



# 高原鼯鼠肉碱棕榈酰基转移酶基因的进化和表达

杜波<sup>1,2</sup>, 胡庆飞<sup>1,2</sup>, 马凡<sup>1,2</sup>, 魏登邦<sup>1</sup>, 安志芳<sup>1\*</sup>

(1. 青海大学省部共建三江源生态与高原农牧业国家重点实验室, 西宁, 810016;  
2. 青海大学生态环境工程学院, 西宁, 810016)

## 稿件运行过程

收稿日期: 2024-09-23

修回日期: 2024-10-12



关键词: 高原鼯鼠;

肉碱棕榈酰基转移酶 1A;

基因进化;

基因表达;

低氧环境

**Keywords:** Plateau zokor (*Eosplax baileyi*);  
Carnitine palmitoyl transferase 1A;  
Gene evolution;  
Gene expression;  
Hypoxia environment

中图分类号: Q955

文献标志码: A

文章编号:

2310-1490(2025)-02-0281-10

DOI: 10.12375/ysdwxb.20250205

## 摘要

为深入了解高原鼯鼠(*Eosplax baileyi*)高原适应性的生物学基础,应用生物信息学相关软件分析高原鼯鼠肉碱棕榈酰基转移酶 1A(carnitine palmitoyl transferase 1A, *CPT-1A*)基因序列的同源性和趋同进化位点,利用 qRT-PCR 方法测定不同海拔条件下(3 700 m 和 2 700 m)高原鼯鼠肝脏、骨骼肌和脂肪组织中 *CPT-1A* 基因的表达水平。结果表明:高原鼯鼠 *CPT-1A* 基因与盲鼯鼠(*Nannospalax galili*)的同源性最高;高原鼯鼠、盲鼯鼠和裸鼯鼠(*Heterocephalus glaber*)3种地下鼠 *CPT-1A* 存在明显的趋同进化位点;随着海拔的升高,高原鼯鼠背部脂肪组织中 *CPT-1A* 基因表达水平显著升高;不同组织之间的比较发现,肝脏组织中 *CPT-1A* 基因表达量最高。以上结果提示,高原鼯鼠 *CPT-1A* 基因在进化过程中形成了特定的适应性突变,低氧上调高原鼯鼠脂肪组织中 *CPT-1A* 基因的表达,这可能与高原鼯鼠适应地下寒冷、低氧和高二氧化碳浓度的洞道生境有关,是高原鼯鼠适应地下洞道生境的分子机制之一。

## Evolution and Expression of Carnitine Palmitoyl Transferase Gene in Plateau Zokor

DU Bo<sup>1,2</sup>, HU Qingfei<sup>1,2</sup>, MA Fan<sup>1,2</sup>, WEI Dengbang<sup>1</sup>, AN Zhifang<sup>1\*</sup>

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

2. College of Ecological Environment Engineering, Qinghai University,  
Xining, 810016, China)

基金项目: 青海省应用基础研究计划项目(2024-ZJ-713)

第一作者简介: 杜波(2000—),女,硕士研究生;主要从事动物生态学研究。E-mail: DuBB084@163.com

\*通信作者: 安志芳, E-mail: anzhibang90@126.com

**Abstract:** In order to further explore the biological basis of the plateau zokor (*Eospalax baileyi*) in the plateau environment, the homologies and convergent sites of carnitine palmitoyl transferase 1A (*CPT-1A*) were analyzed by bioinformatics software, the expression levels of *CPT-1A* in the liver, skeletal muscle, and fat tissues of plateau zokors were determined with real-time PCR under different altitudes (3 700 m and 2 700 m). The results showed that the nucleotide and amino acid sequences of *CPT-1A* had the highest homologies with the *Nannospalax galili*; *CPT-1A* of plateau zokor, *N. galili* and *Heterocephalus glaber* occurred convergent sites; compared to low altitudes (2 700 m), the expression level of the *CPT-1A* in the back fat tissue of the plateau zokor was significantly higher at high altitudes (3 700 m); compared to the different tissues, the expression level of *CPT-1A* was highest in liver tissues. The above results suggested that, the *CPT-1A* of the plateau zokor has formed specific adaptive mutations over the long-term of evolution, and hypoxia upregulates the expression levels of *CPT-1A*, which may be related to the plateau zokor's adaptation to the cold, hypoxic, and high carbon dioxide concentration environment in underground burrows, which is one of the molecular mechanisms of the plateau zokor adaption to the burrowing environment.

高原鼯鼠(*Eospalax baileyi*)是青藏高原特有的地下鼠<sup>[1]</sup>,终生生活在完全黑暗且封闭的地下洞道中<sup>[2]</sup>,地下洞道的明显生境特征是严重的低氧、通气性差和高二氧化碳浓度<sup>[3]</sup>。青藏高原东部是高原鼯鼠的主要栖息地,该地区海拔为2 800~4 200 m<sup>[4]</sup>。地下洞道为高原鼯鼠提供了相对稳定的生活场所,使其在一定程度上免受捕食者的伤害以及恶劣气候的影响<sup>[5]</sup>。为适应这种地下极端的生存环境,高原鼯鼠在形态、生理和分子水平上表现出特有的高原适应性,其脂肪酸 $\beta$ -氧化、线粒体呼吸链和能量代谢等相关基因产生了显著的正向选择和高表达<sup>[6]</sup>。

肉碱棕榈酰基转移酶(carnitine palmitoyl transferase, *CPT*)家族基因在脂肪酸 $\beta$ -氧化的过程中起着至关重要的作用,该家族基因可以促使脂肪酸与肉碱结合后转移至线粒体中进行 $\beta$ -氧化<sup>[7]</sup>。*CPT*家族基因主要分为*CPT-1*和*CPT-2*两个亚型,其中*CPT-1*位于线粒体外膜,促进长链脂酰CoA进入线粒体进行氧化反应,是这一环节的调节酶和关键限速酶<sup>[8]</sup>。*CPT-1*酶有2个分支,分别为*CPT-1A*和*CPT-1B*,由于功能和分布的差异,*CPT-1A*能够在更高程度上调节体内脂肪酸的氧化过程<sup>[9]</sup>。国内已有的研究结果显示,限制生存条件的物种体内*CPT-1A*的活性强弱、表达含量高低控制着酰基CoA进入线粒体进行氧化代谢的速度,同时影响着体内的脂肪酸 $\beta$ -氧化、线粒体呼吸链和能量代谢等过程,对于动物机体获能、正常生长有着重要影响<sup>[10]</sup>。目前,*CPT-1A*基因的研究对象主要为鱼类、禽类、哺乳动物中的山羊、

