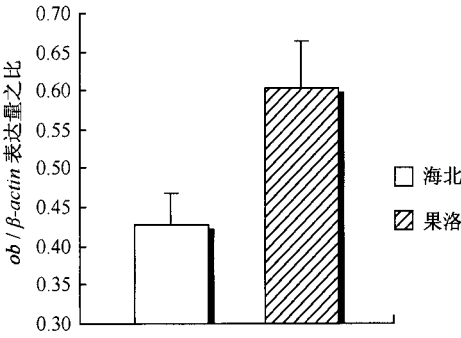


图 4-15 两地高原鼠兔 *ob* 基因表达量比较

表 4-11 不同海拔下高原鼠兔样本特征以及实时 PCR 定量结果

地点	编号	体重 /g	身长 /cm	体重 指数	<i>ob</i>		<i>β-actin</i>		标化值
					拷贝数	对数值	拷贝数	对数值	
海北	1	134	17.5	0.0438	(5.08 ± 2.850)E+02	2.657	(9.21 ± 3.100)E+07	7.945	0.33
	2	126	18.2	0.0380	(9.04 ± 1.690)E+03	3.951	(7.94 ± 2.180)E+06	6.889	0.57
	3	130	17.8	0.0410	(8.05 ± 2.600)E+03	3.889	(2.02 ± 0.136)E+08	8.305	0.47

续表

地点	编号	体重 /g	身长 /cm	体重 指数	<i>ob</i>		<i>βactin</i>		标化值
					拷贝数	对数值	拷贝数	对数值	
	4	138	18.0	0.0426	(2.19±0.455)E+03	3.334	(1.01±0.091)E+08	8.005	0.42
	5	128	17.5	0.0418	(1.08±0.471)E+03	3.003	(3.64±0.647)E+07	7.556	0.40
	6	132	17.8	0.0417	(1.90±0.945)E+03	3.234	(3.85±0.335)E+07	7.585	0.43
	7	156	18.9	0.0437	(1.49±0.592)E+03	3.148	(1.45±0.303)E+07	7.156	0.44
	8	136	17.8	0.0429	(3.36±3.370)E+03	3.525	(3.67±0.059)E+08	8.565	0.41
	9	136	18.3	0.0406	(2.84±1.280)E+02	2.452	(6.64±1.470)E+06	6.821	0.36
	10	143	17.4	0.0472	(2.51±1.831)E+03	3.399	(4.40±1.672)E+07	7.641	0.45
果洛	1	175	17.7	0.0559	(2.15±0.205)E+05	5.331	(1.40±0.155)E+07	7.143	0.75
	2	174	19.1	0.0477	(1.76±0.603)E+03	3.227	(1.58±0.202)E+07	7.196	0.45
	3	160	18.1	0.0488	(2.88±0.226)E+04	4.459	(5.23±0.534)E+07	7.717	0.58
	4	171	19.6	0.0445	(1.32±0.323)E+05	5.113	(2.74±0.402)E+07	7.434	0.69
	5	155	19.6	0.0403	(1.11±0.177)E+05	5.043	(5.52±1.490)E+07	7.731	0.65
	6	172	19.6	0.0448	(8.94±0.737)E+04	4.951	(2.13±0.446)E+07	7.322	0.68
	7	179	19.4	0.0475	(1.86±0.287)E+04	4.267	(1.97±0.263)E+07	7.291	0.59
	8	171	19.3	0.0459	(5.07±2.180)E+03	3.703	(1.14±1.090)E+07	7.056	0.52
	9	178	19.2	0.0483	(1.33±0.586)E+04	4.123	(1.86±0.133)E+07	7.265	0.57
	10	173	19.5	0.0455	(1.49±0.705)E+04	4.173	(3.04±0.665)E+07	7.481	0.56

本研究的采样地点均为典型的高寒草甸生态系统，海拔分别为 3200 m（海北站）和 3900 m（果洛），两地的年平均气温分别为-1.7℃和-2.6℃，无绝对无霜期，植物年平均生长期为 110~130 天。两地均为典型的大陆季风气候，其特点是冬天时间长而且寒冷，夏天时间短而且比较凉爽，经常有大风天气，尤其是在冬季和春季，日温差相对较大，降雨大多集中在 5~9 月之间。通过比较两地高原鼠兔体重指数发现随着海拔的增加体重指数也会增加，果洛鼠兔体内有更多的脂肪储存提示随着海拔的升高，高原鼠兔对能量的需求增加。*ob* 基因在不同海拔高原鼠兔表达变化表明：随着海拔的增高，*ob* 基因的表达量增加，果洛地区的高原鼠兔体内 *ob* 基因的表达量要高于海北站地区的高原鼠兔。这种高原鼠兔体内不同海拔 *ob* 基因表达量的变化对于高原鼠兔来说具有重要的生态学意义，即随着海拔的增加，缺氧加重，环境温度降低，高原鼠兔体温与外环境的温度梯度增加，为维持高海拔环境下的正常生存，鼠兔必须要增加其能量及产热以维持正常的物理活动以及代谢率。因此我们的研究结果揭示了高原鼠兔在不同海拔下高原鼠兔体内能量调节的一种分子机制，也就是随着海拔的增加，通过 *ob*

基因的不同的表达来实现高原鼠兔对能量的需求增加。同时高原鼠兔 *ob* 基因不同组织的表达特征表明：高原鼠兔 *ob* 基因可以在脑、心、肺、肝脏、脾脏、肾脏、骨骼肌、脂肪组织中表达，其中以白色脂肪组织中的表达量最多这与先前的研究结论一致，leptin 主要由白色脂肪组织分泌。其次是心脏和肺的表达量仅低于脂肪组织，而肝脏和肾脏的 *ob* 基因的 mRNA 表达量最低。高原鼠兔 *ob* 基因这种多组织表达特征可能对于维持体内 leptin 的高水平起到调节作用，对于高原鼠兔适应高寒低氧的青藏高原环境具有重要的生态学意义。

8 结论

(1) 高原鼠兔 *ob* 基因在脑、心、肺、肝脏、脾脏、肾脏、骨骼肌和脂肪组织中表达，其中以白色脂肪组织中的表达量最多，其次是心脏和肺表达量仅低于脂肪组织，而肝脏和肾脏的 *ob* 基因 mRNA 表达量最低。这种多组织的表达特征可能对维持体内 leptin 的高水平起到调节作用。

(2) 随着海拔的增加，高原鼠兔的体重指数增加，提示随着海拔的增加，动物对能量的需求增加。

(3) 随着海拔的增加，高原鼠兔 *ob* 基因 mRNA 表达量增加，提示 *ob* 基因可能是不同海拔下高原鼠兔体内能量调节的一个重要因子。

缺氧是青藏高原地区动物生存的主要限制性生态因子之一，高原土著动物在长期进化过程中，形成一套独特的适应高海拔低氧的机制。低氧诱导因子-1 (hypoxia inducible factor-1, HIF-1) 是一种重要的转录因子，由氧依赖的 HIF-1 α 亚基和组成型的 HIF-1 β 亚基组成，在生物的低氧适应调控中具有关键作用。血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 作为 HIF-1 的靶基因之一，在与低氧适应密切相关的血管生成、促进血管舒张等生理过程中具有重要的作用。本章主要是以 HIF-1 α 和 VEGF 以及二者之间的相互关系为切入点来研究高原鼠兔低氧适应的分子机制。研究中，首次成功地克隆了高原鼠兔 HIF-1 α 和 VEGF 的 cDNA，并利用生物信息学方法对其序列进行了分析。利用 Northern 印迹、实时定量 PCR、Western 印迹、免疫组化、细胞免疫染色和荧光素酶报告分析等现代分子生物学方法，对它们的表达、调控和功能等进行了研究。

第五章 高原鼠兔对青藏高原高海拔缺氧环境的生态适应

根据古生物资料记载,现存的各种鼠兔均由古鼠兔亚科(Subfamily Sino-lagomyinae)演化而来。青藏高原的北缘发现的鼠兔化石距今约 3700 万年(Heath et al., 1981)。高原鼠兔世代生活繁衍在高原,是一种经过无数代自然选择过程且对高原缺氧充分适应而保留下来的青藏高原特有的土生动物。高原低氧环境可视为它们生存的正常环境。近十几年来,许多国内外学者对高原鼠兔进行了大量研究并已获得了一些有关的生物习性、形态学、生理学和基因表达等方面的宝贵资料,认为该动物是研究高原低氧适应的理想模型(杜继曾等, 1982; 李庆芬等, 1984; 叶润荣等, 1993, 1994; Ge et al., 1994, 1995, 1998; 何加强等, 1994; 格日力等, 1995; Chen et al., 1997; 余海茹等, 1997; 赵建文等, 1997; 阮宗海等, 2000)。高原鼠兔低氧性肺血管收缩反应(HPV)钝化、肺动脉压不高、无右心室肥大,红细胞数(RBC)、红细胞压积(Hct)和血红蛋白(Hb)不因海拔高度的增加而发生明显改变,其生理特征与在同样环境下的移居大鼠及人类明显不同,而与其他土生动物,如牦牛、南美洲高原的驼羊等类似(Beall et al., 1984; Anand et al., 1986; Durmowicz et al., 1993)。

高原鼠兔的低氧适应机制在器官整体水平上的研究已取得了很大的进展。然而,利用现代分子生物学的方法与技术,在细胞、分子水平上来阐明高原鼠兔对环境低氧适应的详细机制鲜见报道。

本章主要是通过 HIF-1 α 和 VEGF 基因在分子及细胞水平的研究来探讨高原鼠兔对环境低氧适应的分子机制。

第一节 高海拔低氧环境及动物的低氧应答

分子氧是地球高等生命必不可少的成分,在物种进化过程中,动物通过发育复杂的生物学机制来优化氧的利用。低氧研究是生命科学理论的重要课题,低氧的遗传适应、氧感受的信号传导、间歇性低氧和高原病的防治乃是当今国际上低氧研究领域的热点问题。

1 高海拔缺氧概述

随着海拔的增高,大气压力不断降低。海平面的大气压力是 760 mmHg, O_2 易于穿过肺膜进入血液中,在海拔 5500 m 的地方,大气压力只有 380 mmHg,仅是海平面大气压力的一半,此时空气中 O_2 和 N_2 的比例仍是相同的,空气中的氧分压是 80 mmHg (380 mmHg 的 21%),肺泡氧分压甚至低于 45 mmHg。低气压让 O_2 扩散进血管系统变得非常困难,从而缺氧,也称为低压缺氧。

根据缺氧的持续时间可以把缺氧的反应分为四种:①急性缺氧,从几秒钟到 1~2 h;②慢性缺氧,从数小时到数年(低海拔地区的人进入高海拔地区,登山运动员);③终生缺氧(在高海拔地区出生和生活的人);④世代缺氧(已经在高海拔地区生活了几代的人)。急性缺氧也被分类为发生在几秒钟到几分钟的缺氧,慢性缺氧持续时间从几小时到几天 (Lopez-Barneo et al., 2001)。

机体对高海拔缺氧的最初直接反应就是一系列生理现象的产生:呼吸加快、循环增加、肌肉酸痛、心跳加快和血压升高。在这种低氧低压环境下适应一段时间后,机体就会产生更多的红细胞和毛细血管以携带运输更多的氧供机体所需,肌肉中的血管也会增加,以此来满足机体对氧的需求。这一系列的反应都是为了增加组织供氧量。高海拔缺氧反应适应由两个连续阶段构成,即急性反应和慢性反应。高海拔缺氧的急性反应就是指短时间的适应,而高海拔缺氧的慢性反应就是指长时间的适应。短时间适应和长时间适应是个体对环境变化适应的两个主要阶段,这是很普遍的自然现象。短时间适应是通过原有的机制以及潜在的应急机制的激活,如,调动能量资源、结构资源和运输功能等达到适应环境的变化、脂质的迅速变化(依赖于膜蛋白、酶、受体以及离子通道的变化)、第二信使合成的增加,以及细胞新陈代谢的激活。这些机制的改变是基因激活阶段的一个结果,基因激活使急性反应转变成慢性或长时间适应。这个过程包括早期调节基因连续协调的激活和晚期结构基因编码结构蛋白的激活。尽管短期适应和长期适应具有不同的机制和生物学功能,但是这两者是适应过程中两个连续的阶段。早期基因的激活和原癌基因以及应激蛋白的合成增加在适应过程中组成了非特异的联系。而接下来的晚期结构基因的适应是特异的。在适应缺氧的情况下,基因编码的蛋白中与氧的运输、冠状血管的生成及红血球生成有关的蛋白被激活。

2 高海拔缺氧引起的生理反应

在缺氧的高海拔环境下,通常会引起生理机制的调节,主要是氧运输组织,特别是呼吸系统和心血管系统的调节。

2.1 强力呼吸

强力呼吸是机体对低氧的一个重要反应,是指通过吸入更多的空气来增加对氧气的摄取。在海平面上呼吸正常,肺泡氧分压约为 100 mmHg。随着海拔的增加,氧分压逐渐降低,肺泡二氧化碳分压也降低,表明强力呼吸渐渐增加。没有强力呼吸,就不能在高海拔条件下存活。强力呼吸减轻了动脉血氧不足,无论对于短期适应还是长期适应,这都是非常必要的。呼吸增强依赖于周边化学感应器的活性,尤其是那些位于颈动脉内的化学感应器,它们可以检测到动脉血氧浓度的变化,并且传递信息到脑干神经细胞来调节呼吸 (Prabhakar et al., 1993, 1996, 2000)。外围化学感应器的低压刺激开始处于低氧环境的最初几秒(从肺到颈动脉化学感应器的循环时间),而且会由于开始几小时或几天内一直处于高海拔条件下而不断加强。随着在高海拔停留时间的增加强力呼吸也逐渐增强,原因是颈动脉化学感受器促进感受性的增强,这种增强的感觉从化学感应器输送到骨髓,进而增强对同样水平的动脉需氧不足的感受。pH(由于开始时是低二氧化碳分压, pH 是偏碱性的)也逐渐转到正常,这是因为肾脏排泄钠离子和碳酸氢钾 (Gledhill et al., 1975; Bartsch et al., 1988, 1991; Swenson et al., 1995)。

2.2 氧合血红蛋白氧合/解离

氧合血红蛋白解离曲线(氧合曲线)的特征对于机体适应高海拔缺氧能力是非常重要的 (Moore et al., 1981, 1986; Winslow et al., 1984)。在高于 3048 m 的任何一个高度,动脉血氧分压都会降落到氧合血红蛋白解离曲线(氧合曲线)急剧升降的部分,低于高原地区的安全范围。结果,动脉血的血红蛋白饱和度也随着海拔的升高而迅速下降。在氧合血红蛋白饱和度降低至 90%之前,动脉血氧分压可以降低到 30~35 mmHg(氧分压约为 60 Pa)。此外,由于高海拔的强力呼吸,动脉二氧化碳分压降低,动脉中 pH 升高,所以氧合曲线向左移动。因而在任何氧分压的情况下,流经肺部的动脉血都能够维持高水平的氧饱和度和氧容量。

2.3 红细胞浓度增加

血液中红细胞浓度的增加是对高海拔环境适应的一个重要特征 (Richalet et al., 1994; Sawka et al., 1996)。低氧低压环境可以刺激肾脏和肝脏细胞释放红细胞生成素 (erythropoietin, EPO),这种激素又可以刺激骨髓产生红细胞。红细胞生成的增加导致血红蛋白浓度的增加,而血红蛋白浓度的增加是血液运输氧气能的关键因素。这表明,尽管在高海拔环境下动脉氧分压和氧合血红

蛋白饱和度降低,但是动脉血的氧容量仍是接近正常的。

2.4 血液流动

对于急性缺氧,标准的血液动力学反应是心率增加 (Vogel et al., 1967; Reeves et al., 1992; Kanstrup et al., 1999; Veglio et al., 1999)。这是由于血液在流向不同的器官过程中(如骨骼肌、肾脏、肠和脑)需要更多的氧气供应。心率的增加增强了心脏的泵血功能,有助于恢复身体的氧气运输。在缺氧条件下适应几天之后,心脏每搏输出量降低,心输出量回复到原先水平,可能是因为高海拔下多尿导致血浆体积降低 (Bestle et al., 2002)。

缺氧还可以选择性的扩张脑和冠状循环中的一些血管。身体、脑以及冠状循环中的血流速度的增加也会部分的抵消由于氧合血红蛋白饱和度减少而引起的氧气运输的降低。无论是急性供氧不足还是慢性供氧不足,大脑的血流都会通过大脑血管收缩神经和血管扩张神经的反应而受到严格保护。缺氧造成的血管舒张可以被血内碳酸过少引起的血管收缩抵消,最终的结果是加速大脑血液流动。这种反应是为了保护低氧条件下大脑氧气的正常运输,这对于大脑是非常重要的,因为脑中的一元胺和神经传递素代谢对氧气是非常敏感的。长期的供氧不足也会在离体大脑血管中改变这些反应 (Brian et al., 1996; Buck et al., 1998)。这些效应对于那些由于急性或慢性缺氧而造成的异常(包括脑循环在内)尤为重要。利用正电子发射断层显像 (PET) 技术对不同地区人们的大脑血流速度进行测量,表明短期缺氧会更多地引起下丘脑的血流速度增加。

2.5 线粒体 O_2 扩散的毛细血管作用

随着适应高海拔环境,人类骨骼肌中的线粒体体积与完整的线粒体体积相比减少了近 30% (Hoppeler et al., 1990)。而骨骼肌中的毛细血管密度(每单位面积里的毛细血管数量)却随着肌纤维直径的减少而增加 (Boutellier et al., 1983; MacDougall et al., 1991),因而使组织氧的传递变得更加容易。在骨骼肌和心肌中,肌红蛋白含量的增加使得从毛细血管到线粒体传送氧的过程更加容易,也可以在肌肉中储存氧以备短时间缺氧所需。

2.6 底物新陈代谢的调节

高海拔缺氧改变底物新陈代谢的调节以更加有利于碳水化合物 (CHO) 氧化。由于氧化磷酸化受到限制引起可利用能量的减少,为了满足机体 ATP 的供应,细胞通过上调糖分解酶和下调一些需要消耗 ATP 的蛋白(如 Na^+-K^+ ATP 酶)的活性来增强无氧糖酵解。对高海拔 (4300 m) 的适应导致血液葡萄糖的消耗增加 (Brooks et al., 1991),也进一步增加血液对葡萄糖的依赖性

(Roberts et al., 1996)。近几年研究表明, 机体为了适应高海拔环境, 一些组织器官(如心脏、肝脏和骨骼肌), 可以选择性的降低在脂肪利用和氧化方面的一些关键酶的活性(Kennedy et al., 2001)。机体对血液葡萄糖的依赖要胜于对脂肪酸代谢的依赖, 其原因可能是这样可以优化每个单位氧所产生的能量, 而有助于维持动态平衡。碳水化合物的氧化过程中每分子氧可以产生更多的 ATP, 还能够通过无氧代谢产生 ATP 和乳酸。然而, 一些研究提出了间接的证据, 即机体为适应高海拔环境, 增加了脂肪的利用, 从而可以节约肌肉储藏的糖原(Young et al., 1992)。

3 高海拔缺氧引发的细胞和分子水平上的反应

高海拔低氧低压引起的最初反应在宏观上表现为生理功能的反应, 而在分子水平上存在着多细胞生物需氧和信号转导的精确调节机制(Lopez-Barneo et al., 2001), 根据这些机制能够检测到氧分压的降低, 以及接下来的一系列相关事件的发生。大自然赋予了多细胞生物需氧和信号转导的精确调节机制(Lopez-Barneo et al., 2001)。最初氧感受归因于位于化学感应器器官(颈动脉、大动脉或神经上皮细胞)(Prabhakar, 2000; Prabhakar et al., 2000), 这些感应器细胞能够在兴奋、收缩或分泌时的几秒钟或几分钟的改变过程中对氧的消耗做出反应。目前研究发现人类机体的有核细胞能感知氧浓度, 并对急性和慢性降低的氧浓度做出反应。

生活在低地的人若短时间处于高海拔环境, 引发的缺氧防卫机制有几种氧感知的信号感受转导途径, 被描述为五种缺氧反应系统: ①颈动脉的氧传感器(Acker et al., 1989; Acker, 1994a, 1994b)产生缺氧通气反应(HVR)(Lahiri, 2000), 不顾发生碱毒症的危险, 来满足机体短时间内对氧的需求(Samaja et al., 1997; Lahiri, 2000; Samaja, 2001); ②肺部脉管系统的氧传感器(Archer et al., 1993, 1999; Samaja et al., 1997, 2001; Lahiri, 2000; Samaja, 2001)调控缺氧时肺的血管收缩神经的反应, 进而调节肺灌注(Heath et al., 1984; Groves et al., 1993); ③其他组织的脉管系统的氧传感器激活了血管内皮生长因子(Forsythe et al., 1996)和其受体(Detmar et al., 1997)的表达, 从而引起血管新生, 特别是在心脏(Hashimoto et al., 1994)中, 也有可能在大脑(Harik et al., 1996)中起作用; ④肾脏和肝脏中的氧传感器激活了促红细胞生成素的表达, 造成了红细胞数量的上调(Goldberg et al., 1988, 1994; Goldberg-Cohen et al., 2002); ⑤组织特异性氧传感器和信号转导途径导致了新陈代谢的重新调节(Hochachka et al., 1996), 至少部分的通过改变低氧敏感基因的表达速率来改变代谢酶和代谢转运体(Bunn et al., 1996, 1998)。

3.1 氧敏感的分子基础

虽然对哺乳动物氧传感器特性的了解还不是十分清楚,但目前仍有很多种氧传感器机制的说法 (Prabhakar et al., 1996, 2000; Chandel et al., 1998, 2000; Lahiri, 2000; Prabhakar, 2000; Lopez-Barneo et al., 2001)。氧传感器被认为是一种血红素蛋白,在脱氧形式下通过信号传递或直接激活受动器。基于亚铁血红素的氧传感器的存在与否还不太确定,因为一些亚铁血红素蛋白,如血红蛋白,具有很高的氧亲和力。亚铁血红素氧传感器可能存在于促红细胞生成素分泌的细胞中 (Goldberg et al., 1988; Acker, 1994a)。线粒体细胞色素对氧的亲和力较低也能够作为氧传感器;但是对这种由细胞色素作为氧传感器的机制还不是很了解。通过光谱测量 I 型颈动脉体细胞和肝细胞瘤细胞株 Hep G2 细胞,表明氧传感器是一种细胞质中跨膜的多亚基组成的细胞色素 *b*,它与氧结合形成过氧化物,而产生氧活性中间体 (ROI)。有几种非线粒体酶,例如, NADPH 氧化酶,也包含亚铁血红素,它们的活性严格依赖于氧的利用。

被认为是氧传感器的另外两个有效的机制是 NADPH 氧化酶和线粒体 (Jones et al., 2000; Lopez-Barneo et al., 2001)。NADPH 氧化酶是由多亚基组成的酶,包括跨膜催化复合物: gp⁹¹phox 和 p²²phox 亚单位、b558 细胞色素和几个细胞质调节亚单位。NADPH 氧化酶能通过改变生产过氧化物阴离子 (O₂⁻) 的速率转换 O₂ 水平 (Overholt et al., 2000; Prabhakar, 2000; Prabhakar et al., 2000)。O₂⁻ 产生过氧化氢的歧化作用能使转录因子或离子通道氧化。有文献提出 NADPH 氧化酶所产生的 ROS 又可以通过钾通道来调节膜电压 (Acker et al., 1989)。然而, NADPH 氧化酶的直接功能不像是氧传感器,因为缺陷 gp⁹¹phox 和 p²²phox 的细胞株内氧依赖的基因表达调控并未被损害的 (Wenger et al., 1996, 1998; Wenger, 2002)。不过,作为氧传感器的“低输出” NADPH 氧化酶同工酶的存在与 NADPH 氧化酶密切相关,但是与噬菌体细胞的高输出氧化酶相距甚远,或许不能被排除 (Acker, 1994a, 1994b)。NADPH 氧化酶异构体具有不同的 gp⁹¹phox 亚基和不正常的细胞色素 aa3,其带有的亚铁血红素 a/a3 为 9:91,它可以作为氧传感器蛋白影响基因表达和离子通道的传导率 (Porwol et al., 2001)。近年来对心肌细胞的研究指出,线粒体可能会作为氧传感器,在缺氧条件下表现为细胞色素氧化酶 V_{max} 降低,导致在还原阶段电子积累,ROS 的产生增加 (Chandel et al., 2000)。很可能随着 P (O₂) 的减少而反应指数增长,可能会在细胞质线粒体和膜结合的 NADPH 氧化酶中有所体现。然而,鉴定这样一种氧化酶,无论是在线粒体还是细胞质,关键是通过 P (O₂) 依赖的 ROS 的产生来分析 O₂ 依赖的基因表达,目前这些还不太清楚。利用双光子共聚焦显微镜获得的核周 Ros Fenton 反应图像表明,线粒

体和非线粒体都产生 ROS (Porwol et al., 2001)。有趣的是, 线粒体 DNA-less (ρ^0) 细胞对缺氧有正常的反应 (Srinivas et al., 2001), 这就暗示着在低氧信号传递过程中 ROS 不是唯一的信号分子。

3.2 高海拔诱导的基因表达

高海拔的低氧低压环境对机体造成压力, 在生理上的表现是受到分子水平上的某些特定基因的表达来调控的。在颈动脉体, 缺氧引起电导率被迅速的抑制, 这是通过两种方式完成, 一通过钾离子通道, 二是通过诱导酪氨酸羟化酶 (TH) 基因的表达, 酪氨酸羟化酶 (TH) 基因是在神经传递素多巴胺合成过程中一种编码限速酶的基因 (Czyzyk-Krzeska et al., 1994; Norris et al., 1995)。诱导酪氨酸羟化酶 (TH) 可以有利于通过颈动脉体控制通气量。低氧通气反应 (HVR) 是受到颈动脉体动脉化学感应器和单核管 (NTS) 的多巴胺 D(2) 受体 [D(2)-R] 调节的。长时间缺氧则会改变 D(2)-R 基因的表达, 进而改变 D(2)-R 对低氧通气反应的调节, 促进通气来适应缺氧环境。缺氧还会诱导颈动脉体中内皮素基因的表达, 这是通过提高细胞内钙离子水平以及促进血管球细胞的增殖达到增强化学感应器反应的目的 (Paciga et al., 1999; Chen et al., 2000)。

氧压的改变能够上调一些基因的表达, 包括红细胞生成、血管生成、组织重建和控制血管收缩。这些基因包括红细胞生成素 (EPO)、铁传递蛋白、铁传递蛋白受体、血管内皮生长因子 (VEGF)、VEGF 受体 Flt-1、碱性纤维原细胞生长因子 (bFGF)、血小板来源的生长因子 A 和 B、类胰岛素生长因子 2 (IGF-2)、内皮素-1 (EDN-1)、一氧化氮合成酶 (NOS) 和血红素加氧酶-1 (HO-1)。缺氧还会诱导与葡萄糖代谢有关的酶的基因表达 (Semenza, 2000a, 2000b; Lopez-Barneo et al., 2001), 如葡萄糖转移因子 GLUT-1 和 GLUT-3、糖分解酶醛缩酶 A 和 C、己糖激酶 1 和 2、3-磷酸甘油醛脱氢酶、乳酸脱氢酶 A、磷酸果糖激酶 L、磷酸甘油酸激酶-1、丙酮酸激酶 M 和三磷酸异构酶。内皮细胞中很多基因的表达也受到组织氧合的调节, 包括血小板来源的生长因子 (Kourembanas et al., 1990, 1991)、白细胞介素-1 α (Shreeniwas et al., 1992)、白细胞介素-8、内皮素-1、IGF 结合蛋白 1-3、p21、p35srj 等 (Semenza, 2000a, 2000b)。而绝大部分的这些基因都能被 HIF-1 调控, 它是低氧调控中的关键基因 (Semenza, 2003)。

第二节 高原鼠兔对高海拔低氧环境生理适应特征

1 血液学的特征

高原鼠兔对低氧环境的适应在血液学上是以低 Hct、低 Hb 为特征的, 不因

海拔高度的变化而出现明显改变。研究表明,不同海拔高度的高原鼠兔 Hct 和 Hb 均明显低于生活在同一环境中的 Wistar 大鼠,从 2300~5000 m,高原鼠兔的 Hct 仅增加了 15.18%,而 Wistar 大鼠增加到了 57.13% (杜继曾等,1982;阮宗海等,2000;格日力等,1995;Ge et al.,1998)。机体对低氧刺激的反应就是增加循环内的 RBC 数目以增加携氧能力以弥补大气中的供氧不足,但 RBC 的过度增加反而对机体产生负面影响。Hct 与血液黏度呈线形关系,如红细胞数量超过 50% 时全血黏度显著升高,血液流动明显缓慢,超过 70% 时血液实际在微循环内呈停滞状态。心脏泵血功能是氧从血液传递到组织的一个关键因素 (Ge et al.,1995),当 Hct 达到一定程度时外周阻力和血液黏滞度明显增高,导致后负荷增加使左室收缩功能降低而使心输出量下降。高原鼠兔的 Hct 及 Hb 仅随海拔的升高呈轻度增加,这种变化以求 Hb 携带更多的氧到组织中去,同时又不使血液黏滞性过度增加而有利于组织的灌流,这是高原鼠兔在血液方面已适应高原的一大特点,与高原世居人群和其他动物是一致的 (Adams et al.,1975;Beall et al.,1984)。虽然高原鼠兔的 Hct 及 Hb 低于大鼠,但在每升血液中红细胞的个数较人和其他的动物多。有人将灰尾兔 (*Lepus oiostolus*) 和高原鼠兔的骨髓各级幼红细胞的透射电镜照片进行了“Feret's”直径的研究,高原鼠兔红细胞在成熟过程中各期红细胞的直径均小于灰尾兔,其晚幼红细胞的直径与外周血的红细胞直径相似 (马志军等,2000),这一特点与其他高原动物牦牛及高原驼类似,其直径较小本身就降低了血浆黏滞度,促进血流速度加快,同时通过增加红细胞数量来携带更多的氧,由于红细胞较小,这似乎增加了红细胞的表面积,也有利于氧的弥散。铁是血红蛋白的基本组成部分,是生成红细胞的原料之一,随着红细胞数和血红蛋白含量的增加,对铁的要求也会相应增加,铁蛋白是体内铁的一种分布形式,是反映铁含量的敏感指标,其含量随海拔的升高而增加 (张彦博,1996)。高原人群血清铁含量和转铁蛋白含量相对较高,这是为了达到红细胞破坏与补偿间体内铁含量的动态平衡。有研究表明,室内长期培育和繁殖的封闭群高原鼠兔与野生高原鼠兔比较,血清运铁蛋白含量无差异,随着海拔的升高,对铁的需求增加,因此要相应地提高运铁能力,而这一过程的完成主要通过增加运铁蛋白与铁的结合力而不是增加运铁蛋白的含量来实现的 (叶润荣等,1993),这样对减少血液黏稠度及血液循环阻力,减轻心脏负担起到了积极的作用。不同的血红蛋白类型具有不同的氧亲和力,正常海拔高度,外界环境供氧正常,血红蛋白组分不发生改变,但长期生活在低氧环境中,为了适应这种环境除了增加红细胞数量外,在分子水平上血红蛋白组分也发生了改变。海拔 2260 m 的 Wistar 大鼠血红蛋白电泳带形与低海拔的 Wistar 大鼠电泳带形相同,分为 A1. A2. F,当移居高海拔一个月后随即出现 1 条新带,即成为 4 条带形,但与高原鼠兔 5 条带形的电泳不相同 (阮宗海等,2000),当高原鼠兔移至低海拔

30 天后, 带形也发生了改变, 此种改变可能是 Hb 呈现的多态现象, 对适应环境、调节改善机体的氧供应具有积极的意义。红细胞除了具有运氧能力外, 有研究表明, 高原鼠兔的红细胞膜上存有 C_3b 受体, 有较强的黏附免疫复合物的能力 (叶润荣等, 1995), 所以它还具有较强的免疫功能。

2 携氧及氧利用特征

人及动物移居高原低氧环境时最主要的代偿方式是, 通过各种途径对氧的运输及氧利用的调节, RBC、Hct 及 Hb 增加, 肺动脉压升高, 某些器官重量增加等代偿性适应过程, 这种变化会给机体提供较多的氧, 对维持血氧分压和氧饱和度相对恒定产生积极的作用。然而 RBC 过度增生, 会导致血液黏滞度增加, 从而降低了外周组织中的血流及氧含量, 并造成不同程度的心脏损害。高原鼠兔在低氧环境下 P_{50} 显著降低, 氧解离曲线左移 (顾浩平等, 1991), 大鼠则无明显改变。鼠兔 P_{50} 的降低意味着在低氧条件下与氧的亲合力明显高于大鼠, 也就是在鼠兔的肺部 Hb 能与更多的 O_2 结合成 HbO_2 。但并不减少对组织氧的释放, 其原因不仅与氧解离曲线左移有关, 而且与曲线中下段坡度明显比大鼠陡峭有关, 这一特征使得鼠兔在肺部氧分压较高时具有很强的 Hb 氧亲合力, 从而显著增加携氧量, 而在组织这个氧分压较低的部位, 由于曲线中下段陡峭, 使得氧分压稍有降低, Hb 就会释出大量的氧。可使机体保持了较高的血氧分压和氧饱和度, 不会因缺氧而引起 RBC 过度增生, 而使组织能获得足够的氧, 以满足机体的需要。有报道表明 (何加强等, 1994; 张彦博, 1996), 鼠兔与大鼠混合静脉血 HbO_2 两者间无差异, 而动脉血两者间差异显著, 鼠兔明显高于大鼠, 说明鼠兔的动脉血经组织回流到右心, 氧饱和度下降的梯度大于大鼠。动静脉 (A-V) 氧差可作为评价向组织释氧能力的客观指标 (Heath et al., 1981), 在海拔为 2300 ~ 5000 m 的高度, 鼠兔的 Hb 仅增加了 15.18%, 而大鼠增加了 57.11%; 氧的利用率, 鼠兔为 66.13%, 大鼠仅为 23.19% (杜继曾等, 1982)。高原鼠兔的耗氧量明显高于兔、豚鼠、大鼠和人, 所以说鼠兔在组织释氧能力及氧的利用率均优于大鼠。2, 3-二磷酸甘油酸 (2, 3-DPG) 被认为是调节血氧亲和力的重要因素 (Ackers, 1979), 人和动物暴露于高原环境后, 血中 2, 3-DPG 明显升高 (Mairbaurl et al., 1990; 余海茹 et al., 1997), 其主要是抗衡由于低氧引发的呼吸性碱中毒使得氧解离曲线左移。研究表明, 慢性缺氧的大鼠 pH 与高原鼠兔无明显差异 (张彦博, 1996; 余海茹等, 1997), 可能由于 2, 3-DPG 的增加降低了 pH (格日力等, 1995)。由于 2, 3-DPG 的增加使氧解离曲线右移导致 P_{50} 增加, 引起血氧亲合力显著降低, 从而使血液由肺部摄氧过程发生困难。高原红细胞增多患者的 P_{50} 明显高于健康人, 且 P_{50} 与 2, 3-DPG 之间呈正相关 (格日力等, 1995), 说明血中 2, 3-DPG 异常升高, 可能进一步降低血氧亲合力, 使氧

解离曲线显著右移, 摄氧能力减弱, 从而使氧饱和度降低, 其结果又促使 2, 3-DPG 合成, 导致氧饱和度进一步降低, 由此形成恶性循环。故此 2, 3-DPG 浓度过高是适应不良症状的表现之一。在大气氧分压恒定的情况下, 影响动脉氧分压的因素主要是肺通气与肺换气。关于高原鼠兔的通气变化未见报道, 但其从高原移居平原再到高原 4 周后血气二氧化碳分压值未发生改变, 可以间接表明肺通气未发生改变。低氧性通气增加主要与颈动脉体的化学感受器有关, 高原世居者对低氧通气反应明显低于移居者。关于颈动脉体组织学超微结构与缺氧通气反应钝化的关系尚未见报道, 长期移居高原的大鼠, 其颈动脉体超微结构均有不同程度的缺氧性损害, 如 I 型细胞的增生肿胀、线粒体变性肿胀等, 但高原鼠兔的颈动脉体未见具有缺氧性损伤征状, 其微细结构与平原大鼠相似 (俞诗源等, 1996)。在高海拔地区, 鼠兔仍能保持较高的动脉血氧分压, 肺气体交换更加有效, 这样充分保证组织中的氧含量。尽管氧张力减少, 部分原因可能是由于低氧通气反应的钝化 (HVR)。

3 肺血管结构和动能的变化

低氧性肺动脉高压的特点是以肺血管收缩反应增强和肺小动脉壁平滑肌细胞的异常增生, 引起血管重构 (vascular remodeling) 为主。居住在海平面的人和动物暴露于高原后, 由于低氧引起肺小动脉压力增高, 从而改善了通气血流的匹配, 减轻低氧血症, 这是一个重要的适应机制。但长期低氧使肺血管出现形态的改变, 主要表现为肺小动脉中层肥厚, 无肌型肺小动脉出现平滑肌层, 而成为新肌化血管, 进一步促进了肺动脉压力增加。严重的肺动脉高压将引起右室负荷的加重, 导致右室肥厚, 限制了心脏血液输出, 还可能导致右心衰 (Durmowicz et al., 1993; Groves et al., 1993)。低氧 30 天的大鼠右心室/(左心室+室间隔) 比值 (RVW/LVW) 为 0.40~0.50, 鼠兔经过自然选择似乎失去了这种低氧性肺血管收缩反应, 缺乏右室肥厚, RVW/LVW 仅在 0.21~0.23 之间。其肺动脉树显示薄壁结构, 肺小动脉平滑肌缺如, 较小的肺动脉的管壁厚度小于 100 μm , 仅由一弹力纤维层组成 (Ge et al., 1998; 阮宗海等, 2000)。有人用扫描电镜观察了达乌尔鼠兔 (*Ochotona daurica*) 肺毛细血管的结构, 发现其肺微动脉也缺乏平滑肌, 管壁厚度小于 100 μm 的小动脉管壁由一层内皮和弹力膜构成, 缺乏肌性中膜 (俞诗源等, 1996)。而大鼠随着海拔的升高肺动脉压 (Ppa) 明显增加, 同样大小的肺小动脉, 在内外层的弹性纤维中有一较厚的平滑肌层, 血管壁的增厚与平均 Ppa 呈正相关 ($r=0.769$)。肺组织和血管内皮细胞是分泌和合成血管活性物质的重要场所, 可合成并释放具有舒缩血管作用的物质, 从而对血管张力有重要调控作用。低氧使大鼠肺血管周围肥大、细胞密度增加, 肥大细胞增生的数量和小动脉中层的厚度有较好的相关性 (Tucker et al.,

1977; Heath, 1992)。肥大细胞释放某些介质,如组织胺等使肺血管收缩,随着免疫组织化学及分子生物检测技术的发展,发现肥大细胞除了释放舒缩血管介质外,还合成和释放很多生长因子,其中类胰蛋白酶(tryptase)是肥大细胞分泌的一种血管新生因子,在大鼠的肺小动脉周围有许多肥大细胞,tryptase 免疫组织化学染色呈阳性,而鼠兔的肺小动脉血管周围则没有肥大细胞及此种免疫反应(Ge et al., 1998),提示大鼠肺小动脉中层厚度的增加与肥大细胞分泌的 tryptase 有关。TGF- β (transforming growth factor- β) 是一种血管再建的调节因子,低氧能刺激 TGF- β 的 mRNA 表达(Botney et al., 1994),在原发性肺动脉高压的患者及慢性缺氧的大鼠肺组织的肌化血管 TGF- β 抗体染色呈阳性,非常有趣的是高原鼠兔的肺组织却没有这种反应,所以在较高的海拔,鼠兔无肺动脉高压,也缺乏此种小血管的再建过程,这与世居人群的结果是一致的,是一种遗传性的适应(Chen et al., 1997)。NO 对调节低氧性肺血管收缩反应(hypoxia pulmonary vasoconstriction, HPV)具有重要的意义,不管是慢性缺氧性肺动脉高压动物模型的肺血管或是离体肺的灌注,还是慢性阻塞性肺病患者的肺血管环,均发现其对乙酰胆碱的内皮依赖性舒张作用减弱,说明慢性缺氧时血管内皮受损,内皮损伤能增加 HPV,慢性缺氧的大鼠 NOS 活性下降,NO 含量降低,NO 和肺动脉压有较好的相关性,肺小动脉壁厚度和 NO 的水平呈负相关,也有较好的相关性(王晓勤等, 2001),所以 NO 释放的减少既导致了肺血管缺氧性收缩反应,又参与了肺血管的结构再建过程。高原鼠兔在长期低氧环境下肺血管内皮细胞及平滑肌无低氧性损伤,能维持 NO 正常释放,对维持肺血管的低张力起到了重要作用(王晓勤等, 2001),这也是它适应低氧环境的重要机制之一。

近来的研究表明,低氧诱导因子-1(HIF-1)可介导内皮素(ET)、血管内皮生长因子(VEGF)、红细胞生成素(Epo)等在 HPV 中发挥着相应的作用,但它们在高原鼠兔体内是否存在,它们的功能和调节机制以及彼此之间的关系仍不十分清楚。总之低氧性肺动脉高压的形成,从客观上看是由于血管收缩与舒张之间失去平衡所致。

第三节 低氧诱导因子-1 (HIF-1)

HIF-1 是 1992 年由 Semanza 等在低氧的肝癌细胞株 Hep3B 细胞的核提取物中发现的一种氧依赖的转录激活因子,通过与低氧反应元件(HRE)特异性结合,引发下游基因的转录。

1 HIF-1 的结构和功能

HIF-1 在细胞低氧信号转导途径中处于核心地位,发挥着关键作用。目前已

报道的受 HIF 调控的基因有 150 余种, 包括红细胞生成素 (EPO)、糖酵解酶 (glycolytic enzyme)、诱导型一氧化氮合酶 (iNOS)、血管内皮生长因子和细胞存活因子 (如 IGF-2、TGF- α) 等, 这些基因涉及血管生成、红细胞生成、能量代谢、细胞存活和增殖等多方面, 在细胞和机体的低氧生理反应中至关重要。

HIF-1 是由 α 和 β 两个亚基组成的异源二聚体蛋白。HIF-1 β 为 (也被称为芳香烃受体核转移蛋白, ARNT) 组成型表达, 是几种转录因子的共同亚基; 而 HIF-1 α 是氧调节蛋白, 为 HIF-1 独有。人类 HIF-1 α 基因定位于 14 号染色体 (14q21~24) 上, 其 cDNA 全长 3720 bp, 编码 826 个氨基酸。HIF-1 α 的 N 端 (第 1~390 位氨基酸) 包括碱性螺旋-环-螺旋结构域 (basic helix-loop-helix domain, bHLH) 和 PAS 结构域 (图 5-1), 是与 HIF-1 β 形成异源二聚体和顺式反应元件的区域 (Jiang et al., 1996a)。HIF-1 的 C 端决定了氧调节的稳定性和蛋白的转录活性 (Jiang et al., 1996b), 包括两个反式激活域 (transactivation domain, TAD), 即 N-TAD (第 531~575 位氨基酸) 和 C-TAD (786~826 氨基酸), 这两个 TAD 之间为抑制结构域 (inhibitory domain, ID), 能抑制该分子在正常氧条件下的反式激活作用。此外 HIF-1 α 存在两个核定位信号 (nuclear localization signal, NLS), 分别位于 N 端的第 17~33 位氨基酸和 C 端的第 718~721 位氨基酸, 其中 C 端的 NLS 在介导 HIF-1 α 进入细胞核的过程中起着关键作用。HIF-1 α 极不稳定, 在常氧条件下, 半衰期不到 5 min。与其降解有关的结构域称为氧依赖的降解结构域 (oxygen-dependent degradation domain, ODD) (第 401~603 位氨基酸), 此区域包含 N-TAD, 抑制 HIF-1 α 的降解。

