

高原鼠兔 *ob*基因的组织表达特征

杨洁^{1,2} 赵新全^{1*} 郭松长^{1,2} 李红阁^{1,2} 祁得林^{1,2} 王德鹏^{1,2} 曹俊虎^{1,2}

(1中国科学院西北高原生物研究所, 西宁 810001) (2中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要: *ob*基因编码的 leptin蛋白在调节生物体能量平衡中起到重要作用。本研究应用 Taqman探针 real time PCR技术对高原鼠兔 *ob*基因的组织分布进行检测。通过提取不同组织总 RNA, 经 DNase I消化后, 用随机引物进行反转录合成 cDNA, 采用特异性 Taqman探针和引物分别对 *ob*基因及 β -actin基因进行实时定量 PCR扩增, 对不同组织中 *ob*基因和 β -actin基因的初始拷贝数之比进行比较。结果表明 *ob*基因在脑、心脏、肺、肝脏、脾脏、肾脏、骨骼肌、脂肪组织中均有表达, 其中以白色脂肪组织中 *ob*基因表达量最高, 其次为心脏和肺, 表达量最低的是肝脏和肾脏。

关键词: 高原鼠兔; *ob*基因; Taqman探针; Real time PCR; 组织分布

中图分类号: Q754

文献标识码: A

文章编号: 1000 - 1050 (2007) 01 - 0033 - 06

The tissue expression character of *ob* mRNA in plateau pika (*Ochotona curzoniae*)

YANG Jie^{1,2}, ZHAO Xinquan^{1*}, GUO Songchang^{1,2}, LI Hongge^{1,2}, QI Delin^{1,2}, WANG Depeng^{1,2}, CAO Junhu^{1,2}

(1 Northwest Plateau Institute of Biology, the Chinese Academy of Sciences, Xining 810001, China)

(2 Graduated School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: Leptin, the production of the *ob* gene, plays an important role in the regulation of energy homeostasis. In this study, we detected the tissue expression character of *ob* gene in plateau pika (*Ochotona curzoniae*) using the method of real time PCR (Taqman probe). Total RNA was extracted from eight tissues including brain, heart, lung, liver, spleen, kidney, muscle and white adipose of plateau pika. After treated with DNase I, the total RNA was reverse transcribed with random primer to synthesize cDNA. Then the *ob* gene and β -actin gene were amplified with pika-specific Taqman probes and primers by real time PCR. The pika leptin mRNA in different tissues were normalized with β -actin mRNA to compensate for variations in input RNA amounts. Our results showed that *ob* mRNA was expressed in all of eight tissues, and tissular specificity was displayed with the highest in white adipose, next in heart and lung, and much less in kidney and liver.

Key words: *Ob* gene; Plateau pika (*Ochotona curzoniae*); Real time PCR; Taqman probe; Tissue distribution

动物与环境在长期相互作用中会导致动物结构、生理或行为等方面发生一定的变化。气候环境可以影响机体与外环境之间的温度梯度从而决定动物能量消耗 (Li *et al.*, 2001)。而动物只有在能量贮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 (李兴升, 2003)。强紫外线辐射、高寒、低氧是青藏高原主要的气候特征。独特的高原环境给动物的生存带来影响。高寒环境是影响这一地区小型哺乳动物产热的重要因素 (王德华等, 1993, 1996)。青藏高原高寒地区的小哺乳动物由于常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, 产热能力常年也维持在高水平 (宋志刚和王德华, 2002)。高原鼠兔 (*Ochotona curzoniae*) 是生活在青藏高原海拔 3 000 m 以上的小型非冬眠哺乳动物, 是青藏高原的特有种, 在维持青藏高原生态系统平衡中起到了重要作用 (Chien and smith, 2003)。在长期的进化过程中, 高原鼠兔形成了特有的生活方式和适应机制。通常表现为比较高的基础代谢率及非颤抖性产热 (non-shivering thermogenesis, NST) (Li *et al.*, 2001) 和

基金项目: 国家基础研究规划项目 (20005CB422005)

