

DOI: 10.3969/j.issn.1000-7083.2014.04.006

## 高原鼠兔诱导型一氧化氮合酶 cDNA 克隆及序列分析

谢玲<sup>1,2</sup>, 郭新异<sup>1,2</sup>, 张涓泽<sup>3</sup>, 庞礴<sup>1,2</sup>, 都玉蓉<sup>4</sup>, 邹小艳<sup>1</sup>, 郭松长<sup>1\*</sup>, 赵新全<sup>1\*</sup>

(1. 中国科学院西北高原生物研究所, 中国科学院高原生物适应与进化重点实验室, 西宁 810008;

2. 中国科学院大学, 北京 100049; 3. 青海民族大学, 西宁 810007; 4. 青海师范大学生命与地理科学学院, 西宁 810008)

**摘要:** 高原鼠兔 *Ochotona curzoniae* 世居在青藏高原海拔 3000~5000 m 的地区, 是一种典型的低氧耐受哺乳动物。一氧化氮(NO)作为一种有效的血管舒张因子, 在预防低氧诱导的低氧性肺血管收缩反应和肺动脉高压中发挥着重要功能。诱导型一氧化氮合酶(iNOS)是一种催化 L-精氨酸合成 NO 的重要酶, 受低氧调控。本研究经 RT-PCR 和 cDNA 3' 末端快速扩增(3' RACE)方法成功克隆了高原鼠兔 iNOS 基因 cDNA 序列, 并对其分子特征进行了分析。结果显示: 高原鼠兔 iNOS cDNA 全长为 3981 bp, 开放阅读框(ORF)为 3450 bp, 共编码 1149 个氨基酸残基; 预测的蛋白序列与北美鼠兔、兔、人、大鼠、小鼠、狗以及猪的同源性分别为 98%、87%、82%、78%、78%、82% 和 83%; 蛋白结构预测结果显示高原鼠兔 iNOS 具有氧化域、还原域及黄素腺苷酸结合区域等 iNOS 所具有的典型结构域; 基于 iNOS 的最大似然树和贝叶斯树均支持鼠兔与兔有最近的亲缘关系, 与形态或其他分子标记构建的进化关系相符; 分子进化分析检测到高原鼠兔 iNOS 中存在 3 个正选择位点——32T、33Y 和 46R, 但不同模型的结果表明哺乳动物 iNOS 基因所受选择以净化选择为主, 不支持 iNOS 在高原鼠兔支系发生适应性进化。该研究为揭示高原鼠兔 iNOS 的表达特征及其在低氧适应中的作用与调控机制研究奠定了初步基础。

**关键词:** 高原鼠兔; 诱导型一氧化氮合酶; cDNA 克隆

中图分类号: Q959.8; Q78 文献标志码: A 文章编号: 1000-7083(2014)04-0511-11

## Cloning and Characterization of Inducible Nitric Oxide Synthase from Plateau Pika (*Ochotona curzoniae*)

XIE Ling<sup>1,2</sup>, GUO Xinyi<sup>1,2</sup>, ZHANG Xuze<sup>3</sup>, PANG Bo<sup>1,2</sup>, DU Yurong<sup>4</sup>, ZOU Xiaoyan<sup>1</sup>,  
GUO Songchang<sup>1\*</sup>, ZHAO Xinquan<sup>1\*</sup>

(1. Key Laboratory of Adaptation and Evolution of Plateau Biota, Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810008, China; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 3. Qinghai University for Nationalities, Xining 810007, China; 4. School of Life and Geography Science, Qinghai Normal University, Xining 810008, China)

**Abstract:** Plateau pika (*Ochotona curzoniae*), a native species living at 3000~5000 m above sea-level on the Qinghai-Tibetan Plateau, is a typical hypoxia-tolerant mammal. Nitric oxide (NO), which has been proved to be a vasodilator, plays important roles in preventing hypoxia-induced hypoxic pulmonary vasoconstriction and pulmonary hypertension under hypoxia. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) is a key enzymes that catalyzing L-arginine to NO and regulated by hypoxia stress. In this study, the cDNA of iNOS was cloned by RT-PCR and 3'-rapid amplification PCR of cDNA ends (3'-RACE) from the lung of plateau pika. The results showed that the length of iNOS cDNA of plateau pika was 3981 bp, containing an open reading frame (ORF) of 3450 bp and encoding 1149 amino acid residues. The deduced amino acid sequence was highly identical to those of the American pika (98%), followed by rabbit (87%), human (82%), rat (78%), mouse (78%), dog (82%) and pig (83%). The typical iNOS domains, including oxidase domain, reductase domain and FAD binding site, were identified in the iNOS of plateau pika. The molecular phylogenetic trees based on ML and Bayesian methods showed that pika has a close relationship with rabbit. Three positive selection sites, 32T, 33Y and 46R, were identified by the PAML analysis. However, the modeling results showed that the evolution of iNOS was mainly under negative selection, suggested that there was no adaptive evolution in plateau pika iNOS. This study laid a foundation for further exploration

收稿日期: 2014-03-19 接受日期: 2014-04-18

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金资助项目(30800118); 中国科学院知识创新工程重要方向项目(KSCX2-EW-J-26); 青海省科技计划类项目(2013-Z-750)

作者简介: 谢玲(1985~)女, 博士研究生, 主要从事高原动物低氧适应的研究

\* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: guo@nwipb.cas.cn; xqzhao@nwipb.cas.cn

on the expression pattern, function and regulatory mechanism of iNOS in plateau pika adapting to high altitude environment.

**Key words:** plateau pika; inducible nitric oxide synthase (iNOS); cDNA clone

一氧化氮(nitric oxide, NO)作为一种第二信使气体分子广泛参与生物体生理病理活动。由内皮细胞合成的 NO 能够发挥血管舒张的作用(Furchgott & Zawadzki, 1980; Palmer *et al.*, 1987), 作为神经递质在神经系统有着不可忽视的作用(O'dell *et al.*, 1991; Vincent, 1994), 以及能在巨噬细胞中起着免疫效应因子的功能(Nathan & Hibbs Jr, 1991; Bogdan, 2001)。NO 扩散到血管平滑肌细胞后作用于可溶性鸟苷酸环化酶(soluble guanylyl cyclase, SG) 诱导 3', 5'-环磷酸鸟苷(guanosine 3', 5'-cyclic monophosphate, cGMP) 的形成, cGMP 可以通过一系列调控机制诱导血管舒张(Klinger, 2007)。低氧条件下, 抑制 NO 的合成使大鼠肺动脉收缩反应增强(Archer *et al.*, 1989), 因此 NO 缓解低氧性肺动脉高压的作用越来越受到关注(Manukhina *et al.*, 2000; Hampl & Herget, 2000), 在临床研究中也越来越受到重视。

内源性 NO 由一氧化氮合酶(NO synthases, NOSs) 在氧气、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH)、黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD)、黄素单核苷酸(FMN) 和四氢生物蝶呤(BH<sub>4</sub>) 等共同参与下经一系列氧化还原反应催化 L-精氨酸合成(Stuehr, 1999; Alderton *et al.*, 2001)。具有稳定二聚体的 NOS 才能行使其功能, 而每个单体由碳(C) 末端还原结构域、氮(N) 末端氧化结构域和 Ca<sup>2+</sup>/Ca<sup>2+</sup> 结合蛋白(钙调素, CaM) 识别区域组成(Stuehr, 1999)。N 末端氧化结构域主要结合血红素、BH<sub>4</sub> 和 L-精氨酸形成一个合成 NO 的活性位点, 而 C 末端还原结构域结合 FAD、FMN 和 NADPH (Nishida *et al.*, 1992; Andrew & Mayer, 1999; Stuehr, 1999)。目前至少有 3 种不同亚型的 NOS, 分别是内皮型 NOS (endothelial NOS, eNOS)、神经型 NOS (neuronal NOS, nNOS) 和诱导型 NOS (inducible NOS, iNOS), 它们位于不同的染色体上并由不同的基因克隆(Stuehr, 1999; Alderton *et al.*, 2001)。eNOS 和 nNOS 又被称为组成型 NOS (cNOS), 因为它们在细胞内组成型表达, 主要受到外源 Ca<sup>2+</sup> 和 CaM 的调控; 而 iNOS 的表达不依赖 Ca<sup>2+</sup> 和 CaM, 但在细胞因子(如: 白介素-1、白介素-6、肿瘤坏死因子-α 和脂多糖) 刺激下会被诱导表达(Stuehr, 1999; Aktan, 2004)。低氧条件下, 低氧诱导因子-1α (HIF-1α) 结合到 iNOS 启动上的低氧反应