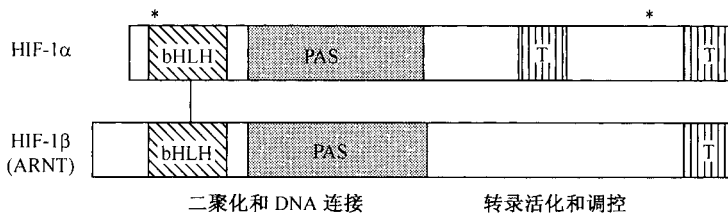


图 5-1 低氧诱导因子 1 的结构 (Wang et al., 1993)

2 HIF-1 调节机制

HIF-1 的调控主要是通过氧依赖的 HIF-1 α 亚基的降解。低氧状态下哺乳动物细胞内 HIF-1 α 蛋白水平急剧增加 (Semenza, 2004), 是因为在低氧状态下 HIF-1 α 中关键的脯氨酸和天冬酰胺残基未被羟基化, 从而阻止了蛋白的细胞内水解。然而在常氧条件下, HIF-1 α 上特殊的脯氨酸和天冬酰胺残基被羟基化后, 与 VHL 蛋白 (the von Hippel-Lindau protein) 结合, 于是促使由蛋白酶体作用的胞内蛋白水解 (Lee et al., 2004)。目前已知 3 种人 HIF- α 脯氨酸羟化酶

(prolyl hydroxylases domain containing protein, PHD), 分别为 PHD1、PHD2 和 PHD3 (Bruick et al., 2001), 它们均能特异性地羟化 HIF-1 α 氧依赖降解结构域中的 Pro402 或 Pro564。HIF-1 α 氧依赖降解结构域中的第 561~575 位氨基酸片段在脯氨酸残基被羟基化后形成的 β 折叠构象, 通过两个不连续片段与 VHL 蛋白的 β 结构域结合, 继而被泛素蛋白酶降解。

3 HIF-1 的作用机制

HIF-1 在细胞低氧信号转导过程中发挥枢纽性的关键作用。低氧条件下, HIF-1 α 降解途径被阻遏, 大量的 HIF-1 α 蛋白积聚并同 HIF-1 β 结合, 形成具有活性的 HIF-1。HIF-1 与其靶基因的特异性 DNA 结合序列 (5'-RCGTG-3', 该序列位于靶基因的启动子、增强子等低氧反应元件内) 相结合, 从而使得其羧基端的转录激活区参与基因转录调控, 进而调控编码红细胞生成素、血管内皮生长因子等低氧基因的表达, 最后引起一系列的生理反应, 维持有机体的氧平衡 (Semenza, 2000a)。无论是在细胞水平, 还是在有机体局部甚至是整体水平, HIF-1 都是氧感应子与氧效应子之间联系的关键性纽带, 而 HIF-1 α 可以被认为是细胞低氧适应反应所必需的核信号, 如图 5-2 所示 (Semenza, 1998, 1999)。

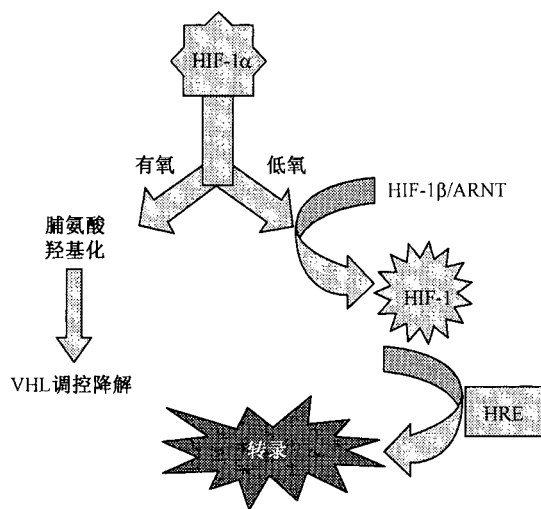


图 5-2 低氧诱导因子-1 α 的功能机制

第四节 基于 HIF-1 α 基因探讨高原鼠兔的低氧适应机制

基于 HIF-1 在低氧适应中的重要性和高原鼠兔对低氧的耐受, 我们以 HIF-1

的低氧调节亚基 HIF-1 α 为切入点对高原鼠兔的低氧适应机制进行了研究。本节介绍了在此研究中用到的一些分子生物学和生物信息学方法以及取得的主要成果。

1 高原鼠兔 HIF-1 α 全长 cDNA 克隆及其序列分析

本工作主要采用 RT-PCR 以及 3' RACE 和 5' RACE 方法克隆出高原鼠兔 HIF-1 α 基因全长 cDNA 序列, 并对其序列及分子结构进行分析。

1.1 克隆策略及引物设计

高原鼠兔 HIF-1 α 基因序列未见报道, 它是一个未知基因, 为尽快得到其序列, 我们拟采取 RT-PCR 及 RACE 技术获得其 cDNA 全长。实际试验过程中我们采用了分段扩增策略, 通过片段间的重叠区域获得全长。克隆策略如图 5-3 所示。

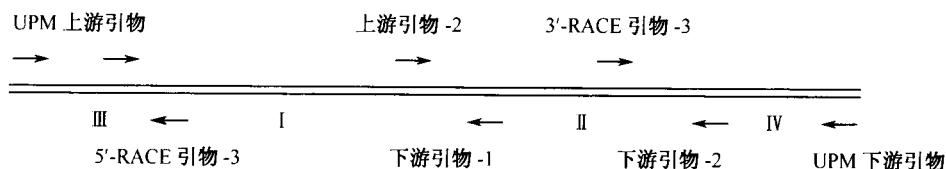


图 5-3 扩增引物及相应片段位置

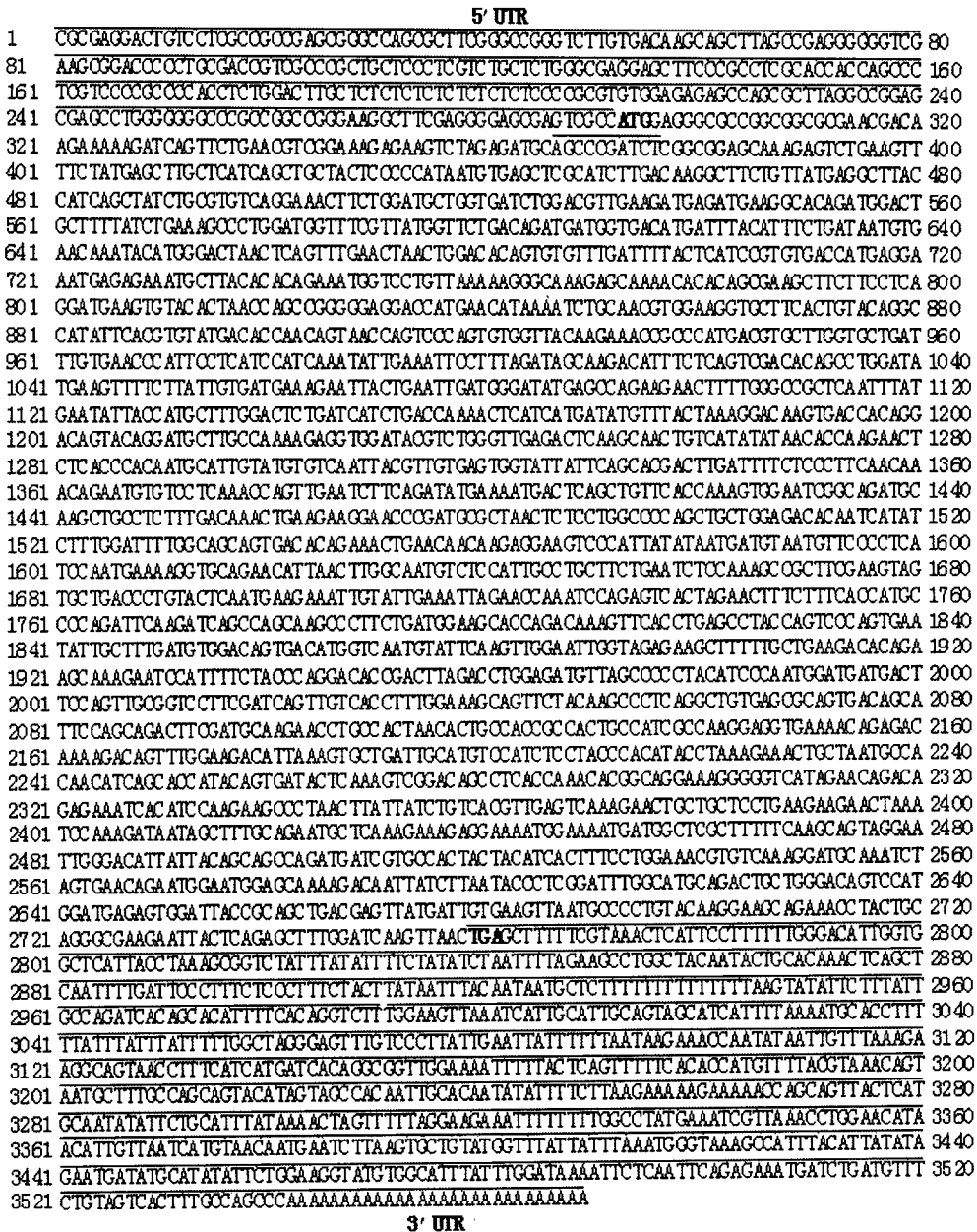
表 5-1 引物序列和退火温度

引物	序列	退火温度/℃
上游引物-1	AGTTCTGAACGTCGAAAAG	50.3
下游引物-1	CAGG(A/G)TCAGCACTACTTC(G/T)	50.3
上游引物-2	TTGCCTGCTTCTGAATCTCC	51
下游引物-2	GTTAACCTGATCCAAAGCTC	51
3'-RACE 引物-3	ACAGCAGCCAGATGATCGTGCCACTAC	68
5'-RACE 引物-3	CCAGCATCCAGAAGTTTCCTGACACGC	68

1.2 高原鼠兔 HIF-1 α cDNA 序列全长及其序列分析

根据 I、II、III、IV 片段间的重叠区域, 拼接出高原鼠兔 HIF-1 α cDNA 序列全长, 如图 5-4 所示。

对该序列进行分析显示, 高原鼠兔 HIF-1 α cDNA 由 3569 个核苷酸组成, 编

图 5-4 高原鼠兔 HIF-1 α cDNA 全长

起始密码子和终止密码子用粗体表示；下划线表示 Kozak 序列、5'端非编码区及 3'端非编码区

码一个由 822 个氨基酸组成的蛋白质；其 cDNA 具有高度的保守性。高原鼠兔 HIF-1 α cDNA 与人、牛、小鼠、挪威鼠、鸡、非洲爪蟾、虹鳟鱼的同源性分别为 82%、89%、82%、77%、68%、62%、30%，其推测的氨基酸序列同源性分别为 90%、92%、86%、86%、76%、53%、40%。利用其全长编码区构建

的系统进化树（图 5-5）表明，其反应的物种关系与根据传统的分类方法得到的物种关系类似，表明 HIF-1 α 基因可以作为分子标记来揭示分类学中的系统发生关系，从而也进一步证明了其保守性。

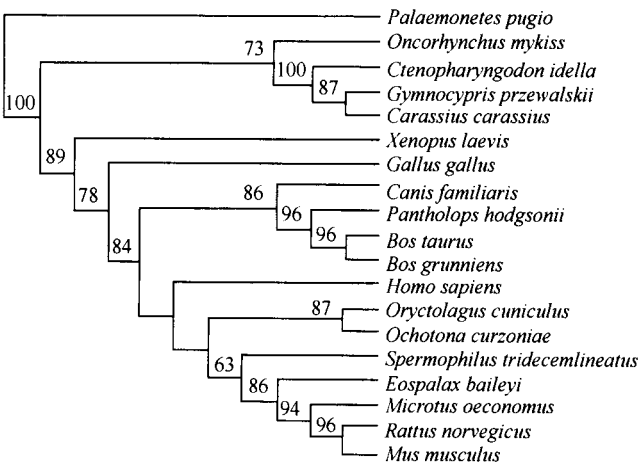


图 5-5 HIF-1 α 的系统进化树

RT-PCR 检测到高原鼠兔 HIF-1 α 有 2 个同型物，其中较短的同型物缺少外显子 11 的 3'端 70 bp 和外显子 12 的 5'端 63 bp 的片段（图 5-6），缺少的片段既不是以 GT 开头也不是以 AG 结尾，引入了一个新的氨基酸序列 G-P-S-I-S-C-H-L 作为羧基末端。缺少 133 bp 片段的高原鼠兔 HIF-1 α cDNA 编码一个由 536 个氨基酸组成的蛋白质（HIF-1 α ⁵³⁶），该蛋白质缺少部分氧依赖降解功能域（ODD）、转录激活功能域（TAD）和核定位信号序列（NLS）。

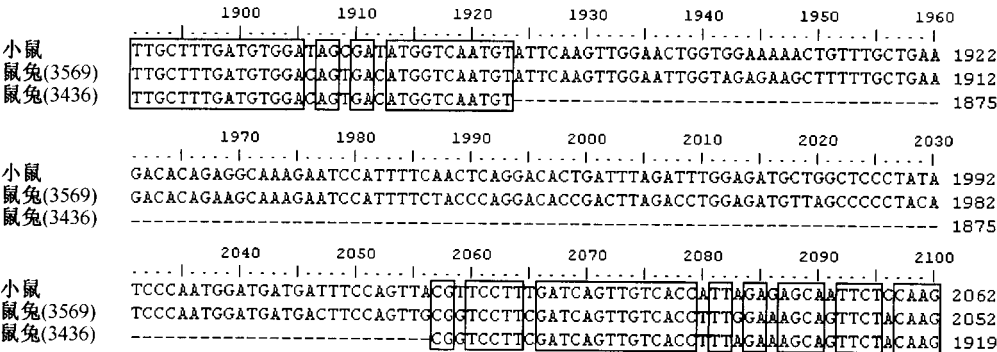


图 5-6 HIF-1 α 核苷酸序列的比对

与其他哺乳动物相比，高原鼠兔 HIF-1 α 氨基酸序列中具有 10 个特异的变异位点，其中一个位点在 bHLH 区，第 45 位的脯氨酸被亮氨酸所替代。在氧依赖的降解区域（ODD）内，发现有 6 个变异位点，第 422 位的天冬氨酸被谷氨

酰胺替代,第441位的亮氨酸被缬氨酸替代,第467位的丙氨酸被缬氨酸替代,第470位的谷氨酰胺被谷氨酸替代,第472位的缬氨酸被异亮氨酸替代,第473位的丙氨酸被缬氨酸替代,推测这将影响 HIF-1 α 蛋白的稳定性。高原鼠兔 HIF-1 α 与人和小鼠 HIF-1 α 氨基酸序列的比对、功能域和变异位点如图 5-7 所示。

		bHLH 45	
鼠兔	MEGAGGANDKKKIS	ERRRKEKS	SRDAARSRRSKESEVFYELAHQLPLPHNVSSHLDKASVMRLTISYLRVRKLLDAGDLDV 80
人	MEGAGGANDKKKIS	ERRRKEKS	SRDAARSRRSKESEVFYELAHQLPLPHNVSSHLDKASVMRLTISYLRVRKLLDAGDLDI 80
小鼠	MEGAGGENKKKMS	ERRRKEKS	SRDAARSRRSKESEVFYELAHQLPLPHNVSSHLDKASVMRLTISYLRVRKLLDAGGLDS 80
		PAS(A)	
鼠兔	EDENKAQMDCFY	LKALDGFV	VMVLTDDGDMYIISDNVNYMGLTQFELTGHSVDFTHPCDHEEMREMLTHRNGPVKKGKE 160
人	EDENKAQMDCFY	LKALDGFV	VMVLTDDGDMYIISDNVNYMGLTQFELTGHSVDFTHPCDHEEMREMLTHRNGPVKKGKE 160
小鼠	EDENKAQMDCFY	LKALDGFV	VMVLTDDGDMYIISDNVNYMGLTQFELTGHSVDFTHPCDHEEMREMLTHRNGPVKKGKE 160
鼠兔	QNTQR	SFFLRMKCTL	TSRGRIMNKSATWKVLHCTGHIHVDITNSNQ9CCGYKKPPMTCLVLICEPIPHSNIEIPLDSK 240
人	QNTQR	SFFLRMKCTL	TSRGRIMNKSATWKVLHCTGHIHVDITNSNQ9CCGYKKPPMTCLVLICEPIPHSNIEIPLDSK 240
小鼠	LNTQR	SFFLRMKCTL	TSRGRIMNKSATWKVLHCTGHIHVDITNSNQ9CCGYKKPPMTCLVLICEPIPHSNIEIPLDSK 240
		PAS(B)	
鼠兔	TFLSRHSLDMKFSYCDERITELM	GYEPEELLGR	SIYEYHALDSHLTKTHDMFTKGGVITGQYRMLAKRGGYVWVETQ 320
人	TFLSRHSLDMKFSYCDERITELM	GYEPEELLGR	SIYEYHALDSHLTKTHDMFTKGGVITGQYRMLAKRGGYVWVETQ 320
小鼠	TFLSRHSLDMKFSYCDERITELM	GYEPEELLGR	SIYEYHALDSHLTKTHDMFTKGGVITGQYRMLAKRGGYVWVETQ 320
		331	383
鼠兔	ATVIYTIKNSHPQCIVCVNYVVS	GIQHDLIF	SLQOTEVLPKPVSSDMKMTQLFTKVESADASCIFDKLKKEPDAL TLL 400
人	ATVIYTIKNSHPQCIVCVNYVVS	GIQHDLIF	SLQOTEVLPKPVSSDMKMTQLFTKVESDTS SLFDKLKKEPDAL TLL 400
小鼠	ATVIYTIKNSHPQCIVCVNYVVS	GIQHDLIF	SLQOTEVLPKPVSSDMKMTQLFTKVESDTS SLFDKLKKEPDAL TLL 400
		422	441
鼠兔	APAAAGDTIISLDFGSSD	TETEQQ	EEVPLYNVDMFSPSNEKVNINLAMSPLPASESPKPLRSSADPVLNEETVLKLEP 478
人	APAAAGDTIISLDFGSSD	TETEQQ	EEVPLYNVDMFSPSNEKVNINLAMSPLPASESPKPLRSSADPVLNEETVLKLEP 480
小鼠	APAAAGDTIISLDFGSSD	TETEQQ	EEVPLYNVDMFSPSNEKVNINLAMSPLPASESPKPLRSSADPVLNEETVLKLEP 479
			TAD-N
鼠兔	NPEISL	SFTMPQIQDQ	PASPDGSTRQSSPE-----PTSPSEYCFD VDSMDVNVFKLELVEKLFADTEA 544
人	NPEISL	SFTMPQIQDQ	TPSPSDGSTRQSSPE-----PNSPSEYCFYVDSMDVNVFKLELVEKLFADTEA 546
小鼠	SPEISL	SFTMPQIQDQ	PASPDGSTRQSSPERLLQENVNTPNFQSPNSPSEYCFD VDSMDVNVFKLELVEKLFADTEA 559
鼠兔	KNPFS	QD TDL	DLEMLAPYIPMDDDFQLRSFDQLSPLESSTSPQAVS---AVTAFQQTSMQEP-ATNATATATAIAKEVK 620
人	KNPFS	QD TDL	DLEMLAPYIPMDDDFQLRSFDQLSPLESSTSPQAVS---AVTAFQQTSMQEP-ATNATATATAIAKEVK 625
小鼠	KNPFS	QD TDL	DLEMLAPYIPMDDDFQLRSFDQLSPLESSTSPQAVS---AVTAFQQTSMQEP-ATNATATATAIAKEVK 636
			69.6
鼠兔	TE TKD	SLEDIKVLI	ACPSPTHIPKETANATTSAPYSDTQSRITASPNTACKGVIEOTEKSHRSPNLLSVTL SQRITAAPEE 700
人	TE TKD	RMEIDIK	ILIASPSPTHIHKETTSAT-SSPYRDTQSRITASPNTACKGVIEOTEKSHRSPNLLSVTL SQRITVPEE 704
小鼠	TE TKD	NKEDIK	ILIASPSTQWPQETITAK-ASAYSGTHERTASPDACKRVIEQTDKAHPRS-LKLSATLNQRTVPEE 714
鼠兔	ELNPK	ITIALQNAQR	KRKMEHDGSLFQAVGIGTILQQPDRAITISLSWKRKVGCKSSBQNGMBOKTITILIPSDLACRLG 780
人	ELNPK	ITIALQNAQR	KRKMEHDGSLFQAVGIGTILQQPDHAATTISLSWKRKVGCKSSBQNGMBOKTITILIPSDLACRLG 784
小鼠	ELNPK	ITIALQNAQR	KRKMEHDGSLFQAAAGIGTILQQPGDCAPTMSLSWKRKVGFISSBQNGTEBQKTTILIPSDLACRLG 794
			TAD-C
鼠兔	QSMDES	SGLPQL	TSYDCEVNAPVQGSRNLLQGEELLRALDOWN 822
人	QSMDES	SGLPQL	TSYDCEVNAPVQGSRNLLQGEELLRALDOWN 826
小鼠	QSMDES	SGLPQL	TSYDCEVNAPVQGSRNLLQGEELLRALDOWN 836

图 5-7 HIF-1 α 氨基酸序列的多元比对

高原鼠兔 HIF-1 α 非编码区。高原鼠兔 HIF-1 α 5'端非编码区 G+C 含量为 72.4%, 3'端非编码区包含 8 个 AUUA mRNA 不稳定元素, 与鼠的 7 个不稳定结构中的 6 个是一致的, 5 个与人相同。高原鼠兔 HIF-1 α 5'端非编码区的 292 bp 与鼠的 5'端非编码区的 257 bp 的同源性为 73%。高原鼠兔 HIF-1 α 的 3'端非编码区与鼠有显著差别: 高原鼠兔缺少一个 35 bp 长的富含 GT 区域。高原

鼠兔 3'端非编码区的 811 bp 核苷酸序列与鼠的 1208 bp 核苷酸序列的同源性为 76%，而与人的 1172 bp 核苷酸序列的同源性为 86%。

2 高原鼠兔 HIF-1α 蛋白在体外的表达、定位、调控和功能

2.1 高原鼠兔 HIF-1α 蛋白在不同细胞系的表达和定位

利用高原鼠兔 HIF-1α 的全长编码区构建了表达质粒 pcDNA3.0/6xMyc-ppHIF-1α，将其转染到 HEK293T、HeLa 和 COS-7 真核细胞里。Western 印迹结果（图 5-8）表明，高原鼠兔 HIF-1α 表达质粒在不同细胞系中都能很好的表达，且其蛋白大小都为

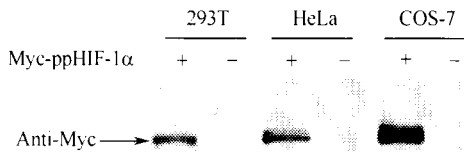


图 5-8 高原鼠兔 HIF-1α 蛋白在 HEK293T、HeLa 和 COS-7 真核细胞系的表达

120 kDa。实际检测到的蛋白明显大于根据氨基酸序列预测的结果，表明高原鼠兔 HIF-1α 在生理条件下存在明显的翻译后修饰。利用激光共聚焦显微镜进一步对其蛋白的体外定位进行了免疫荧光染色分析，结果表明高原鼠兔 HIF-1α 蛋白主要定位到细胞核里，其定位与细胞系的物种来源无关（图 5-9）。这与我们的序列核定位信号预测结果相一致。

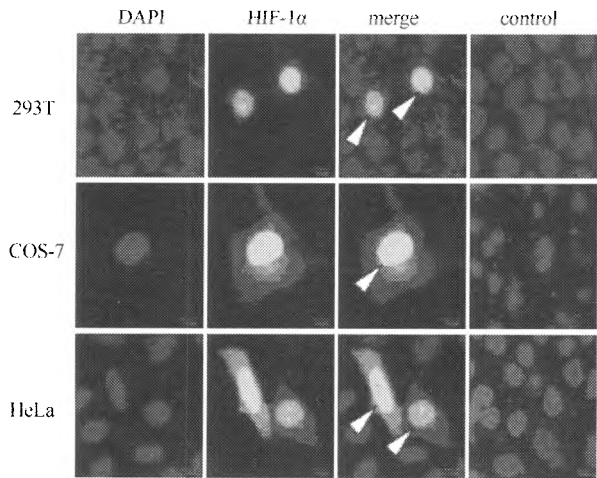


图 5-9 高原鼠兔 HIF-1α 蛋白在 HEK293T、HeLa 和 COS-7 真核细胞的定位（另见彩版）

DAPI 栏显示的是细胞核；HIF-1α 栏是 Myc-标签标记的高原鼠兔 HIF-1α 的染色图片；merge 是这两栏图片的合并图；control 是对照组，显示的转染空载体的细胞的染色图片

2.2 高原鼠兔 HIF-1 α 蛋白稳定性的调控

利用高原鼠兔 HIF-1 α 表达质粒 pcDNA3.0/6xMyc-ppHIF-1 α 与脯氨酸羟化酶 (PHD) 表达载体 (PHD1, 2, 3-EGFP-N1) 共转染分析表明, 当有 PHD 存在时, 高原鼠兔 HIF-1 α 蛋白被很快降解。图 5-10 是 Western 印迹 (A) 和免疫染色 (B) 的分析结果, 这两种分析方法所得的结果是一致的。PHD2 和 PHD3 对高原鼠兔 HIF-1 α 蛋白的降解作用最明显。在共定位分析中, 观察到了 PHD 与高原鼠兔 HIF-1 α 的共定位, 表明 PHD 可以直接作用于 HIF-1 α , 达到调控其稳定性的目的。

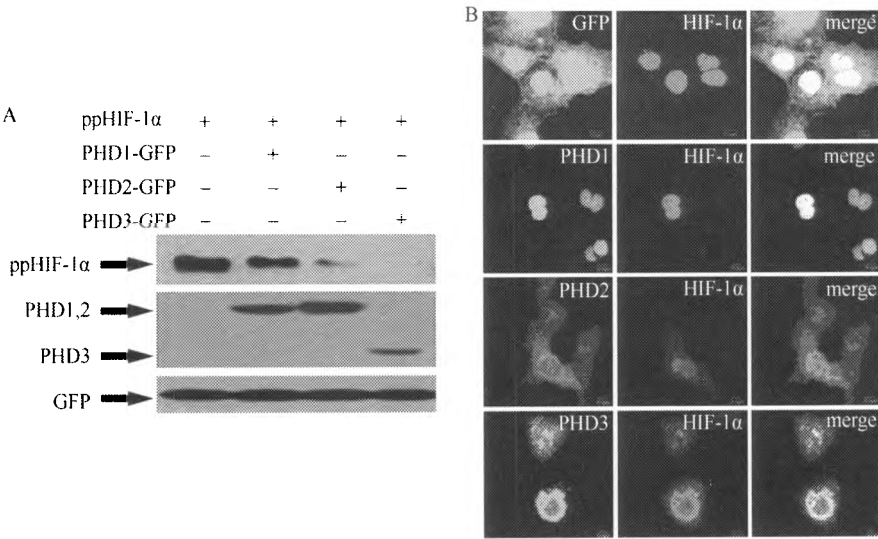


图 5-10 脯氨酸羟化酶对高原鼠兔 HIF-1 α 蛋白的调控 (另见彩版)

将 PHD1、PHD2 或 PHD3 分别与高原鼠兔 HIF-1 α 共转染 COS-7 细胞, 然后分别对转染后的细胞进行免疫印迹 A 和免疫染色分析 B; HIF-1 α 和空载体共转的细胞作为对照。merge 栏图片是前两栏细胞的合并

2.3 高原鼠兔 HIF-1 α 蛋白的功能

如图 5-11 所示, 当高原鼠兔 HIF-1 α 的表达质粒 pcDNA3.0/6xMyc-ppHIF-1 α 与其靶基因的萤光素酶报告质粒 (HRE-luc) 共转染时, 细胞的萤光素酶的活性明显高于对照组。此实验表明高原鼠兔 HIF-1 α 能够促进低氧反应基因的表达。

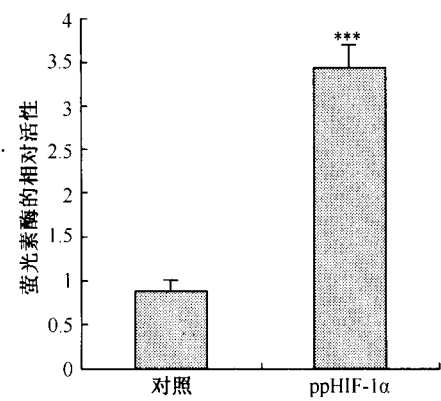


图 5-11 高原鼠兔 HIF-1α 转录活化了低氧基因的表达

3 HIF-1α 在高原鼠兔组织内的表达

3.1 HIF-1α mRNA 在高原鼠兔不同组织的表达

Northern 印迹检测到高原鼠兔 HIF-1α 有 2 个转录物，分别命名较短的转录物为 pSHIF-1α；较长的转录物为 pLHIF-1α。pSHIF-1α 和 pLHIF-1α 在检测的高原鼠兔各组织中均有表达，其中 pSHIF-1α 的表达量在各组织中均明显大于 pLHIF-1α。pSHIF-1α 在脑和肾中的表达量较大，心、脾、肺、肝、肌肉中相对较少（图 5-12A）。雌雄高原鼠兔个体 HIF-1α mRNA 的组织表达之间没有明显差异。同小鼠 HIF-1α 的组织表达（图 5-12B）相比，高原鼠兔 2 个转录物的表达量在肾和脑中明显高于其他组织，呈显著的组织特异性，并且高原鼠兔 HIF-1α 的这种组织表达特异性不受个体、性别及分布海拔高度的影响。雌雄高原鼠兔个体 HIF-1α mRNA 的组织表达谱没有明显差异。将采集于中国科学院

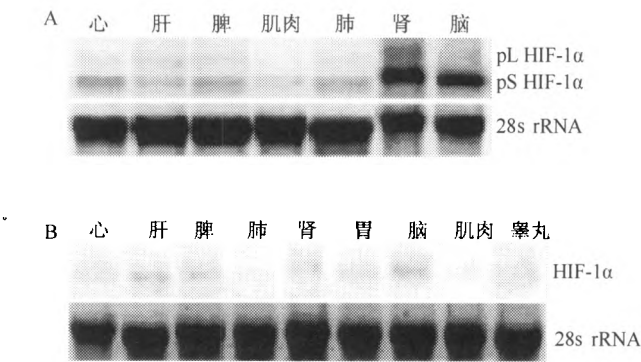


图 5-12 HIF-1α mRNA 在高原鼠兔
(A) 和小鼠 (B) 不同组织的表达

海北高寒草甸生态系统研究站 (37°40' N, 101°23' E, 海拔 3200 m, 气压为 508 mmHg) 附近的高原鼠兔带到清华大学基因组研究所动物房室温喂养 7 天。Northern 印迹检测到 HIF-1 α 在高原鼠兔各组织中仍均有表达, 其中脑和肾中表达量较大。昆仑山口附近 (35°42' N, 94°04' E, 海拔 4750 m, 气压为 418 mmHg) 高原鼠兔 HIF-1 α mRNA 表达与海北站地区的类似, 其在脑和肾中的表达量最大, 其他组织相对较少, 呈明显的组织特异性。

3.2 HIF-1 α 蛋白在高原鼠兔不同组织的表达及定位

3.2.1 HIF-1 α 蛋白在高原鼠兔不同组织的表达特征

Western 印迹检测到 HIF-1 α 蛋白在高原鼠兔组织 (图 5-13A) 内的表达明显高于其在小鼠组织 (图 5-13B) 的表达。图 5-13C 所显示的量化结果明显地表明了高原鼠兔 HIF-1 α 蛋白的高水平。它在高原鼠兔肺、肝、脾和肾中的表达明显高于其他组织。肺中 HIF-1 α 蛋白的水平分别是脑和肌肉的 12 倍和 10 倍。肝和脾中的 HIF-1 α 蛋白水平是类似的, 分别是心脏的 2 倍、脑的 10 倍、肌肉的 8 倍。HIF-1 α 蛋白在高原鼠兔肾中的表达分别是其脑和肌肉中表达的 8 倍和 7 倍。这些结果表明, 高原鼠兔 HIF-1 α 蛋白展示了明显的组织特异性表达。

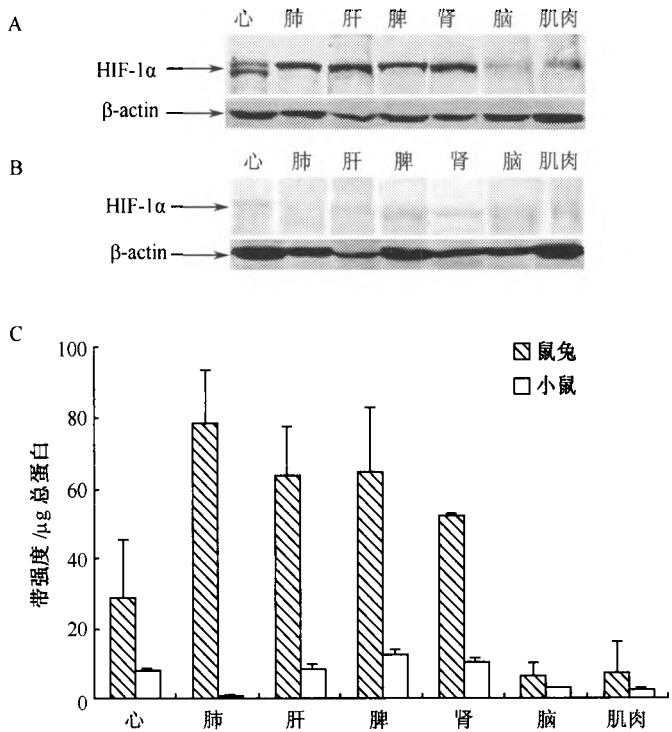


图 5-13 HIF-1 α 蛋白在高原鼠兔 (A) 和小鼠 (B) 不同组织的表达以及对其表达的量化 (C)

3.2.2 HIF-1α 蛋白在高原鼠兔不同组织的定位

利用生长在自然条件下的高原鼠兔组织，进行了免疫组织化学分析，结果发现 HIF-1α 蛋白在不同组织中都有明显的表达。图 5-14 展示其在脑、肺、肝和肾中的定位。结果显示，HIF-1α 蛋白在这些鼠兔组织中都存在明显的核定位，且这种定位是组成性的。这表明高原鼠兔 HIF-1α 作为核转录因子，具有促进其下游基因表达的潜力。

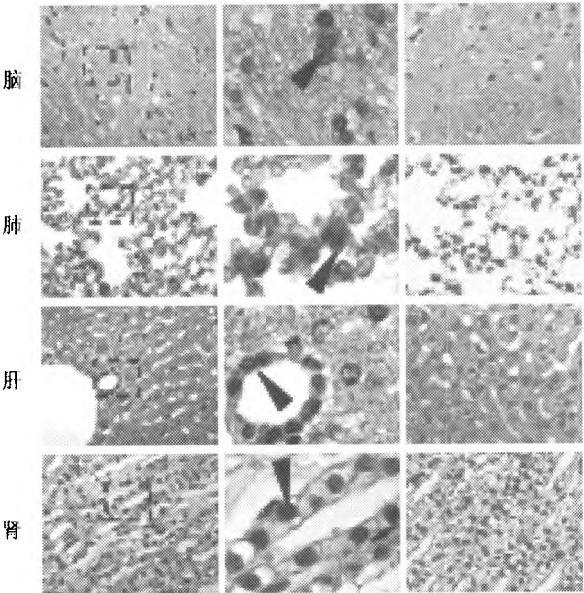


图 5-14 HIF-1α 蛋白在高原鼠兔脑、肺、肝和肾中的定位（另见彩版）
箭头表示 HF-1α 蛋白在细胞核的阳性着色

4 高原鼠兔 HIF-1α 在不同海拔的表达

4.1 高原鼠兔 HIF-1α mRNA 在不同海拔的表达

选取 HIF-1α mRNA 表达量高的两个组织脑和肾，比较不同海拔高原鼠兔 HIF-1α mRNA 的表达差异。其中 4750 m、3200 m、2300 m 分别代表昆仑山口附近、海北站附近、西宁 3 个海拔地区的高原鼠兔，西宁的高原鼠兔捕获自昆仑山口附近地区，并带到西宁实验室室温喂养 7 天后进行处理。

Northern 印迹结果显示，不同海拔地区高原鼠兔的脑和肾中 HIF-1α mRNA 水平的表达没有显著差异（图 5-15）。

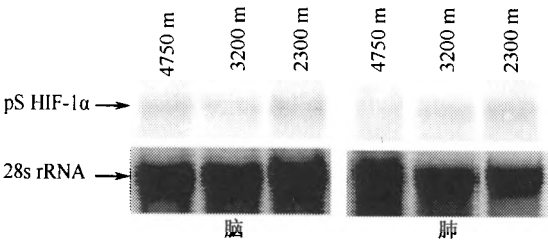


图 5-15 高原鼠兔 HIF-1 α mRNA 在海拔 2300 m、3200 m 和 4750 m 的表达

4.2 高原鼠兔 HIF-1 α 蛋白在不同海拔的表达

选取三个海拔明显不同的地点（海北站，3200 m；果洛州军牧场，3950 m；昆仑山口 4750 m），捕获鼠兔，迅速摘取其组织，检测肺、肾肝和脾组织内 HIF-1 α 蛋白的表达。研究表明 HIF-1 α 蛋白在肺、肾肝和脾组织中随海拔的升高而增加（图 5-16）。

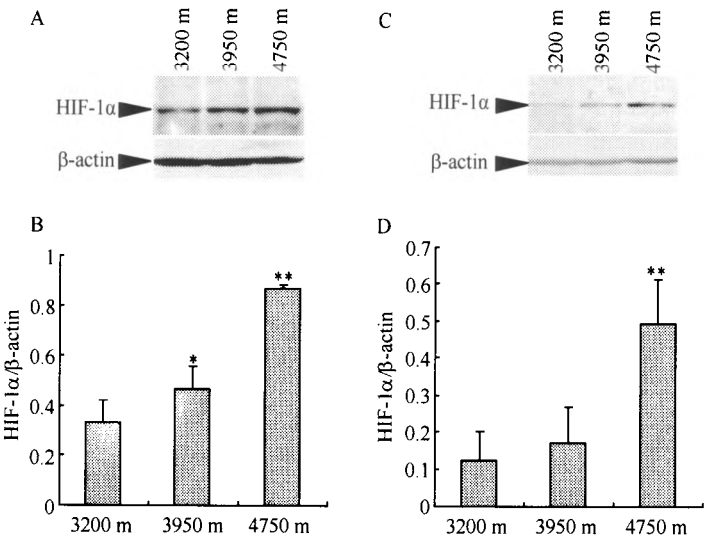


图 5-16 高原鼠兔 HIF-1 α 蛋白在不同海拔（3200 m、3950 m 和 4750 m）不同组织的表达

A. 肺；B. 肾；C. 肝；D. 脾。星号代表与海拔 3200 m 高原鼠兔组织内的表达相比是明显的 (** $P<0.01$)

比较有意思的是，不同海拔条件下高原鼠兔 HIF-1 α mRNA 表达水平相当，而蛋白表达水平却有显著差异。这表明高原鼠兔 HIF-1 α 的功能调节是通过转录后水平的调控实现的。

5 HIF-1 α 与高原鼠兔低氧适应

5.1 高原鼠兔 HIF-1 α 在结构上的适应

克隆实验中的高原鼠兔采集于中国科学院海北高寒草甸生态系统研究站附近地区,该区域属于典型的大陆季风气候。冬天严寒,时间长;夏天凉爽,时间比较短;大风天气较多,尤其是在春冬两季。其中海北站地区最高气温为27.6℃而最低气温为-37.1℃,平均气温为-1.7℃,大部分降水集中在5~9月的植被生长季节内,年平均降水量为426~860 mm (Zhao et al., 1999)。该地区高寒草甸土壤肥沃而且潮湿,植被类型属于高寒草甸,主要的植物物种包括嵩草 (*Kobresia* spp.)、藁草 (*Carex* spp.)、针茅 (*Stipa* spp.)、芨芨草 (*Achnatherum splendens*)。该地区主要的脊椎动物有大鸮 (*Buteo hemilasius*)、角百灵 (*Eremophila alpestris*)、高原鼯鼠 (*Myospalax baileyi*)、艾鼬 (*Mustela eversmanni*)、驯化牦牛 (*Bos grunniens*) 及羊 (*Ovis*)、根田鼠 (*Microtus oeconomus*)、香鼬 (*Mustela altaica*) 和高原鼠兔 (*Ochotona curzoni*)。这种独特的高原环境是决定高原鼠兔 HIF-1 α 特殊功能的主要因素之一。

HIF-1 α bHLH 区域是 DNA 结合所必需的 (Reisz-Porszasz et al., 1994; Jiang et al., 1996a), 而 PAS 区域参与亚基二聚化和特异性的靶基因结合 (Huang et al., 1993; Reisz-Porszasz et al., 1994; Lindebros et al., 1995; Jiang et al., 1996a; Zelzer et al., 1997)。高原鼠兔与人、鼠和牛相比, PAS (B) 区域在氨基酸序列上具有 100% 的同源性, 而 bHLH 区域内第 45 位亮氨酸 (Leu, L) 与所有比较的动物都不相同, 其他动物在该位的氨基酸为脯氨酸 (Pro, P) 这种结构差异的生物学意义有待深入研究。

HIF-1 α ODD 区域是其氧依赖降解所必需的。高原鼠兔 HIF-1 α ODD 区域内具有 6 个特有的氨基酸, 这不同于所有其他被比较的哺乳动物。推测此变异可能促进了高原鼠兔 HIF-1 α 蛋白的稳定性。这种结构上的差异是进化过程中迫于长期低氧环境压力而选择下来的特殊性适应的结果。

早期研究表明哺乳动物 HIF-1 α mRNA 只有一种主要的转录方式 (Wang et al., 1995; Gradin et al., 1996; Ema et al., 1997; Ladoux et al., 1997; Hara et al., 1999)。最近, 在 10 日龄的鸡胚胎中发现 HIF-1 α mRNA 有两种主要转录方式 (Takahashi et al., 2001), 在鼠、大鼠和人的细胞中发现了 HIF-1 α mRNA 的多种转录方式 (Wenger et al., 1997; Gothie et al., 2000)。其中在小鼠细胞中发现的剪接方式具有不同的翻译起始位点, 这种选择性剪接位于 10 号外显子内 (Luo et al., 1997; Wenger et al., 1997); 大鼠细胞的选择性剪接位点位于 HIF-1 α 的 N 端 (Drutel et al., 2000); 人细胞内的选择性剪接方式已

