

研究论文

高原鼯鼠、高原鼠兔和大鼠肺表面活性物质组成和含量的比较

李永晓^{1,2}, 徐波², 安志芳², 王志洁², 李吉梅², 高聪慧^{1,2}, 魏莲¹, 魏登邦^{1,2,*}

青海大学¹生态环境工程学院; ²省部共建三江源生态与高原农牧业国家重点实验室, 西宁 810016

摘要: 本研究通过分析肺表面活性物质(pulmonary surfactant, PS)组成和含量探讨高原鼯鼠(*Myospalax baileyi*)和高原鼠兔(*Ochotona curzoniae*)的低氧适应机制。高原鼯鼠和高原鼠兔各36只, 捕捉于海拔3 600 m左右的青海省海南州贵德县拉脊山地区, 36只Sprague-Dawley (SD)大鼠购自海拔1 500 m左右的兰州大学实验动物中心。所有动物麻醉后通过肺循环进行肺灌注, 充分洗净肺组织中的血液, 取出完整的肺组织灌注得到肺泡灌洗液。应用高效液相色谱法分析三种动物PS中磷脂的组成和含量; 应用G-250考马斯亮蓝法、聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)和质谱测序分析PS蛋白质的含量和种类; 应用溶氧电极测定了PS溶液中的溶氧量。结果表明: 高原鼯鼠、高原鼠兔和SD大鼠PS中, 总磷脂含量依次显著增加($P < 0.05$), 总蛋白含量依次显著减少($P < 0.05$); 三种动物PS中均含有亚油酰棕榈酰胆碱(linoleic palmitoylphosphatidylcholine, LPPC)、二棕榈酰磷脂酰胆碱(dipalmitoylphosphatidylcholine, DPPC)、磷脂酰甘油(phosphatidylglycerol, PG)、磷脂酰肌醇(phosphatidylinositol, PI)和磷脂酰丝氨酸(phosphatidylserine, PSe)等5种磷脂成分, 但其相对含量明显不同; 在高原鼯鼠、高原鼠兔和SD大鼠中, LPPC所占比例依次显著增加($P < 0.01$); 高原鼯鼠PS磷脂中, DPPC、PG和PI所占比例极显著高于高原鼠兔($P < 0.01$), 高原鼠兔与SD大鼠之间没有显著差异($P > 0.05$); 高原鼯鼠与高原鼠兔PS磷脂中, PSe所占比例没有显著差异($P > 0.05$), 但均极显著高于SD大鼠($P < 0.01$)。三种动物PS中均含有血清白蛋白(serum albumin, SA), 高原鼯鼠和高原鼠兔PS中含有血红蛋白 β 亚基构成的含血红素的同源四聚体蛋白, 高原鼯鼠和SD大鼠PS中含有免疫球蛋白(immunoglobulin, Ig)重链残基, 高原鼠兔Ig重链残基含量极显著高于SD大鼠($P < 0.01$), 含血红素蛋白含量显著高于高原鼠兔($P < 0.05$)。高原鼯鼠、高原鼠兔和SD大鼠PS溶液中溶氧量依次显著减小($P < 0.01$), 但均显著高于生理盐水($P < 0.01$)。以上结果提示, 高原鼯鼠和高原鼠兔PS中总蛋白含量显著增加, 总磷脂含量显著减少, 蛋白成分中含有高含量的含血红素同源四聚体蛋白, 且高原鼯鼠主要磷脂成分DPPC的相对含量显著增加, 这种PS成分和含量的变化增强了这两种高原动物对低氧环境的适应性。

关键词: 高原鼯鼠; 高原鼠兔; 肺表面活性物质; 磷脂; 蛋白

中图分类号: Q955

Comparison of the composition and content of pulmonary surfactant among plateau zokors, plateau pikas and rats

LI Yong-Xiao^{1,2}, XU Bo², AN Zhi-Fang², WANG Zhi-Jie², LI Ji-Mei², GAO Cong-Hui^{1,2}, WEI Lian¹, WEI Deng-Bang^{1,2,*}

¹College of Ecological Environment Engineering; ²The Co-constructing State Key Laboratory of Three Rivers Sources Ecology and Plateau Agriculture and Animal Husbandry, Qinghai University, Xining 810016, China

Abstract: In the present study, the composition and content of pulmonary surfactant (PS) were analyzed to explore the hypoxia adaptation mechanism in plateau zokors (*Myospalax baileyi*) and plateau pikas (*Ochotona curzoniae*). 36 plateau zokors and plateau pikas were trapped alive at the Laji Mountain in Guide County, Qinghai Province (at the altitude of about 3 600 m), and 36 Sprague-Dawley (SD) rats were purchased from the experimental animal center of Lanzhou University (at the altitude of about 1 500 m). All animals were lavaged after laboratory anesthesia, the blood in lung tissues was fully washed out and the lung tissues were then taken out to obtain the bronchoalveolar lavage fluid by bronchoalveolar lavage. The composition and content of phospholipids in the PS of three

Received 2020-04-13 Accepted 2020-08-28

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 31860606) and the Second Tibetan Plateau Scientific Expedition and Research Program (STEP) (No. 2019QZKK0501).

*Corresponding author. E-mail: weidengbang@163.com

different kinds of animals were analyzed by using high performance liquid chromatography; the protein composition, content and types in the PS were analyzed by G-250 Coomassie brilliant blue method, polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and mass spectrometry; the dissolved oxygen in the PS solutions were determined by using dissolved oxygen electrode. The results showed that the total contents of phospholipids in the PS were successively increased among plateau zokors, plateau pikas and SD rats ($P < 0.05$), while the total content of proteins successively decreased ($P < 0.05$). There were five phospholipids identified in the PS, including linoleic palmitoylphosphatidylcholine (LPPC), dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC), phosphatidylglycerol (PG), phosphatidylinositol (PI) and phosphatidylserine (PSe), but the relative contents of these phospholipids were different. The relative content of LPPC was successively increased among plateau zokors, plateau pikas and SD rats ($P < 0.01$). The relative contents of DPPC, PG and PI in the PS of plateau zokors were significantly higher than those of plateau pikas ($P < 0.01$), while insignificant differences between plateau pikas and SD rats ($P > 0.05$). The relative content of PSe had no significant differences between plateau zokors and plateau pikas ($P > 0.05$), but both were significantly higher than that of SD rats ($P < 0.01$). The serum albumin (SA) was identified in the PS of three kinds of animals, including homologous tetramer protein containing heme, which is composed of hemoglobin β subunit, in plateau zokors and plateau pikas. Immunoglobulin (Ig) heavy chain was found in PS of plateau zokors and SD rats. The content of Ig heavy chain in plateau zokor was significantly higher than that in SD rats ($P < 0.01$), and the content of protein containing heme was significantly higher than that in plateau pikas ($P < 0.05$). The amount of dissolved oxygen was successively decreased in the PS among plateau zokors, plateau pikas and SD rats ($P < 0.01$), but it was significantly higher than that in saline ($P < 0.01$). These results suggest that the total content of proteins in the PS of plateau zokors and plateau pikas was significantly higher, while the total content of phospholipids was significantly decreased. There were high content of homologous tetramer protein containing heme in the PS of plateau zokors and plateau pikas. The relative content of DPPC, the main component of phospholipids, was significantly increased in plateau zokors. The changes of PS component and content improve the adaptability of the two plateau animals in hypoxia environment.