绵羊和猪<sup>[11-12]</sup>,但是,对于啮齿类物种*CPT-1A*基因的研究还有待开展,高原鼯鼠*CPT-1A*基因的研究未见报道,对于高原鼯鼠*CPT-1A*基因的进化机制和表达分析需深入研究。因此,本研究利用生物信息学相关软件对高原鼯鼠*CPT-1A*基因序列进行分析,利用qRT-PCR测定不同海拔高原鼯鼠的*CPT-1A*基因在不同组织中的表达水平,以期探讨高原鼯鼠*CPT-1A*基因的进化过程和表达水平差异。这有助于进一步探讨高原鼯鼠对低氧、高二氧化碳浓度环境适应的进化机制和在黑暗环境中生存的适应策略,对于深入了解高原鼯鼠高原适应性的生物学基础具有重要意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

高海拔组和低海拔组高原鼯鼠分别捕捉于青海省海南州贵德县拉脊山(36°21' N, 101°25' E; 海拔约3 700 m, 大气压为59 kPa, 含氧量为173.1 g/m<sup>3</sup>)和青海省西宁市湟中区上圈村(36°19' N, 101°38' E; 海拔约2 700 m, 大气压为70 kPa, 含氧量为197.6 g/m<sup>3</sup>),各6只。所有实验动物处理措施均按照GB/T 35892—2018《实验动物 福利伦理审查指南》执行,并获得青海大学科技伦理委员会的批准(SL-2023019)。

### 1.2 *CPT-1A* 基因序列获取

从NCBI(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>)中下载盲鼯鼠(*Nannospalax galili*)、裸鼯鼠(*Heterocephalus*

*glaber*) 和褐家鼠 (*Rattus norvegicus*) 等 20 个物种 *CPT-1A* 基因的核苷酸序列、氨基酸序列。高原鼯鼠 *CPT-1A* 基因的核苷酸序列从基因组、三代转录组数据库中通过构建本地 BLAST 库进行 BLAST 比对获得, 高原鼠兔 (*Ochotona curzoniae*) *CPT-1A* 基因的核苷酸获取方法与高原鼯鼠一致, 具体序列获取的方法参考高聪慧等<sup>[13]</sup>的研究。用 Lasergene 程序中的 EditSeq 功能<sup>[14]</sup>将获取到的高原鼯鼠的基因编码区序列翻译为氨基酸序列。

### 1.3 *CPT-1A* 基因的同源性分析

将获取的高原鼯鼠、裸鼯鼠、褐家鼠、盲鼯鼠、小家鼠 (*Mus musculus*)、高原鼠兔、北美鼠兔 (*Ochotona princeps*) 和人 (*Homo sapiens*) 的 *CPT-1A* 基因序列用 DNAMAN 9.0 (<https://www.lynnon.com>) 软件进行同源性比对分析, 使用 MEGA 7.0 程序<sup>[15]</sup>构建系统进化树, 同源性分析具体方法参考 An *et al.*<sup>[16]</sup>的研究。

### 1.4 物种树的构建和 *CPT-1A* 基因的选择压力分析

从 NCBI 公共数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 中下载 22 个陆生哺乳动物的线粒体 DNA 全基因组序列 (表 1), 分别利用 MAFFT、DnaSP 和 DAMBE 程序进行序列比对、提取序列单倍型以及核酸置换饱和检验, 利用 MrBayes 3.2 程序将 22 个哺乳动物的单倍型序列构建成系统进化树, 模型检验采用 PAUP 4.0<sup>[17]</sup>和 jModelTest 2.3<sup>[18]</sup>程序。通过计算似然值得分来确定最良好的 DNA 进化替代模型。应用 TreeGraph 2.7.1<sup>[19]</sup>和 CorelDRAW X7 软件完成作图。

利用 ClustalX 1.81 软件对包括 14 个啮齿目 (Rodentia)、3 个兔形目 (Lagomorpha) 和 5 个外类群在内的 22 个哺乳动物的全部基因编码序列进行比对, 使用 MEGA 7.0 软件将比对结果进行格式转换, 利用 PAML 4.8 软件包中的 CODEML 程序对物种树进行选择压力分析<sup>[20-22]</sup>, 选用该程序中基于最大似然法枝位点模型, 把高原鼯鼠支设为前景支系, 先用 model A 检测前景支系中是否存在显著的正向选择位点, 再利用 Null A 进行第二次运算, 提取 2 次运算时的似然率值 ( $\ln L$  值, 分别记为  $\ln L1$  和  $\ln L0$ ), 并计算其两倍差值  $2\Delta \ln L$ 。具体方法参考 An *et al.*<sup>[16]</sup>的选择压力分析方法。

