

血红蛋白与脊椎动物高海拔适应进化

朱筱佳^{①②}, 管玉艳^{①②}, 雷富民^{①*}

① 中国科学院动物研究所, 中国科学院动物进化与系统学重点实验室, 北京 100101;

② 中国科学院大学生命科学学院, 北京 100049

* 联系人, E-mail: leifm@ioz.ac.cn

收稿日期: 2015-07-23; 接受日期: 2015-08-20

国家自然科学基金(批准号: 31330073)、中国科学院战略性先导科技专项(批准号: XDB13020300)、国家自然科学基金委员会特殊学科点项目(批准号: J1210002)和中国科学院动物进化与系统学重点实验室开放课题(批准号: O529YX5105)资助

摘要 高海拔环境是研究脊椎动物对极端环境适应进化过程的典型范例之一。血红蛋白在脊椎动物呼吸和氧化能量代谢中的核心作用决定了其无论在进化生物学还是高原医学研究领域都有着极其重要的意义。然而, 如果不清楚研究对象的系统进化地位和机体本身的适应进化特点, 就无法对各个水平的适应进化机制作出全面诠释。因此, 对脊椎动物的低氧适应进化研究首先从机体生理需求的差异出发。此外, 血红蛋白的功能适应性还表现在物种或种群间的空间分布差异导致不同程度的低氧需求。因此, 本文从个体和系统发育水平评述了血红蛋白的分子进化及功能适应研究, 深入比较了长期定居和短期移居物种间的适应机制区别, 系统分析了鸟类及其他脊椎动物适应高海拔低氧环境的趋同和趋异进化特征。最后通过评价不同研究方法的优缺点, 结合功能蛋白和物种进化相似的分子遗传规律, 为未来高海拔低氧适应进化及高原医学研究提出一些新的思考。总之, 本文支持功能验证在适应性进化相关基因研究中的必要性, 强调整合分子、细胞和系统水平确定研究方案的重要性, 以及系统发育背景和种群进化历史在研究对象选择中的重要意义。

关键词 低氧适应, 球蛋白, 血红蛋白, 趋同进化, 适应进化, 标志异位显性

生物进化中, 有氧呼吸比厌氧呼吸更有效产能, 是多细胞复杂有机体的一个主要进化动力^[1,2]。在诸多动物适应极端环境进化的研究中, 低氧环境作为动物需氧代谢的首要适应条件, 因而生物对高海拔环境的适应性进化研究已成为在极端环境中自然选择压力下宏观和微观进化, 及环境变化和生物适应性表型变异的经典研究体系^[3,4]。应对地下、水下和高海拔3种自然低氧环境下的生理挑战, 自然选择促使

脊椎动物进化出相似的适应机制, 其中高海拔环境为典型的低氧适应环境, 为脊椎动物低氧适应进化的天然实验室^[5-10]。微进化变异的分子遗传基础及其发生和发展过程是进化生物学中极端环境适应研究的焦点之一^[11,12]。

高海拔环境的低气压、低含氧量和低气温, 以及强紫外线(ultraviolet, UV)辐射和干燥气候条件是高海拔分布内温动物生存进化所面临的特殊挑战, 而

引用格式: 朱筱佳, 管玉艳, 雷富民. 血红蛋白与脊椎动物高海拔适应进化. 中国科学: 生命科学, 2016, 46: 84-102
Zhu X J, Guan Y Y, Lei F M. Hemoglobins and high-altitude adaptive evolution in vertebrates. *Sci Sin Vitae*, 2016, 46: 84-102, doi: 10.1360/N052015-00245

在相当长的时间内对这些环境条件的适应性进化使得不同物种演化出不同的适应性表型变异^[13]。低氧分压(hypobaric hypoxia)是影响高海拔地区鸟类和人类生存的首要因素^[14-16], 海拔每升高 1000 m, 机体吸入氧含量就减少 10%, 例如, 在海拔 4000 m 地区所吸入氧含量只有海平面的 60%^[17]。在高海拔环境下吸入氧含量减少会导致动脉血氧饱和度降低(血氧不足 Hypoxemia), 继而引起需氧代谢组织的细胞氧供应不足; 此时若缺乏其他补偿性生理调节, 低氧诱导的血氧不足会严重限制需氧代谢, 从而影响动物觅食、持续运动和产热能力^[18]。另一方面, 高海拔栖息地具有低氧和低温共同变化的特性, 机体面临两者共同作用下的高海拔适应^[19]。低氧限制了需氧代谢的产热能力, 低温增加了低氧下的代谢需求^[20], 高海拔内温动物在氧利用率减少和低温压力增加下必须保证恒定的能量供应, 如多数功能基因在低温和低氧暴露下均上调^[21], 低氧条件下机体控制体温和代谢维持氧供需平衡^[22,23]。因此高海拔适应进化涉及协同选择压力下的分子适应。同时, 高海拔环境中的强 UV 辐射会直接引起机体氧化损伤, 氧化压力与海拔高度正相关^[21,24,25]。因此, 高海拔环境的几个主要作用因子中, 低氧分压对内温动物适应进化的影响最大。