Key words: plateau zokor; plateau pika; pulmonary surfactant; phospholipid; protein

高原鼯鼠 (*Myospalax baileyi*) 和高原鼠兔 (*Ochotona curzoniae*) 是青藏高原特有的小型哺乳动物。高原鼯鼠终生生活在完全封闭的地下洞道中, 栖息地海拔在 2 800~4 200 m, 洞道中平均含氧量比同地区大气低 20% 左右^[1]。高原鼠兔生活在地面和开放洞道中, 栖息地海拔在 3 000~5 000 m^[2, 3]。两种高原动物生境严重缺氧, 如何从低氧环境中有效地获取氧气是其生存所面临的挑战。血液是氧气运输的载体, 高原鼯鼠和高原鼠兔血液中红细胞体积小而数目多、红细胞压积小、血液黏度低、血红蛋白浓度高、动脉血氧分压和血氧饱和度、血氧利用率高, 说明这两种高原动物能够从低氧环境中有效获取氧气^[4-6]。通过长期适应, 这两种高原动物的肺组织产生了从低氧环境中有效获取氧的一系列生理学策略, 如高原鼯鼠和高原鼠兔肺/体重比大、单位面积肺泡小而数目多、微血管密度高、气血屏障薄, 说明这两种高原动物通过增加肺气体扩散容量、气体交换面积和气血屏障通透性, 加强了肺部气体交换能力^[7, 8]。

肺表面活性物质 (pulmonary surfactant, PS) 主要是肺泡 II 型上皮细胞合成并分泌到肺泡表面的物质^[9]。哺乳动物 PS 中约 90% 为脂类, 10% 为蛋白质, 其中脂类的 80%~85% 为磷脂, 5%~10% 为中性脂

肪和无机盐^[10]。磷脂酰胆碱 (phosphatidylcholine, PC) 为 PS 磷脂主要成分, 并在哺乳动物之间具有高度保守性^[11], PC 的分子结构中, 由于磷酸胆碱所连接的第 3 和第 2 碳位置的不同, 分别产生了 α 和 β 两种异构体, α 碳位上连接饱和脂肪酸, 而 β 碳位上通常连接亚油酸、亚麻酸、花生四烯酸等不饱和脂肪酸^[12]。在 PS 磷脂中, 二棕榈酰磷脂酰胆碱 (dipalmitoylphosphatidylcholine, DPPC) 为 PC 中的饱和成分, 此外还有磷脂酰甘油 (phosphatidylglycerol, PG)、磷脂酰肌醇 (phosphatidylinositol, PI)、磷脂酰丝氨酸 (phosphatidylserine, PSe) 等成分^[13]。目前已发现的肺表面活性物质蛋白 (surfactant associated protein, SP) 主要为 SP-A、SP-B、SP-C 和 SP-D^[14], 其中 SP-A 和 SP-D 为亲水性蛋白, SP-B 和 SP-C 为疏水性蛋白, SP-A 含量最多, 约占 SP 总量的 50%^[15]。

PS 具有降低肺泡表面张力、防止肺水肿和参与呼吸系统局部防御等功能, 有助于肺泡的气体交换^[16]。肺部气体交换功能的维持, 不仅与肺组织气体交换的总面积大小有关, 而且与 PS 的组成和含量密切相关。已有研究表明, 高原低氧环境会产生肺水肿等疾病^[17], 肺水肿会导致患者支气管肺泡灌洗液中总磷脂、PC 和 PG 显著减少^[18], 导致 PS 的活性降低, 影响肺部气体交换。在低氧条件下, 平

原 Wistar 大鼠的 PS 中总磷脂、PG、PC 和 DPPC 含量均显著低于世代生活在高原低氧环境中的高原鼠兔^[9]。因此, 本文在此研究基础上, 以平原 Sprague-Dawley (SD) 大鼠为对照, 通过分析高原鼯鼠和高原鼠兔 PS 的组分和含量特征, 进一步探讨它们适应高原低氧环境的生理机制, 并为 PS 制剂的研发提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验动物 高原鼯鼠和高原鼠兔各 36 只, 不分雌雄, 捕捉于青海省海南州贵德县拉脊山地区(北纬 36°72', 东经 101°28', 海拔 3 600 m 左右), 采样点大气氧分压为 13.59 kPa, 含氧量为 193.10 g/m³。高原鼯鼠体重为 200~250 g, 高原鼠兔体重为 150~200 g。同等数量的 SD 大鼠购于兰州大学实验动物中心(北纬 36°02', 东经 103°51', 海拔 1 500 m 左右), 不分雌雄, 当地大气氧分压为 17.73 kPa, 含氧量为 250 g/m³, SD 大鼠体重为 200~250 g。动物处理措施均按照国家《实验动物管理条例(GB14923-2010)》执行, 并获得青海大学动物伦理委员会批准。三种动物均不在实验室进行饲养, 采样返回当天立即在实验室进行动物实验。

1.2 PS 的制备 高原鼯鼠、高原鼠兔和 SD 大鼠用 5% 戊巴比妥钠麻醉, 用连接输液袋的灌注针(输液袋中注入生理盐水)刺入右心室, 经右心室插入至肺动脉进行肺灌注, 充分洗净肺组织血液, 待肺组织变为白色后取完整的肺组织, 滤纸吸干肺表面水分后称重, 按照每克肺 2 mL 的标准从支气管分 3 次缓慢注入 37 °C 生理盐水, 充分灌注肺泡后抽出灌洗液。收集三种动物的肺灌洗液后, 每 6 只动物的肺灌洗液合并, 在 4 °C, 10 000 r/min 的条件下离心 10 min, 取上清液置于 -50 °C 真空冷冻干燥(GLZY-0.5B, 上海浦东冷冻干燥设备有限公司), 将冻干粉置于 -20 °C 冻存。

1.3 PS 中脂质成分的提取 将高原鼯鼠、高原鼠兔和 SD 大鼠的 PS 冻干粉用去离子水配制成浓度为 0.05 g/mL 的 PS 溶液, 向三种 PS 溶液中分别加入等体积的氯仿-甲醇溶液(体积比 2:1), 振荡混匀, 在 4 °C, 10 000 r/min 的条件下离心 10 min, 吸取氯仿相溶液于容量瓶, 用氯仿-甲醇溶液(体积比 2:1)定容, 置于 4 °C 保存。

1.4 高效液相色谱法磷脂分析方法的建立

1.4.1 标准品储备液的配制 称取 5.00 mg PG (纯

度 99%)、5.00 mg PI (纯度 99%)、5.00 mg PSe (纯度 98%)、5.20 mg DPPC (纯度 99%) 和 5.10 mg 亚油酰棕榈酰胆碱 (linoleic palmitoylphosphatidylcholine, LPPC) (纯度 99%) 标准品 (美国 Sigma 公司), 分别置于 10 mL 容量瓶中, 加入氯仿-甲醇溶液(体积比 2:1)溶解并定容, 所得溶液即为 PG、PI、PS、DPPC 和 LPPC 的磷脂标准品储备液, 浓度分别为 2.00、2.00、2.00、2.60 和 2.55 mg/mL。分别吸取 0.45、0.50、0.26、0.15 和 0.10 mL 上述储备液于 2 mL 容量瓶中, 用分析纯的氯仿-甲醇溶液(体积比 2:1)定容后作为混合标准溶液。将样品储备液和标准品储备液超声 5 min, 使用 0.45 μm 有机微孔滤膜过滤后, 将所得样品置于 4 °C 保存。

1.4.2 样品检测方法 应用 Agilent 1260 HPLC 高效液相色谱仪(上海安捷伦科技有限公司)检测高原鼯鼠、高原鼠兔和 SD 大鼠的 PS 磷脂。色谱柱为: Bio-Bond C4 5 μL 250 mm × 4.6 mm (北京迪科马科技有限公司), 色谱条件为: 流动相的正己烷(色谱纯)-乙醇(分析纯)-冰乙酸(分析纯)(体积比 96.8:3:0.2)等度洗脱, 流速 0.07 mL/min, 柱温 30 °C, 进样 15 μL。检测器为 Agilent 1260 ELSD 蒸发光散射检测器(上海安捷伦科技有限公司), 检测条件: 漂移管温度为 70 °C, 雾化气体流量为 2.50 L/min (氮气, 纯度 ≥ 99.5%), 检测信道为 A 信道, 撞击器为关闭模式。

