

研究论文

Research Article

## 藏猪 (*Sus scrofa*) II 型肺泡上皮细胞低氧应答关键时间点筛选

席彬鹏 杨雅楠 黄志强 牛瑞来 樊海 赵生国\*

甘肃农业大学动物科学技术学院, 兰州, 730070

\*通信作者, zhaosg@gsau.edu.cn

**摘要** 为探究藏猪 (*Sus scrofa*) II 型肺泡上皮细胞 (type II alveolar epithelial cells, AT II) 对低氧环境应答的关键时间点, 本研究在常氧 (21% O<sub>2</sub>) 和低氧 (2% O<sub>2</sub>) 水平下培养藏猪和长白猪的 AT II, 观察并分析不同时间点 (0~144 h) AT II 的三维构象特征, 内皮 PAS 结构域包含蛋白 (endothelial PAS domain protein 1, EPAS1) 和血红蛋白 β (hemoglobin beta locus, HBB) 基因的表达量, 以及细胞增殖率的变化, 寻找藏猪对低氧环境应答的关键时间点, 并使用流式细胞仪分析其凋亡率。结果表明, 成功分离到纯度达 90% 以上的藏猪 AT II, 低氧培养的藏猪 AT II 呈现明显的纤维化。0~36 h 时, 藏猪和长白猪 EPAS1 的表达量变化较为平缓, 在 48 h 时表达量变化显著 ( $P<0.05$ )。在低氧环境下, 与长白猪相比, 与长白猪相比, 藏猪 AT II 的 EPAS1 基因表达量更低, 此变化趋势一直延续至 96 h; HBB 基因在藏猪和长白猪 AT II 中的相对表达量随着时间的变化呈现先升高后降低的趋势, 在低氧环境下, 与长白猪相比, 藏猪 AT II 中更高; 在低氧 24~120 h 时, 藏猪 AT II 在 2% O<sub>2</sub> 培养下其细胞增殖率变化明显, 且在培养 120 h 时是高于其他组的; 48 h 低氧组 (藏猪 AT II 2% O<sub>2</sub> 培养, 长白猪 AT II 2% O<sub>2</sub> 培养) 的 AT II 晚期凋亡率均高于常氧组 (藏猪 AT II 21% O<sub>2</sub> 培养, 长白猪 AT II 21% O<sub>2</sub> 培养) 的。结果表明, 48 h 是藏猪 AT II 的低氧应答的关键时间点。

**关键词** 藏猪; 低氧适应; 肺脏; II 型肺泡上皮细胞

## Screening of Critical Time Points for Hypoxic Response of Type II Alveolar Epithelial Cells in Tibetan Pigs (*Sus scrofa*)

XI Binpeng YANG Yanan HUANG Zhiqiang NIU Ruilai FAN Hai ZHAO Shengguo\*

College of Animal Science and Technology, Gansu Agricultural University, Lanzhou, 730070

\* Corresponding author, zhaosg@gsau.edu.cn

DOI: 10.13417/j.gab.042.000736

**Abstract** To explore the critical time points of type II alveolar epithelial cells (AT II) in response to hypoxia in *Sus scrofa*, in this study, AT II of Tibetan pigs and Landrace pigs were cultured under normal oxygen (21% O<sub>2</sub>) and hypooxygen (2% O<sub>2</sub>) levels. The three-dimensional conformational characteristics of AT II, the change in the gene expression levels of EPAS1 (endothelial PAS domain protein 1) and HBB(hemoglobin beta locus), and the proliferation rate of AT II were observed and analyzed AT II at different time points (0~144 h). The key change points of Tibetan pigs' response to hypoxic environment were investigated and the apoptosis rate was analyzed by flow cytometry. Results showed that AT II of Tibetan pigs with purity of more than 90% was isolated successfully. AT II of Tibetan pigs cultured with low oxygen showed obvious fibrosis. The expression level of EPAS1 in Tibetan pigs and Landrace pigs changed gently at 0~36 h, and significantly at 48 h ( $P<0.05$ ). Compared to Landrace pigs, the expression level of EPAS1 gene in AT II of Tibetan pigs was lower in hypoxia environment, and the change trend continued until 96 h. Compared to Landrace pigs, the relative expression of HBB gene AT II in the two groups firstly increased and then decreased with the change of time, and AT II in Tibetan

基金项目: 本研究由国家自然科学基金(32060730)、甘肃农业大学青年导师扶持基金(GAU-QDFC-2018-03)和国家级大创计划项目(202010733015)共同资助。

引用格式: 席彬鹏, 杨雅楠, 黄志强, 等, 2023. 藏猪 (*Sus scrofa*) II 型肺泡上皮细胞低氧应答关键时间点筛选. 基因组学与应用生物学, 42(7): 736-743. [XI B P, YANG Y N, HUANG Z Q, et al., 2023. Screening of critical time points for hypoxic response of type II alveolar epithelial cells in Tibetan pigs (*Sus scrofa*). Genomics and Applied Biology, 42(7): 736-743.]

pigs was higher under hypoxia environment. At low oxygen levels of 24 h to 120 h, the cell proliferation rate of Tibetan pigs AT II cultured with 2% O<sub>2</sub> was significantly higher than that of other groups, and at 120 hours of cultivation, it was higher than other groups. The late apoptosis rate of AT II in 48 h hypoxia group (Tibetan pigs AT II cultured under 2% O<sub>2</sub>, Landrace pigs AT II cultured under 2% O<sub>2</sub>) was higher than that in normal oxygen group (Tibetan pigs AT II cultured under 21% O<sub>2</sub>, Landrace pigs AT II cultured under 21% O<sub>2</sub>). The results showed that 48 h was the key time point for hypoxia response of Tibetan pigs AT II.

