

# 高原鼯鼠 *prestin* 基因的组织特异性表达 与适应地下生活的关系

许利娜 魏琳娜 汪洋 李筱 魏莲 魏登邦\*

(青海大学农牧学院, 西宁 810016)

**摘要:** 高原鼯鼠是青藏高原特有的地下鼠, 地下鼠具有准确的空间定位能力。*Prestin* 蛋白是在耳蜗特异性表达且与回声定位有关的蛋白分子。为了探讨 *prestin* 基因与高原鼯鼠地下空间定位之间的关系, 我们克隆了高原鼯鼠 *prestin* 基因的编码区序列, 并与其他物种的 *prestin* 基因进行序列比对; 运用 PAML 软件对高原鼯鼠的 *prestin* 基因进行进化分析; 根据已克隆的序列, 应用实时荧光定量方法测定高原鼯鼠耳蜗、尾部、足垫和鼻垫组织中 *prestin* 基因 mRNA 的表达水平。研究表明, 与人、大鼠、小鼠、裸鼯鼠、家兔和牛 6 种哺乳类动物相比, 高原鼯鼠 *prestin* 基因编码的氨基酸序列显示存在 9 个氨基酸残基突变; Test 2 模型未检测到统计上显著的正选择位点; 高原鼯鼠耳蜗 *prestin* 基因 mRNA 的表达水平显著高于高原鼠兔 ( $P < 0.05$ ), 高原鼯鼠耳蜗和尾部 *prestin* 基因 mRNA 的表达水平显著高于足垫和鼻垫 ( $P < 0.01$ )。以上结果说明, *prestin* 基因不仅在高原鼯鼠耳蜗中表达, 而且在尾部、足垫和鼻垫组织中也有表达。高原鼯鼠在地下洞道生活过程中, 可能利用尾巴、前后足和鼻子辅助感知低频声波, 从而准确地进行空间定位。

**关键词:** 高原鼯鼠; *Prestin* 基因; 组织特异性表达; 地下空间定位

中图分类号: Q95-3; Q955

文献标识码: A

文章编号: 1000-1050 (2016) 02-0221-11

## The relationship between the structure of the *prestin* gene and specific expression in tissues of the plateau zokor and its adaption to the underground life

XU Lina, WEI Linna, WANG Yang, LI Xiao, WEI Lian, WEI Dengbang\*

(College of Agriculture and Animal Husbandry, Qinghai University, Xining 810016, China)

**Abstract:** The Plateau zokor (*Eospalax baileyi*) is a typical subterranean mole rat in Qinghai-Tibet plateau. Subterranean mole rat is a kind of animal which has the ability to orient space accurately. *Prestin* expressed specifically in cochlea is the protein related to the echolocation. In order to shed light on the relationship between *prestin* and underground spatial orientation of plateau zokor, the CDS sequence of plateau zokor *prestin* gene was cloned and compared with other species. The software PAML was used to analyze the adaptive evolution of amino acid sites in the *prestin* of plateau zokor. The expression levels of *prestin* mRNA in cochlea, tail, paw and nose were determined with real-time PCR according to the cloned sequence. The results indicated that the CDS sequence of the plateau zokor *prestin* was similar to those of six kinds of mammals such as human, rat, mouse, naked mole rat, rabbit and cow; and the amino acid sequences showed a relatively high degree of conservation with nine particular amino acid substitutions. No significantly positive selection site was detected with Test 2 model. The expression level of *prestin* mRNA in plateau zokor cochlea was significantly higher than that in plateau pika ( $P < 0.05$ ), and the *prestin* mRNA in plateau zokor cochlea was significantly higher than that in the paw and nose ( $P < 0.01$ ). The result above suggested that *prestin* not only is expressed in the cochlea, but also in paw, nose and tail of plateau zokor. Plateau zokors may perceive low frequency sound waves to accurately orient the space with assistance from their paws, noses and tails during their underground trunk life.

**Key words:** Plateau zokor (*Eospalax baileyi*); *Prestin* gene; Tissue specific expression; Subterranean spatial orientation

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31260512); 青海省自然科学基金项目 (2012-Z-905 及 2014-ZJ-714)

作者简介: 许利娜 (1986-), 女, 硕士研究生, 主要从事高原动物低氧生理研究。

收稿日期: 2015-07-08; 修回日期: 2015-12-06

\* 通讯作者, Corresponding author, E-mail: weidengbang@163.com

高原鼯鼠 (*Eospalax baileyi*) 属于啮齿目 (Rodentia), 鼯形鼠科 (Spalacidae), 鼯鼠属 (*Eospalax*) (Wilson and Reeder, 2005; Zhou and Zhou, 2008), 终生生活在完全封闭的地下洞道中 (樊乃昌和谷守勤, 1981)。高原鼯鼠和绝大多数地下鼠一样, 生命中大部分时间在各自的洞道中单独生活, 有其严格的领域范围, 雌雄鼠只在繁殖季节打通相互之间的洞道以便交配繁衍后代 (Heth, 1989; Zuri and Terkel, 1996; 樊乃昌等, 1990)。高原鼯鼠等地下鼠洞道的显著特点是低氧、高二氧化碳含量和高湿度 (Avivi *et al.*, 1999)。经过长期进化和适应, 地下鼠表现出一系列有效摄取氧、转运氧和利用氧的生理生化特征 (Weibel, 1999; Avivi *et al.*, 2005, 2010; Wei *et al.*, 2006; 王晓君等, 2008)。

挖掘地下洞道需要消耗很高的能量, 其耗能等同于地面行走距离的 360 - 3 400 倍 (Vleck, 1979, 1981), 在此过程中空间定位对地下鼠适应地下洞道生活非常重要。高原鼯鼠等地下鼠在挖掘地下洞道的过程中, 经常遇到障碍物、陷阱、悬崖等, 只有准确进行地下空间定位, 用最短的挖掘距离绕过障碍物和陷阱, 才能有效获取食物和完成繁殖 (Kimchi *et al.*, 2005)。国内外研究表明, 地下鼠可以利用地球磁场, 通过大脑记忆和感知低频声波进行地下空间定位 (Zuri and Terkel, 1996; 李金刚等, 2001; Kimchi *et al.*, 2005)。目前, 有关地下鼠是通过何种声波感受器来接受低频声波尚没有统一的结论, 有学者认为, 地下鼠用耳蜗内的特殊感受器感知低频声波 (Ashmore, 1987; Rado *et al.*, 1989; Raphael *et al.*, 1991; Rado *et al.*, 1998), 也有研究者提出地下鼠可以用身体的某些特殊感受器如足垫来感知低频声波 (Nevo *et al.*, 1991; Kimchi *et al.*, 2005)。地质学研究表明, 在土壤介质中, 低频声波传递的距离较远, 衰减最小 (Ashmore, 1987; Steeples *et al.*, 1997; Bachrach *et al.*, 1998)。在通讯过程中, 甘肃鼯鼠发出的震动波频率范围为 39 ~ 570 Hz (李金刚等, 2001), 裸鼯鼠、鼯形鼠等地下鼠对低频声波敏感 (Heth *et al.*, 1987; 1991), 他们的听阈范围为 80 Hz - 10 000 Hz, 在小于 800 Hz 的低频范围内听觉较为敏感。因此, 地下鼠通过低频声波的回声定位方式进行地下空间定位具有可行性。近期的研究发现,