### 1.5 趋同进化分析

为了让结果更加清晰、有突出性, 选择 11 个物种进行趋同进化分析。对高原鼯鼠、盲鼯鼠、裸鼯

表 1 22 种哺乳动物的名称及 GenBank 登录号

Table 1 Names of 22 mammals species and their IDs in GenBank

类别 Category	物种 Species	登录号 GenBank No.
啮齿目 Rodentia	高原鼯鼠 <i>Eospalax baileyi</i>	NC_018098.1
	盲鼯鼠 <i>Nannospalax galili</i>	JN571132.1
	褐家鼠 <i>Rattus norvegicus</i>	KF011917.1
	小家鼠 <i>Mus musculus</i>	J01420.1
	草原田鼠 <i>Microtus ochrogaster</i>	NC_027945.1
	金仓鼠 <i>Mesocricetus auratus</i>	EU660218.1
	黑线仓鼠 <i>Cricetulus barabensis</i>	DQ390542.2
	小埃及跳鼠 <i>Jaculus jaculus</i>	NC_005314.1
	裸鼯鼠 <i>Heterocephalus glaber</i>	HQ689652.1
	达马拉兰鼯鼠 <i>Fukomys damarensis</i>	KT321364.1
	豚鼠 <i>Cavia porcellus</i>	NC_000884.1
	长尾毛丝鼠 <i>Chinchilla lanigera</i>	NC_021386.1
	智利八齿鼠 <i>Octodon degus</i>	HM544134.1
	多纹黄鼠 <i>Ictidomys tridecemlineatus</i>	NC_027278.1
兔形目 Lagomorpha	高原鼠兔 <i>Ochotona curzoniae</i>	EF535828.1
	北美鼠兔 <i>Ochotona princeps</i>	NC_005358.1
	穴兔 <i>Oryctolagus cuniculus</i>	NC_001913.1
其他 Outgroup	家牛 <i>Bos taurus</i>	V00654.1
	绵羊 <i>Ovis aries</i>	KR868678.1
	山羊 <i>Capra hircus</i>	KY305183.1
	人 <i>Homo sapiens</i>	V00662.1
	黑猩猩 <i>Pan troglodytes</i>	NC_001643.1

鼠和人等 11 个物种的 *CPT-1A* 基因的氨基酸序列进行趋同进化分析。利用 DNAMAN 软件和 PAML 4.8 软件包中的 CODEML 程序进行序列比对和单拷贝同源基因的蛋白序列祖先重建。丢弃后验概率小于 0.9 的位点, 再利用软件 converg 2 检验趋同进化位点的显著性。应用 MEGA 7.0 程序对 11 种哺乳动物的氨基酸序列进行比对, 去掉所有 gap, 并按指定格式做出系统进化树, 再输入树文件和序列文件, 并分别使用 JTT 和 POISSON 两种模型计算, 参数使用默认值, 舍弃  $P > 0.05$  的结果。

### 1.6 *CPT-1A* 基因表达水平测定

#### 1.6.1 引物设计

利用 Beacon Designer 8 软件, 在高原鼯鼠 *CPT-1A* 基因序列编码区设计荧光定量特异性引物 (表 2), 在生工生物工程 (上海) 股份有限公司完成引物合成。

表2 高原鼯鼠qRT-PCR引物序列

Table 2 qRT-PCR primer sequences of *Eospalax baileyi*

Table with 3 columns: Gene, Forward primer (5'→3'), Reverse primer (5'→3'). Rows include CPT-1A and beta-actin.

1.6.2 总RNA提取

利用总RNA提取试剂盒RNA simple Total RNA Kit提取高原鼯鼠的骨骼肌组织、肝脏组织、背部脂肪组织和腹股沟脂肪组织的总RNA,将提取出的总RNA放置于冰箱中-70℃保存备用。

1.6.3 实时荧光定量PCR

按照Premix Ex Taq Version试剂盒说明书配制反应体系,进行实时荧光定量PCR扩增反应,将合格的产物切胶后,利用DNA Extraction Kit普通琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒进行回收,同时对回收产物进行10倍梯度稀释。设定最初的PCR产物浓度为1,再分别稀释到8个梯度,作为备用的标品,梯度依次为1×10^-1、1×10^-2、1×10^-3、1×10^-4、1×10^-5、1×10^-6、1×10^-7、1×10^-8。荧光定量PCR反应按照TB Green® Premix Ex Taq™ II (Til RNaseH Plus)试剂盒说明书进行加样,每个反应板上点一种组织的样品,分为2部分,其中8个梯度各点2个孔,共16个;每种组织有高、低海拔2组,每组有6个cDNA样品,每个样品点3个复孔,共36个,2部分总共52个孔。点完

样后在Bio-Rad CFX96荧光定量PCR仪上进行扩增反应。反应条件:95℃预变性3min;95℃变性30s,60℃退火30s,72℃延伸30s,40个循环。具体方法参照张佳钰等[23]的研究。实时荧光定量PCR总反应体系25.0μL,其中TB Green® Premix Ex Taq™ II 12.5μL,上、下游引物各0.5μL,cDNA 1.0μL,ddH2O 10.5μL。

1.7 统计学分析

用Excel 2019和GraphPad Prism 8.0.1处理数据,使用独立样本t检验分析高原鼯鼠不同组织中CPT-1A基因表达量在高海拔组(3700m)和低海拔组(2700m)之间的差异。数据均用平均值±标准误差(mean±SE)表示,当统计结果P<0.05认为差异具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 高原鼯鼠CPT-1A基因序列分析

通过构建本地BLAST库筛选到的高原鼯鼠CPT-1A基因核苷酸序列及其编码的氨基酸序列见图1。同源性对比发现,高原鼯鼠与盲鼯鼠、小家鼠、褐家鼠、裸鼯鼠、人和北美鼠兔的CPT-1A基因编码区序列同源性分别为92.68%、88.93%、88.76%、84.19%、83.03%和79.46%;高原鼯鼠与盲鼯鼠、小家鼠、褐家鼠、裸鼯鼠、人和北美鼠兔的CPT-1A氨基酸序列的同源性分别为95.73%、94.57%、94.57%、87.58%、86.29%和79.82%。综上得,高原鼯鼠与盲鼯鼠的同源性最高,其次是小家鼠。