经发现了3种：剪接位置分别位于1和2号外显子之间、13和14号外显子之间（Gothie et al., 2000）及11和12号外显子之间（Chun et al., 2002）。

Chun 等于2002年报道的人 HIF-1 α mRNA 同型物选择性剪接发生于11和12号外显子内，并且证明了其能够同内源性 HIF-1 α 竞争性结合靶基因，从而影响 HIF-1 α 的活性。该种新的 HIF-1 α mRNA 同型物缺失了11和12号外显子，产生了一个新的 HIF-1 α 蛋白形式。在这种新的 HIF-1 α 蛋白中，缺少了部分氧依赖降解区域、所有的 TAD 域以及羧基端的 NLS。表达出的该蛋白既不具有转录激活活性又不能在低氧条件下进核。同 HIF-1 α 相比，该蛋白在常氧条件下异常稳定，低氧条件下对其诱导远远低于对 HIF-1 α 表达的诱导。该蛋白能够同内源性 HIF-1 α 竞争性结合低氧反应基因，影响 HIF-1 α 的活性，从而下调下游低氧反应基因的表达。

高原鼠兔 HIF-1 α cDNA 新的转录方式缺少了一段133 bp 序列。该种转录方式丢失了11号外显子（70 bp）和12号外显子（63 bp）的部分序列。缺少了该133 bp 序列导致产生了一个新的由536个氨基酸组成的蛋白质可读框。该可读框缺失了氧依赖降解区域的部分序列、转录激活区以及核定位信号域（NLS）。基于其结构特点，我们推测类似于人 HIF-1 α 的同型物（Chun et al., 2002），高原鼠兔的这种新同型物不具备转录激活活性以及低氧诱导的转运进核能力，同时，在细胞内它能同内源性 HIF-1 α 竞争性结合靶基因，抑制 HIF-1 α 的活性。结合高原鼠兔的极强的低氧耐受能力，推测该同型物能够通过抑制 HIF-1 α 的过度表达来调节有氧代谢和无氧代谢之间的平衡，在高原鼠兔有机体氧平衡的调节过程中发挥重要作用。

5.2 高原鼠兔 HIF-1 α mRNA 及蛋白表达与低氧适应

通过对高原鼠兔 HIF-1 α mRNA 和蛋白水平的检测发现，其在心、肺、肝、脾、肾、脑和肌肉组织都表达并且表达量都明显高于平原动物小鼠的 HIF-1 α 。与其他动物相比，高原鼠兔 HIF-1 α 的表达展示了明显的组织特异性，这是一个新的发现。比较高原鼠兔同其他常氧动物 HIF-1 α 的表达差异有助于人们深入理解高原鼠兔 HIF-1 α 的特殊功能及生态学意义。相同于其他动物，HIF-1 α 在检测的高原鼠兔各个组织中均有表达，这说明 HIF-1 α 亦参与协调有机体各部分的氧平衡调节，HIF-1 α 这种普遍性的功能在长期的进化过程中通过稳定选择而保存下来；然而不同于其他动物，高原鼠兔 HIF-1 α 展示了组织特异性表达，可能与高原鼠兔在长期的进化适应过程中某些特殊的器官出于低氧适应的需要而使得 HIF-1 α 处于高表达水平的结果。

高原鼠兔 HIF-1 α mRNA 水平的表达模式与其蛋白水平的表达模式并不是一致的。高原鼠兔 HIF-1 α 蛋白在肺、肝、脾和肾中有高的表达，而其 mRNA 仅

在脑和肾中有高的表达。这种不一致性,表明高原鼠兔 HIF-1 α 存在明显的转录后调控。通过研究已经发现高原鼠兔 HIF-1 α 蛋白的表达随海拔的升高而增加,而其 mRNA 水平的表达并不随海拔的升高而变化。这也支持了其转录后调控的存在。表明 HIF-1 α 转录后的调控可能在高原鼠兔低氧适应中具有重要的作用,进一步研究高原鼠兔 HIF-1 α 转录后调控的机制,有助于进一步了解高原鼠兔低氧适应的分子机制。

高原鼠兔 HIF-1 α 组成性地定位到细胞核,并且像其他的 HIF-1 α 一样能够通过低氧反应元件激活下游低氧反应基因的表达。表明高原鼠兔 HIF-1 α 在其高的红细胞数量、钝化的肺高压呼吸反应、肝和肺细胞的保护中具有重要的作用。红细胞生成素 (erythropoietin, EPO) 是由肾及胎儿肝细胞产生的一种糖蛋白。低氧条件下 EPO 的表达量升高,从而使得血液中的红细胞增多以增强携氧能力 (Jelkmann, 1992)。世居高海拔地区人类通过保持 EPO 的表达水平来增强血液的携氧能力以适应缺氧环境已是科研者普遍接受的观点 (Maxwell et al., 1993; Bunn et al., 1996; Wenger et al., 1997; Hochachka et al., 1999), 而 EPO 基因是 HIF-1 α 的靶基因之一,低氧条件下 HIF-1 α 上调能够引起 EPO 表达量增加。我们的研究发现在高原鼠兔肾中 HIF-1 α 的表达量极高,由此推断肾中 HIF-1 α 高水平表达能使 EPO 高水平表达,从而红细胞的数目维持在高水平,携氧能力显著增强,这是高原鼠兔对环境低氧适应的重要机制之一。早在 1994 年,马志军等通过扫描电镜技术比较了高原鼠兔同家兔的红细胞特征发现:高原鼠兔的红细胞直径、厚度、体积及内凹区直径等多项指标同平原地区家兔基本相近,而每升血中红细胞的数量却高于平原地区家兔 (马志军等, 1994), 这个结果能有力地证明我们的推论。一氧化氮 (NO) 能够引起血管扩张,并在维持动脉基础张力方面起重要作用,其作用机理是 NO 通过激活靶细胞鸟苷酸环化酶,使胞内 cGMP 含量增加,从而引起血管舒张 (Cornwell et al., 1994)。由此推断在高原鼠兔肺中 HIF-1 α 的高水平表达可能使 NOS 处于高水平表达,从而使 NO 维持较高的水平 (Palmer et al., 1998)。这将有利于高原鼠兔在低氧条件下维持正常的血管张力。Ge 等于 1998 年报道的高原鼠兔低氧肺血管收缩反应钝化强烈地支持这一观点。有许多存活因子 (如胰岛素样生长因子-2IGF-2, IGF-1、血管内皮生长因子、VEGF 和转化生长因子- α 、TGF- α , 等) 都是 HIF-1 α 的靶基因。在高原鼠兔肝细胞和肺超微结构中发现, HIF-1 α 在肝和肺中有高水平表达,这可能是保护其免受低氧的损伤的原因。李庆芬等 (1984, 1987) 曾报道,在低氧刺激条件下高原鼠兔保持正常的肝细胞,而常氧动物大鼠在低氧刺激下其肝细胞受到严重损伤;陈钦明等于 1988 年报道,在低氧刺激条件下常氧动物大鼠肺细胞超微结构发生明显的变化,而高原鼠兔却保持正常。这强烈支持了 HIF-1 α 的高水平表达有助于保护

高原鼠兔肝细胞和肺细胞等这一论断。因此,可以假定高原鼠兔的低氧适应是其 HIF-1 α 高水平表达和组织特异性分布的主要原因。

6 结论

通过高原鼠兔 HIF-1 α cDNA 序列克隆, mRNA 的组织特异性表达,蛋白的组织特异性表达,蛋白的定位、功能和调控研究,结合生物信息学的分析,我们发现了高原鼠兔 HIF-1 α 基因区别于人、小鼠等其他动物 HIF-1 α 的结构和功能特点,探讨了 HIF-1 α 在高原鼠兔对环境低氧的适应中的作用。从我们研究的结果中可以看出,高原鼠兔 HIF-1 α mRNA 的剪接以及其表达的变化可能在高原鼠兔低氧适应中具有重要的作用。

到目前为止,分子生态学领域的研究大多集中在利用分子生物学手段解决系统学问题,而从特殊环境密切相关基因入手来解决生态学领域的适应问题鲜见报道,这也是一个意义重大、难度大具有挑战性的课题。对高原鼠兔 HIF-1 α 的研究,一方面拓展了 HIF-1 α 基因功能研究领域,另一方面丰富了高原鼠兔环境低氧适应机理研究内容,同时为从 HIF-1 α 基因功能的特殊性方面来深入研究高原鼠兔对环境低氧的适应奠定了坚实的基础。这在适应机理研究的方法、思路以及策略上是一种开创性的探索。

高原土著动物对极端环境的适应性特征是在长期的进化过程中形成的,这种特征经受得起自然界的强烈选择并稳定遗传。自然选择体现在对表型的选择上,而自然选择的反应应答却要追溯到基因水平上。寻找高原土著动物环境密切相关基因区别于其他动物基因的特征是研究高原土著动物对极端环境适应分子机理的有力切入点。HIF-1 蛋白的调控主要是通过其 α 亚基的氧依赖的降解。从蛋白水平上对高原鼠兔 HIF-1 α 进行研究,更有力地揭示了其在高海拔低氧适应中的作用。我们认为高原鼠兔 HIF-1 α 蛋白的高水平表达和明显的组织特异性的分布是高原鼠兔低氧适应的一种机制。进一步研究 HIF-1 α 蛋白高的表达的机制及其直接的靶基因有望在高原动物低氧适应领域取得突破性进展。

第五节 血管内皮生长因子 (VEGF)

血管内皮生长因子是 1989 年 Ferrara 等在牛垂体滤泡星状细胞体外培养液中首先纯化出来的蛋白质,是内皮细胞特异性促有丝分裂原,具有促进内皮细胞增殖,增加微血管通透性、诱导血管生成等多种功能 (Yamazaki et al., 2006)。很多研究发现其在低氧适应也具有重要的作用。本节主要介绍了 VEGF 的结构、功能、调控及其与低氧的关系。

1 VEGF 的分子结构

VEGF 表现为一种具有肝素结合活性的同源二聚体糖蛋白,是由两条单链通过二硫键连接起来的,蛋白结构具有高度保守性,其相对分子质量为 34 000~45 000,在其氨基端有一段独特的氨基酸序列,它耐热、耐酸,等电点 ≥ 7.5 。VEGF 基因位于人 6 号染色体的 P12~P21 区,基因全长为 28 kb,由 7 个内含子和 8 个外显子组成。VEGF 的 cDNA 克隆分析表明:VEGF 由其 mRNA 的不同剪接方式形成 9 种异构体,包括 VEGF₁₂₁、VEGF₁₄₂、VEGF₁₄₅、VEGF₁₄₈、VEGF₁₆₅、VEGF_{165b}、VEGF₁₈₃、VEGF₁₈₉、VEGF₂₀₆ (Yamazaki et al., 2006)。VEGF 选择性直接作用于血管内皮细胞上的两种Ⅲ型酪氨酸激酶受体,flt-1 和 KDR/flk-1,这两种受体相对分子质量分别为 160 000、180 000,有 34%的同源性,均主要分布在正常组织中的血管内皮细胞,均是跨膜受体,其共同特点是催化域内有酪氨酸激酶插入区,该酪氨酸激酶的活性通过受体与配体结合而激活,由于受体磷酸化而发挥生物学效应 (Robinson et al., 2001)。其中受体 KDR 是 VEGF 发挥主要功能的受体。VEGF 与 flk-1 结合后,可诱导内皮细胞增生和血管生成。而与 flt-1 结合可促进内皮细胞迁移,却对内皮增生无影响。

2 VEGF 的生物学功能

2.1 促进内皮细胞增生

VEGF 主要通过与血管内皮细胞表面特异性受体结合发挥生物学效应。VEGF 是目前已知的作用最强的内皮细胞促有丝分裂原,与受体结合后,通过肌醇酯的水解,促进第二信使形成,在肝素样分子的调节下,引起受体的自身磷酸化,打开磷脂酰肌醇代谢的信息传递通路,激活丝裂原活化的蛋白激酶,表现出 VEGF 的有丝分裂原特性,引起内皮细胞分裂、增生 (Pettersson et al., 2000)。

2.2 血管生成功能

VEGF 可诱导内皮细胞表达,整合 av3、av5 及其配体,从而介导内皮细胞迁移和浸润。VEGF 还可诱导内皮细胞分泌多种组织蛋白酶,主要是尿型和组织型纤维蛋白溶酶原 (uPA/tPA),胶原蛋白酶及组织因子等,以此降解细胞外基质,诱导内皮细胞迁移和浸润,诱导新生血管形成 (Hoeben et al., 2004)。

2.3 增加血管通透性

超微免疫组织化学定位发现:VEGF 能与内皮细胞内的囊泡小体 (VVO) 结合,在细胞膜上形成一些允许生物大分子通过的“小孔”,促进生物分子的跨膜转运,以此增加血管通透性。

2.4 促进血管舒张

VEGF 通过活化内皮性一氧化氮合酶 (eNOS) 促进 NO 的合成, 从而促进血管的舒张。腺病毒介导的 VEGF 在肺部的高表达降低了大鼠低氧性肺动脉高压反应, 对其具有保护作用 (Voelkel et al., 2006)。

2.5 促红细胞生成

VEGF 在造血过程中可以调控造血干细胞的存活 (Ferrara, 2004)。

3 VEGF 基因表达及其调控

VEGF 在正常成人和动物的许多组织中表达, 但一般水平很低。一些代谢旺盛, 血供丰富的组织, 如肾小球足突细胞、心肌细胞、前列腺上皮细胞、精子细胞、肾上腺皮质细胞等, VEGF 的表达高于其他组织。胚胎组织、胎盘、增生期子宫内膜、黄体等由于生理性血管形成的需要, VEGF 的表达往往呈较高水平。在病理条件下, 尤其是恶性肿瘤组织中, VEGF 往往是过量表达。VEGF 表达的调节机制目前还不完全清楚, 但局部氧浓度是调节 VEGF 分泌最为重要的因素。短时间缺氧 (3 h) 可使 VEGF 的表达量增加 3~4 倍, 而持续性缺氧 (15 h) 可使 VEGF 的表达量增加 8~10 倍。缺氧上调 VEGF 基因表达的作用与一种缺氧诱导的特异性 DNA 结合蛋白 HIF-1 密切相关 (Damert et al., 1997)。缺氧细胞中 VEGF 的转录调节是通过 HIF-1 与 VEGF 5'端增强子作用实现的。在 VEGF 5'端增强子内存在 HIF-1 结合位点, 缺氧诱导 HIF-1 DNA 结合活性, HIF-1 与 VEGF 5'端增强子结合后使 VEGF 的转录和表达增强。有研究认为低氧可能激活 c-Src 原癌基因而升高 VEGF 的表达 (Scott et al., 1998)。而 Goldberg 发现, VEGF 与另一种对低氧敏感性物质——促红细胞生成素 (EPO) 在序列上有同源性, 从而试图解释低氧对 VEGF 的调节作用 (Goldberg et al., 1994)。同时激素、细胞因子、生长因子、原癌基因、抑癌基因, 都可不同程度地调节 VEGF 的表达, 如血小板源生长因子 (PDGF)、肿瘤坏死因子-A (TNF-A)、白细胞介素-6 (IL-6) 可增强 VEGF 的表达。Maru 等发现, *ras*、*raf*、*src* 基因产物对 VEGF 表达的调节是通过对 VEGF 转录水平的调节来实现的, 具体作用位点是 VEGF 的启动子, 即通过激活 VEGF 启动子而诱导 VEGF 基因的转录和表达水平升高 (Maru et al., 1998)。野生型 P53 通过 TATA 启动子而抑制 VEGF 基因的表达, 而突变型 P53 的细胞 VEGF 表达水平升高 (Zhang et al., 2004; Liang et al., 2005; Famulski et al., 2006; Perryman et al., 2006)。

4 VEGF 与低氧的关系

近年的研究表明,低氧条件下,细胞反应趋向减轻低氧状态所造成的损伤影响。包括细胞周期停止、大分子合成减少、应激控制基因表达增加、血管形成因子分泌以及正调控触发血管交互形成,导致血液运输增加。这些众多基因产物在细胞水平上直接发挥保护细胞的作用,VEGF 是其中的代表。研究表明,VEGF 是一种低氧性诱导的血管形成生长因子,具有正调控作用。由于具有血管发生的潜能和内皮细胞的特异性,VEGF 被认为是主要的血管发生蛋白。低氧不仅可以诱导 VEGF 的明显增高,同时可以诱导神经胶质细胞的 VEGF mRNA 的过量表达并且延长 VEGF mRNA 的半衰期 (Ikeda et al., 1995; Levy et al., 1998)。低氧可以通过 HIF-1 (受低氧诱导产生的因子) 与 VEGF mRNA 5'端结合提高 VEGF 蛋白翻译水平的速度 (Liu et al., 1995), 并且可能通过作用于与 VEGF mRNA 结合的蛋白来提高 VEGF 的稳定性。除此之外,在低氧的状态下可以提高 VEGF 蛋白水平翻译的有效成功率,从而加快和提高 VEGF 的分泌。低氧对 VEGF 的诱导以及与其受体调节信号传导过程涉及酪氨酸激酶的参与。目前已证实,诱导酪氨酸激酶级联反应的低氧环境通过对 PP60-C-Src 激酶活力的影响而实现对 VEGF 的调控。研究发现,大鼠在一侧大脑中动脉 (MCA) 完全闭塞 48~72 h 后,在梗死中心的周边有大量新生血管的形成,用低氧的标记硝基咪唑 EF5 发现在低氧周边的新大脑皮质能观测到低氧细胞,VEGF 是一个非常重要的血管因子,在发病后 6~24 h 由于低氧的原因导致 VEGF 的过量表达,另外 VEGF 的受体也在梗死 48 h 以后在梗死区域明显表达 (Waltenberger et al., 1996)。

第六节 基于 VEGF 基因探讨高原鼠兔的低氧适应机制

VEGF 基因是 HIF-1 最重要的靶基因之一,其生物学功能大多与低氧适应有关。为了进一步揭示低氧适应的机制,我们研究了高原鼠兔 VEGF,并对高原鼠兔 HIF-1 和 VEGF 在生理条件下的调控关系。本节介绍了此研究所取得的主要成果。

1 高原鼠兔 VEGF 全长编码区的克隆

本工作主要采用 RT-PCR 方法克隆到了高原鼠兔 VEGF 的两个同型物基因全长编码区并对其序列及分子结构进行分析 (图 5-17)。

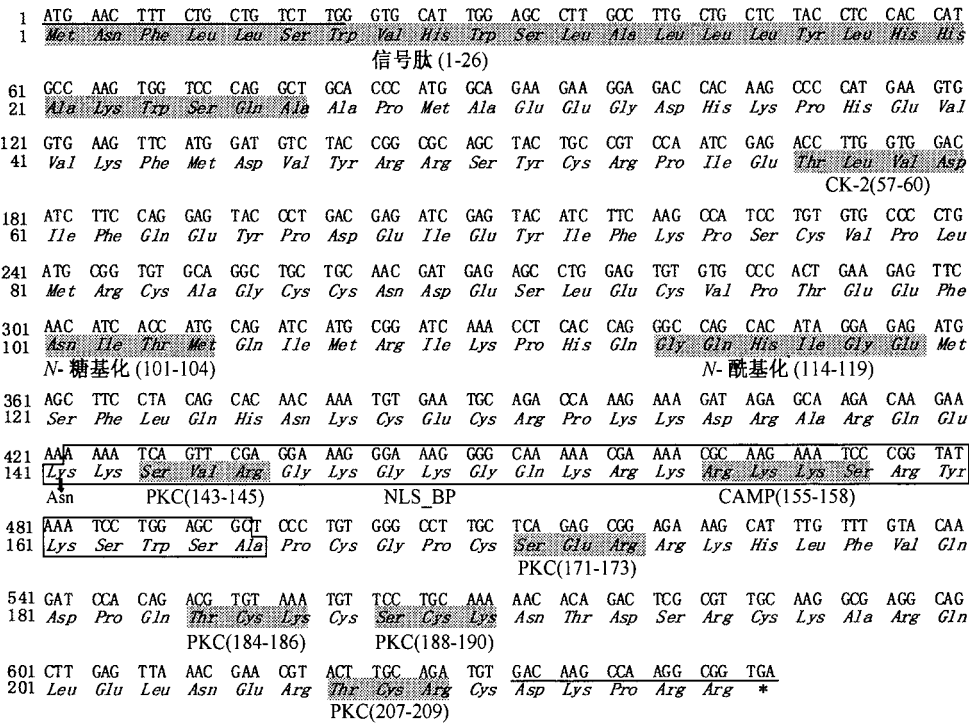


图 5-17 高原鼠兔 VEGF cDNA 以及预测的蛋白序列

下划线标示了克隆时所用引物的序列。阴影部分表示信号肽以及所含的蛋白修饰位点。VEGF₁₈₉ 比 VEGF₁₆₅ 多 24 氨基酸序列，在图中用方框标出

1.1 高原鼠兔 VEGF 全长编码区

根据人、小鼠和大鼠的 VEGF₁₆₅ 的全长编码区设计引物，我们克隆到了两个长度分别为 576 bp 和 648 bp 的 DNA 片段。通过比对，发现其分别与人、小鼠和大鼠的 VEGF₁₆₅ 和 VEGF₁₈₉ 高度同源，其编码长度为 191 个氨基酸和 215 个氨基酸。信号肽预测表明，都在 N 端包含一个 26 个氨基酸的信号肽。成熟的蛋白分别具有 165 个和 189 个氨基酸。因此我们分别命名高原鼠兔 VEGF 的这两个异型体为 VEGF₁₆₅ 和 VEGF₁₈₉。VEGF₁₈₉ 比 VEGF₁₆₅ 多 24 个氨基酸，其他序列是完全一致的。图 5-17 展示其碱基和蛋白序列全长，及其预测的修饰位点。预测的修饰位点包括酪蛋白激酶 II 磷酸化位点（CK-2）、N-糖基化位点（N-glycosylation site）、N-酰基化位点（N-myristoylation site）、蛋白激酶 C 磷酸化位点（PKC）、cAMP 和 cGMP 依赖的蛋白磷酸化位点（CAMP）。

1.2 高原鼠兔 VEGF 序列分析

通过网上在线预测，发现高原鼠兔 VEGF 含有糖基化位点等多个修饰位点，

如图 5-17 所示。多序列比对表明高原鼠兔 VEGF₁₆₅ 与人、兔、小鼠和挪威鼠的同源性分别为 95%、94%、91% 和 90%。其 VEGF₁₈₉ 与人、兔、小鼠和挪威鼠的同源性分别为 95%、95%、91% 和 91%。蛋白的序列比对表明高原鼠兔 VEGF₁₆₅ 或 VEGF₁₈₉ 与其他哺乳动物的同源性为 89%~96%。进一步利用系统进化分析方法, 构建了高原鼠兔 VEGF₁₆₅ 和 VEGF₁₈₉ 的进化树。在此进化树中, 高原鼠兔 (*Ochotona curzoniae*) 与兔 (*Oryctolagus cuniculus*) 聚在一起, 这与经典的进化分析结果一致, 表明 VEGF₁₆₅ 和 VEGF₁₈₉ 是进化保守的。蛋白质序列比对和进化树见图 5-18。

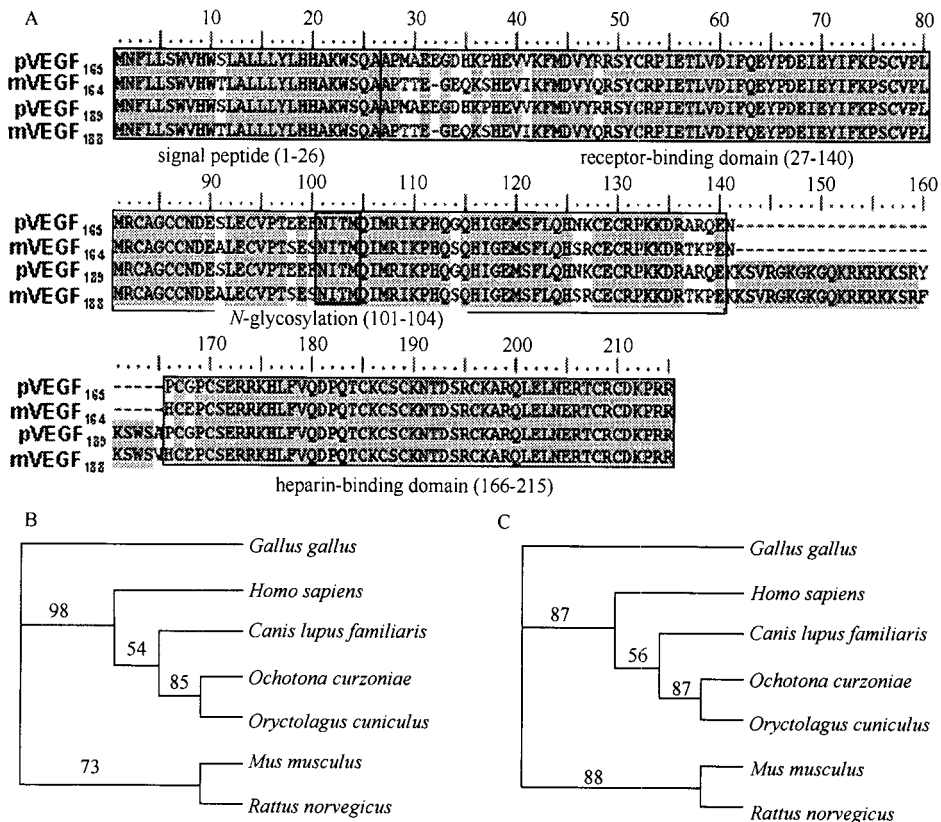


图 5-18 VEGF 序列分析

A. 高原鼠兔 VEGF₁₆₅ (pVEGF₁₆₅) 和 VEGF₁₈₉ (pVEGF₁₈₉) 以及小鼠 VEGF₁₆₅ (mVEGF₁₆₅) 蛋白质序列比对。B, C. VEGF₁₆₅ 和 VEGF₁₈₉ 系统进化树分析

2 高原鼠兔 VEGF mRNA 在不同组织的表达

RT-PCR 结果表明, 高原鼠兔 VEGF 在心、肺、肝、脾、肾、脑和肌肉组织都有表达。实时定量 PCR 结果表明在肺的表达最高, 其次是肝。肺内 VEGF mRNA 水平是肾和肌肉的 3 倍, 分别是脾和脑的 10.3 和 10.4 倍。有意思的是,

通过比较分析，我们发现在高原鼠兔大部分组织内的 VEGF mRNA 水平比小鼠的高，尤其是在心脏、肺、肝和肾组织 ($P < 0.01$ 、 0.001 、 0.001 和 0.05)，但在肌肉内表达低于小鼠。结果如图 5-19 所示。

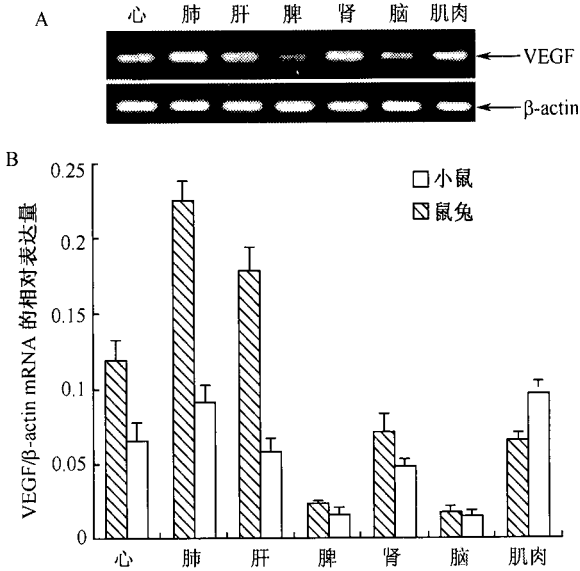


图 5-19 VEGF mRNA 在高原鼠兔 (A, B) 和小鼠 (B) 心、肺、肝、脾、肾、脑和肌肉的表达

3 高原鼠兔 VEGF 不同亚型在不同组织的表达模式

实时定量 PCR 结果揭示了高原鼠兔 VEGF₁₆₅ 和 VEGF₁₈₉ mRNA 在心、肺、肝、脾、肾、脑和肌肉组织内有不同的表达模式。在心 and 肺组织内，VEGF₁₈₉ mRNA 水平明显高于 VEGF₁₆₅ (分别为 1.8 和 6.2 倍)。在肝、脾和肾组织内，VEGF₁₆₅ mRNA 水平明显高于 VEGF₁₈₉ (分别为 3.5、1.8 和 1.2 倍)。有意思的是在脑和肌肉中，VEGF₁₈₉ mRNA 水平明显高于 VEGF₁₆₅ (分别为 1.7 和 8.0 倍)。通过与小鼠组织内这两个 VEGF 亚型的表达比较发现：在小鼠肝、脑和肌肉组织内这两个 VEGF 亚型具有相反的表达模式。这提示 VEGF₁₆₅ 和 VEGF₁₈₉ 在这两个物种中可能存在不同的功能。结果如图 5-20 所示。

4 总 VEGF 和 VEGF 不同亚型在不同海拔的高原鼠兔组织内的表达

利用实时定量 PCR 方法，检测了生活在海拔为 3200 m 和 4750 m 高原鼠兔总 VEGF、VEGF₁₆₅ 和 VEGF₁₈₉ mRNA 水平。结果表明总 VEGF mRNA 水平在海拔为 4750 m 的高原鼠兔肺和脑组织内的表达明显高于海拔为 3200 m 的高原鼠兔 ($P < 0.05$)。总 VEGF mRNA 水平不同限制了 VEGF₁₈₉ mRNA 水平的变

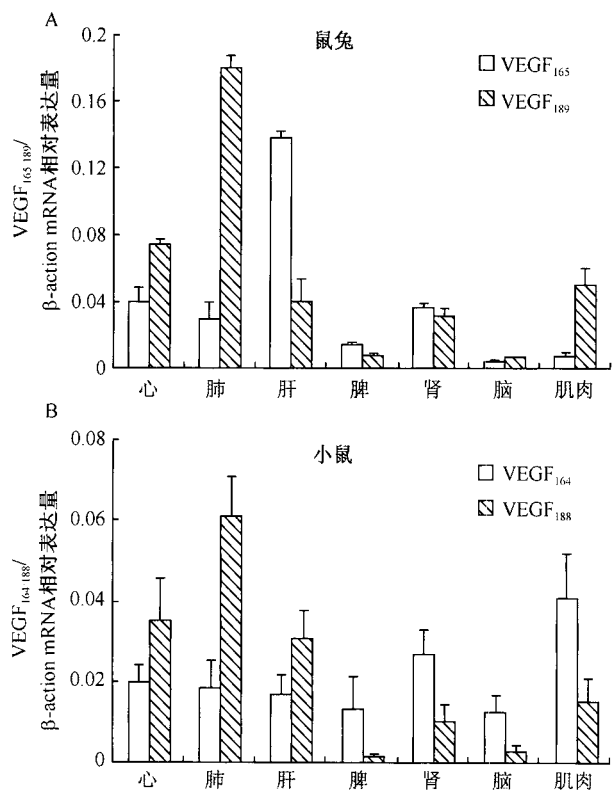


图 5-20 VEGF 亚型 (VEGF₁₆₅、VEGF₁₈₉) mRNA 在高原鼠兔 (A) 和小鼠 (B) 心、肺、肝、脾、肾、脑和肌肉组织的表达

化，而 VEGF₁₆₅ mRNA 水平实际上没有变化。结果如图 5-21 所示。

5 高原鼠兔 VEGF 或 VEGF₁₈₉mRNA 水平与 HIF-1α 蛋白水平的相关

HIF-1α 在高原鼠兔的高海拔低氧适应中具有重要的作用。为了确定 VEGF 在高原鼠兔低氧适应中的作用，我们研究了 HIF-1α 蛋白水平与 VEGF mRNA 水平的相关性。在第六节中，我们提到高原鼠兔 HIF-1α 蛋白表达随海拔的升高而增加，此趋势与 VEGF 和 VEGF₁₈₉mRNA 水平的变化一致。有意思的是，总 VEGF mRNA 水平与 HIF-1α 蛋白水平在两个不同海拔的高原鼠兔肺组织中都存在明显的正相关 (3200 m: $r=0.726$, $P=0.017$; 4750 m: $r=0.576$, $P=0.081$)。特别的是，尽管统计上意义不明显，VEGF₁₈₉ 与 HIF-1α 也存在正相关 (3200 m: $r=0.505$, $P=0.207$; 4750 m: $r=0.140$, $P=0.7000$)。结果如图 5-22 所示。

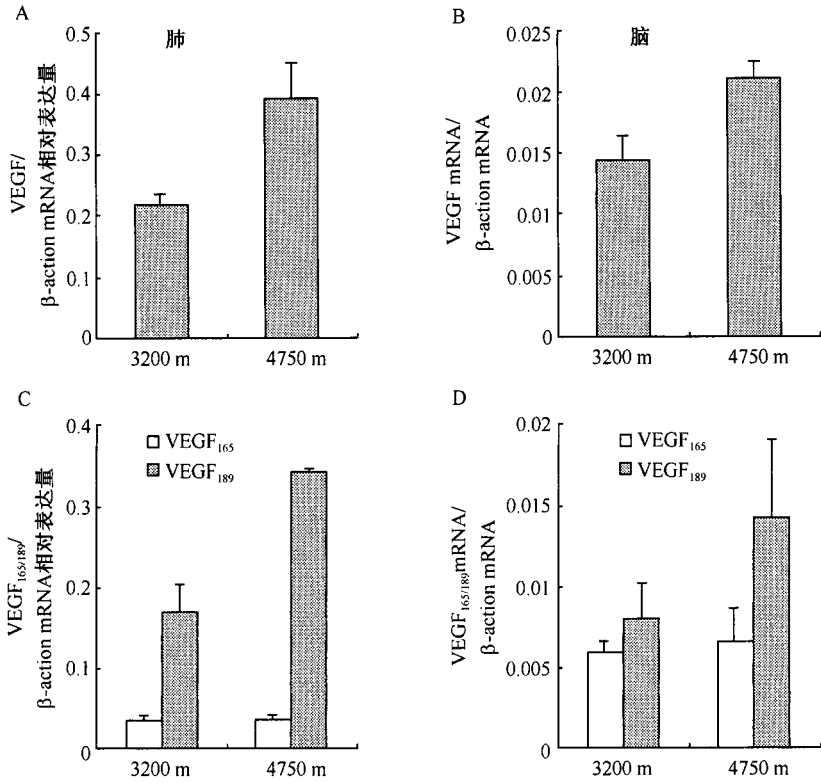


图 5-21 高原鼠兔 VEGF 和它的不同亚型 mRNA 水平随海拔的升高而升高
A, B. 高原鼠兔肺和脑内 VEGF mRNA 水平; C, D. 高原鼠兔肺和脑内 VEGF₁₆₅ and VEGF₁₈₉ mRNA 水平。海拔: 3200 m 和 4750 m

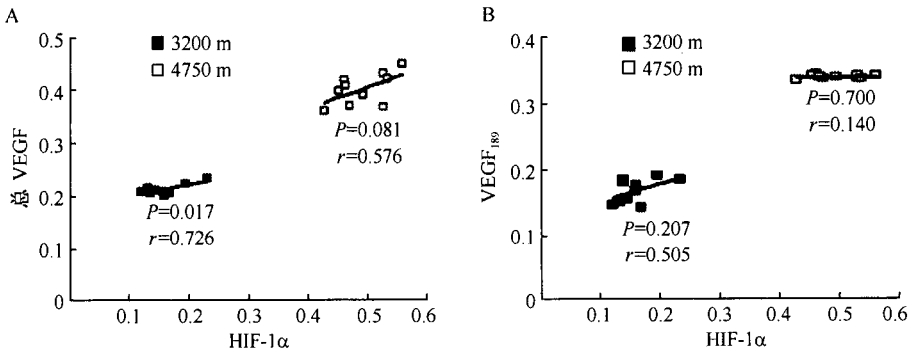


图 5-22 总 VEGF 或 VEGF₁₈₉ mRNA 水平与 HIF-1α 蛋白水平相关

6 VEGF 与高原鼠兔低氧适应

高原鼠兔 VEGF 氨基酸序列与其他哺乳动物具有高度一致性。序列的高度同源性提示 VEGF 分子的进化速度相当的慢 (Coultas et al., 2005)。VEGF 在动物的发育过程中的重要性支持了此论断。因此 VEGF 基因可以作为系统分类的一个分子标记。

我们发现高原鼠兔 VEGF 的表达在丰度上和不同亚型的表达模式上, 与小鼠等其他低海拔动物存在明显的不同。这些差异可能与高原鼠兔的长期高海拔低氧适应性进化有关。高原鼠兔一直生活在高海拔环境中, 其所受的低氧刺激明显长于其他低海拔动物。低氧在 VEGF 的表达调控具有重要的作用, 其通过稳定 HIF-1 促进了 VEGF 的表达 (Liu et al., 1995)。基因表达的变化以及由此引起的生化、生理和行为的改变组成了习服或适应性反应 (Schulte, 2001)。因此, 高原鼠兔 VEGF 丰度的提高和表达模式的变异是在成千上万年的高海拔环境中自然选择的结果。VEGF 在生活于不同海拔的高原鼠兔组织中表达的变化, 也支持了此观点。

高原鼠兔 VEGF 的高表达可能与其高海拔低氧适应有关。Partovian 等 (2000) 曾报道肺组织中过表达的 VEGF 使大鼠在低氧条件下避免了肺高压反应, 对其具有保护作用。积累的证据表明当生活在低海拔的哺乳动物进入高海拔环境时, 一定的个体产成了肺高压并伴随着肺细小动脉肌化的提高 (Banchero et al., 1971; Farber et al., 2004)。不同物种肺高压的程度不同, 并且与其在高海拔生活时间以及低氧刺激的强度有关 (Tucker et al., 1975)。高原鼠兔已经成功地适应高海拔低氧环境。其中一个适应特点是肺血管中间层非常薄, 肺细小、动脉小、无平滑肌并且右心室无肥大。其他的特点是肺血管平滑肌的量和内皮细胞结构与功能的改变 (Ge et al., 1998)。这些改变归因于 NO, 因为 NO 是一个潜在的系统性和肺的舒张因子, 它可以抑制平滑肌的扩增、迁移、浸入以及基质蛋白的产生 (Moncada, 1997; Qin et al., 2001)。由于 NO 是 VEGF 下游的一个主要调节子, 我们假定 VEGF 在高原鼠兔肺中也是通过内皮性一氧化氮合酶 (Endothelial nitric oxide synthase, eNOS) 促进了 NO 的合成 (Voelkel et al., 2006)。因此, VEGF 的高表达可能与高原鼠兔低氧性肺动脉高压反应钝化 (Ge et al., 1998) 有关。在高原鼠兔脑和肌肉组织中, VEGF₁₈₉ mRNA 水平明显高于 VEGF₁₆₅, 与小鼠脑和肌肉组织中的表达模式相反。小鼠脑和肌肉组织中这两种 VEGF 亚型的表达水平与其他的报道一致 (Bacic et al., 1995; Ng et al., 2001)。VEGF 亚型不同比例反应了其在动物中的功能和生态意义。的确, VEGF 亚型的比例的变化与组织类型、胚胎发育和个体成长阶段 (Ng et al., 2001)、组织修复 (Uchida et al., 2003) 以及系统低氧 (Hofstaetter et

al., 2004) 和葡萄糖缺乏 (Zhang et al., 2002) 的反应有关。高原鼠兔 VEGF₁₈₉ 表达水平随海拔的升高而增加可能为其低氧适应提供了新的线索。

在第六节中, 我们已经介绍了 HIF-1 α 蛋白在动物的低氧适应中的重要作用。为了揭示 VEGF 高水平表达的分子机制, 我们研究了高原鼠兔 VEGF 和 HIF-1 α 表达的相关性。我们发现这两个重要的因子与海拔的变化联系在一起。由于在其他物种中, 低氧诱导的 VEGF 的表达受 HIF-1 的调控 (Damert et al., 1997), 我们推测, 在高海拔低氧环境中, 高原鼠兔 HIF-1 α 蛋白的高表达支持了 VEGF mRNA 的高水平。另一方面, VEGF 也可能参与了 HIF-1 α 的表达调控。最近的报道 (Deudero et al., 2008): 通过过氧化物, VEGF 诱导了 HIF-1 α 的表达支持了此观点。因此, 我们假定 VEGF 和 HIF-1 在高原鼠兔组织内相互调控, 这与 VEGF 和 HIF-1 的刺激关系是双向的报道相一致。由于 VEGF₁₈₉ 亚型的表达也与 HIF-1 α 蛋白水平相关, 可以推测其在高原鼠兔的低氧适应中具有更重要的作用。

7 结论

通过高原鼠兔 VEGF cDNA 序列克隆、mRNA 的表达模式, 结合生物信息的分析, 我们发现了高原鼠兔 VEGF 基因的保守性, 以及其表达模式与小鼠等其他低海拔动物 VEGF 表达模式的差异。通过其表达的差异, 以及与 HIF-1 α 之间的相关性研究, 探讨了 VEGF 在高原鼠兔对环境低氧的适应中的作用。我们的结果表明高原鼠兔 VEGF 表达水平以及其不同亚型表达模式的变化可能在高原鼠兔的低氧适应中具有重要的作用。

对高原鼠兔 VEGF 及其表达模式的研究一方面拓展了 VEGF 基因功能研究领域, 另一方面丰富了高原鼠兔环境低氧适应机理研究内容, 为从 VEGF 基因功能的特殊性方面来深入研究高原鼠兔对环境低氧的适应奠定了坚实的基础。目前为止, 高原生物适应机制的分子机制的研究还处于初级阶段, 主要集中于对特殊环境密切相关的基因的结构分析和表达的研究, 而从基因之间的调控以及相关性方面来揭示适应机制还鲜见报道。我们首次报道了 VEGF 和 HIF-1 α 在居住与不同海拔的高原鼠兔组织细胞内存在明显的正相关, 证明了两者在高原鼠兔中可以相互调控。这对低氧适应的分子机制研究是一个新的突破。这在适应机理研究的方法、思路以及策略上是一种开创性的探索。

VEGF 是一个低氧响应基因, 其表达主要受低氧的调控。由于其对刺激的敏感性, 其表达存在多样性。因此研究高原低氧耐受动物 VEGF 的表达模式, 并与其他低海拔动物做比较, 有利于进一步理解高原动物低氧适应的分子机制。对高原鼠兔不同发育阶段 VEGF 和其不同亚型的表达模式及其与 HIF-1 α 表达的相关性进行研究有望在高原动物低氧适应机制的研究方面取得突破性进展。