1.4.3 精密度、重现性和稳定性实验 取 LPPC、DPPC、PG、PSe 和 PI 的磷脂混合标准品溶液分 6 次进样分析, 每次进样 15 μL, 计算各磷脂峰面积的相对标准偏差(relative standard deviation, RSD), 为日内精密度实验; 次日再取此溶液用相同方法进样分析, 将 12 次进样分析的峰面积合并计算, 为日间精密度实验。取同一样品溶液 6 份, 分别进样, 计算各磷脂成分的峰面积和保留时间的 RSD, 为重现性实验。取同一样品溶液 6 份, 在 0、2、4、6、8、10 和 12 h 分别进样, 测定各磷脂成分峰面积的 RSD, 为稳定性实验。

1.5 PS 总蛋白含量测定 利用 G-250 考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒(北京索莱宝科技有限公司)测定高原鼯鼠、高原鼠兔和 SD 大鼠 PS 溶液中总蛋白含量。

1.6 PS 蛋白分离和含量分析 将高原鼯鼠、高原鼠兔和 SD 大鼠 PS 冻干粉用去离子水配制成浓度为 0.05 g/mL 的 PS 溶液, 采用聚丙烯酰胺凝胶

(PAGE) 电泳分离 PS 蛋白。电泳条件参照 Wei 等人的实验条件进行^[20]，上样量为 10 μL 。电泳结束后取出胶板，将胶片置于室温下用考马斯亮蓝染色液染色 30 min，用甲醇 - 冰乙酸 - 水的脱色液 (体积比 4:5:1) 脱色 100 min。采用 BIO-RAD 凝胶成像系统拍照，利用 AlphaImager HP 软件对所拍照片中的电泳条带进行灰度值扫描，其灰度值作为蛋白含量进行分析。

1.7 PS 蛋白质谱分析和同源性比对 利用 PAGE 电泳分离高原鼫鼠、高原鼠兔和 SD 大鼠 PS 蛋白，在北京六合华大蛋白质研发中心有限公司进行蛋白质谱 Q-E 检测分析。采用蛋白质肽段重叠法，在 Ubuntu16.0 系统下利用 PeptideMass 程序拼接蛋白质谱检测的肽段序列^[21]。将拼接校正所得的

序列在 Uniprot 数据库中进行比对，分析确定蛋白种类。从 NCBI 公共数据库中检索并下载与本研究结果相同种类的大鼠 (*Rattus norvegicus*) 和小鼠 (*Mus musculus*) 的相应蛋白质氨基酸序列，利用 MEGA 7.0 软件、采用极大似然法对各物种的蛋白质氨基酸序列建树，并利用 DNAMAN 8.0 软件进行同源性比对。

1.8 PS 溶氧量测定 将高原鼫鼠、高原鼠兔和 SD 大鼠 PS 冻干粉用去离子水配制成浓度为 0.05 g/mL 的 PS 溶液。以生理盐水为对照组，用雷磁 JPB-607A 便携式溶氧仪 (DO-957 极谱型覆膜式溶解氧电极) 测定 PS 溶液的溶氧量，实验中用空气进行平衡，室温 25 $^{\circ}\text{C}$ ，环境压力 77.3 kPa，示数稳定后记录数据。

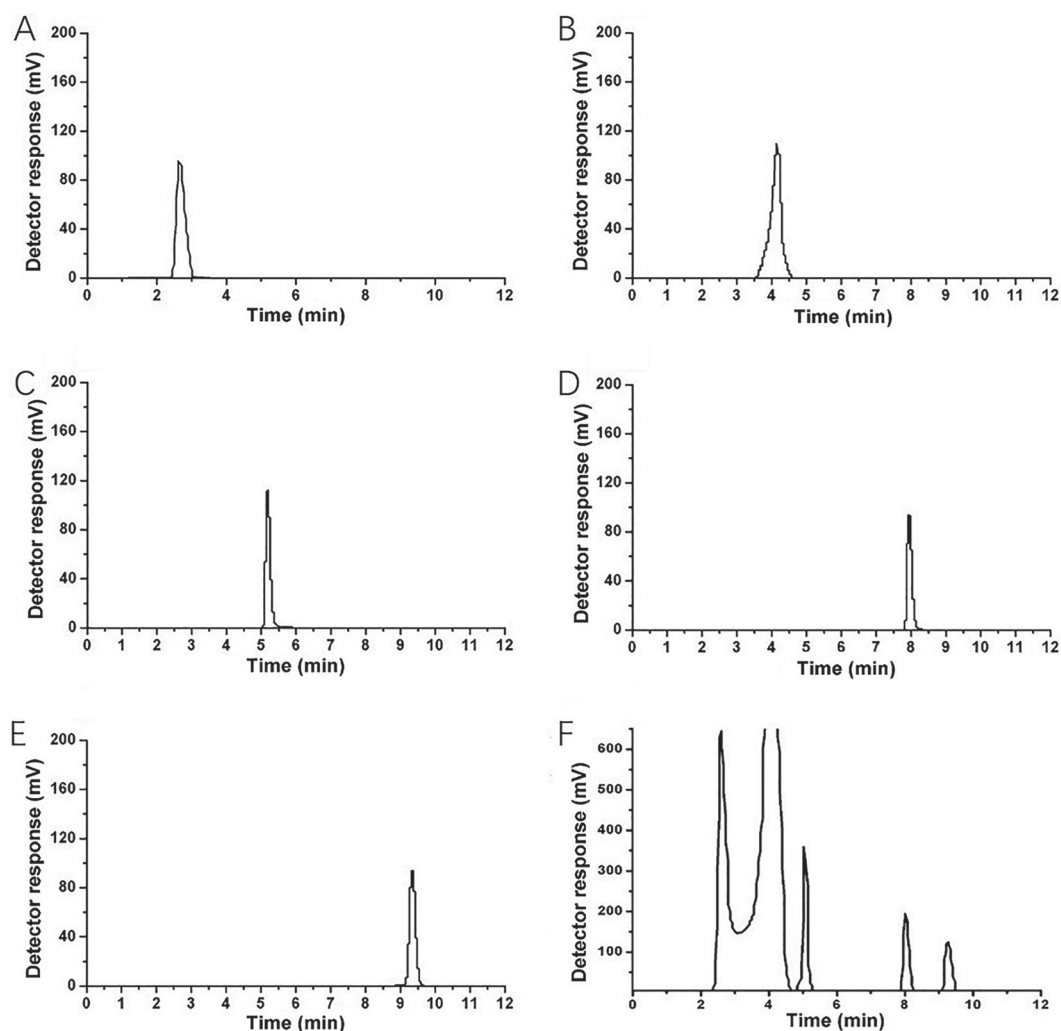


图 1. 肺表面活性物质磷脂标准品高效液相色谱图

Fig. 1. The high performance liquid chromatogram (HPLC) of pulmonary surfactant (PS) phospholipid standards. A, B, C, D and E are HPLC of single standard of LPPC, DPPC, PSe, PG and PI, respectively. F is HPLC of mixed standards.

1.9 统计学分析 采用 SPSS 24.0 软件进行数据处理，采用 Kolmogoro-Simironov 和 Levene 检验数据的正态性和方差齐性。数据符合正态分布并具有同质性，采用单因素方差分析 (one-way ANOVA) 和 Duncan's 多重比较，结果用 mean \pm SD 来表示， $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 高效液相色谱法建立磷脂的测定方法

在本实验选定的色谱条件下，5 种单一标准品峰型良好，混合标准品能实现基线分离。LPPC、DPPC、PSe、PG 和 PI 的出峰时间分别在 2.6 min、4.1 min、5.0 min、7.9 min 和 9.3 min (图 1)。标准品进样量与峰面积的相关系数 $R^2 > 0.99$ (表 1)，说

明各磷脂标准品在各自范围内的含量与峰面积线性关系良好。LPPC、DPPC、PSe、PG 和 PI 的日内精密密度 RSD 值分别为 0.39%、0.81%、0.21%、0.58% 和 0.44%；日间精密密度 RSD 值为 0.83%、1.24%、0.48%、0.76% 和 0.69%，说明该仪器分析的精密密度良好。单一标准品溶液 LPPC、DPPC、PSe、PG 和 PI 峰面积的 RSD 分别为 0.43%、1.08%、0.73%、0.37% 和 0.25%，保留时间的 RSD 分别为 0.12%、0.45%、0.16%、0.08% 和 0.86%，说明该方法重现性良好。在 0、2、4、6、8、10 和 12 h 分别进样测定，测得 LPPC、DPPC、PSe、PG 和 PI 峰面积的 RSD 分别为 0.88%、0.38%、0.23%、0.45% 和 0.62%，说明该方法稳定性良好。以上结果说明，建立的高效液相色谱分析方法具有稳定性和可重复性，误差小，

