

藏猪内皮型一氧化氮合酶(eNOS)基因的表达与低氧适应分析

张博¹ 强巴央宗² 李庆岗^{1,3} 杨玉增¹ 王志秀¹ 班冬梅¹ 张浩^{1*}

(1. 中国农业大学 动物科学技术学院,北京 100193; 2. 西藏农牧学院 畜牧兽医系,西藏 林芝 860000;
3. 安徽省农业科学院 畜牧兽医研究所,合肥 230031)

摘要 为了解内皮型一氧化氮合酶(eNOS)在动物体内催化产生一氧化氮(NO),对动物低氧适应的重要作用,选取饲养在西藏林芝地区(海拔约3 000 m)的藏猪、大约克猪(高原大约克猪)和饲养在北京(海拔约100 m)的大约克猪(低地大约克猪),屠宰并采集心肌、肝脏和肺脏组织,采用荧光定量PCR技术测定eNOS基因的表达量。结果表明,高原藏猪、大约克猪和低地大约克猪在肝脏和肺脏中eNOS的总体表达量分别比心脏中要高1 000和400倍;在心脏中,高原藏猪和高原大约克猪eNOS基因的表达量均高于低地大约克猪的4.0和2.6倍($P < 0.01$),但是在肝脏和肺脏中的表达量却相反。大约克猪从低地移居高原,心肌组织eNOS表达量增加了2.6倍,但肝脏和肺脏组织中eNOS表达量分别下降了1.6和1.1倍。结果表明,藏猪eNOS基因表达量与低地大约克猪和移居高原的大约克猪存在差异,且在心肌、肝脏和肺脏组织表现不同,可能对其低氧适应起不同的调节作用。

关键词 藏猪; eNOS; 基因表达; 低氧适应性

中图分类号 S 828 文章编号 1007-4333(2013)05-0104-05 文献标志码 A

Endothelial nitric oxide synthase (eNOS) gene expression and hypoxic adaptation analysis in Tibetan pig

ZHANG Bo¹, Chamba Yangzom², LI Qing-gang^{1,3}, YANG Yu-zeng¹,
WANG Zhi-xiu¹, BAN Dong-mei¹, ZHANG Hao^{1*}

(1. College of Animal Science and Technology, China Agricultural University, Beijing 100193, China;

2. College of Agriculture and Animal Husbandry, Tibet University, Linzhi 860000, China;

3. Institute of Animal Science and Veterinary Medicine, Anhui Academy of Agricultural Sciences, Hefei 230031, China)

Abstract Endothelial nitric oxide synthase (eNOS), which catalyzes to produce NO *in vivo*, might play an important role in hypoxic adaptation of animals. Heart, liver and lung tissues were collected from three groups of pig population, with 10 pigs each group. Tibetan and Yorkshire pigs raising at Linzhi, Tibet (3 000 m altitude) and Yorkshire pigs raising at Beijing (100 m altitude). The eNOS expression was measured with real-time quantitative PCR. The results showed that the mRNA expression of eNOS gene was higher in liver and lung tissues than that in heart tissue of the three pig groups. In heart tissue, Tibetan pig and Yorkshire pigs raising at high land had higher expression of eNOS than low land ($P < 0.01$), however, it is reversely in liver and lung tissues. The Yorkshire pig raising at high land had increased expression of eNOS in heart tissue and had tends of reduced expression in live and lung tissues compared with the pigs raising at low land. It was concluded that the Tibetan pig have distinct characteristic of eNOS expression from Yorkshire raising at high land and low land, as well as presents difference in heart, live and lung tissues, which have different roles for regulation of hypoxic adaptation.