动物机体和环境低氧既相互区别又相对发生。狭义上的低氧对应医学定义, 是一种组织可利用氧的缺乏状态, 即机体内环境低氧, 具体包括窒息(asphyxia)和局部缺血(ischemia); 广义上的低氧可能发生在水下、地下或高海拔自然环境, 蛰伏(如冬眠)以及脑卒中(stroke)、肺气肿(emphysema)和哮喘(asthma)等临床病理状态^[26]。然而, 机体和环境低氧又是相对发生的, 如病理和生理状态(蛰伏)下机体在常氧环境下的低氧反应, 同样, 适应高海拔和地下洞穴等低氧环境动物的内环境稳定为非低氧状态, 但是如果剧烈活动引起代谢改变会打破内稳态(homeostasis)。

机体对环境低氧的生理反应分为急性和慢性两种表型^[3,26]: 几分钟/小时内(如潜水)和数天/月内(如蛰伏)的急性低氧反应, 或称低氧驯化或习服(acclimatization), 明显增加低氧下的氧摄入; 相反, 慢性低氧适应(adaptation), 即在不可逆的低氧环境长达数月/年、甚至繁衍几代, 表现在对低氧反应敏感度的逐渐减弱, 以保持血液的 CO₂/pH 内稳态^[8,27], 如高海拔环境或地下洞穴生活的鸟类和哺乳类。无论急

性还是慢性低氧反应, 氧呼吸代谢过程中的功能蛋白在氧摄取、传输、组织氧卸载和氧感受及活性氧族清除^[28]的一系列反应中承担各自的任务, 其中球蛋白家族在多个环节中起关键作用。

由于血红蛋白是脊椎动物高海拔低氧适应代谢通路最重要、研究最多的功能蛋白^[10,29-34], 其本身的结构功能进化也代表一定的脊椎动物进化规律^[35-38], 基于此, 本文总结以下 4 方面的进展: (i) 球蛋白与脊椎动物低氧适应机制; (ii) 血红蛋白低氧适应机制和分子进化机制及在脊椎动物进化史中与其他球蛋白的演化关系; (iii) 以血红蛋白为代表比较高海拔土著和移居动物的适应机制差异, 进一步分析血红蛋白与脊椎动物适应进化的关系; (iv) 血红蛋白高级结构反映的脊椎动物适应进化机制。同时从各个角度和不同层次分析血红蛋白分子进化和脊椎动物高海拔适应的关系, 并评价不同研究体系和方法。

1 球蛋白与脊椎动物低氧适应机制

脊椎动物机体氧呼吸代谢过程涉及球蛋白(globins)超家族的血红蛋白(hemoglobins, Hbs)、肌红蛋白(myoglobin, Mb)、眼红蛋白(eye globin, GbE), 和主要与氧代谢过程中活性氧氮族(reactive oxygen and nitrogen species, RONS)代谢和阻止细胞凋亡相关的脑红蛋白(neuroglobin, Ngb)^[39]以及胞红蛋白(cytoglobin, Cygb)等 5 个成员^[40]。前两者同属于血红素蛋白类(hemoproteins)^[41], 是脊椎动物体内最重要和最丰富的蛋白, 主要执行氧运输和氧储存功能^[42,43], 为低氧适应及低气温适应的典型功能蛋白^[44-48]。此外, Hbs 和 Mb 还参与体内 RONS 清除和 NO 信号转导, 在急性低氧恢复的细胞保护中起重要作用^[26]。GbE 最早发现于鸟类基因组^[49,50], 近来还在其他脊椎动物中发现^[51], 但目前只发现在鸟类眼部表达, 执行从无血管视网膜到光受体细胞氧运输调控的功能^[52]。

几种氧代谢球蛋白中 Hbs 分布的类群和细胞类型最广泛, 存在于除了南极冰鱼类(Channichthyidae)以外的几乎所有脊椎动物中^[40]。除了血细胞外, 近来发现还表达于神经元^[53,54]、巨噬细胞^[55]、晶状体细胞^[56]、肺泡表面上皮细胞^[57]、内分泌细胞^[32]、肾细胞^[58]和癌细胞^[59], 在这些细胞中目前只发现与 ROS 防御或 NO 信号相关, 所以可能具有抗氧化和血管壁

扩张功能^[60,61], 而这两个功能与脊椎动物高海拔环境适应密切相关^[21,24,26].

血液的氧运输属性依赖于两种机制: (i) 血红蛋白本身的(stripped, 即实验控制的无变构因子状态)氧结合属性和基于分子结构的变构因子(allosteric effectors)敏感度; (ii) 红细胞的可变环境(如自由因子效应下的浓度变化)^[62]. 同时, 分子和细胞水平适应机制受到机体系统水平一般性适应的补偿, 三者共同组成机体适应低氧环境的内在支撑系统^[26]. 从血红蛋白基因适应机制的生物系统等级分析, 由编码基因固定的种间适应差异通常涉及分子结构变化(包括变构因子、血红素结合位点及亚基间接触面)的长期适应机制, 而主要由短期适应引起的种内群体间适应变化一般涉及红细胞代谢过程中变构因子浓度改变的短期调控机制^[14,63,64]. 血红蛋白本身潜在氧运输能力可同时在氧亲和力升高和降低下增加, 分别引起肺氧载量和周围组织氧供给增加, 两者之间的转换取决于动静脉氧压差、氧容差和可变 pH 条件等^[35].