表 1. 五种磷脂峰面积与含量的线性回归方程

Table 1. Linear regression equation of peak area and content of five phospholipids

Phospholipids	Regression equations	R^2	Linear range (μg)
LPPC	$y = 8.049x - 25.642$	0.9966	2.55–63.75
DPPC	$y = 301.410x - 1155.200$	0.9994	26.00–65.00
PSe	$y = 31.305x - 226.580$	0.9917	2.00–20.00
PG	$y = 10.617x - 51.098$	0.9960	2.00–20.00
PI	$y = 10.807x - 45.885$	0.9973	2.00–20.00

LPPC, linoleic palmitoylphosphatidylcholine; DPPC, dipalmitoylphosphatidylcholine; PSe, phosphatidylserine; PG, phosphatidylglycerol; PI, phosphatidylinositol.

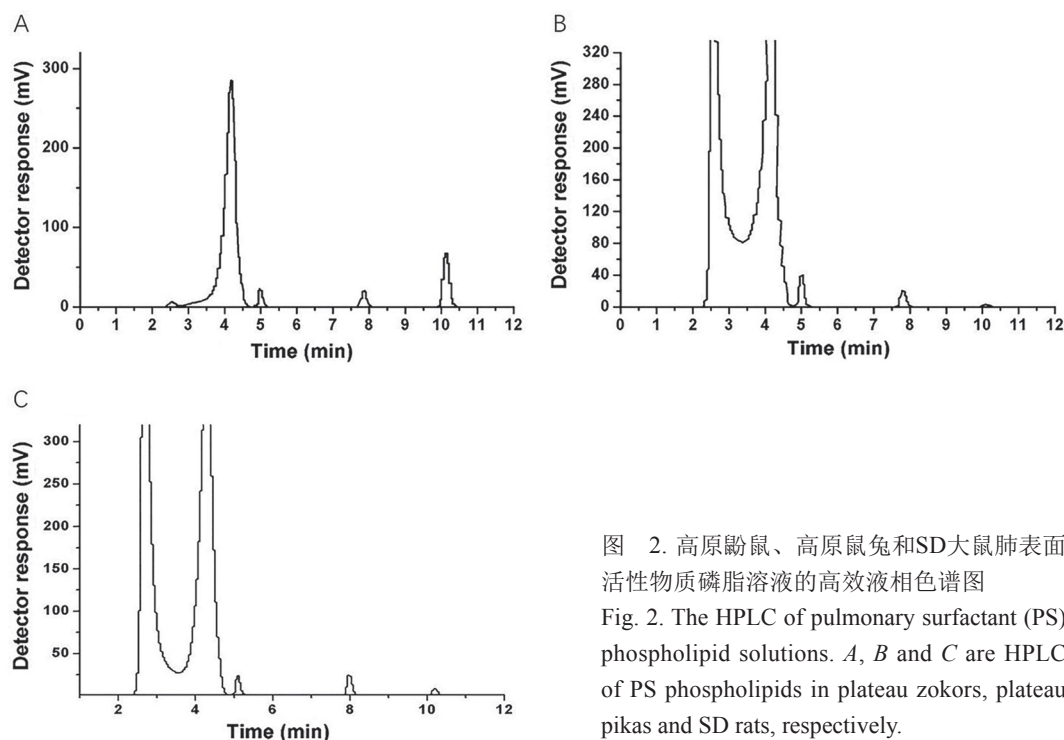


图 2. 高原鼯鼠、高原鼠兔和SD大鼠肺表面活性物质磷脂溶液的高效液相色谱图
Fig. 2. The HPLC of pulmonary surfactant (PS) phospholipid solutions. A, B and C are HPLC of PS phospholipids in plateau zokors, plateau pikas and SD rats, respectively.

灵敏度高, 可用于样品的测试。

2.2 三种动物PS中磷脂的含量

高原鼯鼠、高原鼠兔和SD大鼠PS中均含有LPPC、DPPC、PSe、PG和PI等5种磷脂成分(图2)。统计结果表明, 单位体积PS中, 高原鼯鼠总磷脂含量极显著低于高原鼠兔和SD大鼠($P < 0.01$), 高原鼠兔显著低于SD大鼠($P < 0.05$)(表2); 在三种动物总磷脂中, 各磷脂成分所占比例明显不同, 在高原鼯鼠、高原鼠兔和SD大鼠中, LPPC所占比例依次显著增加($P < 0.01$); 高原鼯鼠PS磷脂中, DPPC、PG和PI所占比例极显著高于高原鼠兔($P < 0.01$), 高原鼠兔与SD大鼠之间没有显著差异($P > 0.05$); 高原鼯鼠与高原鼠兔PS磷脂中, PSe所占比例没有显著差异($P > 0.05$), 但均极显著高于SD大鼠($P < 0.01$)(表3)。

2.3 三种动物PS蛋白组成、种类和含量

高原鼯鼠、高原鼠兔和SD大鼠PS中, 总蛋白含量依次显著减少($P < 0.05$), 分别为(12.64 ± 1.05) mg/mL、(10.78 ± 1.13) mg/mL 和 (4.38 ± 0.44) mg/mL (图3A)。PS蛋白的PAGE电泳显示, 高原鼯鼠

PS蛋白有3个条带(Band1、Band2和Band3), 高原鼠兔有2个条带(Band2和Band3), SD大鼠有2个条带(Band1和Band3)(图3B)。经质谱分析和同源性比对发现, 高原鼯鼠和SD大鼠的条带1蛋白分别含有125和143个氨基酸残基, 相似度为38.93%, 经Uniprot数据库比对, 这两种动物条带1蛋白为免疫球蛋白(immunoglobulin, Ig)重链残基; 高原鼯鼠和高原鼠兔的条带2蛋白均含有147个氨基酸残基, 相似度为68.71%, 分析发现该蛋白是由类似血红蛋白 β 亚基构成的同原四聚体血红素蛋白; 高原鼯鼠、高原鼠兔和SD大鼠的条带3蛋白分别含有606、608和608个氨基酸残基, 其中高原鼯鼠与高原鼠兔序列相似度为67.11%, 高原鼯鼠与SD大鼠序列相似度为85.20%, 高原鼠兔与SD大鼠序列相似度为64.80%, 经Uniprot数据库比对, 条带3蛋白为血清白蛋白(serum albumin, SA)(图4)。高原鼯鼠和SD大鼠PS中, Ig重链残基电泳条带灰度值分别为 84.94 ± 1.15 和 44.17 ± 2.03 , 高原鼯鼠Ig重链残基含量极显著高于SD大鼠($P < 0.01$), 高原鼠兔缺乏该蛋白; 高原鼯鼠和高原鼠兔PS中,

表2. 肺表面活性物质磷脂成分的含量

Table 2. The content of phospholipids in pulmonary surfactant ($\mu\text{g/mL}$)

Phospholipids	Species		
	Zokor	Pika	Rat
LPPC	2.23 ± 0.61	$43.28 \pm 4.17^{**}$	$74.52 \pm 5.83^{***\#}$
DPPC	30.80 ± 3.73	35.66 ± 1.67	34.51 ± 5.35
PSe	5.23 ± 0.69	$7.83 \pm 1.18^*$	$2.84 \pm 0.74^{***}$
PG	6.36 ± 1.04	6.48 ± 1.12	$9.54 \pm 0.32^{*\#}$
PI	7.71 ± 0.93	$2.24 \pm 0.16^{**}$	$1.65 \pm 0.20^{**}$
TPL	52.32 ± 7.00	$95.49 \pm 8.30^{**}$	$123.06 \pm 12.44^{***\#}$

Zokor, plateau zokor (*Myospalax baileyi*); Pika, plateau pika (*Ochotona curzoniae*); Rat, SD rat; LPPC, linoleic palmitoylphosphatidylcholine; DPPC, dipalmitoylphosphatidylcholine; PSe, phosphatidylserine; PG, phosphatidylglycerol; PI, phosphatidylinositol; TPL, total phospholipids. Mean \pm SD, $n = 6$. $^*P < 0.05$ vs Zokor, $^{**}P < 0.01$ vs Zokor, $^{\#}P < 0.05$ vs Pika, $^{***}P < 0.01$ vs Pika.