地下鼠的耳朵具有感知低频声波的功能, 其耳蜗基底膜分布有声频信号感受器, 耳蜗不同部位对声频信号的感知与声波的频率有关, 耳蜗顶层可感知低频声波, 底层感知高频声波 (Ashmore, 2008; 王茁, 2011)。地下鼠通过头骨的振动引起内耳淋巴液的振动, 从而引起耳蜗顶层毛细细胞的摆动来感知低频声波 (Kimchi and Terkel, 2002; Kimchi and Terkel, 2003a; 2003b; Kimchi *et al.*, 2005)。

Prestin 蛋白是新发现的阴离子转运家族蛋白成员, 在耳窝外毛细胞中特异性表达, 是耳窝外毛细胞的分子马达, 具有将声波机械能转变成电能的能力及放大听力的作用 (Zheng, 2000)。我们的预实验发现, prestin 基因不仅在高原鼯鼠耳蜗内特异性表达, 而且在尾部、足垫和鼻垫等组织中也有表达。因此, 我们假设, 高原鼯鼠在地下洞道生活过程中, 为了准确地进行空间定位, 有效获取食物, 寻找配偶, 避开障碍物等, 通过多种身体感受器来感知低频声波, 从而准确进行空间定位, prestin 蛋白是高原鼯鼠感知低频声波感受器的重要物质基础。

基于以上的理论分析和假设, 本文进行了高原鼯鼠耳蜗 prestin 基因的克隆及测序, 对测得的 prestin 基因序列进行进化分析, 应用荧光定量 PCR 方法测定了高原鼯鼠和相同地区地面动物高原鼠兔 (*Ochotona curzoniae*) 耳蜗中 prestin 基因 mRNA 表达水平, 以及高原鼯鼠耳蜗、尾部、足垫和鼻垫组织中 mRNA 水平的表达量。Prestin 蛋白在高原鼯鼠组织中特异性表达的研究, 为高原鼯鼠地下定位机制研究提供依据。

## 1 研究方法

### 1.1 实验动物

高原鼯鼠 (*Eospalax baileyi*) 和高原鼠兔 (*Ochotona curzoniae*) 捕捉于青海省海南州贵德县拉鸡山 (北纬 36° 72', 东经 101° 28', 海拔 3 900 m)。所有实验动物均用 5% 戊巴比妥钠 (1 mL/kg) 麻醉后迅速解剖, 采集耳蜗、尾部、足垫和鼻垫组织, 立即液氮保存。采集过程中所涉及到处理动物的措施均按照国家《实验动物管理条例 (GB14923 - 2010)》执行。

### 1.2 高原鼯鼠耳蜗 prestin 基因的克隆和测序

从 NCBI 下载人 (*Homo sapiens* AF523354)、大

鼠 (*Rattus norvegicus* NM\_030840.1), 小鼠 (*Mus musculus* AY024359.2), 裸鼯鼠 (*Heterocephalus glaber* XM\_004893953) 和家兔 (*Oryctolagus cuniculus* NM\_001142261.1) 的 cDNA 序列, 输入到 Primer premier 5.0 软件中, 通过核酸序列的同源比对, 在高度保守区设计引物, 引物序列及扩增长度见表 1, 引物由上海生物工程有限公司合成。引物序列, 退火温度和扩增长度见表 1。按照 mirVana™ PARIS™ Kit 试剂盒 (Invitrogen Life Technologies) 说明取高原鼯鼠和高原鼠兔耳蜗组织提取总 RNA,

核酸蛋白含量检测仪测定 A260/A280 值及浓度, 选取 A260/A280 介于 1.8 - 2.0 之间的 RNA 样品, 进行 1% 甲醛变性琼脂糖凝胶电泳检测其质量, 取 1μg 总 RNA 采用 First Strand cDNA Synthesis kit (Thermo Scientific) 试剂盒合成 cDNA。按照 the Premix Ex Taq Version Kit (TAKARA) 说明进行 PCR 反应, 将 PCR 产物直接送上海生物工程有限公司测序。将获得的序列在 GenBank 上进行比较分析。

表 1 高原鼯鼠 *prestin* 基因测序引物  
Table 1 Primers for amplification of *prestin* in plateau zokor (*Eospalax baileyi*)

引物 Primer	序列 Sequence	退火温度 Annealing temperature	克隆片段长度 Fragment length
Primer (1)	F: 5' - ATGGATCATGCTGAAGAAAATG - 3' R: 5' - TGCCCGAGACCAAGTCACC - 3'	58 °C	261 bp
Primer (2)	F: 5' - TGCTGTGGGTGGCAAGG - 3' R: 5' - TCAACCTGGTAGCCATG - 3'	57 °C	298 bp
Primer (3)	F: 5' - CATGGCTACCAGGT - 3' R: 5' - GCCTGGGGTAACGACTC - 3'	58 °C	221 bp
Primer (4)	F: 5' - AGGTCTCAGATTCCATCGGG - 3' R: 5' - ACAGTCCCAAGGCAATGAGC - 3'	60 °C	1032 bp
Primer (5)	F: 5' - CACGGGATTCCTCTTTGA - 3' R: 5' - GCATCCTGCTAAATAGACATAA - 3'	55 °C	757 bp
Primer (6)	F: 5' - CATCTGGCTTACCACTTT - 3' R: 5' - TCACCCTCCAATCAAGC - 3'	56 °C	958 bp

### 1.3 高原鼯鼠耳蜗 *prestin* 序列分析

测序结果经 Blast 比较, 以确定是否为目标序列; 采用 DNASTar 软件包 (DNASTar Inc., USA) 中 SeqMan 程序进行序列拼接, 并辅以人工校正; 用在线预测服务器 ExPASy (<http://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/protparam>)、SignalP 4.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>)、SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>) 进行蛋白质生物信息学特征分析。

### 1.4 高原鼯鼠耳蜗 *prestin* 基因选择压力分析

#### 1.4.1 *Prestin* 基因序列比对和构建系统发育树

从 NCBI 公共数据库中检索并下载了包括食肉类、灵长类和啮齿类动物在内的 26 个物种的 *prestin* 基因编码序列, 利用 MEGA5.0 程序 (Tamura et al., 2011) 对不同动物 *prestin* 基因序列进行 BLAST 分析, 计算物种间的遗传距离。在此基础上, 采用 Tcoffee 程序以保证在 BLAST 过程中 cDNA 的各密码子碱基均为 3 的整数倍。根据 cDNA

的 BLAST 结果, 将已知的 26 个物种的 *prestin* 编码区核苷酸序列用 PAUP 4.0 软件 (Swofford, 2000) 构建最大似然树 (ML 树)。系统树的可靠性经 1000 次重复的自展法 (Bootstrap) 进行检验。

#### 1.4.2 选择压力分析

分别将 26 个物种 (包括随机选择一种蝙蝠、鲸鱼和海豚), 23 个物种 (不包含蝙蝠、鲸鱼和海豚) 和 22 个物种 (不包含蝙蝠、鲸鱼、海豚和裸鼯鼠) 的 *prestin* 基因全部编码序列用 ClustalX1.81 软件进行比对, 比对结果经 MEGA5.0 格式转换后, 应用 PAML4.8 软件包中的 CODEML 程序, 根据 *prestin* 基因的物种树进行选择压力分析。本文选用了该程序中改进的分支位点模型 (“test 2”) 对数据进行正选择分析, 该模型是基于最大似然法。