第七节 高原鼠兔低氧适应分子机制研究的意义与展望

1 高原鼠兔低氧适应分子机制研究的理论意义

高原鼠兔是青藏高原上的优势物种，其是青藏高原上最古老的物种之一，一直生活在高海拔低氧环境中。基于低氧密切相关基因如 HIF-1 α 和 VEGF 研究高原鼠兔低氧适应的分子机制，有利于揭示与低氧适应的分子基础，也拓宽了低氧相关基因的研究领域，同时促进了低氧基因的研究。HIF-1 α 作为一个重要的与低氧适应密切相关的转录因子，其调控主要在蛋白水平，在人和正常的实验动物组织中很难检测到它的表达，利用常规的实验动物或细胞研究 HIF-1 α 功能时，一般采取诱导表达的方法。有意思的是，在高原鼠兔组织中，尤其是在肺中检测到 HIF-1 α 蛋白有明显高的表达量，因此我们认为高原鼠兔可以作为研究 HIF-1 α 生理功能和意义的比较好的实验动物。VEGF 不同亚型的表达精确调控机制至今仍未报道。在我们的研究中，发现 VEGF₁₈₉ 和 VEGF₁₆₅ 亚型在高原鼠兔脑和肌肉组织中的表达模式明显不同于其他实验动物，并且生活在不同海拔的高原鼠兔组织中其表达方式也明显不同。对高原鼠兔 VEGF 不同亚型的进一步研究有利于研究其调控机制。我们的研究表明高原鼠兔 HIF-1 α 和 VEGF 在生理条件下存在明显的正相关，表明两者在生理条件下存在相互调控关系，这为两者的调控提供生理依据。

利用分子生物学方法特别是基于环境密切相关基因探讨低氧适应的机制是低氧适应机理研究在方法、思路以及策略上的一种开创性探索。

2 高原鼠兔低氧适应分子机制研究的现实意义

高原土著动物对极端环境的适应性特征是在长期的进化过程中形成的，经受得起自然界的强烈选择并稳定遗传。自然选择体现在对表型的选择上，而自然选择的反应应答却要追溯到基因水平上。因此对高原鼠兔等高原土著动物的低氧耐受的分子机制研究为缺氧预适应、低氧习服以及低氧习服药物的开发提供理论依据。

低氧适应分子机制的研究为高原病的基因治疗和药物的开发提供理论依据。急性高原肺水肿（HAPE）是以低氧性肺动脉高压为特征的一种急性高原病，属于急性高原病的危重类型，严重威胁着初到高原者的生命安全。我们通过对高原鼠兔 HIF-1 α 和 VEGF 的研究，发现高原鼠兔肺组织中 HIF-1 α 和 VEGF 具有明显高的表达，认为其与高原鼠兔低氧性肺高压反应钝化有关。因此我们认为基于 HIF-1 α 和 VEGF 的基因治疗或通过药物增加二者适度的表达，可能有利于缓解

肺动脉高压，从而降低了高原肺水肿的危险。

3 高原鼠兔低氧适应分子机制研究的展望

高原低氧适应是高原医学和生理学的核心，高原低氧适应的机制主要是围绕缺氧建立起来的一系列复杂的代偿。高原鼠兔长年生活在高海拔、高寒地区，对低氧的适应性极强，对其研究已获得了一系列成果，尤其是低氧适应的分子机制是近几年研究的热点，但仍处于发展阶段。利用现代分子生物学的方法，在细胞及分子水平上展开大量的研究，以期阐明其低氧适应的详细机制将是未来发展的方向。

地下鼠主要是在密封的洞穴中渡过的，除具有独特形态解剖结构外，其 EPO 分子结构及表达对地下缺氧环境亦具有良好的适应性。本章以世居于青藏高原的地下鼠种——高原鼯鼠为研究对象，采用 RT-PCR 方法克隆出其 EPO 基因 cDNA 序列并对其序列及蛋白分子结构进行分析；并分析青藏高原地下缺氧环境对 EPO mRNA 相对表达量的影响。结果表明，①高原鼯鼠 EPO 基因 cDNA 编码区长 576 bp，编码 192 个氨基酸组成的蛋白质，其 N 端含有 26 个氨基酸组成的信号肽，成熟分泌型蛋白质为 166 个氨基酸组成。高原鼯鼠 EPO 核苷酸序列与人同源为 81%，与小鼠、大鼠、根田鼠的则均为 85%；而与同为地下鼠的鼯形鼠 4 个种，*Spalax golani*、*S. carmeli*、*S. judaei*、*S. galili* 的序列同源性均高达 95%。②蛋白质氨基酸序列的多重比对结果显示，成熟高原鼯鼠 EPO 与上述比对物种的同源性分别为：人，81%；大鼠，85%；小鼠和根田鼠，86%；鼯形鼠，91%。推导出的氨基酸序列比对发现，高原鼯鼠与鼯形鼠属具有极为相似的生活方式，为终生地下生活，二者的 EPO 相似度也极高，趋同进化位点为 10 个。据此认为，低氧环境压力驱动地下生活物种高原鼯鼠和鼯形鼠 EPO 蛋白发生了适应性功能进化，从而提高其在压力环境下的生存的适合度。高原鼯鼠地下生活的进化时间鼯形鼠较短，EPO 正向选择位点亦较少，但较其他非地下生活物种高。说明地下生活进化时间对 EPO 正向选择具有重要的影响。③高原鼯鼠不同组织 EPO mRNA 相对表达量存在显著差异，心脏最高，白色脂肪组织几乎不表达；肝脏和肾脏 EPO mRNA 相对表达量均随海拔升高而增加，说明生活环境的缺氧水平是高原鼯鼠的 EPO 表达量直接影响因素。

第六章 高原鼯鼠对青藏高原地下低氧环境的生态适应研究

青藏高原主要的环境特征是高寒、缺氧及强紫外线辐射，其中缺氧是本区最具特色，阻碍动物生存的限制性因子，高原土著动物在长期进化过程中，形成一套独特的机制以适应高原的缺氧环境。高原鼯鼠是一种世居高海拔地区的地下属种，其洞道内部含氧量比同地区大气中低 20%，对这种缺氧环境具有很强的反应。表现为高的红细胞数以及高的血红蛋白含量及肌红蛋白含量。同时在缺氧环境下通过代谢机制的调整，合成和积累了一些特殊的抗缺氧物质，表现为很强的抗缺氧能力，红细胞生成素（erythropoietin, EPO）主要由肾脏皮髓交界处的肾小管旁细胞分泌，是促进哺乳动物红系祖细胞增殖分化的主要细胞因子，调节机体红细胞的生成。

关于高原鼯鼠 EPO mRNA 分子结构特征及其表达水平与高原低氧的生活环境之间的关系，目前还不十分清楚。鉴于高原鼯鼠在青藏高原极端环境下所表现的 O_2 代谢特征，以及 EPO 在调节低氧中的重要作用及其对低氧环境的敏感性，我们检验的假设为：①高原鼯鼠的 EPO 因其地下生活而产生了适应性功能进化；②高原鼯鼠 EPO 表达具有海拔制约特征，即其表达将随海拔升高而升高。

本章就高原鼯鼠 EPO 的分子特征、分子进化及其在不同海拔的生存环境下的表达特征等方面展开深入研究，目的在于揭示高原鼯鼠对高原地下缺氧环境的适应性。

第一节 高原鼯鼠对高原地下缺氧环境的适应

地下鼠主要是在密封的洞穴中渡过的，在长期低氧环境的生活中（Arieli, 1989; Shams et al., 2004）进化形成了适应低氧环境的呼吸和心血管系统（Arieli&Nevo, 1991），地下鼠适应地下缺氧环境的主要形态解剖特征有：肺泡壁薄，气体扩散能力强（Kleinschmidt et al., 1984）、心血管系统气体运输能力强（Shams et al., 2004）以及肌肉组织中线粒体含量高，氧气利用能力强（Widmer et al., 1997）等。其中最为令人瞩目的成果是 Shams 等（2004）对鼯鼠属（*Spalax*）低氧诱导因子-1 α （hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α ）和红细胞生成素的研究。

红细胞生成素主要由肾脏皮髓交界处的肾小管旁细胞分泌，是促进哺乳动物

红系祖细胞增殖分化的主要细胞因子, EPO 与红系祖细胞表面的 EPO 受体 (EPOR) 结合后, 通过信号传递使细胞核内特定基因转录发生改变。与其他造血生长因子不同, EPO 主要作用于相对成熟的红系祖细胞。EPO 属于 I 型细胞因子家族, 缺氧是其最强的诱导因子, EPOR 为一跨膜受体, 胞质域无任何激酶活性, EPO 作用于受体后, 使其形成同源二聚体, 进而激活与受体偶联的 JAK2, 后者导致 EPOR、STAT5 及其他信号转导靶分子酪氨酸残基磷酸化, 启动细胞内信号网络 (Kendall, 2001)。

1 低氧感受与反应的细胞分子机制

细胞低氧信号的感受与应答非常复杂。简言之, 细胞感受外界低氧信号后, 既可上调细胞内某些基因表达, 又可使细胞内某些基因的表达降低, 这两种情况通过不同的途径都可以使有机体处于低氧反应的激活或抑制状态。

关于低氧反应通路的研究历时 200 余年, 先后经历了由经典低氧反应、红细胞生成素 (EPO)、低氧诱导因子-1 (HIF-1)、一系列低氧反应基因以及缺氧感受器。直到 20 世纪 90 年代, 由氧感受器—信号转导—效应基因的现代低氧反应通路才逐步形成。

目前, 有关低氧感受与反应应答的细胞分子机制研究很多。细胞表面的氧感受器是一种血红素蛋白 (其中辅酶 II 氧化酶被认为是最可能的氧感受器), 它能感受细胞周围环境氧浓度的变化, 并把细胞周围的氧气转变为过氧化氢, 由过氧化氢充当信使分子, 通过多种机制调节细胞中的多种蛋白质表达。氧浓度高时, 过氧化氢浓度升高, 低氧时则降低。通过过氧化氢浓度的变化, 把氧分压变化的信息传入细胞内, 调节低氧敏感基因的表达。HIF-1 基因是该细胞通路过程中的关键一员。HIF-1 感受到来自细胞外的氧浓度变化后, 作用于其下游的一系列靶基因, 最后实现低氧信号的传导, 完成靶基因转录的调控 (谢印芝等, 2000)。近期研究则认为 HIF 脯氨酸羟化酶 2 (HIF prolyl-hydroxylase 2, PHD2) 是关键氧感受子, 能使常氧条件下 HIF-1 α 处于低稳定状态, 同时提出低氧引起 PHD2 表达上调, 提供了一个由氧浓度驱动的 HIF-1 依赖的自动调节机制 (Berra et al., 2003)。HIF-1 处在整个细胞低氧信号转导途径的核心位置, 在调节机体氧平衡过程中发挥关键性作用 (图 6-1)。

2 EPO 在低氧应激中的作用

EPO 是促进哺乳动物红系祖细胞增殖分化的主要细胞因子, EPO 与红系祖细胞表面的 EPOR 结合后, 通过信号传递使细胞核内特定基因转录发生改变。与其他造血生长因子不同, EPO 主要作用于相对成熟的红系祖细胞。

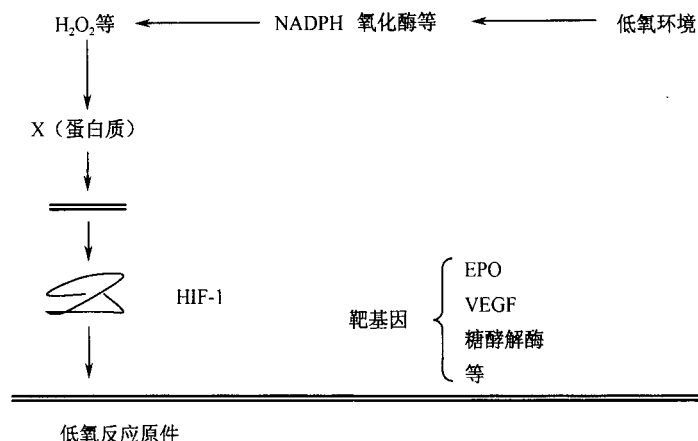


图 6-1 低氧信号转导途径

2.1 EPO 的结构与功能

2.1.1 EPO 的分子组成及结构特点

人 EPO 基因位于第七对染色体的 q21~q22 区, 至少含有 5 个外显子和 4 个内含子。EPO 基因两侧的不同 DNA 序列 (即侧翼序列) 控制着肾脏和肝脏 EPO 的表达, 大约有 50 个核苷酸组成的 3' 端侧翼序列能传递对缺氧产生的转录诱导, 作为增强子发挥作用 (Kendall, 2001)。

人 EPO 是一种对热和酸稳定的酸性糖蛋白质, 其前体有 193 个氨基酸组成。成熟的人 EPO 分子由 166 个氨基酸残基组成, 含有 2 个二硫键, 理论相对分子质量为 18 000, 但糖基化的 EPO 相对分子质量为 30 400。人 EPO 氨基酸组成与猴具有 95% 的同源性, 与大鼠有 85%。

EPO 分子中有 3 个 N-糖基化位点和 1 个 O-糖基化位点, 分别位于第 24、26、83 位的 Asn 和第 126 位的 Ser。成熟的 EPO 分子在这几个位点均可被糖基化。

2.1.2 EPO 的分泌器官

在发育过程中, 早期胚胎器官 EPO 基因可能在胚胎的卵黄囊表达, 中期在胚胎肝细胞中表达, 妊娠晚期及成年期主要在肾脏中表达。在肾脏内层皮质中, 20%~30% 间质细胞能分泌 EPO, 肾被膜下皮质中 10% 间质细胞能产生 EPO。

2.1.3 EPO 的生物学活性

EPO 是机体红细胞生成的主要刺激生长因子, 调控机体红细胞的生成。在实验中, 对 EPO 造血单能干细胞具有多种作用, 而对骨髓中的多能干细胞的作用不明显。在红细胞生成过程中, EPO 能与其他生长因子, 如干细胞生长因子 (stem cell growth factor, SCGF)、胰岛素样生长因子 1 (insulin-like growth

factor1, IGF-1)、白细胞介素 3 (interleukin-3, IL-3) 等一起协同作用促进未成熟的红细胞的增殖和成熟, 尤其是发现 EPO 可阻断红系干细胞从红细胞集落形成单位细胞 (colony forming unit-erythroid, CFU-E) 到早幼红细胞阶段的正常细胞凋亡, 在细胞凋亡减少的同时其他生长因子可通过刺激红系干细胞的增殖而增加其数量。同时 IGF-1 通过引导晚幼红细胞的成熟而促进红细胞的生成。尽管存在争议, 有报道认为 EPO 具有促进爆式红细胞集落形成单位 (BFU-E) 分化成熟的能力。实验中, 低浓度 EPO (10 pmol) 可促进细胞分裂周期 G_1 期延长并产生分化信号, 而高浓度的 EPO (500 pmol) 可产生细胞增殖信号, 使细胞 G_1 期缩短。EPO 还可诱使血红蛋白合成增加以及影响骨髓微环境从而促进血细胞的生成 (Roeder et al., 1998; Kendall, 2001)。

EPO 对巨核细胞的生长发育也具有作用。单独或与血小板生成素 (TPO) 一起均可刺激巨核细胞集落形成单位细胞 (CSF-Meg) 增殖成熟及胞质裂解形成血小板 (Maront, 1997; Kendall, 2001)。EPO 也可以直接作用于激活的 B 细胞, 促进 B 细胞的增殖并加速免疫球蛋白的合成。另外 EPO 也可经自分泌方式对一些人红白血病细胞产生作用 (Kendall, 2001)。

2.2 EPO 的调节机制

细胞可以通过改变基因表达方式而对细胞内外各种环境刺激产生应答反应, 以维持其稳态。诸多研究表明, 缺氧可以调节某些基因的表达, 其中包括 EPO、血管内皮生长因子 (VEGF)、血小板衍生生长因子 (PDGF)、糖酵解酶、转录因子和某些原癌基因等。这种基因的缺氧诱导性表达调控是通过特异的反式作用与 DNA 上的氧调节性顺式作用元件相互作用而实现的。

2.2.1 缺氧诱导因子-1 (hypoxia inducible factor-1, HIF-1) 的生成与转录调节作用

HIF-1 是从缺氧培养的细胞核粗液中提取的一种具有 DNA 结合活性的蛋白质因子, 其产生具有以下特点: ①缺氧 (1% O_2) 是 HIF-1 产生的有效刺激因素, 其 DNA 结合活性受氧分压严格调节; ② $CoCl_2$ (可替代血红素中的二价铁, 刺激 EPO 的生成) 和 DFX (desferrioxamine, 一种铁螯合剂) 也可诱导细胞产生 HIF-1 DNA 结合活性, 动力学与缺氧相似; ③HIF-1 的产生无细胞特异性, 1% O_2 几乎对所有的哺乳动物细胞均具诱导效应, 包括 EPO 生成 (EPO-producing) 细胞和非 EPO 生成 (non-EPO-producing) 细胞; ④放线菌素 D、放线菌酮可阻断 HIF-1 的缺氧性诱导, 表明缺氧可诱导 HIF-1 从头转录和翻译 (Wang et al., 1995; Kietzmann et al., 2001)。

2.2.2 氧调节性顺式作用元件

在缺氧诱导性表达基因的增强子或启动子区内含有对氧分压改变敏感的特殊

DNA 序列, 在缺氧时能与某些反式作用因子结合, 上调基因的表达, 这些序列称为 O_2 反应/调节元件 (O_2 -response/regulation element, O_2 -RE)。

Semenza 和 Wang (1992) 在研究 *epo* 基因的缺氧诱导性表达调控机制时, 发现人 EPO 3'侧翼区含有肝脏特异的 DNase I 超敏位点, 含此超敏位点在内的 256 bp 片段与 EPO 的缺氧诱导性表达有关。经删除分析鉴定出自 EPO 基因 poly (A)位点 3'端 116 nt 起始的 50 bp 序列 (3454~3503 bp) 具有缺氧诱导性增强子 (hypoxia-inducible enhance, HIE) 功能, 利用 SV₄₀早期启动子-CAT 报道基因在 Hep3B 细胞中的瞬时表达分析, 将此 50 bp 的 HIE 克隆插入 CAT 编码序列的 3'或 5'方向均可介导缺氧对 CAT 报道基因转录的 7 倍诱导效应 (1% O_2 相对于 20% O_2)。经删除或扫描突变分析显示, 此 50 bp 的增强子含有 3 个功能性位点, 其中位点 1 (4~12 bp) 和位点 2 (19~23 bp) 是诱导表达所需的, 这些部位的任一碱基替换可失去缺氧诱导性表达。1~33 bp 拷贝可产生 3 倍诱导效应, 而串联的双拷贝则可产生与完整 50 bp HIE 相同的 7 倍诱导, 说明 24~50 bp 并非诱导所必需, 但是具防止扩大诱导信号的作用。DNase I 足迹研究表明, 另一功能性位点位于 26~48 bp (位点 3)。

小鼠 *epo* 基因 3'侧翼区含有保守的 96 bp 缺氧反应性增强子序列, 位于 poly (A)位点 3'端的 120 bp 与人 EPO 基因 3'-HIE 高度同源, 其中与 *hif-1* 结合位点 (位点 1) 则完全相同。此 3'-HIE 的 1~18bp 双链寡核苷酸探针 (W_{18}) 可结合 Hep3B 核提取液中的两种因子, 一种为特异结合于位点 1 的 HIF-1, 仅存在于缺氧细胞核粗提取液中, 位点 1 中 7~9 核苷酸 5'-CGT-3'被 5'-AAA-3'替换, 可完全阻断 HIF-1 与位点 1 的结合。甲基化干扰分析表明, 位点 1 中有 4 个 G 与 *hif-1* 的 DNA 结合活性密切相关, 编码 G-8、G-10 和非编码链的 G-7 和 G-11 每个甲基化均可阻断 HIF-1 的结合, 而其他部位的 G 和任意链上的 A 甲基化不影响 HIF-1 的结合, 证明 *hif-1* 主要结合于 DNA 双螺旋的大沟, 其特异结合序列为 5'-CTACGTGCT-3'。 W_{18} 探测到另外一种核因子为组成型因子 (constitutive factor), 在缺氧及非缺氧细胞中均存在, 但以此增强子序列 1~33 bp 为探针做凝胶迁移率改变分析, 也可探测到此组成型因子, 其结合位点是 19~23 bp (位点 2), 但是其结构和性质均未可知。可能在 *hif-1* 与转录起始复合体的功能性相互作用中是必需的, 但未得到证实。缺氧 (1%) 或常氧 (20%) 培养的 Hep3B 细胞核粗提液均可保护位点 3 免受核酸酶的消化, 推测位点 3 位组成型因子的结合位点。又由于 30~43 bp 的反义链中含有 5'-AG-GTCA-3'正向重复序列, 此序列为甲状腺/类固醇核激素受体 (NHR) 超家族成员的结合位点, 但转染含此受体的配体 (β -雌二醇、睾酮、地塞米松、VD₃ 等) 处理后对报道基因的表达无明显影响。提示结合于增强子位点 3 的组成型因子与已知的 NHR 结构相似, 但为一孤儿 (orphan) 受体, 其配体也未被鉴

定(汤盈等, 2006)。

epo 基因的 HIE 在功能上具有普遍性, 对非 EPO 生成细胞具有相似的缺氧诱导效应, 但对缺氧反应程度低于 EPO 生成细胞 Hep3B 细胞, 50 bp 的 HIE 单拷贝对 CAT 报道基因产生 7 倍的缺氧诱导效应, 而在 CHO 或 293 细胞中, 单拷贝仅产生 1.7 倍的诱导效应, 2~4 拷贝可产生 3~4 倍诱导效应, 拷贝数与报道基因的缺氧诱导性表达直接相关。几乎在所有检测的人及哺乳动物细胞系中, 小鼠 EPO 基因 3' 增强子序列均可介导缺氧对 α -珠蛋白基因的诱导表达, 1% O_2 比 20% O_2 可产生 3~10 倍的缺氧诱导效应。人和小鼠 EPO 基因 3'-HIE 序列对哺乳动物细胞这种普遍生物学效应说明, 在非 EPO 生成细胞具有和 EPO 生成细胞相同或相似的基因转录的缺氧性激活调控机制, 产生除 EPO 表达以外的其他与缺氧反应有关的细胞事件 (Wang et al., 1995)。

2.3 EPO 在神经系统中的作用

EPO 是一种多功能营养因子, EPO 和 EPOR (EPO 受体) 在多种组织中表达, 它不仅影响造血系统, 对整个机体的内稳态也有作用。在中枢神经系统 (central nervous system, CNS) 中, 存在特异性的 EPO/EPOR 系统, 并且该系统不依赖于造血系统。EPO 及 EPOR 在脑中不同区域和不同细胞类型中均有表达, 对脑的发育和成熟有作用, 在成年脑中影响 CNS 内稳态及神经传导。缺氧缺血应激对 CNS 造成复杂的损伤机制, 能量代谢障碍、细胞内 Ca^{2+} 超载、兴奋性氨基酸中毒、NO 和氧自由基的损伤以及细胞凋亡等共同参与了这一生理过程。但是在缺氧缺血条件下, CNS 的自我保护系统也同时被激活, 形成一系列保护反应。其中, EPO 起到了重要的神经营养和保护作用 (Kendall, 2001)。

2.3.1 作用部位脑组织和脑脊液

EPO mRNA 在小鼠、猴和人脑中都有相近水平的组成性表达。EPO 基因在人脑的颞叶皮层、海马和杏仁核中均有表达。在猴脑中, EPO 基因表达的区域较为广泛, 包括颞叶、额叶和枕叶皮层、小脑、下丘脑、海马和尾状核。此外, 研究发现, 早产儿和足月产儿的脑脊液 (cerebrospinal fluid, CSF) 中均含有 EPO, 并随胎龄成比例下降 (Kendall, 2001)。

2.3.2 EPO 在神经系统缺氧中的作用

EPO 在 CNS 中的生理功能尚未完全清楚, 由于脑源性 EPO 不易通过血脑屏障 (BBB), 因此, 其对骨髓中的红细胞生成作用不显著。EPO 在 CNS 中的表达可能发挥局部生理功能。

体外和体内研究表明, EPO 具有直接的神经营养作用和神经保护作用, 缺血损伤中那些神经元易受损伤的区域, 如海马和大脑皮层中表达 EPO/EPOR 系统, 说明 EPO 能以神经营养和神经保护因子的形式作用于 CNS, 尤其是在神经

受损的情况下。此外, EPO 还可以影响神经递质的释放, 在成体脑的突触可塑性中发挥重要的作用。

EPO 在大脑缺血中发挥神经保护作用。在缺血、低氧或者低血糖情况下, 引起神经元死亡的因子主要是谷氨酸。谷氨酸诱导 NMDA 受体的激活, 引起细胞内 Ca^{2+} 浓度持续升高, 继而在很大程度上引发细胞内酶级联反应, 最终导致神经元死亡。而体外培养的神经元经 EPO 预处理可阻止谷氨酸诱导的细胞死亡, 且呈现出剂量制约模式。EPO 可在极短时间 ($<5 \text{ min}$) 内产生针对谷氨酸毒性的神经保护作用, 而细胞自然产生则需要很长的时间 (8 h), 推测其保护作用可能部分依赖于 RNA 和蛋白合成。

3 EPO 在心血管系统中的作用

每个血管内皮细胞大约有 27 000 个 EPOR。研究表明 EPO 对人脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 及牛肾上腺毛细血管内皮细胞具有促分裂增生及化学趋化作用。而且, EPO 可诱导 EA1hy926 细胞产生 MMP22, 促进其增生, 激活细胞 JAK2, 促进该细胞分化形成血管结构等 (Ribatti et al., 1999)。Jaquet 等 (2002) 采用小块人源心肌组织, 研究发现 EPO 能够与 VEGF 同样有效地促进心肌毛细血管的生长。采用浓度为 2.5 U/ml 的 EPO 可使毛细血管的生长增加 220%, 这一发现提示 EPO 具有很强的促血管生长作用。EPO 促进血管内皮细胞表达内皮素, 在培养的 HUVEC 中还诱导其表达 PAI21。在对 EPO 作用于血管内皮细胞后对其基因表达影响的基因组研究中发现, 血管功能相关基因、基因转录及翻译相关基因、线粒体能量代谢相关蛋白以及蛋白酪氨酸激酶等表达上调。Stohlawetz 等 (2000) 发现经静脉给予 RhuEPO 后, 内皮细胞明显激活, 并出现 EPO 时间剂量依赖性的 E2selectin 的分泌, 同时使 VCAM21 的产生增加。为了评价 EPO 对血管内皮功能的影响, Noguchi 等 (2001) 连续给予家兔注射 EPO 治疗 1 周, 发现其血压及血管阻力对内皮依赖性血管扩张剂的反应性明显下降, 而对内皮非依赖性血管扩张剂的反应性无变化, 表明 EPO 可能通过对内皮一氧化氮合酶活性的抑制而减少内皮依赖性血管因子 NO 的合成, 但进一步的研究表明尽管 EPO 对血管内皮细胞的直接作用是抑制 NO 的合成, 但其诱导红细胞增生的作用却能够使 NO 的合成代偿性的增加。研究发现 RhuEPO 转基因小鼠在过度表达 EPO 的同时, 其血浆 NO 水平高于对照组, 同样, 外源性 EPO 诱导红细胞增多的大鼠其 NO 产生增加, 血压仍保持在正常水平。

3.1 EPO 与血管平滑肌细胞

RhuEPO 对离体肾脏及肠系膜血管具有收缩作用, 高浓度作用时能够诱导

大鼠肾小球系膜及主动脉血管平滑肌细胞 (VSMC) 收缩。这一作用可能与 EPO 激活 PKC 及 PLC2 γ 1, 使细胞内游离钙升高有关, EPO 还对去甲肾上腺素、血管紧张素 II 及 ET21 升高胞质钙水平具有协同作用, 同时还能够使血管紧张素受体表达上调, 使 VSMC 对血管紧张素 II 的敏感性增加 (Barrett et al., 1998)。EPO 使 VSMC 的原癌基因, 如 *c-myc*、*junb* 及 *c-fos* 等表达上调, 因此促进 VSMC 的增殖。EPO 诱导 VSMC 的 PI3/AKT 通路的激活, 该通路已证明具有抗凋亡作用, 可能也参与 EPO 诱导的 VSMC 的增殖 (Akimoto et al., 2000)。有人在接受 EPO 治疗的血液透析患者增生的血管内膜上发现 EPOR 表达明显增加, 提示 EPO 可能与血管内膜的增生有关。

3.2 EPO 与心肌

EPO 对乳鼠心肌细胞的分裂增殖具有剂量依赖性的促进作用, 这一作用在酪氨酸激酶、蛋白激酶 C 及磷脂酶 C 抑制剂作用后被阻断。Na⁺/K⁺/ATP 酶阻断剂也抑制了 RhuEPO 对心肌细胞增殖的促进作用。因此, 推测 EPO 促心肌细胞增殖的作用与酪氨酸激酶及蛋白激酶 C 的磷酸化, 并进一步激活 Na⁺/K⁺/ATP 酶有关。Wald 等 (1995) 发现 EPO 治疗能够改善尿毒症大鼠的心肌收缩功能, 恢复心肌细胞对洋地黄类药物的高亲和力结合位点。研究还发现用 RhuEPO 纠正肾衰竭合并心力衰竭患者的贫血后, 其心输出量增加、外周血管阻力下降、冠状循环血流改善、运动耐力增加、左心室肥厚减轻且左心室射血分数增加。还有很多研究证实 EPO 用于治疗慢性心力衰竭合并贫血的患者, 能够明显改善心功能, 降低病死率等。最近的研究发现, EPO 在心肌的缺氧复氧及缺血在灌注损伤中具有显著的保护作用, 这一发现为临床缺血性心脏病的防治研究提供了新的思路。Cai 等 (2003) 发现提前 24 h 以 EPO 预处理大鼠, 可以明显促进心脏缺血再灌注损伤后心功能的恢复, 减少心肌细胞凋亡。Tramontano 等 (2003) 同时应用培养大鼠乳鼠心室肌细胞缺氧损伤模型及大鼠冠状动脉阻断心肌缺血损伤模型观察发现 EPO 可以明显降低缺氧及缺血损伤后心肌细胞凋亡率, 抑制凋亡相关蛋白 caspase23 的活性, 促进心功能恢复等, 同时对心肌细胞作 EPOR 的免疫组织化学染色及 Western 印迹分析, 均证明大鼠乳鼠心肌细胞能够表达 EPOR 蛋白, 提示在心肌细胞中 EPO—EPOR 的通路是存在的, EPO 可能通过直接作用于心肌细胞的 EPOR 而产生心肌保护作用。Parsa 等 (2003) 在以 H₂O₂ 及缺氧复氧损伤心肌细胞后, 观察到 RhuEPO 明显抑制细胞凋亡, 促进其存活, 在对大鼠缺血再灌注损伤心肌梗死模型的研究中发现, EPO 能够明显减少心肌梗死面积, 促进心功能恢复。在 Tramontano 等 (2003) 的研究中发现, EPO 心肌保护作用可能与 PI3K/AKT 通路的激活有关, 该通路参与细胞抗凋亡效应, 但研究表明 EPO 作用于细胞后启动复

杂的细胞内信号网络,因此,仍需要进一步的研究以阐明 EPO 心肌保护作用的相关信号机制。

3.3 EPO 在心血管系统中的不良反应

EPO 在心血管系统中的主要不良反应为促进血栓形成及增加高血压危险。EPO 治疗使房室分流模型形成的血栓血小板含量增加近 3 倍,这一现象在 EPO 治疗停止后消失。EPO 治疗增加血栓形成危险可能与多种机制有关 (Tang et al., 1998), 主要包括红细胞增多、凝血因子激活、血小板聚集增强、抗凝蛋白 S 和抗凝蛋白 C 下调等。然而, Christensson 等 (2001) 和 Marchi 等 (1997) 却报道了相反的结果, 他们的研究表明 EPO 治疗并没有明显激活凝血因子及增加血栓形成的危险, 因此, EPO 长期应用对血栓形成的影响还有待进一步观察和研究。高血压是 EPO 治疗后的又一潜在的不良反应, 但在给予适当治疗后很少会出现中风、癫痫等严重后果。研究发现低血压患者在开始 RhuEPO 治疗后, 血压可能升高 10%。接受血液透析的患者在 RhuEPO 治疗后 2 周直到 4 个月会出现血压升高, 在有高血压病史的透析患者中尤为常见。目前推测 EPO 治疗促进血压升高的机制可能为: 使血液黏滞度升高、贫血纠正后的血管反应性增强、儿茶酚胺释放、肾素血管紧张素系统激活、血管内皮细胞合成 ET-1 增加、EPO 使 VSMC 的胞质钙水平升高直接促进血管收缩等。

4 高原鼢鼠对高原地下低氧环境的适应特征

高原鼢鼠 (*Myospalax baileyi*) 隶属于啮齿目 (Rodentia)、仓鼠科 (Cricetidae)、鼢鼠属 (*Myospalax*), 为青藏高原特有物种, 其分布仅见于高原地区。在甘肃河西走廊以南的祁连山地、甘南高原、青海高原以及四川西北部的农田、草甸和草原 (海拔 2800~4200 m) 均有分布 (图 6-2)。

高原鼢鼠是一种世居高海拔地区的地下鼠, 其洞道内部含氧量比同地区大气中低 20% (王祖望等, 1979), 它对这种缺氧环境具有很强的适应能力。高原鼢鼠血液中红细胞数为 $9.92 \pm 1.49 \times 10^{12}$ 个/L, 血红蛋白含量为 173 ± 13.4 g/L, 与相同海拔高度 (3250 m) 高原鼠兔 (红细胞数为 $5.46 \pm 0.23 \times 10^{12}$ 个/L, 血红蛋白含量为 96 ± 5 g/L) 相比, 都具有极显著差异 (魏登邦和马建宾, 2001); 高原鼢鼠心肌肌红蛋白含量为 741 ± 67 nmol/g, 骨骼肌肌红蛋白含量为 627 ± 27 nmol/g, 都明显高于其他高原动物 (魏登邦和马建宾, 2001); 高原鼢鼠心肌、骨筋肌、肝和肾中乳酸脱氢酶活性明显低于其他高原动物 (刘国富等, 1985)。高原鼢鼠在缺氧环境中通过代谢机制的调整, 合成和积累了一些特殊的抗缺氧物质。高原鼢鼠肌肉内脂溶性成分和醇溶性成分都有一定的抗缺氧效果,

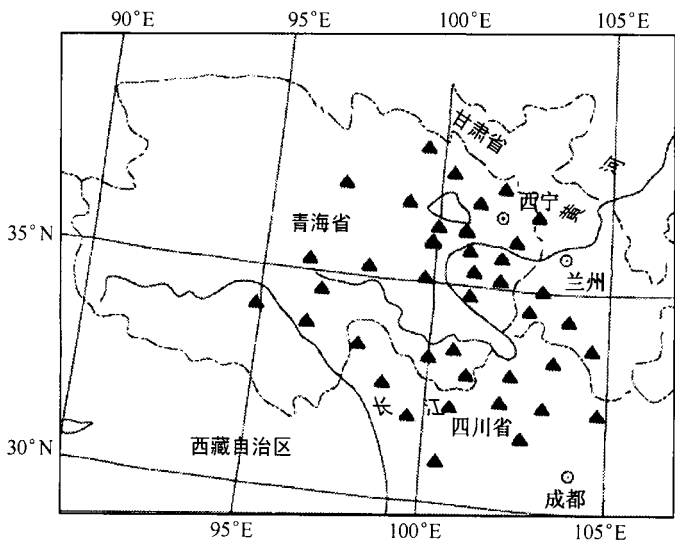


图 6-2 高原鼯鼠的地理分布 (Zhang et al., 2003)

水溶成分没有抗缺氧效果。但脂溶成分与醇溶成分相比，在相同浓度下，脂溶性成分抗缺氧效果更为突出，其抗缺氧的最适浓度为100 ml/L (魏登邦和张宝琛，2002)。

在适宜浓度 (10%) 时，高原鼯鼠肌肉超临界萃取物能显著延长小鼠在缺氧条件下的生存时间、提高小鼠血清中 SOD 和 GSH-PX 活性、降低血清中 LDH 活性和 MDA 的含量，具有明显的抗缺氧效果。这与高原鼯鼠肌肉脂溶性成分消除缺氧条件下增殖的自由基 (Leung&Liu, 2000)、提高抗氧化酶活性 (Pariza et al., 2000)、维持生物膜正常结构和功能有关 (唐云和顾倬云, 1999; 陈炳卿, 1998)。

第二节 高原鼯鼠 EPO cDNA 克隆及其序列分析

本研究主要采用 RT-PCR 方法克隆出高原鼯鼠 *epo* 基因 cDNA 序列并对其序列及分子结构进行分析。

1 样本采集与保存

2006 年 4~6 月，高原鼯鼠 (*Myospalax baileyi*) 采集于青海省东部地区 (图 6-3, 表 6-1)。采用地箭法捕捉高原鼯鼠以腹腔注射 20% 乌拉坦 0.6 ml/100 g 体重进行麻醉后，施与断颈处死后就地解剖，迅速将各组织器官投入液氮中，回实验室置 -70℃ 低温冰箱长期保存备用。

表 6-1 采样地及气候特征资料

编号	地点	N	E	数量	海拔/m	年均温度/℃	年均降水量/mm	植被类型
1	达日县德昂乡	33°23.158′	100°12.578′	2	4256	−1.3	552.4	草甸
2	达日县满掌乡	30°16.449′	100°27.235′	1	3963	−1.3	552.4	草甸
3	达日县满掌乡	30°16.796′	100°27.056′	1	3977	−1.3	552.4	草甸
4	四川阿坝	33°27.179′	101°55.255′	1	3474	3.3	712.0	草甸

注：气候数据来源于当地气象局。

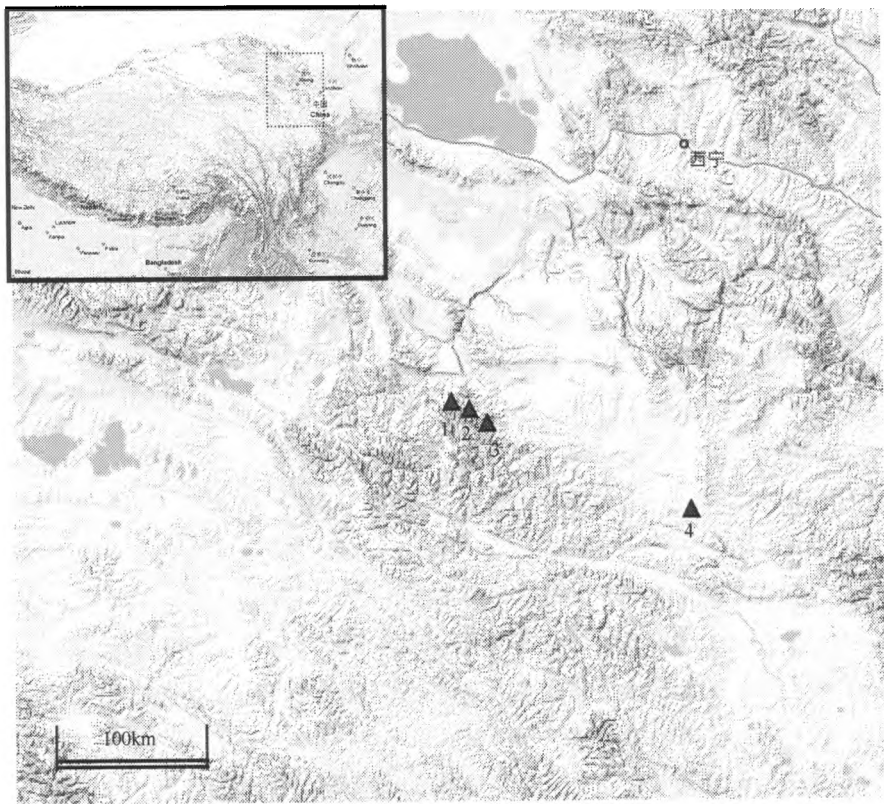


图 6-3 高原鼯鼠样本的野外采集地点

1. 达日县德昂乡；2、3. 达日县满掌乡；4. 四川阿坝

2 克隆策略

依据 GenBank 其他物种 EPO 基因 mRNA 序列，该基因 mRNA 约 580 bp 左右，种间变异较大。在基因克隆过程中，采用分段逐步扩增策略，首先获得高度保守的编码区部分序列，由此设计下游片段的上游引物，下游引物仍然由不同

物种的保守序列设计而来，这样所扩增出的片段之间形成较大的重叠区，以便于序列拼接。克隆策略与相应引物的位置如图 6-4 所示。

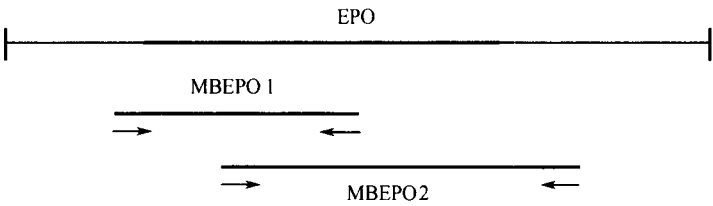


图 6-4 高原鼢鼠 EPO 基因 cDNA 克隆策略

3 引物设计

将 NCBI 中 GenBank 数据库查到的大鼠、小鼠、鼯形鼠、人、兔的 EPO cDNA 全序列输入到 CLISTAL X (1.81) 软件中，同源序列比对，在保守区利用 Primer Premier 5.0 软件设计引物。引物由上海生工生物工程公司合成，工作浓度为 10 μmol/L (表 6-2)。

表 6-2 高原鼢鼠 EPO cDNA 克隆引物

克隆序列名称	PCR 产物大小	引物名称	引物组成 (5′—3′)
MBEPO 1	395 bp	EPO1f	CAC GCC TCA TTT GCG ACA GT
		EPO1r	TGT GAG TGT TCG GAG TGG AGC
MBEPO 2	582 bp	EPO2f	GAG ATG GGG GTG CCC GAA CG
		EPO2r	GTC ACC TGT CCC CTC TCC TG

4 序列分析

利用 BLAST 分别检索分段克隆的序列，经确认为 EPO 序列后，将片段间交叉重叠处拼接，得到长 589 bp 的序列 (图 6-5)。该序列已递交至 GenBank 中，接受号为 1021725。

高原鼢鼠 EPO mRNA 全长为 579 bp，起始密码子为 ATG，终止密码子为 TGA，存在 2 处 SNP 位点，分别为 36M-A/G 和 168M-C/A。对编码区序列进行 BLAST 检索表明，高原鼢鼠 EPO mRNA 与人 (NM_000799) 的序列同源性为 81%；与小鼠 (NM_007942)、大鼠 (NM_017001)、根田鼠 (DQ658370) 的则均为 85%；而与同为地下鼠的鼯形鼠四个种，*Spalax golani* (AJ715792)、*Spalax carmeli* (AJ715793)、*Spalax judaei* (AJ715794) *Spalax galili* (AJ715795) 的序列同源性均高达 95%。