表3. 肺表面活性物质磷脂成分相对含量

Table 3. The relative content of phospholipids in pulmonary surfactant (%)

Phospholipids	Species		
	Zokor	Pika	Rat
LPPC	4.32 ± 1.18	$45.32 \pm 4.36^{**}$	$61.84 \pm 4.84^{***\#}$
DPPC	58.28 ± 7.22	$37.34 \pm 1.75^{**}$	$28.64 \pm 4.44^{**}$
PSe	10.14 ± 1.33	8.20 ± 1.23	$2.36 \pm 0.61^{***\#}$
PG	12.32 ± 2.02	$6.79 \pm 1.18^{**}$	$7.91 \pm 0.26^{**}$
PI	14.93 ± 1.80	$2.35 \pm 0.17^{**}$	$1.37 \pm 0.17^{**}$

Zokor, plateau zokor (*Myospalax baileyi*); Pika, plateau pika (*Ochotona curzoniae*); Rat, SD rat; LPPC, linoleic palmitoylphosphatidylcholine; DPPC, dipalmitoylphosphatidylcholine; PSe, phosphatidylserine; PG, phosphatidylglycerol; PI, phosphatidylinositol. Mean \pm SD, $n = 6$. $^{**}P < 0.01$ vs Zokor, $^{***}P < 0.01$ vs Pika.

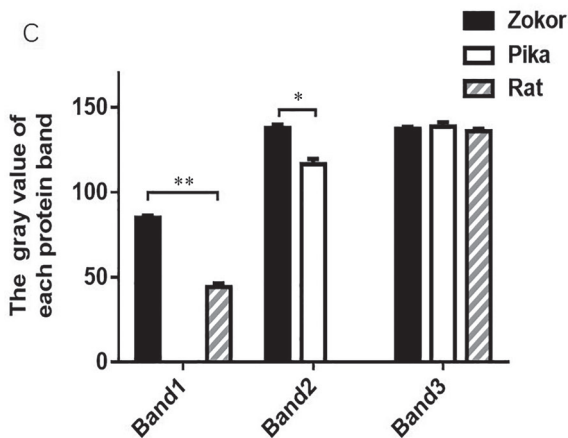
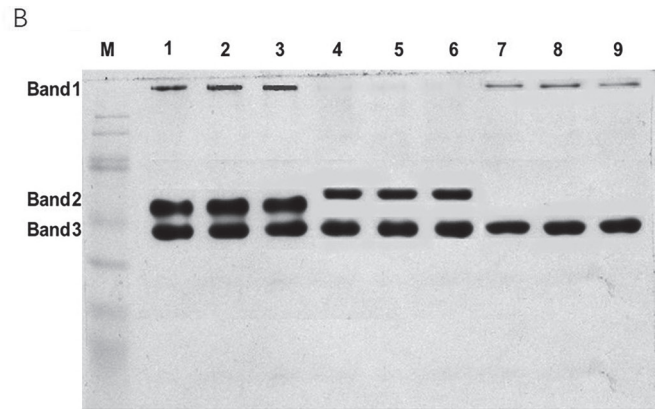
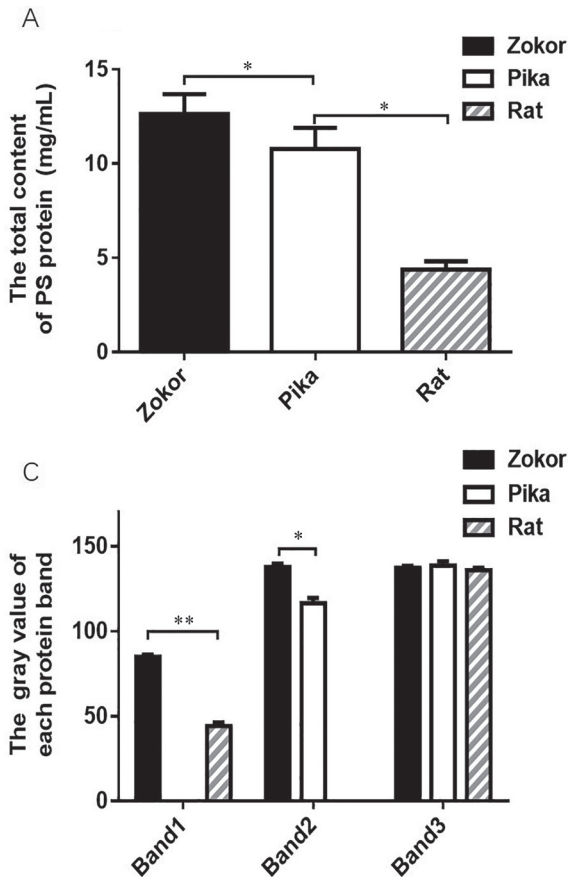


图 3. 高原鼯鼠、高原鼠兔和SD大鼠肺表面活性物质总蛋白和各条带蛋白含量

Fig. 3. The content of total protein and each protein band in the pulmonary surfactant (PS) of plateau zokors, plateau pikas and SD rats. A: The total content of PS protein. B: Polyacrylamide gel electrophoresis. M, protein marker; 1–3 lane, the PS protein of plateau zokors; 4–6 lane, the PS protein of plateau pikas; 7–9 lane, the PS protein of SD rats. C: The gray value of each protein band. Mean \pm SD, $n = 6$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

含血红蛋白电泳条带灰度值分别 137.75 ± 2.02 和 116.41 ± 3.12 ，高原鼯鼠含血红蛋白含量显著高于高原鼠兔 ($P < 0.05$)，SD 大鼠缺乏该蛋白；高原鼯鼠、高原鼠兔和 SD 大鼠 PS 中，SA 电泳条带灰度值分别为 137.16 ± 1.32 、 138.68 ± 2.42 和 135.99 ± 1.21 ，三种动物 SA 含量没有显著差异 (图 3C)。

从 NCBI 数据库中下载大鼠和小鼠的 Ig 重链残基、SA、SP-A、SP-B、SP-C 和 SP-D 的蛋白序列后，与高原鼯鼠、高原鼠兔和 SD 大鼠的 PS 蛋白序列进行同源性比对并构建进化树。进化分析显示，高原鼯鼠、高原鼠兔和 SD 大鼠 PS 蛋白与大鼠和小鼠的 SP-A、SP-B、SP-C 和 SP-D 蛋白序列同源性均低于 14%，但是高原鼯鼠的条带 1 蛋白与小鼠的 Ig 重链残基蛋白序列的同源性为 84.00%，SD 大鼠的条带 1 蛋白与大鼠的 Ig 重链残基蛋白序列的同源性为 97.20%；高原鼯鼠的条带 3 蛋白与大鼠和小鼠的 SA 蛋白序列的同源性分别为 83.72% 和 84.34%，高原鼠兔的条带 3 蛋白与大鼠和小鼠的 SA 蛋白序列的同源性分别为 63.38% 和 63.32%，SD 大鼠的条带 3 蛋白与大鼠和小鼠的 SA 蛋白序列的同源性分别为 98.03% 和 89.80%。说明高原鼯鼠、