分支位点模型 (“test 2”) 是将所选定的枝系作为研究对象, 其余枝系作为背景, 对前景枝系所受选择压力进行分析。本文中把高原鼯鼠枝设为检

测枝, 其余枝系设为背景枝, 先用 model A 检测前景枝 (foreground branch) 中是否存在正选择位点, 其标准为 Bayes empirical Bayes (BEB) > 0.95; 然后将控制文件 (codmel.ctl) 中的 fix\_omega 和 omega 都设定为 1, 然后进行第二次运算。提取两次运算时的 lnL 值 (分别记为 lnL1 和 lnL0), 并计算其加倍差值  $2 \times \Delta \ln L$ 。利用 PAML 软件包中的 Chi2 程序, 基于  $2 \times \Delta \ln L$  值计算模型的后验概率  $P$  值 ( $df = 1$ ), 当  $P < 0.05$  时, 此模型得到的结果较可靠。

### 1.5 Prestin 基因在高原鼯鼠各组织中的筛选

根据从耳蜗中已获得的序列设计引物在高原鼯鼠耳蜗、尾部、鼻垫、足垫、心肌、肝脏、肺、肾、脑及骨骼肌等组织中进行筛选, 上游引物序列: 5' - CATGGCTACCAGGTTGA - 3'; 下游引物序列: 5' - GCCTGGGGTAACGACTC - 3', 扩增目的片段为 221 bp。

### 1.6 Prestin 基因 mRNA 表达水平的测定

设计 prestin 和内参  $\beta$ -actin 基因的特异性引物, 应用实时荧光定量 PCR 方法检测高原鼯鼠耳蜗、尾部、足垫和鼻垫组织以及高原鼠兔耳蜗组织中 prestin 基因 mRNA 水平的表达量。用未反转的 RNA 进行 PCR 反应来作为阴性对照。扩增 prestin 基因的上游引物序列为: 5' - AATGAAATCCCTG-CAGCAAC - 3'; 下游引物序列为: 5' - AGACCT-TGTCCTTGGTGTGC - 3'; 扩增长度为 97 bp。扩增内参  $\beta$ -actin 基因的上游引物序列为: 5' - CTAAG-GCCAACCCTGAAAAGAT - 3'; 下游引物序列: 5' - GACCAGAGGCATACAGGGACA - 3'; 扩增长度为 105 bp。

按照 Premix Ex Taq Version 试剂盒 (TAKARA) 说明配制反应体系进行 PCR 反应, 将产物切胶回收, 用回收后的产物进行 10 倍梯度稀释: 设定 PCR 产物浓度为 1, 分别稀释为  $1 \times 10^{-1}$ 、 $1 \times 10^{-2}$ 、 $1 \times 10^{-3}$ 、 $1 \times 10^{-4}$ 、 $1 \times 10^{-5}$ 、 $1 \times 10^{-6}$ 、 $1 \times 10^{-7}$ 、 $1 \times 10^{-8}$  8 个梯度浓度的 DNA, 作为标准品备用。按照 SYBR@ Premix Ex Taq<sup>TM</sup> II (Perfect Real Time) (TAKARA) 说明配制反应体系: 12.50  $\mu$ L SYBR@ Premix Ex Taq<sup>TM</sup> II, 0.50  $\mu$ L 10  $\mu$ mol/L 的 PCR 特异引物 F, 0.50  $\mu$ L 10  $\mu$ mol/L 的 PCR 特异引物 R, 1  $\mu$ L cDNA, 加水至总体积 25  $\mu$ L。反应条件: 95 $^{\circ}$ C 3 min; (95 $^{\circ}$ C 30 s, 60 $^{\circ}$ C

30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s) 40 个循环; BIO-RAD connect 软件采集和分析数据。各样品目的基因和管家基因的浓度结果直接由机器生成。每个样品的目的基因浓度除以其管家基因的浓度, 即为此样品基因校正后的相对含量。

### 1.7 数据统计分析

采用 SPSS 22.0 统计软件对数据统计分析, 采用独立样本  $t$  检验方法多重比较 ( $\alpha = 0.05$ )。所有结果均以平均值  $\pm$  标准差 (mean  $\pm$  SD) 表示,  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 高原鼯鼠 prestin 基因的克隆和序列分析

高原鼯鼠 prestin 基因编码区序列全长为 2 232 bp, 编码 743 个氨基酸, 其起始密码子和终止密码子分别为 ATG 和 TGA。理化性质分析显示高原鼯鼠 prestin 蛋白的分子质量为 81 051.60 Da, 理论等电点 (pI) 为 5.96。该蛋白共包括 11 577 个原子, 分子式为  $C_{3720}H_{5863}N_{925}O_{1044}S_{25}$ 。在组成 prestin 蛋白的 20 种氨基酸中, Leu (L) 所占比例最高为 11.3%, Trp (W) 所占比例最低为 0.4%, prestin 蛋白不含 Pyl (O) 和 Sec (U) 两种氨基酸。prestn 蛋白的不稳定性指数为 33.25, 脂肪指数为 109.14。Signal P4.1 Server 在 prestin 中未检测到信号肽结构。功能域位点: 2 个  $N$ -糖基化位点、2 个 CAMP 和 CGMP 依赖的蛋白激酶磷酸化位点、5 个酪蛋白激酶 II 磷酸化位点、11 个  $N$ -酰基化位点、6 个蛋白激酶 C 磷酸化位点 (PKC) 和 1 个酪氨酸激酶磷酸化位点 (TK) (图 1)。

用 DNAMAN 软件进行序列分析, 发现高原鼯鼠 prestin 基因与人、大鼠、小鼠、裸鼯鼠、家兔和牛的同源性分别为 90.38%、88.28%、89.44%、88.95%、86.45% 和 89.53%; 而其氨基酸同源性分别为 95.30%、94.35%、95.16%、95.03%、93.68% 和 94.89%, 高原鼯鼠 prestin 基因的碱基及其所编码蛋白的氨基酸序列比较保守。与人、大鼠、小鼠、裸鼯鼠、家兔和牛 6 种哺乳动物相比, 高原鼯鼠 prestin 氨基酸序列有 9 处突变, 分别是 D44E, D316G, A588T, T591A, F646L, Q714H, E723A, N736S, T738A。