														ATT	GAG
7	ATG	GGG	GTG	CCC	GAA	CGT	CCC	ACC	CTG	CGG	CTC	TCG	GTG	ACC	TTT
1	Met	Gly	Val	Pro	Glu	Arg	Pro	Thr	Leu	Arg	Leu	Ser	Val	Thr	Phe
信号肽(1-26)															
52	CTA	CTG	CTT	TCT	CTG	GGC	CTC	CCA	GTC	CTC	GGT	GCG	CCC	CCA	CGC
16	Leu	Leu	Leu	Ser	Leu	Gly	Leu	Pro	Val	Leu	Gly	Ala	Pro	Pro	Arg
97	CTC	ATC	TGT	GAC	AGC	CGA	GTT	TTG	GAG	AGG	TAC	ATC	CTG	GAG	GCC
31	Leu	Ile	Cys	Asp	Ser	Arg	Val	Leu	Glu	Arg	Tyr	Ile	Leu	Glu	Ala
Erythropoietin/thrombopoietin signature(28-55)															
142	AAA	GAA	GCA	GAG	AAT	ACC	ACG	ATG	GGC	TGT	GCC	GAA	GGT	CCC	AGA
46	Lys	Glu	Ala	Glu	Asn	Thr	Thr	Met	Gly	Cys	Ala	Glu	Gly	Pro	Arg
N-glycosylation site(50-53)															
187	TTC	AGT	GAG	AAT	TTC	ACA	GTC	CCA	GAC	ACC	AAA	GTC	AAC	TTC	TAT
61	Phe	Ser	Glu	Asn	Phe	Thr	Val	Pro	Asp	Thr	Lys	Val	Asn	Phe	Tyr
N-glycosylation site(64-67) CK-2(66-69)															
232	GCC	TGG	AAG	ACA	ATG	GAG	GTG	GAA	GAA	CAG	GCT	GTA	GAG	GTC	TGG
76	Ala	Trp	Lys	Thr	Met	Glu	Val	Glu	Glu	Gln	Ala	Val	Glu	Val	Trp
277	CAA	GGC	CTG	TCC	CTG	CTA	TTC	GAA	GCC	ATC	CTG	AGG	GCC	CAG	GCT
91	Gln	Gly	Leu	Ser	Leu	Leu	Phe	Glu	Ala	Ile	Leu	Arg	Ala	Gln	Ala
322	CTG	CTA	GCC	AAT	TCC	TCC	CAA	CCA	TCA	GAG	ATG	TTA	CAA	CTG	CAT
106	Leu	Leu	Ala	Asn	Ser	Ser	Gln	Pro	Ser	Glu	Met	Leu	Gln	Leu	His
N-glycosylation site(109-112)															
367	GTA	GAC	AAA	GCC	ATC	AGT	GGC	CTT	CGA	AGC	CTT	ACC	TCC	TTG	CTC
121	Val	Asp	Lys	Ala	Ile	Ser	Gly	Leu	Arg	Ser	Leu	Thr	Ser	Leu	Leu
412	CGG	GTG	CTG	GGA	GCC	CAG	AAG	GAA	GCC	ATA	TCG	CCT	CCA	GAC	TCC
136	Arg	Val	Leu	Gly	Ala	Gln	Lys	Glu	Ala	Ile	Ser	Pro	Pro	Asp	Ser
CK-2(146-149)															
457	ACC	CCA	CCG	GCT	CCA	CTT	CGA	ACA	TTC	ACA	GTG	GAC	ACT	TTC	TGT
151	Thr	Pro	Pro	Ala	Pro	Leu	Arg	Thr	Phe	Thr	Val	Asp	Thr	Phe	Cys
502	AAA	CTC	TTC	CGA	ATC	TAC	TCC	AAT	TTC	CTC	CGG	GGA	AAG	CTG	AAG
166	Lys	Leu	Phe	Arg	Ile	Tyr	Ser	Asn	Phe	Leu	Arg	Gly	Lys	Leu	Lys
547	CTG	TAC	ACA	GGC	GAG	GCC	TGC	AGG	AGA	GGG	GAC	AGG	TGA	CAA	T
181	Leu	Tyr	Thr	Gly	Glu	Ala	Cys	Arg	Arg	Gly	Asp	Arg	*		
CAS(189-191)															

图 6-5 高原鼯鼠 EPO 的 mRNA 序列及其推导的氨基酸序列

灰色底纹表示被预测的功能基序；加框部分为 N-糖基化位点 (N-glycosylation site)；下划线处为起始密码子 ATG 和终止密码子 TGA。图中基序简称如下：CK-2 表示酪蛋白激酶 II 磷酸化作用位点；CAS 表示细胞附着序列；单核苷酸多态性 (SNP) 分布位点：36 M- A/G；168 M- C/A

由序列推导的蛋白质分析显示，高原鼯鼠 EPO 由 192 个氨基酸组成，在其 N 端含有一个 26 个氨基酸组成的信号肽序列，位于第 26 位 Gly 和第 27 位的 Ala 之间 ($P=0.958$)，信号肽将在 EPO 分泌过程中被切除，形成一个 166 个氨基酸残基的糖蛋白 (图 6-6，表 6-3)。蛋白质氨基酸序列的多重比对结果显示，成熟高原鼯鼠 EPO 与上述比对物种的同源性分别为，人，81%、大鼠，85%、小鼠和根田鼠，86%、*Spalax*，91% (图 6-7)。

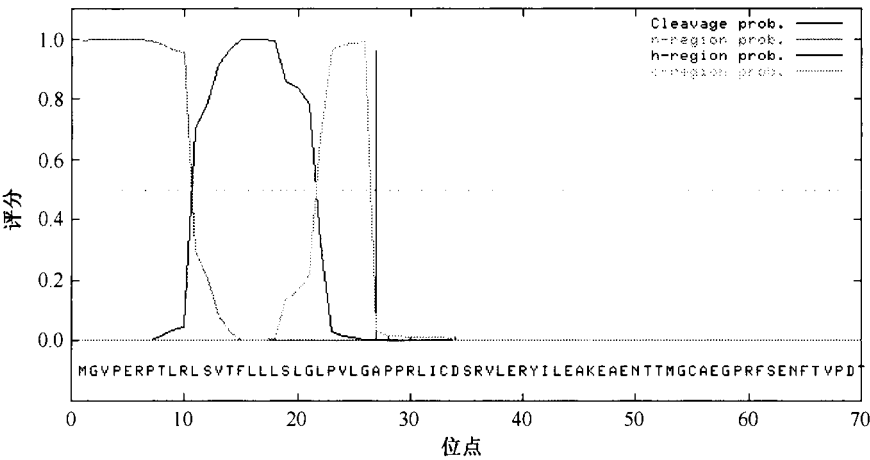


图 6-6 高原鼯鼠 EPO 蛋白质信号肽预测结果 (另见彩版)

表 6-3 高原鼯鼠信号肽预测分析结果

变量	位点	预测值	截断值	信号肽
max. C	27	0.871	0.32	yes
max. Y	27	0.849	0.33	yes
max. S	19	0.991	0.87	yes
mean S	1-26	0.862	0.48	yes
D	1-26	0.855	0.43	yes

cleavage site between pos. 26 and 27; VLG-AP ($P=0.958$)

预测的功能基序结果表明，高原鼯鼠 EPO 序列含有 3 个 N-糖基化位点、2 个酪蛋白激酶 II 磷酸化作用位点、1 个促红细胞生成素/促血小板生成素结构和 1 个细胞附着序列 (图 6-5)。

高原鼯鼠的 EPO 三维分子结构与人 EPO 晶体结构高度一致，参照 SWISS-MOELD server 中所提供的人 EPO 三维分子模型 (编号: 1BUY)，预测出高原鼯鼠 EPO 三维结构 (图 6-8)。高原鼯鼠 EPO 为球形分子，由 4 个反向平行的 α 螺旋和两长两短的环状结构组成。

<i>Mus musculus</i>	MGVPERPTLL LLSLLLLPL GLPVLCAAPR LICDSRVLER YILEAKEAEN	50
<i>Rattus norvegicus</i>		50
<i>Microtus oeconomus</i>	L.....G.....R.....	50
<i>Spalax judaei</i>	...DCLA.P..VTF..LS.....G.....	50
<i>Spalax carmeli</i>	...DCLA.P..VTF..LS.....G.....	50
<i>Spalax galili</i>	...DCLA.P..VTF..LS.....G.....	50
<i>Spalax golani</i>	...DCLA.P..VTF..LS.....G.....	50
<i>Myospalax baileyi</i>	R..SVTF..LS.....G.....	50
<i>Homo sapiens</i>	...H.C.A.W.....SL.....G.....L.....	50
<i>Mus musculus</i>	VTMGCAEGPR LSENITVPDT KVNFYAWKRM EVEEQAEVW QGLSLIASEAI	100
<i>Rattus norvegicus</i>	K.....V.....	100
<i>Microtus oeconomus</i>	N.....Q.....V.....	100
<i>Spalax judaei</i>	I.....FN..F.....T..G.....V.....F...	100
<i>Spalax carmeli</i>	I.....FN..F.....T..G.....V.....F...	100
<i>Spalax galili</i>	I.....FN..F.....T..G.....V.....F...	100
<i>Spalax golani</i>	I.....FN..F.....T..G.....V.....F...	100
<i>Myospalax baileyi</i>	T.....F...F.....T.....V.....F...	100
<i>Homo sapiens</i>	I.T.....HCS..N.....GQ..V.....A.....V	100
<i>Mus musculus</i>	LQAQALLANS SQPPETLQLH IDKATSGLRSLTSLRLVIGA QKEIMSPDDT	150
<i>Rattus norvegicus</i>	Q.....S.....A	150
<i>Microtus oeconomus</i>	.RG.....SGM.....SI.....A	150
<i>Spalax judaei</i>	.R...V.....S.M....V.....A....AI....	150
<i>Spalax carmeli</i>	.R...V.....S.M....V.....A....AI....	150
<i>Spalax galili</i>	.R...V.....S.M....V.....A....AI....	150
<i>Spalax golani</i>	V.....S.M....V.....A....AI....	150
<i>Myospalax baileyi</i>	.R.....S.M....V.....AI....S	150
<i>Homo sapiens</i>	.RG.....V....W.P....V...V.....T...A....AI....A	150
<i>Mus musculus</i>	TPPAPLRLTL VDTECKLFRV YANFLRGKLGK LYTGEVCRRG DR	192
<i>Rattus norvegicus</i>	.QA.....A.....S.....A.....	192
<i>Microtus oeconomus</i>	M..EN.....S.....A.....	192
<i>Spalax judaei</i>	.QV1...RF.....I..S.....A.....	192
<i>Spalax carmeli</i>	.QV1...RF.....I..S.....A.....	192
<i>Spalax galili</i>	.QV1...RF.....I..S.....A.....	192
<i>Spalax golani</i>	.QV1...RF.....I..S.....A.....	192
<i>Myospalax baileyi</i>	F.....I..S.....A.....	192
<i>Homosapiens</i>	ASA....I..A...R.....S.....A..T...	192

图 6-7 高原鼢鼠 EPO 推导氨基酸序列的多重序列比对图

右侧数字表示氨基酸位置, 其他物种 EPO 在 GenBank 中的接受号分别为: *Homo sapiens*, NP_000790; *Rattus norvegicus*, NP_058697; *Mus musculus*, NP_031968; *Spalax galili*, Q6H8S9; *Spalax golani*, Q6H8T2; *Microtus oeconomus* ABG47336; *Spalax carmeli*, CAG29398; *Spalax judaei*, CAG29399

5 结论

通过对高原鼢鼠 *epo* 基因 cDNA 克隆及序列分析, 得出如下结论。

(1) 高原鼢鼠 *epo* 基因 cDNA 编码区长 576 bp, 编码 192 个氨基酸组成的蛋白质, 其 N 端含有 26 个氨基酸组成的信号肽, 成熟分泌蛋白为 166 个氨基酸

组成。

(2) 高原鼯鼠 EPO 核苷酸序列与人同源率为 81%，与大鼠、小鼠、根田鼠的则为 85%；而与同为地下鼠的鼯形鼠 4 个种，*Spalax golani*、*S. carmeli*、*S. judaei*、*S. galili* 的序列同源性均高达 95%。

(3) 推导出的氨基酸序列比对发现，高原鼯鼠与鼯形鼠属具有极为相似的生活方式，为终生地下生活，二者 EPO 相似度极高，趋同进化位点为 10 个。



图 6-8 高原鼯鼠 EPO 三级结构模拟图

第三节 高原地下生活对高原鼯鼠 EPO 蛋白的适应性功能进化研究

1 样本采集与保存

样本采集及样本保存同本章第二节。

2 EPO 基因序列描述分析

高原鼯鼠 EPO 由 192 个氨基酸组成，N 端含有一个 26 个氨基酸组成的信号肽，位于 26 位 Gly 和 27 位的 Ala 之间 ($P=0.958$)。信号肽将在 EPO 分泌过程中被切除，形成一个 166 个氨基酸残基的糖蛋白，序列含有 3 个 N-糖基化位点、2 个酪蛋白激酶 II 磷酸化作用位点、1 个促红细胞生成素/促血小板生成素结构和 1 个细胞附着序列。高原鼯鼠和鼯形鼠属的 4 个物种均终生地下生活，EPO 序列中含有相同数量的 N-糖基化位点 (图 6-9)。

3 EPO 基因进化分析

由 ModelTest 3.7 和 PAUPb10 软件计算得出最佳进化分析模型为 HKY+G 模型，参数设置为：碱基频率，腺嘌呤 (A) 为 0.1963，胞嘧啶 (C) 为 0.3201，鸟嘌呤 (G) 为 0.2779，胸腺嘧啶 (T) 为 0.2057；转换/颠换比值 (ti/tv) 为 2.2473；估计的 γ 分布参数为 0.7334。

为揭示 EPO 在不同系谱动物中的进化关系，我们选取 8 种啮齿类动物，利用 PHYLIP 软件分别以核苷酸和氨基酸序列采用距离法、最大似然法和最大简约法构建系统进化树。由于三种方法生成相似的拓扑结构，这里我们只显示了以

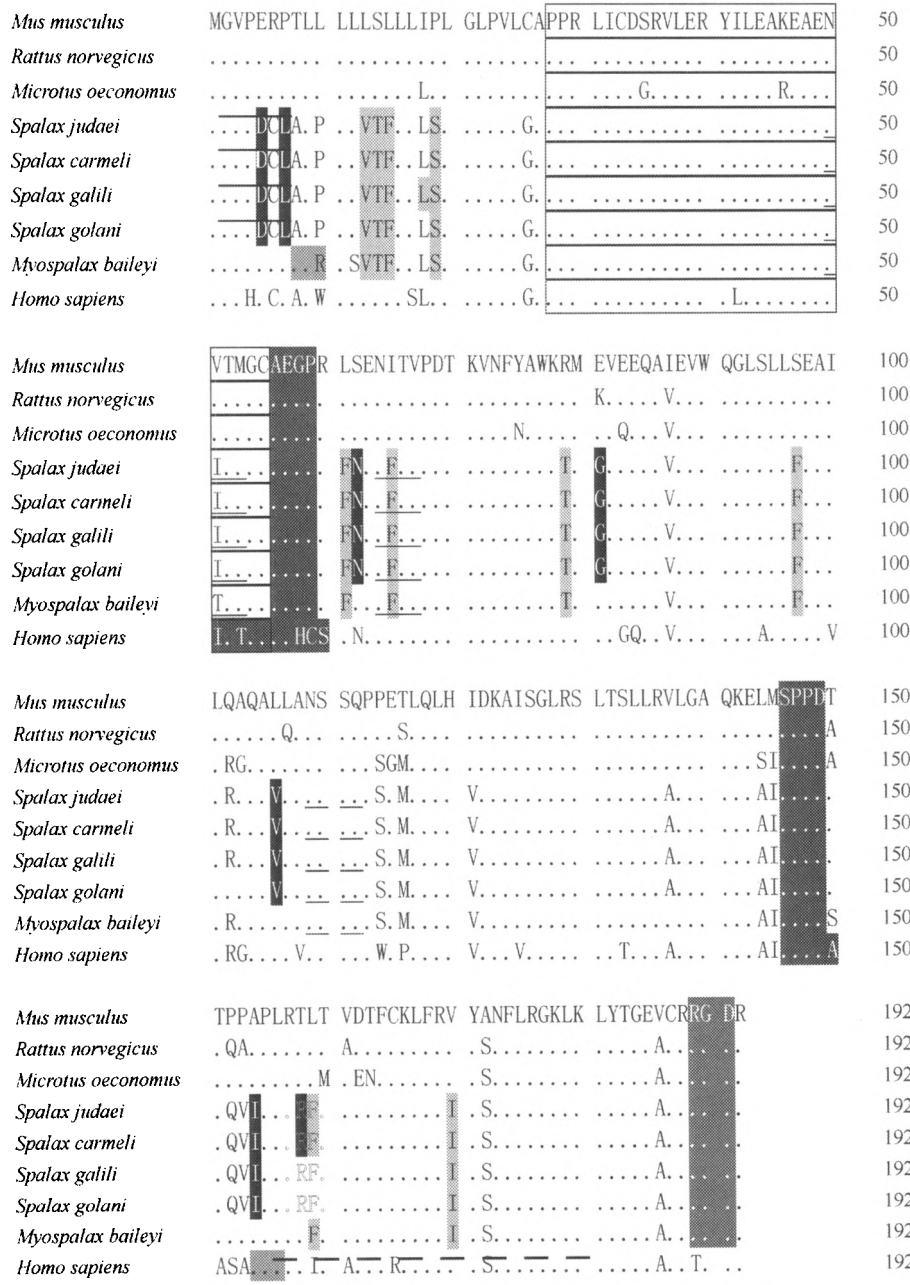


图 6-9 高原鼫鼠 EPO 基因推导的氨基酸序列比对图 (另见彩版)

下划线表示 N-糖基化位点; ■代表酪氨酸激酶磷酸位点 II; ■代表蛋白激酶 C 磷酸位点; ■代表细胞黏附序列; 加框代表 EPO/TPO 信号; 黑体代表 cAMP 和 cGMP 依赖的蛋白激酶磷酸化位点; 上划线代表 N-酰基化位点; 虚线代表双向核定位信号谱; ■代表 zokor 与 SP 的趋同进化的位点; ■为 SP 特有的位点

核苷酸序列构建的最大似然树（图 6-10）。

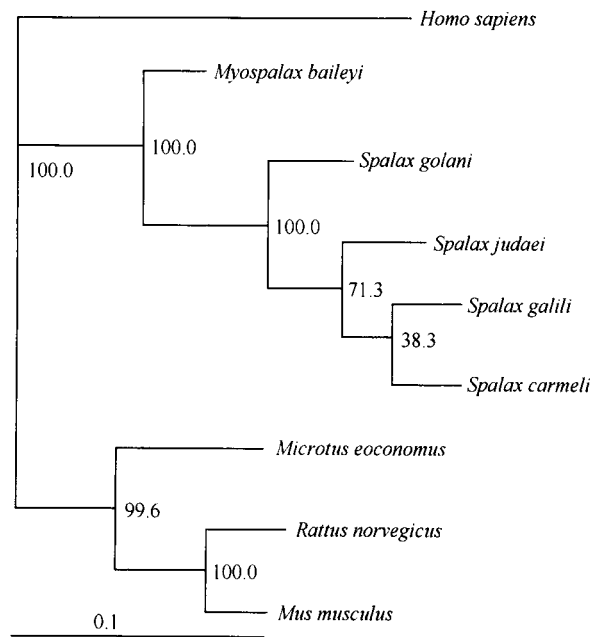


图 6-10 EPO 最大似然进化树

4 选择压力分析

为比较高原鼢鼠与鼹形鼠（SP）属种变异位点的性质，我们采用 PAML 软件中的 CODEML 程序分别分析了高原鼢鼠和 SP 中正向选择作用于 EPO 基因的可能性。核苷酸的最大似然系统进化树经修饰后用于所有 CODEML 分析。分别将高原鼢鼠支系和 SP 支系作为 foreground branch，而其他物种支系作为 backgroud branch 进行适应性进化分析（表 6-4、表 6-5、表 6-6 和表 6-7）。

表 6-4 高原鼢鼠 *epo* 基因进化分析参数

模型	参数估计值	ℓ	正向选择位点
M0; one-ratio	$\omega=0.16953$	-1348.915634	none
branch-specific model			
two-ratio	$\omega_0=0.1436, \omega_1=0.1898$	-1348.681090	
site-specific model			
M1a; nearly neutral(K=2)	$p_0=0.94054, (p_1=0.05946)$	-1348.291319	not allowed
M2a; positive selection(K=3)	$p_0=0.94054, p_1=0.02802$	-1348.291319	116 T($p=0.538$)
	$(p_2=0.03144)\omega_2=1.0000$		144 L($p=0.553$)

续表

模型	参数估计值	ℓ	正向选择位点
M3; discrete(K=3)	$p_0=0.586\ 02, p_1=0.391\ 65(p_2=0.022\ 33), \omega_1=0.046\ 55, \omega_2=0.371\ 01, \omega_3=0.371\ 01$	-1348.166 631	none
M7; beta	$p=0.729\ 97, q=3.233\ 49$	-1348.176 039	none
M8; beta& ω	$p_0=1.0000, p=0.729\ 97, q=3.23354(p_1=0.0000), \omega=1.0000$	-1348.176 040	116 T($p=0.559$) 144 L($p=0.583$)
branch-site model			
model A	$p_0=0.730\ 56, p_1=0.046\ 19(p_2+p_3=0.223\ 25), \omega_0=0.133\ 57, \omega_1=1.0000, \omega_3=2.737\ 84$	-1348.291 320	none
mdel B	$p_0=0.039\ 99, p_1=0.028\ 18(p_2+p_3=0.931\ 84), \omega_0=0.047\ 05, \omega_1=0.378\ 03, \omega_3=0.000\ 00$	-1348.161 553	none

表 6-5 高原鼯鼠 EPO 进化分析似然比检验统计值

	$2\Delta\ell$	自由度	P 值
LRT of ω at branch B			
one ratio vs. two ratio	0.469 088	1	0.04934
LRTs of variable ω values among sites			
M1a vs. M2a	0	2	1
M7 vs. M8	0.000 05	2	1
one ratio vs. M3	1.498 006	2	0.04728
LRTs of variable ω values along branch B(Fig. 2)			
M1a vs. model A	0.000 002	2	1
M3 vs. model B	0.010 156	2	0.09949

表 6-6 鼯形鼠属 EPO 基因进化分析参数

模型	参数估计值	ℓ	正向选择位点
M0; one-ratio	$\omega=0.2125$	-1422.290 221	none
branch-specific model			
two-ratio	$\omega_0=0.1880, \omega_1=0.3113$	-1422.001 776	
site-specific model			
M1a; nearly neutral (K=2)	$p_0=0.86385, (p_1=0.13615)$	-1418.977 154	not allowed

续表			
模型	参数估计值	ℓ	正向选择位点
M2a; positive selection (K=3)	$p_0 = 0.92100, p_1 = 0.00000$ $(p_2 = 0.07900)\omega_2 = 1.0000$	-1418.899 555	102 Q,(0.530)116 T(0.553),144 L(,0.581)152 P(0.708)
M3; discrete(K=3)	$p_0 = 0.31184, p_1 = 0.60916$ $(p_2 = 0.07900)\omega_1 = 0.14457$ $\omega_2 = 0.14457, \omega_3 = 1.50496$	-1418.899 555	81 E(0.594),102Q(0.809), 116T(0.864),144 L(0.850), 152 P(0.757),153 P(0.963), 154 A(0.727)
M7; beta	$p = 0.38457, q = 1.22245$	-1419.259 019	none
M8; beta& ω	$p_0 = 0.92368, p = 17.05841,$ $q = 99.00000(p_1 = 0.07632),$ $\omega = 1.52815$	-1418.902 584	102 Q (0.543), 116 T(0.545),144 L(0.590), 153 P(0.704)
branch-site model			
model A	$p_0 = 0.79261, p_1 = 0.11870$ $(p_2 + p_3 = 0.08869), \omega_0 =$ 0.10724, $\omega_1 = 1.0000,$ $\omega_3 = 1.00000$	-1418.837 809	none
model B	$p_0 = 0.68274, p_1 = 0.06575$ $(p_2 + p_3 = 0.2515), \omega_0 =$ 0.11963 $\omega_1 = 1.52426,$ $\omega_3 = 0.31593$	-1418.733 355	81 E (0.519), 102 Q(0.738),116 T(0.579), 144 L (0.786), 152 P(0.636),153 P(0.910), 154 A(0.572)

表 6-7 鼯形鼠属 EPO 进化分析似然比检验统计值

	$2\Delta\ell$	自由度	P 值
LRT of ω at branch B (Fig. 2)			
one ratio vs. two ratio	0.576 89	1	0.044 75
LRTs of variable ω values among sites			
M1a vs. M2a	0.1551 98	2	0.092 53
M7 vs. M8	0.712 87	2	0.070 02
one ratio vs. M3	6.781 332	2	0.035 69
LRTs of variable ω values along branch B (Fig. 2)			
M1a vs. model A	0.278 69	2	0.086 99
M3 vs. model B	0.3324	2	0.084 69

EPO 作为对低氧环境压力敏感反应蛋白，受动物生活史特征影响。在对高原鼯鼠选择压力的分析中，branch-specific 的分析模型中，one-ratio 模型显示：

序列中所有的位点均含有相同的 ω 值为 0.169 53, 而 two-ratio 模型显示: 高原鼯鼠支系的 ω 值为 0.1898, 而其他背景支系的 ω 为 0.1436。one-ratio 模型与 two-ratio 模型两者似然比检验统计参数 ($2\Delta\ell$) 为 0.469 088, $P=0.049\ 34$, 因此高原鼯鼠支系的 ω 值与其他支系相比差异显著。在 site-specific 分析模型下, M3 模型显著性好于 one-ratio 模型, 其 $2\Delta\ell$ 为 1.498 006, $P=0.047\ 28$; M8 模型确定了两个正向选择位点 116 T 和 144 L。M7 模型与 M8 模型不具有显著性差异, $2\Delta\ell$ 值为 0.000 05, $P=1$ 。在 branch-site 分析模型下, A 模型和 B 模型均没有计算出明显的正向选择位点。而本次分析结果的 site-specific 模型中的 M8 模型确定了发生在高原鼯鼠上的 2 个正向选择位点: 116 T 和 144 L。

对鼯形鼠属选择压力进行分析, 在 branch-specific 分析模型中, one-ratio 模型显示: 序列中所有的位点均含有相同的 ω 值为 0.2125, 而 two-ratio 模型显示: SP 支系的 ω 值为 0.3113, 而其他背景支系的 ω 为 0.1880。one-ratio 模型与 two-ratio 模型两者似然比检验统计参数 ($2\Delta\ell$) 为 0.576 89, $P=0.044\ 75$, 因此鼯形鼠属支系的 ω 值与其他支系相比具有显著性差异。在 site-specific 分析模型下, M3 离散模型估计的 ω 值为 1.504 96, 同时确定了 7 个正向选择位点, 81 E、102Q、116T、144 L、152 P、153 P、154 A。M3 模型显著性好于 one-ratio 模型, 其 $2\Delta\ell$ 为 6.781332, $P=0.033\ 69$; M8 模型 ω 估计值为 1.528 15, 同时确定了 4 个与 M3 模型相同的正向选择位点 102 Q、116 T、144 L、153 P。M7 模型与 M8 模型不具有显著性差异, $2\Delta\ell$ 值为 0.712 87, $P=0.070\ 02$ 。在 branch-site 分析模型下, model B 的 ω 估计值为 1.524 26, 确定了 7 个正向选择位点 81 E、102 Q、116 T、144 L、152 P、153 P、154 A。因此在本次分析中我们确定了发生在鼯形鼠属中的 7 个正向选择位点, 与高原鼯鼠相比, 发现两者有两个相同的位点发生了正向选择, 即 116 T 和 144 L。

低氧环境压力驱动地下生活物种高原鼯鼠和鼯形鼠 EPO 蛋白发生了适应性功能进化, 从而提高其在压力环境下的生存适合度。高原鼯鼠中, 鼯形鼠地下生活的进化时间较短, EPO 正向选择位点也较少, 但较其他非地下生活物种高。可能地下生活进化时间对 EPO 正向选择具有重要的影响。

5 结论

(1) EPO 作为对低氧环境压力敏感反应蛋白, 受动物生活史特征影响。

(2) 低氧环境压力驱动地下生活物种高原鼯鼠和鼯形鼠 EPO 蛋白发生了适应性功能进化, 从而提高其在压力环境下生存的适合度。

(3) 高原鼯鼠地下生活的进化时间较鼯形鼠短, EPO 正向选择位点也较少, 但较其他非地下生活物种高, 说明地下生活时间对 EPO 正向选择具有重要影响。

第四节 高原鼯鼠 EPO mRNA 在不同组织间和海拔表达特征

1 标本采集与保存

样本采集与保存方法同本章第二节。采样地当地气候特征资源见表 6-8，样本野外采样地点见图 6-11。

表 6-8 采样地及气候特征资料

编号	地点	N	E	数量	海拔/m	年均温度/℃	年均降水量/mm	植被类型
1	达日县德昂乡	33°23.158′	100°12.578′	4	4256	−1.3	552.4	M
2	达日县满掌乡	30°16.449′	100°27.235′	5	3963	−1.3	552.4	M
3	班玛县	32°51.257′	100°49.330′	1	3464	4.2	638.4	Sh+M
4	达日县满掌乡	30°16.796′	100°27.056′	4	3977	−1.3	552.4	M
5	久治县	33°18.175′	100°52.467′	5	4268	0.1	764.6	M
6	四川阿坝	33°27.179′	101°55.255′	5	3474	3.3	712.0	M
7	河南县赛尔龙乡	34°31.089′	102°01.236′	4	3386	11.9	606.3	St
8	河南县	34°43.293′	101°40.946′	7	3591	11.9	606.3	Sh+M
9	贵南县	35°16.543′	101°19.789′	1	3641	2.1	398.0	M
10	民和县郭家山	36°05.794′	102°43.849′	6	2538	8.0	500.0	Fl+M
11	民和县古鄯镇	36°07.263′	102°43.019′	8	2492	8.0	500.0	Ar+M
12	化隆县	36°05.023′	102°14.003′	8	2996	2.2	470.0	Fl+M
13	化隆县地摊村	36°11.175′	102°17.319′	8	3153	2.2	470.0	Fl
14	大通县向华	37°06.849′	101°47.773′	5	2889	1.3	589.6	Fl+M
15	大通县向华	37°11.521′	101°45.914′	8	3215	1.3	589.6	Sh+M
16	大通县东峡镇	37°02.731′	101°48.310′	9	2745	1.3	589.6	Fl+Ar

注：Al=海拔（m）；Tm=年均温度（℃）；Rn=年均降水量（mm）；气候数据来源于当地气象局。
Vg=植被类型；M=草甸；Sh=灌丛；St草原；Fl=农田；Ar=乔木。

2 荧光染料掺入法

SYBR green 是一种结合于所有 dsDNA 双螺旋小沟区域的具有绿色激发波长的染料。在 PCR 反应体系中，加入过量 SYBR 荧光染料，SYBR 荧光染料特异性地掺入 DNA 双链后，发射荧光信号，而不掺入链中的 SYBR 染料分子不会发射任何荧光信号，从而保证荧光信号的增加与 PCR 产物的增加完全同步，可

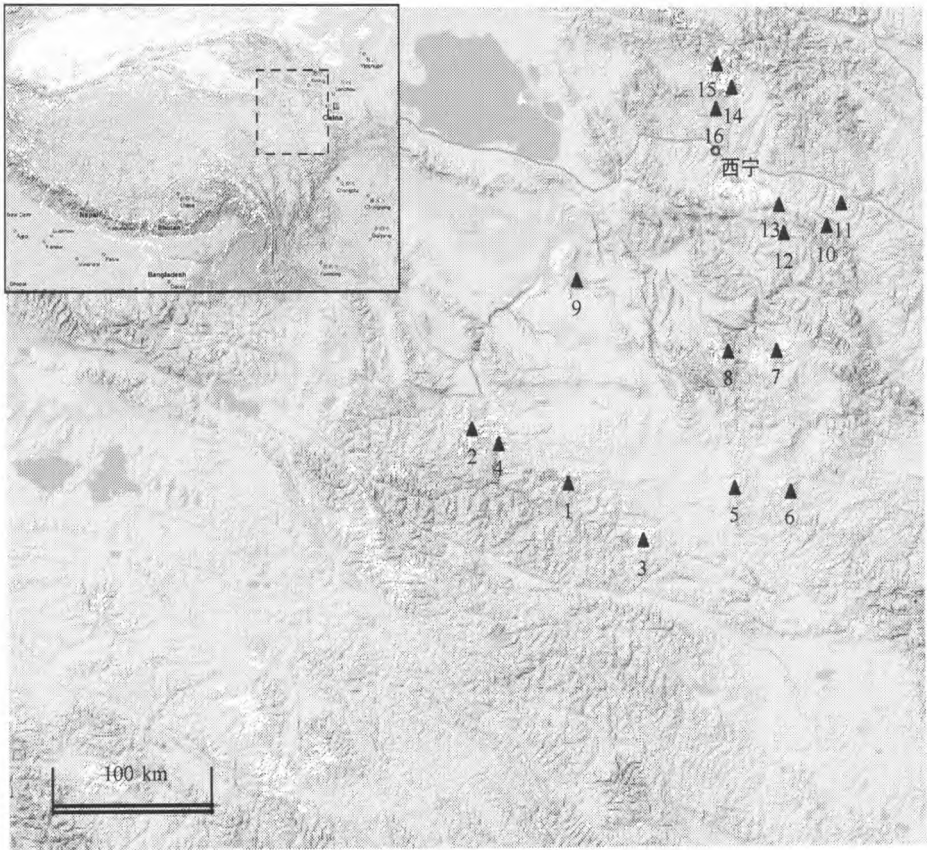


图 6-11 高原麝鼠样本的野外采集地点
本图中数字与表 6-8 所表示的地区相对应

以根据荧光信号检测出 PCR 体系存在的双链 DNA 数量。其与双链 DNA 结合后，可使荧光效果增强到 1000 倍以上。由于它能与所有的双链 DNA 相结合，所以对不同模板不需特别定制不同的特异性探针，通用性较好。

3 引物设计

引物设计方法同本章第二节。高原麝鼠 EPO 实时定量 PCR 引物序列参见表 6-9 和表 6-10。

表 6-9 高原麝鼠 EPO 实时定量 PCR 引物

目的基因	引物名称	引物类型	片段长度	引物组成 (5'—3')
EPO	EPOF	正向	106 bp	ACA ATG GAG GTG GAA GAA CAG G
	EPOR	反向		ATG GTT GGG AGG AAT TGG CT
β-actin	BAF	正向	105 bp	CTA AGG CCA ACC GTG AAA AGA T
	BAR	反向		GAC CAG AGG CAT ACA GGG ACA

表 6-10 高原鼯鼠 EPO 实时定量 PCR 产物序列

EPO				β-actin	
ACAATGGAGG	TGGAAGAACA	GGCTGTAGAG	GACCAGAGGC	TACAGGGACA	AGCACAGCCT
GTCTGGCAAG	GCCTGTCYCT	GCTATTGAA	GGATGGCTAC	GTACATAGCT	GGGGTGTGTA
GCCATCCTGA	GGGCCAGGC	TCTGCTAGCC	AGGTCTCAAA	CATGATCTGG	GTCATCTTTT
AATTCCTCCC	AACCAT		CACGGTTGGC	CTTAG	

4 高原鼯鼠 8 种组织中 EPO 相对表达量

采用 ΔCt ($Ct_{EPO}-Ct_{\beta actin}$) 方法计算高原鼯鼠 8 种组织 EPO 相对表达量 (图 6-12)。心脏 EPO mRNA 表达量最高 (14.19 ± 0.56), 肺 (11.33 ± 0.85)、脑 (10.47 ± 0.85) 和肾脏 (10.29 ± 0.69) 次之, 脾脏 (8.79 ± 0.68)、肝脏 (8.29 ± 1.05) 和骨骼肌 (7.20 ± 1.18) 的约为心脏的 50%, 白色脂肪组织 (-0.82 ± 1.20) 几乎不表达。

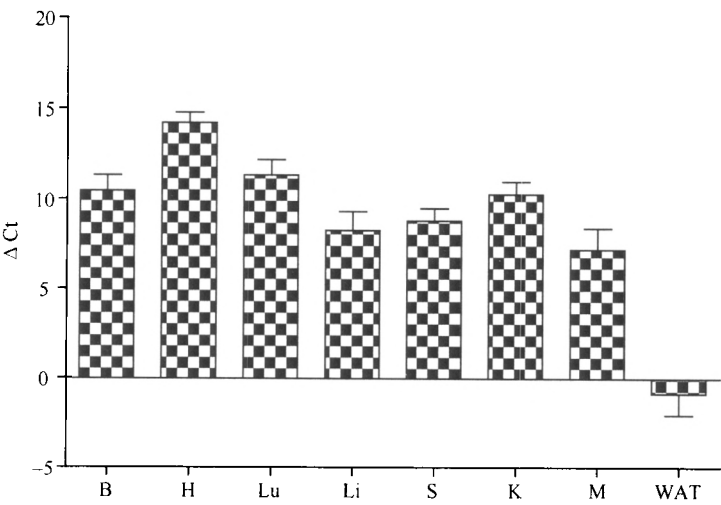


图 6-12 高原鼯鼠 8 种组织中 EPO 相对表达量

B=脑; H=心脏; Lu=肺; Li=肝脏; S=脾脏; K=肾脏; M=骨骼肌; WAT =白色脂肪组织

5 海拔对高原鼯鼠肝脏和肾脏 EPO mRNA 表达量的影响

高原鼯鼠肝脏和肾脏 EPO mRNA 表达量随海拔上升而增加 (图 6-13)。肝脏 EPO mRNA 表达量随海拔增加而增加 ($R^2=0.6260$, $F_{1.86}=144.00$, $P<0.001$; 图 6-13A), 肾脏亦具有相同的趋势 ($R^2=0.6136$, $F_{1.86}=144.00$, $P<0.001$; 图 6-13B)。

维持红血细胞体积是确保组织氧供应的基本特征 (Kendall, 2001)。早期对人类 EPO 分泌研究表明, 胚胎早期 EPO 由肝生成, 然后逐渐向肾转移, 出生后

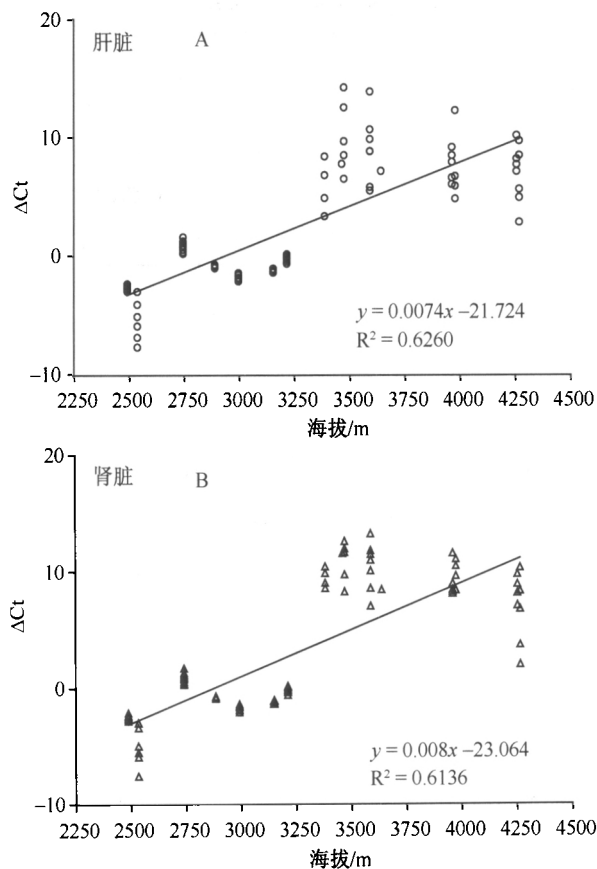


图 6-13 海拔对高原鼯鼠、肝脏和肾脏、*epo* 基因 mRNA 表达影响

A 为海拔对肝脏 *epo* 基因 mRNA 表达量影响；B 为海拔对肾脏 *epo* 基因 mRNA 表达量的影响

主要由肾小管间质细胞分泌，因此，大多数研究均采用肾脏作为测定 EPO 表达的目标组织 (Shams et al., 2004)。本研究采用荧光定量 RT-PCR 测定脑、心肌、肺、肝脏、脾脏、肾脏、骨骼肌及白色脂肪等 8 种组织中 EPO mRNA 表达。结果表明，除白色脂肪外，其他 7 种组织均有表达，但不同组织的表达量存在差异。心脏 EPO mRNA 表达量最高，肺、脑和肾脏次之，脾脏、肝脏和骨骼肌的约为心脏的 50%，白色脂肪组织几乎不表达。

心脏和肺是心血管系统和呼吸系统的重要器官，脑则既是低氧感受器官，也是调节器官，同时也最容易受到缺氧的伤害。由此可推论，这三种器官 EPO 表达量最高是高原鼯鼠对高海拔地区低氧的一种适应。脑 EPO 的产生和脑组织供血供氧情况密切相关。脑缺血时，局部会生成一种缺氧反应因子 (HIF-1)，HIF-1 进入细胞并到达核内与染色体上的缺氧反应元件 (hypoxia response element, HRE) 相结合，启动一系列基因的转录，包括葡萄糖转运蛋白、糖酵解酶系、血管内皮生长因子 (VEGF) 以及 EPO 伴随着 EPO 生成量的增加，缺血

半影区内神经细胞 EPOR 的表达也明显上调,进一步加强了 EPO 的作用效果(谢印芝等,2000)。

缺氧是诱导 EPO 表达的最直接因素,随着海拔升高,大气中氧分压不断降低,高原鼯鼠洞道中的氧气含量也随之降低,血液中氧的含量随之减少,促进了红细胞(RBC)数量、血红蛋白(Hb)含量、血细胞压积(HCT)的增加以满足机体氧的需要。因此,高原鼯鼠肝脏和肾脏 EPO mRNA 相对表达量均随海拔升高而增加,说明生活环境的缺氧水平是高原鼯鼠的 EPO 表达量直接影响因素。

6 结论

(1) 高原鼯鼠不同组织 EPO 基因 mRNA 相对表达量存在显著差异,心脏最高,白色脂肪组织几乎不表达。

(2) 高原鼯鼠肝脏和肾脏 EPO 基因 mRNA 相对表达量具有相同模式均随海拔升高而增加,这说明生活环境的缺氧水平是高原鼯鼠的 *epo* 表达量的直接影响因素。

牦牛是青藏高原上大型食草动物，在青藏高原的进化历史至少可追溯到二百万年前。牦牛经过长期的自然选择，在生理、生化和形态学上已获得了稳定的适应高原低氧的遗传学特征，但它对低氧适应的分子机制目前还不清楚。为了研究牦牛低氧适应的分子机制，我们首次克隆了牦牛 *hif-1 α* 基因的全长 cDNA 序列，并利用生物信息学方法对其序列进行分析。同时，利用 Northern 印迹、实时定量 PCR、Western 印迹等现在分子生物学方法检测了 HIF-1 α 在牦牛不同组织的表达。