Key words Tibetan pig; eNOS; gene expression; hypoxic adaptation

收稿日期: 2013-01-31

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(U1036604,31160441); 国家科技支撑项目(2012BAD3B03)

第一作者: 张博, 硕士研究生, E-mail: bozhang06@126.com

通讯作者: 张浩, 副研究员, 主要从事动物遗传资源与功能基因组研究, E-mail: zhanghao827@163.com

动物高海拔低氧适应的分子机制是生物学和医学研究热点问题之一,对人类医学和动物资源保护具有重要意义。内皮型一氧化氮合酶(Endothelial nitric oxide synthase, eNOS)在内皮细胞中结构性表达^[1],是催化 L-精氨酸生成一氧化氮(NO)的限速酶之一^[2]。eNOS 作为钙依赖性一氧化氮合酶(NOS),在哺乳动物组织中广泛表达^[3],主要负责肺和血管基础 NO 的合成^[4]。NO 具有调节免疫、调节神经和心血管的兴奋等功能^[5]。增加 eNOS 活性可以改变心血管对低氧的反应,提高血液流入量^[6]。Erzurum 等^[7]报道,生活在海拔 4 200 m 的藏族人比海拔 206 m 的美国人血流速度快 2 倍,血液中 NO 代谢产物高 10 倍。因此,NO 及其合成酶可能在动物低氧适应中起着重要作用。

藏猪是我国青藏高原特有的原始小型地方猪种,该品种以其应对不良环境的抵抗力和优良的肉质著称^[8-9],在组织、细胞中及分子水平的适应能力可达到较高水平^[10-11],具有独特的稳定遗传机制^[12],可以作为模式动物用于低氧适应相关基因的研究。本研究以高原饲养的藏猪、大约克猪以及低

地饲养的大约克猪为材料,研究 eNOS 基因 mRNA 的表达情况,分析其低氧适应功能,旨在为进一步揭示 eNOS 的低氧适应分子机制提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本试验所用西藏藏猪(TH)来自西藏农牧学院教学实习牧场(海拔约 3 000 m);饲养在西藏的大约克猪(YH)来自西藏林芝地区尼洋河养殖场(海拔约 3 000 m);低地大约克猪(YL)来自北京中顺景盛养殖场(海拔约 100 m)。每组试验猪均为 10 头 6 月龄的健康去势公猪,体重相近,无亲缘关系。屠宰后,采集心肌(左心室部位)、肝脏(左中叶部位)和肺脏(左心叶部位)组织,液氮速冻,−80 °C 保存,用于提取 RNA。

1.2 定量 PCR 引物设计和合成

从 NCBI 中下载猪 eNOS 和 GAPDH(作为内参)基因 mRNA 序列,采用 Primer Premier 5.0 软件设计荧光定量的引物(表 1)。引物由上海生物工程有限公司合成,用 0.1% DEPC 水溶解,4 °C 保存。

表 1 基因定量的引物序列

Table 1 Primer sequences for quantitative analysis

| 基因名称 Gene name | GenBank 登录号 GenBank ACC. No. | 引物序列(5'→3') Primer sequence(5'→3') | 退火温度/°C Annealing temperature | 产物大小/bp Product size |
|-------------------|---------------------------------|---------------------------------------|----------------------------------|-------------------------|
| eNOS | NM_214295 | F:CCCAGAGAATGGAGAGAGTT | 60 | 107 |
| | | R:TATTGAAGCGGATTTTGTA | | |
| GAPDH | NM_001206359 | F:GGTCACCAGGGCTGCTTTTA | 60 | 134 |
| | | R:CCTTGACTGTGCCGTGGAAT | | |

1.3 总 RNA 提取和 cDNA 制备

采用超纯 RNA 提取试剂盒(北京康为世纪生物科技有限公司)提取心脏、肝脏和肺脏组织总 RNA。1% 琼脂糖胶电泳检测 RNA 样品的完整性。用 NanoDrop2000(美国 Thermo 公司)测定 RNA 样品浓度和质量。随后采用 M-MLV 反转录试剂盒(北京百泰克生物技术有限公司)合成 cDNA,−20 °C 冻存。

1.4 定量 PCR

首先以 cDNA 为模板,用表 1 中引物扩增 GAPDH 和 eNOS 基因片段,PCR 产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,观察目的条带的大小、亮度和是否有

杂带,并对目的条带测序(北京诺赛基因组研究中心有限公司),看是否为目的基因。

用 5 个点 10 倍梯度稀释的 cDNA 为模板,采用 SYBR 定量 PCR 试剂盒(北京百泰克生物技术有限公司)在 CFX96 定量 PCR 仪(Bio-Rad, USA)进行扩增,每个样品点设置 3 个重复。观察 5 个点扩增曲线、标准曲线和产物溶解曲线,从扩增效率、重复性和产物特异性来确定定量 PCR 引物的有效性。

