

# 云南乌金猪与约大乌猪低氧适应性的研究

李美荃, 张春勇, 安清聪, 潘洪彬, 陈克嶙, 郭荣富\*

(云南农业大学动物科学技术学院, 云南省动物营养与饲料重点实验室, 昆明 650201)

**摘要:** 旨在探明云南高原乌金猪与约大乌猪低氧适应差异。采集 60 日龄乌金猪与约大乌猪各 30 头(公母各半)血样, 检测乌金猪和约大乌猪血液血红蛋白含量(HGB)、红细胞压积(HCT)、红细胞数目(RBC)、平均血红蛋白含量(MCH)、平均血红蛋白浓度(MCHC)和氧饱和度生理表征参数。屠宰 60 日龄乌金猪与约大乌猪各 12 头(公母各半), 采用 Real-time PCR 方法检测心、肝、肺、肾、空肠、回肠、十二指肠、皮肤、肌肉、胰腺、睾丸或卵巢 12 种组织中 *HIF-1 $\alpha$* 、*VEGF*、*EPO* 基因的表达。结果显示, 乌金猪 HGB 和 RBC 极显著( $P < 0.01$ )高于约大乌猪, 而 HCT 和 MCH 低于约大乌猪, 乌金猪氧饱和度高于约大乌猪, 但差异不显著( $P > 0.05$ )。在乌金猪与约大乌猪的各个组织中均检测到 *HIF-1 $\alpha$* 、*VEGF*、*EPO* 基因 mRNA 的表达; 在低氧适应基因中, *HIF-1 $\alpha$*  基因在肝、肺、胰腺、肾和皮肤组织表达量最高, *VEGF* 基因在肝、肺和胰腺表达量最高, *EPO* 基因在肾和肝表达量最高; *HIF-1 $\alpha$* 、*VEGF*、*EPO* 基因在两猪种中的表达量趋势一致, 约大乌猪组织中的总体表达量高于乌金猪的表达量; 母猪低氧适应基因的总表达量显著高于公猪。乌金猪低氧适应生理表征参数明显高于约大乌猪, 在多数组织约大乌猪低氧适应基因的表达高于乌金猪。但对其高原低氧适应性机制有待进一步研究。

**关键词:** 乌金猪; 约大乌猪; *HIF-1 $\alpha$* ; *VEGF*; *EPO*; 基因表达

中图分类号: S828; S813.3

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2015)06-0965-09

## The Study of Hypoxia Adaptive Differences of Yunnan Wujin and Yuedawu Pigs

LI Mei-quan, ZHANG Chun-yong, AN Qing-cong, PAN Hong-bin, CHEN Ke-lin, GUO Rong-fu\*

(Key Laboratory of Animal Nutrition and Feed Science of Yunnan Province,

Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China)

**Abstract:** This study aimed to ascertain the differences of hypoxia adaptation between Yunnan plateau Wujin pig and Yuedawu pig. Blood samples of 30 Wujin pigs and 30 Yuedawu pigs were collected (Half male and female) on 60 days. The blood HGB, HCT, RBC, MCH, MCHC and oxygen saturation were determined. The gene expressions of *HIF-1 $\alpha$* , *VEGF* and *EPO* were determined by real-time PCR in heart, liver, lung, kidney, jejunum, ileum, duodenum, skin, muscle, pancreas, testes and ovaries of Yuedawu and Wujin pigs (half male and female). The results showed that HGB and RBC of Wujin pigs was significant higher than that of Yuedawu pigs ( $P < 0.01$ ), and hematocrit (HCT) and MCH was lower than Yuedawu pigs. Oxygen saturation of Wujin pigs was higher than that of Yuedawu pigs, without significant differences ( $P > 0.05$ ). *HIF-1 $\alpha$* , *VEGF*, *EPO* mRNA were detected in various tissues of Yuedawu and Wujin pigs. The gene expressions of *HIF-1 $\alpha$* , *VEGF* and *EPO* in most tissues of Yuedawu pigs were higher than that in Wujin pigs, and main expression tissues for *HIF-1 $\alpha$*  and *VEGF* were liver, lungs and pancreas in 2 pig breeds, whereas *EPO* was mainly expressed in kidney and liver, the trends of *HIF-1 $\alpha$* , *VEGF* and *EPO*

收稿日期: 2014-07-28

基金项目: 云南省重大科技专项项目(2012ZA018); 云南现代农业生猪产业技术体系(A3007381)

作者简介: 李美荃(1986-), 女, 黑龙江哈尔滨人, 博士生, 主要从事猪抗病营养的分子基础研究, E-mail: limeiquan2010@163.com; 张春勇(1975-), 男, 硕士, 讲师, 主要从事猪抗病营养的分子基础研究。二者并列为一作者

\* 通信作者: 郭荣富, 博士, 教授, 博导, E-mail: rongfug@163.com

genes expression in 2 pig breeds is consistent. In 2 pig breeds, the hypoxia adaptation gene expressions of sows were significantly higher than that of boar. The HGB, RBC and oxygen saturation of Wujin pigs was significantly higher than that of Yuedawu pigs. Physiological characterization parameters of hypoxia adaptation of Wujin pig were significantly higher than Yuedawu pig. Hypoxia adaptation gene expression in most tissues of Yuedawu pig were higher than that in Wujin pig. But the mechanisms of hypoxia adaptation need to be researched in the further.