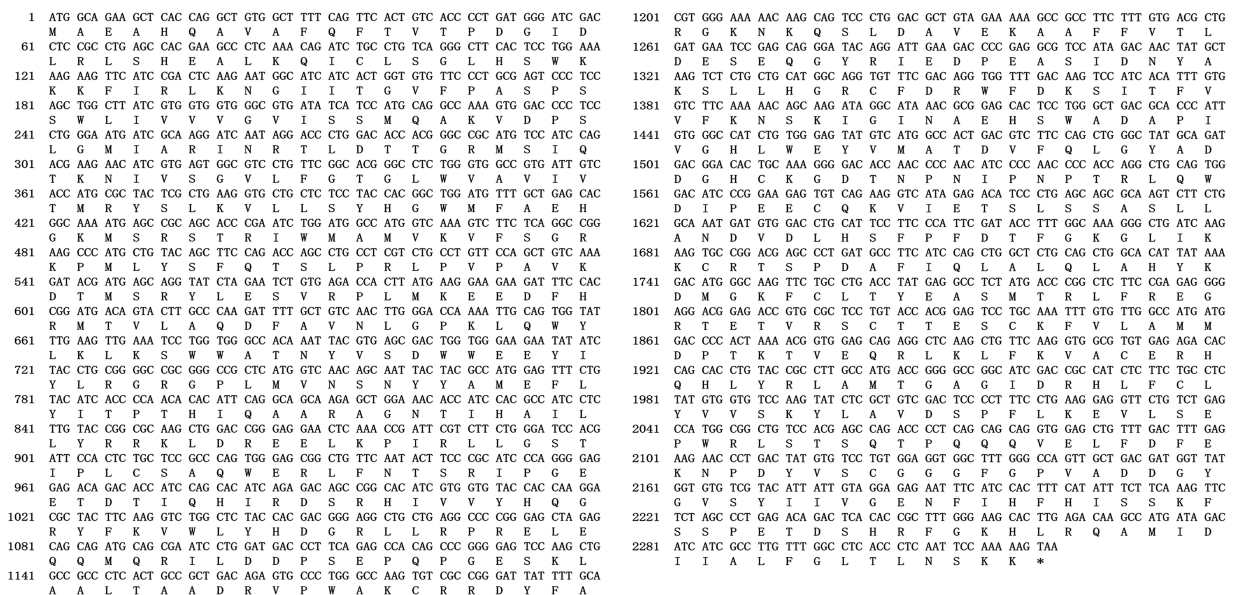
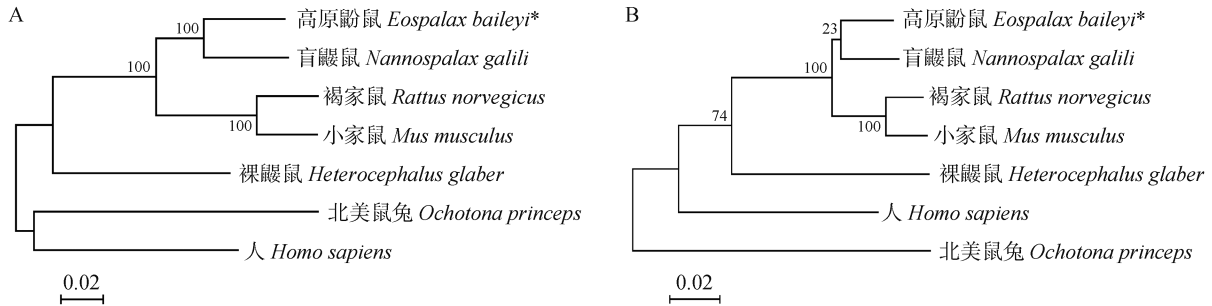


图1 高原鼯鼠CPT-1A基因核苷酸序列及其编码的氨基酸序列

Figure 1 Nucleotide sequences and amino acid sequences of CPT-1A in *Eospalax baileyi*

从构建的 *CPT-1A* 核苷酸序列及其编码的氨基酸序列进化树中可以看出, 高原鼯鼠、盲鼯鼠聚在一个小的分支上, 与啮齿目的褐家鼠和小家鼠聚在

一个大的分支上(图2); 高原鼯鼠 *CPT-1A* 与盲鼯鼠进化关系最近, 其次是小家鼠和褐家鼠。



\*. 本文研究对象。  
\*. The subject of this study.

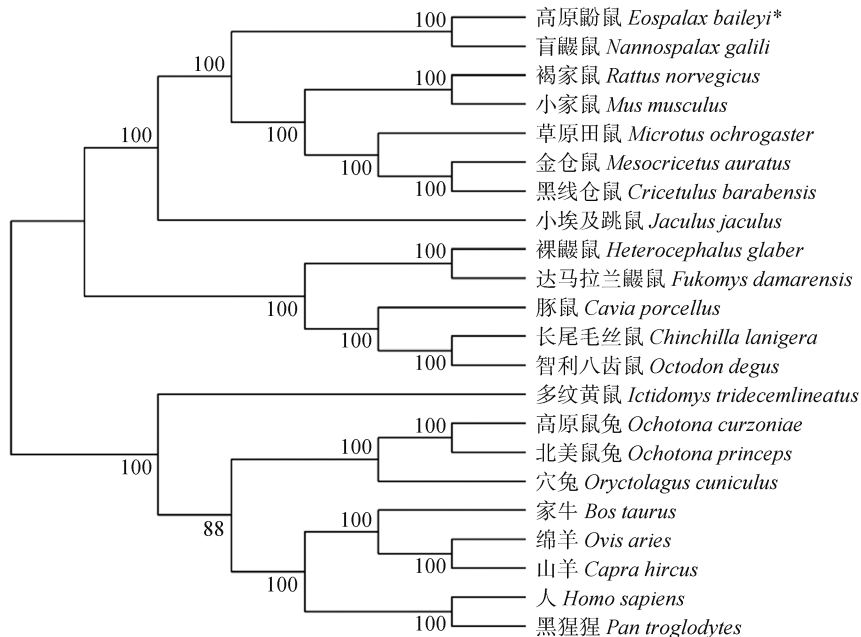
图2 最大似然法构建的 *CPT-1A* 基因核苷酸序列(A)和氨基酸序列(B)的系统进化树

Figure 2 Phylogenetic trees of the nucleotide sequences (A) and amino acid sequences (B) of the *CPT-1A* gene constructed using the maximum likelihood method

### 2.2 22种陆生哺乳动物的物种树

选取22种陆生哺乳动物的线粒体DNA全基因组序列构建物种进化树(图3)。DAMBE饱和度检测结果显示, 指标分数(index score, ISS)低于临界分数(critical score, ISS. c) (ISS为0.685, ISS. c为0.830,  $P < 0.01$ ), 说明核酸替换未达到饱和, 适合建树。

最佳DNA进化替代模型采用with gamma-distributed rate variation across sites 和 a proportion of invariable sites 的GTR模型。图3构建的贝叶斯树中各枝的支持率均大于85%, 说明构建的物种树准确度高, 适用于基因选择压力分析等的研究。



\*. 本文研究对象。  
\*. The subject of this study.