作者简介: 杨洁 (1973 -), 女, 博士研究生, 主要从事分子生物学与分子生态学研究。

收稿日期: 2005 - 12 - 25; 修回日期: 2006 - 08 - 17

* 通讯作者, correspondence author, E-mail: xqzhao@nwipb.ac.cn

高的氧利用率 (杜继曾和李庆芬, 1982; 杜继曾等, 1984) 来适应这种环境压力。与北美鼠兔 (*Ochotona princeps*) 相比, 高原鼠兔体内常年存在褐色脂肪组织 (brown adipose tissue, BAT), 且 BAT 含量及其显微结构随着季节产生适应性的变化, 表现为严寒冬季 BAT 含量增多, 线粒体体积增大, 峭的数量增多, 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, 1989, 1990, 1992; 王德华等, 1996, 1999)。在对高原鼠兔进行冷驯化以及脱冷驯化的实验中也表现出与自然环境相一致的生理变化: 冷驯化中, 鼠兔的非颤抖性产热, 褐色脂肪组织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), 这些均表明高原鼠兔是通过 BMR 与 NST 的调节, 维持恒定的体温, 形成对高原地区气温变化的适应。

自 Zhang 等 (1994) 首次克隆了 ob 基因以来, 有关该基因功能方面的研究, 便成为科研工作者的研究热点。ob 基因编码一个由 167 个氨基酸组成的分泌型蛋白 (leptin), 与分布于中枢和外周的多个组织器官中的 leptin 受体结合, 发挥其重要的生物学功能 (Zhang *et al.*, 1994)。例如维持机体能量平衡、促进机体的新陈代谢、调节生殖与发育、提高动物应激能力及免疫功能、参与造血等重要的生理功能 (Zhang *et al.*, 1994; Farid *et al.*, 1996, 1997; Zamorano *et al.*, 1997; Thierry *et al.*, 1997; Lord *et al.*, 1998)。Leptin 表达受到多种因素的调节, 比如冷暴露可以抑制 leptin 表达 (Trayhum *et al.*, 1996; Peino *et al.*, 2000), 而低氧环境下 leptin 合成增加 (Grosfeld *et al.*, 2001, 2002a, 2002b; Ambrosini *et al.*, 2002), 可见 ob 基因对低氧和低温环境变化较为敏感, 同时 leptin 又作为调节能量平衡的重要激素, 因而, 我们推测 ob 基因可能在高原鼠兔对高寒低氧的高原环境的适应机制中起到

了重要的作用。Yang 等 (2006) 报道了高原鼠兔 ob 基因 cDNA 序列以及在不同海拔下 ob 基因 mRNA 的表达特征, 高原鼠兔体内 ob 基因的表达特征却鲜为报道, 而这部分又是高原鼠兔生态适应分子机制研究最重要的内容。因此, 本文首次采用荧光定量 PCR 技术对高原鼠兔 ob 基因的组织分布特征进行了描述, 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 材料与方法

1.1 材料来源

采集于中国科学院北海高寒草甸生态系统试验站 (37°40'N, 101°23'E, 海拔 3 200 m) 附近, 采用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, 迅速取各组织器官投入液氮中, 回实验室置 -70 低温冰箱中长期保存备用。

1.2 主要实验试剂

载体 pMD18-T、限制性内切酶、Taq DNA 聚合酶为 TaKaRa 公司产品。大肠杆菌 DH5a、引物购自上海生工生物公司。Trizol RNA 提取试剂为 Invitrogen 产品, M-MLV 逆转录酶、胶回收试剂盒购自 Promega 公司。其他试剂均为国产或进口产品。含有 ob 基因以及 β -actin 基因片段的重组质粒为本实验室自行克隆。

1.3 实验步骤

1.3.1 引物及 Taqman 探针的设计

Real time PCR 中 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 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 1。

表 1 Real time PCR 中所使用的引物及探针序列

Table 1 Primers and Taqman probes for real-time PCR

| 目的基因 Target gene | 引物 (探针) 名称 Primer (probe) name | 引物 (探针) 类型 Primer type | 引物 (探针) 序列 Sequence (5' - 3') | 预期片段长度 Expected size |
|---------------------|-----------------------------------|---------------------------|-----------------------------------|-------------------------|
| ob | 270F | forward | CCC GGA ATG TGG TCC AAA | 66 bp |
| | 335R | reverse | CAG CTA CCA GGT GCA GAA GGT | |
| | 289T | Taqman probe | TGC CAA TGA CCT GGA GAA CCT CCG | |
| β -actin | B T277F | forward | GCG AGA TCG TCG GTG ACA T | 67 bp |
| | B T343R | reverse | GCC ATC TCC TGC TCG AAG TC | |
| | B T297T | Taqman probe | AAG GAG AAG CTG TGC TAC GTC GCC C | |