**Key words:** Wujin pigs; Yuedawu pigs; HIF-1 $\alpha$ ; VEGF; EPO; gene expression

高海拔低氧是高原猪种生存与种属繁衍的重要生态环境,高原本地猪种与培育猪种相比,其贮脂能力强,肌肉中亚油酸、亚麻油酸和花生油酸含量高,肉质好,其耐粗饲、抗病力和抗氧化能力更强,但生长速度缓慢、繁殖率低。高原猪种是高原民族重要的动物蛋白质来源之一,是发展高原养猪业的珍稀种质资源。高原猪种长期生活在高原低氧生态环境条件下,形成了独特的生物学和遗传特性,表现出更强的抗逆性。本地猪种和培育猪种对高原环境的适应性表现出明显差异性,这可能与高原猪种低氧适应基因密切相关。因此,研究不同猪种高原低氧适应基因表达和作用,对开发和利用高原猪种具有重要参考价值。

缺氧诱导因子 1 $\alpha$ (HIF-1 $\alpha$ )、血管内皮生长因子(VEGF)和促红细胞生成素(EPO)是哺乳动物重要的低氧适应基因。G. L. Semenza 等首次发现了一种能特异性地结合于 EPO 的低氧反应元件上的蛋白,称之为 HIF-1 $\alpha$ <sup>[1]</sup>。HIF-1 是由  $\alpha$  和  $\beta$  两个亚基形成的异二聚体,其中 HIF-1 $\alpha$  蛋白是在低氧调节中起主要功能的亚基,对氧敏感,而 HIF-1 $\beta$  蛋白对氧不敏感,因此 HIF-1 的活性主要取决于  $\alpha$  亚基的活性<sup>[2-4]</sup>。HIF-1 通过调节多种低氧反应基因的表达,调节糖与能量代谢,影响新血管的生成,细胞的发育、增殖与凋亡,铁代谢,糖酵解等过程<sup>[5-6]</sup>。I. Mylonis 等报道,低氧条件下,HIF-1 还可以通过介导刺激 Lipin1 的表达,来促进甘油三脂的积累<sup>[7]</sup>。M. Parsanejad 等报道,DJ-1 可调控 VHL/HIF-1 信号传导通路<sup>[8]</sup>。E. M. De Francesco 等报道,GPER 通过雌激素介导激活 HIF-1 $\alpha$ /VEGF 信号通路<sup>[9]</sup>。VEGF 和 EPO 是低氧诱导因子的靶基因,VEGF 是细胞因子的一种,能促进内皮细胞的增殖,广泛存在于动物组织中具有高度特异的血管内皮细胞有丝分裂时期<sup>[10-11]</sup>,EPO 对机体红细胞的生成起着重要的调控作用,主要作用于骨髓造血细胞<sup>[12]</sup>。D. A. Vesey 等通过体外试验证实,高浓度的 EPO(400

U $\cdot$ mL<sup>-1</sup>)可以刺激低氧条件下的合成和细胞增殖,抑制细胞凋亡<sup>[13]</sup>。高原低氧环境显著影响血液中的血红蛋白(HGB)和红细胞数(RBC)。T. H. Jessen 等报道,安第斯雁(*Andean goose*)生活在南美海拔 5 000~6 000 m 高原,其血红蛋白也显示高的血氧亲和力<sup>[14]</sup>。血红蛋白与低氧环境密切相关,其含量变化直接影响低氧适应基因的表达。D. Yoon 报道,HIFs 在调控铁代谢与红细胞生成中起了重要的作用<sup>[15]</sup>。

乌金猪属于高原放牧性猪种,主要分布在云南、贵州、四川 3 省接壤的乌蒙山和大、小凉山地区,已形成不同类群,主要有贵州省的柯乐猪,云南富源的大河猪,昭通市的昭通猪和四川省的凉山猪,均属西南型猪种。乌金猪耐粗饲,优质健壮,适应高原低氧生态环境,但生长速度慢、脂肪沉积高、瘦肉率低。而约大乌猪属于新培育杂交猪种,含有 25% 乌金猪血缘。本地乌金猪日增重约 250 g,瘦肉率约 45%;而约大乌猪日增重约 800 g,瘦肉率 57% 以上,杂交改良明显提高了杂交猪种的瘦肉率和生长速度。藏猪也是高原猪种,长期生长于高原环境具有较强低氧适应能力,刘金凤等报道,藏猪 EPO 基因相对于长白猪出现多个位点突变,推断藏猪可能是由于长期缺氧环境导致基因突变<sup>[16]</sup>。高原低氧是影响高原猪种健康和遗传生长潜力的重要生态因素,云南乌金猪具有较强的适应性和抗逆性,而具有本地乌金猪血缘的约大乌猪具有较好的生长速度和瘦肉率,在云南独特的生态条件下,乌金猪与约大乌猪的健康和生产性能存在明显差异,这可能与高原低氧适应基因表达和作用密切相关。本试验以乌金猪和约大乌猪为研究对象,检测高原低氧血液生理表征参数,采用实时荧光定量法研究约大乌猪与乌金猪不同组织中 HIF-1 $\alpha$ 、VEGF、EPO 基因的差异性表达,探讨乌金猪与约大乌猪高原低氧适应基因之间的差异。