2 血红蛋白低氧适应的分子基础

脊椎动物血红蛋白分子是由两条 α 多肽链(α_1 和 α_2)和两条 β 多肽链(β_1 和 β_2)组成的四聚体蛋白, α 和 β 链分别由 7 和 8 个螺旋片段(记为 A-H)组成(α 链没有 D 螺旋), 为非螺旋片段(AB, BC 等)所间隔, 两端是氨基端 NA(5'第一个非螺旋)和羧基端 HC(3'最后一个非螺旋)形成转角并引起链的特征三级折叠(图 1, SWISS-MODEL servers^[65~67]和 QMEAN4 in DeepView/Swiss-PdbViewer 4.1.0, templates: 1faw)^[68]. 分别由内二聚体($\alpha_1\beta_1$ 和 $\alpha_2\beta_2$)和间二聚体($\alpha_1\beta_2$ 和 $\alpha_2\beta_1$)构成紧密(packing)和滑动(sliding)接触面^[14,42,69]. 成年鸟类体内主要表达 HbA 亚型($\alpha_A\beta_A$)和表达较低或者不表达的 HbD 亚型($\alpha_D\beta_D$), 以不同组合和表达形成氧亲和力差异的物种特异亚型^[70], 两亚型共享相同 β 链, 故功能异质性可能主要由 α 链氨基酸变化引起^[70~71]. 由于成熟血细胞包含功能差异的不同 Hb 亚型混合, 机体可以通过调节两亚基的化学计量比,

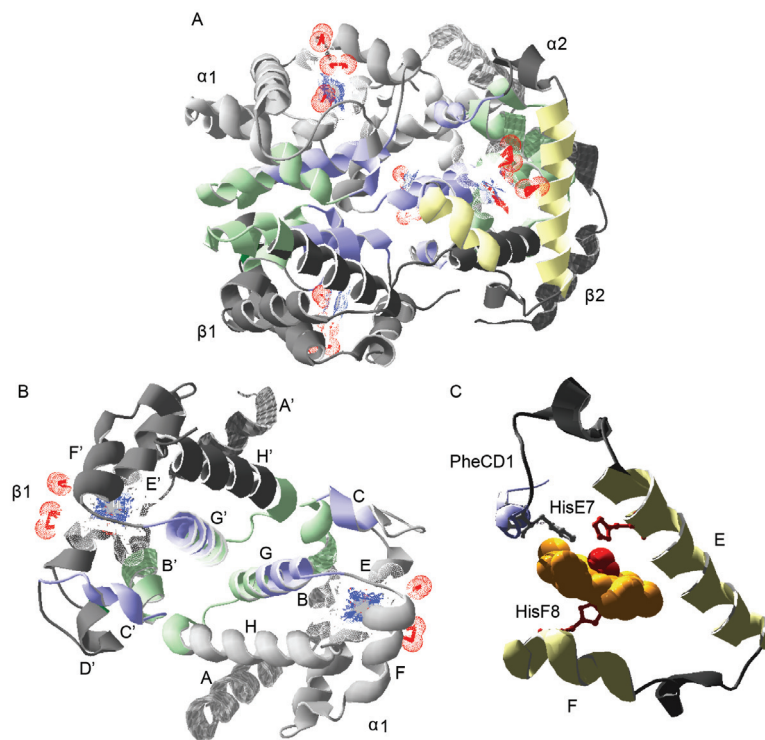


图 1 地山雀(*Parus humilis*)血红蛋白 HbA 四聚体分子的模拟三维结构(模板: 1faw)

A: 四聚体结构及功能域: 紫色为滑动接触面, 绿色为紧密接触面, 黄色为血红素口袋; B: $\alpha_1\beta_1$ 内二聚体, 由 α 链的 7 个螺旋(无 D 螺旋)和 β 链的 8 个螺旋组成; C: 血红素口袋及所有脊椎动物保守的血红素结合位点

控制不同代谢需求下的氧通量比率^[72]。此外,一些哺乳动物出生前具有胎儿血红蛋白(HbF),由 γ 链代替 β 链;早期发育阶段所有哺乳动物都表达胚胎Hbs,具有胚胎型 α 或 β 链^[63]。

血红蛋白的可逆氧结合过程包括(图2),亚铁血红素(heme)附近的三级结构变化引起二聚体间作用力变化,最终导致四级结构改变,发生去氧化(deoxy)Hbs紧张态T(tense)构象和氧化(oxy)Hbs松弛态R(relaxed)构象之间的转换,形成低和高氧亲和力Hb之间的变构平衡(allosteric balance)^[63],低氧亲和力T构象具有高变构因子亲和力,R构象则相反^[69]。R/T状态间转化由分子内部结构改变决定的同促效应(homotropic effects)和分子细胞环境中变构因子引起的异促效应(heterotropic effects)形成,前者包括4个亚单位协作氧结合和二聚体间作用力变化^[14,62]。脊椎动物体内主要变构因子包括CO₂, H⁺/pH, Cl⁻和有机磷,在不同类群的反应程度各有差异^[29,35],各因子之间相互作用决定最终的Hb功能状态^[62]。单独或相互作用形成的主要异构效应:由CO₂和H⁺引起pH