1.3.2 高原鼠兔不同组织 RNA 提取

高原鼠兔不同组织(脑、心脏、肺、肝脏、脾脏、肾脏、骨骼肌、白色脂肪组织)总 RNA 的提取采用 Trizol reagent 一步抽提法完成。用无 RNase 的 DNase I 处理总 RNA, 以去除总 RNA 中残存的基因组 DNA。紫外分光光度计测其浓度和纯度。甲醛变性琼脂糖凝胶电泳鉴定其完整性。

1.3.3 cDNA 的合成

取不同组织总 RNA 各 2 μ g 分别与 0.5 μ g 随机引物 70 保温 5 min, 迅速冰浴 2 min。将上述反应液加入到如下逆转录反应体系中(25 μ l) 含 1 \times M-MLV buffer, 0.5mM dNTPs, 25 units Rnasin, 200 units M-MLV 逆转录酶; 37 保温 1 h; 95 保温 5 min 以灭活逆转录酶, 合成的 cDNA - 20 保存备用。

1.3.4 标准曲线的制备

测定含 ob 基因和内源基因 β -actin 部分片段的重组质粒的浓度, 按照 1 μ g 1 000 bp 的 DNA 相当于 9.1×10^{11} 个分子来计算其拷贝数 (Overbergh *et al.*, 1999), 估计每微升体积中所含的质粒拷贝数, 以确定 Real time PCR 反应体系中的上样量。将已知浓度的质粒分别稀释 $10^3 \sim 10^7$ 5 个浓度梯度, 按同样方法计算不同浓度下的拷贝数。

1.3.5 Real-time PCR 反应体系的建立

建立表 2 所示反应体系, 每一种 DNA 模板的扩增重复 3 管。PCR 扩增参数为: 95 预变性 2 min, 95 5 s, 60 30 s, 45 个循环扩增。信号收集在每一循环第二步: 60 30 s, Real-time PCR 扩增在美国伯乐公司生产的 iCycler Q™ Real-time PCR Detection System 上进行。

表 2 荧光定量 PCR 反应体系

Table 2 Quantitative PCR Reaction Components

| 组分 Component | 体积 Volume | 终浓度 Final concentration |
|----------------------------------|---------------|----------------------------|
| Taq DNA polymerase (5U/ μ l) | 0.25 μ l | 25U/ml |
| 10 \times PCR buffer | 5 μ l | 1 \times |
| MgCl ₂ (25mM) | 4 μ l | 2 mM |
| dNTP mixture (2.5mM each) | 4 μ l | 200 μ M each |
| Template DNA | 5 μ l | |
| Forward primer (10 μ M) | 2 μ l | 0.4 μ M |
| Reverse primer (10 μ M) | 2 μ l | 0.4 μ M |
| Taqman probe (10 μ M) | 1 μ l | 0.2 μ M |
| ddH ₂ O | 26.75 μ l | |
| 总体积 Total volume | 50 μ l | |

2 结果

2.1 高原鼠兔不同组织总 RNA 提取

利用 Trizol reagent 一步抽提法提取高原鼠兔不同组织(脑、心脏、肺、肝脏、脾脏、肾脏、骨骼肌、白色脂肪)总 RNA, 在紫外分光光度计下测定其浓度和纯度。测得 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值在 1.9 ~ 2.0 之间, 说明所提的总 RNA 纯度高, 无基因组、蛋白质或其他杂质的污染。总 RNA 经 1% 的甲醛变性琼脂糖凝胶电泳分离, 溴化乙锭染色, 紫外照射下显示, 28S rRNA 亮度大约是 18S rRNA 亮度的 1 ~ 2 倍, 说明所提的总 RNA 完整, 没有或者很少有降解, 可以作为逆转录模板用于 cDNA 合成 (图 1)。

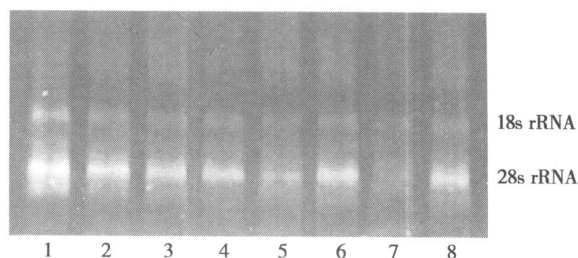


图 1 甲醛变性琼脂糖凝胶电泳分析高原鼠兔不同组织总 RNA

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

Fig. 1 Formaldehyde-agarose gel electrophoresis analysis of total RNA of different tissues in plateau pika. 1 brain; 2 heart; 3 lung; 4 liver; 5 spleen; 6 kidney; 7 muscle; 8 white adipose tissue