**Keywords** Tibetan pigs; Hypoxia adaptation; Lung; Type II alveolar epithelial cells

缺氧可引发一系列应激反应,如影响正常细胞周期(Jeong et al., 2018)、代谢紊乱、组织和细胞膜损伤等(Gan et al., 2019; He et al., 2019)。高海拔、低气压和低氧分压严重影响青藏高原人类和其他动物的生存。经历自然选择,青藏高原的土著动物对这种极端环境具有良好的遗传适应性。藏猪(*Sus scrofa*)在长期适应性进化中形成了独特的高原低氧适应策略(Yang et al., 2022a; Yang et al., 2021)。肺泡作为气体交换的主要场所,其上皮细胞可最早感知肺泡内氧分压变化。肺泡上皮细胞主要由I型肺泡上皮细胞(type I alveolar cells, AT I)和Ⅱ型肺泡上皮细胞(type II alveolar cells, AT II)构成。低氧刺激下,AT I损伤后不能再生与修复;AT II可分泌表面活性物质来维持肺泡的稳态并降低其表面张力,同时通过有丝分裂产生子代AT II以维持自身的细胞群,也可进行细胞更新及损伤修复而分化为AT I(Cardoso and Whitsett, 2008)。因此,作为肺泡上皮的祖细胞,AT II对维持低氧环境下肺功能稳态至关重要(Matalon, 1991; Hoffman and Ingenito, 2012)。

高原低氧在土著动物的适应性形成过程中扮演着重要角色,它可能会修改基因转录,并可能不可逆地影响特定的动物表型。本研究通过建立低氧模型来评估藏猪AT II对低氧应答的关键时间点。相比于长白猪,藏猪的肺更发达,肺泡间隔更厚,血管网更密集(Yang et al., 2021)。高海拔猪(藏猪)的血红蛋白(hemoglobin)和平均红细胞血红蛋白浓度(mean corpuscular hemoglobin concentration, MCHC)均显著高于低海拔猪(长白猪)的(柏云心等, 2020)。藏猪和长白猪的RNA-seq分析表明,藏猪低氧相关信号通路可能形成一个复杂的级联反应,在缺氧条件下发生,以降低肺损伤的风险。

氧是细胞生存的必要条件之一,亦是维持细胞稳态的重要调控因子。低氧是肺损伤组织中重要的微环境特征之一,可刺激成纤维细胞生长因子(f-

broblast growth factor, FGF)等一系列基因表达上调,从而促进肺内皮细胞和平滑肌细胞的增殖、凋亡及分化,促使大量癌细胞增殖或炎症细胞释放,最终导致肺动脉高压(Sajib et al., 2018; Tirpe et al., 2019)。内皮PAS结构域包含蛋白(endothelial PAS domain protein 1, EPAS1),又称缺氧诱导因子(hypoxia-inducible factor 2α, HIF-2α),可促进间充质干细胞分化为AT II,进而修复低氧导致的肺损伤(马彩云, 2018)。血红蛋白β(hemoglobin beta locus, HBB)基因是缺氧诱导因子1(hypoxia-inducible factor 1, HIF-1)途径中的关键基因,缺氧时HBB基因表达量上调,可增加血液中血红蛋白,以保证血液和营养的运输(张博, 2016)。

目前,关于构建藏猪AT II低氧(2% O<sub>2</sub>)损伤模型的报道较少。本研究分别在常氧(21% O<sub>2</sub>)和低氧(2% O<sub>2</sub>)条件下培养藏猪和长白猪的AT II,探究低氧作用下不同时间的AT II形态功能及其在低氧环境下存活和凋亡的变化趋势,以期确定其在低氧环境下关键变化时间拐点,为从细胞学水平揭示藏猪AT II响应低氧胁迫的生物学机制研究奠定基础。

## 1 结果

### 1.1 低氧环境下培养藏猪AT II的形态学变化

分离出藏猪和长白猪AT II细胞后,对其进行碱性磷酸酶染色,并观察生长状态。结果表明,AT II呈立方形,经碱性磷酸酶染色后,膜边缘有较多蓝色反应,其余细胞不显色,说明分离的AT II纯度到达90%以上(图1A, 图1B)。在倒置显微镜下观察低氧和常氧条件下培养的藏猪和长白猪AT II形态,48 h时AT II贴壁生长良好,呈不规则的多边形,细胞密度高;相较于常氧下的细胞,低氧培养的AT II呈现明显的纤维化,细胞呈短梭形(图1C, 图1D)。6 d时,低氧培养的AT II密度较大,细胞纤维化更明显,细胞呈长梭形,漂浮细胞逐渐增多,培养液折光度逐渐变小(图1E, 图1F)。