第七章 家牦牛 HIF-1 α 基因的表达特征及其低氧适应意义

低氧是阻止动物生存的最重要的生态因子，在长期的进化过程中，高原土著动物形成了一套它们独特的机制来适应高原的缺氧环境。牦牛是青藏高原上的大型食草动物，它在青藏高原的进化历史至少可追溯到 200 万年前。牦牛经过长期的自然选择，在生理、生化和形态学上已获得了稳定的适应高原低氧环境的形态学上的生理、生化特征，如没有肺动脉高压和右心室肥厚、心肺发育良好、心肺指数高等，但它对低氧适应的分子机制目前还不清楚。HIF-1 α 是一个转录激活因子，主要调控组织和器官的氧的动态平衡，在低氧适应中起到核心调控作用，它调控众多的下游基因的表达使机体适应低氧。

本章主要介绍牦牛的低氧适应的生理特征并通过 HIF-1 α 的研究探讨青藏高原家牦牛低氧适应的分子机制。

第一节 牦牛低氧适应的生理特征

1 牦牛低氧适应的血液学特征

1.1 红细胞数目和血红蛋白含量特征

增多的红细胞数目及增加的血红蛋白含量是许多生活在高原的动物的血液学特征，以增强运载氧的能力。随着海拔的升高，这些值也相应增加。Jiang 等 (1991) 研究发现，藏北高原那曲牦牛（海拔 4500 m）的血红蛋白含量高于藏南河谷林芝牦牛（海拔 3000 m）。根据血红蛋白电泳分离结果发现，长期生活在不同海拔高度的生态环境下，在高海拔的那曲牦牛血红蛋白电泳呈现 A、A₂、A₃ 三个区带，而生活在较低海拔的林芝牦牛却只有 A 和 A₂ 两个区带。有报道称，各种哺乳动物除个体间的血红蛋白（胎儿的和成年的）有变异之外，还有种间的变异。在藏北那曲牦牛中也发现了变异血红蛋白（A₃），雄性牦牛的变异血红蛋白的数量高于雌性牦牛，差异极显著（ $P < 0.001$ ）。他们认为，高原牦牛变异血红蛋白的产生，除个体或种间因素外，可能主要是由于高海拔特殊环境下的低氧分压所致。将生活于海拔 4500 m 的藏北高原那曲牦牛与海拔 3000 m 的藏南河谷林芝牦牛做比较，藏北高原牦牛的血液总量、红细胞数量、红细胞压积和血红蛋白含量都极明显的高于藏南河谷牦牛。这些差异性，除与营养、健康状

况、身体活动程度相关外，主要还是长期生活在高海拔、低气压环境下的牦牛机体，为适应其特定的高原生态环境而产生的特异性适应性变异。海拔高度越高，氧分压越低，当牦牛血液含氧量降低时，可促使血量、红细胞数量、红细胞压积、血红蛋白含量增长，以满足机体对氧的需求。

1.2 血红蛋白的氧亲和力特征

牦牛血红蛋白比牛血红蛋白对氧有更高的亲和力，牦牛血红蛋白 β 链与牛相比在三个位置上有不同，与它们没有亚铁血红素或亚单位的联系有关。牦牛血红蛋白 β 链与绝大部分的哺乳动物的区别是第135位的丙氨酸(H13)被替换成了缬氨酸，使亚铁血红素附近的链形成了一个大的疏水基团，这可能使H螺旋发生了小的改变，从而改变了对氧的亲和力。

1.3 血液的黏滞性特征

高原土生动物红细胞数目增多，这增强了血液的氧运输能力，从而增强了对低氧的适应。但增多的红细胞数目会导致血液黏滞性增加，从而增加血液阻力。这使得血流速度降低，心脏负担增加，对机体是不利的。但那些通过增多红细胞数目来适应高原低氧的动物，会通过其他途径来降低其血液黏滞性。Jiang等(1991)发现西藏高原牦牛具有红细胞不仅数目多而且体积小特点。那曲牦牛红细胞数目多，体积小，故总表面积大，对于血液的呼吸机能(气体运输)至关重要，氧和二氧化碳等脂溶性气体自由透过红细胞的数目增多；同时也可以降低血液的黏稠度，促进血流速度加快，可以确保牦牛机体在低氧分压环境中氧的供给，这又是高海拔动物适应缺氧环境的重要生理性变异。还发现那曲牦牛红细胞内血红蛋白的平均重量小于林芝牦牛，说明高海拔牦牛红细胞比低海拔牦牛红细胞平均重量轻。另外，那曲牦牛血红蛋白占有的MCV的平均百分比大于林芝牦牛，这说明海拔高度、环境温度及其他气候因子，不仅影响红细胞数目，也影响血红蛋白浓度。

2 牦牛低氧适应的肺动脉结构特征

众所周知，当生活在正常海平面上的动物来到高海拔地区以后，通常会出现肺动脉高压。低氧性肺动脉高压其特点是肺血管收缩反应增强和肺小动脉平滑肌细胞的异常增生，使其结构发生改变。居住在海平面的人和动物暴露于高原后，由于低氧引起肺小动脉压力增高，从而改善了通气血流的匹配，减轻低氧血症，这是一个重要的适应机制。但长期低氧使肺血管发生形态的改变，主要表现为肺小动脉肌中层肥厚，无肌型小动脉出现平滑肌层，而成为新肌化血管，进一步促进了肺动脉压力增加。严重的肺动脉高压将引起右心室负荷的加重，导致右心室

肥厚,限制了心脏血液输出,还可能导致右心室衰竭。

牛科动物大多具有明显的肌性肺血管,特别容易发生低氧性肺血管收缩而导致肺动脉高压和右心室肥厚,甚至出现典型的右心衰竭征象而谓之“兽胸病”。牦牛却与此相反,Heath 等(1984)首次报道了一头母牦牛肺动脉的组织解剖学研究资料,这头生长于海拔 3800~4200 m 处已 7 岁的牦牛,肺动脉是薄壁的、肺小动脉无肌性中层、右心室不肥厚,与以往被研究过的某些高原世居哺乳动物的肺血管特点是一致的。同时,肺动脉内皮细胞的形态和功能对低氧适应也有影响。牦牛的肺动脉内皮细胞大、宽、圆,与低氧敏感牛的内皮细胞不一样,且在这两种动物中,内皮细胞对内皮依赖性血管活性物质的反应也有很大的差异。

3 牦牛低氧适应的心肺特征

牦牛有 14 对肋骨,比别的牛多一对,这使牦牛有很大的胸腔体积,允许体积较大的肺和心的发育。牦牛的肋骨狭窄细长,肋间距大,肋间肌发达。虽然其胸廓的宽度发育较差,但其深度很大(肢长指数为 41%左右),因而牦牛胸廓围度很大,为其心、肺的发育提供了良好的空间。与其他的牛相比,牦牛的心脏相对较大,具有强大的左心和与之相应的发达的右心。我国牦牛的肺重为其体重的 1.1%~1.7%,心脏的重量为其体重的 0.5%~0.8%。且肺泡数目多,体积小,单位面积内肺血管数目较多,肺泡隔内弹性纤维含量较多,这有利于肺动脉血液向肺内的灌注和减缓肺动脉压力的升高,同时有利于肺强力吸气后,肺组织弹性回缩,促进肺内气体的排出。

牦牛的气管也特别粗大以允许牦牛快速地吸入空气。Zhang 等(1994)发现天祝白牦牛的气管长度比其他牛的气管短,而气管的直径比其他牛的大。Li 等(1984)测量了 5 头雌性牦牛的气管,报道了牦牛气管平均长度为 43 cm,平均直径为 5.5 cm。牦牛气管的环型软骨狭窄,每个环型软骨之间的距离约为 4 cm,使其能进行高频率的呼吸,以增加其每次呼吸吸入肺内的空气容量,是牦牛在低氧环境下仍能获得机体生命活动所必需的氧气。

Anand 等(1986)做了一项研究,选取 5 头高海拔地区生长(Ladakh, India, 4500 m)的牦牛和 6 头低海拔(Whipsnade Park, England, 150 m)的牦牛,发现这两组牦牛的肺动脉压没有明显的差别,但是,高海拔牦牛的肺动脉阻力高于低海拔牦牛的肺动脉阻力。当肺动脉系统的血管收缩时将会发生这种高阻力。血管收缩的发生通常是为了减少低氧条件下对未通气的肺部的血液供给,维持机体其他部分的动态平衡。如果动物在低海拔得了肺炎,发生炎症的部位会通过血管收缩来阻止氧到达受损部位,而使更多剩余的氧供应肺部其他没有受损的有功能的区域。他们提出疑问,在高海拔地区,血管收缩对于永久性缺氧将不是一个好的长期的反应。因为,此时在高海拔地区整个肺部已变成了一个低氧的

环境,血管收缩的副作用危害很大,它随后会影响整个肺部。对牦牛和牛的研究比较表明,牦牛已经适应了高海拔的环境,能够在很大程度上防止血管收缩情况的发生。

当比较牦牛、喜马拉雅牛以及这两种牛的杂交牛时,Anand等(1986)发现,这些牛虽然都生活在高海拔地区,但是喜马拉雅牛的肺动脉压要高于牦牛,是牦牛的肺动脉压的3倍。从这方面来看,这两种牛的第一代杂交牛的肺部血液动力方面应该处于牦牛和喜马拉雅牛之间,但实际上更接近于牦牛。然而,将杂交牛与喜马拉雅牛回交(3/4牛,1/4牦牛),尤其在阻力特性方面,有一个双峰的分布,一些接近于喜马拉雅牛,一些接近于牦牛。从这个研究可以得出结论,肺动脉阻力是有遗传基础的,牦牛经历了很长时间的进化去除了血管收缩反应来适应高海拔低氧环境。他们给这个结论提供了一个注释,即还不能肯定喜马拉雅牛和牦牛在肺阻力方面的差别程度,尽管牦牛在这些动物中已经表现出了体型的差异(山牛要小些)。如果这个结论被证实,那么遗传性的减弱血管收缩反应将是对低氧条件的一个重要适应。

为进一步探究这个课题,Anand等(1988)做了另一个实验,这个实验中还对绵羊和山羊进行了研究。后来的结论都支持早期的观点,关于牦牛减低血管收缩反应方面,也增加了一些数据(虽然只研究了一头牦牛),表明牦牛比杂交牛的右心室要大。此外,牦牛的小肺动脉的中间层要薄一些(进一步表明血管收缩能力的降低)。Belkin等(1985)报道,基于对40头成年牦牛的心脏研究,右心室要比左心室的毛细血管化程度高,这进一步证实,生活在高海拔环境的牦牛需要右心室应付增加的负重来进一步适应高海拔。

4 低氧适应的遗传性

对高原低氧适应是否有遗传性,学术界的观点尚未统一。有人认为对高原低氧的适应没有遗传性,但另一些研究证明了低氧适应遗传性的存在。对兽胸病敏感或耐受的牛所生后代能保持各自的敏感性或耐受性至少两代。Fagan等(2001)发现患兽胸病、肺高压和右心衰竭的牛具有家系性。通过选择培育成具有高、低反应家系的牛说明肺血管低氧收缩反应中遗传具有决定作用。品种间、品系间很明显的低氧压力反应差异说明高原低氧适应中遗传的影响仍是一个主要角色。

第二节 低氧适应动物中 HIF-1 α 的研究进展

近年来,对HIF-1 α 的研究主要集中在肿瘤的低氧调控方面,揭示了HIF-1在肿瘤增殖和分化过程中的核心调控作用。但是,对低氧适应动物中的HIF-1

所起的重要作用研究较少。鱼在它们的生活环境中始终经历着氧浓度的不断变化, Soitamo 等 (2001) 从虹鳟 (*Rainbow Trout*) 中克隆了 HIF-1 α 基因, 并对蛋白活性进行了研究。虹鳟的 HIF-1 α 由 766 个氨基酸组成, 与人和鼠的 HIF-1 α 有 61% 的同源性。从 0.2%~20% 不同的氧浓度下各培养虹鳟细胞 1 h, 发现 HIF-1 α 蛋白在 5% 氧浓度时发生最大程度的聚集, 这个氧浓度也是典型的哺乳动物中静脉血的氧浓度。加入蛋白酶抑制剂 MG132 能够抑制虹鳟细胞中 HIF-1 α 蛋白的降解, 使 HIF-1 α 蛋白保持稳定。虹鳟 HIF-1 α HRE 序列与哺乳动物和爪蟾 (*Xenopus*) 的 HRE 序列是完全一致的, 揭示了 HIF-1 α 蛋白在进化过程中的高度的保守性 (Soitamo et al., 2001)。随后, Rissanen 等 (2006) 研究了温度调控非洲鲫鱼 HIF-1 的表达。

Shams 等在 *Spalax* (blind subterranean mole rat, 一种低氧耐受的特殊模型) 和 *Rattus* 中比较了红细胞循环的主要调控者 EPO 和 EPO 表达的诱导者 HIF-1 α 二者的 mRNA 的表达。①EPO mRNA 在 *Spalax* 和 *Rattus* 肾中的表达: 在常氧条件下二者均产生少量的 EPO, *Rattus* EPO mRNA 的最高表达出现在 6% O₂ 处理 4 h 后, 此时 *Spalax* EPO mRNA 的表达水平是 *Rattus* 的 3 倍, 经过 10% O₂ 处理 24 h 后, *Spalax* EPO mRNA 的表达水平达到最高, 是 *Rattus* EPO mRNA 最高表达水平的 6 倍。②常氧条件下 *Spalax* HIF-1 α mRNA 表达水平是 *Rattus* 的 2 倍, 在 3% O₂ 处理 4 h 后, *Spalax* HIF-1 α mRNA 的表达水平达到最高, 是其常氧下最高表达水平的 2 倍, 而 *Rattus* HIF-1 α mRNA 的表达水平在上述几个条件下均没有明显的变化。③6% O₂ 处理 10 h, 此时 *Rattus* 不能生存, *Spalax galili* (生活在土壤潮湿不通风的洞穴中) 的 EPO mRNA 和 HIF-1 α mRNA 的表达水平比 *Spalax judaei* (生活土壤疏松通风的洞穴中) 的表达水平要高。这揭示了 EPO 和 HIF-1 α 这种形式的表达对低氧耐受动物 *Spalax* 适应策略的真实贡献, 它们在 4000 万年的进化过程中不断发展来应对地下环境的低氧压力 (Shams et al., 2004)。

哺乳动物的冬眠和减缓疲劳的呼吸方式与低氧-低体温紧密相关, 从而揭示了当动物进入无知觉状态时体温降低的部分机制。因此, Morin 等假设 HIF-1 表达的改变, 可能潜在的和冬眠-响应基因的定位有关。在基因和蛋白水平检测了 HIF-1 α 在 13 只松鼠 (*Spermophilus tridecemlineatus*) (分成两批, 一批经过冬眠处理进入冬眠, 一组一直保持正常状态) 的 4 个器官中的表达。RT-PCR 显示 HIF-1 α 转录水平在冬眠和非冬眠松鼠的心、肺、骨骼肌和褐色脂肪组织中没有变化, 但是 HIF-1 α 蛋白水平在冬眠松鼠的褐色脂肪和骨骼肌中增加了 60%~70%。而且在 HIF-1 与褐色脂肪组织细胞核提取物的绑定实验中, 冬眠松鼠的褐色脂肪组织细胞核提取物与 HIF-1 的结合能力比非冬眠松鼠增强 6 倍, 提示了 HIF-1 反应基因在冬眠过程中的增强。比较其他哺乳动物的 HIF-1 α 蛋白序

列,在冬眠松鼠 HIF-1 α 基因编码的氨基酸中发现了几个独特的氨基酸被替换,这可能影响蛋白的构造及可能的功能,来抵消在接近 0℃ 的体温没有知觉的过程中低温对 HIF-1 α 构造的影响 (Morin et al., 2005)。

但是 Zhao 等第一次在高原土著动物高原鼠兔中研究了 HIF-1 α 基因的表达,这对揭示高原动物为什么能适应低氧的环境及 HIF-1 α 在高原动物长期进化中对低氧适应的调控都有着重要的意义。他们克隆得到了高原鼠兔 HIF-1 α 基因的全长,并得到了两个异构体,命名为 pLHIF-1 α 和 pSHIF-1 α , pSHIF-1 α 缺少部分的 ODD 区、两个 TAD 区 (N-TAD 和 C-TAD) 及 NLS (nuclear localization signal motif)。通过 Northern 印迹发现,高原鼠兔 HIF-1 α mRNA 在脑和肾中高表达,而在心、肺、肝、肌肉和脾中表达较少,而且还同时检测到了 pSHIF-1 α 和 pLHIF-1 α 的表达。这揭示 HIF-1 α 可能在高原鼠兔对低氧的适应中起着重要的作用,特别是在脑和肾中,而新的异构体的功能还有待研究 (Zhao et al., 2004)。

第三节 基于 HIF-1 α 基因探讨青海家牦牛的低氧适应机制研究

1 牦牛样品采集

本实验中的牦牛为中国科学院海北高寒草甸生态系统实验站 (37°29'N, 101°12'E) 附近的家牦牛。牦牛为牛家族中的稀有牛种,隶属于偶蹄目牛科牦牛属,因能充分利用高寒草地牧草资源及对高寒缺氧生态条件极强的适应性,素有“高原之舟”之称。牦牛是青藏高原及周边地区特有的家畜遗传资源,其分布西起帕米尔,东至岷山,南至喜马拉雅山南坡,北抵阿尔泰山麓,海拔 3000~5000 m 的高原、高山、亚高山的寒冷半湿润气候区域。牦牛生活的地区具有海拔高 (2500~6000 m)、气温低 (年均温 $\leq 0^{\circ}\text{C}$)、昼夜温差大 (15℃ 以上)、牧草生长季短 (110~135 天)、太阳辐射强 (年辐射量 586~816 kJ/cm²)、氧分压低 (14.8 kPa 以下) 的特点,草场以高山及亚高山草场为主体。由于这种特殊的生态环境和严酷的自然选择,牦牛具有很强的生活能力,对高海拔缺氧环境有独特的适应能力。

牦牛从草场进入牛圈后,挑选 3 只雄性牦牛,当场割断气管处死。立即取小块心、肝、脾、肺、肾、脑、肌肉和睾丸 8 种组织,每头牦牛每种组织取 2 份,放在 DEPC 处理过的去离子水中涮洗,去掉残留血液,立即放进灭过菌的 5ml 冻存管中,投入液氮中保存备用。

2 HIF-1 α 及 β -actin 基因的克隆

2.1 引物设计

牦牛 HIF-1 α 引物。同源比对 GenBank 数据库中其他哺乳动物已知的 cDNA 序列, 包括牛 [*Bos taurus* (NM_174339)], 狗 [*Canis familiaris* (AY455802)], 挪威鼠 [*Homo sapiens* (BC012527)], 小鼠 [*Mus musculus* (BC026139)], 大鼠 [*Rattus norvegicus* (AF057308)] 和兔 [*Oryctolagus cuniculus* (AY273790)]。

牦牛 β -actin 引物。同源比对 GenBank 数据库中其他哺乳动物已知的 cDNA 序列, 包括牛 (AY141970), 羊 [*Ovis aries* (U39357)], 马 [*Equus caballus* (AF035774)], 挪威鼠 [*Homo sapiens* (NM_001101)], 狗 (NM_001003349), 豚鼠 [*Cavia porcellus* (AF508792)]。

序列的同源搜索和比对利用软件 Vector NTI Suite 8 (Invitrogen) 来完成。两个基因的引物序列见表 7-1。

表 7-1 HIF-1 α 及 β -actin 基因克隆所用引物

产物大小	引物名称	引物序列
936 bp	Yak 上游引物-1	5'-GAG CTT GCT CAT CAG TTG CC-3'
	Yak 下游引物-1	5'-CAA GTC GTG CTG AAT AAT ACC-3'
1495 bp	Yak 上游引物-2	5'-GGA CAA GTC ACC/A ACA GGA CAG-3'
	Yak 下游引物-2	5'-CA/GT AAC TGG TCA GC/TT GTG G-3'
2472 bp	Yak 3	5'-ATG GAG GGC GCC GGC/G GGC G-3'
2595 bp	Yak ORF terminate	5'-TCA GTT AAC TTG ATC CAA AGC-3'
	Yak H1a ORF 2S	5'-ATG GAG GGC GCC GGC/G GGC GCG AAC G-3'
	Yak H1a ORF 2AS	5'-TCA GTT AAC TTG ATC CAA AGC TCT GAG-3'
1128 bp	Yak bactin S1	5'-ATG GAT GAT GAT ATT/C GCT/C GCG CTC G-3'
	Yak bactin AS1	5'-CTA GAA GCA TTT GCG GTG GAC GAT G-3'

2.2 序列分析

采用 RT-PCR 扩增和 T 克隆方法共获得 3 种牦牛 HIF-1 α 基因可读框, 并提交至 GenBank 数据库, Yak HIF-1 α ORF 1a (DQ838046), Yak HIF-1 α ORF 1b (DQ838047), Yak HIF-1 α ORF 2 (DQ838048)。三者氨基酸序列比对如图 7-1 所示。以同样的方法克隆出牦牛 β -actin 基因的完整可读框, 命名为 Yak β -actin ORF (DQ838049)。

HIF1α -1a	MEGAGGANDK KK-----	-----	-----	-----
HIF1α -1b	MEGAGGANDK KK-----	-----	-----	-----
HIF1α -2	MEGAGGANDK KKLEGEETIY	LEAIMYLVRR	IYGRLEITML	GRSLTYCSVL
		bHLH		
HIF1α -1a	---ISSERRK EKSrDAARSr	RSKESEVFYE	LAHQPLPLPHN	VSSHLDKASV
HIF1α -1b	---ISSERRK EKSrDAARSr	RSKESEVFYE	LAHQPLPLPHN	VSSHLDKASV
HIF1α -2	SKWISSERRK EKSrDAARSr	RSKESEVFYE	LAHQPLPLPHN	VSSHLDKASV
			PAS (A)	
HIF1α -1a	MRLTISYLRV RKLLDAGDLD	IEDEMKAQMN	CFYLKALDGF	VMVLTDDGDM
HIF1α -1b	MRLTISYLRV RKLLDAGDLD	IEDEMKAQMN	CFYLKALDGF	VMVLTDDGDM
HIF1α -2	MRLTISYLRV RKLLDAGDLD	IEDEMKAQMN	CFYLKALDGF	VMVLTDDGDM
HIF1α -1a	IYISDNVNKY MGLTQFELTG	HSVFDFTHP	DHEEMREMLT	HRNGLVKKGR
HIF1α -1b	IYISDNVNKY MGLTQFELTG	HSVFDFTHP	DHEEMREMLT	HRNGLVKKGR
HIF1α -2	IYISDNVNKY MGLTQFEPTG	HSVFDFTHP	DHEEMREMLT	HRNGLVKKGR
HIF1α -1a	EQNTQRSFFL RMKCTLTSRG	RTMNIKSATW	KVLHCTGHIH	VYDTNSNQSQ
HIF1α -1b	EQNTQRSFFL RMKCTLTSRG	RTMNIKSATW	KVLHCTGHIH	VYDTNSNQSQ
HIF1α -2	EQNTQRSFFL RMKCTLTSRG	RTMNIKSATW	KVLHCTGHIH	VYDTNSNQPO
			PAS (B)	
HIF1α -1a	CGYKKPPMTC LVLICEPIPH	PSNIEIPLDS	KTFLSRHSLD	MKFSYCDERI
HIF1α -1b	CGYKKPPMTC LVLICEPIPH	PSNIEIPLDS	KTFLSRHSLD	MKFSYCDERI
HIF1α -2	CGYKKPPMTC SVLICEPIPH	PSNIEIPLDS	KTFLSRHSLD	MKFSYCDERI
HIF1α -1a	TELMGYEPEE LLGRSIYEYY	HALDSHDLTK	THHDMFTKGQ	VTTGQYRMLA
HIF1α -1b	TELMGYEPEE LLGRSIYEYY	HALDSHDLTK	THHDMFTKGQ	VTTGQYRMLA
HIF1α -2	TELMGYEPEE LLGRSIYEYY	HALDSHDLTK	THHDMFTKGQ	VTTGQYRMLA
HIF1α -1a	KKGGYVWIET QATVIYNKTN	SQPQCIVCVN	YVSGIIQHD	LIFSLQQTEC
HIF1α -1b	KKGGYVWIET QATVIYNKTN	SQPQCIVCVN	YVSGIIQHD	LIFSLQQTEC
HIF1α -2	KKGGYVWIET QATVIYNKTN	SQPQCIVCVN	YVSGIIQHD	LIFSLQQTEC
			ODD	
HIF1α -1a	VLKPVESSDM KMTQLFTKVE	SEDTSSLFDK	LKKEPDALT	IAPAAGDTII
HIF1α -1b	VLKPVESSDM KMTQLFTKVE	SEDTSSLFDK	LKKEPDALT	IAPAAGDTII
HIF1α -2	VLKPVESSDM KMTQLFTKVE	SEDTSSLFDK	LKKEPDALT	IAPAAGDTII
HIF1α -1a	SLDFGSNDTE TDDQOLEEVP	LYNDVMLPSS	NEKLQINILA	MSPLPASETP
HIF1α -1b	SLDFGSNDTE TDDQOLEEVP	LYNDVMLPSS	NEKLQINILA	MSPLPASETP
HIF1α -2	SLDFGSNDTE TDDQOLEEAP	LYNDVMLPSS	NEKLQINILA	MSPLPASETP

HIF1 α -1a	KPLRSSADPA LNQEVALKLE	PNPESLGLSF	TMPQIQDQPA	SPSDGSTRQS
HIF1 α -1b	KPLRSSADPA LNQEVALKVE	PNPESLELSF	TMPQIQDQPA	SPSDGSTRQS
HIF1 α -2	KPLRSSADPA LNQEVALKLE	PNPESLELSF	TMPQIQDQPA	SPSDGSTRQS
TAD-N				
HIF1 α -1a	SPEPNSPSEY CFDVDGDMVN	EFKLELVEKL	FAEDTEAKNP	FSTQDSDLDI
HIF1 α -1b	SPEPNSPSEY CFDVDSDMVN	EFKLELVEKL	FAEDTEAKNP	FSTQDSDLDI
HIF1 α -2	SPEPNSPSEY CFDVDSDMVN	EFKLELVEKL	FAEDTEAKNP	FSTQDSDLDI
HIF1 α -1a	EMLAPYIPMD DDFQLRSFDQ	LSPLENSSTS	PQASASTNTVF	OPTQMQEPPF
HIF1 α -1b	EMLAPYIPMD DDFQLRSFDQ	LSPLENSSTS	PQASASTNTVF	OPTQMQEPPF
HIF1 α -2	EMLAPYIPMD DDFQLRSFDQ	LSPLENSSTS	PQASASTNTVF	OPTQMQEPPF
HIF1 α -1a	ATVTTTATSD ELKTVTKDGM	KDIKILIAFP	SPPHVPKEPP	CATTSPYSDT
HIF1 α -1b	ATVTTTATSD ELKTVTKDGM	EDIKILIAFP	SPPHVPKEPP	CATTSPYSDT
HIF1 α -2	ATVTTTATSD ELKTVTKDGM	EDIKILIAFP	SPPHVPKEPP	CATTSPYSDN
HIF1 α -1a	GSRTASPSRA GKGVIEQTEK	SHPRSPNVLS	VALSQRTTAP	EEELNPKILA
HIF1 α -1b	GSRTASPNRA GKGVIEQTEK	SHPRSPNVLS	VALSQRTTAP	EEELNPKILA
HIF1 α -2	GSRTASPNRA GKGVIEQTEK	SHPRSPNVLS	VALSQRTTAP	EEELNPKILA
HIF1 α -1a	LQNAQRKRKI EHDGSLFQAV	GIGTLLQOPD	DRATTTSLSW	KRVKGCKSSE
HIF1 α -1b	LQNAQRKRKI EHDGSLFQAV	GIGTLLQOPD	DRATTTSLSW	KRVKGCKSSE
HIF1 α -2	LQNAQRKRKI EHDGSLFQAV	GIGTLLQOPD	DRATTTSLSW	KRVKGCKSSE
TAD-C				
HIF1 α -1a	QNGMEQKTII LIPSDLVCRL	LQGSMDESGL	PQLTSYDCEV	NAPIQGSRNI
HIF1 α -1b	QNGMEQKTII FIPSDLACRL	LQGSMDESGL	PQLTSYDCEV	NAPIQGSRNI
HIF1 α -2	QNGMEQKTII LIPSDLACRL	LQGSMDESGL	PQLTSYDCEV	NAPIQGSRNI
HIF1 α -1a	LQGEELLRAL DQVN			
HIF1 α -1b	LQGEELLRAL DQVN			
HIF1 α -2	LQGEELLRAL DQVN			

图 7-1 家牦牛的三个不同的 HIF-1 α ORF 编码的氨基酸序列的比対图

黑体为三个序列中不同的氨基酸，有下划线的是氧依赖的羟基化位点

3 HIF-1 α mRNA 在牦牛不同组织中的表达

我们对牦牛不同组织中 HIF-1 α mRNA 的表达进行了研究，采用了三种检测方法，分别是 semi-quantitative RT-PCR（半定量 RT-PCR）、Northern 印迹和 real time quantitative PCR（实时定量 PCR）。

3.1 半定量 RT-PCR 检测

由图 7-2 可以看出，HIF-1 α mRNA 在牦牛 8 种组织中均有表达，牦牛 HIF-

1 α mRNA 在脾、脑和睾丸中的表达量较高，尤其是睾丸中表达量最高，其他组织中则较少。而 β -actin 基因在牦牛不同组织中的表达量基本是恒定的。

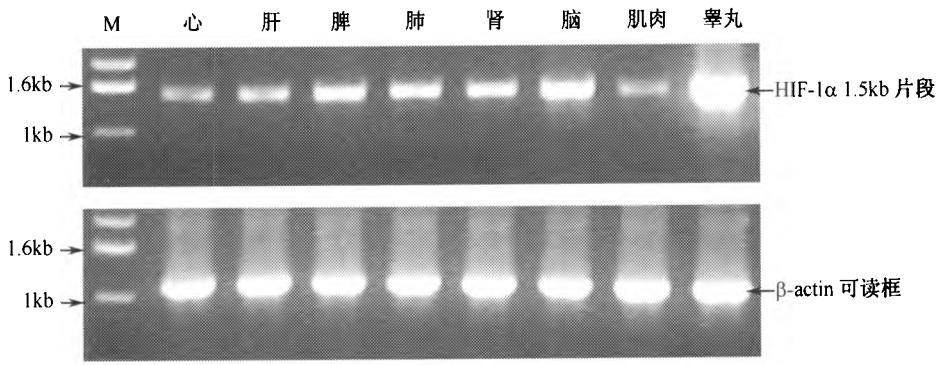


图 7-2 半定量 RT-PCR 电泳图

3.2 Northern 印迹检测

由图 7-3 看出，HIF-1 α mRNA 在牦牛不同组织中均有表达，在脾和睾丸中的表达量较高，其他组织中较少，尤其是肌肉组织中表达量很低。

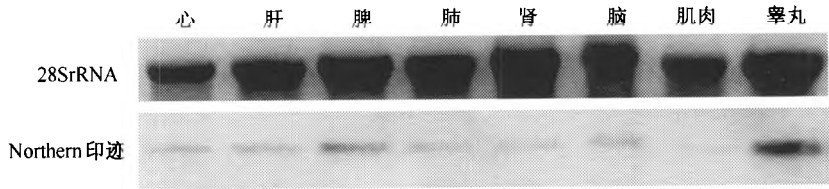


图 7-3 Northern 印迹结果

3.3 实时定量 PCR 检测

我们采用 SYBR green 荧光染料检测 PCR 反应体系中存在的双链 DNA 数量。经过预实验的多次摸索后，最终选用引物 HIF-1 α 1162-1252 来扩增 HIF-1 α 片段，引物 β -actin 822-945 来扩增 β -actin 片段。引物序列见表 7-2。

表 7-2 实时定量 PCR 所用引物

引物名称及 PCR 产物大小		引物序列
H1a 1162-1252	H1a 1162-1252 S	5'-GATAAACTTAAGAAGGAGCCTGATGCT-3'
HIF-1 α 片段 91bp	H1a 1162-1252 AS	5'-TGTCATTGCTGCCAAAATCTAAAG-3'
β -actin 822-945	β -actin 822-945 S	5'-TCACGAAACTACCTTCAATTCATC-3'
β -actin 片段 124bp	β -actin 822-945 AS	5'-TTTCTGCATCCTGTTTGCGAT-3'

3.3.1 绝对定量法

3.3.1.1 标准曲线的建立

表 7-3 HIF-1α ORF+pGEM-T 载体质粒扩增数据

浓度梯度	浓度/ (ng/μl)	拷贝数	Ct 值
125	10 ⁻³	8.95×10 ⁵	18.69±0.023
25	2×10 ⁻⁴	1.79×10 ⁵	19.68±0.014
5	4×10 ⁻⁵	3.58×10 ⁴	22.57±0.038
1	8×10 ⁻⁶	7.16×10 ³	24.987±0.021
0.2	1.6×10 ⁻⁶	1.43×10 ³	27.217±0.015
0.04	3.2×10 ⁻⁷	2.86×10 ²	29.56±0.011

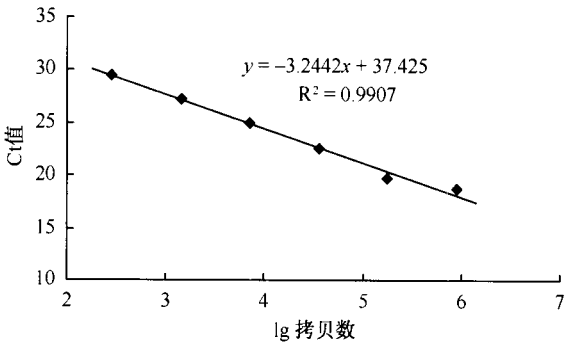


图 7-4 HIF-1α ORF+pGEM-T 载体质粒扩增标准曲线

由表 7-3 和图 7-4 可以看出，HIF-1α ORF+pGEM-T 载体质粒扩增标准曲线的 R^2 值为 0.9907，接近于 1，说明此标准曲线的可信度很高。

表 7-4 β-actin+pGEM-T 载体质粒扩增数据

浓度梯度	浓度/ (ng/μl)	拷贝数	Ct 值
125	10 ⁻³	1.19×10 ⁶	17.89±0.004
25	2×10 ⁻⁴	2.37×10 ⁵	19.63±0.021
5	4×10 ⁻⁵	4.74×10 ⁴	21.72±0.012
1	8×10 ⁻⁶	9.5×10 ³	24.7±0.02
0.2	1.6×10 ⁻⁶	1.9×10 ³	26.7±0.029
0.04	3.2×10 ⁻⁷	3.79×10 ²	29.02±0.015

由表 7-4 和图 7-5 可以看出，β-actin+pGEM-T 载体质粒扩增标准曲线的 R^2

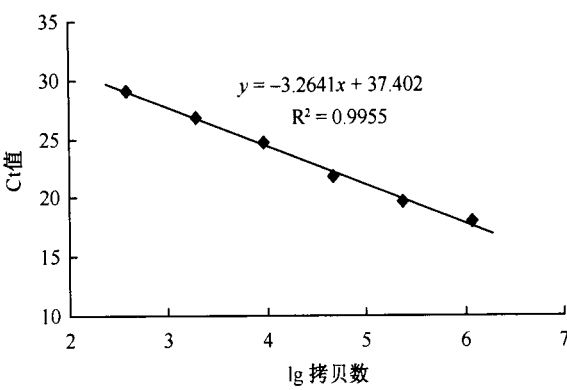


图 7-5 β -actin+pGEM-T 载体质粒扩增标准曲线

值为 0.9955，接近于 1，说明此标准曲线的可信度很高。

3.3.1.2 HIF-1 α 基因的表达量

表 7-5 5 μ g 总 RNA 中 HIF-1 α 基因转录物的拷贝数

组织	稀释倍数	Ct 值	拷贝数
心	10 ⁻²	27.45±0.175	476 866±82 400
肝	10 ⁻²	25.15±0.036	2 431 251±61 905
脾	10 ⁻²	27.09±0.122	612 048±63 315
肺	10 ⁻³	28.89±0.213	1 718 634±360 138
肾	10 ⁻³	27.81±0.083	3 675 301±219 856
脑	10 ⁻³	26.93±0.046	6 874 112±222 415
肌肉	10 ⁻²	28.57±0.035	214 096±5326
睾丸	10 ⁻²	23.88±0.095	5 973 004±264 646

表 7-6 5 μ g 总 RNA 中 β -actin 基因转录物的拷贝数

组织	稀释倍数	Ct 值	拷贝数
心	10 ⁻³	26.58±0.078	8 259 090±447 272
肝	10 ⁻²	20.08±0.075	81 150 612±4 297 940
脾	10 ⁻³	27.09±0.047	5 787 062±191 402
肺	10 ⁻³	24.7±0.026	31 155 553±584 087
肾	10 ⁻³	23.32±0.035	82 675 381±2 051 600
脑	10 ⁻³	22.59±0.025	137 700 501±2 440 243
肌肉	10 ⁻²	22.69±0.036	12 863 785±328 751
睾丸	10 ⁻²	21.54±0.031	28 882 757±624 507

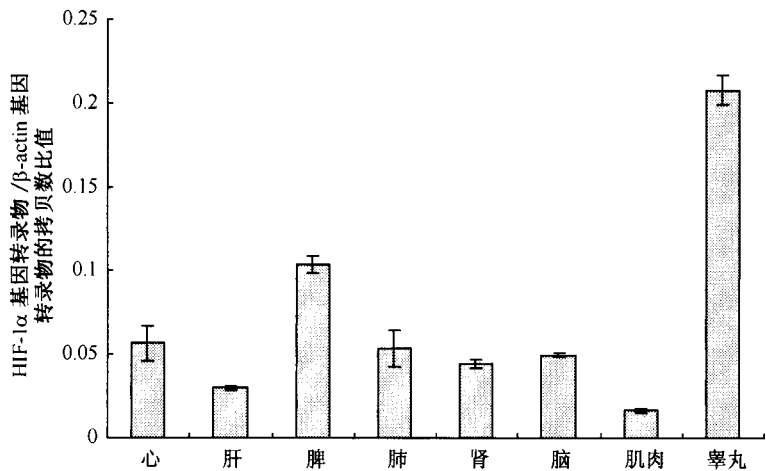


图 7-6 5μg 总 RNA 中 HIF-1α/β-actin 基因转录物的拷贝数

由表 7-5、表 7-6 和图 7-6 可以看出，牦牛 HIF-1α mRNA 在睾丸中的表达量最高，约是脾中 HIF-1α mRNA 表达量的 2 倍，约是心、肺、肾、脑中 HIF-1α mRNA 表达量的 4 倍，约是肝中 HIF-1α mRNA 表达量的 6 倍，约是肌肉中 HIF-1α mRNA 表达量的 10 倍。

3.3.2 相对定量法 (ΔΔCt 方法)

经过实验分析，发现 HIF-1α 和 β-actin 在肾、脑、睾丸、肝、脾中扩增效率近似，所以对 HIF-1α 基因在这 5 种组织中的表达又进行相对定量的检测和分析。

表 7-7 ΔΔCt 方法计算其他四种组织（肾、脑、肝、脾）HIF-1α 基因相对于睾丸中 HIF-1α 基因的表达量

组织	ΔCt	ΔΔCt (ΔCt _{sample} -ΔCt _{testis})	2 ^{-ΔΔCt}	2 ^{ΔΔCt}
肾	4.844±0.294	2.535±0.175	0.173±0.021	5.825±0.706
脑	4.401±0.138	2.086±0.192	0.236±0.031	4.271±0.568
睾丸	2.292±0.151	0	1	1
肝	5.090±0.054	2.799±0.141	0.144±0.014	6.98±0.679
脾	3.323±0.106	1.031±0.102	0.490±0.034	2.047±0.145

从表 7-7 和图 7-7 可以看出，用 ΔΔCt 方法计算的 HIF-1α mRNA 在睾丸中的表达量，是肾 HIF-1α mRNA 表达量的 5.8 倍，是脑 HIF-1α mRNA 表达量的 4.3 倍，是肝 HIF-1α mRNA 表达量的 7 倍，是脾 HIF-1α mRNA 表达量的 2 倍，与用绝对定量方法计算得出的结果相吻合。

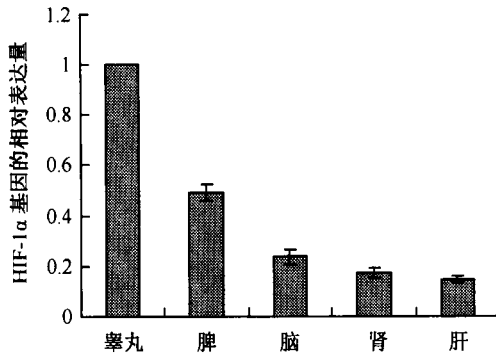


图 7-7 $\Delta\Delta Ct$ 计算的 HIF-1 α 基因在牦牛不同组织中的表达量

4 HIF-1 α 蛋白在牦牛不同组织中表达的研究

因为 HIF-1 α 主要是在转录后的调控方面起重要的作用，因此本实验又研究了 HIF-1 α 蛋白在牦牛不同组织中的表达，以帮助我们进一步了解 HIF-1 α 蛋白在牦牛低氧适应过程中的重要作用。本章对 HIF-1 α 蛋白在牦牛不同组织中表达的检测方法和实验结果进行阐述和讨论。

4.1 HIF-1 α 基因在不同宿主中的表达

4.1.1 HIF-1 α (HIF-1 α 0.6K、HIF-1 α 0.8K) 基因在大肠杆菌 BL21 (DE3) 中的表达及纯化

由图 7-8 和图 7-9 可以看出，HIF-1 α 0.6K+pET30a 表达蛋白和 HIF-1 α 0.8K+pET30a 表达蛋白，使用 FPLC 过完 Ni 柱后，均得到了很大程度的纯化，

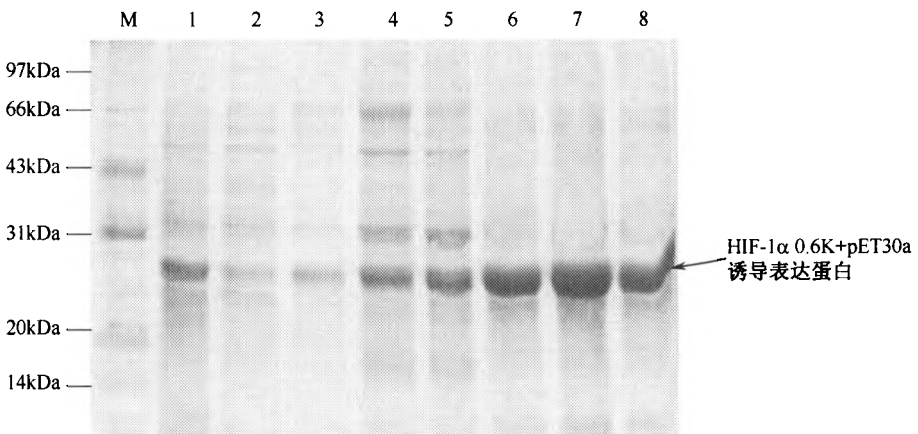


图 7-8 HIF-1 α 0.6K+pET30a 表达蛋白纯化后电泳图

1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 为梯度洗脱时不同时间收获的样品

得到了纯度很高的目的蛋白。图 7-8 中的 6 号管、7 号管收取的蛋白和图 7-9 中 3 号管收取的蛋白，经过透析、冻干后，溶于 PBS，测蛋白浓度，各取 500 μg 免疫小鼠制备抗体。