2.2 标准曲线的获得

紫外分光光度计下测得 ob 基因重组质粒浓度, 按前述方法计算单位体积质粒拷贝数; 将质粒用 TE 缓冲液稀释 $10^3 \sim 10^7$ 倍; 内源基因 β -actin 的重组质粒按同样方法进行浓度测定和稀释。两个基因的扩增曲线和标准曲线如图 2 所示。

由图 2 可看出, ob 基因的标准曲线各点相关系数为 0.996, 相关性较高, 曲线定量准确。直线回归方程为 $Y = -3.516X + 40.735$, 曲线斜率为 -3.516, 说明反应的扩增效率较高。内源 β -actin 基因标准曲线相关系数为 0.991, 直线回归方程为 $Y = -3.451X + 43.299$, 曲线斜率为 -3.451。利用直线回归方程所得到的斜率按公式 $[10^{(-1/slope)} - 1] \times 100$ 计算扩增效率 (Elyanne, *et al.*, 2001), 可见, 两条标准曲线的各自相关性较高, 扩增效率高。应用这两条曲线定量分析可以得到准确结果。

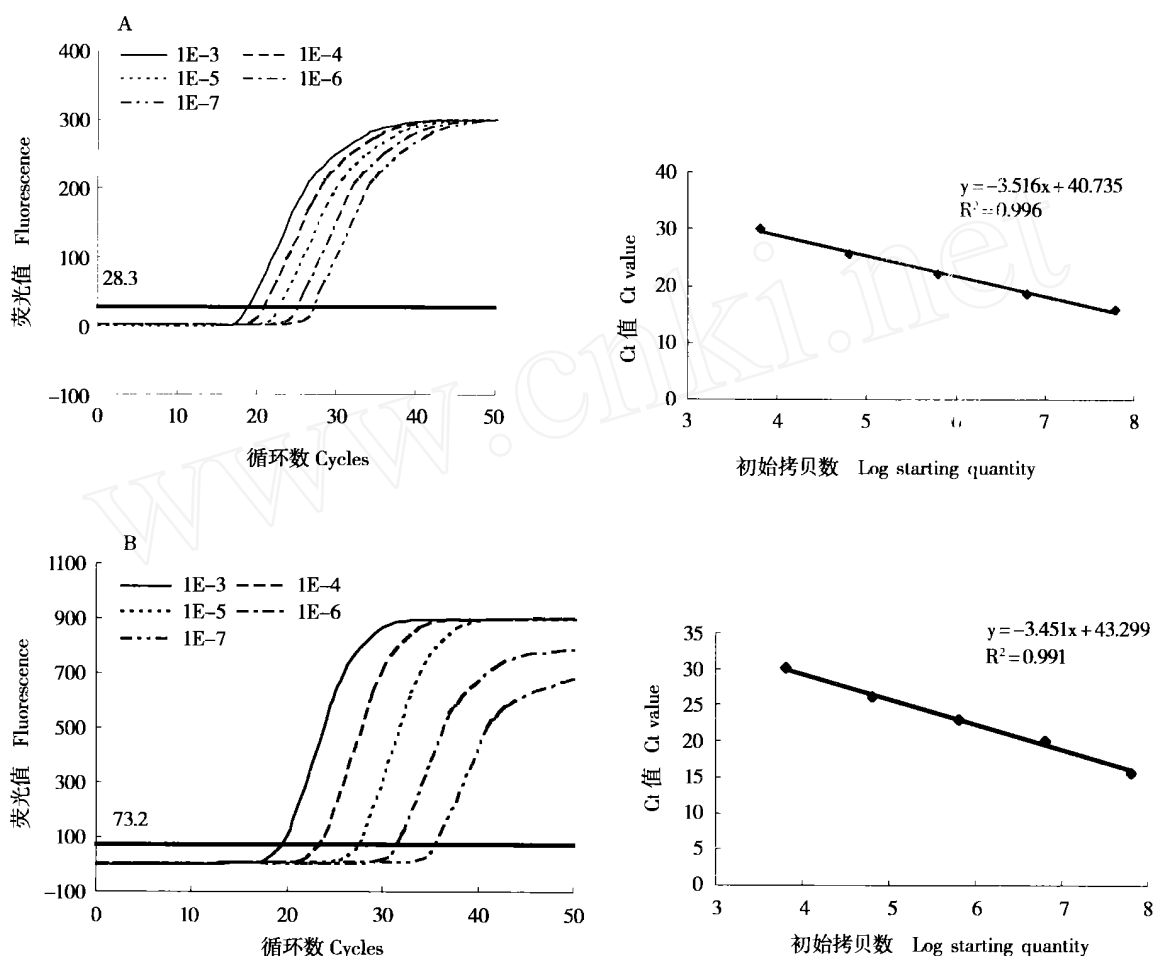


图 2 ob基因及内源基因 β -actin重组质粒荧光定量 PCR扩增曲线及标准曲线 (扩增曲线只显示不同稀释浓度单孔扩增曲线)

A: ob基因 real-time PCR扩增曲线及标准曲线; B: 内源 β -actin基因 real-time PCR扩增曲线及标准曲线

Fig.2 The amplification plot and standard curve of ob gene and β -actin gene. The amplification plot showed the plot of single pore in each dilution.

A: the amplification plot and standard curve of ob gene; B: the amplification plot and standard curve of β -actin gene

2.3 高原鼠兔不同组织 ob基因的分布特征

通过 icycler分析软件自动将未知样品的荧光值与标准曲线荧光值相比对计算得出反应体系的初始拷贝数值 (以对数值来表示)。将不同组织 ob基因与 β -actin基因初始拷贝数之比作图 (图 3)。由图 3显示出高原鼠兔 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, 其中在白色脂肪组织中表达量最高, 心脏和肺中 ob基因的表达量次之, 而肝脏和肾脏中 ob基因的表达量最低。

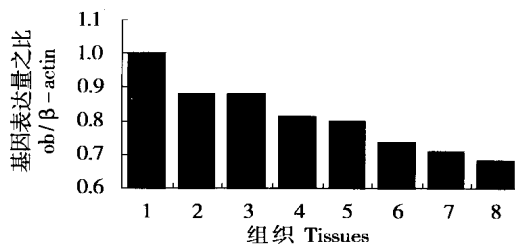