高原鼠兔和 SD 大鼠的 PS 蛋白种类并不是 SP-A、SP-B、SP-C 和 SP-D，而是 Ig 重链残基和 SA (图 5)。

2.4 PS溶氧量测定

高原鼯鼠、高原鼠兔、SD 大鼠的 0.05 g/mL PS 溶液和生理盐水溶氧量分别为 (7.05 ± 0.15) mg/L、 (6.30 ± 0.10) mg/L、 (5.75 ± 0.05) mg/L 和 (4.85 ± 0.05) mg/L。高原鼯鼠、高原鼠兔和 SD 大鼠 PS 溶液溶氧量均极显著高于生理盐水 ($P < 0.01$)，且高原鼯鼠和高原鼠兔 PS 溶液的溶氧量极显著高于 SD 大鼠 ($P < 0.01$) (图 6)。

3 讨论

PS 具有降低肺泡表面张力，增强肺组织免疫系统的防御功能，保证肺泡气体交换功能的作用^[22]。研究显示，家兔在模拟 4 800 m 高原低氧环境时，其肺灌洗液中总磷脂含量显著下降^[23]，Wistar 大鼠移居高原后，其肺灌洗液中总磷脂、PG、PC、DPPC 和总蛋白含量显著低于高原鼯鼠和高原鼠兔^[24]。呼吸窘迫综合征 (respiratory distress syndrome, RDS) 患者 PS 中总磷脂和总蛋白含量明显减少^[25, 26]，主要成分 DPPC 和 PG 相对含量明显下降^[27, 28]，同时

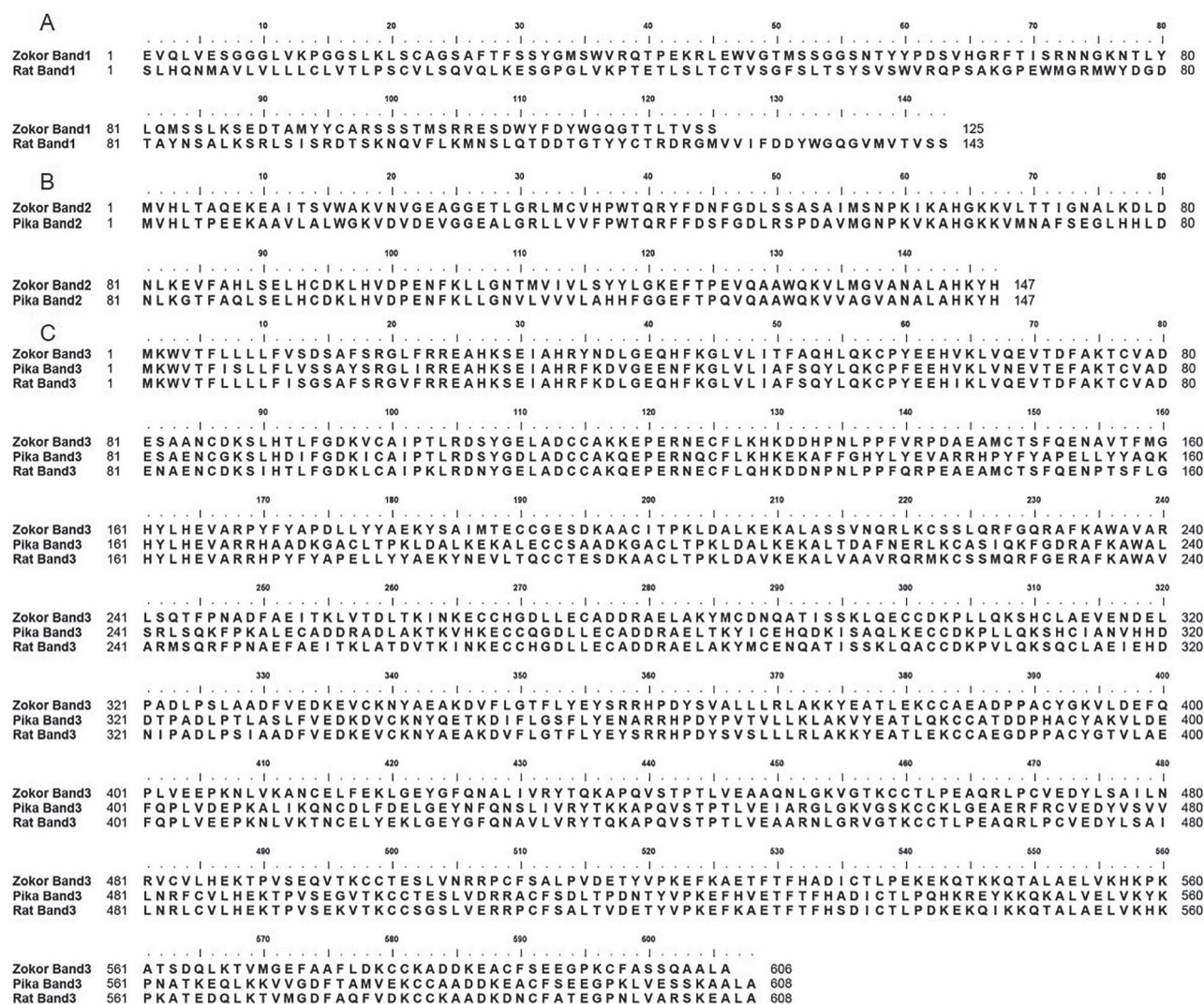


图 4. 高原鼢鼠、高原鼠兔和SD大鼠肺表面活性物质蛋白氨基酸序列

Fig. 4. Amino acid sequences of pulmonary surfactant proteins in plateau zokors, plateau pikas and SD rats. A, B and C are the amino acid sequences of band1, band2 and band3 proteins, respectively.

患者的动脉血氧饱和度显著下降，动脉血二氧化碳分压显著增高^[29]。应用外源性PS制剂治疗后，能弥补组织中PS的不足，明显改善肺的顺应性，增强气体交换功能^[30]，使患者PS中DPPC和PG相对含量显著增高，动脉血氧分压和动脉血氧饱和度显著增高，动脉血二氧化碳分压显著降低^[31, 32]。这些结果说明，PS中总蛋白和总磷脂含量下降，尤其是磷脂成分中DPPC和PG相对含量下降是肺泡气体交换功能减弱的重要因素。本研究结果显示，虽然高原鼢鼠和高原鼠兔PS中总磷脂含量显著减少，但总蛋白含量显著增加，且高原鼢鼠主要磷脂成分DPPC相对含量显著增加。高原鼢鼠和高原鼠兔是青藏高原典型的土著动物，栖息地大气氧分压和含氧量显著低于平原地区。由于高原鼢鼠生活在

完全封闭的地下隧道中，而高原鼠兔在地面生活，所以在同地区分布的高原鼢鼠生境中氧含量明显低于高原鼠兔生活的地面生境^[33]。但是，两种高原动物血氧利用率显著高于平原SD大鼠，且高原鼢鼠显著高于高原鼠兔^[5]，这不仅与两种高原动物肺泡气体交换总面积大有关，而且可能与它们PS中总蛋白以及主要磷脂成分DPPC相对含量的增加有关。

PS中的蛋白不仅与肺泡表面张力有关，而且具有免疫防御功能。研究显示，SA能维持血管内胶体渗透压，其含量的提高有利于PS的合成并改善肺部功能^[34]。Ig的化学结构与抗体分子相似且具有抗体活性，主要是两条相同的轻链和两条相同的重链由二硫键连接形成，具有良好的抗体活性，可与抗原相互结合，发挥细胞免疫效应^[35]。本研究结果