## 1 材料与方法

### 1.1 血样和组织样品采集

本试验中乌金猪来自云南省富源县大河镇的大河猪场,海拔 2 610 m,42 日龄断奶,与培育的约大乌猪在相同日粮类型和饲养管理下饲养至 60 日龄,选择乌金猪( $12.63 \pm 0.82$ )kg 和约大乌猪( $18.92 \pm 0.69$ )kg 各 30 头(1/2♂,1/2♀),采用 Pulse Oximeter Model 300,经猪耳缘测定氧饱和度(Beijing Choice Electronic Technology Co.,Ltd.),空腹 12 h,经前腔静脉采血 10 mL,使用肝素抗凝管获得全血,非肝素抗凝管用于分离血清( $3\ 000\ r \cdot \min^{-1}$ ),血常规采用 BC-1800 全自动血液细胞分析仪(深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司)进行测定,采用试剂盒(南京建成公司)测定 HGB、HCT、RBC、MCH 和 MCHC 参数。随后从已采血的乌金猪与约大乌猪中随机各选取 12 头(6♂,6♀)屠宰,共 24 头,收集心、肝、肺、肾、十二指肠、空肠、回肠、皮肤、肌肉、胰腺、睾丸或卵巢 12 种组织,剔除脂肪组织,迅速剪碎,液氮速冻, $-80\ ^\circ\text{C}$  保存。

### 1.2 总 RNA 提取

各组织总 RNA 提取按照 RNA simple Total RNA Kit(北京天根)试剂盒说明书进行,每 50~

100 mg 组织加 1 mL 裂解液。各组织经过研磨粉碎匀浆后,加入氯仿萃取。最后得到的总 RNA 溶解于超纯水中,总 RNA 的纯度与浓度分别用分光光度计在 260 与 280 nm 下检测。

### 1.3 反转录

采用相同浓度的总 RNA 样品按反转录试剂盒(TaKaRa)说明书要求配制 RT 反应液。用于实时荧光定量的 RT 产物(cDNA)于 $-20\ ^\circ\text{C}$  保存。

### 1.4 实时荧光定量 PCR

上述 cDNA 用于实时荧光定量 PCR 相关基因根据 GenBank 上猪的 *HIF-1 $\alpha$* 、*VEGF*、*EPO* 以及 *GAPDH*、18S、 *$\beta$ actin* 序列,采用 Primer Express Software 设计引物。引物由生工生物公司合成(表 1)。采用 Eva Green I 染料法,反应在 Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Systems 上进行。反应体系为 20  $\mu\text{L}$ :SsoFast™ EvaGREEN® Supermix 10  $\mu\text{L}$ (BIO-RAD,美国),上下游引物( $10\ \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )各 1.0  $\mu\text{L}$ ,cDNA 模板 2.0  $\mu\text{L}$ ,加灭菌去离子水至 20  $\mu\text{L}$ 。样品分装于 96 孔板(BIO-RAD)中,透光盖(BIO-RAD)盖紧。*HIF-1 $\alpha$*  反应条件: $95\ ^\circ\text{C}$  10 s; $95\ ^\circ\text{C}$  5 s, $57\ ^\circ\text{C}$  20 s, $72\ ^\circ\text{C}$  15 s,40 个循环。*VEGF* 与 *HIF-1 $\alpha$*  反应条件相同。*EPO* 反应条件: $95\ ^\circ\text{C}$  10 s; $95\ ^\circ\text{C}$  5 s, $55\ ^\circ\text{C}$  20 s, $72\ ^\circ\text{C}$  15 s,40 个循环。

表 1 RT-qPCR 引物信息

Table 1 Information of primers used for RT-qPCR

基因 Gene	引物(5'→3') Primer sequence	引物长度/bp Length	产物长度/bp Product length	GenBank 登录号 GenBank accession No.
<i>HIF-1<math>\alpha</math></i>	F-TAGAACATGATGGGTCAC	18	176	EF070345
	R-ACAGGCTAAGTCAGAGGG	18		
<i>VEGF</i>	F-GCTACTGCCGTCCAATC	17	135	AF318502
	R-CACACTCCAGACCTTCG	17		
<i>EPO</i>	F-TGCTTCTGCTGTCTTGC	18	134	NM_214134
	R-GCCCATCGTGGCATTTTCG	19		
<i>GAPDH</i>	F-ACATCAAGAAGGTGGTGAAG	20	179	NM_001206359.1
	R-ATTGTCGTACCAGGAAATGAG	20		
<i><math>\beta</math>actin</i>	F-TCTGGCACACACCTTCT	18	114	XM_003124280.2
	R-TGATCTGGGTCATCTTCTCAC	21		
18S	F-GAGCGAAAGCATTTGCCAAG	20	101	AY265350
	R-GGCATCGTTTATGGTCGGAAC	21		

### 1.5 数据分析

所有组织低氧适应基因的表达量均是以 *GAPDH*、18S、 $\beta$ *actin* 为内参基因,最终以相对表达量来表示,相对荧光定量计算方法采用 M. W. Pfaffl [17] 的方法。所有数据均采用 Excel 进行整理,利用 SPSS 17.0 统计软件进行统计处理,对乌金猪和约大乌猪生理表征参数测定结果采用 *t* 检验,结果用“平均数±标准差”表示,各组织间的基因表达采用 Duncan 法进行多重比较;两品种间的统计采用 DYES 进行处理。

## 2 结果

### 2.1 总 RNA 的提取

由图 1 可知,本研究所提取 RNA 的 28S 条带的亮度大于 18S,5S 条带很淡,表明 RNA 完整性好,无明显降解。经分光光度计检测,所提取 RNA 的  $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$  为 1.8~2.0,可用于后续研究(图 1)。

### 2.2 相关基因的实时荧光定量 PCR 检测

图 2 为 *HIF-1 $\alpha$* 、*VEGF*、*EPO* 荧光定量 PCR 产物 2% 琼脂糖凝胶电泳图,图 3 为 *HIF-1 $\alpha$* 、*VEGF* 和 *EPO* cDNA 通过实时荧光定量所得熔解曲线。如图 3 所示熔解曲线为单一峰,无非特异性扩增。