元件(HRE) 从而可以调控 iNOS 的转录(Melillo *et al.*, 1997; Vargiu *et al.*, 2000)。

高原鼠兔 *Ochotona curzoniae* 隶属于兔形目 Lagomophia 鼠兔科 Ochotonidae, 又名黑唇鼠兔, 是一种小型非冬眠啮齿类哺乳动物, 它主要分布在青藏高原及其边缘地带, 栖息于海拔 3000 ~ 5000 m 左右的裸露草原草甸区(王西之, 胡锦涛, 1999)。高原鼠兔的化石证据显示他们世居在青藏高原已经超过 3700 万年(Williams, 1980), 在长期的进化过程中高原鼠兔已经形成一套独特的适应高原环境(如低压低氧、低温和强辐射) 的生存机制。高原鼠兔通过增强氧利用率、钝化低氧性肺动脉收缩反应以及减少血红蛋白和红细胞压积来适应低氧环境(Ge *et al.*, 1998; Sheafor, 2003)。鉴于内源性 NO 作为血管舒张因子在缓解低氧性肺血管收缩反应和肺动脉高压中发挥的重要作用以及 iNOS 是合成 NO 的重要酶并且受低氧调控, 我们克隆了高原鼠兔 iNOS cDNA 序列, 分析了其 DNA 序列和蛋白特征, 为后续的研究做好基础准备。

## 1 材料

### 1.1 实验动物

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, 海拔约为 3200 m, 属于典型的高寒草甸。采用绳套活捕法捕捉的高原鼠兔, 经 3 mg/kg 的水合氯醛腹腔注射轻微麻醉后就地解剖, 迅速将各组织放入液氮中冷冻保存。

### 1.2 主要试剂

RNA 提取试剂盒购自威格拉斯公司, cDNA 第一链合成试剂盒(K1631) 购自 Fermentas 公司, Ex Taq 聚合酶和 dNTP mix 购自 TaKaRa 公司, pGEM-T easy 载体购自 Promega 公司, 感受态细胞 DH5α 购自全式金公司, DNA 凝胶回收纯化试剂盒及其他试剂耗材购自上海生工生物工程有限公司。

## 2 方法

### 2.1 组织总 RNA 提取与 cDNA 第一链合成

组织总 RNA 提取根据 RNeasyzol(威格拉斯公司) 试剂盒说明书操作。冷冻的 100 mg 高原鼠兔肺组织置于预冷研钵, 加入液氮快速研磨, 研磨后的粉

未转移至 0.1% DEPC 水处理过的 1.5 mL 离心管中,迅速加入 RNAVzol 裂解液,裂解 10 min。裂解液经氯仿和异丙醇抽提后得到的沉淀用 75% 乙醇(0.1% DEPC 水配制)漂洗。干燥后的 RNA 用 0.1% DEPC 水溶解,并用紫外分光光度计测定其  $A_{260/280}$  值以确定纯度,1% 琼脂糖凝胶电泳大致判断 RNA 完整性。

cDNA 第一链的合成参照 RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit( Fermentas) 说明书进行。20  $\mu$ L 体系中包含: 1  $\mu$ g/ $\mu$ L 总 RNA 样品 4  $\mu$ L、5  $\times$  reaction buffer 4  $\mu$ L、10 mM dNTP Mix 2  $\mu$ L、100  $\mu$ M 引物 oligo (dT)<sub>18</sub> 1  $\mu$ L、200 单位/ $\mu$ L M-MLV 反转录酶 1  $\mu$ L、

20 单位/ $\mu$ L 的 RNA 酶抑制剂 1  $\mu$ L 和 DEPC 水 7  $\mu$ L。热反应条件是: 65 $^{\circ}$ C 5 min、42 $^{\circ}$ C 60 min、70 $^{\circ}$ C 10 min。cDNA 产物经 2 倍稀释后保存在 -20 $^{\circ}$ C 备用。

### 2.2 引物设计

从 GenBank 数据库中下载北美鼠兔(XM\_004593897.1)、人(NM\_000625.4)、兔(XM\_002718780.1)、小鼠(NM\_010927.3)和大鼠(NM\_012611.3)的 iNOS cDNA 序列,用 Primer Primer 5.0 (Primer Biosoft, USA) 在其高度保守区内设计引物,3' RACE 引物基于测序结果进行设计。设计的引物序列发送至上海生工生物工程有限公司合成。引物信息见表 1。

表 1 高原鼠兔 iNOS cDNA 克隆引物  
Table 1 Primers for cDNA cloning of plateau pika iNOS

引物名字 Name of primers	引物序列(3'-5') Sequence of primers	产物长度( $\approx$ bp) Products	退火温度( $^{\circ}$ C) Annealing temperature
iNOS-1-sense	CACTGAGCTAGAATCCACAGAAG	838	58.5
iNOS-1-antisense	CGTAGCGGATGAGTTGAGTG		
iNOS-2-sense	CAAAGGAAATAGAAACAACAGGAAC	962	58.5
iNOS-2-antisense	GTAGTAGAAAGGGACAGGACG		
iNOS-3-sense	GATGCCCCARCGCTACAACA	1352	59.7
iNOS-3-antisense	GTGATGTCCAGGAAGTAGGTGAG		
iNOS-4-sense	ACCCTGGATGAGAGTGCCA	607	60
iNOS-4-antisense	CCCGAAGTCCTGTGTTTGC		
iNOS-5-sense	CTGCTTTGTGCGGAGTGC	457	59
iNOS-5-antisense	CACCTGCCTCGCTTAG		
dT-AP	CTGATCTAGAGGTACCGGATCCTTTTTTTTTTTTTTTT		
AP	CTGATCTAGAGGTACCGGATCC		
3' -GSP1	CTGCTTTGTGCGGAGTGC	800	59.7
3' -GSP2	AGCTAGCCGATGAGGTGCTC		

### 2.3 PCR 扩增

根据引物  $T_m$  值调整扩增的退火温度以及模板浓度筛选合适的扩增条件。PCR 反应体系为 50  $\mu$ L, 含 cDNA 1.5  $\mu$ L、10  $\times$  Ex PCR buffer 5  $\mu$ L、dNTP mix (2.5 mM each) 4  $\mu$ L、Sense/Antisense primer (10  $\mu$ M) 各 1  $\mu$ L、Ex Taq DNA Polymerase (5 U/ $\mu$ L) 0.5  $\mu$ L, 去离子水 37  $\mu$ L。PCR 反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 40 s、58 ~ 60 $^{\circ}$ C 退火 40 s、72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 共 36 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,参考 DNA Ladder 单一目的条带产物直接测序; 非特异扩增产物经 DNA 凝胶回收纯化试剂盒回收后克隆至 pGEM-T easy 载体中,经蓝白斑筛选挑取阳性克隆于 LB 培养基中扩大培养,分装重悬菌液送至上海生工生物工程有限公司测序。