图3 22种陆生哺乳动物的线粒体DNA系统进化树

Figure 3 Phylogenetic tree of mitochondrial DNA in 22 terrestrial mammals

2.3 高原鼯鼠 *CPT-1A* 基因选择压力

基于图3构建的物种树,对高原鼯鼠 *CPT-1A* 基因进行选择压力分析,结果表明, *CPT-1A* 基因有12个潜在的正向选择位点,分别为46 Leu、74 Gln、183

Met、259 Phe、329 Arg、339 Gln、378 Ser、396 Arg、438 Asn、528 Lys、614 Lys 和 639 Arg 位点,但是使用 Null A 和 model A 这2种模型得出的参数结果差异均不显著( $2\Delta\ln L = 3.20, P = 0.206$ )(表3)。

表3 高原鼯鼠 *CPT-1A* 基因的似然值、参数估计和正向选择位点

Table 3 Likelihood values, parameter estimates, and sites of positive selection for the *CPT-1A* gene in *Eospalax baileyi*

模型 Model	参数估计 Estimate of parameters	似然率值 -ln L	正向选择点 Positively selected sites	2倍差值(P值) 2Δln L(P-value)
Null A	$P_0 = 0.93327,$ $P_1 = 0.05341,$ $(P_2 + P_3 = 0.01332)$ $\omega_0 = 0.06096,$ $\omega_1 = 1.00000,$ $\omega_2 = 1.00000$	-15243.11		3.20 ( $P = 0.206$ )
model A	$P_0 = 0.94331,$ $P_1 = 0.05371,$ $(P_2 + P_3 = 0.00298)$ $\omega_0 = 0.06104,$ $\omega_1 = 1.00000,$ $\omega_2 = 26.71155$	-15241.51	46 Leu (0.552); 74 Gln (0.566); 183 Met (0.533); 259 Phe (0.931); 329 Arg (0.586); 339 Gln (0.819); 378 Ser (0.589); 396 Arg (0.577); 438 Asn (0.531); 528 Lys (0.541); 614 Lys (0.535); 639 Arg (0.620)	

注:  $P_0$ 表示纯化选择的比例,  $P_1$ 表示中性选择的比例,  $P_2 + P_3$ 表示正选择的比例;  $\omega_0, \omega_1$ 和  $\omega_2$ 分别表示纯化选择、中性选择和正向选择的非同义替换与同义替换比值。

Note:  $P_0, P_1$  and  $P_2 + P_3$  are the proportion of purifying, neutral and positive selection, respectively;  $\omega_0, \omega_1$  and  $\omega_2$  are the ratio of nonsynonymous substitution to synonymous substitution for purified selection, neutral selection and forward selection, respectively.

2.4 高原鼯鼠 *CPT-1A* 基因的趋同进化分析

*CPT-1A* 序列趋同进化分析结果显示,86号位点的精氨酸(Arg,R)在同为地下鼠的高原鼯鼠、盲鼯鼠和裸鼯鼠中是共有的趋同进化位点,而在其他被检物种中,该位点为赖氨酸(Lys,K);在高原鼯鼠和盲鼯鼠中除了86号位点外,还共同存在4处位点,分别为200号位点的组氨酸(His,H)、397号位点的天冬氨酸(Asp,D)、624号位点的赖氨酸(Lys,K)和759号位点的异亮氨酸(Ile,I)。200号位点褐家鼠和小家鼠为谷氨酰胺(Gln,Q),家牛和绵羊为苏氨酸(Thr,T),其他物种为赖氨酸(Lys,K);397号位点褐家鼠和小家鼠为苏氨酸(Thr,T),其他物种为丙氨酸(Ala,A);624号位点褐家鼠为丝氨酸(Ser,S),小家鼠为苏氨酸(Thr,T),其他物种为谷氨酰胺(Gln,Q);759号位点褐家鼠和小家鼠为甲硫氨酸(Met,M),其

他物种为苏氨酸(Thr,T)(图4)。

2.5 不同海拔下 *CPT-1A* 基因在不同组织中的表达水平

由图5可知, *CPT-1A* 基因在低海拔组的高原鼯鼠肝脏组织中的表达量高于高海拔组的高原鼯鼠肝脏组织中的表达量,但差异不显著( $P > 0.05$ );腹股沟组织中 *CPT-1A* 基因的表达水平在不同海拔之间也没有显著差异( $P > 0.05$ );在背部脂肪组织中, *CPT-1A* 基因的表达水平随着海拔的升高其表达水平显著升高( $P < 0.01$ )。在高海拔和低海拔环境下, *CPT-1A* 基因在肝脏组织中的表达量都显著高于骨骼肌、背部脂肪和腹股沟脂肪的表达量( $P < 0.05$ ), *CPT-1A* 基因在骨骼肌的表达量最低,在背部脂肪、腹股沟脂肪的表达量均显著高于骨骼肌组织( $P < 0.05$ )。

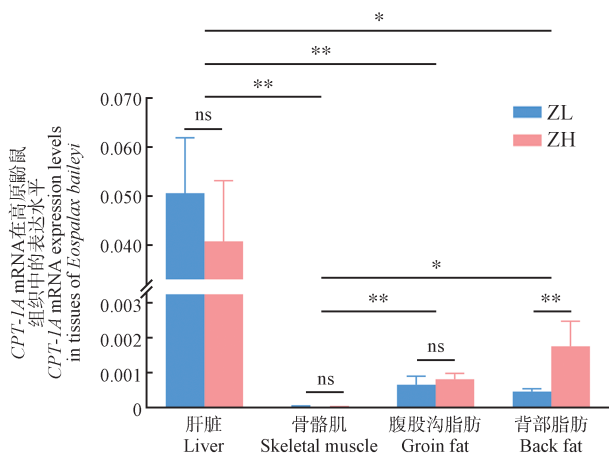


系统进化树后的序列分别表示氨基酸和对应的碱基序列,红色字体的氨基酸表示高原鼯鼠、盲鼯鼠和裸鼯鼠共有的趋同进化位点;R代表精氨酸,M代表甲硫氨酸,K代表赖氨酸,Q代表谷氨酰胺,H代表组氨酸,T代表苏氨酸,I代表异亮氨酸,S代表丝氨酸,D代表天冬氨酸。

The sequences following the phylogenetic tree represent the amino acid sequences and their corresponding nucleotide sequences. The amino acids in red font indicate the convergent evolutionary sites shared by the *Eospalax baileyi*, *Nannospalax galili*, and *Heterocephalus glaber*. R represents arginine, M represents methionine, K represents lysine, Q represents glutamine, H represents histidine, T represents threonine, I represents isoleucine, S represents serine, and D represents aspartic acid.