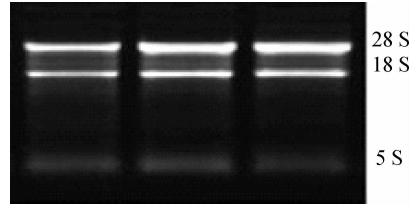
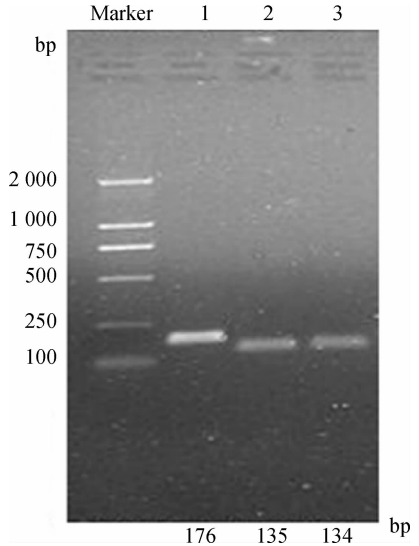


图 1 总 RNA 提取电泳图  
Fig. 1 Agarose gel electrophoresis result of total RNA



1. *HIF-1 $\alpha$* ; 2. *VEGF*; 3. *EPO*  
图 2 琼脂糖凝胶电泳检测 *HIF-1 $\alpha$* 、*VEGF*、*EPO*  
Fig. 2 Agarose gel of the *HIF-1 $\alpha$* , *VEGF* and *EPO*

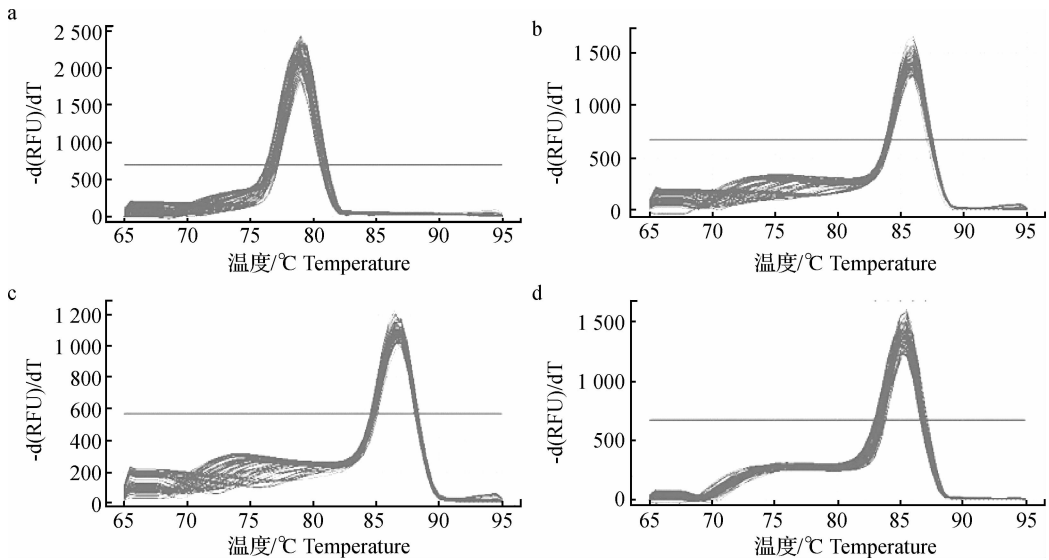


图 3 实时定量 PCR 反应产物熔解曲线 *HIF-1 $\alpha$* (a)、*VEGF*(b)、*EPO*(c)、*GAPDH*(d)  
Fig. 3 Melting curve analysis for *HIF-1 $\alpha$* (a), *VEGF*(b), *EPO*(c), *GAPDH*(d)

### 2.3 血液生理表征参数测定结果

乌金猪与约大乌猪的 HGB、HCT、RBC、MCH、MCHC、氧饱和度检测结果如表 2 所示,乌金

猪血液 HGB 和 RBC 极显著高于约大乌猪 ( $P < 0.01$ ), HCT、MCH、MCHC 和氧饱和度两猪种间差异不显著 ( $P > 0.05$ )。

表 2 乌金猪与约大乌猪血液生理表征参数测定结果

Table 2 The results of blood physiological parameters measurement

类别 Class	约大乌猪 Yuedawu pig	乌金猪 Wujin pig
血红蛋白含量/(g · L <sup>-1</sup> ) HGB	117.500 ± 6.868* *	128.530 ± 8.047
红细胞数目/(10 <sup>12</sup> · L <sup>-1</sup> ) RBC	7.199 ± 0.627* *	7.903 ± 0.502
红细胞压积/(L · L <sup>-1</sup> ) HCT	0.461 ± 0.029	0.424 ± 0.033
平均血红蛋白含量/pg MCH	16.290 ± 1.066	16.040 ± 0.788
平均血红蛋白浓度/(g · L <sup>-1</sup> ) MCHC	277.600 ± 11.150	278.750 ± 10.208
氧饱和度/(vol · dL <sup>-1</sup> ) Oxygen saturation	91.950 ± 3.268	93.950 ± 4.006

\* \*,  $P < 0.01$ 

## 2.4 不同猪种间 *HIF-1 $\alpha$* 、*VEGF*、*EPO* mRNA 的差异表达

*HIF-1 $\alpha$* 、*VEGF*、*EPO* mRNA 基因在乌金猪与约大乌猪间的差异表达趋势如图 4 所示。空肠、回肠、肌肉、睾丸、卵巢中 *HIF-1 $\alpha$*  表达量乌金猪高于约大乌猪,十二指肠、睾丸和空肠中 *VEGF* 表达量乌金猪高于约大乌猪,*EPO* mRNA 的表达各组织均为约大乌猪高于乌金猪。