对心脏、肝脏和肺脏组织 cDNA 样品进行定量 PCR,每个样品设 3 个重复。同时,在每次 PCR 反应中设置标准样(所有 cDNA 样品的等量混池)和空白样。反应结束后,设置合适的阈值,读取所有样品的 C_T 值,样品目的基因的表达量采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算:

$$\Delta C_{T(\text{样品})} = C_{T(\text{样品目的基因})} - C_{T(\text{样品内参基因})}$$

$$\Delta C_{T(\text{标准样})} = C_{T(\text{标准样目的基因})} - C_{T(\text{标准样内参基因})}$$

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T(\text{样品})} - \Delta C_{T(\text{标准样})}$$

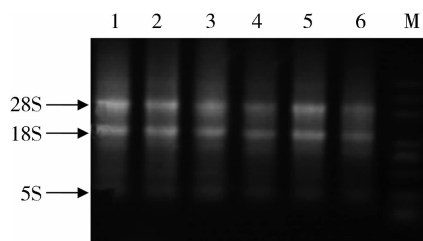
$$\text{目的基因表达量} = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

1.5 统计分析

用 SAS 9.0 软件对 *eNOS* 基因表达量进行双因素(品种和组织)方差分析,并进行 Duncan 多重比较, $P < 0.05$ 时差异显著, $P < 0.01$ 时差异极显著, $P > 0.05$ 无显著性差异。数据表示为均值 ± 标准误。

2 结果与分析

总 RNA 电泳检测(图 1)可见 28S、18S 和 5S 3 条带,且 28S 条带比 18S 条带更亮,表明总 RNA 质量较好。所有样品总 RNA 在 260 和 280 nm 的吸收



1,2 为高原藏猪;3,4 为高海拔大约克猪;5,6 为低地大约克猪;M 为 DM 2000 Plus Marker。

1,2. Tibetan pig in high land; 3,4. Yorkshire in high land; 5,6. Yorkshire in low land; M. DM 2000 Plus Marker.

图 1 猪心脏组织总 RNA 提取结果

Fig. 1 Total RNA extraction from heart tissues of pigs

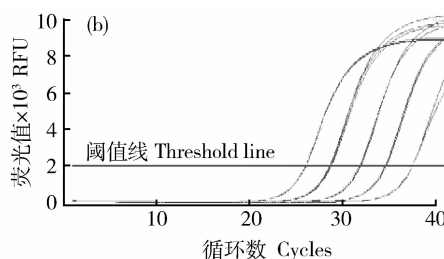
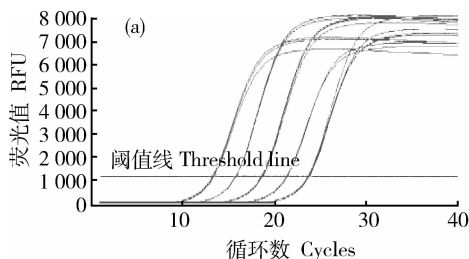


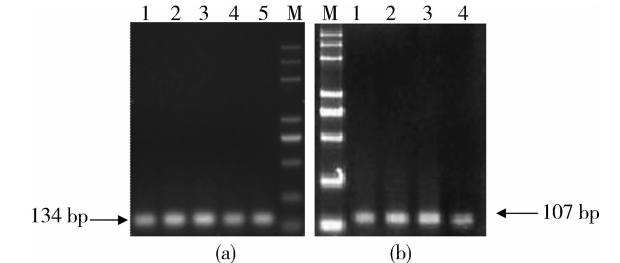
图 3 *GAPDH*(a)和 *eNOS*(b)基因的荧光定量 PCR 扩增曲线