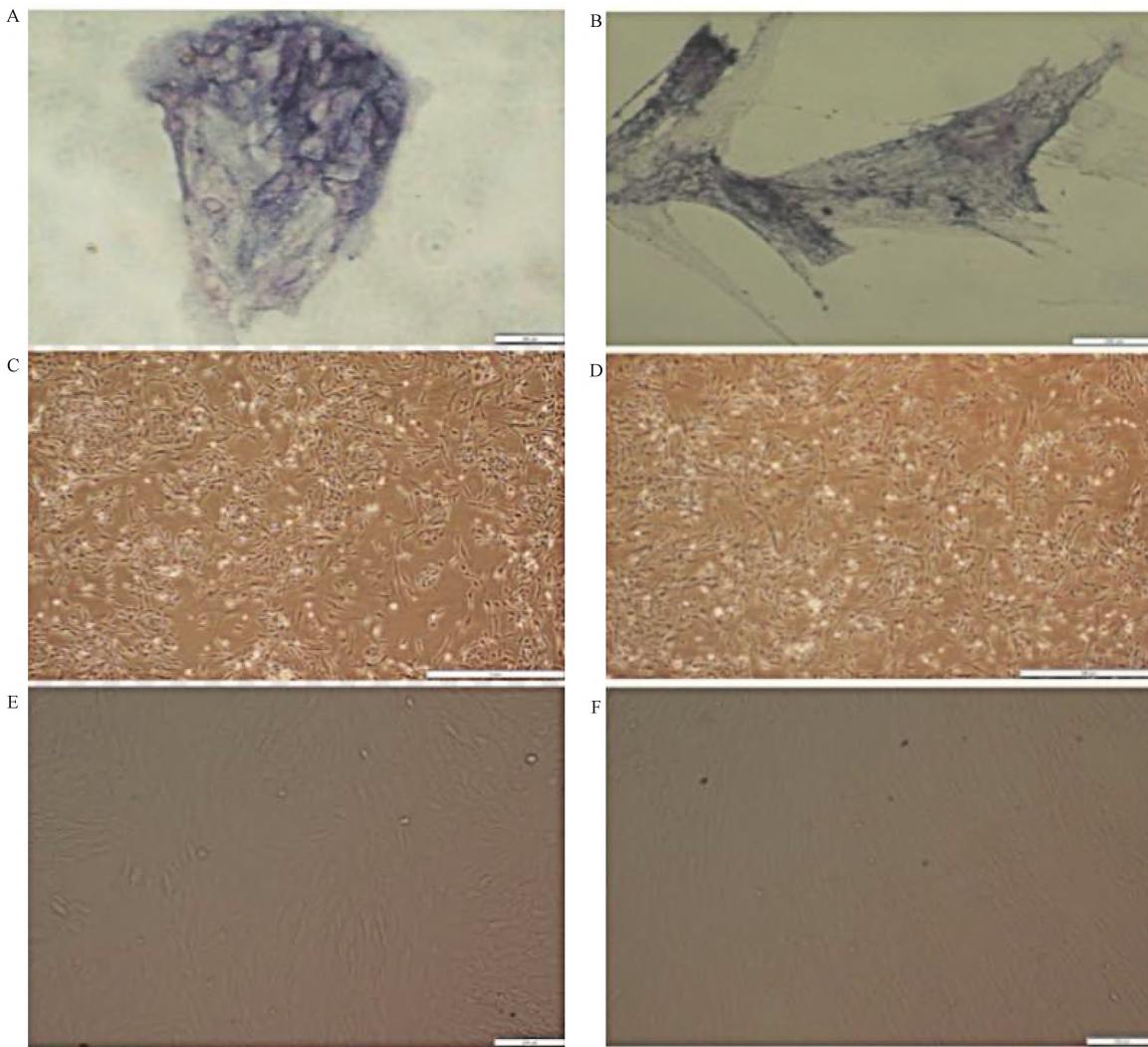


图 1 藏猪 AT II 的形态

(A) 碱性磷酸酶染色鉴定藏猪 AT II ; (B) 碱性磷酸酶染色鉴定长白猪 AT II ; (C) AT II 常氧(21% O<sub>2</sub>)培养 48 h; (D) AT II 低氧(2% O<sub>2</sub>)培养 48 h; (E) AT II 常氧(21% O<sub>2</sub>)培养 6 d; (F) AT II 低氧(2% O<sub>2</sub>)培养 6 d

Figure 1 Morphology of AT II in Tibetan pigs

(A) Alkaline phosphatase staining of AT II in Tibetan pig; (B) Alkaline phosphatase staining of AT II in Landrace pig; (C) AT II culture for 48 h under normal (21% O<sub>2</sub>) condition; (D) AT II culture for 48 h under hypoxia (2% O<sub>2</sub>) condition; (E) AT II culture for 6 d under normal (21% O<sub>2</sub>) condition; (F) AT II culture for 6 d under hypoxia (2% O<sub>2</sub>) condition

## 1.2 低氧环境下培养 AT II 中 EPAS1 和 HBB 的表达变化

*EPAS1* 基因在 AT II 中的表达量随着时间的变化逐渐升高。0~36 h 时, *EPAS1* 基因的表达量变化较为平缓; 在 48 h 时发生了显著的变化, *EPAS1* 基因的表达量在低氧环境下以长白猪的 AT II 中最高, 在低氧环境下以藏猪的 AT II 中最低, 此变化趋势一直延续至 96 h (图 2A)。

*HBB* 基因在 AT II 中的表达量随着时间的变化呈现先升高后降低的趋势。0~36 h 时 *HBB*

基因的表达量几乎没有变化; 在 48 h 时发生了显著的变化, 同时发现 *HBB* 基因的表达量在低氧环境下藏猪的 AT II 中最高, 在常氧培养条件下以长白猪的 AT II 中最低; 60 h 后 *HBB* 基因在 4 个组均呈现降低趋势 (图 2B)。低氧组 *HBB* 的表达量始终高于常氧组的。*HBB* 基因的表达量在低氧环境下以藏猪的 AT II 中最高, 在常氧环境下以长白猪的 AT II 中最低。在相同的环境下, *HBB* 基因在藏猪的表达量始终高于长白猪的。