乌金猪与约大乌猪各个组织中均用实时荧光定量检测到 *HIF-1 $\alpha$*  mRNA 的存在(图 4a)。在约大乌猪各组织中,*HIF-1 $\alpha$*  在肝、肺、胰腺表达最高,而肌肉与回肠表达最低。乌金猪与约大乌猪的表达趋势一致。乌金猪与约大乌猪各个组织中均用实时荧光定量检测到 *VEGF* mRNA 的存在(图 4b)。在约大乌猪各组织中,*VEGF* 在肝、肺、胰腺表达最高,而肌肉与回肠表达最低。乌金猪与约大乌猪的表达趋势一致。乌金猪与约大乌猪各个组织中均用实时荧光定量检测到 *EPO* mRNA 的存在(图 4c)。在约大乌猪各组织中,*EPO* mRNA 表达量最高的是肾和肝,表达量最低的是十二指肠和肌肉。乌金猪与约大乌猪的表达趋势一致。可以明显的看出 *EPO* 在十二指肠中几乎无表达。

## 2.5 公猪与母猪之间 *HIF-1 $\alpha$* 、*VEGF*、*EPO* mRNA 的差异表达

*HIF-1 $\alpha$* 、*VEGF*、*EPO* mRNA 基因在乌金猪与约大乌猪的公、母猪的差异表达趋势如图 5 所示。低氧适应基因在约大乌猪的总体表达量要显著高于乌金猪( $P < 0.05$ ),母猪低氧适应基因平均表达量高于公猪。除乌金猪 *VEGF* 差异显著( $P < 0.05$ )外,其他均差异极显著( $P < 0.01$ )。

## 3 讨论

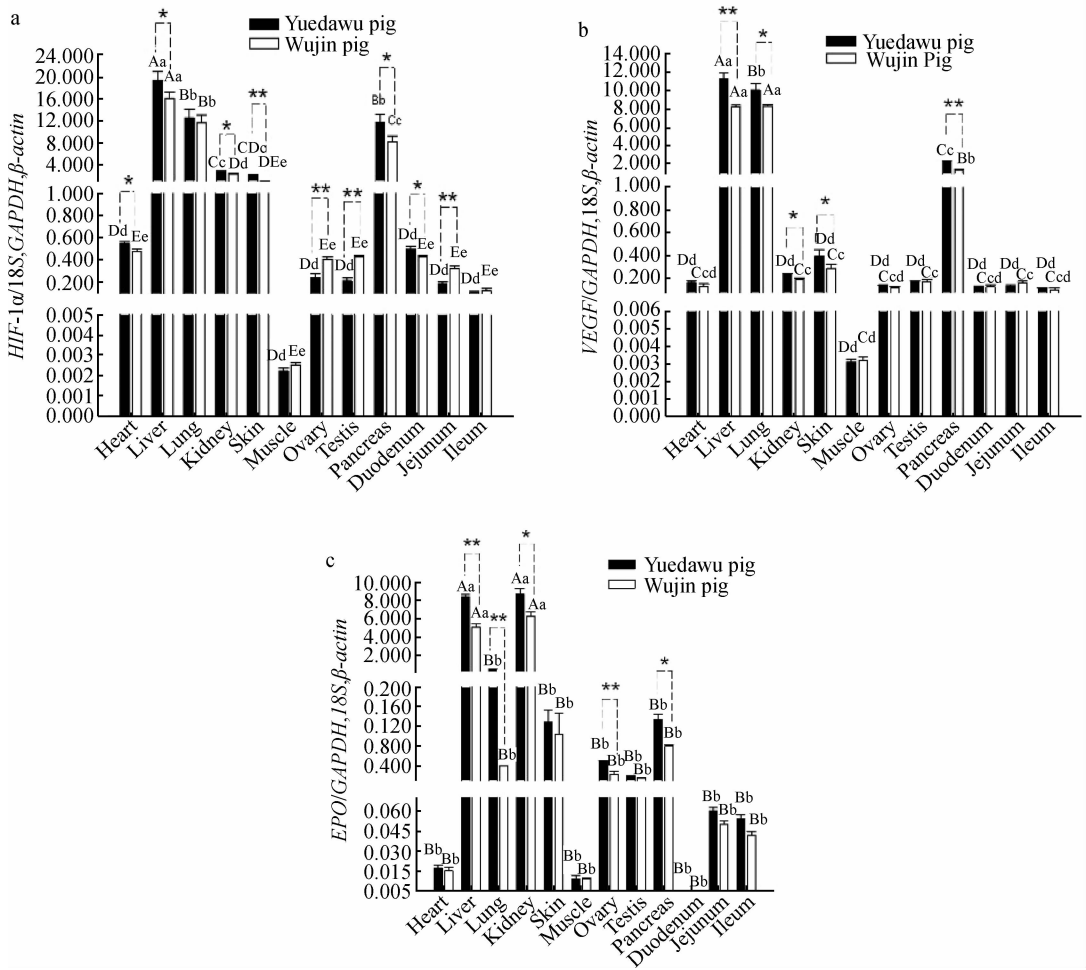
在高原低氧生态条件下,围绕本地乌金猪与培育猪种约大乌猪的低氧适应性,本研究检测了乌金猪与约大乌猪血液生理表征参数、不同组织 *HIF-1 $\alpha$* 、*VEGF*、*EPO* 基因表达量,研究表明,血液生理表征参数和低氧适应基因表达与低氧适应能力之间密切相关,其机制有待进一步研究。