Fig. 3 Q-PCR amplification curves for *GAPDH* (a) and *eNOS* (b) genes

高原饲养藏猪、大约克猪和低地大约克猪 3 组的心脏、肝脏和肺脏组织的 *eNOS* 基因 mRNA 表达量见图 4。在不同的组织和不同品种中,该基因表达均有显著差异($P < 0.05$)。在肝脏、肺脏中表达量比较丰富,但在心脏中的表达量中均较低。在肝脏、肺脏组织中,藏猪 *eNOS* 基因的表达量均低于高

原大约克猪和低地大约克猪($P < 0.05$) (图 4(a)和(b))。而在心脏中却相反,高原藏猪表达量最高,显著高于低地大约克猪($P < 0.01$)。大约克猪从低地移居到高海拔,心脏中 *eNOS* 表达显著增加($P < 0.01$) (图 4(c)),在肝脏和肺脏中 *eNOS* 表达量虽有下降趋势,但与低地大约克猪差异不显著($P > 0.05$)。

值比值均在 1.8~2.0 之间,无蛋白质和 DNA 等杂质的污染,提取的总 RNA 质量完好,可用于后续 cDNA 的合成及定量分析。



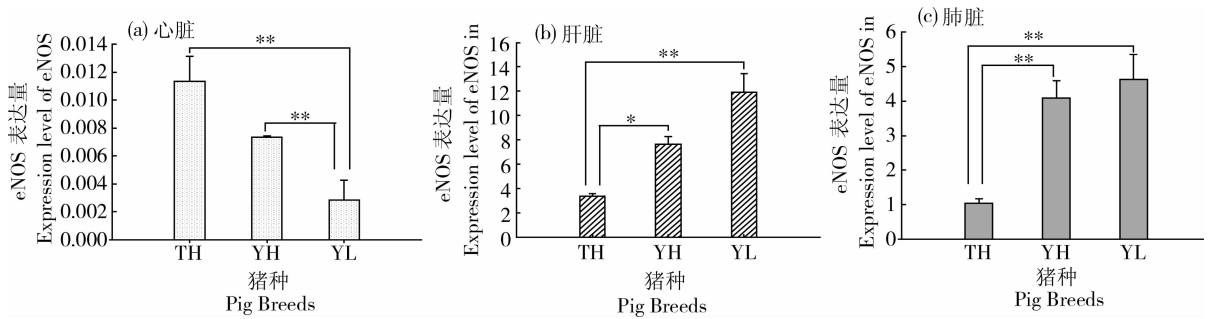
1,5 为高原藏猪;2,3 为高海拔大约克猪;4 为低地大约克猪;M 为 DM 2000 Plus Marker。

1,5 Tibetan pig in high land; 2,3 Yorkshire in high land; 4 Yorkshire in low land; M DM 2000 Plus Marker.

图 2 *GAPDH*(a)和 *eNOS*(b)基因引物 PCR 产物

Fig. 2 PCR products of primers of *GAPDH* (a) and *eNOS* (b) genes

GAPDH 和 *eNOS* 基因引物以梯度浓度 cDNA 为模板定量 PCR 扩增曲线见图 3。可见扩增重复性较高,标准曲线的 R^2 值在 0.99 以上,扩增效率均在 95%~105%之间,说明扩增引物符合定量 PCR 要求。



TH为藏猪($n=10$),YH为高海拔大约克猪($n=10$),YL为低地大约克猪($n=10$);*为显著差异($P<0.05$),**为极显著差异($P<0.01$)。

TH=Tibetan pig in high land ($n=10$), YH=Yorkshire in high land ($n=10$), YL=Yorkshire in low land ($n=10$);

* Significant difference ($P<0.05$), ** Extremely significant difference ($P<0.01$).