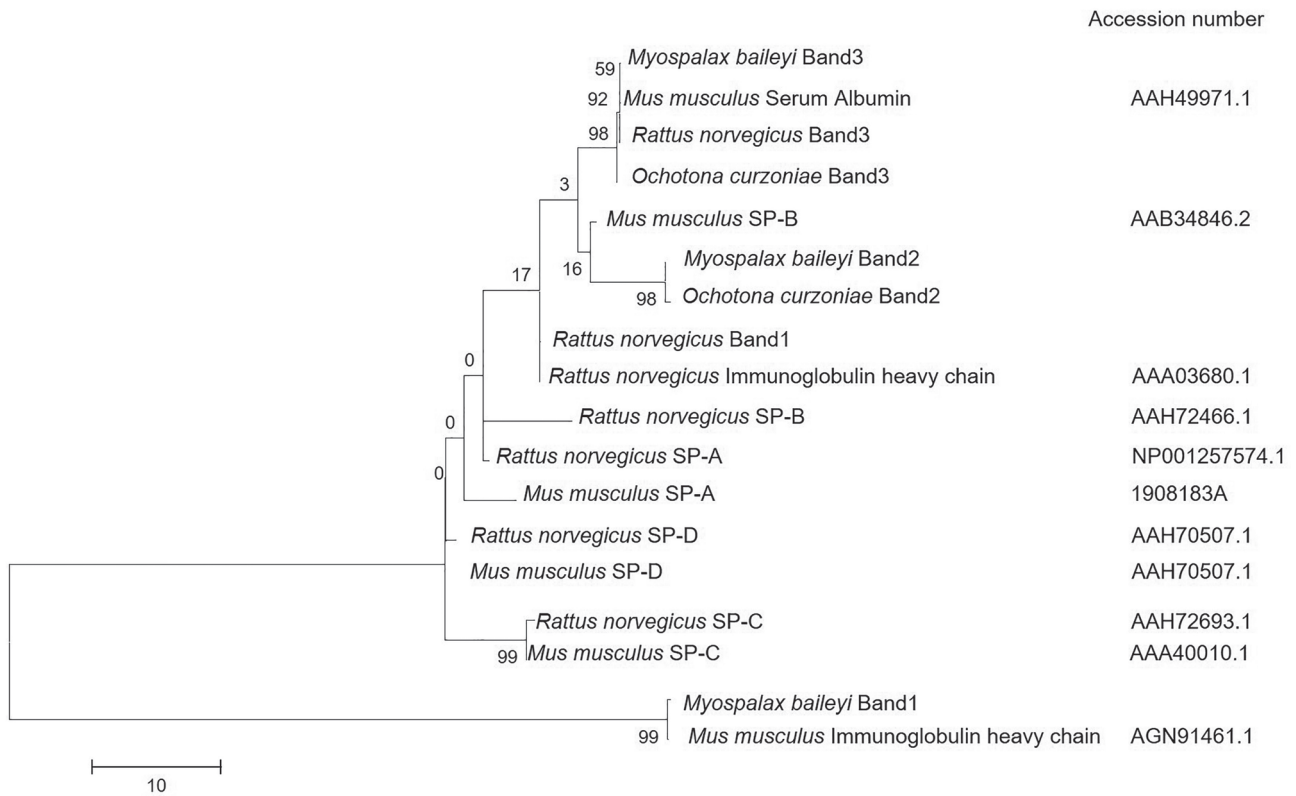


图 5. 高原麝鼠、高原鼠兔、SD大鼠肺表面活性物质蛋白和大鼠(*Rattus norvegicus*)以及小鼠(*Mus musculus*)蛋白序列的进化树
Fig. 5. Evolution tree of pulmonary surfactant protein sequences of plateau zokors, plateau pikas, SD rats, *Rattus norvegicus* and *Mus musculus*.

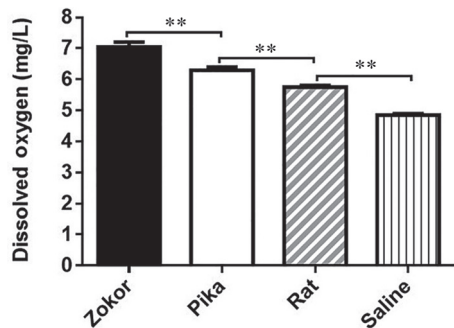


图 6. 高原麝鼠、高原鼠兔、SD大鼠肺表面活性物质溶液和生理盐水的溶氧量
Fig. 6. The dissolved oxygen content of pulmonary surfactant solutions in plateau zokors, plateau pikas, SD rats and saline. Mean \pm SD, $n = 6$. ** $P < 0.01$.

显示, 高原麝鼠 PS 中有 3 种蛋白分别为 Ig 重链残基、含血红素蛋白和 SA, 高原鼠兔 PS 中缺乏其中的 Ig 重链残基, SD 大鼠 PS 中缺乏其中的含血红素蛋白; 两种高原动物 PS 中总蛋白含量显著增加, 且出现了高含量的含血红素蛋白; 三种动物的 PS 蛋白成分中并没有发现 SP-A、SP-B、SP-C 和 SP-D 等 4 种

成分。本研究为了防止血液污染, 在获取三种动物 PS 之前, 对动物肺组织进行了充分灌洗, 完全洗净了肺部血管中的血液, 因此, PS 中的蛋白成分不可能是来自血液。可能由于动物种属和生境的不同, PS 蛋白成分组成和功能有所差异, 只有系统的比较研究才能阐明差异原因。

值得注意的是, 高原麝鼠和高原鼠兔 PS 蛋白成分中存在较高含量的含血红素蛋白, 我们对该蛋白的分子量、亚基组成、编码该亚基的基因起源、结构和进化、亚基组织特异性表达、低氧对该基因表达的调控和该蛋白的分泌过程进行了研究 (结果待发表)。结果表明, 该蛋白为单亚基组成的含血红素的同源四聚体蛋白, 在肺组织中特异性表达; 控制合成该蛋白的基因属于血红蛋白 β 亚基家族, 基因组成元件中含有肺组织特异性增强子和低氧反应元件, 低氧上调该基因的表达; 该蛋白在肺 II 型上皮细胞中合成, 经板层小体分泌至肺泡中成为 PS 组成成分。本研究组之前的研究表明, 高原麝鼠和高原鼠兔的动脉血氧分压和血氧利用率显著高于 SD 大鼠 [6]。本研究结果显示, 高原麝鼠、高原

鼠兔和 SD 大鼠相同浓度的 PS 溶液中溶氧量依次显著降低, 这与它们 PS 中含血红素蛋白的含量高低一致。同源四聚体血红蛋白虽然失去了异源四聚体血红蛋白具有的别构效应, 但是具有肌红蛋白一样氧结合和解离特征, 并且在二氧化碳作用下能够快速释放结合的氧气^[36]。高原鼯鼠和高原鼠兔 PS 中高含量的同源四聚体血红蛋白可能在吸气时储存氧, 在呼气时释放结合的氧进入血液中。因此, 我们猜想, 高原鼯鼠和高原鼠兔 PS 中高含量的同源四聚体血红蛋白使它们的肺具有类似鸟类肺的“双重呼吸”功能, 从而增强了从低氧环境中获取氧的能力。鸟类的肺不仅具有管状肺泡, 而且肺泡上连有气囊, 鸟类在吸气时, 一部分空气进入肺泡, 进行氧气和二氧化碳的交换, 另一部分吸入的空气不经过肺泡直接进入气囊, 这部分气体在呼气时才经过肺泡进行氧气和二氧化碳的交换。因此, 鸟类在吸气和呼气时均进行氧气和二氧化碳的交换, 从而增强了肺的气体交换能力, 满足飞行过程中对氧气的大量需求。

总而言之, 高原鼯鼠和高原鼠兔 PS 中总蛋白含量显著增加, 总磷脂含量显著减少, 蛋白成分中含有高含量的含血红素同源四聚体蛋白, 且高原鼯鼠主要磷脂成分 DPPC 相对含量显著增加, 这种 PS 成分和含量的变化增强了这两种高原动物对低氧环境的适应性。