图 3 高原鼠兔 ob基因组织分布比较

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

Fig.3 Comparison of tissues distribution of ob gene in plateau pika

1 white adiposetissue; 2 heart; 3 lung; 4 spleen; 5 muscle; 6 brain; 7 kidney; 8 liver

3 讨论

高原鼠兔作为青藏高原特有种有其独特的高原环境的适应方式和机制, 因此探讨高原环境作用下的基因表达特征是揭示高原鼠兔生态适应分子机制的重要内容。本文以 ob基因作为研究对象, 探讨了高原鼠兔在青藏高原这一独特自然环境下基因表达的组织分

布状态, 从而为进一步研究其生态适应分子机制奠定基础。

ob基因最初被认为只在白色脂肪组织表达

(Zhang *et al.*, 1994)。近年来随着分子生物技术手段的改进,灵敏度和准确度得到很大改善。ob基因组织分布特征的研究也有一些新进展,据报道,ob基因除在脂肪组织表达外,还在棕色脂肪组织、胎盘、纤维母细胞等组织细胞中表达(Cancelb *et al.*, 1998; Buchbinder *et al.*, 2001; Glasow *et al.*, 2001)。这些脂肪组织之外的ob基因表达现象,除了与ob基因表达具有种属特异性之外还与所使用的检测手段有关。目前对于基因mRNA的表达研究有4种常用方法:northern杂交、原位杂交、RNAse保护分析以及RT-PCR(Hod, 1992; Saccomanno *et al.*, 1992; Weis *et al.*, 1992; Parker and Bames, 1999),而本次研究则采用了以Taqman探针作为检测手段将高灵敏性与特异性融为一体的Real-time PCR技术描述高原鼠兔ob基因的组织表达特征,同时建立了高原鼠兔ob基因mRNA检测的优化条件。

为防止基因组DNA污染对结果影响,总RNA要经过无RNase的DNase I进行处理,以去除残留的基因组DNA,有效避免了由于基因组的扩增所产生的假象。评价标准曲线的优劣主要从扩增曲线,相关系数及回归曲线方程进行判断。通常,理想扩增曲线呈现“S”型,上升的坡度陡峭,且不同梯度之间的上升曲线形成平行线。回归直线的相关系数越接近1,说明该曲线定量越准确。同时回归曲线斜率越接近于 $[10^{(-1/\text{slope})} - 1] \times 100$,说明扩增效率越高。在本次研究中的标准曲线,两条曲线的相关系数都 >0.99 ,相关性好,且直线的斜率分别为-3.516和-3.451,扩增效率达92.5%和94.8%,结果显示本次定量准确,结论可靠。