### 3.1 高原低氧环境猪种血液生理表征参数的变化

血红蛋白作为氧的载体,其含量与血氧亲和力一直是高原动物耐受低氧环境的研究热点。据报道,高海拔地区动物血红蛋白含量明显高于低海拔地区,苟潇报道,高原安第斯鸡从 4 000 m 运到海平面饲养两代,结果发现血氧亲和力降低<sup>[18]</sup>,证实了高海拔地区动物独特的血红蛋白机制。而强巴央宗等研究报道藏猪的 RBC、HGB 和 HCT 指标低于高海拔饲养的长白猪,说明藏猪对高原低氧反应不敏感,低氧适应性强<sup>[19]</sup>。本研究发现,乌金猪的血液生理表征参数 HGB 和 RBC 极显著高于约大乌猪,而 HCT、MCH 低于约大乌猪,氧饱和度高于约大乌猪,但差异不显著。乌金猪长期生活在云南高海拔地区,已形成适应低氧独特且稳定的血红蛋白机制,而约大乌猪为新培育品种,其 HGB、RBC 和氧饱和度低于乌金猪。本研究发现,乌金猪和约大乌猪血液生理表征参数存在明显差异,结果提示,低氧生理表征参数变化与低氧适应能力有关。

### 3.2 乌金猪与约大乌猪不同组织中低氧适应基因表达的特异性

本研究检测了肝、肾、肺、胰腺、心、肌肉、皮肤、睾丸、卵巢、十二指肠、空肠和回肠 12 种组织 *HIF-*



\* ,  $P < 0.05$ ; \* \* ,  $P < 0.01$ . The same as below

图 4 约大乌猪与乌金猪 *HIF-1α*(a)、*VEGF* (b) 和 *EPO*(c) 基因在各组织的表达

Fig. 4 Relative gene expression of *HIF-1α*(a), *VEGF* (b) and *EPO*(c) in tissues in Yuedawu pigs and Wujin pigs

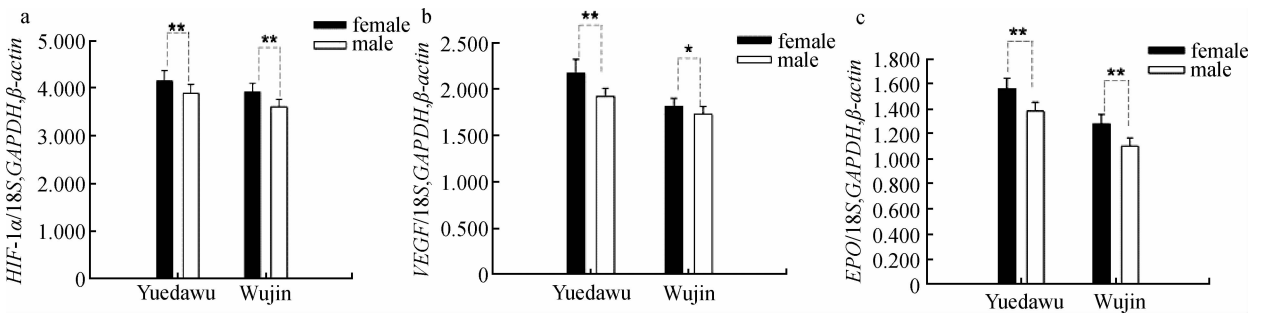


图 5 约大乌猪与乌金猪的公、母猪 *HIF-1α*(a)、*VEGF* (b) 和 *EPO*(c) 基因的平均表达量

Fig. 5 Relative gene expression of *HIF-1α*(a), *VEGF* (b) and *EPO*(c) in tissues of female and male in Yuedawu pigs and Wujin pigs

*1α*、*VEGF*、*EPO* 基因表达量, 结果表明, 乌金猪与约大乌猪不同组织低氧适应基因表达谱存在明显差异, 结果显示与高原低氧适应性密切相关。

肝 *HIF-1α* 和 *VEGF* 基因表达最高, 而 *EPO* 表达也相对较高, 这表明肝与低氧适应基因密切相关。赵同标等采用 Northern 杂交技术, 检测了

*HIF-1 $\alpha$*  mRNA 在高原鼠兔多种组织中均有表达,其中脑的表达量最高,其次为肾,而心、脾和肝的表达相对较低<sup>[20]</sup>。这与本试验的结果不完全一致,可能是与高原低氧特殊的生态环境及不同动物,猪种健康状况相关。L. Tacchini 等体外试验证实,肝内肝细胞生长因子能激活 *HIF-1 $\alpha$*  基因<sup>[21]</sup>。S. Anavi 等报道,常氧环境下,肝内的胆固醇可激活 HIF 信号通路<sup>[22]</sup>。云南本地猪与培育猪种长期处于高原低氧生态环境中,低氧应激可能使猪的肝发生适应变化,从而诱导肝低氧适应基因表达升高,这一推测有待研究证实。

在肺中,*HIF-1 $\alpha$*  和 *VEGF* 基因表达相对较高,与其他组织相比差异极显著。血红蛋白是从肺携带氧经由动脉血运送给机体各组织,而氧气的供应及血红蛋白运输氧气的能力与低氧适应基因直接相关,这与苟潇研究的藏鸡胚胎低氧适应的血红蛋白分子机制是相一致的<sup>[18]</sup>。Y. Liang 等与 A. Abbasi 等的研究也证实了高原鸟类血红蛋白有高的血氧亲和力<sup>[23-24]</sup>。胰腺内胰岛分泌胰岛素,调节糖代谢。邹多宏等报道,*HIF-1 $\alpha$*  可激活的下游因子包括一些糖代谢相关酶,糖酵解酶等<sup>[25]</sup>。低氧条件下,上调 CD147 是通过 *HIF-1 $\alpha$*  与 Sp1 共同加速糖酵解及肿瘤的进程达到的<sup>[26]</sup>。本研究发现,低氧适应基因在胰腺中表达很高,目前未见相关报道,对低氧适应基因在胰腺中的高表达及其作用机制值得研究。