用 SWISS-MODEL 服务器对 prestin 蛋白三级结构进行预测发现, prestin 蛋白 505 到 717 氨基酸残

基是基于 3ll0 的 A 链进行建模，两者序列的一致性达到 91.55%；638-718 氨基酸残基是基于 3ll0

的 A 链进行建模，两者序列的一致性达到 91.46% (图 2)。

```

1 ATGGATCATCGAAGAATAAATCCCTGCAGCAACCCAGGAGTATTATGTGGAAAGGCGCTTCTCAGTCAT
  MDHAEENEIPIAA [TQR] Y Y V E R P I F S H
26 CCTGTCTCCAGGAAAGGCTGCACACAGGACAAGGTCAGATTCCATCGGGGAGAGCTGAAACAGGCATTC
  PKC(13-15)
151 ACATGATCTCTAAAATAAAGAAATATCAITACAGTTCCTGCTACACCAAGTGGTGGCAGCATATAAG
  T C T P K I R N I I Y M F L P I T K W L P A Y K
  PKC(33-35)
226 TTCAGGAGTAAGTGTAGGTGACTTGGCTCGGGCATAAGCAGCTGGAGTCTCAGCTTCTCAAGCTTAGCC
  F K E Y V L G D L V S [GISTGV] L Q L P Q [GLA]
  N-myristoylation site (87-92)
301 TTGCAATGCTGGCAGCTGGCCCTGTGTTCCGGCTGACTCGTCTTTATTCCTGTTATCATGTTGCTTT
  F A M L A A V P P V F [GLYSS] Y P V I M Y C F
  N-myristoylation site (98-103)
376 CTTGGAACTCCAGACACATATCCATAGGTCCTTTCGGCTGTTATTAGCCTAATGATTGGTGGCTGCTTCCA
  L G [TS] H I S I G P F A V I S L M I G G V A V R
  PKC(128-130)
451 TTAGTCCAGATGATATGATCCACAGGAGCCGTAATGCAACCAATGGTACAGAAGCTAGAGATGCTTGAGA
  L V P D D I V I P [E] G V N A T N G A E A R D A L R
  N-myristoylation site (160-165) N-glycosylation site (163-166)
526 GTGAAGTGGCCATGCTCTGACTTACTTCTGGATCACTTTCCTAGGTCCTGATGGTGGATTT
  V K V A M S V T L L S G I I Q F C L G V C R F G F
601 GTGGCCATAACCTCACGAGGCCCTGGTCCGAGGCTTACCACTGCGGCTGCGTGCATGTCTTACCTCATM
  V A I Y L T E P L V R G F T T A A A V H V F T S M
676 TTAATAACTTGTGGGGTAAACAAGCGGTACACTGGGATCTTTCAGTGGTATAGTACAGTGTCTGTG
  L K Y L F G V K [KRY] G I F S V V Y S T V A V
  PKC(234-236) CAMP(235-238)
751 TTGCAAGTCTAAAACCTCAACGTGTCTTCTAGGGCTGGGCTCACTGGTCTTGGTCTGCTGGCGCGC
  L Q N V K N L N V C S L G V G L M V F [LIL] G G
  N-myristoylation site (270-275)
826 AAGAGTAAATGAGAGATTAAAGAGAACTGCGGGCCATTCCTAGAAATCTTTCGGGTGGATGGGA
  K E F N E R F K E K L P A P I P L E F F A V V M [E]
901 ACTGGCAATTCGGCGGATTAACCTGCAAGAACTCAATGTAGGTGCTGTGGAACACTTCTCGGGGCTA
  [GISA] G F N L Q E S Y N V [GVVGT] L P L G L
  N-myristoylation site (300-305) N-myristoylation site (316-321)
976 CTCCTCCTCCCAACCCAGACACAGCCTCTCCACCTGGTGTAGTGGATGCTATTGCCATAGCCATTGTTGA
  L P P A N P D T S L F H L V Y V D A I A I A I V G
1051 TTTTCAGTACCTCTCCATGGCAAGACTTGGCAAAAGCATGGCTACCAAGTTGATGGCAATGAGGAGCTC
  F S V T I S M A K T L A N K H G Y Q V D G N Q E L

```

```

1126 ATTGCCTGGGACTGTGCAATCCATGGATCTCTTTCAGACCTTTTGGATTTCTGCTCTTGTTCGAAGC
  I A L [GLCNS] T G S L F Q T F S I S C S L S R S
  N-myristoylation site (379-384)
1201 CTTGTCTCAGGAGACTGGAGGAGCACAGCTTCAGGTTGCTTGGCTCTTAAATGATTCTGCTGTCATA
  401 L V Q E G T G G K T Q L A [ECLAS] M I L L V I
  N-myristoylation site (414-419)
1276 TTAGCCACTGGATTCTCTTGGAGTGTACCCCGAGCTGCAGCATTCAGCCATIGTATGTCAACCTGAAGGA
  426 L A T G F L F E S L P Q A V L S A I V I V N L K G
1351 ATGTTTATGCACTTCTGGATCTCCCTCTTCTGGAAACACCAAAATAGAGCTGACCATCTGGCTACCACT
  451 M F M Q F L D L P F F W R [TSKI] E L T I W L T T
  PKC(464-466) CK2(465-468)
1426 TTTGTCTCTGCTGCTGGATAGACTACGGCCGTATTAAGTGTGATGATGATGCTGACTGTGATT
  476 F V S S L F L [GLDYG] I T A V I I A L L T V I
  N-myristoylation site (483-488)
1501 TACCGAACACAGCTCCAGCTACAAAGTCTGGACACTGCTCTGACACTGATGATGATGACATAGATGA
  501 Y R T Q S P S Y K V L G Q L P D T D V Y I D I D A
  PKC(507-509)
1576 TATGAGGAGGTGAAAGAATTCCTGGAGTAAAATATCCAAATAAATGCTCCAAATTAATGAAATAGTGAC
  526 Y E E V K E I P G V K I F Q I N A P I Y Y A N S D
1651 TTGTATAGCAAGCATTAAAGAAAGACTGGAGTGAACCCAGCATAATAGGAGCAAGAAAGGCGCATG
  551 L Y S N A L [KRK] [GVNPA] I M G A R R K A M
  CAMP(557-560) N-myristoylation site (561-566)
1726 AGGAAGTATGCTAAGGAAGTGGAAATGCCACCTGACCAACCGCGCGTGGTAAAGTGGATGCAAGATAGAC
  576 R K Y A K E V G N A [NVT] A A V V K V D A E V D
  N-glycosylation site (586-589)
1801 GGAGAAGTCTACCAAGCTGGAAGAAGATGATGATGAAATATCCCAATGATCATCAAAAACACATTT
  601 G E D A [PKP] E E D D E V K Y P P I V I K N [I]
  CK2(605-608) CK2(624-627)
1876 CCTGAGAGCTACAAGATTCATGCCCGAGGGGAAATGTCACACTATCATTCITGGACCTCACAGAAGTCAAT
  626 [E] E L Q R F M P P P G E N V H T I I L D L T Q V N
  N-myristoylation site (665-673)
1951 TTCATTGACTGTGGAGTAAAACCTGGCCGGGATGTGAGGAATAATGAGACGTCGGTATTTATGCTCAT
  651 F I D S V G V K T L A G I V [KEYGDVGI] V Y
  N-glycosylation site (686-693)
2026 TTAGCAGGATGCAAGTGTGAAAGTGTGAAAGTGTGAAAGTGTGAAAGTGTGAAAGTGTGAAAGTGTGAAAG
  676 L A G C S P Q V N D L T R N R P F E N P A L K E
2101 CTTCTGTCACAGATCAATGATGCGGTTTATGGAGCCACCTTCGAGGAGGACTGGCCGAGGAGCTCAAGCT
  701 L L F H [SIH] A V L G S H V R E A L A E Q A S A
  CK2(705-708)
2176 CTGCTCCACAGAGGACTGGAGCCGAGCGGACCTGACACACTGAGGAGCATGA
  726 L P P Q E D L E P S A A P A T P E A *

```

图 1 高原鼯鼠 prestin cDNA 及推测的氨基酸序列。图中加框和灰色底纹表示所含有的功能域位点，包括 N-糖基化位点、CAMP 和 CGMP 依赖的蛋白激酶磷酸化位点、酪蛋白激酶 II 磷酸化位点、N-酰基化位点、蛋白激酶 C 磷酸化位点 (PKC) 和酪氨酸激酶磷酸化位点 (TK)

Fig. 1 The cDNA and amino acid sequences of prestin in plateau zokor. The abbreviation of motifs surrounded by boxes are presented as follows: N-glycosylation site, CAMP and CGMP dependent protein kinase phosphorylation site, Casein kinase II phosphorylation site (CK - 2), N-myristoylation site, Protein kinase C phosphorylation site (PKC), Tyrosine kinase phosphorylation site (TK)