图4 CPT-1A 系统进化树和趋同进化位点

Figure 4 Phylogenetic tree of CPT-1A and convergent evolutionary sites



ZL. 低海拔组(2 700 m);ZH. 高海拔组(3 700 m)。ns. 差异无统计学意义, $P > 0.05$ ;\*.  $P < 0.05$ \*\* $. P < 0.01$ 。

ZL. Low-altitude group (2 700 m); ZH. High-altitude group (3 700 m); ns. Not significantly different,  $P > 0.05$ ; \*.  $P < 0.05$ ; \*\* $. P < 0.01$ .

图5 CPT-1A mRNA 在不同海拔下高原鼯鼠组织中的表达量

Figure 5 CPT-1A mRNA expression levels in tissues of *Eospalax baileyi* at different altitudes

### 3 讨论与结论

对于生活在高原地区的地下鼠而言,其地下洞道中的低氧、高二氧化碳浓度环境是它们生存的限制性生态因子,从严重的低氧环境中能够快速有效地获取生命活动所需的能量和热量,是它们生存的

关键适应性策略<sup>[23]</sup>。高原鼯鼠作为在这种恶劣环境中生存的小型啮齿类动物,其能量代谢相关基因的表达水平与动物获取能量和热量维持其生命活动密切相关。本研究应用生物信息学方法对高原鼯鼠脂肪酸 $\beta$ -氧化过程中关键限速酶基因(*CPT-1A*)进行序列特异性分析,利用qRT-PCR测定了不同海拔条件下高原鼯鼠组织中的表达水平,探讨高原鼯鼠对高原低氧环境、高二氧化碳浓度环境适应的进化机制。

高原鼯鼠、盲鼯鼠和裸鼯鼠同属于地下鼠,终生生活在黑暗且封闭的地下洞道中。按照物种栖息地来看,这3种地下鼠栖息地的洞道生境特征都具有缺氧、通气性差和高二氧化碳浓度的特点<sup>[2,24-25]</sup>。从本研究构建的*CPT-1A*进化树中也可以看出高原鼯鼠与盲鼯鼠的同源性最高,且聚在同一个小的分支上,与裸鼯鼠聚在一个大的分支上(图2)。可见,高原鼯鼠、盲鼯鼠和裸鼯鼠3种地下鼠为了适应地下洞道生境,在*CPT-1A*基因序列上体现出了趋同性。

同为地下鼠的高原鼯鼠、盲鼯鼠和裸鼯鼠*CPT-1A*在86号位点有一个相同的趋同进化位点,即精氨酸(Arg, R),而在其他物种中为赖氨酸(Lys, K),推测这可能与高原鼯鼠、盲鼯鼠和裸鼯鼠生存的高海拔环境密切相关。同源性越高,表明2个物种亲缘关系越近,*CPT-1A*基因的变异差异就越小;反之,亲

缘关系越远, *CPT-1A* 基因的变异差异就越大。本研究结果显示, 高原鼯鼠与盲鼯鼠的同源性最高, 但高原鼯鼠 *CPT-1A* 基因的变异位点与其他地下鼠的 *CPT-1A* 基因变异位点相比也不完全相同。高原鼯鼠 *CPT-1A* 基因与褐家鼠、小家鼠均没有相同的趋同进化位点, 说明高原鼯鼠 *CPT-1A* 基因与褐家鼠、小家鼠的趋同进化变异差异大, 说明高海拔的生活环境对高原鼯鼠 *CPT-1A* 基因的变异存在较大影响。

生物体进行脂肪代谢的主要器官是肝脏, 肝脏细胞液中的脂肪酸和其他器官组织细胞中获取的脂肪酸会集合在一起, 在 *CPT-1A* 的作用下, 被转运至线粒体内部, 经过  $\beta$ -氧化后生成乙酰 CoA, 而在肝脏中生成的乙酰辅酶 A, 有少部分会经过 TCA 循环后产生 ATP 为机体供能, 更多的一部分是转化为酮体运输到肝脏以外的器官组织中进行氧化利用<sup>[26]</sup>。现有研究结果显示, *CPT-1A* 基因在生物体的各个组织中都有表达, 且在肝脏中表达量最高<sup>[26-27]</sup>, 但是在不同个体和品种中存在差异; 于宝莉等<sup>[28]</sup>的研究结果也表示, *CPT-1A* 基因在 180 日龄的绵羊肝脏组织中表达量最高, 在 180 日龄的山羊脾脏组织中表达量最高。Tu *et al.*<sup>[26]</sup>的研究结果表明, 在鸡的各个部位、器官的组织中, *CPT-1A* 基因也存在表达, 但是相对表达量不高; 在白羽鸡的集中产蛋时期, *CPT-1A* 基因在其肝脏中的表达量高于其他部位和器官的组织。本研究结果显示, *CPT-1A* 基因在高、低海拔高原鼯鼠的各个组织中都有表达, 但在肝脏组织中 *CPT-1A* 基因表达量极显著高于其他 3 个组织。

研究发现, 随海拔升高, 温度降低, 高原鼠兔的氧耗量、基础代谢率和棕色脂肪含量显著增加, 皮下白色脂肪向棕色脂肪转变(米色化), 脂肪组织中氧化磷酸化解偶联蛋白(uncoupling protein 1, UCP-1)、线粒体生成相关的过氧化物增殖体激活受体  $\gamma$  共激活因子-1 $\alpha$  (peroxisome proliferator-activated receptor-coactivator-1 $\alpha$ , PGC-1 $\alpha$ ) 和线粒体呼吸链蛋白等产热相关基因表达显著增加, 从而应对高原寒冷和食物缺乏的严酷环境<sup>[29-31]</sup>。任明等<sup>[32]</sup>的研究结果显示, 海拔越高, 褐家鼠肝脏中乙酰辅酶 A 羧化酶 1 (acetyl coenzyme a carboxylase 1, *ACC1*) 的表达量就越高, *ACC1* 能催化乙酰辅酶 A 转化为 Malonyl-A, 而 *CPT-1* 活性会受 Malonyl-A 抑制, 最终抑制脂肪酸  $\beta$ -氧化, 同时, 研究结果还表示, 相同体质量情况下的高原鼠兔, 在冬季的热能消耗量比夏季热能消耗量低