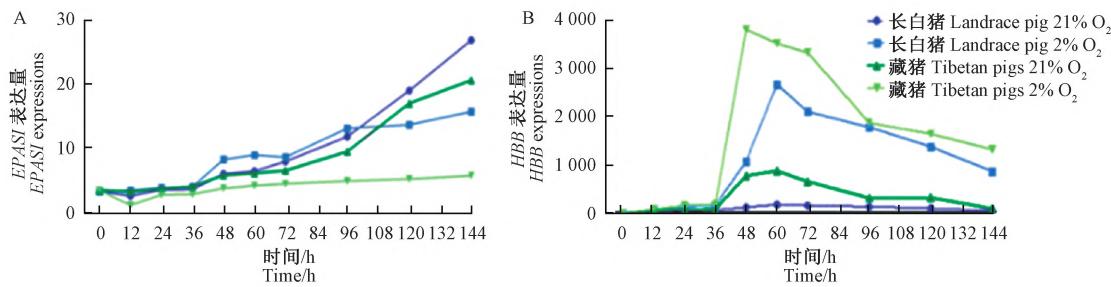


图 2 低氧对 AT II 的 EPAS1 和 HBB 表达量的影响

Figure 2 Effect of hypoxia on the expression levels of EPAS1 and HBB in AT II

### 1.3 低氧环境对藏猪 AT II 增殖的影响

采用 CCK-8 试剂盒检测细胞的增殖率, 结果显示, 0~8 h 时, AT II 的细胞增殖率几乎无明显变化; 12~24 h 时, 变化较平缓; 24~48 h 时, 呈现明显的升高趋势; 48~64 h 时, 细胞增殖率较平缓; 68 h 时, 呈现短暂降低后继续增高。与

2% O<sub>2</sub> 培养下长白猪 AT II 相比, 21% O<sub>2</sub> 培养下的藏猪 AT II、21% O<sub>2</sub> 培养下的长白猪 AT II 和 2% O<sub>2</sub> 培养下的藏猪 AT II 的存活率明显较高。在低氧条件下培养 24~120 h 时, 藏猪 AT II 的细胞增殖率变化明显, 且在培养 120 h 时是高于其他组的(图 3)。

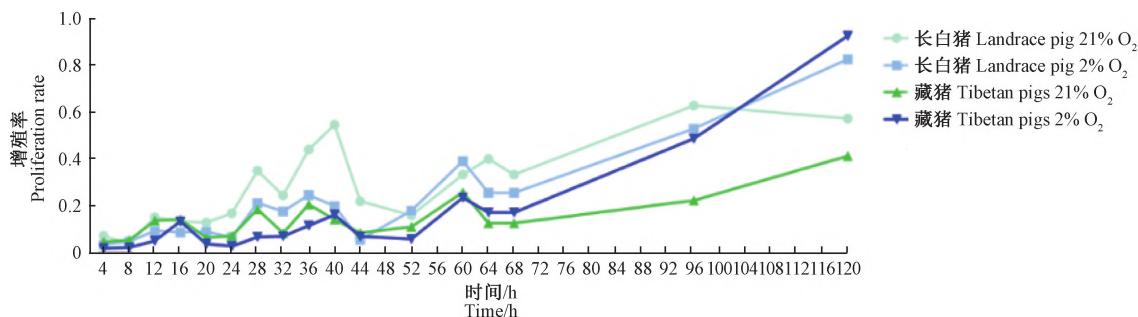


图 3 低氧下藏猪 AT II 的增殖率随时间的变化趋势

Figure 3 Change trend of proliferation rate in AT II of Tibetan pigs with time under hypoxia

### 1.4 低氧 48 h 对藏猪 AT II 凋亡率的影响

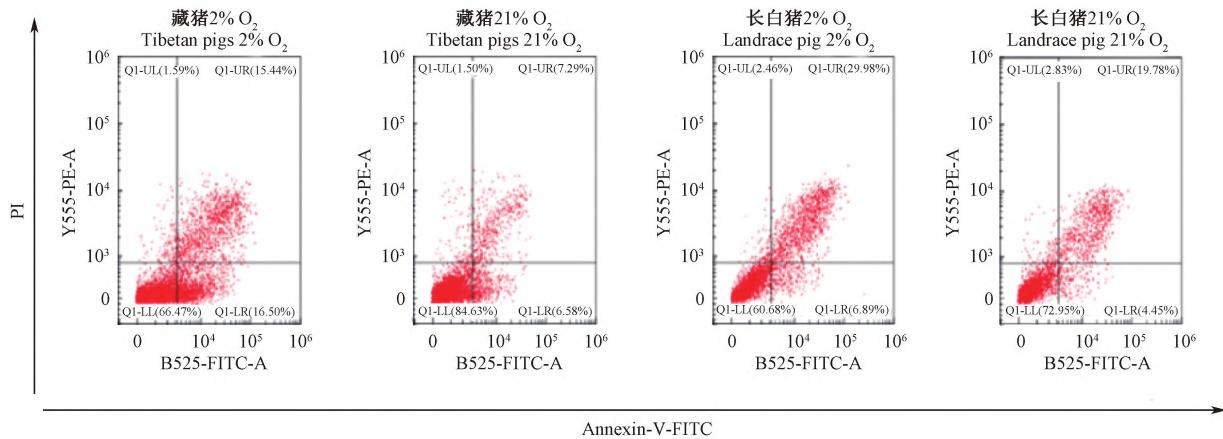
课题组前期研究发现, 与常氧组(藏猪 AT II 21% O<sub>2</sub> 培养, 长白猪 AT II 21% O<sub>2</sub> 培养)相比, 低氧组(藏猪 AT II 2% O<sub>2</sub> 培养, 长白猪 AT II 2% O<sub>2</sub> 培养)AT II 的晚期凋亡率、早期凋亡率、总凋亡率均