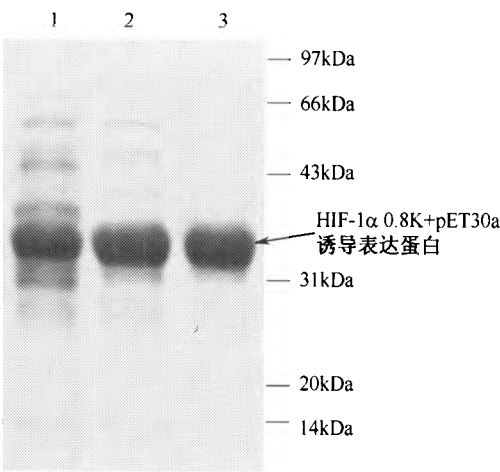


图 7-9 HIF-1α 0.8K+pET30a 表达蛋白纯化后电泳图
1, 2, 3 为梯度洗脱时不同时间收获的样品

4.1.2 HIF-1α 基因在哺乳动物细胞中的表达

从图 7-10 可以看出，HIF-1α ORF+pcDNA3.1/myc-HisA 在 HEK 293T 细胞中表达出了目的蛋白，使用 His-Tag 抗体检测，在转染 HIF-1α ORF + pcDNA3.1/myc-HisA 质粒的 HEK 293T 细胞 (P) 中检测到了 HIF-1α 蛋白的表达，大小约为 120 kDa，在未转染 HIF-1α ORF+pcDNA3.1/myc-HisA 质粒的 HEK 293T 细胞中没有检测到 HIF-1α 蛋白的表达；使用 HIF-1α 特异性抗体，同样在在转染 HIF-1α ORF+pcDNA3.1/myc-HisA 质粒的 HEK 293T 细胞 (P) 中检测到了 HIF-1α 蛋白的表达，大小约为 120kDa，在未转染 HIF-1α ORF + pcDNA3.1/myc-HisA 质粒的 HEK 293T 细胞中没有检测到 HIF-1α 蛋白的表达。这既说明了蛋白的表达，又说明了 HIF-1α 特异性抗体的特异性较号，能够

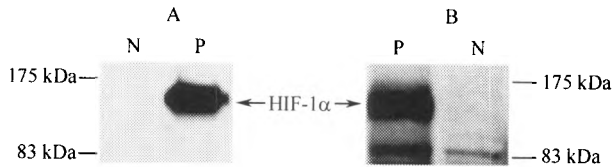


图 7-10 HIF-1α ORF+pcDNA3.1/myc-HisA 在 HEK 293T 细胞中表达蛋白鉴定
A 为 His-Tag 抗体检测；B 为 HIF-1α 特异性抗体检测；N 为未转染 HIF-1α ORF+pcDNA3.1/myc-HisA 质粒的 HEK 293T 细胞；P 为转染 HIF-1α ORF+pcDNA3.1/myc-HisA 质粒的 HEK 293T 细胞

较好的检测 HIF-1 α 蛋白的表达。

4.2 HIF-1 α 蛋白在牦牛不同组织中表达的研究

4.2.1 抗体的检测与纯化

(1) 被转化 HIF-1 α 0.6K+pET30a 质粒的 BL21 (DE3) 菌体, 经过诱导表达后, 超声破碎, 取上清液跑电泳。HIF-1 α 0.6K+pET30a 诱导表达蛋白制备的抗体经过纯化后, 与 HIF-1 α 0.6K+pET30a 质粒诱导表达蛋白上清液进行杂交, 以检测抗体的特异性及纯化效果。

由图 7-11 可以看出, HIF-1 α 0.6K 抗体能够从 HIF-1 α 0.6K+pET30a 质粒诱导表达蛋白上清液中检测出蛋白的表达, 说明制备的 HIF-1 α 0.6K 抗体特异性较好。

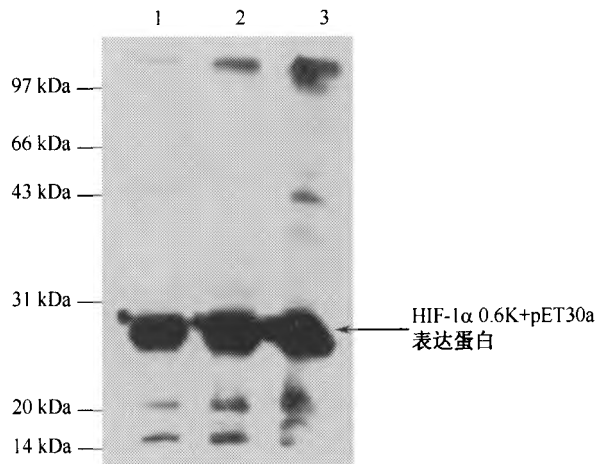


图 7-11 HIF-1 α 0.6K 抗体的特异性检测

1 为 3 μ l HIF-1 α 0.6K+pET30a 质粒诱导表达蛋白上清液;

2 为 5 μ l HIF-1 α 0.6K+pET30a 质粒诱导表达蛋白上清液;

3 为 10 μ l HIF-1 α 0.6K+pET30a 质粒诱导表达蛋白上清液

(2) 被转化 HIF-1 α 0.8K+pET30a 质粒的 BL21 (DE3) 菌体, 经过诱导表达后, 超声破碎, 取上清液跑电泳。HIF-1 α 0.8K+pET30a 诱导表达蛋白制备的抗体经过纯化后, 与 HIF-1 α 0.8K+pET30a 质粒诱导表达蛋白上清液进行杂交, 以检测抗体的特异性及纯化效果。

由图 7-12 可以看出, HIF-1 α 0.8K 抗体能够从 HIF-1 α 0.8K+pET30a 质粒诱导表达蛋白上清液中检测出蛋白的表达, 说明制备的 HIF-1 α 0.8K 抗体特异性较好。

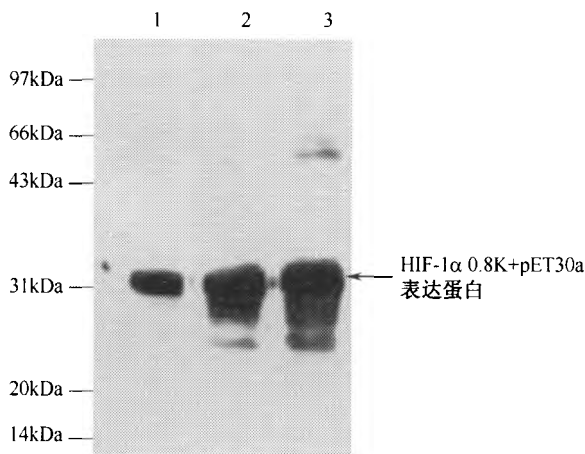


图 7-12 HIF-1 α 0.8K 抗体的特异性检测

1 为 3 μ l HIF-1 α 0.8K+pET30a 质粒诱导表达蛋白上清液；2 为 5 μ l HIF-1 α 0.8K+pET30a 质粒诱导表达蛋白上清液；3 为 10 μ l HIF-1 α 0.8K+pET30a 质粒诱导表达蛋白上清液

4.2.2 HIF-1 α 蛋白在牦牛不同组织中表达量的检测

4.2.2.1 抗体的选择

利用纯化好的 HIF-1 α 0.6K 和 HIF-1 α 0.8K 两种抗体，分别与牦牛组织总蛋白进行 Western 印迹检测，发现 HIF-1 α 0.8K 抗体能够特异性的检测到 HIF-1 α 蛋白，所以选用了这个抗体来检测 HIF-1 α 蛋白在牦牛不同组织中的表达。

4.2.2.2 HIF-1 α 蛋白在牦牛不同组织中的表达

由图 7-13 可以看出，HIF-1 α 蛋白在牦牛不同组织中均有表达，只是在表达量上有所差异。

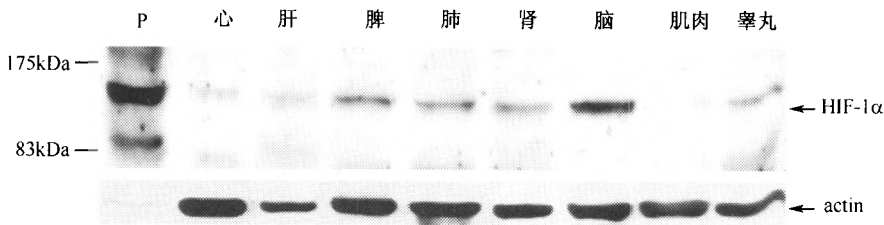
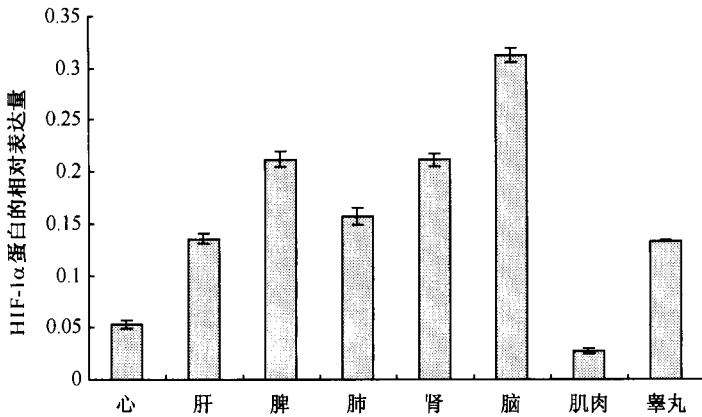


图 7-13 HIF-1 α 蛋白在牦牛不同组织中的表达 Western 印迹检测

P 为 HIF-1 α ORF+pcDNA3.1myc/His A 质粒在 HEK 293T 细胞中表达的蛋白

用 HIF-1 α 0.8K 抗体检测了 HIF-1 α 蛋白在三只牦牛不同组织中的表达量，得到了相似的结果。使用 Image J 软件进行量化后，做出图 7-14。

从图 7-14 可以看出，HIF-1 α 蛋白在牦牛的脑中表达量最高，在脾、肾和肺中的表达量较高，在肌肉中的表达量最少。

图 7-14 HIF-1 α 蛋白在牦牛不同组织中的相对表达量

5 结论

组织中维持氧的平衡非常重要。通过 Western 印迹分析,我们发现 HIF-1 α 蛋白在牦牛 8 个组织中都有表达,只是在表达量上有差异。据我们目前所知,这是第一次报道 HIF-1 α 蛋白在高原土著动物不同组织中的广谱性表达。HIF-1 α 蛋白在牦牛的脑、脾和肾中表达量较高,它在脑中的蛋白表达量约是肌肉的 HIF-1 α 蛋白表达量的 10 倍,约是心的 HIF-1 α 蛋白表达量的 6 倍,约是睾丸的蛋白表达量的 2 倍。脾和肾中的 HIF-1 α 蛋白表达量约是心的 HIF-1 α 蛋白表达量的 4 倍。牦牛 HIF-1 α 蛋白在肌肉和心中的表达量低于它在其他 6 种组织中的表达量。

我们的实验结果跟别人在老鼠中的实验结果有很大的差别 (Stroka et al., 2001; Jewell et al., 2001), 因为我们的研究模型是高原土著动物,高海拔缺氧和牦牛在长期进化的过程中对低氧的适应是两个关键的因素。牦牛 HIF-1 α 蛋白的表达跟 HIF-1 α mRNA 的表达有一些不同。正如我们知道的, HIF-1 α 在转录后即蛋白水平起着关键的作用 (Wang et al., 1995; Semenza, 1999, 2001; Wenger, 2002), 所以 HIF-1 α mRNA 的表达跟 HIF-1 α 的作用没有直接的联系 (Stroka et al., 2001)。因此我们能够理解, HIF-1 α mRNA 的表达与 HIF-1 α 蛋白表达的差异是可能的。

随着海拔高度的增加,氧分压不断降低,牦牛血液中氧的含量也随之减少,促进了红细胞数量、血红蛋白含量、血细胞压积的增加以满足机体氧的需要。生活在海拔 4500 m 的西藏那曲牦牛的红细胞数量、血红蛋白含量、血细胞压积都比生活在海拔 3000 m 的西藏林芝地区的牦牛相应指标要高。但是西藏那曲牦牛与西藏林芝牦牛相比,血液中的平均红细胞容积 (MCV) 降低,而血液中的红细胞平均血红蛋白浓度 (MCHC) 增高,增加的红细胞数量和减少的红细胞平均体积能够增加红细胞的总表面积,对于血液的呼吸机能 (气体运

输)至关重要, O₂ 和 CO₂ 等脂溶性气体自由透过红细胞的数量增多, 同时降低了血液的黏稠度, 加快血液的流动速度, 可以确保牦牛机体在低氧分压环境中氧的供给 (Jiang et al., 1991)。牦牛的血红蛋白比黄牛的血红蛋白对氧有更高的亲和力, 牦牛的血红蛋白 β 链与黄牛相比在三个位置有不同, 与它们没有亚铁血红素或亚单位的联系有关。牦牛的血红蛋白 β 链与绝大部分的哺乳动物的区别是第 135 位的丙氨酸 (H13) 被替换成了缬氨酸, 使亚铁血红素附近的链形成了一个大的疏水基团, 这可能使 H 螺旋发生了小的改变, 改变了对氧的亲和力 (Lalthantluanga et al., 1985; Weber et al., 1988)。哺乳动物的组织通过血管供应充足的氧来完成正常的功能, 因此氧气供应和消耗 (hypoxia) 诱导产生了一系列细胞、局部和系统水平的特殊的适应机制。这些机制通过激活 HIF-1 被部分的控制, 而随后 HIF-1 调节了低氧调控基因的表达, 比如, VEGF 和 EPO。

内源性 NO 是通过 NO 合成酶 (NOS, NO synthase) 将保守的 L-精氨酸酶解成 L-瓜氨酸时产生的。NO 通过抑制平滑肌的增殖、分化、发炎和大量蛋白的产生来维持系统和肺血管的舒张 (Cornwell et al., 1994; Alfke et al., 2000; Moncada et al., 1997)。因此肺部产生的 NO 增多能够通过改变血管的结构和阻止血管重建抑制肺动脉高压的形成。虽然这里面准确的机制还不清楚, 但有意思的是生活在高原上的藏民和玻利维亚人呼出的气体中含有较多的 NO (Beall et al., 2001)。因此我们推测 HIF-1 α 蛋白在牦牛肺中的高表达能够增高 NOS 的表达以产生更多的 NO (Palmer et al., 1998), 来阻止牦牛肺动脉高压的形成, 也许这是 HIF-1 α 蛋白在牦牛肺中高表达的主要原因。

以前的研究表明, 在常氧、低氧和极端低氧的条件下, 在正常小鼠的脑、肾、肝和心的细胞核中检测到了 HIF-1 α 蛋白的表达 (Stroka et al., 2001; Jewell et al., 2001)。但我们的实验结果与他们的不同, 特别是在肺中, 这也是我们研究中最有意思的发现。因为我们的研究动物是高原土著动物牦牛, 它们能在青藏高原这个缺氧的条件下生存得很好, 而他们的实验动物是需要常在常氧下才能正常生存的小鼠, 他们对小鼠人工进行缺氧和极度缺氧的处理, 而这个处理可能改变了小鼠正常的生理代谢和体内的微环境 (Wenger, 2000; Duranteau et al., 1998)。对常氧动物的这种人工缺氧处理并不能准确的发现 HIF-1 α 蛋白的功能, 但我们的实验动物牦牛, 能够让我们在正常和真实的生理条件下了解 HIF-1 α 蛋白在高原土著动物中的表达和生理功能, 这是我们感觉最兴奋的事情。第一, 这些数据告诉我们, 牦牛作为高海拔动物, 它们有复杂和完善的应对低氧的机制, 因此它们甚至能在海拔 7200 m 的地方生存并运输沉重的货物 (Gerald et al., 2003)。第二, EPO 和 NOS 可能在牦牛对低氧适应中起着重要的作用。牦牛 HIF-1 α 蛋白组织特异性表达与牦牛低氧适应的生理特征相适应, 这为牦牛低氧适应的分子机制研究做出了积极的贡献。

参考文献

- 蔡伯凌. 1981. 九龙牦牛调查. 中国牦牛, (1): 41~45
- 蔡立. 1992. 中国牦牛. 北京: 农业出版社
- 蔡振媛, 张同作, 慈海鑫等. 2007. 高原鼯鼠线粒体谱系地理学和遗传多样性. 兽类学报, 27 (2): 130~137
- 曹文宣. 1964. 裂腹鱼亚科鱼类的分类//伍献文. 中国鲤科鱼类志. 上海: 上海科学技术出版社: 137~197
- 曹文宣, 陈宜瑜, 武云飞等. 1981. 裂腹鱼类的起源和演化及其与青藏高原的隆起关系//中国科学院青藏高原综合科学考察队编. 青藏高原隆起的时代、幅度和形式问题. 北京: 科学出版社: 118~130
- 曹文宣, 邓中履. 1962. 四川西部及其邻近地区的裂腹鱼类. 水生生物学集刊, 2: 27~53
- 陈炳卿. 1998. 共轭亚油酸与人体健康. 国外医学卫生学分册, 25 (3): 148~150
- 陈钦明, 叶于聪. 1988. 高原低氧对高原鼠兔和大白鼠肺泡Ⅱ型细胞及表面活性物质超微机构的影响. 兽类学报, 8: 307~313
- 陈毅峰, 曹文宣. 2000. 裂腹鱼亚科鱼类的分类. 见: 乐佩琦, 单乡红, 林人端等主编. 中国动物志——硬骨鱼纲, 鲤形目 (下卷). 北京: 科学出版社, 273~390
- 陈自明, 陈毅峰. 2000. 用RAPD技术对特化级裂腹鱼类亲缘关系的探讨. 动物学研究, 21 (4): 262~268
- 成庆泰, 1958. 云南的鱼类研究. 动物学杂志, 2 (3): 153~163
- 杜继曾, 李庆芬. 1982. 模拟高原低氧对高原鼠兔和大鼠器官与血液若干指标的影响. 兽类学报, 2: 35~41
- 樊乃昌. 2001. 青海省草原鼠害的生态学及其治理对策//申忠玉, 中国与欧盟技术合作“青海省畜牧业开发项目”论文集. 西宁: 青海人民出版社: 124~140
- 樊乃昌, 谷守勤. 1981. 中华鼯鼠 (*Myospalax cansus*) 的洞道结构. 兽类学报, 1 (1): 67~72
- 傅天佑, 叶妙荣. 1984. 四川裂腹鱼属一新种的记述. 动物学研究, 5 (2): 165~168
- 戈峰. 2005. 现代生态学. 北京: 科学出版社
- 格日力, 余海茹, 陈秋红等. 1995. 高原红细胞增多症患者红细胞二磷酸甘油酸和氧亲和力变化的探讨. 中国应用生理学杂志, 11: 205~208
- 耿社民, 刘小林等. 2003. 中国家畜品种资源纲要. 北京: 中国农业出版社
- 顾浩平, 杨之, 滕国奇等. 1991. 高原鼠兔血红蛋白氧亲和力 P50 的测定. 中国应用生理学杂志, 7: 365~367
- 何德奎, 陈毅峰, 陈宜瑜等. 2003. 特化等级裂腹鱼类的分子系统发育与青藏高原隆起. 科学通报, 48 (22): 2354~2362
- 何加强, 许存和, 孟宪法等. 1994. 高原鼠兔与平原大鼠血液携氧能力的比较研究. 解放军预防医学杂志, 12: 431~435
- 和绍禹, 肖汪吉. 1998. 中甸牦牛. 黄牛杂志, 24 (2): 22~25, 45
- 黄顺友. 1985. 云南裂腹鱼类三新种及二新亚种. 动物学研究, 6 (3): 209~217
- 黄顺友, 陈宜瑜. 1986. 中甸重唇鱼和裸腹重唇鱼的系统发育关系及其动物地理学分析. 动物分类学报, 11 (1): 100~107
- 江延安, 庄海博. 1990. 黄土高原甘肃鼯鼠危害及防治研究: I. 甘肃鼯鼠的繁殖研究. 4 (4): 76~83
- 江延安, 庄海博, 李凌等. 1990. 甘肃鼯鼠的繁殖研究. 水土保持学报, 4 (4): 76~81
- 蒋志刚, 夏武平. 1985. 高原鼠兔食物资源利用的研究. 兽类学报, 5: 257~262

- 赖松家,王玲,刘益平等. 2005. 中国部分牦牛品种线粒体 DNA 遗传多样性研究. 遗传学报, 32 (5): 463~470
- 李长安,殷鸿福,于庆文. 1999. 东昆仑山构造隆升与水系演化及其发展趋势. 科学通报, 44 (2): 211~214
- 李长安,殷鸿福,于庆文等. 1998. 昆仑山东段的构造隆升、水系相应与环境变化. 地球科学: 中国地质大学学报, 23 (5): 456~459
- 李金钢,何建平,王廷正. 2003. 笼养条件下甘肃鼯鼠夏秋季行为活动节律. 西北大学学报 (自然科学版) 33 (2): 217~222
- 李孔亮,陆仲磷. 1990. 牦牛科学研究论文集. 兰州: 甘肃民族出版社: 27~30
- 李庆芬,陈晓光,尤治秉等. 1987. 急性高原性低氧对三种小哺乳动物肝脏作用的比较. 兽类学报, 7: 51~57
- 李庆芬,尤治秉,陈晓光等. 1984. 慢性高原低氧对高原鼠兔和大鼠肝脏的作用. 兽类学报, 6: 261~266
- 李思忠,戴定远,张世义等. 1966. 新疆北部鱼类的调查研究. 动物学报, 18 (1): 41~56
- 李思忠,张世义. 1974. 甘肃河西走廊鱼类新种及新亚种. 动物学报, 20 (4): 414~419
- 李晓晨,李娜,王冬. 2001. 鼯鼠洞道结构的建筑工程学分析. 陕西师范大学学报 (自然科学版), 29 (3): 86~90
- 李晓晨,刘敏,李金刚. 1991. 甘肃鼯鼠中华鼯鼠种群动态及测报. 陕西师范大学学报, (增刊): 9~15
- 李子魏,孙儒泳,杜继增等. 1998. 高原鼠兔的季节性繁殖. 兽类学报, 18 (1): 42~49
- 梁杰荣. 1981. 高原鼠兔的家庭结构. 兽类学报, 1 (2): 159~165
- 刘国富,温得启,胡晓梅. 1985. 高原鼠兔和高原鼯鼠乳酸脱氢酶同工酶的初步研究. 兽类学报. 5 (3): 223~228
- 刘焕金,李承节. 1984. 中华鼯鼠洞穴的研究. 动物学杂志, 2: 28~30
- 刘志杰,孙永军. 2007. 青藏高原隆升与黄河形成演化. 地理与地理信息科学, 23 (1): 79~91
- 柳劲松,李庆芬. 1996. 高原鼠兔冷驯化和脱冷驯化中产热变化. 动物学报, 42 (4): 377~385
- 陆仲磷. 1990. 牦牛科学研究论文集. 兰州: 甘肃民族出版社
- 吕国蔚. 2001. 低氧耐受动物细胞的耐低氧策略. 高原医学杂志, 11 (1): 63~65
- 罗泽珣,陈卫,高武等. 2000. 中国动物志兽纲. 第六卷: 啮齿目 (下册), 仓鼠科. 北京: 科学出版社
- 马志军,王晋青,王可. 1994. 高原鼠兔和高原灰尾野兔红细胞扫描电镜形态计量研究. 青海医学院学报, 15: 31~35
- 马志军,王可,张先钧. 2000. 高原灰尾兔和高原鼠兔骨髓红系细胞 Feret's 直径研究. 高原医学杂志, 10: 6~7
- 潘保田,李吉均,曹继秀等. 1996. 化隆盆地地貌演化与黄河发育研究. 山地研究, 14 (3): 153~158
- 祁学斌. 2000. 甘肃牦牛乳蛋白遗传多样性的研究 (硕士学位论文). 兰州: 甘肃农业大学
- 任慕莲,武云飞. 1982. 西藏纳木错的鱼类. 动物学报, 28 (1): 80~86
- 阮宗海,陈华伟,陈秋红等. 2000. 不同海拔高原鼠兔、大白鼠血红蛋白电泳及血液学对比观察. 中国应用生理学杂志, 16: 91~95
- 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 2002. 分子克隆实验指南. 北京: 科学出版社: 463~470
- 余海茹,格日力,陈秋红等. 1997. 高原鼠兔红细胞 2, 3-二磷酸甘油酸含量的测定. 高原医学杂志, 7: 38~40
- 施银柱,樊乃昌,王学高等. 1978. 高原鼠兔种群年龄及繁殖研究. 灭鼠和鼠类生物研究报告第 3 集. 北京: 科学出版社: 104~117

- 苏建平, 刘季科. 2000. 哺乳动物进化过程中体重增大的原因浅析. 兽类学报, 20 (1): 58~66
- 孙鸿烈, 郑度. 1998. 青藏高原形成演化与发展. 广州: 广东科技出版社
- 汤盈, 侯天德, 李爱红. 2006. 缺氧诱导因子-1 (HIF-1) 对促红细胞生成素 (EPO) 等靶基因表达的影响. 四川体育科学, 3: 26~29
- 唐云, 顾倬云. 1999 亚油酸对红细胞膜磷脂脂肪酸组成的作用. 营养学报, 21 (3): 344~346
- 涂正超. 1996. 中国牦牛遗传多样性及遗传分化研究 (博士学位论文). 杨陵: 西北农业大学
- 涂正超, 张亚平, 邱怀. 1998. 中国牦牛线粒体 DNA 多态性及遗传分化. 遗传学报, 25 (3): 205~212
- 王德华, 王祖望. 1990. 小哺乳动物在高寒环境中的生存对策 II: 高原鼠兔和根田鼠非颤抖型产热的季节性变化. 兽类学报, 10 (1): 40~53
- 王德华, 王祖望. 1992. 褐色脂肪组织及其产热研究进展. 生态学杂志, 11 (3): 43~48
- 王俊森, 柳劲松, 杨秀芝等. 1997. 东北鼯鼠种群生长指标的主分量分, 兽类学报, 1: 62, 76~78
- 王玲. 2004. 中国牦牛线粒体 DNA 多态性及遗传分化研究. 硕士学位论文. 雅安: 四川农业大学
- 王香亭, 何洳良, 赵宏漠. 1956. 兰州附近黄河的鱼类. 生物学通报, 8: 14~19
- 王晓勤, 王占刚, 陈秋红等. 2001. 高原鼠兔肺动脉压与 NO 的变化. 高原医学杂志, 11: 2~6
- 王学高, Smith A T. 1998. 高原鼠兔冬季自然死亡率. 兽类学报, 8 (2): 152~156
- 王学高, 戴克华. 1991. 高原鼠兔种群繁殖生态的研究. 动物学研究, 12 (2): 155~161
- 王祖望. 1975. 鼯鼠数量与地面痕迹的关系. 灭鼠和鼠类生物学研究报告, 第二集. 北京: 科学出版社: 83~934
- 王祖望, 曾绪祥, 韩永才. 1979. 高原鼠兔和中华鼯鼠气体代谢研究. 动物学报, 25 (1): 75~84
- 魏登邦, 马建宾. 2001. 高原鼯鼠和小白鼠心肌及骨骼肌肌红蛋白含量和乳酸脱氢酶活性的比较研究. 青海大学学报, 19 (2): 20~21
- 魏登邦, 张宝琛. 2002. 高原鼯鼠肌肉脂溶性物质的抗缺氧效果与化学成分. 动物学报, 48 (6): 764~769
- 魏万红, 樊乃昌, 周文扬等. 2000. 繁殖期高原鼠兔的攻击行为. 动物学报, 46 (3): 278~286
- 魏万红, 周文扬, 樊乃昌. 1994. 香鼯的栖息地选择、觅食和育幼行为. 兽类学报, 14: 184~188
- 武云飞. 1984. 中国裂腹鱼亚科鱼类分类与系统关系研究. 高原生物学集刊, 3: 119~139
- 武云飞, 吕克强. 1983. 贵州省几种裂腹鱼的分类讨论. 动物分类学报, 8 (3): 335~336
- 武云飞, 吴翠珍. 1988. 黄河源头及星宿海的鱼类. 动物分类学报, 13 (2): 195~200
- 武云飞, 吴翠珍. 1991. 青藏高原鱼类. 成都: 四川科学技术出版社
- 武云飞, 朱松泉. 1979. 青海省果洛和玉树地区鱼类. 动物分类学报, 4 (3): 287~296
- 武云飞, 朱松泉. 1979. 西藏阿里鱼类分类、区系研究及资源概况//西藏阿里地区动植物考察报告. 北京: 科学出版社
- 谢印芝, 杨曦明, 马子敏. 2000. 低氧大鼠脑、肺组织、NO、NOS 变化及机理研究. 高原医学杂志, 10 (1): 4~6
- 姚檀栋, Thompson L G, 施雅风等. 1997. 古里雅冰芯中末次间冰期以来气候变化记录研究. 中国科学 (D 辑), 27 (5): 447~452
- 叶润荣, 曹伊凡. 1995. 高原鼠兔红细胞免疫功能的研究. 兽类学报, 15: 298~301
- 叶润荣, 曹伊凡, 白琴华. 1994. 高原鼠兔的血象及其与低氧适应的关系. 中国实验动物学报, 2: 115~120
- 叶润荣, 樊乃昌, 白琴华. 1993. 新开发实验动物——高原鼠兔. 动物学杂志, 28: 51~53
- 殷宝法, 魏万红, 张堰铭等. 2003. 微卫星技术在高原鼠兔行为研究中的应用. 动物学研究, 24 (6):

- 401~406
- 俞诗源, 尤启斌. 1996. 鼠兔肺毛细血管铸型的扫描电镜观察. 西北师范大学学报, 32: 115~117
- 岳佐和, 黄宏金. 1964. 中国鲤科鱼类一新属、新种. 水生生物学集刊, 5 (1): 27~30
- 张才骏, 王应安, 李清军等. 1991. 青海高原牛 β -乳球蛋白多态性的调查研究. 青海畜牧兽医学院学报, 8 (1): 16~21
- 张才骏, 魏雅萍. 2000. 大通家牦牛乳蛋白的多态性. 青海畜牧兽医杂志, 30 (1): 3~5
- 张春霖. 1954. 中国淡水鱼类分布. 地理学报, 20 (3): 279~284
- 张春霖. 1959. 中国系统鲤类志. 北京: 高等教育出版社
- 张春霖, 王文滨. 1962. 西藏鱼类初篇. 动物学报, 14 (4): 529~536
- 张春霖, 岳佐和, 黄宏金. 1964. 西藏南部的裸鲤属 (*Gymnocypris*) 鱼类. 动物学报, 16 (1): 139~154
- 张春霖, 张玉琳. 1965. 青海省扎陵湖及大通河的几种鱼类. 动物学杂志, 7 (3): 121~122
- 张道川, 周文扬, 张堰铭. 1993. 人工饲养高原鼢鼠生长和发育的观察. 兽类学报, 13 (4): 304~306
- 张孚允, 杨若莉. 1980. 中华鼢鼠种群生态的研究. 兰州大学学报 (自然科学版), 12: 148~165
- 张容昶. 1989. 中国的牦牛. 兰州: 甘肃科学技术出版社
- 张新时. 1978. 西藏植被的高原地带性. 植物学报, 20 (2): 140~149
- 张彦博. 1996. 人与高原——高原习服与适应. 81~89, 51~60, 292~296
- 赵建文, 田海秋, 孙淑芬等. 1997. 高原鼠兔部分生理及血液生化测定值. 上海实验动物科学, 17: 223~225
- 赵凯, 李俊兵, 杨公社等. 2005. 青海湖及其相邻水系特有裸鲤属鱼类的分子系统发育. 科学通报, 50 (13): 1348~1355
- 赵兴波, 钟光辉. 1995. 牦牛乳蛋白多态性的研究. 西南民族学院学报 (自然科学版), 21 (1): 54~56
- 郑度, 姚檀栋. 2004. 青藏高原隆升与环境效应. 北京: 科学出版社
- 郑玉才. 1991. 放牧条件下四川牦牛泌乳生理生化若干特性的研究 (硕士学位论文). 南京: 南京农业大学
- 郑玉才, 韩正康. 1996. 麦洼牦牛和犏牛乳蛋白的遗传多态, 西南民族学院学报 (自然科学版), 22 (4): 421~424
- 中国科学院青藏高原综合科学考察队. 1981. 西藏家畜. 北京: 科技出版社
- 《中国牦牛学》编写委员会. 1989. 中国牦牛学. 成都: 四川科学技术出版社
- 《中国牛品种志》编写组. 1986. 中国牛品种志. 上海: 上海科学技术出版社
- 中国畜禽遗传资源状况编委会. 2004. 中国畜禽遗传资源状况. 北京: 中国农业出版社: 18
- 钟金城, 陈智华, 赵素君等. 2006. 牦牛生态类型的分类. 生态学报, 26 (7): 2068~2072
- 钟金城, 陈智华, 字向东等. 2001. 牦牛品种的聚类分析. 西南民族学院学报 (自然科学版), 27 (1): 92~94
- 钟金城, 赵素君, 陈智华等. 2006. 牦牛品种的遗传多样性及分类研究. 中国农业科学, 39 (2): 389~397
- 朱松泉, 武云飞. 1975. 青海湖地区鱼类区系//青海湖地区的鱼类区系和青海湖裸鲤的生物学. 北京: 科学出版社
- 朱筱敏, 康安, 韩德馨等. 2003. 柴达木盆地第四纪环境演变、构造变形与青藏高原隆升的关系. 地质科学, 38 (3): 413~424
- Acker H, Dufau E, Huber J, et al. 1989. Indications to an NADPH oxidase as a possible pO_2 sensor in the rat carotid body. FEBS Lett, 256: 75~78
- Acker H. 1994a. Cellular oxygen sensors. Ann N Y Acad Sci, 718: 3~10; discussion 11~12
- Acker H. 1994b. Oxygen sensing in the carotid body: ideas and models. Adv Exp Med Biol, 360: 21~27

- Ackers G K. 1979. Linked functions in allosteric proteins: an exact theory for the effect of organic phosphates on oxygen affinity of hemoglobin. *Biochemistry*, 18: 3372~3380
- Adams W H, Graves I L, Pyakural S. 1975. Hematologic observations on the yak. *Proc Soc Exp Biol Med*, 148: 701~705
- Ahima R S, Flier J. 2000. Leptin. *Annu Rev Physiol*, 62: 413~437
- Akimoto T, Kusano E, Inaba T. 2000. Erythropoietin regulates vascular smooth muscle cell apoptosis by a phosphatidylinositol 3 kinase2dependent pathway. *Kidney Int*, 58 (2): 269~282
- Alfke H, Kleb B, Klose K J. 2000. Nitric oxide inhibits the basic fibroblast growth factor-stimulated migration of bovine vascular smooth muscle cells in vitro. *Vasa* 29: 99~102
- Alpers D L, Vuuren B J V, Arctander P, et al. 2004. Population genetics of the roan antelope (*Hippotragus equinus*) with suggestions for conservation. *Molecular Ecology*, 13: 1771~1784
- Alroy J. 2001. A multispecies overkill simulation of the end-Pleistocene megafaunal mass extinction. *Science*, 292 (5523): 1893~1896
- Anand I S, Harris E, Ferrari R, et al. 1986. Pulmonary haemodynamics of the yak, cattle, and cross breeds at high altitude. *Thorax*, 41: 696~700
- Anand I S. 1988. The pulmonary circulation of some domestic animals at high altitude. *Inter J Biometeor*, 32: 56~64
- Ansell W F H. Family Artiodactyla. 1971. In: Meester J, Setzer H W eds. *The Mammals of African: An Identification Manual*, Part 2. 15. Washington DC: Smithsonian Institution Press
- Archer S L, Huang J, Henry T, et al. 1993. A redox-based O₂ sensor in rat pulmonary vasculature. *Circ Res*, 73: 1100~1112
- Archer S L, Reeve H L, Michelakis E, et al. 1999. O₂ sensing is preserved in mice lacking the gp91 phox subunit of NADPH oxidase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96: 7944~7949
- Arieli R. and Nevo, E. 1991. Hypoxic survival differs between two mole rat species (*Spalax ehrenbergi*) of humid and arid habitats, *Comp Biochem Physiol*, A 100: 543~545
- Arieli, R. 1989. Adaptation of the mammalian gas transport system to subterranean life. //Nevo E, Reig O A. *Evolution of Subterranean Mammals at the Organismal and Molecular Levels*. New York Wiley-Liss: 251~268
- Ashwell C M, Richards M P, McMurty J P. 2001. The ontogeny of leptin mRNA expression in growing broilers and its relationship to metabolic body weight. *Domest Anim Endocrinol*, 21: 161~168
- Ashworth C J, Hoggard N, Thomas L, et al. 2000. Placental leptin. *Rev Reprod*, 5: 18~24
- Avise J C, Neigel J E, Arnold J. 1984. Demographic influences on mitochondrial lineage survivorship in animal population. *Journal of Molecular Evolution*, 20 (2): 99~105
- Avise J C. 1994. *Molecular Markers, Natural History and Evolution*, London: Chapman & Hall
- Avise J C. 2000. *Phylogeography the history and formation of species*. Cambridge MA: Harvard University Press
- Bacic M, Edwards N A, Merrill M J. 1995. Differential expression of vascular endothelial growth factor (vascular permeability factor) forms in rat tissues. *Growth Factors*, 12: 11~15
- Bado A, Levasseur S, Attoub S, et al. 1998. The stomach is a source of leptin. *Nature*, 394: 790~793
- Bailey D M, Ainslie P N, Jackson S K, et al. 2004. Evidence against redox regulation of energy homeosta-

- sis in humans at high altitude. *Clin Sci (Lond)*, 107: 589~600
- Bandero N, Grover R F, Will J A. 1971. High altitude-induced pulmonary arterial hypertension in the llama (*Lama glama*). *Am J Physiol*, 220: 422~427
- Bandelt H J, Forster P, Rohl A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 16: 37~48
- Barrett J D, Zhang Z, Zhu J H. 1998. Erythropoietin unregulates angiotensin receptors in cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Hypertens*, 16 (9): 1749~1757
- Bartsch P, Pfluger N, Audetat M, et al. 1991. Effects of slow ascent to 4559 M on fluid homeostasis. *Aviat Space Environ Med*, 62: 105~110
- Bartsch P, Shaw S, Franciolli M, et al. 1988. Atrial natriuretic peptide in acute mountain sickness. *J Appl Physiol*, 65: 1929~1937
- Bazan J F. 1990. Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily. *Proc Natl Acad Sci USA*, 87: 6934~6938
- Beall C M, Reichsman A B. 1984. Hemoglobin levels in a Himalayan high altitude population. *Am J Phys Anthropol*, 63: 301~306
- Beall C M, Laskowski D, Strohl K P, et al. 2001. Pulmonary nitric oxide in mountain dwellers. *Nature*, 414: 411~412
- Beja-Pereira A, England P R, Ferrand N, et al. 2004. African origins of the domestic donkey. *Science*, 304: 1781
- Belkin V S, Astakhov O B, Gutorov S L. 1985. Capillarization of myocardium in the yak, *Arkh Anat Gistol Embriol*, 88: 53~57
- Berra E, Benizri E, Ginouves A, et al. 2003. HIF prolyl-hydroxylase 2 is the key oxygen sensor setting low steady-state levels of HIF-1 in normoxia. *EMBO J*, 22: 4082~4090
- Bestle M H, Olsen N V, Poulsen T D, et al. 2002. Prolonged hypobaric hypoxemia attenuates vasopressin secretion and renal response to osmostimulation in men. *J Appl Physiol*, 92: 1911~1922
- Bjorbaek C, Uotani S, da Silva B, Flier J S. 1997. Divergent signaling capacities of the long and short isoforms of the leptin receptor. *J Biol Chem*, 272: 32686~32695
- Bleeker P. 1860. *Conspectus systematis Cyprinorm*. *Nat. Tijd. Ned-Indie*, 20: 421~441
- Bleeker P. 1862. *Atlas ichthyologique des Indes Orientales Néerlandaises*, publié sous les auspices du Gouvernement colonial néerlandais Amsterdam. 1862~1877, 3 Cyprins: 1~150
- Bleeker P. 1863. *Systema cyprinoidorum revisum*. *Ned. Tijd. Dierk* 1: 187~218
- Blum W F, Englaro P, Hanitsch S, et al. 1997. Plasma leptin levels in healthy children and adolescents: dependence on body mass index, fat mass, gender, pubertal stage, and testosterone. *J Clin Endocrinol Metab*, 82: 2904~2910
- Boden G, Chen X, Mozzoli M, et al. 1996. Effect of fasting on serum leptin in normal human subjects. *J Clin Endocrinol Metab*, 81: 3419~3423
- Bohlken H. 1958. Vergleichende Untersuchungen an Wildrindern (Tribus Bovini Simpson, 1954). *Zool Jahrb*, 68: 113~202
- Bohlken H. 1961. Haustiere und Zoologische Systematik. *Z Tier Zuchtungsbiol*, 76: 107~113
- Bonnet M, Gourdou I, Leroux C, et al. 2002. Leptin expression in the ovine mammary gland: putative se-

- quential involvement of adipose, epithelial, and myoepithelial cells during pregnancy and lactation. *J Anim Sci*, 80: 723~728
- Bornstein S R, Licinio J, Tauchnitz R, et al. 1998. Plasma leptin levels are increased in survivors of acute sepsis; associated loss of diurnal rhythm in cortisol and leptin secretion. *J Clin Endocrinol Metab*, 83: 280~283
- Botney M D, Bahadori L, Gold L I. 1994. Vascular remodeling in primary pulmonary hypertension. Potential role for transforming growth factor-beta. *Am J Pathol*, 144: 286~295
- Boutellier U, Howald H, di Prampero P E, et al. 1983. Human muscle adaptations to chronic hypoxia. *Prog Clin Biol Res*, 136: 273~285
- Boyd D P. 2003. Conservation of North American Bison: Status and Recommendation. Calgary, Alberta, 27~28
- Bradley D G, MacHugh D E, Cunningham M P, et al. 1996. Mitochondrial diversity and the origins of African and European cattle. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 93: 5131~5135
- Brian J E, Faraci F M, Heistad D D. 1996. Recent insights into the regulation of cerebral circulation. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 23: 449~457
- Bromham L, Penny D. 2003. The modern molecular clock. *Nature Reviews Genetics*, 4: 216~224
- Brook B W, Bowman D. 2004. The uncertain blitzkrieg of Pleistocene megafauna. *J Biogeogr*, 31 (4): 517
- Brooks G A, Butterfield G E, Wolfe R R, et al. 1991. Increased dependence on blood glucose after acclimatization to 4, 300 m. *J Appl Physiol*, 70: 919~927
- Bruford M W, Bradley D G, Luikart G. 2003. DNA markers reveal the complexity of livestock domestication. *Nature Reviews Genetics*, 4: 900~910
- Bruick R K, McKnight S L. 2001. A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. *Science*, 294: 1337~1340
- Buchbinder A, Lang U, Baker R S, et al. 2001. Leptin in the ovine fetus correlates with fetal and placental size. *Am J Obstet Gynecol*, 185: 786~791
- Buck A, Schirlo C, Jasinsky V, et al. 1998. Changes of cerebral blood flow during short-term exposure to normobaric hypoxia. *J Cereb Blood Flow Metab*, 18: 906~910
- Bunn H F, Gu J, Huang L E, et al. 1998. Erythropoietin: a model system for studying oxygen-dependent gene regulation. *J Exp Biol*, 201: 1197~1201
- Bunn H F, Poyton R O. 1996. Oxygen sensing and molecular adaptation to hypoxia. *Physiol Rev*, 76: 839~885
- Cai Z Q, Manalo D J, Wei G. 2003. Hearts from rodents exposed to intermittent hypoxia or erythropoietin are protected against ischemia/reperfusion injury. *Circulation*, 107 (1): 79~85
- Cancello R, Zingaretti M C, Sarzani R, et al. 1998. Leptin and Ucp1 genes are reciprocally regulated in brown adipose tissue. *Endocrinology*, 139: 4747~4750
- Cannon B, Nedergaard J. 2004. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev*, 84: 277~359
- Cantarore P, Roberti M, Pesole G, et al. 1994. Evolutionary analysis of cytochrome b sequences in some Perciformes: Evidence for a slower rate of evolution than in mammals. *J Mol Evol*, 39: 589~597
- Chan J L, Bluher S, Yiannakouris N, et al. 2002. Regulation of circulating soluble leptin receptor levels by