图4 eNOS基因在心脏(a)、肝脏(b)、肺脏(c)组织中的表达量

Fig. 4 eNOS gene expression in the heart (a), liver (b), lung (c) tissues

3 讨论

1) eNOS最初在内皮细胞中发现和纯化,90%以上呈颗粒性,少量可溶性酶的变性分子质量约为135 u。研究发现eNOS除存在于血管内皮细胞外,也存在于其他细胞中,甚至骨骼肌细胞和海马锥体细胞内也有存在^[13-14]。eNOS被认为是结构型酶,在生理状态下处于低水平表达,其接受激动剂作用时快,酶活性迅速增加,起效时间仅几秒,其活性受 Ca^{2+} 浓度调节,当 Ca^{2+} 进入细胞内形成 Ca^{2+} -CaM复合物从而导致其活性的激活^[3]。缺氧对eNOS表达的影响表现不一,长期低氧损害肺血管内皮细胞 Ca^{2+} 代谢和eNOS与小窝蛋白-1(Caveolin-1)的正常耦联而导致eNOS表达的减少^[15]。低氧时eNOS一个重叠的顺式反义引物转录物可能在转录后水平下调eNOS发挥作用^[16]。而另有研究报道,低氧可以诱导eNOS基因表达的上调^[17]。这可能是因为不同的氧压力和/或不同的内皮细胞类型造成这一差异的。

2) 心脏是调节低氧适应功能的重要器官,如eNOS基因敲除的小鼠心脏发育先天性缺陷会导致其心脏衰竭^[18]。藏猪是我国特有的高原型地方猪种,具有较强的适应高海拔低氧、高寒环境的能力。本试验发现,高海拔低氧环境中,藏猪心脏组织eNOS基因表达显著较高,这可能是其心血管系统对低氧适应起了重要作用。藏猪为了适应低氧的环境,需增加体内eNOS活性,改变心血管对低氧的反应,提高血液流入量,增加心肌的泵血功能;低地大约克猪移居到高海拔低氧环境后,心肌组织中

eNOS基因的表达也比低海拔环境中高,原因可能是低地猪通过增加eNOS表达量,改善心血管系统运输氧的能力以适应高原低氧环境的代偿性生理反应。

3) 氧是肝脏能量代谢中必需的电子接受体,缺血灌注时,肝脏糖代谢主要受供氧调节,只有在氧气体积分数大于4%时才有糖合成,氧气体积分数必须大于2%时才有糖摄取。本试验中,藏猪长期处于氧气稀薄、低温、高辐射、高海拔以及没有人类给予生物学保护的应激环境下^[19],在长期的自然选择过程中,在行为、生理和形态等诸多方面形成其独特的特点以适应环境的挑战,所以在肝脏中的eNOS表达基本处于稳定。低地大约克猪移居到高海拔低氧环境后,肝脏中eNOS的表达量降低,但是二者差异不显著,可能是低地大约克猪移居到氧气体积分数小于2%的低氧环境下,机体启动了脂肪和蛋白质代谢,此种环境下肝糖原合成受阻,有可能导致某发育阶段激活eNOS释放NO,NO升高,活化鸟苷酸环化酶,维持毛细血管持久性扩张,减小外周阻力,加速血液循环,改善组织获氧能力,但是本试验移居到高海拔的大约克猪在低氧环境下有3~4年之久,过高的NO水平又抑制eNOS在肝脏中的表达,所以eNOS的合成发生负反馈调节作用而引起eNOS表达的下调。

有研究表明^[20],长期处于低氧环境中可抑制eNOS活性,使小鼠肺组织eNOS表达减少,随之NO生成与释放减少,舒张血管作用减弱,肺血管内皮细胞和平滑肌细胞增殖、肺血管重构、肺动脉压力升高。而NO减少主要由于血管内皮细胞的eNOS

的低表达^[21]。本试验中,大约克猪从低地移居到高原,*eNOS*的活性受到抑制,肺脏组织的*eNOS*表达量呈下降趋势,藏猪长期居住在低氧的环境中,与大约克猪中*eNOS*表达量相比表现明显的差异性。但是藏族和玻利维亚人呼出去的NO含量比平原人高^[22],与本研究结果不一致。由于基因表达具有时序性,不同时期*eNOS*基因的表达量是否会有变化,其变化规律如何,仍需进一步对不同发育阶段藏猪*eNOS*基因mRNA组织表达差异进行研究。