更高, 而其正常细胞数则更低(表 1)。4 组之间总凋亡率从低到高排序如下: 藏猪 AT II 21% O<sub>2</sub> 培养, 长白猪 AT II 21% O<sub>2</sub> 培养, 藏猪 AT II 2% O<sub>2</sub> 培养, 长白猪 AT II 2% O<sub>2</sub> 培养。正常活细胞数的排序则与之相反(图 4)(Yang et al., 2022b)。

表 1 低氧常氧处理下藏猪 AT II 的凋亡率

Table 1 Apoptosis rate of AT II of Tibetan pigs under hypoxia and normal oxygen treatment

分组 Groups	晚期凋亡率/% Late apoptosis rate/%	早期凋亡率/% Early apoptosis rate/%	总凋亡率/% Total rate of apoptosis/%	正常活细胞率/% Normal viable cell rate/%
长白猪 21% O <sub>2</sub> Landrace pig 21% O <sub>2</sub>	19.78	4.45	24.23	72.95
长白猪 2% O <sub>2</sub> Landrace pig 2% O <sub>2</sub>	29.98	6.89	36.87	60.68
藏猪 21% O <sub>2</sub> Tibetan pigs 21% O <sub>2</sub>	7.29	6.58	13.87	84.63
藏猪 2% O <sub>2</sub> Tibetan pigs 2% O <sub>2</sub>	15.40	16.50	31.90	66.47



Annexin-V-FITC 表示膜联蛋白-V 标记的异硫氰酸荧光素; PI 表示碘化丙啶。

Annexin-V-FITC represents fluorescence isothiocyanate labeled with annexin V; PI represents propidium iodide.

图 4 低氧和常氧处理下藏猪 AT II 的凋亡情况

Figure 4 Apoptosis of AT II in Tibetan pigs was detected under hypoxia and normal oxygen treatment

## 2 讨论与结论

细胞长期暴露在低氧水平下可导致细胞及其线粒体、生物膜损伤, 引起氧自由基增多而导致蛋白质、脂肪、DNA 氧化损伤, 进而触发细胞凋亡(Guo et al., 2019; Schito and Rey, 2018)。对于大多数细胞来说, 缺氧会导致细胞增殖下降。细胞数量的增加会导致氧需求量的增加, 从而加剧了缺氧应激(Hubbi and Semenza, 2015)。有研究表明, 低氧环境下刺激 HIF-2 $\alpha$  可直接上调心肌素(myocardin)的表达量, 进一步促进骨髓间充质干细胞向心肌样细胞分化(哈艳平等, 2021)。miR-21-5p 可调节 AT II 在高氧引起的急性肺损伤中的凋亡(张鑫, 2017)。军曹鱼(*Rachycentron canadum*)幼鱼在低氧环境生存 28 d 后, 其免疫功能可能被抑制, 易引发肠道炎症, 并且其感染病原菌的风险也升高(王维政等, 2021)。转基因小鼠过表达 FGF-10 基因可抑制 AT II 纤维化, 并促进上皮细胞再生, 最终维持肺泡上皮细胞的完整性(Dredge et al., 2003)。缺氧或高氧诱导的急性肺疾病或损伤包括肺纤维化、慢性阻塞性肺疾病和成人急性呼吸窘迫综合征, 氧化应激可能是导致 II型肺泡上皮细胞(AT II)凋亡的主要原因。本研究发现, 与常氧组相比, 低氧培养的藏猪和长白猪 AT II 形态均呈现明显的纤维化, 这是其对低氧环境的显著适应性特征之一。

内皮 PAS1 蛋白, 又称“缺氧诱导转录因子 2 $\alpha$  亚基(HIF-2 $\alpha$ )”, 作为低氧研究的明星因子, 最早被发现于内皮细胞中(Tian et al., 1997)。低氧条件下 PHD(plant homeodomain) 表达量减少, 使 HIF-2 $\alpha$

的氧依赖性降解域(oxygen-dependent degradation, ODD)区脯氨酸残基羟基化水平降低, 通过抑制 HIF-2 $\alpha$  的降解使其表达量提高。HIF-2 $\alpha$  和 HIF-1 $\alpha$  基因在序列和结构上具有高达 48% 的相似性, 且在下游调控区存在着一些共同和特异的靶基因(Hanaoka et al., 2012; Schönenberger et al., 2015; Yu et al., 2018)。有学者研究滇藏线连续海拔(800-1800-3300 m)猪种, 检测 EPAS1 基因编码区的遗传变异、mRNA 及其蛋白表达量, 发现 EPAS1 基因参与藏猪的低氧应答(易胜男等, 2020)。EPAS1 mRNA 在 AT II 中的相对表达量随着时间的变化逐渐升高, EPAS1 基因在低氧环境下藏猪的 AT II 中表达量最低, 此变化趋势一直延续至 96 h, 与藏族人的低氧应答趋势相同(Peng et al., 2017)。