29.7%<sup>[33]</sup>, 由此说明在高寒环境下动物自身机体的产能较少。寒冷、缺氧暴露相关的研究表明, 将褐家鼠的肝脏组织和肌肉组织分别暴露 1、7 d, 发现这 2 个组织中的 *CPT-1* 表达量显著减少, 所以同样认为动物在低氧、寒冷环境下的生存机制可能是降低脂肪酸  $\beta$ -氧化的代谢水平<sup>[34]</sup>。有学者发现, 将小家鼠的肝脏细胞暴露在低氧环境中可以降低 *CPT-1* 在肝脏 mRNA 中的表达, 从而使脂肪酸  $\beta$ -氧化受到抑制, 诱导肝脏脂肪的堆积<sup>[35]</sup>。因此, 在低氧、高寒环境下, 高原鼯鼠生命活动所需的能量消耗量相对不高, 在高海拔的高原鼯鼠背部脂肪中 *CPT-1A* 表达量极显著高于低海拔 *CPT-1A* 表达量, 说明在背部脂肪中的 *CPT-1A* 基因随着海拔升高越具有组织特异性表达, 背部的脂肪能更好地储能, 对维持自身的能量和热量起到关键作用。

总之, 高原鼯鼠 *CPT-1A* 基因与盲鼯鼠的同源性最高; 高原鼯鼠、盲鼯鼠和裸鼯鼠 3 种地下鼠 *CPT-1A* 存在明显的趋同进化位点; 低氧上调高原鼯鼠背部脂肪组织中 *CPT-1A* 基因的表达水平; 高原鼯鼠 *CPT-1A* 基因在进化过程中形成了特定的适应性突变, 这可能与高原鼯鼠适应地下洞道寒冷、低氧和高二氧化碳浓度的生境有关。

#### 参考文献:

- [1] 刘仁华. 中国鼯鼠的分类及地理区划[J]. 国土与自然资源研究, 1995(3): 54-56.  
LIU R H. Classification and geographic regionalization of Chinese zokor [J]. Territory & Natural Resources Study, 1995 (3): 54-56.
- [2] 曾绪祥, 王祖望, 师治贤. 高山地区高原鼯鼠的代谢特点及若干生理指标的观察[J]. 高原生物学集刊, 1984(3): 163-171.  
ZENG J X, WANG Z W, SHI Z X. Metabolic characteristics and some physiological parameters of mole rat *Myospalax baileyi* in alpine area [J]. Acta Biologica Plateau Sinica, 1984(3): 163-171.
- [3] 张佳钰, 高聪慧, 李吉梅, 等. 地下洞道生境下高原鼯鼠血液特征[J]. 野生动物学报, 2024, 45(2): 298-304.  
ZHANG J Y, GAO C H, LI J M, *et al.* Blood properties of plateau zokor in underground burrow conditions [J]. Chinese Journal of Wildlife, 2024, 45(2): 298-304.
- [4] 樊乃昌, 施银柱. 中国鼯鼠(*Eospalax*)亚属分类研究[J]. 兽类学报, 1982, 2(2): 183-199.  
FAN N C, SHI Y Z. A revision of the zokors of subgenus *Eospalax* [J]. Acta Theriologica Sinica, 1982, 2(2): 183-199.
- [5] 张小刚. 高原鼯鼠洞道气体变化研究[D]. 兰州: 兰州大学, 2016.  
ZHANG X G. Study on gas change in burrow of plateau zokor