降低以在组织释放氧的波尔效应(Bohr effect),包括碱性(pH6~9)和酸性(pH<6)波尔效应^[74,75];仅由H⁺引起的鲁特效应(Root effect),为碱性波尔效应的强化^[29];Cl⁻平衡氧释放和体温降低,如低温环境中的变温动物;脊椎动物共有的有机磷效应^[29,35,76],其中硬骨鱼类的有机磷效应从强到弱为鸟苷三磷酸(guanosine triphosphate, GTP),腺苷三磷酸(adenosine triphosphate, ATP),二磷酸甘油酸(2,3-diphosphoglycerate, DPG)和肌醇五磷酸(inositol pentaphosphate, IPP)^[77],两栖类主要具DPG和ATP,爬行类主要具肌醇六磷酸(inositol hexaphosphate, IHP)和ATP,哺乳类主要为DGP,鸟类主要为IPP且比哺乳类DPG结合更紧密,更有效降低氧亲和力^[78~79]。

血红蛋白分子所有亚单位都表现出序列同源性,是分子系统发育中基因复制的典型代表^[29,35]。不同物种Hbs分子大多数氨基酸位点替代都是保守的,包括分子内部的非极性和分子外部的极性或非极性残基。分子适应性突变只发生在蛋白关键结构域的少数(1~5个)氨基酸残基位点^[31,80],且可能被任何其他反应间接抑制,而不一定移除原有的冗余替代,因而大多数物种间的氨基酸替代是功能中性的。

血红蛋白的功能属性一般表现为强化组织氧供给,包括通过增加氧亲和力提高氧载量和同时降低氧亲和力以释放氧两个方向,尤其是在高海拔严格低氧环境下^[62,81]。极端环境下脊椎动物维持机体的组织氧供给同时在系统、细胞和分子水平进化出不同的适应机制,其中同时存在远缘物种间趋同进化和近缘种或种群间的趋异进化规律。因此以典型功能蛋白分子的低氧适应机制分析脊椎动物低氧适应进化需要从生理系统差异、氧运输的细胞水平调节和分子进化机制3个层次进行。

2.1 生理系统水平适应

脊椎动物的低氧适应进化在血红蛋白分子共有特征的基础上,首先体现出生理系统水平低氧耐受策略的类群特异性。哺乳类对低氧环境的生理反应高度保守,包括高通气反应(hyperventilatory response, HVR)、肺泡气体扩散和组织气体扩散3个阶段,表现在通气量增加、血管收缩、心动过缓,低灌注组织代谢降低和组织毛细血管增加^[13,82]。类似地,人体对高海拔环境的典型生理适应包括高通气量、血小板增多、低氧诱导的肺纤维化、血红蛋白氧亲和力变化、

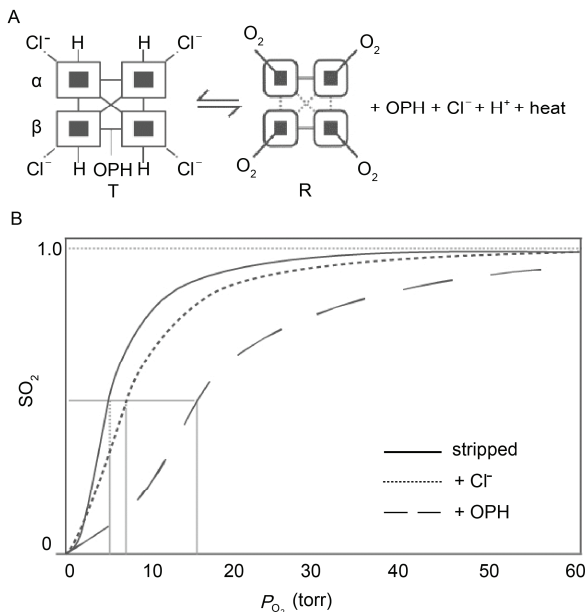


图2 血红蛋白变构平衡下的可逆氧结合 (修改自 Projecto 等, 2013)^[73]

A: 主要变构因子调控下的T态(低氧亲和力)和R态(高氧亲和力)间的散热(heat)平衡反应^[20]; B: 随氧分压(P_{O_2})变化的氧饱和度(satuation of O₂, SO₂)构成氧S型平衡曲线,SO₂在变构因子(有机磷OPH>Cl⁻)存在比缺乏(stripped)下转向T状态,因而曲线右移,氧亲和力降低

氧化酶增加, 及周围组织毛细血管增多^[83], 其中除了氧亲和力变化外, 血红蛋白浓度变化及其遗传调控基础在世界范围内不同高海拔人群间有显著差异^[84,85].

鸟类通常比哺乳类更能忍受高海拔低氧环境^[82,86]. 区别于其他内温动物(endotherm), 鸟类通过以下4个特有生理特征适应高海拔生存环境^[87,88]: 背支气管-平行支气管-腹支气管系统(Dorsobronchi-Parabronchi-Ventrobrownchi, D-V-P system)与外周毛细血管的交叉对流系统(cross-current system), 并与发达的辅助气囊系统连通, 组成具有显著低通气反应的双重呼吸系统; 较大的心脏和高心输出量, Hbs 的高氧亲和力偶联对低碳酸血高度耐受(低碳酸血症 Hypocapnia, 高海拔下呼吸增强的次生后果, 会导致机体碱中毒)完成高效血氧传输; 低氧条件下显著的脑血管舒张和耐受低碳酸血的脑血管收缩效应协同作用, 保持脑部的氧传输; 包括大脑皮层、心肌和骨骼肌的细肌纤维和高毛细血管密度, 及高密度心肌线粒体和高活性胸肌需氧酶等, 对低氧适应的局部调节. 另一些动物对低氧环境氧运载与卸载的适应表现在体温变化对血红蛋白氧亲和力温度敏感性的降低^[23,89], 从而保持亲和力和氧载量, 但是燕类(Hirundinidae)相反, 以一种保存能量的方式在低温下增加氧亲和力来减少组织耗氧量, 从而降低代谢率^[90].