HBB 参与疟疾通路, 可下调 HIF-1 途径中的关键基因 IL-6。HBB 作为一种重要的缺氧适应基因, 其编码蛋白也是机体内负责氧气运输的蛋白的主要成分, 这表明缺氧通过上调 HBB 转录而增加血液中的血红蛋白, 以保证血液和营养的运输(马彩云, 2018)。在缺氧适应过程中, 动物通过增加血红蛋白的浓度来改善氧气运输(Yang et al., 2021)。通过对藏猪和普通猪 HBB 表达的比较, 发现在  $\beta$  球蛋白第 58、75、119 和 137 位的氨基酸替换中, 第 137 位丙氨酸替换为缬氨酸提高了血红蛋白和 O<sub>2</sub> 的亲和力(张博, 2016)。因此, HBB 对藏猪和藏族人血红蛋白的调节作用相似, HBB 的遗传变异与藏族群体的血红蛋白水平和高原适应性有关。本研究结果表明, 低氧环境下 HBB 在藏猪和长白猪的 AT II 中表

达量低于常氧环境下的,且藏猪 ATII 中 *HBB* 表达量最低,在藏猪肝脏组织的 RNA-seq 中也得到类似结果,说明 *HBB* 的上调是藏猪 ATII 适应低氧环境的调控方式之一,且 48 h 为变化的关键时间点。

本研究中低氧组(藏猪 AT II 2% O<sub>2</sub> 培养、长白猪 AT II 2% O<sub>2</sub> 培养)的 AT II 增殖率较高,可能是低氧促进其增殖和抑制衰老。细胞凋亡又称细胞程序性死亡,是由一系列信号传递而启动,并由多基因调控及一系列酶参与的一个主动、高度有序的过程(Xu et al., 2019)。在本研究中,低氧组(藏猪 AT II 2% O<sub>2</sub> 培养、长白猪 AT II 2% O<sub>2</sub> 培养)AT II 的晚期凋亡率、早期凋亡率、总凋亡率均高于常氧组(藏猪 AT II 21% O<sub>2</sub> 培养、长白猪 AT II 21% O<sub>2</sub> 培养)的,可能是 AT II 对低氧环境的适应性变化。长白猪 AT II 2% O<sub>2</sub> 培养组的凋亡率高于藏猪 AT II 2% O<sub>2</sub> 培养组的,但增殖率低于藏猪 AT II 2% O<sub>2</sub> 培养组的,表明藏猪 AT II 2% O<sub>2</sub> 培养组比长白猪 AT II 2% O<sub>2</sub> 培养组能更好地适应低氧环境。

综上所述,在低氧环境下的藏猪 AT II 的 *EPAS1* 和 *HBB* 基因的表达量、增殖率随着时间的变化而变化,48 h 是其变化的关键时间点。

### 3 材料与方法

#### 3.1 实验材料

选取甘肃省兰州市榆中县某猪场 1 月龄左右的健康藏猪和长白猪公猪各一头,麻醉后无菌条件下屠宰收集肺组织。所有操作均按照中华人民共和国科学技术部制定的实验动物伦理学要求进行,并经甘肃农业大学批准(批准号:2006-398)。

#### 3.2 主要试剂

DMEM(dulbecco's modified eagle medium) 培养液、猪 IgG、胎牛血清、胰蛋白酶购自美国 Gibco 公司;T25 培养瓶购自美国康宁公司;碱性磷酸酶试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司;RT-qPCR 试剂盒购自湖南艾科瑞生物工程有限公司;Arical 流式细胞仪购自美国 BD 医疗器械有限公司;低温高速离心机购自美国 Sigma 化学公司;荧光倒置显微镜购自日本 Olympus 公司;二氧化碳培养箱购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司。

#### 3.3 AT II 的分离、纯化及鉴定

将修剪后的肝脏用含 1% 双抗的 PBS 清洗 3 次,剪成约 1 mm<sup>3</sup> 的小块后,继续在培养皿中剪碎至糊

状。加入 6 mL 胰酶于 37 ℃ 下消化 35 min,消化完成后加入等体积的完全培养基(90% DMEM 基本培养基和 10% 血清)终止消化,并使用 100 目细胞筛过筛。滤液 1 000 r/min 离心 5 min,用 3 mL 的 HBSS 缓冲液清洗 3 次后,1 000 r/min 离心 5 min。

向细胞培养瓶中加入 0.05% 猪 IgG 溶液 5 mL,在细胞培养箱中静置 3 h(避免接触 CO<sub>2</sub>),弃上清液并用 PBS 洗瓶 2 次,DMEM 铺瓶静置 10 min。弃去 DMEM,并加入分离后的细胞悬液,置于细胞培养箱中孵育 1 h。收集未黏附的细胞,1 000 r/min 离心 5 min,将细胞铺至细胞培养瓶。在 6 孔板中铺少量细胞,按照碱性磷酸酶染色试剂盒说明书进行染色操作,置于倒置显微镜下观察 AT II 的比例。

#### 3.4 AT II 低氧培养模型构建

将藏猪和长白猪 AT II 分别随机分为 2 组,即常氧对照组(21% O<sub>2</sub>)和低氧试验组(2% O<sub>2</sub>)。使用混合气的三气培养箱在常氧(74% N<sub>2</sub>、5% CO<sub>2</sub>、21% O<sub>2</sub>)和低氧(93% N<sub>2</sub>、5% CO<sub>2</sub>、2% O<sub>2</sub>)条件下培养细胞。