### 2.4 3' RACE

以引物 dT-AP 代替寡核苷酸引物 oligo(dT)<sub>18</sub> 进

行 cDNA 第一链的合成,反应体系和热循环条件依照 RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit( Fermentas) 说明书进行。为了得到特异性高的产物,分别用 3' -GSP1 和 3' -GSP2 与 AP 引物做巢式 PCR。依据 Ex Taq DNA Polymerase( TaKaRa) 说明书配制其反应体系,根据引物  $T_m$  值选择合适的 PCR 退火温度。非特异性的 3' RACE 产物克隆至 pGEM-T easy 载体中,重悬的阳性克隆菌液送至上海生工生物工程有限公司测序。

### 2.5 cDNA 序列分析、构建系统发育树和适应性进化分析

测序结果采用 DNAMAN 6.0 比对和手动校正后拼接成全长 cDNA。获得的 cDNA 序列以及蛋白理化性质和功能结构域预测用在线生物信息学工具( www.ncbi.nlm.nih.gov 和 www.expasy.org) 分析。

根据高原鼠兔和其他物种的 iNOS 氨基酸序列

采用 PAUP4.0 (Swofford 2002) 和 MrBayes (Huelsenbeck & Ronquist, 2001) 分别构建最大似然树 (ML 树) 和贝叶斯树 (Bayes 树)。ML 树分析采用启发式搜索算法和 1000 次逐步随机叠加 (Stepwise-addition) 进行, 以自展检验 (Bootstrap test) 估计进化树中节点的支持率, 重复次数为 1000 次。Bayes 树构建主要以随机树作为起始树, 马尔科夫链的蒙特卡罗方法 (Markov chain Monte Carlo process) 设置三条热链和一条冷链同时运行, 共执行  $1 \times 10^7$  代, 每 2000 代保存一棵树。根据可能性值及经验估计, 舍弃前 25% 老化样本, 而后的 4750 棵树用于计算 50% 一致性树。

正选择通过  $d_N/d_S$  的比值来确定, 其中  $d_N$  表示非同义替代率 (nonsynonymous substitution rate),  $d_S$  表示同义替代率 (synonymous substitution rate)。 $d_N/d_S$  的比值 ( $\omega$ ) = 1, < 1 和 > 1 分别表示中性选择 (neutral selection), 负选择 (negative selection) 和正选择 (positive selection) (Yang *et al.* 2000)。采用经典工具 PAML (基于最大似然法检测单一位点的氨基酸或密码子是否受到正选择) (Yang 2000, 2007) 的 CODEML 程序分析高原鼠兔 iNOS 正向选择概率以确定其变异位点的性质。将鼠兔科 (高原鼠兔和北美鼠兔) 支系作为前景分支 (foreground branch), 而其他物种的支系作为背景分支 (background branch), 分别用 branch model、branch site model 和 site model 分析。Site model 中, M0, M1a 和 M7 为零假设模型, 分别与 3 个正选择模型 M3, M2a 和 M8 形成嵌套模型用于检测正选择 (Anisimova *et al.*, 2001)。采用似然比检验 (likelihood ratio test, LRT) 即 2 倍的正选择模型与零假设模型的最大似然率之差 ( $2\Delta\ell$ ) 是否显著来确定是否存在正选择 (Anisimova *et al.* 2001)。通过正选择模型可以鉴定出一些受到正选择的单个氨基酸 (或密码子) 位点。每个选择位点的后验概率通过贝叶斯经验检验 (Bayes empirical Bayes, BEB) 获得 (Anisimova *et al.* 2002)。当一个位点的  $\omega > 1$  且其后验概率 ( $P$ )  $\geq 0.95$  时被视为正选择位点 (positive selection site)。

### 3 结果

#### 3.1 核酸序列特性

本研究获得的高原鼠兔 iNOS cDNA 全长 3981 bp, 起始密码子是 ATG, 终止密码子 TGA 位于 3448 处, 包括多聚腺苷尾序列, 多聚腺苷化信号

AATAAA 位于 3945 处 (图 1)。该 cDNA 序列包含一个 3450 bp 的开放阅读框, 共编码 1149 个氨基酸残基。将其提交至 GenBank 登录号为 KC707553。在这 3450 个碱基中, 4 种碱基所占的比例分别是: A (21.98%)、G (28.00%)、T (19.30%) 和 C (30.72%), 即 A + T 含量为 41.28%, G + C 含量为 58.72%。高原鼠兔编码区序列与北美鼠兔、兔、人、小鼠、大鼠、狗和猪有很高的同源性, 分别为 97%、87%、84%、80%、81%、83% 和 83%。

#### 3.2 蛋白质理化性质和结构预测

蛋白在线预测服务器 (<http://web.expasy.org>) 分析结果显示该推导的 1149 个氨基酸组成的高原鼠兔 iNOS 蛋白的分子式为  $C_{5826}H_{9070}N_{1620}O_{1674}S_{50}$ , 分子量 (MW) 为 130.195 kDa, 等电点 (pI) 为 7.76。在这 1149 个氨基酸残基中, 疏水性 (Hydrophobic) 氨基酸所占比例最大, 共计 486 个, 包括: 丙氨酸 (Ala 80)、异亮氨酸 (Ile 41)、亮氨酸 (Leu 131)、苯丙氨酸 (Phe 47)、色氨酸 (Trp 22)、缬氨酸 (Val 165)、脯氨酸 (Pro 74) 和甲硫氨酸 (Met 26); 其次是极性不带电荷 (Polar) 氨基酸共计 367 个, 包括: 天冬酰胺 (Asn 33)、半胱氨酸 (Cys 24)、谷氨酰胺 (Gln 62)、丝氨酸 (Ser 75)、苏氨酸 (Thr 61)、甘氨酸 (Gly 75) 和酪氨酸 (Tyr 37); 强碱性 (Strongly Basic, 带正电) 氨基酸共计 168 个, 包括精氨酸 (Arg 74)、组氨酸 (His 38) 和赖氨酸 (Lys 56); 以及强酸性 (Strongly Acidic, 带负电) 氨基酸共 128 个, 其中包括天冬氨酸 (Asp 50) 和谷氨酸 (Glu 78)。该蛋白不稳定指数为 49.25, 表明该蛋白不稳定。Expasy 服务器预测了高原鼠兔 iNOS 蛋白二级结构和功能域结构, 该蛋白以  $\alpha$ -螺旋 (Helix, 35.5%) 和无规则卷曲 (coil, 47.2%) 为主伴随  $\beta$ -折叠结构 (extended-beta, 17.3%), 预测到 4 个主要的功能域区, 包括 128 ~ 499 位的一氧化氮合酶氧化功能域、538 ~ 669 位的黄素蛋白结合功能域、722 ~ 946 位的黄素腺嘌呤结合功能域和 965 ~ 1127 位的 C 末端还原结构域 (图 1)。其氨基酸序列与北美鼠兔、兔、人、大鼠、小鼠、狗、猪、猫以及牛的同源性分别为 98%、87%、82%、78%、78%、82%、83%、83% 和 82%。高原鼠兔 iNOS 蛋白与人 (登录号: NP\_000616.3)、小鼠 (登录号: AAM11887) 和藏羚羊 (登录号: XP\_005963745.1) iNOS 蛋白比对显示在其 N 末端和 C 末端变异较大, 而在主要的功能域则相对保守; 高原鼠兔 iNOS 蛋白存在两个氨基酸残基——862 Met (M) 和 863 Gln (Q) 的插入; 与



其他三种哺乳动物的 iNOS 蛋白序列比对,鼠兔 iNOS 个别位点发生突变,例如 89Asn、110Thr 和 111Tyr(在人、大鼠和藏羚羊中分别为 Ser、Lys 和 Ser),见图 2。