Leptin最主要的生物学功能是调节能量代谢,可以减少动物摄食,增加机体代谢、体温及活动量(Pelleymounter *et al.*, 1995)。Leptin可以通过增加BAT中的解偶联蛋白1(uncoupling protein 1; UCP1),白色脂肪组织中的解偶联蛋白2(uncoupling protein 2; UCP2)以及骨骼肌中的解偶联蛋白3(uncoupling protein 3; UCP3)的表达来增加机体的能量(Scarpace, 1997; Zhou, 1997; Liu, 1998; 李兴升, 2004)。动物体内leptin水平对季节的适应具有种属特异性,布氏田鼠(*Lasiopodomys brandtii*)、根田鼠(*Microtus oeconomus*)和高原鼠兔体内leptin水平在冬季的环境下显著下降,而叙利亚仓鼠(*Mesocricetus auratus*)在冬季leptin水平增加(Wang *et al.*, 2006a, 2006b)。然而对高寒地区动物与温带地区动物体内leptin水平比较鲜为报道。本次研究所探讨的高原鼠兔ob基因

的组织表达特征表明:高原鼠兔ob基因可在脑、心脏、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基因这种多种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。

致谢: 承蒙河北省石家庄市卫生防疫站闫纯锴站长、陈杏琴副站长、徐保红主任、田会芳等同志在实验过程中给予的大力支持与帮助,谨此致谢。

参考文献:

- Ambrosini G, Nath A K, Sierra-Honigmann M R, Flores-Riveros J. 2002 Transcriptional activation of the human leptin gene in response to hypoxia: Involvement of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem*, **277** (37): 34601 - 34609.
- Buchbinder A, Lang U, Baker R S, Khoury J C, Mershon J, Clark K E. 2001. Leptin in the ovine fetus correlates with fetal and placental size. *Am J Obstet Gynecol*, **185** (4): 786 - 791.
- Cancelb R, Zingaretti M C, Sarzani R, Ricquier D, Cinti S. 1998. Leptin and Ucp1 genes are reciprocally regulated in brown adipose tissue. *Endocrinology*, **139** (11): 4747 - 4750.
- Chien H L, Smith A T. 2003. Keystone status of plateau pika (*Ochotona curzoniae*): effect of control on biodiversity of native birds. *Biodivers Conserv*, **12**: 1901 - 1912.
- Du J Z, Li Q F. 1982. Effects of simulated hypoxic acclimation on organism, organ and hematology in *Ochotona curzoniae* and rats. *Acta Theriologica Sinica*, **2** (1): 35 - 41. (in Chinese)
- Du J Z, Li Q F, Chen X G. 1984. Effect of simulated altitude on liver of *Ochotona curzoniae* and rats. *Acta Zoologica Sinica*, **171** (1): 201 - 203. (in Chinese)
- Elyanne G, Yanne M, Axelle D, Chahrazed B, Jean-Claude N, Antoine G C. Quantification of human cytomegalovirus DNA by real-time PCR. *J Clin Microbiol*, **39** (2): 772 - 775.
- Farid F C, Khalid M, Ronghua L, Mary E L. 1997. Early onset of reproductive function in normal female mice treated with leptin. *Science*, **275** (5296): 88 - 90.
- Farid F, Chehab F F, Mary E L, Ronghua L. 1996. Correction of the sterility defect in homozygous obese female mice by treatment with the human recombinant leptin. *Nat Genet*, **12** (3): 318 - 320.
- Glasow A, Kiess W, Anderegg U, Berthold A, Bottner A, Kratzsch J. 2001. Expression of leptin (Ob) and leptin receptor (Ob-R) in human fibroblasts: regulation of leptin secretion by insulin. *J Clin Endocrinol Metab*, **86** (9): 4472 - 4479.
- Grosfeld A, Andre J, Mouzon S H, Berra E, Pouyssegur J, Guerre-Millo M. 2002a. Hypoxia-inducible Factor 1 Transactivates the Human Leptin Gene Promoter. *J Biol Chem*, **277** (45): 42953 - 42957.
- Grosfeld A, Zilberfarb V, Turban S, Andre J, Guerre-Millo M, Issad T. 2002b. Hypoxia increase leptin expression in human PAZ6 adipose cells. *Diabetologia*, **45** (4): 527 - 530.
- Grosfeld A, Turban S, Andre J, Cauzac M, Challier J C, Mouzon S H, Guerre-Millo M. 2001. Transcriptional effect of hypoxia on placental leptin. *FEBS Lett*, **502** (3): 122 - 126.