- gender, adiposity, sex steroids, and leptin: observational and interventional studies in humans. *Diabetes*, 51: 2105~2112
- Chandel N S, Maltepe E, Goldwasser E, et al. 1998. Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95: 11715~11720
- Chandel N S, Schumacker P T. 2000. Cellular oxygen sensing by mitochondria: old questions, new insight. *J Appl Physiol*, 88: 1880~1889
- Chen J, He L, Dinger B, et al. 2000. Cellular mechanisms involved in rabbit carotid body excitation elicited by endothelin peptides. *Respir Physiol*, 121: 13~23
- Chen Q H, Ge R L, Wang X Z, et al. 1997. Exercise performance of Tibetan and Han adolescents at altitudes of 3, 417 and 4, 300 m. *J Appl Physiol*, 83: 661~667
- Chen S Y, Su Y H, Wu S F, et al. 2005. Mitochondrial diversity and phylogeographic structure of Chinese domestic goats. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 37: 804~814
- Chen Z M, Chen Y F. 2001. Phylogeny of the specialized Schizothoracine fishes (Teleostei; Cypriniformes; Cyprinidae). *Zoological Studies*, 40 (2): 147~157
- Cherhab F F, Mounzih K, Lu R, et al. 1997. Early onset of reproductive function in normal female mice treated with leptin. *Science*, 275: 88~90
- Christensson A G, Danielson B G, Lethagen S R. 2001. Normalization of haemoglobin concentration with recombinant erythropoietin has minimal effect on blood haemostasis. *Nephro Dial Transplant*. 16 (2): 313~319
- Chu Y T (朱元鼎). 1935. Comparative studies on the scales and on the pharyngeals and their teeth in Chinese cyprinids, with particular reference to the taxonomy and evolution. *Biological Bulletin of Shanghai John's University*, 2: 9~255
- Chun Y S, Choi E, Kim T Y, et al. 2002. A dominant-negative isoform lacking exons 11 and 12 of the human hypoxia-inducible factor-1 α gene. *Biochem J*, 362: 71~79
- Chung S L, Lo C, Lee T Y, et al. 1998. Diachronous uplift of the Tibetan plateau starting 40 Myr ago. *Nature*, 394: 769~773
- Clement M, Posada D, Crandall K A. 2000. TCS: A computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology*, 9: 1657~1659
- Cook B D, Baker A M, Page T J, et al. 2006. Biogeographic history of an Australian freshwater shrimp, *Paratya australiensis* (Atyidae): the role life history transition in phylogeographic diversification. *Molecular Ecology*, 15: 1083~1093
- Corbet G B. 1978. in *The Mammals of the Palaearctic Region: A Taxonomic Review*. (British Museum and Cornell Univ. Press, New York), 67~69
- Cornwell T L, Arnold E, Boerth N J, et al. 1994. Inhibition of smooth muscle cell growth by nitric oxide and activation of cAMP-dependent protein kinase by cGMP. *Am J Physiol*, 267: 1405~1413
- Correia M L, Morgan D A, Mitchell J L, et al. 2001. Role of Corticotrophin-Releasing Factor in Effects of Leptin on Sympathetic Nerve Activity and Arterial Pressure. *Hypertension*, 38: 384~388
- Coultas L, Chawengsaksophak K, Rossant J. 2005. Endothelial cells and VEGF in vascular development. *Nature*, 438: 937~945
- Crandall K A, Templeton A R. 1993. Empirical tests of some predictions from coalescent theory with appli-

- cations to intraspecific phylogeny reconstruction. *Genetics*, 134: 959~969
- Crespi B J, Fulton M J. 2004. Molecular systematics of Salmonidae: combined nuclear data yields a robust phylogeny. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 31: 658~679
- Czyzyk-Krzeska M F, Furnari B A, Lawson E E, et al. 1994. Hypoxia increases rate of transcription and stability of tyrosine hydroxylase mRNA in pheochromocytoma (PC12) cells. *J Biol Chem*, 269: 760~764
- Cárdenas L, Hernández C E, Poulina E, et al. 2005. Origin, diversification, and historical biogeography of the genus *Trachurus* (Perciformes: Carangidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 35: 496~507
- Damert A, Ikeda E, Risau W. 1997. Activator-protein-1 binding potentiates the hypoxia-inducible factor-1-mediated hypoxia-induced transcriptional activation of vascular-endothelial growth factor expression in C6 glioma cells. *Biochem J*, 327 (Pt 2): 419~423
- Danahoo W T, Jensen D R, Yost T J, et al. 1997. Isoproterenol and somatostatin decrease plasma leptin in humans: a novel mechanism regulating leptin secretion. *J Clin Endocrinol Metab*, 82: 4139~4143
- Day F. 1871. Monograph of Indian Cyprinidae. *Journ. Roy. Asiat. Soc. Bengal*. 40 (2): 337~367
- de Cabrera L A, Almeida G D, Perez M I, et al. 2004. Leptin and altitude in the cardiovascular diseases. *Obes Res*, 12: 1492~1498
- Detmar M, Brown L F, Berse B, et al. 1997. Hypoxia regulates the expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor (VPF/VEGF) and its receptors in human skin. *J Invest Dermatol*, 108: 263~268
- Deudero J J, Caramelo C, Castellanos M C, et al. 2008. Induction of hypoxia-inducible factor 1alpha gene expression by vascular endothelial growth factor. Role of a superoxide-mediated mechanism. *J Biol Chem*
- Devos R, Guisez Y, Van der Heyden J, et al. 1997. Ligand-independent dimerization of the extracellular domain of the leptin receptor and determination of the stoichiometry of leptin binding. *J Biol Chem*, 272: 18304~18310
- Diamond J. 2002. Evolution, consequences and future of plant and animal domestication. *Nature*, 418: 700~707
- Dobson F S, Smith A T, Wang X G. 2000. The mating system and gene dynamics of plateau pikas. *Behavioural Processes*, 51 (1-3): 101~110
- Dong G, Wang G, Chen H, et al. 1995. The formation and evolution of the deserts in China and their relation to the uplifting of Qinghai-Tibet Plateau. In "Qinghai-Tibet Plateau and Global Variations" (China Society of the Qinghai-Tibet Plateau Research, Eds.). Beijing: China Meteorological Press: 13~29
- Drutel G, Kathmann M, Heron A, et al. 2000. Two splice variants of the hypoxia-inducible factor HIF-1alpha as potential dimerization partners of ARNT2 in neurons. *Eur J Neurosci*, 12: 3701~3708
- Duranteau J, Chandel N S, Kulisz A, et al. 1998. Intracellular signaling by reactive oxygen species during hypoxia in cardiomyocytes. *J Biol Chem*, 273: 11619~11624
- Durmowicz A G, Hofmeister S, Kadyraliev T K, et al. 1993. Functional and structural adaptation of the yak pulmonary circulation to residence at high altitude. *J Appl Physiol*, 74: 2276~2285
- Ema M, Taya S, Yokotani N, et al. 1997. A novel bHLH-PAS factor with close sequence similarity to hypoxia-inducible factor 1alpha regulates the VEGF expression and is potentially involved in lung and vascular development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94: 4273~4278
- Fagan K A, Weil J V. 2001. Potential genetic contributions to control of the pulmonary circulation and venti-

- lation at high altitude. *High Alt Med Biol* 2: 165~171
- Famulski W, Sulkowska M, Wincewicz A, et al. 2006. P53 correlates positively with VEGF in preoperative sera of colorectal cancer patients. *Neoplasma*, 53: 43~48
- Fang P W (方炳文). 1936. On some schizothoracid fishes from Western China preserved in the National Research Institute of Biology, Academy Sinica, Sinensia, 7 (4): 421~458
- Fang X, Li J, Zhu J, Zhong W, Lu W, Wang J. 1995. Environmental change of the Linxia Basin and the uplift of the Tibetan Plateau. In "Qinghai-Tibetan Plateau and Global Variations" (China Society of the Qinghai-Tibetan Plateau Research, Eds.). Beijing: China Meteorological Press; 41~51
- Farber H W, Loscalzo J. 2004. Pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med*, 351: 1655~1665
- Ferrara N, Henzel W J. 1989. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 161: 851~858
- Ferrara N. 2004. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev*, 25: 581~611
- Flerow C C. 1980. Zur geographischen Verbreitung der Gattung *Poephagus* im Pleistozan und Holozan. *Quartarpalaontolog*, 4: 123~126
- Folkman J. 1995. Clinical Applications of Research of Angiogenesis. *New Engl. J. Med.* 285, 1757~1763
- Forster P, Harding R, Torroni A, et al. 1996. Origin and evolution of Native American mtDNA variation: a reappraisal. *The American Journal of Human Genetics*, 59: 935~945
- Forsythe J A, Jiang B H, Iyer N V, et al. 1996. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol*, 16: 4604~4613
- Fu Y X. 1997. Statistics tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*, 147: 915~925
- Gavrilova O, Barr V, Marcus-Sarnuels B, et al. 1997. Hyperleptinaemia of pregnancy associated with the appearance of a circulating form of the leptin receptor. *J Biol Chem*, 272: 45898~45903
- Ge R L, Chen Q H, Wang L H, et al. 1994. Higher exercise performance and lower VO_2max in Tibetan than Han residents at 4, 700 m altitude. *J Appl Physiol*, 77: 684~691
- Ge R L, Chen Q H, Wang L H, et al. 1995. Comparisons of oxygen transport between Tibetan and Han residents at moderate altitude. *Wilderness and Environmental Medicine*, 6: 391~400
- Ge R L, Kubo K, Kobayashi T, et al. 1998. Blunted hypoxic pulmonary vasoconstrictive response in the rodent *Ochotona curzoniae* (pika) at high altitude. *Am J Physiol*, 274: 1792~1799
- Gerald W, Han J L, Long R J. 2003. The Yak, second ed. , Food Agriculture Organization of the United Nations Regional Office for Asia and the Pacific Bangkok, Thailand
- Giuffra E, Kijas J M H, Amarger V, et al. 2000. The origin of the domestic pig: independent domestication and subsequent introgression. *Genetics*, 154: 1785~1791
- Glasow A, Kiess W, Anderegg U, et al. 2001. Expression of leptin (Ob) and leptin receptor (OB-R) in human fibroblasts: regulation of leptin secretion by insulin. *J Clin Endocrinol Metab*, 86: 4472~4479
- Gledhill N, Beirne G J, Dempsey J A. 1975. Renal response to short-term hypocapnia in man. *Kidney Int*, 8: 376~384
- Goldberg M A, Dunning S P, Bunn H F. 1988. Regulation of the erythropoietin gene: evidence that the oxygen sensor is a heme protein. *Science*, 242: 1412~1415

- Goldberg M A, Schneider T J. 1994. Similarities between the oxygen-sensing mechanisms regulating the expression of vascular endothelial growth factor and erythropoietin. *J Biol Chem*, 269: 4355~4359
- Goldberg-Cohen I, Furneaux H, Levy A P. 2002. A 40bp RNA element that mediates stabilization of vascular endothelial growth factor mRNA by HuR. *J Biol Chem*, 277: 13635~13640
- Gong D W, Bi S, Pratley R E, et al. 1996. Genomic structure and promoter analysis of the human obese gene. *J Biol Chem*, 271: 3971~3974
- Gothie E, Richard D E, Berra E, et al. 2000. Identification of alternative spliced variants of human hypoxia-inducible factor-1 α . *J Biol Chem*, 275: 6922~6927
- Gradin K, McGuire J, Wenger R H, et al. 1996. Functional interference between hypoxia and dioxin signal transduction pathways: competition for recruitment of the Arnt transcription factor. *Mol Cell Biol*, 16: 5221~5231
- Grasso P, Leinung M C, Ingher S P, et al. 1997. In vivo effects of leptin-related synthetic peptides on body weight and food intake in female ob / ob mice: localization of leptin activity to domains between amino acid residue 106-140. *Endocrinology*, 138: 1413~1418
- Grasso P, Leinung M C, Lee D W. 1999a. Epitope mapping of secreted mouse leptin utilizing peripherally administered synthetic peptides. *Regul Pept*, 85: 93~100
- Grasso P, White D W, Tartaglia L A, et al. 1999b. Inhibitory effects of leptin-related synthetic peptide 116-130 on food intake and body weight gain in female C57BL/6J ob/ob mice may not be mediated by peptide activation of the long isoform of the leptin receptor. *Diabetes*, 48: 2204~2220
- Grosfeld A, Andre J, Mouzon S H, et al. 2002. Hypoxia-inducible Factor 1 Transactivates the Human Leptin Gene Promoter. *J Biol Chem*, 277: 42953~42957
- Grosfeld A, Zilberfarb V, Turban S, et al. 2002. Hypoxia increase leptin expression in human PAZ6 adipose cells. *Diabetologia*, 45: 527~530
- Groves B M, Droma T, Sutton J R, et al. 1993. Minimal hypoxic pulmonary hypertension in normal Tibetans at 3, 658 m. *J Appl Physiol*, 74: 312~318
- Groves C P. 1981. Systematic relationships in the Bovini (Artiodactyla, Bovidae). *Z Zool Syst Evolutionforsch*, 19: 264~278
- Grunfeld C, Zhao C, Fuller J, et al. 1996. Endotoxin and cytokines induce expression of leptin, the ob gene product, in hamsters. *J Clin Invest*, 97: 2152~2157
- Guo S C, Savolainen P, Su J P, et al. 2006. Origin of mitochondrial DNA diversity of domestic yaks. *BMC Evolutionary Biology*, <http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1471-2148-6-73.pdf>
- Guo X G, He S P, Zhang Y G. 2005. Phylogeny and biogeography of Chinese sisorid catfishes re-examined using mitochondrial cytochrome *b* and 16S rRNA gene sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 35: 344~362
- Gupta A K. 2004. Origin of agriculture and domestication of plants and animals linked to early Holocene climate amelioration. *Current Science*, 87: 54~59
- Guthrie R D. 2003. Rapid body size decline in Alaskan Pleistocene horses before extinction. *Nature*, 426: 169~171
- Günther A. 1868. Catalogue of the fish in the British Museum. *Lodon*. 7: 1~512
- Günther A. 1873. Report on a collection of fishes from China. *Ann Mag nat Hist*, 12 (4): 239~252

- Günther A. 1876. Remark on Fishes, with descriptions of new species in the British Museum, chiefly from Southern Seas. *Ann Mag nat Hist*, 17 (4): 389~402
- Günther A. 1888. Contribution to our knowledge of the fishes of the Yangtze-Kiang. *Ann Mag nat Hist*, 1 (6): 429~435
- Günther A. 1889. Third contribution to our knowledge of retiles and fishes from the upper Yangtze-Kiang. *Ann Mag nat Hist*, 4 (6): 218~229
- Hall E R. 1981. In *The Mammals of North America* 2nd ed. New York: John WI Sons
- Hamilton B S, Paglia D, Kwan A Y M, et al. 1995. Increased obese mRNA expression in omental fat cells from mas-sively obese humans. *Nat Med*, 1: 953~956
- Hanni C, Laudet V, Stehelin D, et al. 1994. Tracking the origins of the cave bear (*Ursus spelaeus*) by mitochondrial DNA sequencing. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91: 12336~12340
- Hara S, Kobayashi C, Imura N. 1999. Molecular cloning of cDNAs encoding hypoxia-inducible factor (HIF) -1 α and -2 α of bovine arterial endothelial cells. *Biochim Biophys Acta*, 1445: 237~243
- Hardie D G, Hawley S A, Scott J W. 2006. AMP-activated protein kinase—development of the energy sensor. *J Physiol*, 574: 7~15
- Harik N, Harik S I, Kuo N T, et al. 1996. Time-course and reversibility of the hypoxia-induced alterations in cerebral vascularity and cerebral capillary glucose transporter density. *Brain Res*, 737: 335~338
- Harpending H C, Batzer M A, Gurvens M, et al. 1998. Genetic traces of ancient demography. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 95: 1961~1967
- Harris D R. 1996. *The origins and spread of agriculture and pastoralism in Eurasia*. London: University College London Press
- Harrison T M, Copeland P, Kidd W S F, et al. 1992. Raising Tibet. *Science*, 255: 1663~1670
- Harter A V, Gardner K A, Lentz D L, et al. 2004. Origin of extant domesticated sunflowers in easter North America. *Nature*, 430: 201~205
- Hashimoto E, Ogita T, Nakaoka T, et al. 1994. Rapid induction of vascular endothelial growth factor expression by transient ischemia in rat heart. *Am J Physiol*, 267: 1948~1954
- Hassanin A, Douzery E J P. 1999. The tribal radiation of the family Bovidae (Artiodactyla) and the evolution of the mitochondrial cytochrome *b* gene. *Mol Phylogenet Evol*, 13 (2): 227~243
- Hassanin A, Ropiquet A. 2004. Molecular phylogeny of the tribe Bovini (Bovidae, Bovinae) and the taxonomic status of the Kouprey, *Bos sauveli* Urbain 1937. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 33: 896~907
- Haynes W G, Morgan D A, Walsh S A, et al. 1997. Receptor mediated regional sympathetic nerve activation by leptin. *J Clin Invest*, 100: 270~278
- He D K, Chen Y F. 2006. Biogeography and molecular phylogeny of the genus *Schizothorax* (Teleostei: Cyprinidae) in China inferred from cytochrome *b* sequences. *Journal of Biogeography*, 33: 1448~1460
- Heath D, Williams D R. 1981. In *Man at High Altitude*. 2nd ed. New York: Churchill Livingstone: 269~281
- Heath D, Williams D, Dickinson J. 1984. The pulmonary arteries of the yak. *Cardiovasc Res*, 18: 133~139
- Heath D. 1992. Mast cells in the human lung at high altitude. *Int J Biometeorol*, 36: 210~213
- Heckel J J. 1838. *Fische aus Caschmir gesammelt und herausgeben von Carl Freiherrn Von Hugel*, be-

- schriepen von J. Heckel Wen, 1: 10~112
- Herzenstein S M. 1888. Wissenschaftliche Resultate der von N. M. Przewalski nach Central-Asien. Zoologischer Theil III, 2 (1): 1~91
- Herzenstein S M. 1889. Wissenschaftliche Resultate der von N. M. Przewalski nach Central-Asien. Zoologischer Theil III, 2 (2): 91~180
- Herzenstein S M. 1891. Wissenschaftliche Resultate der von N. M. Przewalski nach Central-Asien. Zoologischer Theil III, 2 (3): 181~262
- Herzenstein S M. 1892. Ichthyologische Bemerkungen aus dem zoologischen Museum der Kaiserlichen Akademie Wissenchoften. Mémoires de l'Academie Imperiale des Sciences de Saint Petersburg, 13: 219~235
- Heshka J T, Jones P J. 2001. A role for dietary fat in leptin receptor, OB-Rb, function. Life Sci, 69: 987~1003
- Hewitt G M. 1996. Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. Biological Journal of Linnean Society, 58: 247~276
- Hewitt G M. 2004. Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 359: 183~195
- Hiendler S, Kaup B, Wassmuth R, et al. 2002. Molecular analysis of wild and domestic sheep questions current nomenclature and provides evidence for domestication from two different subspecies. Proceedings of the Royal Society Series B, 269: 893~904
- Hileman S M, Tornoe J, Flier J S, et al. 2000. Transcellular transport of leptin by the short leptin receptor isoform ObRa in Madin-Darby Canine Kidney cells. Endocrinology, 141: 1955~1961
- Hisano S, Fukui Y, Chikamori Aoyama M, et al. 1993. Reciprocal synaptic relations between CRF-immunoreactive and TRH immunoreactive neurons in the paraventricular nucleus of the rat hypothalamus. Brain Res, 620: 343~346
- Ho S, Larson G. 2006. Molecular clocks: when times are a-changin'. Trends in Genetics, 22: 79~85
- Hochachka P W, Buck L T, Doll C J, et al. 1996. Unifying theory of hypoxia tolerance: molecular/metabolic defense and rescue mechanisms for surviving oxygen lack. Proc Natl Acad Sci USA, 93: 9493~9498
- Hochachka P W, Rupert J L, Monge C. 1999. Adaptation and conservation of physiological systems in the evolution of human hypoxia tolerance. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol, 124: 1~17
- Hoeben A, Landuyt B, Highley M S, et al. 2004. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. Pharmacol Rev, 56: 549~580
- Hoffmann R S. 1993. in Mammalian Species of the World, A Taxonomic and Geographic Reference, eds Wilson D-E, Reeder D-M (Smithsonian Institution Press, Washington, DC), 807~827
- Hofstaetter J G, Saad F A, Samuel R E, et al. 2004. Differential expression of VEGF isoforms and receptors in knee joint menisci under systemic hypoxia. Biochem Biophys Res Commun, 324: 667~672
- Hoppeler H, Howald H, Cerretelli P. 1990. Human muscle structure after exposure to extreme altitude. Experientia, 46: 1185~1187
- Hora S L. 1937. Indian cyprinoid fishes belonging to the genus Carra, with notes on related species from other countries. Records Of the Indian Museum, 22: 633~687
- Hoss M, Paabo S. 1993. DNA extraction from pleistocene bones by a silica-based purification method. Nucleic Acids Research, 21: 3913~3914

- Huang Z J, Edery I, Rosbash M. 1993. PAS is a dimerization domain common to *Drosophila* period and several transcription factors. *Nature*, 364: 259~262
- Huelsenbeck J P, Ronquist F, Nielsen R, et al. 2001. Bayesian influence of phylogeny and its impact on evolutionary biology. *Science*, 294: 2310~2314
- Huelsenbeck J P, Ronquist F. 2001. MTBAYES - Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics*, 17: 754~755
- Huntley B, Webb T. 1989. Migration: Species' response to climatic variations caused by changes in the earth's orbit. *J Biogeogr*, 16: 5~19
- Hwang C S, Mandrup S, MacDougald O A, et al. 1996. Transcriptional activation of the mouse obese (Ob) gene by CCAAT/enhancer binding protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93: 873~77
- Ikeda E, Achen M G, Breier G, et al. 1995. Hypoxia-induced transcriptional activation and increased mRNA stability of vascular endothelial growth factor in C6 glioma cells. *J Biol Chem*, 270: 19761~19766
- Imagawa K, Numate Y, Katsuura G, et al. 1998. Structure-function studies of human leptin. *J Bio Chem*, 273: 35245~35249
- Ingalls A M, Dickie M M, Snell G D. 1950. Obese, a new mutation in the mouse. *J Hered*, 41: 317~318
- Iserentant H, Peelman F, Defeau D, et al. 2005. Mapping of the interface between leptin and the leptin receptor CRH2 domain. *J Cell Sci*, 118: 2519~2527
- Janecek L L, Honeycutt R L, Adkins R M, et al. 1996. Mitochondrial gene sequences and the molecular systematics of the artiodactyl subfamily Bovinae. *Mol Phylogenet Evol*, 6 (1): 107~119
- Janik J E, Curtis E D, Considine R V, et al. 1997. Interleukin 1 alpha increases serum leptin concentrations in humans. *J Clin Endocrinol Metab*, 82: 3084~3086
- Jansen T P, Forster M A, Levine H, et al. 2002. Mitochondrial DNA and the origins of the domestic horse. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 99: 10905~10910
- Jaquet K, Krause K, Tawakol2Khodai M. 2002. Erythropoietin and VEGF exhibit equal angiogenic potential. *Microvascular Res*, 64 (2): 326~333
- Jelkmann W. 1992. Erythropoietin: structure, control of production, and function. *Physiol Rev*, 72: 449~489
- Jewell U R, Kvietikova I, Scheid A, et al. 2001. Induction of HIF-1 α in response to hypoxia is instantaneous. *FASEB J*, 15: 1312~1314
- Jiang B H, Rue E, Wang G L, et al. 1996a. Dimerization, DNA binding, and transactivation properties of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem*, 271: 17771~17778
- Jiang B H, Semenza G L, Bauer C, et al. 1996b. Hypoxia-inducible factor 1 levels vary exponentially over a physiologically relevant range of O₂ tension. *Am J Physiol*, 271: 1172~1180
- Jiang J C, Gama R Z, He M L. 1991. Comparison of the Tibetan plateau yak blood physiology value from different altitude. *Chinese J Animal Veter, Science*, 22: 20~26
- Jin L, Zhang S, Bürguera B G, et al. 2000. Leptin and leptin receptors expression in rat and mouse pituitary cells. *Endocrinology*, 141: 333~339
- Jones R D, Hancock J T, Morice A H. 2000. NADPH oxidase: a universal oxygen sensor? *Free Radic Biol Med*, 29: 416~424
- Joshi M B, Rout P K, Mandal A K, et al. 2004. Phylogeography and origin of Indian domestic goats. *Molec-*

- ular Biology and Evolution, 21 (3): 454~462
- Kahn B B, Alquier T, Carling D, et al. 2005. AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell Metab*, 1: 15~25
- Kallen C B, Lazar M A. 1996. Antidiabetic thiazolidinediones inhibit leptin (ob) gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93: 5793~5796
- Kanstrup I L, Poulsen T D, Hansen J M, et al. 1999. Blood pressure and plasma catecholamines in acute and prolonged hypoxia: effects of local hypothermia. *J Appl Physiol*, 87: 2053~2058
- Kendall R. G. 2001. Erythropoietin. *Clin Lab Haem*, 23: 71~80
- Kennedy S L, Stanley W C, Panchal A R, et al. 2001. Alterations in enzymes involved in fat metabolism after acute and chronic altitude exposure. *J Appl Physiol*, 90: 17~22
- Kessler K F. 1872. Ichthyological fauna of Turkestan. *Bulletin of the Zoological Society of Moscou*, 10: 47~76
- Kessler K F. 1874. Pisces. (In Fedtschensko's Expedition to Turkestan, Zoogeographical researches), *Bulletin of the Zoological Society of Moscou*, 11: 1~63
- Kessler K F. 1876. Beschreibung der von oberst Prezewalskii in der Mongolei gesammelten Fische. (Text Russisch) //Prezewalskii "Mongolia i Strana Tangutov", 2 (4): 1~36
- Kessler K F. 1879. Beitrare zur Ichthyologie von Central-Asien. *Mémoires de l'Academie Imperiale des Sciences de Saint Petersbourg*, 25: 282~310
- Kierstein G, Vallinoto M, Silva A, et al. 2004. Analysis of mitochondrial D-loop region casts new light on domestic water buffalo *Bubalus bubalis* phylogeny. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 30: 308~324
- Kietzmann T, Cornesse Y, Brechtel K, et al. 2001. Perivenous expression of the mRNA of the three hypoxia-inducible factor α -subunits, HIF1 α , HIF2 α and HIF3 α in rat liver. *Biochem J*, 354: 531~537
- Kimura M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16: 111~120
- Kleinschmidt T, Nevo E, Braunitzer G. 1984. The primary structure of the hemoglobin of the male rat. *Hoppe-Seylers Z Physiol Chem*, 365: 531~537
- Kloek C, Haq A K, Dunn S L, et al. 2002. Regulation of Jak kinases by intracellular leptin receptor sequences. *J Biol Chem*, 277: 41547~41555
- Klootwijk C T, Conaghan P J, Powell C M. 1985. The Himalayan arc: large-scale continental subduction, oroclinal bending and back-arc spreading. *Earth and Planetary Science Letters*, 75: 167~183
- Kourembanas S, Hannan R L, Faller D V. 1990. Oxygen tension regulates the expression of the platelet-derived growth factor-B chain gene in human endothelial cells. *J Clin Invest*, 86: 670~674
- Kourembanas S, Marsden P A, McQuillan L P, et al. 1991. Hypoxia induces endothelin gene expression and secretion in cultured human endothelium. *J Clin Invest*, 88: 1054~1057
- Krings M, Stone A, Schmitz R W, et al. 1997. Neanderthal DNA sequence and the origin of modern humans. *Cell*, 90: 19~30
- Kumar S, Tamura K, Nei M. 2004. MEGA3-Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics*, 5: 150~163
- Kumar S. 1996. *PHYLTEST: A Program for Testing Phylogenetic Hypothesis*. The Pennsylvania State University, University Park, Pennsylvania, USA

- Kuznetsov GV, kulikov E E, Peter N B, et al. 2002. Mitochondrial 12s rDNA sequence relationships suggest that the ening matic Bovid "Linh Duong" *Pseudonovi bos spiralis* is closely related to Buffalo. *Molecular phylogewetics and Evolution*, 23 (1): 91~94.
- Ladoux A, Frelin C. 1997. Cardiac expressions of HIF-1 alpha and HLF/EPAS, two basic loop helix/PAS domain transcription factors involved in adaptative responses to hypoxic stresses. *Biochem Biophys Res Commun*, 240: 552~556
- Laharrague P, Larroy D, Fontanilles A M, et al. 1998. High expression of leptin by human bone marrow adipocytes in primary culture. *FASEB J*, 12: 747~752
- Lahiri S. 2000. Historical perspectives of cellular oxygen sensing and responses to hypoxia. *J Appl Physiol*, 88: 1467~1473
- Lalthantluanga R, Wiesner H, Braunitzer G. 1985. Studies on yak hemoglobin (*Bos grunniens*, Bovidae): structural basis for high intrinsic oxygen affinity? *Biol Chem Hoppe Seyler*, 366: 63~68
- Lammert A, Kiess W, Bottner A, et al. 2001. Soluble leptin receptor represents the main leptin binding activity in human blood. *Biochem Biophys Res Commun*, 283: 982~988
- Larson G, Dobney K, Albarella U, et al. 2005. Worldwide phylogeography of wild boar reveals multiple centers of pig domestication. *Science*, 307: 1618~1621
- Lau C H, Drinkwater R D, Yusoff K, et al. 1998. Genetic diversity of Asian water buffalo (*Bubalus bubalis*): mitochondrial DNA D-loop and cytochrome b sequence variation. *Animal Genetics*, 29: 253~264
- Lee J W, Bae S H, Jeong J W, et al. 2004. Hypoxia-inducible factor (HIF-1) alpha: its protein stability and biological functions. *Exp Mol Med*, 36: 1~12
- Legradi G, Emerson C H, Ahima R S, et al. 1997. Leptin prevents fasting induced suppression of prothyrotropin releasing hormone messenger ribonucleic acid in neurons of the hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinology*, 138: 2569~2576
- Legradi G, Emerson C H, Ahima R S, et al. 1998. Arcuate nucleus ablation prevents fasting induced suppression of proTRH mRNA in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Neuroendocrinology*, 68: 89~97
- Leung Y H, Liu R H. 2000. Tran-9, cis-12-conjugated linoleic acid isomers exhibits stronger oxyradical scavenging capacity than cis-9, trans-11-conjugated linoleic acid isomer. *J Arric Food Chem*, 48: 5496~5475
- Levy N S, Chung S, Furneaux H, et al. 1998. Hypoxic stabilization of vascular endothelial growth factor mRNA by the RNA-binding protein HuR. *J Biol Chem*, 273: 6417~6423
- Lewandowski K, Horn R, Callaghan C j, et al. 1999. Free leptin, bound leptin and soluble leptin receptor in normal and diabetic pregnancies. *J Clin Endocrinol Metab*, 84: 300~306
- Li S H. 1984. The observation on yak's heat resistance. A research on the utilization and exploitation of grassland in the northwestern part of Sichuan province, Sichuan National Publishing House, 171~174
- Liang J. 1981. Family structure of plateau pika (*Ochotona curzoniae*). *Acta Theriologica Sinica*, 1: 159~165
- Liang Y, Wu J, Stancel G M, et al. 2005. p53-dependent inhibition of progesterin-induced VEGF expression in human breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 93: 173~182
- Lindebro M C, Poellinger L, Whitelaw M L. 1995. Protein-protein interaction via PAS domains: role of the PAS domain in positive and negative regulation of the bHLH/PAS dioxin receptor-Arnt transcription factor complex. *EMBO J*, 14: 3528~3539

- Linnaeus C. 1766. Systema Naturae. twelveth ed, part 1. Holmiae, Salvii
- Liu J Q, Ho T N, Liu S W, et al. 2001. Karyological studies on the Sino-Himalayas endemic genus, *Cremnathodium* (Asteraceae; Senecioneae). Bot J Linn Soc, 135: 107~112
- Liu S G, Xu H, Hu Q H. 1994. Constructing yak DNA fingerprints by using human microsatellite DNA probes. Proceeding of the 1st international congress on yak, 92 ~95
- Liu Y P, Wu G S, Yao Y G, et al. 2006. Multiple maternal origins of chickens: Out of the Asian jungles. Molecular Phylogenetics and Evolution, 38: 12~19
- Liu Y, Cox S R, Morita T, et al. 1995. Hypoxia regulates vascular endothelial growth factor gene expression in endothelial cells. Identification of a 5' enhancer. Circ Res, 77: 638~643
- Lloyd R E. 1908. Report on the fish collected in Tibet by Captain F. H. Stewart, I. M. S. Records of The Indian Museum, 2: 341~345
- Lonnqvist F, Arner P, Nordfors, et al. 1995. Overexpression of the obese (ob) gene in adipose tissue of human obese subjects. Nat Med, 1: 950~953
- Lopez-Barneo J, Pardal R, Ortega-Saenz P. 2001. Cellular mechanism of oxygen sensing. Annu Rev Physiol, 63: 259~287
- Lord G M, Matarese G, Howard J K, et al. 1998. Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression. Nature, 394: 897~901
- Lovejoy N R, de Aratijo L G. 2000. Molecular systematics, biogeography and population structure of Neotropical freshwater needlefishes of the genus *Potamorhaphis*. Molecular Ecology, 9: 259~268
- Lowell B B, Spiegelman B M. 2000. Towards a molecular understanding of adaptive thermogenesis. Nature, 404: 652~660
- Luikart G, Gielly L, Excoffier L, et al. 2001. Multiple maternal origins and weak phylogeographic structure in domestic goats. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 98: 5927~5932
- Luo G, Gu Y Z, Jain S, et al. 1997. Molecular characterization of the murine Hif-1 alpha locus. Gene Expr, 6: 287~299
- MacArthur R A, Wang L C. 1973. Physiology of thermoregulation in the pika. Ochotona princes. Canadian Journal of Zoology-revue Canadienne De Zoologie, 51: 11~16
- MacDougall J D, Green H J, Sutton J R, et al. 1991. Operation Everest II: structural adaptations in skeletal muscle in response to extreme simulated altitude. Acta Physiol Scand, 142: 421~427
- MacHugh D E, Bradley D G. 2001. Livestock genetic origins: goats buck the trend. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 98: 5382~5384
- Maddison D R. 1991. The discovery and importance of multiple island of Most-parsimonious trees. Systematic zoology, 40: 315~328
- Mairbaur H, Schobersberger W, Oelz O, et al. 1990. Unchanged in vivo p50 at high altitude despite decreased erythrocyte age and elevated 2, 3-diphosphoglycerate. J Appl Physiol, 68: 1186~1194
- Mannen H, Nagata Y, Tsuji S. 2001. Mitochondrial DNA reveal that domestic goat (*Capra hircus*) are genetically affected by two subspecies of bezoar (*Capra aegagurus*). Biochemical Genetics, 39: 145~154
- Mantzoros C S, Qu D, Frederich R C, et al. 1996. Activation of beta (3) adrenergic receptors suppresses leptin expression and mediates leptin-independent inhibition of food intake in mice. Diabetes, 45: 909~914

- Mantzoros C, Flier J S, Rogol A D. 1997. A longitudinal assessment of hormonal and physical alterations during normal puberty in boys. V. Rising leptin levels may signal the onset of puberty. *J Clin Endocrinol Metab*, 82: 1066~1070
- Marchi S D, Cecchin E, Falletti E. 1997. Longterm effects of erythropoietin therapy on fistula stenosis and plasma concentrations of PDGF and MCP2 in hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol*, 8 (8) : 1147~1156
- Margareto J, Marti A, Alfredo Martinez J. 2001. Change in UCP mRNA expression levels in brown adipose tissue and skeletal muscle after feeding a high-energy diet and relationships with leptin, glucose and PPAR γ . *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 12 : 130~137
- Maront A M. 1997. EPO: Biochemical characteristics, biological effects, indications and results of use in hematology. *Tu mori*, 83: 3~15
- Maru Y, Yamaguchi S, Takahashi T, et al. 1998. Virally activated Ras cooperates with integrin to induce tubulogenesis in sinusoidal endothelial cell lines. *J Cell Physiol*, 176: 223~234
- Maxwell P H, Pugh C W, Ratcliffe P J. 1993. Inducible operation of the erythropoietin 3' enhancer in multiple cell lines: evidence for a widespread oxygen-sensing mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90: 2423~2427
- McClelland J. 1839. Indian Cyprinidae. *Asiatic Res*, 19 (2): 217~417
- McGlashan D, Hughes J M. 2000. Reconciling patterns of genetic variation with stream structure, earth history and biology in the Australian freshwater fish *Cratocephalus stercusmuscarum* (Atherinidae). *Molecular Ecology*, 9: 1737~1751
- Mead J I. 1987. Quaternary records of pika, *Ochotona*, in North America. *Boreas*, 16: 165~171
- Miller S G, de Vos P, Guerre-Millo M, et al. 1996. The adipocyte specific transcription factor C/EBP α modulates human ob gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93: 5507~5511
- Mirza M R. 1991. A contribution to the systematics of the Schizothoracine fishes (Pisces: Cyprinidae) with the description of three new tribes. *Pakistan J zool*, 23: 339~341
- Miyamoto M M, Tanhauser S M, Laipis P J. 1989. Systematic relationships in the Artiodactyl tribe Bovini (family Bovidae), as determined from mitochondrial DNA sequences. *Syst Zool*, 38 (4): 342~349
- Moncada S. 1997. Nitric oxide in the vasculature: physiology and pathophysiology. *Ann N Y Acad Sci* 811: 60~69
- Montague CT, Farooqi I S, Whitehead J P, et al. 1997. Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. *Nature*, 387 (26): 903~908
- Moore L G, Brewer G J. 1981. Beneficial effect of rightward hemoglobin-oxygen dissociation curve shift for short-term high-altitude adaptation. *J Lab Clin Med*, 98: 145~154
- Moore L G, Harrison G L, McCullough R E, et al. 1986. Low acute hypoxic ventilatory response and hypoxic depression in acute altitude sickness. *J Appl Physiol*, 60: 1407~1412
- Morash B, Li A, Murphy P R, Wilkinson M, et al. 1999. Leptin gene expression in the brain and pituitary gland. *Endocrinology*, 140: 5995~5998
- Morel O E, Aubert R, Richalet J P, et al. 2005. simulated high altitude selectively decreases protein intake and lean mass gain in rats. *Physiol Behav*, 15: 145~153
- Morin P J, Storey K B. 2005. Cloning and expression of hypoxia-inducible factor 1 α from the hibernating

- ground squirrel, *Spermophilus tridecemlineatus*, *Biochim Biophys Acta*, 1729: 32~40
- Mukerji D D. 1936. Report on fishes Part II : Sisoridae and Cyprinidae. *Mem Conn And*, 10 (18): 323~359
- Murakami T, Yamashita T, Iida M, et al. 1997. A short form of leptin receptor performs signal transduction. *Biochem Biophys Res Commun*, 231: 26~29
- Murphy W, Collier G E. 1996. Phylogenetic relationships with the Aplocheiloid fish genus *Rivulus* (Cyprinodontiformes, Rivulidae): Implications for Caribbean and Central American biogeography. *Molecular Biology and Evolution*, 13: 642~649
- Myers N, Mittermter R A, Mittermter C G, et al. 2000. Biodiversity hotspots for cousevation priorities. *Nature*, 403: 853~858.
- Nei M, Jin L. 1989. Variances of the average numbers of nucleotide substitutions within and between populations. *Molecular Biology and Evolution*, 6: 290~300
- Nei M, Kumar S. 2000. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. New York: Oxford University Press
- Nei M, Maruyama T, Chakraborty R. 1975. The bottleneck effect and genetic variability. *Evolution*, 29: 1~10
- Nei M. 1971. Fertility excess necessary for gene substitution in regulated populations. *Genetics*, 68: 169~184
- Nei M. 1975. *Molecular population genetics and evolution*. North-Holland, Amsterdam
- Nei M. 1987. *Molecular evolutionary genetics*. New York: Columbia University Press
- Nei M. 2005. Selectionism and neutralism in molecular evolution. *Mol Biol Evol*, 22: 2318~2342
- Nevo E. 2001. Evolution of genome-phenome diversity under environmental stress, *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*, 98: 6233~6240
- Ng Y S, Rohan R, Sunday M E, et al. 2001. Differential expression of VEGF isoforms in mouse during development and in the adult. *Dev Dyn*, 220: 112~121
- Nikolsky A M. 1903. Sur trios nouvelles espèces de poisons provenant de l'Asie centrale. *Annuaire du Musee Zoologique de l'Academie d. Sciences de Saint Petersburg*, 8: 90~94
- Nillni E A, Vaslet C, Harris M, et al. 2000. Leptin Regulates Prothyrotropin-releasing Hormone Biosynthesis. *J Biol Chem*, 275: 36124~36133
- Noguchi K, Yamashiro S, Matsuzaki T. 2001. Effect of 12week treatment with erythropoietin on the vascular endothelial function in anaesthetized rabbits. *Br J Pharmacol*, 133 (2) : 395~405
- Norese M F, Lezon C E, Alippi R M, et al. 2002. Failure of polycythemia-induced increase in arterial oxygen content to suppress the anorexic effect of simulated high altitude in the adult rat . *High Alt Med Biol*, 3: 49~57
- Norman J R. 1923. Three new fishes from Yunnan, collected by Prof. J. W. Gregory. *Annals and Magazine of Natural History*, 9 (11): 561~563
- Norris M L, Millhorn D E. 1995. Hypoxia-induced protein binding to O₂-responsive sequences on the tyrosine hydroxylase gene. *J Biol Chem*, 270: 23774~23779
- Olsen S J. 1990. Fossil ancestry of the yak, its cultural significance and domestication in Tibet. *Proceeding of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia*, 142: 73~100
- Orban Z, Bornstein S R, Chrousos G P. 1998. The interaction between leptin and the Hypothalamic pituitary