### 3.3 系统发育分析

选择亲缘关系较远的袋獾 *Sarcophilus harrisii* 和鸭嘴兽 *Ornithorhynchus anatinus* 为外群 根据高原鼠兔和其他物种 iNOS 序列构建的 Bayes 树和 ML 树一致 我们将其拼成一个系统发育树,并在各支点标记了 Bayes 树的后验概率和 ML 树的 bootstrap 值(见图 3,以“m/n”形式标记,m 数值表示 Bayes 树的后验概率,n 表示 ML 树的 bootstrap 值) 其结果均支持鼠兔与兔汇成一支为兔形目,兔形目与啮齿目形成一个啮齿动物大类,再与灵长目及树鼩目聚在一起形成长总目,继而灵长总目与劳亚兽总目形成真兽亚纲,最后与后兽亚纲(袋鼠)和原兽亚纲(鸭嘴兽)聚成哺乳纲动物。

### 3.4 选择压力分析

Branch model 分析结果显示 在 two-ratio 模型中其他支系  $\omega_0 = 0.14597$ ,大于鼠兔一支的  $\omega_1 = 0.10242$  且与 one-ratio 模型中  $\omega = 0.14279$  差异达到了显著水平( $P = 0.0129$ )。Branch-site model 分析无法找出选择位点,且原假设与备择假设差异不

显著。对包括高原鼠兔在内的 22 种哺乳动物的 iNOS 基因进行 site model 的嵌套模型分析,结果表明: M3 与 M0 模型比较提示不同位点间  $\omega$  值差异明显; M1a 和 M2a 模型间 LRT 达到极显著水平( $P = 0.0018$ ) 找出了 3 个受正选择位点,包括 32T、33Y 和 46R; M7 与 M8 模型检测出 5 个受正选择位点,包括 32T、33Y、46R、64S 和 73A(表 2)。

## 4 讨论

高原鼠兔长期受高寒和低氧胁迫。已发现的高原鼠兔适应机制包括:调节机体摄食与能量支出的关键因子 Leptin 受正选择作用(Yang *et al.* 2008),参与褐色脂肪组织产热的 Leptin 发生功能性进化(Yang *et al.* 2011);低氧性肺血管收缩反应钝化(Ge *et al.* 1998);肺组织中低氧诱导因子  $1\alpha$ (HIF- $1\alpha$ )和血管内皮生长因子 189(VEGF<sub>189</sub>)呈高丰度表达(Li *et al.* 2009, 2013)。鉴于高原鼠兔的低氧适应已有的生理特征研究和 NO 在低氧性肺血管舒张反应中发挥的重要作用,我们对参与高原鼠兔体内 NO 合成并受低氧调控的重要的合成酶 iNOS 进行克隆与进化分析。

本研究克隆的高原鼠兔 iNOS cDNA 结果揭示该基因能编码一条与人、兔以及啮齿目动物的同源

表 2 高原鼠兔 iNOS 基因的参数估计和似然比检验统计值  
Table 2 Parameter estimates and likelihood ratio test statistics ( $2\Delta\ell$ ) for plateau pika iNOS evolution analysis

Model	Parameter estimates	lnL	$2\Delta\ell$	Positive selection site
Branch model (two-ratio)	$\omega_0 = 0.14597$ $\omega_1 = 0.10242$	-25123.80582	6.18298 $P = 0.0129$	N. A.
Site model				
M0 (one-ratio)	$\omega = 0.14279$	-25126.89731	1419.598	N. A.
M3	$p_0 = 0.58563$ $p_1 = 0.35076$ ( $p_2 = 0.06361$ ) $\omega_0 = 0.01948$ $\omega_1 = 0.28257$ $\omega_2 = 0.98076$	-24417.09812	$P = 0.0000$	none
M1a	$p_0 = 0.82615$ ( $p_1 = 0.17385$ ) $\omega_0 = 0.07848$ ( $\omega_1 = 1.00000$ )	-24619.28605	12.72798 $P = 0.0017$	N. A.
M2a	$p_0 = 0.82430$ $p_1 = 0.17225$ $p_2 = 0.00345$ $\omega_0 = 0.07881$ ( $\omega_1 = 1.00000$ ) $\omega_2 = 4.07225$	-24612.92206		<b>32T 33Y 46R</b> 64S 73A 511K
M7	$p = 0.30950$ $q_1 = 1.45284$	-24427.92941	-575.88	N. A.
M8	$p_0 = 0.99999$ ( $p_1 = 0.00001$ )	-24715.86965	$P = 0.0000$	14Q 16C 17N 19T <b>32T 33Y</b> 34V 35L 38P 39V <b>46R</b> 60A <b>64S 73A</b> 111Y 275Q 511K 573R 653T 760P 791S 793D 849E 850E 974L 999S 1092H
Branch-site model	$p = 0.66157$ , $q = 1.38556$ $\omega = 2.33116$			
Model A: alternative	$p_0 = 0.82615$ , $p_1 = 0.17385$ $\omega_0 = 0.07848$ , ( $\omega_1 = 1.00000$ ), $\omega_2 = 1.00000$	-24619.28605	0.0000 $P = 1.0000$	none
null	$p_0 = 0.82615$ , $p_1 = 0.17385$ , $\omega_0 = 0.07848$ , ( $\omega_1 = 1.00000$ , $\omega_2 = 1.00000$ )	-24619.28607		

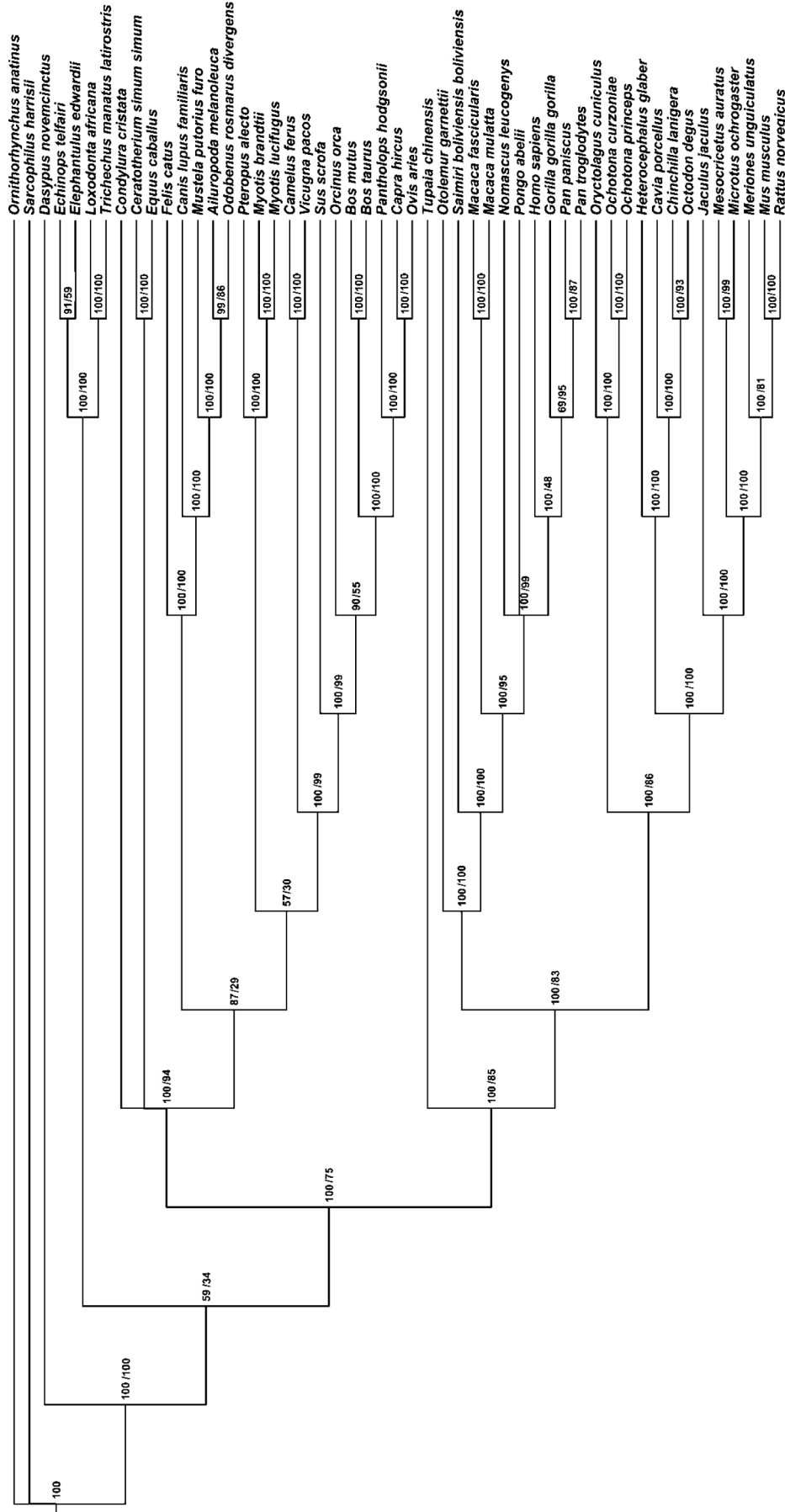
lnL: 最大似然值的对数;  $2\Delta\ell$ : 似然率检验 指 lnL 之差的 2 倍; P 值表示在自由度下的卡方检验; M0 与 M3 比较的自由度为 4, M1a 与 M2a 以及 M7 和 M8 比较的自由度为 2; 后验概率  $\geq 50\%$  的正选择位点被列出,其中后验概率  $\geq 95\%$  的正选择位点用黑体显示