- Hod Y. 1992. A simplified ribonuclease protection assay. *Biotechniques*, **13** (6): 852 - 854
- Lord GM, Matarese G, Howard J K, Baker R, Bloom S R, Lechler R. 1998. Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression. *Nature*, **394** (6696): 897 - 901.
- Liu J S, Li Q F. 1996. Variation of thermogenesis in plateau pika (*Ochotona curzoniae*) during cold acclimation and de-cold acclimation. *Acta Zoologica Sinica*, **4** (4): 377 - 385. (in Chinese)
- Li Q F, Sun R Y, Huang C X, Wang Z K, Liu X T, Hou J J, Liu J S, Cai L Q, Li N, Zhang S Z, Wang Y. 2001. Cold adaptive thermogenesis in small mammals from different geographical zones of China. *Comp Biochem Physiol*, **129** (4): 949 - 961.
- Liu Q, Bai C, Chen F, Wang R P, Macdonald T, Gu M C, Zhang Q, Morsy A, Caskey C T. 1998. Uncoupling protein - 3: a muscle-specific gene upregulated by leptin in ob/ob mice. *Gene*, **207** (1): 1 - 7.
- Li X S, Wang D H. 2003. The role of leptin in the regulation of body weight reproduction and immunity in mammals. *Acta Theriologica Sinica*, **23** (2): 168 - 174. (in Chinese)
- Li X S, Wang D H. 2004. Mechanisms of molecular thermogenesis regulated by leptin in small mammals. *Chemistry of Life*, **24** (3): 268 - 270. (in Chinese)
- Overbergh L, Valckx D, Waer M, Mathieu C. 1999. Quantification of murine cytokine mRNAs using real time quantitative reverse transcriptase PCR. *Cytokine*, **11** (4): 305 - 312.
- Parker R M, Barnes N M. 1999. mRNA: detection by in situ and northern hybridization. *Methods Mol Biol*, **106**: 247 - 248.
- Peino R, Pineiro V, Gualillo Q, Menendez C, Brenlla J, Casabiell X, Diriguez C, Casanueva F F. 2000. Cold exposure inhibits leptin secretion in vitro by a direct non-specific action on adipose tissue. *Eur J Endocrinol*, **142**: 195 - 199.
- Pelleymounter M A, Cullen M J, Baker M B, Hecht R, Winters D, Boone T, Collins F. 1995. Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Sciences*, **269** (5223): 540 - 543.
- Saccomanno C F, Bordonaro M, Chen J S, Nordstrom J L. 1992. A faster ribonuclease protection assay. *Biotechniques*, **13** (6): 846 - 850.
- Scapace P J, Matheny M, Pollock B H, Turner N. 1997. Leptin increase uncoupling protein expression and energy expenditure. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **273** (1 Pt 1): E226 - E230.
- Song Z G, Wang D H. 2002. Influencing factors on basal metabolic rate in mammals. *Acta Theriologica Sinica*, **22** (1): 54 - 60. (in Chinese)
- Thierry T, Francesca G, Sundeep K, Michael D J, Bartolme B, Lawrence R. 1997. Leptin acts on human marrow stromal cells to enhance differentiation to osteoblasts and to inhibit differentiation to adipocytes. *Endocrinology*, **140** (4): 1630 - 1638.
- Trayhurn P, Duncan J S, Rayner D V. 1996. Acute cold-induced suppression of Ob (obese) gene expression in white adipose tissue of mice: mediation by the sympathetic nervous system. *Biochem J*, **311** (3): 729 - 733.
- Wang D H, Liu X D, Wang Z W, Shi Z X. 1993. Seasonal dynamics of composition and function of brown adipose tissue for plateau pika. *Acta Theriologica Sinica*, **13** (4): 271 - 276. (in Chinese)