以上特征决定了即使需氧范围是哺乳类的两倍^[91], 鸟类的海拔分布范围仍然有较大差异^[88], 因此成为内温动物高海拔低氧适应进化的典型最适研究对象^[64,92,93]. 此外, 鸟类在飞行中在保证摄入和传输足够氧的同时组织能量会急剧增加, 空中飞行时能量会增加至海平面静息状态的15倍^[94], 能量代谢是Hbs正常执行功能的基础^[95], 血液氧运输和需氧能量代谢共同作用形成鸟类和哺乳类适应飞行的动力^[96,97]. 鸟类和哺乳类动物低氧适应的一般生理适应和比较生理学机制是进一步细胞和分子机制研究的背景资料.

2.2 细胞水平适应

血红蛋白作为至今研究得最清楚的一个异构蛋白, 在需氧代谢中运输O₂, H⁺和CO₂, 并显著受到异促因子的调控. 除了分子内部亚基间的同促效应, 分子间多聚体解离后的单体或二聚体之间还存在协作

性自相关(cooperative self-association)的同促效应^[98,99], 因此氧既是配体, 又可作为正同促效应因子. 此外, 协同性氧合还受到细胞内Hbs浓度、pH、温度和有机磷的影响, 同时受到Hbs分子本身的变构因子结合位点和对异促因子敏感度的作用. 因而分子水平结构变化受到自身氧亲和力和对细胞内变构因子敏感度两个功能因素的作用^[62,71]. 所有变构因子都与Hb氧亲和力负相关, 直接促进组织中的氧释放. 然而, 血红蛋白对变构因子而非氧的异构属性在不同纲别脊椎动物之间有很大区别^[29,76,100].

鱼类Hbs的细胞适应机制最为复杂和多样性, 除了类群特异性适应机制, 还包括与高等脊椎动物相同的规律. 首先, 有机磷包括所有脊椎动物体内类型; 其次, 鱼类特有的鲁特效应, 由于Hbs对pH较敏感, 红细胞可以在血液酸性条件下不通过腮呼吸调节释放氧到视网膜和鳃, 以提供鳃浮力和视网膜氧化相关作用^[33]. 但是, 有鳃鱼类Hb的碱性波尔效应强于人类, 而无鳃鱼类(如肺鱼(Dipnoi))的Hb不具有鲁特效应, 但是波尔效应的程度与人类相同^[101]. 与此相反, 由于水环境低CO₂分压(1/10于空气)和高溶氧量(28倍于空气), 鲨鱼(Selachimorpha)和善于游泳两栖类具有弱波尔效应^[102], 而快速游泳鱼类的两种Hb亚型分别对异促因子有或者无反应^[29,75,101]. 另外, 更易受环境低温和低氧共同作用的两栖类, 波尔和鲁特效应由位点变异、位点间竞争, 有机磷调控和Cl⁻敏感度共同决定^[5,103], 并受生活史影响的pH控制^[29].

与鱼类相比, 爬行类和鸟类的Hbs细胞调控因子相对专一和简单. 如爬行类由于缺乏高浓度肌红蛋白, 氧尽可能储存在肺部和血液中以供给脑和内脏. 故除了CO₂外, 其血红蛋白对其他常见变构因子几乎没有反应, 因而CO₂相当于其他脊椎动物中有机磷的作用^[104,105]. 鸟类Hb主要受IPP和Cl⁻共同作用, 斑头雁(*Anser indicus*)和灰雁(*A. anser*)的Hb氧亲和力只有在IPP存在的调节下差异显著^[106], 强效应IPP和弱效应Cl⁻(与IPP同时出现于体内细胞环境)反映出共享离子结合位点间的竞争模式, 同样存在于其他鸟类^[10,70].

哺乳动物Hbs的广义细胞调控分为两种情况: 大多数具有内源高氧亲和力, 受到红细胞中DPG的调控而降低; 而反刍动物(Ruminantia)、猫科(Felidae)动物和狐猴(Lemuridea)则具有低内源氧亲和力并很

少甚至不受到DPG的调控^[107-109]。冬眠动物Hbs对体温和变构因子变化的低敏感度平衡了携氧和卸氧之间的冲突,以适应苏醒相体温骤变下的氧压迅速变化,如林睡鼠(*Dryomys nitedula*)^[100],同时波尔效应显著增高以保证组织毛细血管有效的氧卸载,因而冬眠动物的低氧适应更多是由于高效氧卸载的进化而不是氧亲合力。然而,即使温度敏感度相对较低,低体温效应仍然是由冬眠行为引发的氧亲合力温度效应中血氧亲合力增加的主要因素^[110]。相反,与其他鸟类和哺乳类相比,斑头雁Hbs氧亲合力的高温度敏感性与pH共同作用以更好地适应低温且低氧环境和迁徙过程中的持续振翅飞翔^[89]。