#### 3.5 实时定量 PCR 检测 *HIF-1* 和 *HBB* 基因表达

根据细胞的生长周期,选择培养 0、12、24、36、48、60、72、84、96、108、120、132、144 h 后收集样品,收样时先去除培养板中培养液,用 PBS 洗细胞 2 次,每孔加入 1 mL Trizol 溶液提取各组细胞总 RNA,并测定其浓度,按照试剂盒说明书合成 cDNA,引物序列见表 2,进行实时定量 PCR 反应。应用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 对目的基因表达进行相对定量。PCR 反应程序如下:95 ℃ 预变性 1 min,95 ℃ 变性 5 s,58 ℃ 退火 15 s,72 ℃ 延伸 30 s,共 40 个循环。

表 2 实时定量 PCR 引物序列

Table 2 Primer used for real time quantitative PCR

基因 Genes	引物序列(5'-3') Primer sequences (5'-3')	退火温度/℃ Annealing temperature/℃
<i>HIF-2α</i> F: 5'-TTGAAGATGAAATGAAGGCACAGA-3' R: 5'-ATGGTCGCACGGATGAGTAAA-3'		60
<i>HBB</i> F: 5'-CTCCTGGCAACGTGATAGT-3' R: 5'-GGTCAGAGGAAAAAGGGCTCCTCCT-3'		60
<i>β-actin</i> F: 5'-CAGTCGGTTGGATGGAGCAT-3' R: 5'-AGGCAGGGACTCCTGTAAC-3'		60

#### 3.6 CCK-8 法检测细胞存活率

各组细胞处理完成后,在避光条件下加入

CCK-8 溶液 10  $\mu\text{L}/\text{孔}$ (96 孔板), 培养箱中孵育 1 h。用酶标仪测定每组细胞在 450 nm 处的吸光度。

### 3.7 流式细胞术检测细胞凋亡率

胰酶消化后离心收集各组 AT II 及其上清, 加入 PBS 冲洗并回收 100  $\mu\text{L}$  浓度为  $1 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$  的细胞悬液。分别加入 5  $\mu\text{L}$  的膜联蛋白-V 标记的异硫氰酸荧光素(Annexin-V-FITC) 和 5  $\mu\text{L}$  的碘化丙啶(propidium iodide, PI) 避光孵育 15 min, 1 h 内采用流式细胞仪检测激发波长 488 nm 和发射波长 530 nm 处的荧光强度。

### 3.8 数据统计分析

所有指标均重复检测 3 次, 然后取其平均值。采用 SPSS 19.0 软件对数据进行统计学分析, 用 GraphPad Prism 8.0 软件进行绘图, 数据以“Mean  $\pm$  SD”表示。

## 作者贡献

席彬鹏是本研究的实验设计和实验研究的执行人; 席彬鹏、杨雅楠及黄志强完成数据分析和论文初稿的写作; 席彬鹏、牛瑞来及樊海参与实验设计和实验结果分析; 赵生国是项目的构思者及负责人, 指导实验设计、数据分析和论文写作与修改。全体作者都已阅读并同意最终的文本。

## 参考文献

- 柏云心, 杨天良, 蔡原, 等, 2020. 不同海拔猪种血液生理生化指标分析. 中兽医药杂志, 39(6): 13-17. [BAI Y X, YANG T L, CAI Y, et al., 2020. Analysis of the blood physiological and biochemical characteristics between pig breeds at different altitudes. Journal of Traditional Chinese Veterinary Medicine, 39(6): 13-17.]
- 哈艳平, 刘晓晓, 邵钟铭, 等, 2021. 低氧刺激通过 HIF-1 $\alpha$  直接调节 Myocardin 表达促进骨髓间充质干细胞向心肌样细胞分化. 临床与实验病理学杂志, 37(9): 1038-1043. [HA Y P, LIU X X, SHAO Z M, et al., 2021. Hypoxic stimulation directly regulates Myocardin expression through HIF-1 $\alpha$  and promotes the differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells into cardiomyocyte-like cells. Chinese Journal of Clinical and Experimental Pathology, 37(9): 1038-1043.]
- 马彩云, 2018. 间充质干细胞诱导分化为肺泡 II 型上皮细胞修复肺损伤研究, 博士学位论文. 北京: 中国农业科学院. [MA C Y, 2018. Study on the therapy of lung injury by type II alveolar epithelial cells induced from mesenchymal

stem cells, Dissertation for Ph.D. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences. ]

- 王维政, 杨林桐, 杨二军, 等, 2021. 低氧胁迫对军曹鱼幼鱼免疫相关基因转录水平表达的影响. 海洋学报, 43(9): 92-101. [WANG W Z, YANG L T, YANG E J, et al., 2021. Transcription level of immune related genes of juvenile cobia (*Rachycentron canadum*) under hypoxia stress. Haiyang Xuebao, 43(9): 92-101.]

- 易胜男, 孔小艳, 钱锦花, 等, 2020. 藏猪 EPAS1 基因低氧适应相关位点与表达量研究. 家畜生态学报, 41(6): 19-24. [YI S N, KONG X Y, QIAN J H, et al., 2020. Related loci and expression level of EPAS1 gene on hypoxia adaptation in Tibetan pigs. Journal of Domestic Animal Ecology, 41(6): 19-24.]