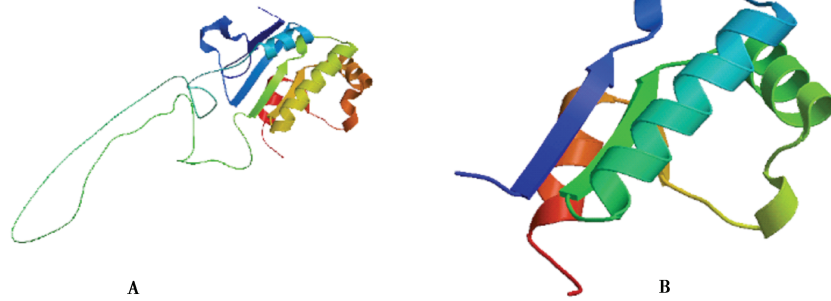


图 2 高原鼯鼠 prestin 蛋白三级结构模拟图。A: 505-717 位氨基酸；B: 638-718 位氨基酸

Fig. 2 The tertiary structure of protein model of plateau zokor prestin. Model A is from 505 to 717 amino acid; Model B is from 638 to 718 amino acid

### 2.2 高原鼯鼠耳蜗 prestin 基因选择压力分析结果

基于 26 个物种 (包括随机选择一种蝙蝠、鲸鱼和海豚), 23 个物种 (不包含蝙蝠、鲸鱼和海豚) 和 22 个物种 (不包含蝙蝠、鲸鱼、海豚和裸鼯鼠) 的 test 2 (model A vs. model A null) 模型计

算结果表明, 高原鼯鼠有潜在的正选择位点, 但 BEB 结果不显著, 且与 null 的 lnL 差值为 0, 即卡方检验不显著 (模型不具有统计效力) (表 2)。高原鼯鼠的 prestin 基因与其他物种相比在进化上没有特殊之处。

兽类学报 Acta Theriologica Sinica

表 2 高原鼯鼠 prestin 基因的选择压力似然比检验

Table 2 Likelihood ratio test (LRT) of branch-site models for prestin gene in plateau zokor

模型 Model	Log likelihood	参数估计 Parameter estimates	模型比较 Model compare	正向选择位点 Positive selection site	$2\Delta\ln L$ ( $P$ -value)
Model A (26)	-14044.237626	$p_0 = 0.90038$ , $p_1 = 0.07453$ $p_{2a} = 0.02317$ , $p_{2b} = 0.00192$ $\omega_0 = 0.02982$ , $\omega_1 = 1$ $\omega_2 = 1$	Model A (26) vs A - null (26)	Not allowed	0 ( $P = 1$ )
Model A - null (26)	-14044.237626	$p_0 = 0.90038$ , $p_1 = 0.07453$ $p_{2a} = 0.02317$ , $p_{2b} = 0.00192$ $\omega_0 = 0.02982$ , $\omega_1 = 1$ $\omega_2 = 1$			
Model A (23)	-13009.572085	$p_0 = 0.90622$ , $p_1 = 0.06709$ $p_{2a} = 0.02484$ , $p_{2b} = 0.00184$ $\omega_0 = 0.02614$ , $\omega_1 = 1$ $\omega_2 = 1$	Model A (23) vs A - null (23)	Not allowed	0 ( $P = 1$ )
Model A - null (23)	-13009.572085	$p_0 = 0.90622$ , $p_1 = 0.06709$ $p_{2a} = 0.02484$ , $p_{2b} = 0.00184$ $\omega_0 = 0.02614$ , $\omega_1 = 1$ $\omega_2 = 1$			
Model A (22)	-12560.932860	$p_0 = 0.90144$ , $p_1 = 0.06909$ $p_{2a} = 0.02737$ , $p_{2b} = 0.00210$ $\omega_0 = 0.02396$ , $\omega_1 = 1$ $\omega_2 = 1$	Model A (22) vs A - null (22)	Not allowed	0 ( $P = 1$ )
Model A - null (22)	-12560.932860	$p_0 = 0.90144$ , $p_1 = 0.06909$ $p_{2a} = 0.02737$ , $p_{2b} = 0.00210$ $\omega_0 = 0.02396$ , $\omega_1 = 1$ $\omega_2 = 1$			

两个模型比较的是  $\ln$  [likelihood] 差异的 2 倍; 选择压力位点用 BEB 分析法; 事后概率中 \* 和 \*\* 分别代表  $P > 0.95$  和  $P > 0.99$

Twice the difference of  $\ln$  [likelihood] between the two models compared. Positively selected sites were identified by Bayes Empirical Bayes (BEB) analysis. The posterior probabilities  $P > 0.95$  and  $P > 0.99$  are indicated by \* and \*\*, respectively.

### 2.3 Prestin 基因在高原鼯鼠各组织中的筛选结果

根据从高原鼯鼠耳蜗中克隆的 prestin 基因序列设计特异性引物在高原鼯鼠尾部、鼻垫、足垫、心肌、肝脏、肺、肾、脑及骨骼肌等组织中进行筛选, 上游引物: 5' - CATGGCTACCAGGTTGA - 3' 下游引物: 5' - GCCTGGGGTAACGAGGTAACGACTC - 3', 扩增目的片段为 221 bp。PCR 产物电泳结果见图 4。

扩增产物经克隆后测序结果见 (图 5), 应用 DNAMAN 软件对测序所得部分序列与耳蜗组织中的

prestIn 基因编码区进行同源性对比, 结果表明, 测得序列位于 prestin 基因编码区的 993 - 1313 bp 处, 与耳蜗组织中 prestin 基因相对应的序列相似度达 100%, 电泳图谱和克隆测序结果均说明 prestin 基因在高原鼯鼠耳蜗、尾部、鼻垫和足垫组织中有表达。

### 2.4 Prestin 基因 mRNA 水平的表达量

荧光定量 PCR 结果表明, 高原鼯鼠和高原鼠兔耳蜗组织中 prestin 基因 mRNA 水平的相对表达量分别为  $0.93 \pm 0.04$  和  $0.87 \pm 0.05$ , 高原鼯鼠耳蜗组织中 prestin 基因 mRNA 水平的相对表达量显著高于高

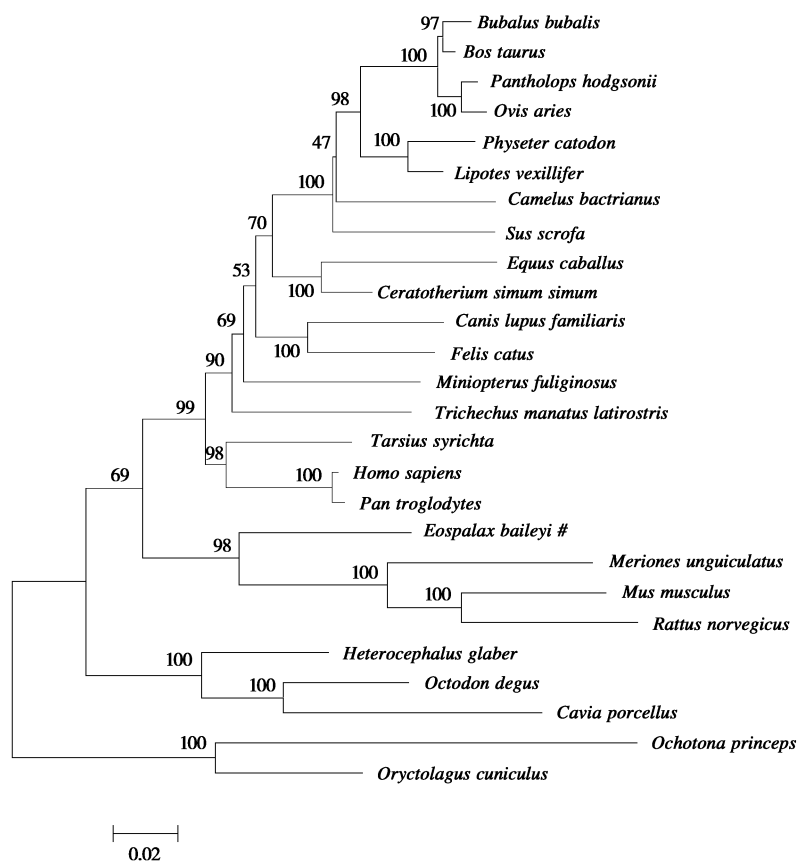


图3 基于 prestin 基因利用最大似然法 (ML) 分析构建的进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree constructed with prestin gene using Maximum Likelihood analyse