人类和哺乳动物Hbs对高海拔低氧的细胞水平适应性改变主要是由于红细胞DPG和pH水平的变化,而其他因子的改变贡献较少,如红细胞体积和与有机磷作用的ATP, Cl⁻, Mg²⁺等^[26,63]。另一方面是低氧诱导因子家族(hypoxia-inducible factors, HIFs)和相关转录因子对细胞环境下血红蛋白浓度变化的调控。HIFs作为低氧诱导的转录因子蛋白复合体家族,是在哺乳动物氧感受中起重要作用的转录因子, HIFs的转录目标有包括内皮PAS域蛋白1(*endothelial PAS domain protein 1, EPAS1*, 即 *HIF2 α*)^[111], Egl9家族低氧诱导因子1(*Egl-9 family hypoxia inducible factor 1, EGLN1*)^[84,112]在内的数百种低氧诱导生理的相关重要基因,与红细胞生成、血管生成、血管反应,血糖和能量代谢,细胞增殖、存活和凋亡相关^[113,114]。除了通路研究较为透彻的HIF通路外,最近发现的和低氧适应相关的另一个血红蛋白基因作用网络有待深入研究^[115]。

总之,脊椎动物Hbs的细胞水平调控和相关适应机制除了表现出显著的系统发育类群多样性,还体现了从低等到高等进化过程中随着环境变化和行为的适应的特化和专一性机制,很好地满足了水下、地下和空中环境,剧烈运动和低温蛰伏行为中的不同进化需要。

2.3 分子适应与系统进化

Hbs分子适应机制与细胞水平相互补,表现在分子水平适应通常涉及细胞内变构因子结合位点特异性^[35],以配合各种细胞调控因子的精确调控。如人类 β 亚基的7个DPG正价结合位点(3个双链位点: β 1Val/ β 2His/ β 143His和1个单链位点 β 82Lys);波尔

效应的质子结合位点位于 α 亚基的氨基末端(α 1Val)和 β 亚基的羧基末端(β 146His); Cl⁻则结合于与 α 131Ser作用的 α 1Val,和与 β 1-Val作用的 β 82Lys; CO₂结合于 α 和 β 链的自由氨基末端。除了与人类相同的结合位点外,鸟类Hbs的IPP还结合于 β 135Arg和 β 139His^[29,76]。由于以上功能重要性位点分布于Hb四聚体 α 和 β 链的不同位置,因而从自然选择分析Hbs及其globins超家族的进化机制,会发现引起基因复制产生链分化的正选择是形成球蛋白进化率大幅度增加的原因,尤其是具协作功能的位点。

通过将globins作为种上水平长期进化的评价体系,Goodman等人^[116]证明了球蛋白进化中自然选择的存在及作用机理:首先是受正选择作用的功能四聚体迅速进化阶段(有颌类, Gnathostomata和四足类, Tetrapoda);然后是以稳定选择保存复杂功能阶段,从羊膜类(Amniotes)到鸟类和哺乳类的进化率明显降低;紧接着从真兽类(Eutherians)和早期灵长类(Primates)到类人猿(Anthropoidea),球蛋白进化再次加速到发生适应性替代,如灵长类胎儿Hb的 γ -链;随后到人类阶段进化率急剧下降。可见,脊椎动物进化史上globins进化率随时间变化的4个阶段中,第二阶段以几乎恒定的进化率累积序列变异,不易与近中性突变的随机固定相区分,证明功能基因进化史上自然选择和中性选择的同时存在^[42]。因此对功能基因的选择性分析结果并不一定能够真实反映出其进化率变化^[117,118]。

结合最新研究方法,Storz等人^[119]对脊椎动物球蛋白超家族的系统发育和比较基因组分析揭示,并系球蛋白趋同进化出相似的表达模式和/或不同系统发育支系间相似功能特化机制的多个进化事件。然而,多数情况下直系同源基因间的支系特异复制事件并不是1:1的直系进化^[120-122]。Hb和Mb分化源于两次全基因组复制事件(和Cygb一起作为脊椎动物共祖两次连续全基因组复制的并系产物),紧接着是串联基因复制所致的 α 和 β 球蛋白基因分化,形成不同亚单位组成的多聚血红蛋白,这种异四聚体结构的形成组成了协作性氧结合和异构调控的核心机制。整个globins进化过程依次形成4:1, 3:1和2:1的并系基因系统发育模式,即每轮全基因组复制后小范围基因复制事件的复制和删除模式^[119]。

然而,进一步从自然选择体系中具体分析适应性选择模式,Storz等人^[123]发现适应性冲突模型(the

“Adaptive conflict” model)^[124]和平衡选择模型(the “Balancing selection” model)^[125,126]同时反映出先于基因复制对蛋白亚功能分化选择,不同氧亲和力等级血红蛋白异构型(isoforms of hemoglobin, isoHbs)的共表达增大了血氧传输的动脉氧压范围,表现为动脉和组织供给的不同. IsoHbs的系统发育特异性在爬行类^[104]、鸟类^[70,90,127-129]和哺乳类^[130,131]都有所体现,鸟类尤其显著.