lnL: log likelihood;  $2\Delta\ell: 2 \times (\ln L_1 - \ln L_2)$ ; P means the probability value test by chi-square under the special degree of freedom (df); the df of M0 vs M3, M1a vs M2a and M7 vs M8 is 4, 2 and 2, respectively; the positive selection sites with the  $P \geq 50\%$  were shown, and the positive selection sites with the  $P \geq 95\%$  were shown in bold

Human	MACPWKFLFKTKFHQYAMNGEKDINNVEKAPCATSSPVTQDDLQYHNSKQQNESPQLVETGKKSPELVKLDATPLSSPRHVRIRKNW	90
Chiru	MACPWQFLFKIKSQKVDLTTELDINNKKGHQPPSSPVTQDDPKRHSKPKHGNESPPQLTGTVKTSPPDLGKLDAPPSACPRHVRIRKNW	90
Pika	MACPWRFLFKTKSQCNLTKTEKDINNNGVGVYVYVSSPVTQDEPKRHGLGKHH... QPPAVAAEKSPDLSGLDAPPSACPRHLIRINW	87
Mouse	MACPWKFLFKVKSQSDLKKEKDINNKKTPCAVLSPTIQDDPKS... HQNGSPQLLTGTAQNVPELTKLHVT. STRPQYVIRIKNW	84
Human	GSGMTFQDTLHKKAKGILTCRSKSLGSIIMTPKSLTRGPRDKPTPPDELLPQAIEFVNQYYSFKEAKIEEHLARVEAVTKEIETTGTYYQ	180
Chiru	GSGVTFQDTLHKKAKGDLSCSKSCLASIMNPKSLTIGPRDKPTPPDELLPQAIEFVNQYYSFKEAKIEEHLARVEAVTKEIETTGTYYQ	180
Pika	GNGMTLQDTLHLKAKEDSTCKSTYCGAIMSPKGMTRGPRDRPIPAEELLPQAIEFVNQYYSCKEAKIEEHLARVEAVTKEIETTGTYYQ	177
Mouse	GSGEILHDTLHKKATSDFTKSKSCLGSIIMNPKSLTRGPRDKPTPELELLPHAIIEFVNQYYSFKEAKIEEHLARLEAVTKEIETTGTYYQ	174
Human	LTGDELIFATKQAWRNAPRCIGRIQWSNLQVFDARSCSTAREMFEHICRHVRYSTNNGNIRSAITVFPQRSQDGHDFRVWNAQLIRYAGY	270
Chiru	LTGDELIFATKQAWRNAPRCIGRIQWSNLQVFDARSCSTAQEMFEHICRHVRYATNNGNIRSAITVFPQRSQDGHDFRVWNAQLIRYAGY	270
Pika	LTGDELIFATKQAWRNAPRCIGRIQWSNLQVFDARSCSTAQEMFEHICRHLYSTNNGNIRSAITVFPQRSQDGRHDFRIWNTQLIRYAGY	267
Mouse	LTLDELIFATKMAWRNAPRCIGRIQWSNLQVFDARNCSTAQEMFQHICRHILYATNNGNIRSAITVFPQRSQDGHDFRILWNSQLIRYAGY	264
Human	QMPDGSIRGDPANVEFTQLCIDLGWKPKYGRFDVPLVLQANGRDPELFEIPPDVLEVAMEHPKYEFWFRELELKWYALPAVANMLLEVG	360
Chiru	QMPDGSIRGDPASVEFTQLCIDLGWKPKYGRFDVPLVLQADGRDPELFEIPPDVLEVMEHPRYEWFRELELKWYALPAVANMLLEVG	360
Pika	QMPDGTIQGDPANAFTQLCIDLGWKPRFGRFDVPLVLQANGDPELFEIPPELLEVMEHPKYEFWFRELELKWYALPAVANMLLEAG	357
Mouse	QMPDGTIRGDAATLEFTQLCIDLGWKPRYGRFDVPLVLQADGDQPEVFEIPPDVLEVMEHPKYEFWFRELELKWYALPAVANMLLEVG	354
Human	GLEFPGCPFNQWYMGTEIGVRFDFCDVQRYNILEEVGRRMGLETHKLASLWKDQAVVEINIAVLHSFQKQNVTIMDHSAEASFMYMQNE	450
Chiru	GLEFPGCPFNQWYMGTEVGRVDFCDVQRYNILEEVGRRMGLETHKLASLWKDRAVVEINAVLHSFQKQNVTIMDHSAEASFMYMQNE	450
Pika	GLEFPACFPNQWYMGTEIGARDFCDAQRYNILEEVGRRMGLETHRLASLWKDRAVTEINAVLHSFQKQNVTIMDHSAEASFMYMQNE	447
Mouse	GLEFPACFPNQWYMGTEIGVRFDFCDVQRYNILEEVGRRMGLETHLTLASLWKDRAVTEINAVLHSFQKQNVTIMDHHTASESFMYMQNE	444
Human	YRSRGGCPADWIWLVPPMSGSITPVFHQEMLNIVLSPFYFYQVEAWKTHVWQDEKRRPKRREIPLKVLVKAFLFACMLMRKTMASRVRVT	540
Chiru	YRSRGGCPADWIWLVPPISGSITPVFHQEMLNIVLSPFYFYQVEAWKTHVWQDERRRRQRREIRFKVLKAVFFASVLMHKAMSSRVRAT	540
Pika	YRTRGGCPADWIWLVVPIAGSITPVFHQEMLNIVLSPFYFYQVEAWKTHVWQDERKRRRRRGLKFRVLRVSVLPASVLMRKTMASRIRAT	537
Mouse	YRARGGCPADWIWLVVPPVSGSITPVFHQEMLNIVLSPFYFYQIEPWKTHIWNQEKLRPRRREIRFRVLVAVVFFASVLMRKMVASRVRAT	534
Human	ILFATETGKSEALAWDLGALFSAFNPKVVCMDKYRLSCLLEERLLLVTSTFGNGDCPGNGEKLKSLFMLKELNKNFRYAVFGLGSSM	630
Chiru	ILFATETGRSETLAQDLGALFSAFNPKVLCMDQYQLSHLEEEQLLLVVTSTFGNGDSPNGEKLKSLMLKELTNKFRYAVFGLGSSM	630