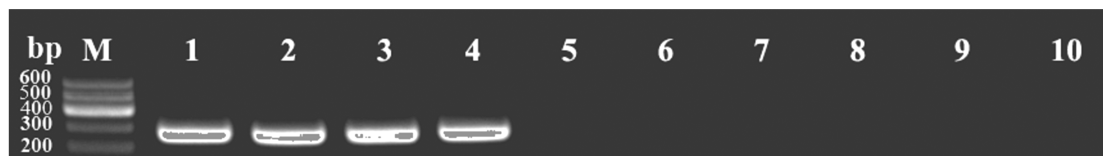


图4 Prestin 基因在高原鼢鼠各组织中的筛选. M: 分子量标准; 1-10 泳道分别为耳蜗、尾部、鼻垫、足垫、心肌、肝脏、肺、肾、脑及骨骼肌等组织中 prestin 基因 PCR 产物

Fig. 4 Identification of prestin gene in plateau zokor tissues. M: DNA Marker; Lane1-10 represent PCR products of prestin gene in plateau zokor cochlear tail, nose, paw, heart, liver, lung, kidney, brain and skeletal muscle, respectively.

原鼠兔 ( $df = 16$ ,  $t = 3.04$ ,  $P < 0.05$ ) (图 6A)。

高原鼢鼠耳蜗、尾部、足垫和鼻垫组织中 prestin 基因 mRNA 水平的相对表达量分别为  $0.93 \pm 0.04$ 、 $0.89 \pm 0.05$ 、 $0.75 \pm 0.05$  和  $0.61 \pm 0.06$ ,

耳蜗和尾部组织中 prestin 基因 mRNA 水平的相对表达量显著高于足垫和鼻垫 ( $P < 0.01$ )，足垫组织中 prestin 基因 mRNA 水平的相对表达量显著高于鼻垫 ( $P < 0.01$ ) (图 6B)。

Cochlear	TTGGCAAATAAC	CATGGCTACCAGGTTGATGGCAATCAGG	1120
tail_paw_and_nose	.....	CATGGCTACCAGGTTGATGGCAATCAGG	28
Consensus		catggctaccaggttgatggcaatcagg	
Cochlear		AGCTCATTGCCTTGGGACTGTGCAATCCATTGGATCTCT	1160
tail_paw_and_nose		AGCTCATTGCCTTGGGACTGTGCAATCCATTGGATCTCT	68
Consensus		agctcattgccttgggactgtgcaatccattggatctct	
Cochlear		TTCCAGACCTTTTCGATTTCTTGCTCCTTGTCTCGAAGC	1200
tail_paw_and_nose		TTCCAGACCTTTTCGATTTCTTGCTCCTTGTCTCGAAGC	108
Consensus		ttccagaccttttcgatcttcttgctccttgtctcgaagc	
Cochlear		CTTGTTCAGGAGGGAAGTGGAGGGAAGACACAGCTTGCAG	1240
tail_paw_and_nose		CTTGTTCAGGAGGGAAGTGGAGGGAAGACACAGCTTGCAG	148
Consensus		cttgttcaggagggaaactggaggggaagacacagcttgcag	
Cochlear		GTTCCTTGGCCCTCCTTAATGATTCTGCTGGTCATATTAGC	1280
tail_paw_and_nose		GTTCCTTGGCCCTCCTTAATGATTCTGCTGGTCATATTAGC	188
Consensus		gttccttggcctccttaatgattctgctgggtcatattagc	
Cochlear		CACTGGATTCCCTTTTGGAGTCGTTACCCAGGC	1320
tail_paw_and_nose		CACTGGATTCCCTTTTGGAGTCGTTACCCAGGC.....	221
Consensus		cactggattcctcttttggagtcgttacccaggc	

图5 高原鼯鼠耳蜗、尾部、足垫和鼻垫组织中 prestin 基因 cDNA 序列片段比对。图中第一行的碱基表示耳蜗 prestin 基因 cDNA 序列片段，第二行的碱基表示尾巴、足垫和鼻垫 prestin 基因 cDNA 序列片段。其中黑框部分表示尾部、足垫和鼻垫组织中 prestin 基因 cDNA 序列片段与耳蜗组织中对应序列中完全相同的部分

Fig. 5 Alignment of the prestin cDNA sequence frgments in plateau zokor cochlear, tail, paw and nose. The nucleotide in first line represents the prestin cDNA fragment in the cochlear, the nucleotide in the second line represents those in the tail, paw and nose. The black box represent the same part of prestin cDNA fragment among plateau zokor cochlear, tail, paw and nose.

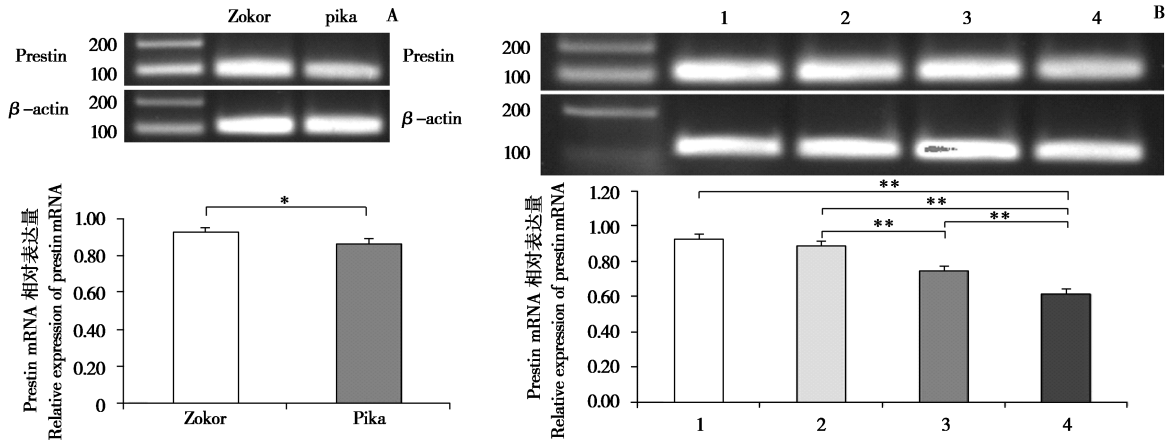


图6 高原鼯鼠和高原鼠兔 prestin 基因 mRNA 表达水平。\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ 。A: 高原鼯鼠和高原鼠兔耳蜗 prestin 基因 mRNA 表达水平; B: 高原鼯鼠耳蜗、尾部、足垫和鼻垫组织 prestin 基因 mRNA 表达水平, 1-4 分别代表高原鼯鼠耳蜗、尾部、足垫和鼻垫组织。

Fig. 6 Expression levels of prestin mRNA in plateau zokor and plateau pika. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ . A: The expression levels of prestin mRNA in plateau zokor and plateau pika cochlear, *df*, *T* and *P* values are 16, 3.04 and 0.046, respectively; B: The expression levels of prestin mRNA in plateau zokor cochlear, tail, paw and nose, 1, 2, 3 and 4 represent tissues of cochlear, tail, paw and nose, respectively.