- 张博, 2016. 心肌组织多重表达组学鉴定藏猪高原适应基因及途径, 博士学位论文. 北京: 中国农业大学. [ZHANG B, 2016. Identification of genes and regulating pathways related to high-altitude adaptation through multiomics of myocardial tissue in Tibetan pigs, Dissertation for Ph.D. Beijing: China Agricultural University. ]

- 张鑫, 2017. miR-21-5p 经 PI3K/Akt 通路在  $\text{H}_2\text{O}_2$  诱导大鼠 AEC II 凋亡的研究, 硕士学位论文. 遵义: 遵义医学院. [ZHANG X, 2017. The study on miR-21-5p via the PI3K/akt pathway regulating AEC II apoptosis of rats induced by  $\text{H}_2\text{O}_2$ , Thesis for M.S. Zunyi: Zunyi Medcial College. ]

- CARDOSO W V, WHITSETT J A, 2008. Resident cellular components of the lung: Developmental aspects. Proc. Am. Thorac. Soc., 5(7): 767-771.

- DREDGE K, DALGLEISH A G, MARRIOTT J B, 2003. Thalidomide analogs as emerging anti-cancer drugs. Anticancer Drugs, 14(5): 331-335.

- GAN M L, SHEN L Y, FAN Y A, et al., 2019. High altitude adaptability and meat quality in Tibetan pigs: a reference for local pork processing and genetic improvement. Animals, 9(12): 1080.

- GUO Y, TAN J, MIAO Y Y, et al., 2019. Effects of microvesicles on cell apoptosis under hypoxia. Oxid. Med. Cell. Longev., 2019: 5972152.

- HANAOKA M, DROMA Y, BASNYAT B, et al., 2012. Genetic variants in EPAS1 contribute to adaptation to high-altitude hypoxia in Sherpas. PLoS ONE, 7(12): e50566.

- HE Y Y, MUNDAY J S, PERROTT M, et al., 2019. Association of age with the expression of hypoxia-inducible factors HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$ , HIF-3 $\alpha$  and VEGF in lung and heart of Tibetan sheep. Animals, 9(9): 673.

- HOFFMAN A M, INGENITO E P, 2012. Alveolar epithelial stem and progenitor cells: emerging evidence for their role in lung regeneration. Curr. Med. Chem., 19(35): 6003-6008.

- HUBBI M E, SEMENZA G L, 2015. Regulation of cell proliferation by hypoxia-inducible factors. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 309(12): C775-C782.
- JEONG W, JUNG S, BAZER F W, et al., 2018. Hypoxia-dependent accumulation of hypoxia-inducible factor-1 alpha induces transient cell cycle arrest in porcine trophectoderm cells. *Theriogenology*, 115: 9-15.
- MATALON S, 1991. Mechanisms and regulation of ion transport in adult mammalian alveolar type II pneumocytes. *Am. J. Physiol.*, 261(5 Pt 1): C727-C738.
- PENG Y, CUI C Y, HE Y X, et al., 2017. Down-regulation of EPAS1 transcription and genetic adaptation of tibetans to high-altitude hypoxia. *Mol. Biol. Evol.*, 34(4): 818-830.
- SAJIB S, ZAHRA F T, LIONAKIS M S, et al., 2018. Mechanisms of angiogenesis in microbe-regulated inflammatory and neoplastic conditions. *Angiogenesis*, 21(1): 1-14.
- SCHITO L, REY S, 2018. Cell-autonomous metabolic reprogramming in hypoxia. *Trends Cell Biol.*, 28(2): 128-142.
- SCHÖNENBERGER M J, KREK W, KOVACS W J, 2015. EPAS1/HIF-2 $\alpha$  is a driver of mammalian pexophagy. *Autophagy*, 11(6): 967-969.
- TIAN H, MCKNIGHT S L, RUSSELL D W, 1997. Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells. *Genes Dev.*, 11(1): 72-82.
- TIRPE A A, GULEI D A, CIORTEA S M, et al., 2019. Hypoxia: overview on hypoxia-mediated mechanisms with a focus on the role of *HIF* genes. *Int. J. Mol. Sci.*, 20(24): 6140.
- XU X B, LAI Y Y, HUA Z C, 2019. Apoptosis and apoptotic body: disease message and therapeutic target potentials. *Biosci. Rep.*, 39(1): BSR20180992.
- YANG Y N, GAO C X, YANG T L, et al., 2021. Characteristics of Tibetan pig lung tissue in response to a hypoxic environment on the Qinghai-Tibet Plateau. *Arch. Anim. Breed.*, 64(1): 283-292.
- YANG Y N, GAO C X, YANG T L, et al., 2022a. Vascular characteristics and expression of hypoxia genes in Tibetan pigs' hearts. *Vet. Med. Sci.*, 8(1): 177-186.
- YANG Y N, LI Y Q, YUAN H N, et al., 2022b. Integrative analysis of the lncRNA-associated ceRNA regulatory network response to hypoxia in alveolar type II epithelial cells of Tibetan pigs. *Front. Vet. Sci.*, 9: 834566.
- YU J, LIANG F, HUANG H, et al., 2018. Effects of loading on chondrocyte hypoxia, HIF-1 $\alpha$  and VEGF in the mandibular condylar cartilage of young rats. *Orthod. Craniofacial Res.*, 21(1): 41-47.

(责任编辑 左波)

(责任副主编 韦祖樟)