- [D]. Lanzhou: Lanzhou University, 2016.
- [6] SHAO Y, LI J X, GE R L, *et al.* Genetic adaptations of the plateau zokor in high-elevation burrows [J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 17262.
- [7] 郝凤奇. 脂肪酸 $\beta$ -氧化促进Treg细胞分化的作用机制研究[D]. 长春: 东北师范大学, 2018.  
HAO F Q. Studies on the mechanism of Treg cell differentiation promoted by fatty acid  $\beta$ -oxidation [D]. Changchun: Northeast Normal University, 2018.
- [8] 崔青美. 家蚕肉碱棕榈酰基转移酶*BmCPT1*基因的鉴定及功能研究[D]. 重庆: 西南大学, 2017.  
CUI Q M. Identification and functional research of carnitine palmitoyltransferase *BmCPT1* gene in silkworm, *Bombyx mori* [D]. Chongqing: Southwest University, 2017.
- [9] 魏婷, 张永煜, 张庆华. 肉碱棕榈酰基转移酶1A的研究进展[J]. *生命科学*, 2013, 25(6): 614-620.  
WEI T, ZHANG Y Y, ZHANG Q H. Research advances of carnitine palmitoyltransferase 1A [J]. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 2013, 25(6): 614-620.
- [10] 贾晶莹, 刘宝宝, 蔡小艳. 苜蓿源 miR168b 通过靶向肉碱棕榈酰基转移酶1A对奶牛乳腺上皮细胞增殖、凋亡和脂滴积累的调控研究[J]. *动物营养学报*, 2023, 35(10): 6699-6712.  
JIA J Y, LIU B B, CAI X Y. Alfalfa miR168b regulates proliferation, apoptosis and lipid droplet production in bovine mammary epithelial cells through target gene carnitine palmitoyl transferase 1A [J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2023, 35(10): 6699-6712.
- [11] 田慧慧, 孙君卫, 马向飞, 等. 鸡*CPT1A*基因的生物信息学分析和组织表达谱构建[J]. *畜牧与兽医*, 2020, 52(12): 110-115.  
TIAN H H, SUN J W, MA X F, *et al.* Bioinformatics of chicken *CPT1A* gene and construction of its expression profile in tissue [J]. *Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2020, 52(12): 110-115.
- [12] 梁计峻, 林亚秋, 俞雨阳, 等. 山羊*CPT1A*基因的克隆表达及肌肉脂肪含量的相关性分析[J]. *华北农学报*, 2019, 34(5): 231-238.  
LIANG J J, LIN Y Q, YU Y Y, *et al.* Cloning and expression of goat *CPT1A* gene and its correlation with intramuscular fat content [J]. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 2019, 34(5): 231-238.
- [13] 高聪慧, 李吉梅, 徐波, 等. 高原鼯鼠和高原鼠兔血液参数和血红蛋白亚型对不同海拔生境的响应[J]. *生理学报*, 2023, 75(1): 69-81.  
GAO C H, LI J M, XU B, *et al.* Responses of blood parameters and hemoglobin subtypes in plateau zokors and plateau pikas to different altitude habitats [J]. *Acta Physiologica Sinica*, 2023, 75(1): 69-81.
- [14] BURLAND T G. DNASTAR's Lasergene sequence analysis software[M]//MISENER S, KRAWETZ S A. *Methods in molecular biology*: Vol. 32: bioinformatics methods and protocols. Totowa: Humana Press, 2000: 71-91.
- [15] KUMAR S, STECHER G, TAMURA K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2016, 33(7): 1870-1874.
- [16] AN Z F, ZHAO K, WEI L N, *et al.* *P53* gene cloning and response to hypoxia in the plateau zokor, *Myospalax baileyi* [J]. *Animal Biology*, 2018, 68(3): 289-308.
- [17] SWOFFORD D L. PAUP\*: phylogenetic analysis using parsimony (\* and other methods): version 4.0 beta version[M]. Sunderland: Sinauer Associates, 2002.
- [18] DARRIBA D, TABOADA G L, DOALLO R, *et al.* jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing[J]. *Nature Methods*, 2012, 9(8): 772.
- [19] STÖVER B C, MÜLLER K F. TreeGraph 2: combining and visualizing evidence from different phylogenetic analyses[J]. *BMC Bioinformatics*, 2010, 11: 7.
- [20] YANG Z H. PAML 4: phylogenetic analysis by maximum likelihood [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2007, 24(8): 1586-1591.
- [21] ZHANG J Z, NIELSEN R, YANG Z H. Evaluation of an improved branch-site likelihood method for detecting positive selection at the molecular level[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2005, 22(12): 2472-2479.
- [22] YANG Z H, WONG W S W, NIELSEN R. Bayes empirical Bayes inference of amino acid sites under positive selection[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2005, 22(4): 1107-1118.
- [23] 张佳钰, 安志芳, 王志洁, 等. 高海拔环境抑制高原鼯鼠和高原鼠兔的胆汁酸代谢[J]. *兽类学报*, 2023, 43(5): 553-567.  
ZHANG J Y, AN Z F, WANG Z J, *et al.* Inhibition of bile acid metabolism in plateau zokor (*Myospalax baileyi*) and plateau pika (*Ochotona curzoniae*) in high-altitude environments [J]. *Acta Theriologica Sinica*, 2023, 43(5): 553-567.
- [24] SHAMS I, AVIVI A, NEVO E. Oxygen and carbon dioxide fluctuations in burrows of subterranean blind mole rats indicate tolerance to hypoxic-hypercapnic stresses[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2005, 142(3): 376-382.
- [25] MCNAB B K. The metabolism of fossorial rodents: a study of convergence[J]. *Ecology*, 1966, 47(5): 712-733.
- [26] TU Y J, SU Y J, LI G H, *et al.* Expression of lipid metabolism-associated genes in male and female white feather chicken [J]. *The Journal of Poultry Science*, 2016, 53(2): 118-123.
- [27] 黄胥莱, 陈东, 万发春, 等. *CPT-1*基因在湘西黄牛不同组织中的发育性表达研究[J]. *中国牛业科学*, 2020, 46(2): 1-5.  
HUANG X L, CHEN D, WAN F C, *et al.* Study on the developmental expression of *CPT-1* gene in different tissues of Xiangxi cattle [J]. *China Cattle Science*, 2020, 46(2): 1-5.
- [28] 于宝莉, 高爱琴, 李金泉, 等. 肉碱棕榈酰基转移酶基因在绵羊和山羊不同肌肉组织中的表达分析[J]. *中国畜牧兽医*, 2012, 39(10): 1-6.

- YU B L, GAO A Q, LI J Q, *et al.* Expression analysis of *CPT* gene in different tissues from sheep and goat[J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2012, 39(10): 1-6.
- [29] BAI Z Z, WUREN T N, LIU S, *et al.* Intermittent cold exposure results in visceral adipose tissue “browning” in the plateau pika (*Ochotona curzoniae*) [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2015, 184: 171-178.
- [30] LI J, YANG Q Y, BAI Z Z, *et al.* Chronic cold exposure results in subcutaneous adipose tissue browning and altered global metabolism in Qinghai-Tibetan plateau pika (*Ochotona curzoniae*) [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2018, 500(2): 117-123.
- [31] ZHU H J, ZHONG L, LI J, *et al.* Differential expression of metabolism-related genes in plateau pika (*Ochotona curzoniae*) at different altitudes on the Qinghai-Tibet Plateau [J]. *Frontiers in Genetics*, 2022, 12: 784811.
- [32] 任明, 保积英, 贾晨阳, 等. 不同海拔大鼠习服过程中肝脏脂肪酸代谢相关指标变化[J]. *中国老年学杂志*, 2022, 42(23): 5757-5762.
- REN M, BAO J Y, JIA C Y, *et al.* Changes of fatty acid metabolism related indexes in liver of rats at different altitudes during acclimatization [J]. *Chinese Journal of Gerontology*, 2022, 42(23): 5757-5762.
- [33] SPEAKMAN J R, CHI Q S, OŁDAKOWSKI Ł, *et al.* Surviving winter on the Qinghai-Tibetan Plateau: pikas suppress energy demands and exploit yak feces to survive winter [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2021, 118(30): e2100707118.
- [34] DUTTA A, VATS P, SINGH V K, *et al.* Impairment of mitochondrial beta-oxidation in rats under cold-hypoxic environment [J]. *International Journal of Biometeorology*, 2009, 53(5): 397-407.
- [35] O’ BRIEN K A, MCNALLY B D, SOWTON A P, *et al.* Enhanced hepatic respiratory capacity and altered lipid metabolism support metabolic homeostasis during short-term hypoxic stress [J]. *BMC Biology*, 2021, 19(1): 265.