Pika	ILFATETGKSEALARDLGLFSAFNPKVLCMDEYRLNLSLEEQQLLLVVTSTFGNGDSPNGEKLKSLFLLKELTNKFRYAVFGLGSSM	627
Mouse	VLFATETGKSEALARDLATLFSYAFNTKVVCMQYKASTLEEEQLLLVVTSTFGNGDCPSNGQTLKSLFMLRELNHTFRYAVFGLGSSM	624
Human	YPRFCAFANDIDQKLSHLGASQLTPMGEGDELSGQEDAFRSWAVQTFKAACETFDVGRGKHHTQIPKLYTSNVTDWPHHYRLVQDSQPLDL	720
Chiru	YPPQCAFANDIDQKLSQLGASQLAPTGGDELSGQEEAFRSWAVQTFKAACETFDVSGKHHIEIPKLYTSNVTDWPHHYRLVQDSEPLDL	720
Pika	YPRFCAFANDVDQKLSHLGASQLTPTGGDELSGQEDAFRSWAVQTFKAACETFDVGRGKHHTQIPKLYTSSVAVWPHHYRLVQDSQPLDL	717
Mouse	YPPQCAFANDIDQKLSHLGASQLAPTGGDELSGQEDAFRSWAVQTFRAACETFDVRSKHHHTQIPKRFSTNATWEPQQYRLIQSPEPLDL	714
Human	SKALSSMHAKNVFTMLKSRQNLQSPSSRATILVELSCEDGQGLNYPGEHLGVCQGNQPALVQGLILERVVDGPTPHQTVRLEALDESG	810
Chiru	NKALSSMHAKHVFTMLKSKQNLQSPKSSRATLVLVELSCGQSPSYLPGEHLGVFPQCNQPALVQGLILERVVDGPAHPQVPRLETLCENG	810
Pika	RKALSNLHAKNVFTMLKSLQNLQSPKSSRATFLVQLSWEDSPGSPYLPGEHLGVCPSNQPALVQGLILERVVDSPDPHHTVSLLETLDSENG	807
Mouse	NRALSSIHAKNVFTMLKSKQNLQSEKSSRATLVLVQLTFEGSRGSPYLPGEHLGIFPGNQTALVQGLILERVVDCTPHQTVRLEALDESG	804
Human	SYWVSDKRLPPCSLSQALTYFLDITTPPTQLLQKLAQVATEEPERQRLAELCQ... PSEYKWKFTNSPTFLEVLEEFPSLRVSAFLLS	898
Chiru	SYWVKDKRLPPCSLSQALTYFLDITTPPTQLLRLKLAQLATEEAERQRLAELCQ... PSDYNKWKFTNSPTFLEVLEEFPSLRVSAFLLS	898
Pika	SYWVRDKRLPPCSLSQALTYFLDITTPPTQLLQKLAQLATEEAERQRLAELCQ... PSEYKWKFTNSPTFLEVLEEFPSLRVSAFLLS	897
Mouse	SYWVSDKRLPPCSLSQALTYFLDITTPPTQLLQKLAQLATEEAERQRLAELCQ... PSEYNDWKFNSNPTFLEVLEEFPSLRVSAFLLS	892
Human	QLPILKPRFYISSSRDHTPTEIHLTVAVVYTHTRDQGGLHHGVCSTWLSLKPQDPVPCFVRSAGFQLPEDRSHPCILIGPGTGIAIP	988
Chiru	QLPILKPRYISSSRDHTPTEIHLTVAVLTYRTRDQGGLHHGVCSTWLSLKPQDPVPCFVRSAGFQLPEDRSHPCILIGPGTGIAIP	988
Pika	QLPILKPRYISSSQDLTPMEVHLTVAVVYTRPRDQGGLHHGVCSTWLSLKPQDPVPCFVRSAGFQLPEDRSHPCILIGPGTGIAIP	987
Mouse	QLPILKPRYISSSQDHTPSEVHLTVAVVYTRTRDQGGLHHGVCSTWLRNLPQDPVPCFVRSVSGFQLPEDRSHPCILIGPGTGIAIP	982
Human	FRSFWQRLHDSQHKGVRRGMRMLVFGCRRPEEDHLYQEEMLEMAQKGVLAHVHTAYSRLPGPKVYVQDILRQRLASEVLRVLEHKEPGH	1078
Chiru	FRSFWQRLHEAEHGLQGGRMMLVFGCRRPEEDHLYWEEMLEMARKGVLEHVHTAYSRLPDQPKVYVQDILRQRLVGEVLRVLEHEEGH	1078
Pika	FRSFWQRLYDSANTGLRGRMMLVSGCRHPEEDHLYWEEMLEMMQKGVLDVHTAYSRLPGPKVYVQDILRQRLADEVLRVLELEAPGH	1077
Mouse	FRSFWQRLHDSQHKGLKGRMMLVFGCRHPEEDHLYQEEMQEMVRKRVLFQVHTAYSRLPGPKVYVQDILRQRLANEVLRVLEHGEQGH	1072
Human	LYVCGDVMARDVAHTLKLQVAAKLLNEEQVEDYFFQLKSQKRYHEDIFGAVFPYEAKKDRVAVQ. PSSLEMSAL	1153
Chiru	LYVCGDVMARDVAHTLKLQVATLALSLNEEQVEDYFFQLKSQKRYHEDIFGAVFPYEMKDKGAAPSDPRALGANRS	1154
Pika	IYVCGDVMARDVAHTLKLQVAAKLLGLSEEQVEDYFFQLKSQKRYHEDIFGAAPPYEVKKEGAARQ. PGNTKL...	1149
Mouse	LYICGDVMARDVATLTKLQVATLKLNEEQVEDYFFQLKSQKRYHEDIFGAVFSGYGAKKGSALAE. PKATRL...	1144

图 2 高原鼠兔、人(登录号: NP\_000616.3)、小鼠(登录号: AAM11887)和藏羚羊(登录号: XP\_005963745.1) iNOS 蛋白序列比较 相同的氨基酸残基灰色标记 高原鼠兔 iNOS 氨基酸残基特异性突变位点加粗标记

Fig. 2 Comparison of amino acid sequences of iNOS among plateau pika, human (GenBank accession No. NP\_000616.3), mouse (GenBank accession no. AAM11887) and chiru (GenBank accession no. XP\_005963745.1). Same residues are shown in grey, and mutations in plateau pika iNOS compared with other mammals are shown in bold.