除了基因复制事件, Hbs 系统进化还表现在β球蛋白基因家族基因序列间的重组、不等交换和并系基因间的基因转换,例如,哺乳类中拉布拉多白足鼠(*Peromyscus maniculatus*)的重组和基因逆转^[31],劳亚兽类(Laurasiatheria)β球蛋白的不等交换和转换^[131].若缺乏基因逆转,直系球蛋白序列的每个分支都可以代表已知动物支系的演化规律^[31].

从血红蛋白分子进化的低氧适应研究中可以看出,在理解功能蛋白本身的分子进化机制和承载其变化的生物有机体的生理适应背景基础上,分子系统进化研究可以更进一步发现两者的紧密联系和进化过程中各自的不同轨迹.血红蛋白分子本身体现的遗传机理耦联机体的生理适应机制,作为联系基因型和表型的基础,贯穿着脊椎动物高海拔极端环境适应每个研究环节.

3 血红蛋白分子进化和高海拔低氧适应

Winslow^[132]认为,对高海拔土著动物的适应进化研究之所以有意义的主要原因:(i)相比起流动性更高的人类,动物更易于近亲繁殖;(ii)每一代的繁殖时间更短,从而更可能受到遗传适应,即进化的影响.基于以上 Hbs 的分子进化基础,进一步从高海拔土著和移居动物间的适应进化比较、系统发育类群间的趋同和趋异进化两个方面阐明血红蛋白分子的高海拔低氧适应进化机制.

3.1 高海拔土著和移居动物低氧适应机制

高海拔土著动物在经历长期繁衍于低氧环境之后,承受不可逆的慢性低氧压力,其长期低氧适应形成机体一系列不同水平的双向慢性低氧适应^[13,26,83].与土著动物的长期适应机制有明显不同,低海拔哺乳类短时间内迅速进入高原后的急性低氧反应,可能表现为人类急性高原病(acute mountain sickness, AMS),包括高原肺水肿(high-altitude pulmonary

edema, HAPE)和脑水肿(high-altitude cerebral edema, HACE);而高海拔土著和世居动物机体也可能发生一些间接非适应性反应,可能表现为人类慢性高原病(chronic mountain sickness, CMS),如高通气量产生低碳酸血症(hypocapnia)下的酸碱平衡失调、高肺氧摄取量下的肺小动脉收缩导致肺高血压(high-altitude pulmonary hypertension, HAPH),红细胞增多引起血液黏稠度增加导致的心脏病等.相比之下,高海拔土著和世居动物同时进化出相应的低氧适应机制^[83]:逐渐减缓高通气反应,同时降低肺血管收缩反应;2,3-DPG降低、氧亲和力增加的同时, Hbs 的有机磷敏感度降低(哺乳类);耐受低碳酸血症及脑血流调控(鸟类)^[133];低至中度的 Hb 浓度和红细胞比容,及低氧诱导红细胞增加反应的减弱^[134];肌肉组织毛细血管密度增加^[135-137]和骨骼肌 Mb 浓度升高^[138]进一步提高有效的细胞氧摄取,表现为高海拔土著人群的 CMS 相对缓和症状^[115].

从系统发育水平分析,高海拔耐受脊椎动物的 Hbs 低氧适应策略主要表现为两类^[35,64,81]:(i)种内水平主要发生红细胞内有机磷因子(主要为 IPP 和 DPG)浓度的改变,典型例子是中海拔的哺乳类^[62];(ii)种间水平差异则多表现为不同结构和功能的 isoHbs 合成,形成不同生活史策略或相似发育阶段下物种间的动态级联氧供给差异,如善飞行高海拔鸟类^[36,70,127,139-141]和哺乳类胚胎^[29].除此之外,分子进化研究揭示高原土著动物与人类共享候选基因位点^[34,81,143]的基础上,反映出哺乳类和鸟类适应机制和过程的趋同进化.

基于相似和极值理论^[144,145],McCracken 等人^[15,36,80]结合系统发育和种群遗传分析方法发现安第斯山脉雁形目(Anseriformes)水鸟的 Hbs 同时存在平行进化和周期性替代机制,在有限的适应途径下,相似的表型效应常常发生在同一基因或蛋白分子中不同的相邻位置.另外,不同海拔分布的雁形目近缘种研究结果证明了改变分子内部接触面作用力的点突变效应^[139,140,146,147],为高海拔耐受物种 Hbs 分子本身异构改变的重要适应机制,该研究也为人类 Hbs 低氧适应病理下体内表达突变体研究技术提供了基础^[35,147].