* * *

致谢: 感谢西北高原生物研究所李玉林研究员、陈涛老师和李洪梅老师对本研究的支持和帮助。

参考文献

- 1 Zeng JX (曾缙祥), Wang ZW, Shi ZX. Metabolic characteristics and some physiological parameters of mole rat *Myospalax baileyi* in alpine area. *Acta Biol Plateau Sin* (高原生物学集刊) 1984; 3: 163–171 (in Chinese).
- 2 Shi YZ (施银柱), Fan NC. Rodent damage and its prevention on grassland. Qinghai People's Publishing House (青海人民出版社) 1980, 67–105 (in Chinese).
- 3 Feng ZJ (冯祚建), Zheng CL. Studies on the pikas (Genus: *Ochotona*) of China—Taxonomic notes and distribution. *Acta Theriol Sin* (兽类学报) 1985; 5(4): 269–290 (in Chinese).
- 4 Gu HP (顾浩平), Yang Z, Teng GQ, Liu JR, Long W, Ruan ZH. Determination of hemoglobin oxygen affinity P50 in plateau pika. *Chin J Appl Physiol* (中国应用生理学杂志) 1991; 7(4): 365–367 (in Chinese with English abstract).
- 5 Wang XJ (王晓君), Wei DB, Wei L, Zhang JM, Yu HY. Adaptation characteristics of erythrocytes to hypoxia in plateau zokor and plateau pika. *Sichuan J Zool* (四川动物) 2008; 27(6): 1100–1103 (in Chinese with English abstract).
- 6 Wei DB, Wei L, Zhang JM, Yu HY. Blood-gas properties of plateau zokor (*Myospalax baileyi*). *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2006; 145(3): 372–375.
- 7 Wang XJ (王晓君), Wei DB, Wei L, Qi XZ, Zhu SH, Rao XF. Structural characteristics of lung lobules of plateau zokor and plateau pika. *Acta Zool Sin* (动物学报) 2008; 54(3): 531–539 (in Chinese with English abstract).
- 8 Weibel ER, Knight BW. A morphometric study on the thickness of the pulmonary air-blood barrier. *J Cell Biol* 1964; 21(3): 367–384.
- 9 Creuwels LA, van Golde LM, Haagsman HP. The pulmonary surfactant system: biochemical and clinical aspects. *Lung* 1997; 175: 1–39.
- 10 Liu ZY (刘中洋), Yang Y, Qi RG, Wang XB. Research progress of pulmonary surfactant and its role in pulmonary infection. *Prog Mod Biomed* (现代生物医学进展) 2015; 15(2): 376–379 (in Chinese with English abstract).
- 11 Haagsman HP, Hogenkamp A, Eijk MV, Veldhuizen EJA. Surfactant collectins and innate immunity. *Neonatology* 2008; 93(4): 288–294.
- 12 Liu YF (刘元法), Wang XG. Composition and characteristics of soybean phospholipids. *Cereals Oils* (粮食与油脂) 2000; (3): 11–14 (in Chinese).
- 13 Chen C (陈超), Jin QL. Clinical application of pulmonary surfactant. *J Clin Pediatr* (临床儿科杂志) 1990; 8(1): 53–54 (in Chinese with English abstract).
- 14 Feng T (冯涛), Li SH. Surfactant binding protein. *Foreign Med (Mol Biol)* (国外医学分子生物学专刊) 1991; 13(2): 74–77 (in Chinese with English abstract).
- 15 Johansson J, Curstedt T, Robertson B. The proteins of the surfactant system. *Eur Respir J* 1994; 7(2): 372–391.
- 16 Lu DM (卢冬梅), Li NF, Yao XG. Research progress of airway distribution and function of pulmonary surfactant. *Chin Clin Res* (中国临床研究) 2016; 29(10): 1409–1413 (in Chinese with English abstract).
- 17 Li Q (李倩). Explore the molecular mechanism of high altitude disease. *Hubei J Anim Vet Sci* (湖北畜牧兽医) 2020; 41(3): 7–9 (in Chinese).
- 18 Jin QL (金勤立), Shi LM, Chen C, Wu JY, Sun JE, Zhu LW, Xu J, Shi BP, Cai DP. Pulmonary surfactant and combination of traditional Chinese and Western medicine to prevent experimental pulmonary edema and hemorrhage. *J Med Res* (医学研究通讯) 1998; 27(6): 16–17 (in Chinese).
- 19 Hu L (胡琳). Study on lipids in bronchoalveolar lavage fluid of plateau pika in different altitudes. *Chin J Med Res Appl*

- (中华医学研究与实践) 2004; 2(9): 1-2 (in Chinese).
- 20 Wei DB (魏登邦), Yu HY, Zhang JM, Wang XJ, Wei L. LDH activity and isozyme patterns of zokor in different seasons. *Chin J Appl Physiol (中国应用生理学杂志)* 2007; 23(3): 365-369 (in Chinese with English abstract).
- 21 Wilkins MR, Lindsog I, Gasteiger E, Bairoch A, Sanchez JC, Hochstrasser DF, Appel RD. Detailed peptide characterization using PEPTIDEMASS--a World Wide Web accessible tool. *Electrophoresis* 1997; 18(3-4): 403-408.
- 22 Wang Y (王璜), Yao XG, Li NF, Nu EGL. Research Progress on characteristics and function of pulmonary surfactant. *J Med Res (医学研究杂志)* 2019; 48(11): 180-183 (in Chinese).
- 23 Chen HY, Yin ZY, Lu YD. Effects of acute hypoxia on pulmonary surfactant in rabbits. *Chin J Appl Physiol (中国应用生理学杂志)* 1989; 5(3): 289-294 (in Chinese with English abstract).
- 24 Chen HY (陈华伟). Study on lung surfactants of plateau zokor and pika. *J High Alt Med (高原医学杂志)* 2004; 14(3): 10-12 (in Chinese).
- 25 Chen C (陈超), Jin QL, Shao XM, Shi MM, Sun JE, Wu JY. Changes of pulmonary surfactant in neonates with pulmonary hemorrhage. *Acta Acad Med Shanghai (上海医科大学学报)* 1991; 18(2): 141-144 (in Chinese).
- 26 Veldhuizen RA, Mccaig LA, Akino T, Lewis JF. Pulmonary surfactant subfractions in patients with the acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152(6): 1867-1871.
- 27 Gregory TJ, Longmore WJ, Moxley MA, Whitsett JA. Surfactant chemical composition and biophysical activity in acute respiratory distress syndrome. *J Clin Invest* 1992; 88(6): 1976-1981.
- 28 Song JZ (宋嘉振), Guo SX. Alveolar surface activity in patients with acute respiratory distress syndrome. *J Clin Anesthesiol (临床麻醉学杂志)* 2001; 17(1): 29-31 (in Chinese with English abstract).
- 29 Xu MF (徐毓芳). Observation on the effect and nursing experience of the treatment of neonatal respiratory distress syndrome with Hog Lung phospholipid injection. *Chin J Biochem Med (中国生化药物杂志)* 2017; 37(10): 1005-1678 (in Chinese with English abstract).
- 30 Zhang B (张波), Lu ZT. Research progress of the characteristics of endogenous surfactant-associated proteins. *J Trauma Surg (创伤外科杂志)* 2011; 13(5): 461-464 (in Chinese).
- 31 Zhao DH (赵丹虹), Wu ZH, Sun B. Mechanism of exogenous pulmonary surfactant in the treatment of acute lung injury caused by sepsis. *Chin Crit Care Med (中华危重病急救医学)* 1999; 11(2): 92-95 (in Chinese with English abstract).
- 32 Cao YH (曹延会), Fei DS, Zhao MY. The value of alveolar lavage surfactant in the treatment of acute respiratory distress syndrome. *Heilongjiang Med J (黑龙江医学)* 2010; 34(11): 804-807 (in Chinese with English abstract).
- 33 Qi XZ (齐新章), Wang XJ, Zhu SH, Rao XF, Wei L, Wei DB. Hypoxic adaptation of the hearts of plateau zokor (*Myospalax baileyi*) and plateau pika (*Ochotona curzoniae*). *Acta Physiol Sin (生理学报)* 2008; 60(3): 348-354 (in Chinese with English abstract).
- 34 Ye J (叶静). Relationship and prognosis analysis between serum albumin level and lung injury score in acute lung injury. *Mod J Integr Trad Chin West Med (现代中西医结合杂志)* 2007; 16(18): 2535-2536 (in Chinese).
- 35 Wang M (汪淼). Clinical value of detection of immunoglobulin IgM, IgG and IgA in children with mycoplasma pneumoniae infection. *Contemp Med (当代医学)* 2019; 25(34): 165-166 (in Chinese).
- 36 Benesch R, Benesch RE. Homos and heteros among the hemos. *Science* 1974; 185(4155): 905-908.