2.0

图 3 基于各物种的 iNOS 基因构建的系统发育关系树  
 数字 “m/n” 中, m 表示 Bayes 树的后验概率, n 表示 ML 树的支持率  
 Fig. 3 Molecular phylogenetic tree based on cDNA sequences of iNOS

In the “m/n”, m means posterior probability of Bayes tree, and n means bootstrap value of ML tree



性达 80% 左右的蛋白序列。功能域预测结果揭示高原鼠兔 iNOS 蛋白与其他哺乳动物有一致的构成, 即含有 N 端氧化结构域、含 FMN、FAD 和 DADPH 结合位点的 C 端还原结构域 (Alderton *et al.*, 2001)。有的 iNOS 合成酶是  $Ca^{2+}$ /CaM 不依赖性的 (Hibbs *et al.*, 1990; Palmer *et al.*, 1993), 有的却是  $Ca^{2+}$ /CaM 依赖性的 (Palmer *et al.*, 1992), 预测的高原鼠兔 iNOS 的 CaM 结合位点序列与人 iNOS 的 CaM 结合位点序列“RPKRREIPLKVLVKAVLFACMLMRKTMASR” (Charles *et al.*, 1993) 和小鼠“RPRRREIRFRVLVKV-VFFASMLM” (Venema *et al.*, 1996) 以及预测的大鼠“RRREIRFTVLVKAVFFASVLMRKVMASRVRA” CaM 结合位点序列 (Iwashina *et al.*, 1996) 同源性不高, 揭示 iNOS 的 CaM 结合位点序列在哺乳动物中可能不保守。定点突变实验证明, 血红素铁离子结合在人 iNOS 蛋白的 200Cys 上, 血红素对维持 iNOS 二聚体稳定性有非常重要的作用 (Cubberley *et al.*, 1997), 高原鼠兔、大鼠、藏羚羊和人 iNOS 蛋白序列比对结果显示血红素结合区域非常保守, 表明高原鼠兔 iNOS 能形成完整的二聚体从而发挥其催化作用。锌离子 (Zn) 结合在高原鼠兔 iNOS 的 107Cys 和 112Cys (对应于人 110Cys 和 115Cys) 上, 点突变证明人 115Cys 对维持 iNOS 稳定性起着必不可少的作用 (Chen *et al.*, 1995)。精氨酸结合在高原鼠兔 iNOS 的 379Asp (对应于人 382Asp) (Fischmann *et al.*, 1999), 该结合位点在人、藏羚羊、小鼠和高原鼠兔 iNOS 保守区。总之, 高原鼠兔 iNOS 的血红素、L-精氨酸和 Zn 结合位点与人、藏羚羊和小鼠同源性很高, iNOS 的 N 端氧化结构域重要结合位点的高保守性有助于稳定二聚体的形成; 高原鼠兔 iNOS C 端还原域的 FMN、FAD 和 DADPH 结合区域与人、兔和小鼠相似度较高, 表明 FMN、FAD 和 DADPH 结合区域较为保守, 因为 FMN 和 FAD 在 iNOS 催化合成 NO 反应中发挥着传递电子的重要作用 (Masters *et al.*, 1996; Stuehr, 1997)。高原鼠兔 iNOS 插入的 2 个氨基酸残基 862Met (M) 和 863Gln (Q) 以及氨基酸突变后对其蛋白结构和功能的影响需要更进一步的研究。

在基于 iNOS cDNA 构建的系统发育树中, 高原鼠兔所属的鼠兔科与兔有更近的亲缘关系, 与啮齿目如大鼠和小鼠亲缘关系相对较远, 这与以往的研究一致 (Luo *et al.*, 2008)。

我们用嵌套模型分析了高原鼠兔 iNOS 基因的

正选择位点。M3 模型会导致对正选择位点的过度估计 (Anisimova *et al.*, 2001, 2002), 因此 M3 模型不被用于鉴定高原鼠兔 iNOS 基因的正选择位点。尽管 M2a 检测到 3 个正选择位点——32T、33Y 和 46R ( $P > 95\%$ ), M8 检测到 5 个正选择位点——32T、33Y、46R、64S 和 73A ( $P > 95\%$ ), 但为了减少和避免假阳性结果, 只有同时被 M2a 和 M8 检测到的正选择位点才被最终确认为正选择位点 (Anisimova *et al.*, 2002), 因此最终确认了 3 个正选择位点——32T、33Y 和 46R。但因为这 3 个正选择位点在 iNOS 的 N 末端, 在各物种间变异很大, 且所选物种亲缘关系相差甚远, 因此位点模型的分析结果不能用作高原鼠兔 iNOS 基因的适应性进化分析。不同模型的结果同样表明哺乳动物 iNOS 基因所受选择仍然以净化选择为主, 不支持 iNOS 在高原鼠兔支系发生适应性进化。

高原鼠兔和其他哺乳动物 iNOS 基因本质特征的相似性和蛋白序列重要功能域的高保守性暗示了 iNOS 基因功能的重要性。本研究克隆的 iNOS 作为一种受低氧调控的基因, 在研究高原鼠兔低氧适应中可作为一个新的切入点, 为揭示高原鼠兔 iNOS 的表达特征及其在低氧适应中的作用与调控机制研究奠定了初步基础。

## 5 参考文献

- 王酉之, 胡锦鑫. 1999. 四川兽类原色图鉴 [M]. 北京: 中国林业出版社: 260.
- Archer SL, Tolins JP, Raj L, *et al.* 1989. Hypoxic pulmonary vasoconstriction is enhanced by inhibition of the synthesis of an endothelium derived relaxing factor [J]. *Biochemical and biophysical research communications*, 164(3): 1198-1205.
- Aktan F. 2004. iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation [J]. *Life Sciences*, 75(6): 639-654.
- Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. 2001. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition [J]. *Biochemical Journal*, 357: 593-615.
- Andrew PJ, Mayer B. 1999. Enzymatic function of nitric oxide synthases [J]. *Cardiovascular research*, 43: 521-531.
- Anisimova M, Bielawski JP, Yang Z. 2001. Accuracy and power of the likelihood ratio test in detecting adaptive molecular evolution [J]. *Mol Biol Evol*, 18(8): 1585-1592.
- Anisimova M, Bielawski JP, Yang Z. 2002. Accuracy and power of bayes prediction of amino acid sites under positive selection [J]. *Mol Biol Evol*, 19(6): 950-958.
- Bogdan C. 2001. Nitric oxide and the immune response [J]. *Nature immunology*, 2: 907-916.
- Charles IG, Palmer RM, Hickery MS, *et al.* 1993. Cloning, characteriza-