- Wang D H, Sun R Y, Wang Z W. 1999. Effects of photoperiod and temperature on brown adipose tissues thermogenic properties in plateau pika. *Zoological Research*, **20** (5): 347 - 352. (in Chinese)
- Wang D H, Sun R Y, Wang Z W, Liu J S, Chen Z. 1996. Adaptive thermogenic properties during cold exposure in root vole. *Acta Zoologica Sinica*, **42** (4): 369 - 376. (in Chinese)
- Wang D H, Wang Z W. 1989. Strategies for survival in cold alpine environment of small mammals. *Acta Theriologica Sinica*, **9** (3): 176 - 185. (in Chinese)
- Wang D H, Wang Z W. 1990. In a cold alpine environment. Seasonal changes in the capacity of nonshivering thermogenesis in *Ochotona curzoniae* and *Microtus oeconomus*. *Acta Theriologica Sinica*, **10** (1): 40 - 53. (in Chinese)
- Wang D H, Wang Z W. 1992. Brown adipose tissue and its thermogenesis: a review. *Chinese J Ecology*, **11** (3): 43 - 48. (in Chinese)
- Wang J M, Zhang Y M, Wang D H. 2006a. Seasonal thermogenesis and body mass regulation in plateau pikas (*Ochotona curzoniae*). *Oecologia*, **149** (3): 373 - 382.
- Wang J M, Zhang Y M, Wang D H. 2006b. Seasonal regulations of energetics, serum concentrations of leptin, and uncoupling protein 1 content of brown adipose tissue in root voles (*Microtus oeconomus*) from the Qinghai-Tibetan plateau. *J Comp Physiol B*, **176** (7): 663 - 671.
- Weis J H, Tan S S, Martin B K, Wittwer C T. 1992. Detection of rare mRNAs via quantitative RT-PCR. *Trends Genet*, **8** (8): 263 - 264.
- Yang J, Zhao X Q, Guo S C, Li H G, Qi D L, Wang D P, Cao J H. 2006. Leptin cDNA cloning and its mRNA expression in plateau pikas (*Ochotona curzoniae*) from different altitudes on Qinghai-Tibet plateau. *Biochem Biophys Res Commun*, **345** (4): 1405 - 1413.
- Zamorano P L, Mahesh V B, De Sevilla L M, Chorich L P, Bhat G K, Brann D W. 1997. Expression and localization of the leptin receptor in endocrine and neuroendocrine tissue of the rat. *Neuroendocrinology*, **65** (3): 223 - 228.
- Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman J M. 1994. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*, **372** (6505): 425 - 432.
- Zhou Y T, Shimabukuro M, Koyama K, Lee Y, Wang M Y, Trieu F, Newgard C B, Unger R H. 1997. Induction by leptin of uncoupling protein - 2 and enzymes of fatty acid oxidation. *Proc Natl Acad Sci USA*, **94** (12): 6386 - 6390.
- 王德华, 王祖望. 1989. 小哺乳动物在高寒环境中的生存策略. 高原鼠兔和根田鼠褐色脂肪组织 (BAT) 重量和显微结构的季节性变化. *兽类学报*, **9** (3): 176 - 185.
- 王德华, 王祖望. 1990. 小哺乳动物在高寒环境中的生存对策. 高原鼠兔和根田鼠非颤抖性产热 (NST) 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.
- 王德华, 刘晓达, 王祖望, 师治贤. 1993. 高原鼠兔褐色脂肪组织成分与功能的季节动态. *兽类学报*, **13** (4): 271 - 276.
- 王德华, 孙儒泳, 王祖望. 1999. 光照和温度对高原鼠兔褐色脂肪组织产热特征的影响. *动物学研究*, **20** (5): 347 - 352.
- 王德华, 孙儒泳, 王祖望, 柳劲松, 陈志. 1996. 根田鼠冷驯化过程中的适应性产热特征. *动物学报*, **42** (4): 369 - 376.
- 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** (1): 35 - 41.
- 杜继曾, 李庆芬, 陈晓光. 1984. 模拟高原对高原鼠兔和大鼠肝脏的影响. *动物学报*, **17** (1): 201 - 203.
- 李兴升, 王德华. 2003. 瘦素在哺乳动物体重调节、繁殖和免疫中的作用. *兽类学报*, **23** (2): 168 - 174.
- 李兴升, 王德华. 2004. 瘦蛋白调控小型哺乳动物产热的分子机制. *生命的化学*, **24** (3): 268 - 270.
- 宋志刚, 王德华. 2002. 哺乳动物基础代谢率的主要影响因素. *兽类学报*, **22** (1): 54 - 60.
- 柳劲松, 李庆芬. 1996. 高原鼠兔冷驯化和脱冷驯化中的产热变化. *动物学报*, **42** (4): 377 - 385.