### 3 讨论

高原鼯鼠是青藏高原特有的地下鼠，研究表

明，地下鼠用头部敲击洞壁发生低频声波通过回声定位来探测洞道与地面距离、洞道周围障碍物的存在、感知周围同类的活动情况 (Heth *et al.*, 1987;



Heth *et al.*, 1991; 李金刚等, 2001; Kimchi *et al.*, 2005)。在哺乳动物中, 耳是感知声音最重要的器官, 其中耳蜗外毛细胞中特异性表达的 prestin 蛋白是将声波机械能转变为电能, 从而感知声音的重要物质基础 (Ashmore, 2008)。地下鼠在长期适应地下洞道生活环境过程中, prestin 基因是否因感知低频声波而发生特异性的适应性突变, 到目前为止没有研究。因此, 本文通过对高原鼯鼠 prestin 基因的结构、同源性和选择压力进行分析, 结果显示, prestin 基因碱基和氨基酸序列与其他物种高度相似; 进化分析结果显示, 高原鼯鼠的 prestin 基因与其他物种在进化上没有明显的正选择位点。说明高原鼯鼠 prestin 基因并非由于适应地下生活而发生结构的特异性变异。

Lieberman 等 (2002) 利用基因敲除技术获得了 prestin 基因缺失小鼠, 经过活体观察发现, prestin 基因缺失小鼠的耳蜗听阈升高了 40 dB; 通过基因敲除不同发育阶段小鼠的 prestin 基因发现, 小鼠的听阈均有不同程度的提高 (郭运凯等, 2004)。以上结果说明, prestin 基因表达水平的提高有利于其感知低频声波。本文结果表明, 与地面动物高原鼠兔相比, 高原鼯鼠耳蜗组织中 prestin 基因 mRNA 表达水平显著高于高原鼠兔。因此我们认为, 高原鼯鼠可能通过提高 prestin 基因表达水平来感知低频声波, 从而进行准确的地下空间定位。

先前的研究认为, prestin 基因在耳蜗组织中特异性表达 (Zheng, 2000; Lieberman *et al.*, 2002; Zheng and Madison, 2002; Dallos and Zheng, 2006), 而本文研究结果表明, prestin 基因不仅在高原鼯鼠耳蜗中表达, 而且在尾部、足垫和鼻垫组织中也有表达。用耳蜗感知声波, 需要比较长的传导过程, 利用尾部、足垫和鼻垫组织能直接感知声波。因此, 我们推测, 高原鼯鼠在地下洞道生活过程中, 可能利用尾巴、前后足和鼻子辅助感知低频声波, 利于地下空间定位。高原鼯鼠尾部组织中 prestin 基因 mRNA 表达水平与耳蜗中的接近, 对于高原鼯鼠来说, 尾巴不利于地下挖掘活动。然而, 在长期适应地下挖掘过程中, 高原鼯鼠的尾巴并没有退化消失, 尾巴的存在可能对其适应地下生活具有重要的作用。是否在高原鼯鼠尾部、足垫和鼻垫中存在 prestin 蛋白为重要结构基础的低频声

波感受器, 这些器官在高原鼯鼠进行地下空间定位中作用大小如何, 需要进一步深入研究。

总而言之, prestin 基因不仅在高原鼯鼠耳蜗中表达, 而且在尾部、足垫和鼻垫组织中也有表达。高原鼯鼠在地下洞道生活过程中, 可能通过提高耳蜗中 prestin 基因的表达水平以及利用尾巴、前后足和鼻子辅助感知低频声波, 从而准确地进行空间定位, 以适应地下生活。

#### 参考文献:

- Ashmore J F. 1987. A fast motile response in guinea-pig outer hair cells: the cellular basis of the cochlear amplifier. *The Journal of Physiology*, **388**: 323 - 347.
- Ashmore J. 2008. Cochlear outer hair cell motility. *Physiological Reviews*, **88** (1): 173 - 210.
- Avivi A, Gerlach F, Joel A, Reuss S, Burmester T, Nevo E, Hankeln T. 2010. Neuroglobin, cytoglobin, and myoglobin contribute to hypoxia adaptation of the subterranean mole rat *Spalax*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **107** (50): 21570 - 21575.
- Avivi A, Resnick M B, Nevo E, Joel A, Levy A P. 1999. Adaptive hypoxic tolerance in subterranean mole rat *Spalax ehrenbergi*: the role of vascular endothelial growth factor. *FEBS Letters*, **452** (3): 133 - 140.
- Avivi A, Shams I, Joel A, Lache O, Levy A P, Nevo E. 2005. Increased blood vessel density provides the mole rat physiological tolerance to its hypoxic subterranean habitat. *The FASEB Journal*, **19** (10): 1314 - 1316.
- Bachrach R, Dvorkin J, Nur A. 1998. High resolution shallow seismic experiments in sand, Part II: Velocities in shallow unconsolidated sand. *Geophysics*, **63**: 1234 - 1240.
- Dallos P, Zheng J, Cheatham M A. 2006. Prestin and the cochlear amplifier. *The Journal of Physiology*, **576** (Pt 1): 37 - 42.
- Fan N C, Gu S Q. 1981. The structure of the tunnel system of the Chinese zokor. *Acta Theriologica Sinica*, **1** (1): 67 - 72. (in Chinese)
- Fan N C, Jing Z C, Zhou W Y. 1990. On the invading behavior of plateau zokor and a new approach to its control. *Acta Theriologica Sinica*, **10** (2): 114 - 120. (in Chinese)
- Franchini L F, Elgoyen A B. 2006. Adaptive evolution in mammalian proteins involved in cochlear outer hair cell electromotility. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **41** (3): 622 - 635.
- Guo Y K, Xie D H, Yang X M. 2004. A correlative study of the alterations of hearing and hair cells in prestin knockout mice. *Chinese Journal of Otolaryngology*, **2** (4): 245 - 249. (in Chinese)
- Heth G. 1989. Burrow patterns of the mole rat *Spalax ehrenbergi* in two soil types (terra - rossa and rendzina) in Mount Carmel, Israel. *Journal of Zoology*, **217** (1): 39 - 56.