- tion and expression of a cDNA encoding an inducible nitric oxide synthase from the human chondrocyte [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America ,90( 23) : 11419-11423.
- Chen PF , Tsai AL , Wu KK. 1995. Cysteine 99 of endothelial nitric oxide synthase ( NOS-III) is critical for tetrahydrobiopterin-dependent NOS-III stability and activity [J]. Biochem Biophys Res Commun , 215 ( 3) : 1119-1129.
- Cubberley RR , Alderton WK , Boyhan A , et al. 1997. Cysteine-200 of human inducible nitric oxide synthase is essential for dimerization of haem domains and for binding of haem , nitroarginine and tetrahydrobiopterin [J]. Biochem J , 323: 141-146.
- Fischmann TO , Hruza A , Niu XD , et al. 1999. Structural characterization of nitric oxide synthase isoforms reveals striking active site conservation [J]. Nat Struct Biol , 6: 233-242.
- Furchgott RF , Zawadzki JV. 1980. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine [J]. Nature , 288: 373-376.
- Ge RL , Kubo K , Kobayashi T , et al. 1998. Blunted hypoxic pulmonary vasoconstrictive response in the rodent *Ochotona curzoniae* ( pika ) at high altitude [J]. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology , 274: 1792-1799.
- Hampl VC , Herget J. 2000. Role of nitric oxide in the pathogenesis of chronic pulmonary hypertension [ J ] . Physiological Reviews , 80: 1337-1372.
- Hibbs JB Jr , Taintor RR , Vavrin Z , et al. 1990. Synthesis of nitric oxide from a terminal guanidine nitrogen atom of L-arginine: A molecular mechanism regulating cellular proliferation that targets intracellular iron [C]// Nitric Oxide from L-Arginine: A Bioregulatory System ( S Moncada and EA Higgins , eds. ) , Elsevier , Amsterdam: 189-223.
- Huelsenbeck JP , Ronquist F. 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees [J]. Bioinformatics , 17( 8) : 754-755.
- Iwashina M , Hirata Y , Imai T , et al. 1996. Molecular cloning of endothelial , inducible nitric oxide synthase gene from rat aortic endothelial cell [J]. Eur J Biochem , 237: 668-673.
- Klinger JR. 2007. The nitric oxide/cGMP signaling pathway in pulmonary hypertension [J]. Clinics in chest medicine , 28( 1) : 143-167.
- Li HG , Ren YM , Guo SC , et al. 2009. The protein level of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  is increased in the plateau pika ( *Ochotona curzoniae* ) inhabiting high altitudes [J]. J Exp Zool , 311( A) : 134-141.
- Li HG , Guo SC , Ren YM , et al. 2013. VEGF<sub>189</sub> expression is highly related to adaptation of the plateau pika ( *Ochotona curzoniae* ) [J]. High Altitude Medicine & Biology , 14( 4) : 395-404.
- Luo YJ , Gao WX , Gao YQ , et al. 2008. Mitochondrial genome analysis of *Ochotona curzoniae* and implication of cytochrome c oxidase in hypoxic adaptation [J]. Mitochondrion , 8: 352-357.
- Manukhina E , Mashina SY , Smirin B , et al. 2000. Role of nitric oxide in adaptation to hypoxia and adaptive defense [J]. Physiological Research , 49: 89-98.
- Masters BS , McMillan K , Sheta EA , et al. 1996. Neuronal nitric oxide synthase , a modular enzyme formed by convergent evolution: structure studies of a cysteine thiolate-ligated heme protein that hydroxylates L-arginine to produce NO as a cellular signal [J]. FASEB J , 10( 5) : 552-558.
- Melillo G , Taylor LS , Brooks A , et al. 1997. Functional requirement of the hypoxia-responsive element in the activation of the inducible nitric oxide synthase promoter by the iron chelator desferrioxamine [J]. Journal of Biological Chemistry , 272: 12236-12243.
- Nathan CF , Hibbs Jr JB. 1991. Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity [J]. Current opinion in immunology , 3( 1) : 65-70.
- Nishida K , Harrison D , Navas J , et al. 1992. Molecular cloning and characterization of the constitutive bovine aortic endothelial cell nitric oxide synthase [J]. Journal of Clinical Investigation , 90( 5) : 2092-2096.
- O'dell TJ , Hawkins RD , Kandel ER , et al. 1991. Tests of the roles of two diffusible substances in long-term potentiation: evidence for nitric oxide as a possible early retrograde messenger [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences , 88: 11285-11289.
- Palmer RMJ , Ferrige AG , Moncada S. 1987. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor [J]. Nature , 327: 524-526.
- Palmer RMJ , Hickery MS , Charles IG , et al. 1993. Induction of nitric oxide synthase in human chondrocytes [J]. Biochem Biophys Res Commun , 193( 1) : 398-405.
- Palmer RMJ , Andrews T , Foxwell NA , et al. 1992. Glucocorticoids do not affect the induction of a novel calcium-dependent nitric oxide synthase in rabbit chondrocytes [J]. Biochem Biophys Res Commun , 188( 1) : 209-215.
- Sheafor BA. 2003. Metabolic enzyme activities across an altitudinal gradient: an examination of pikas ( genus *Ochotona* ) [J]. Journal of experimental biology , 206: 1241-1249.
- Stuehr DJ. 1999. Mammalian nitric oxide synthases [J]. Biochimica et Biophysica Acta ( BBA ) -Bioenergetics , 1411: 217-230.
- Stuehr DJ. 1997. Structure-function aspects in the nitric oxide synthase [J]. Annu Rev Pharmacol Toxicol , 37: 339-359.
- Swofford DL. 2002. PAUP\* . Phylogenetic Analysis Using Parsimony ( \* and Other Methods) . Version 4. 0 Beta version [M]. Sinauer Associates , Sunderland , Massachusetts , USA.
- Vargiu C , Belliaro S , Cravanzola C , et al. 2000. Oxygen regulation of rat hepatocyte iNOS gene expression [J]. Journal of hepatology , 32( 4) : 567-573.
- Vincent SR. 1994. Nitric oxide: a radical neurotransmitter in the central nervous system [J]. Progress in neurobiology , 42( 1) : 129-160.
- Venema RC , Sayegh HS , Kent JD , et al. 1996. Identification , characterization , and comparison of the calmodulin-binding domains of the endothelial and inducible nitric oxide synthases [J]. The Journal of Biological Chemistry , 271( 11) : 6435-6440.
- Williams DR. 1980. Man at high altitude [J]. Pulmonary Circulation in Health and Disease , 3: 225-231.
- Yang Z , Nielsen R , Goldman N , et al. 2000. Codon-substitution models for heterogeneous selection pressure at amino acid sites [J]. Genetics , 155: 431-449.

Yang Z. 2007. PAML 4: Phylogenetic Analysis by Maximum Likelihood [J]. *Mol Biol Evol*, 24( 8) : 1586-1591.

Yang J, Wang ZL, Zhao XQ, *et al.* 2008. Natural selection and adaptive evolution of leptin in the *Ochotona* family driven by the cold environment

stress[J]. *PLoS ONE*, 3( 1) : e1472.

Yang J, Bromage TG, Zhao Q, *et al.* 2011. Functional evolution of leptin of *Ochotona curzoniae* in adaptive thermogenesis driven by cold environmental stress[J]. *PLoS ONE*, 6( 6) : e19833.

## 青海省鸟类新纪录——高山旋木雀

2013 年 4 月 24 日、25 日及 26 日在青海省三江源国家级自然保护区玛可河保护分区内格日则沟( 101°7'E, 32°40'N, 海拔 3250 m)、美浪沟( 100°56'E, 32°47'N, 海拔 3450 m) 和哑巴沟( 101°4'E, 32°41'N, 3190 m) 野外考察期间观察到 11 只雀形目鸟类, 并拍摄到清晰数码照片, 经鉴定为高山旋木雀 *Certhia himalayana*。此种鸟喉白色, 眉纹白色, 上体黑褐色具明显点状白斑, 嘴较其他旋木雀显长而下弯, 尾上具明显横斑。发现时呈螺旋形环绕树干攀爬, 边攀爬边啄食树皮上的昆虫。经查阅《中国鸟类分类与分布名录》( 郑光美 2011)、《中国动物志》( 李桂垣, 1982)、《青海经济动物志》( 李德浩, 1989)、《青藏高原鸟类分类与分布名录》( 刘迺发 2013) 以及以往关于青海省鸟类记录的相关资料, 确定该鸟为青海省鸟类分布新纪录。

高山旋木雀隶属于雀形目 Passeriformes 旋木雀科 Certhiidae, 全世界共 4 个亚种, 我国有 2 个亚种, 即主要分布于陕西南部、甘肃南部、西藏东南部、云南北部和西部、四川北部和西部、贵州西南部的 *C. h. yunnanensis* ( 郑光美 2011) 和记录于新疆乌恰县吉根乡的 *C. h. taeniura* ( 马鸣等, 2013)。此次发现时间是 2013 年 4 月下旬, 共发现 11 只, 由此推测高山旋木雀在玛可河保护分区可能为繁殖鸟。该地区紧挨高山旋木雀在四川的分布区, 在青海未被发现可能是缺乏长期深入的调查所致, 而在青海省是否存在其他可能的分布地, 还有待于进一步调查和发现。本次发现对于研究其地理分布提供了基础资料。



王舰艇 摄

张莹<sup>1</sup>, 王舰艇<sup>2</sup>, 曾阳<sup>1</sup>, 鲍敏<sup>1</sup>, 段培<sup>1</sup>, 陈振宁<sup>1\*</sup>  
 (1. 青海师范大学生命与地理科学学院, 西宁 810008;  
 2. 西宁行知摄影服务有限公司, 西宁 810000)  
 \* 通讯作者, E-mail: qhczn@126.com