在肾中,*HIF-1 $\alpha$*  和 *VEGF* 均有表达,而 *EPO* 表达最高,与其他组织相比差异极显著,这与 E. D. Zanjani 等研究结果一致<sup>[27]</sup>。肾对氧供给和氧张力的变化较敏感,很容易受到缺氧性损伤。相关报道也证实 *EPO* 在胎儿时期由肝分泌,成体主要由肾分泌。*EPO* 是调节红细胞生成的多肽类激素,在氧气稀薄的高原,*EPO* 可以通过促进红细胞生成缓解因所吸入空气氧浓度低而导致的慢性缺氧损伤。N. S. Patel 等报道,在缺血再灌注损伤时,每日给予 *EPO* 治疗,可保护肾<sup>[28]</sup>。在皮肤中,乌金猪和约大乌猪 *HIF-1 $\alpha$*  基因表达相对较高,推测可能有利于猪增强皮肤表面低氧适应能力。小肠不仅是动物饲料养分消化吸收和代谢的主要场所,也是机体重要的低氧适应器官。本研究表明,低氧适应基因在十二指肠、空肠和回肠中表达量有一定的差异。关于高原猪种肠道组织与低氧适应基因及其养分消化吸收之间的关系仍需研究。

本研究显示,低氧适应基因在肌肉和心等器官

中表达相对较低。但心是高原猪种和高原低氧适应基因的重要器官,心与氧气含量及血红蛋白数量密切相关,推测其与低氧适应基因也有一定关系,需进一步研究。

### 3.3 低氧适应基因对猪品种与性别的表达差异

在高原低氧环境条件下,猪品种和性别是影响低氧适应基因表达的重要因素,从而可能改变猪的低氧适应能力和生产性能。

本研究表明,约大乌猪有 9 个组织 *HIF-1 $\alpha$*  和 *VEGF* 基因表达高于乌金猪,而全部组织的 *EPO* 基因表达均为约大乌猪高于乌金猪。由此推测,由于乌金猪长期生长于高原地区可能已具有稳定的低氧环境适应的遗传基础。约大乌猪是新培育的含乌金猪血缘的生产猪种,推测是由于机体尚未形成稳定的低氧适应机制,所以在高原低氧环境下通过上调低氧适应基因的表达来适应低氧环境。本试验结果显示,利用现代遗传育种理论和技术,经过多代选育而成的具有本地乌金猪血缘的约大乌猪不仅提高了生长速度和瘦肉率,其低氧适应性也发生了显著变化,结果与猪的低氧适应能力密切相关。

本研究结果显示,*HIF-1 $\alpha$* 、*VEGF*、*EPO* 基因在约大乌猪与乌金猪的各个组织中均是母猪明显高于公猪。提示,在云南高原低氧的情况下,由于母猪的生产繁殖特性相对于公猪较为复杂,母猪的低氧应激反应可能大于公猪,母猪相对于公猪更容易受到高原低氧的应激。因此,高原低氧环境应激与母猪特有繁殖生理及其低氧适应性可能形成新的研究领域。

## 4 结 论

综上,在云南高原低氧的复杂生态环境中,乌金猪低氧适应生理表征参数明显高于约大乌猪;多数组织约大乌猪低氧适应基因的表达量高于乌金猪,低氧适应基因在约大乌猪与乌金猪的表达具有组织差异性与品种特异性;母猪低氧适应基因的表达量明显高于公猪。低氧适应基因表达差异与猪低氧适应能力之间的内在联系有待进一步研究。

### 参考文献(References):

- [1] SEMENZA G L, NEJFELLT M K, CHI S M, et al. Hypoxia-inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 3' to the human erythropoietin gene [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88: 5680-5684.