- Heth G, Frankenberg E, Raz A, Nevo E. 1987. Vibrational communication in subterranean mole rat (*Spalax ehrenbergi*). *Behavioral Ecology & Sociobiology*, **21**: 31–33.
- Heth G, Frankenberg E, Nevo E. 1986. Adaptive optimal sound for vocal communication in tunnels of a subterranean mammal (*Spalax ehrenbergi*). *Experientia*, **42** (11–12): 1287–1289.
- Heth G, Frankenberg E, Pratt H, Nevo E. 1991. Seismic communication in the blind subterranean mole rat: patterns of head thumping and of their detection in the *Spalax ehrenbergi* superspecies in Israel. *Journal of Zoology*, **224** (4): 633–638.
- Kimchi T, Terkel J. 2002. Seeing and not seeing. *Current Opinion Neurobiology*, **12** (6): 728–734.
- Kimchi T, Terkel J. 2003a. Mole-rats (*Spalax ehrenbergi*) select bypass burrowing strategies in accordance with obstacle size. *Naturwissenschaften*, **90** (1): 36–39.
- Kimchi T, Terkel J. 2003b. Detours by the blind mole-rat follow assessment of location and physical properties of underground obstacles. *Animal Behaviour*, **66** (5): 885–891.
- Kimchi T, Reshef M, Terkel J. 2005. Evidence for the use of reflected self-generated seismic waves for spatial orientation in a blind subterranean mammal. *The Journal of Experimental Biology*, **208** (Pt 4): 647–659.
- Liberman M C, Gao J, He D Z, Wu X, Jia S, Zuo J. 2002. Prestin is required for electromotility of the outer hair cell and for the cochlear amplifier. *Nature*, **419** (6904): 300–304.
- Li J G, Wang T Z, He J P, Min Y J. 2001. Seismic communication in subterranean Gansu zokor (*Myosialax cansus*). *Acta Theriologica Sinica*, **21** (2): 152–154. (in Chinese)
- Nevo E, Heth G, Pratt H. 1991. Seismic communication in a blind subterranean mammal: a major somatosensory mechanism in adaptive evolution underground. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **88** (4): 1256–1260.
- Qi X Z, Wang X J, Zhu S H, Rao X F, Wei L, Wei D B. 2008. Hypoxic adaptation of the hearts of plateau zokor (*Myospalax baileyi*) and plateau pika (*Ochotona curzoniae*). *Acta Physiologica Sinica*, **60** (3): 348–354. (in Chinese)
- Rado R, Himelfarb M, Arensburg B, Terkel J, Wollberg Z. 1989. Are seismic communication signals transmitted by bone conduction in the blind mole rat? *Hearing Research*, **41** (1): 23–29.
- Rado R, Terkel J, Wollberg Z. 1998. Seismic communication signals in the blind mole-rat (*Spalax ehrenbergi*): electrophysiological and behavioral evidence for their processing by the auditory system. *Journal of Comparative Physiology A*, **183** (4): 503–511.
- Raphael Y, Lenoir M, Wroblewski R, Pujol R. 1991. The sensory epithelium and its innervation in the mole rat cochlea. *The Journal of Comparative Neurology*, **314** (2): 367–382.
- Steeple D W, Green A G, McEvilly T V, Miller R D, Doll W E, Rector J W. 1997. A workshop examination of shallow seismic reflection surveying. *The Leading Edge*, **16**: 1641–1647.
- Swofford D L. 2000. PAUP, phylogenetic analysis using parsimony (and other methods). Sunderland (MA): Sinauer Associates.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using likelihood, distance, and parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, **28** (10): 2731–2739.
- Vleck D. 1979. The energy cost of burrowing by the pocket gopher *Thomomys bottae*. *Physiological Zoology*, **52**: 122–125.
- Vleck D. 1981. Burrow structure and foraging costs in the fossorial rodent, *Thomomys bottae*. *Oecologia*, **49** (3): 391–396.
- Wang X J, Wei D B, Wei L, Qi X Z, Zhu S H. 2008. Characteristics of pulmonary acinus structure in the plateau zokor (*Myospalax baileyi*) and plateau pika (*Ochotona curzoniae*). *Acta Zoologica Sinica*, **54** (3): 531–539. (in Chinese)
- Wang Z. 2011. Hearing mechanisms of subterranean rodents. *Journal of Shaanxi Institute of Education*, **27** (03): 71–76. (in Chinese)
- Wei D B, Wang D W, Wei L, Ma B Y. 2012. Differences in physiological adaptive strategies to hypoxic environments in plateau zokor and plateau pika. *Science* (suppl), 36–36.
- Wei D B, Wei L, Zhang J M. 2006. Blood–gas properties of plateau zokor (*Myospalax baileyi*). *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular & Integrative Physiology*, **145** (3): 372–375.
- Weibel E R. 1999. Understanding the limitation of O<sub>2</sub> supply through comparative physiology. *Respiration Physiology*, **118** (2–3): 85–93.
- Wilson D E, Reeder D M. 2005. Mammal Species of the World. Washington: Smithsonian Institution Press.
- Yang X, Downes M, Yu R T, Bookout A L, He W, Straume M, Mangelsdorf D J, Evans R M. 2006. Nuclear receptor expression links the circadian clock to metabolism. *Cell*, **126** (4): 801–810.
- Zheng J. 2000. Prestin is the motor protein of cochlear outer hair cells. *Nature*, **405** (6783): 149–155.
- Zheng J, Madison L D. 2002. Prestin, the motor protein of outer hair cells. *Audiology Neurootology*, **7** (1): 9–12.
- Zheng J, Shen W, He D Z, Long K B, Madison L D, Dallos P. 2000. Prestin is the motor protein of cochlear outer hair cells. *Nature*, **405** (6783): 149–155.
- Zheng Y N, Zhu R J, Wang D W, Wei L, Wei D B. 2011. Gene coding and mRNA expression of vascular endothelial growth factor as well as microvessel density in brain of plateau zokor: comparison with other rodents. *Acta Physiologica Sinica*, **63** (2): 155–163. (in Chinese)
- Zhou C, Zhou K. 2008. The validity of different zokor species and the genus *Eospalax* inferred from mitochondrial gene sequences. *Integrative Zoology*, **3**: 290–298.
- Zhu R J, Rao X F, Wei D B, Wang D W, Wei L, Sun S Z. 2012. Functional difference of malate aspartate shuttle system in liver between plateau zokor (*Myospalax baileyi*) and plateau pika (*Ochotona*

- na curzoniae*). *Acta Physiologica Sinica*, **65** (3): 276 - 284. (in Chinese)
- Zhu S H, Qi X Z, Wang X J, Rao X F, Wei L, Wei D B. 2009. Difference in oxygen uptake in skeletal muscles between plateau zokor (*Myospalax rufescens baileyi*) and plateau pika (*Ochotona curzoniae*). *Acta Physiologica Sinica*, **61** (4): 373 - 378. (in Chinese)
- Zuri I, Terkel J. 1996. Locomotor patterns, territory, and tunnel utilization in the mole-rat *Spalax ehrenbergi*. *Journal of Zoology*, **240** (1): 123 - 140.
- 王茁. 2011. 地下鼠听觉机制研究的进展. 陕西教育学院学报, **27** (03): 71 - 76.
- 王晓君, 魏登邦, 魏莲, 齐新章, 朱世海, 饶鑫峰. 2008. 高原鼢鼠和高原鼠兔肺细叶结构特征. 动物学报, **54** (3): 531 - 539.
- 朱世海, 齐新章, 王晓君, 饶鑫峰, 魏莲, 魏登邦. 2009. 高原鼢鼠和高原鼠兔骨骼肌摄氧功能差异研究. 生理学报, **61** (4): 373 - 378.
- 朱瑞娟, 饶鑫峰, 魏登邦, 王多伟, 魏莲, 孙生祯. 2012. 高原鼢鼠和高原鼠兔肝脏苹果酸天冬氨酸穿梭系统的功能差异. 生理学报, **64** (2): 177 - 186.
- 齐新章, 王晓君, 朱世海, 饶鑫峰, 魏莲, 魏登邦. 2008. 高原鼢鼠和高原鼠兔心脏对低氧环境的适应. 生理学报, **60** (3): 348 - 354.
- 李金刚, 王廷正, 何建平, 闵一建. 2001. 甘肃鼢鼠的震动通讯. 兽类学报, **21** (2): 152 - 154.
- 郑亚宁, 朱瑞娟, 王多伟, 魏莲, 魏登邦. 2011. 高原鼢鼠血管内皮生长因子基因编码和 mRNA 的表达以及微血管密度: 与其它鼠类的比较. 生理学报, **63** (2): 155 - 163.
- 郭运凯, 谢鼎华, 杨新明. 2004. Prestin 基因敲除小鼠听力和毛细胞改变的相关性研究. 中华耳科学杂志, **2** (4): 245 - 249.
- 樊乃昌, 谷守勤. 1981. 中华鼢鼠 (*Myospalax fontanieri*) 的洞道结构. 兽类学报, **1** (1): 67 - 71.
- 樊乃昌, 景增春, 周文杨. 1990. 高原鼢鼠的侵占行为及防治的新途径. 兽类学报, **10** (2): 114 - 120.