参 考 文 献

- [1] Rafikov R, Fonseca F V, Kumar S, et al. eNOS activation and NO function: Structural motifs responsible for the posttranslational control of endothelial nitric oxide synthase activity[J]. *J Endocrinol*, 2011, 210(3): 271-284
- [2] Mawji I A, Marsden P A. Perturbations in paracrine control of the circulation: Role of the endothelial-derived vasomediators, endothelin-1 and nitric oxide[J]. *Microsc Res Tech*, 2003, 60(1): 46-58
- [3] Huh J W, Ha H S, Kim D S, et al. Placenta-restricted expression of LTR-derived NOS3[J]. *Placenta*, 2008, 29(7): 602-608
- [4] León-Velarde F, Mejía O. Gene expression in chronic high altitude diseases[J]. *High Alt Med Biol*, 2008, 9(2): 130-139
- [5] Stefano G B, Goumon Y, Bilfinger T V, et al. Basal nitric oxide limits immune, nervous and cardiovascular excitation: Human endothelia express a muopiate receptor[J]. *Prog Neurobiol*, 2000, 60(6): 513-530
- [6] Walsh E K, Huang H, Wang Z, et al. Control of myocardial oxygen consumption in transgenic mice overexpressing vascular eNOS[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2004, 287(5): 2115-2121
- [7] Erzurum S C, Ghosh S, Janocha A J, et al. Higher blood flow and circulating NO products offset high-altitude hypoxia among Tibetans[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(45): 17593-17598
- [8] 强巴央宗, 谢庄, 田发益. 高原藏猪现状与保种策略[J]. *中国畜牧杂志*, 2001, 37(6): 46-47
- [9] 陈晓晖, 吕学斌, 何志平, 等. 藏猪不同生长发育阶段胴体性能与肉质特性研究[J]. *西南农业学报*, 2009, 22(2): 470-472
- [10] 刘轩, 强巴央宗, 王强, 等. 藏猪繁殖性状多基因效应分析[J]. *遗传*, 2010, 32(5): 480-485
- [11] Yang S L, Zhang H, Mao H M, et al. The local origin of the Tibetan pig and additional insights into the origin of Asian pigs[J]. *PLoS ONE*, 2011, 6(12): e28215
- [12] Jacobs A. Use of nontraditional animals for evaluation of pharmaceutical products[J]. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2006, 2(3): 345-349
- [13] Li H. Dual effect of ceramide on human endothelial cells: Induction of oxidative stress and transcriptional upregulation of endothelial nitric oxide synthase[J]. *Circulation*, 2002, 106(17): 2250-2256
- [14] Higashi Y, Sasaki S, Kurisu S, et al. Regular aerobic exercise augments endothelium-dependent vascular relaxation in normotensive as well as hypertensive subjects: Role of endothelium-derived nitric oxide[J]. *Circulation*, 1999, 100(11): 1194-1202
- [15] Haworth S G. Role of the endothelium in pulmonary arterial hypertension[J]. *Vascul Pharmacol*, 2006, 45(5): 317-325
- [16] Fish J E, Matouk C C, Yeboah E, et al. Hypoxia-inducible expression of a natural cis-antisense transcript inhibits endothelial nitric-oxide synthase[J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(21): 15652-15666
- [17] Chen J X, Meyrick B. Hypoxia increases Hsp90 binding to eNOS via PI3K-Akt in porcine coronary artery endothelium[J]. *Lab Invest*, 2004, 84(2): 182-190
- [18] Feng Q P, Song W, Lu X R, et al. Development of heart failure and congenital septal defects in mice lacking endothelial nitric oxide synthase[J]. *Circulation*, 2002, 106(7): 873-879
- [19] 邱祥聘. 四川畜禽品种资源志[M]. 成都: 四川科技出版社, 1987
- [20] 王慧, 解卫平, 左祥荣, 等. 埃他卡林对长期低氧大鼠肺组织*eNOS* mRNA和蛋白表达的影响[J]. *中国药理学通报*, 2009, 25(12): 1594-1598
- [21] Chen K, Popel A S. Theoretical analysis of biochemical pathways of nitric oxide release from vascular endothelial cells[J]. *Free Radic Biol Med*, 2006, 41(4): 668-680
- [22] Beall C M, Laskowski D, Strohl K P, et al. Pulmonary nitric oxide in mountain dwellers[J]. *Nature*, 2001, 414(22): 411-412