- [ 2 ] SEMENZA G L. Regulation of mammalian O<sub>2</sub> homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 [J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 1999, 15: 551-578.
- [ 3 ] SEMENZA G L. HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia [J]. *Appl Physiol*, 2000, 88(4): 1474-1480.
- [ 4 ] JIANG B H, ZHENG J Z, LEUNG S W, et al. Trans-activation and inhibitory domains of hypoxia-inducible factor 1 [J]. *J Biol Chem*, 1997, 272: 19253-19260.
- [ 5 ] KALOUSHI A, MYLONIS I, POLITOU A S, et al. Casein kinase 1 regulates human hypoxia-inducible factor HIF-1 [J]. *J Cell Sci*, 2010, 123: 2976-2986.
- [ 6 ] SEMENZA G L. Hypoxia-inducible factor 1: master regulator of O<sub>2</sub> homeostasis [J]. *Curr Opin Genet Dev*, 1998, 8(5): 588-594.
- [ 7 ] MYLONIS I, SEMBONGI H, BEFANI C, et al. Hypoxia causes triglyceride accumulation by HIF-1-mediated stimulation of lipin 1 expression [J]. *J Cell Sci*, 2012, 125: 3485-3493.
- [ 8 ] PARSANEJAD M, ZHANG Y, QU D, et al. Regulation of the VHL/HIF-1 pathway by DJ-1 [J]. *J Neurosci*, 2014, 34: 8043-8050.
- [ 9 ] DE FRANCESCO E M, PELLEGRINO M, SANTOLLA M F, et al. GPER mediates activation of HIF-1 $\alpha$ /VEGF signaling by estrogens [J]. *Cancer Res*, 2014, 74(15): 4053-4064.
- [10] FERRARA N. Vascular endothelial growth factor [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2009, 29(6): 789-791.
- [11] 祁 玥, 郑亚宁. 血管内皮生长因子的研究进展 [J]. 青海师范大学学报(自然科学版), 2010, 26(4): 61-66.  
 QI Y, ZHENG Y N. Research of the VEGF [J]. *Journal of Qinghai Normal University (Natural Science Edition)*, 2010, 26(4): 61-66. (in Chinese)
- [12] 秦 川, 肖颖彬, 陈 林, 等. 促红细胞生成素预处理在大鼠心肌缺氧复氧损伤中的抗氧化效应 [J]. 局解手术学杂志, 2011, 20(1): 71-73.  
 QIN C, XIAO Y B, CHEN L, et al. Antioxidation effect of erythropoietin pretreatment on myocardium exposed to hypoxia-reoxygenation injury [J]. *Journal of Regional Anatomy and Operative Surgery*, 2011, 20(1): 71-73. (in Chinese)
- [13] VESEY D A, CHEUNG C, PAT B, et al. Erythropoietin protects against ischaemic acute renal injury [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2004, 19(2): 348-355.
- [14] JESSEN T H, WEBER R E, FERMIN G, et al. Adaptation of bird hemoglobins to high altitudes: demonstration of molecular mechanism by protein engineering [J]. *PNAS*, 1991, 88(15): 6519-6522.
- [15] YOON D, PONKA P, PRCHAL J T, et al. Hypoxia and hematopoiesis [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2011, 300: C1215-C1222.
- [16] 刘金凤, 商 鹏, 旦增旺久, 等. 藏猪促红细胞生成素(EPO)基因多态性分析 [J]. 湖南农业科学, 2012, 51(12): 2590-2592. (in Chinese)  
 LIU J F, SHANG P, DANZENG W J, et al. The polymorphism analysis of erythropoietin in Tibetan pig [J]. *Hubei Agricultural Sciences*, 2012, 51(12): 2590-2592. (in Chinese)
- [17] PFAFFL M W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR [J]. *Nucleic Acids Res*, 2001, 29(9): e45.
- [18] 苟 潇. 藏鸡胚胎低氧适应的血红蛋白分子机制 [D]. 北京: 中国农业大学, 2005.  
 GOU X. Hemoglobin mechanism of hypoxia toleration in Tibetan chick embryo [D]. Beijing: China Agricultural University, 2005. (in Chinese)
- [19] 强巴央宗, 张 浩, 白玛央宗, 等. 高原环境中藏猪血液生理指标测定与比较 [J]. 西南农业学报, 2011, 24(6): 2382-2384.  
 CHAMBA Y Z, ZHANG H, BAINA Y Z, et al. Determination of blood physiological parameters in Tibet pig at high altitude [J]. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 2011, 24(6): 2382-2384. (in Chinese)
- [20] 赵同标, 赵新全, 常智杰, 等. 常氧下高原鼠兔 HIF-1 $\alpha$  mRNA 的表达 [J]. 动物学研究, 2004, 25(2): 132-136.  
 ZHAO T B, ZHAO X Q, CHANG Z J, et al. Tissue specific expression of plateau pikas (*Ochotona curzoniae*) HIF-1 $\alpha$  mRNA under normal oxygen [J]. *Zoological Research*, 2004, 25(2): 132-136. (in Chinese)
- [21] TACCHINI L, DANSI P, MATTEUCCI E, et al. Hepatocyte growth factor signalling stimulates hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) activity in HepG2 hepatoma cells [J]. *Carcinogenesis*, 2001, 22(9): 1363-1371.
- [22] ANAVI S, HAHN OBERCYGER M, MADAR Z, et al. Mechanism for HIF-1 activation by cholesterol under normoxia: a redox signaling pathway for liver damage. [J]. *Free Radic Biol Med*, 2014, 71: 61-69.
- [23] LIANG Y, HUA Z, LIANG X, et al. The crystal structure of bar-headed goose hemoglobin in deoxy



- form: the allosteric mechanism of a hemoglobin species with high oxygen affinity[J]. *J Mol Biol*, 2001, 313(1):123-137.
- [24] ABBASI A, LUTFULLAH G. Molecular basis of bird respiration: primary hemoglobin structure component from Tufted duck (*Aythya fuligula*, Anseriformes)--role of alpha99Arg in formation of a complex salt bridge network[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 291(1):176-184.
- [25] 邹多宏, 黄远亮. 低氧诱导因子-1 $\alpha$  的研究进展[J]. 国际口腔医学杂志, 2010, 37(3):320-323.  
ZOU D H, HUANG Y L. Research progress on hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ [J]. *International Journal of Stomatology*, 2010, 37(3):320-323. (in Chinese)
- [26] KE X, FEI F, CHEN Y, et al. Hypoxia upregulates CD147 through a combined effect of HIF-1 $\alpha$  and Sp1 to promote glycolysis and tumor progression in epithelial solid tumors[J]. *Carcinogenesis*, 2012, 33(8): 1598-1607.
- [27] ZANJANI E D, POSTER J, BURLINGTON H, et al. Liver as the primary site of erythropoietin formation in the fetus[J]. *J Lab Clin Med*, 1977, 89(3): 640-644.
- [28] PATEL N S, SHARPLES E J, CUZZOCREA S, et al. Pretreatment with EPO reduces the injury and dysfunction caused by ischemia/reperfusion in the mouse kidney *in vivo* [J]. *Kidney Int*, 2004, 66(3): 983-989.

(编辑 郭云雁)