体现分子间相互作用效应的标志异位显性机制^[148-150]也发生在 Hbs 的海拔梯度适应进化中,如安第斯山蜂鸟(*Oreotrochilus estella*)种间^[73]和拉布拉多

白足鼠种群间^[34]Hb 分子的标志异位显性替代及对应的表型和适合度. 两种不同水平的标志异位显性机制差异表现在, 蜂鸟的种间变异由于 IHP 结合位点变异影响亲和力变化, 因而以β链极性变化氨基酸变异位点为主要遗传背景, 基因型变异位点较少并保留祖先基因型, 基于同一亚基两个位点组合的进化途径相对简明(图 3A, 表 1); 而白足鼠种内等位基因替代同时涉及α亚基的第 2, 3 外显子和β亚基 12 个变异位点的多基因型组合(表 2), 变异模式也因而较复杂(图 3B), 对氧亲和力的调控机制涉及由内二聚体(α_iβ_i)和间二聚体(α_iβ_j)的亚基间接触力(图 1)决定的 T-R 状态转换. 因而, 种群间的不同亚基的多位点基因型组合引起的复杂异构平衡导致了基因型和表型异位显性的非对应模式(图 3B 和 4). 低氧适应的同时, 高海拔比低海拔拉布拉多白足鼠具有更高的产热能力, 强化了影响氧上调级联反应中多个连续转录模块的

相关表现, 包括组织氧扩散(如血管生成 Angiogenesis)和组织氧利用(代谢能利用和细胞氧化能力)^[151].

然而, 与世居物种的长期适应相区别, 有的类群在进入低氧环境之前就已具有适应性特征, 称为扩展适应(exaptation)^[152,153], 如南美驼类(Camelidae)的高 Hb 氧亲和力并不是由于迁入后对安第斯山脉的适应, 而是该科所有物种的共性特征, 证明其祖先可能为低氧耐受物种, 而不是适应性进化的结果^[6]; 也可能是由于有些哺乳类只表现为生理可塑性, 而未达到遗传适应突变^[151]. 因此, 适应性进化研究应该把研究对象的系统发育特征作为研究背景之一, 考虑物种进化史与适应进化的关系.

动物和人类血红蛋白突变体的结构和功能研究说明二者调节血红蛋白氧亲和力和优化组织氧供给的不同策略^[62], 与一些高海拔土著动物(如豚鼠

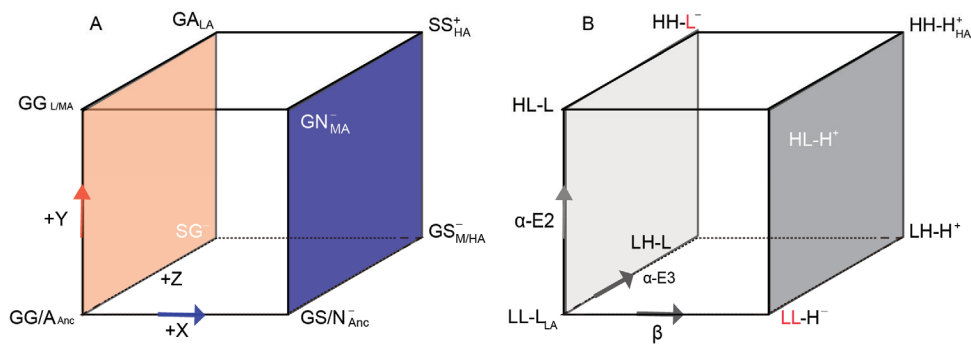


图 3 高低海拔物种和种群间 Hbs 标志异位显性的基因型-表型空间及进化途径(原始数据来自文献[34]和[73])

A: 安第斯山蜂鸟高低海拔近缘种间的基因型-表型空间. 蓝/红色面分别代表趋向高/低海拔物种的表型, 蓝/红色箭头表示标志异位显性作用下高/低海拔适应物种 Hb 的进化途径. 上标 +/- 表示 P_{50} 升高/降低, 下标 Anc 代表祖先性状. 高海拔异位显性主要体现在 X($\beta 83$ 极性替代)及后续路径, 而 Y(保留祖先基因型)和 Z($\beta 13$ 极性替代)为低海拔异位显性替代, P_{50} 只有在极性 $\beta 83$ 背景下降低(表 1); B: 南美拉布拉多白足鼠高低海拔种群间的基因型-表型空间, 上标 +/- 表示 DPG 敏感度升高/降低, 只有在 α -E2 和 E3 为同一基因型的背景下, β 突变为不同基因型(HH-L, LL-H, 红色强调区别)时发生高海拔异位显性替代(DPG 敏感度或 P_{50} 降低), 但 α -E2 和 α -E3 单独替代为 HA 型没有表现出高海拔表型(表 2), 没有如图 A 中的明显趋同表型, 故表示为灰色面

表 1 安第斯山蜂鸟 $\beta 13\beta 83$ 种间替代的基因型-表型和海拔类型(原始数据来自[73])^{a)}

重组血红蛋白(rHb_β13β83)	氧亲和力 P_{50} (KCl+IHP)	物种海拔类型 ^{氨基酸替代数} (L/M/HA, 高/中/低海拔)
GG/A _{Anc}	-	MA
GG +Y	19.38±0.41	LA ³¹ /MA ² : 祖先基因型
SG ⁻ +Z	10.99±0.06	Null: 假设中间型
GA +YZ/ZY	-	LA: 祖先基因型
GS/N _{Anc} +X	-	MA
GN +XY	-	MA
GS ⁻ +XZ	11.76±1.09	MA ³⁶ /HA ²
SS ⁺ +XYZ/ZY	16.31±0.90	HA

a) $\beta 13$ 突变(Y 和 Z)对应中低海拔适应, $\beta 83$ 替代(X)对应中高海拔适应; KCl+IHP 代表鸟类体内环境下同时存在氯化钾和有机磷

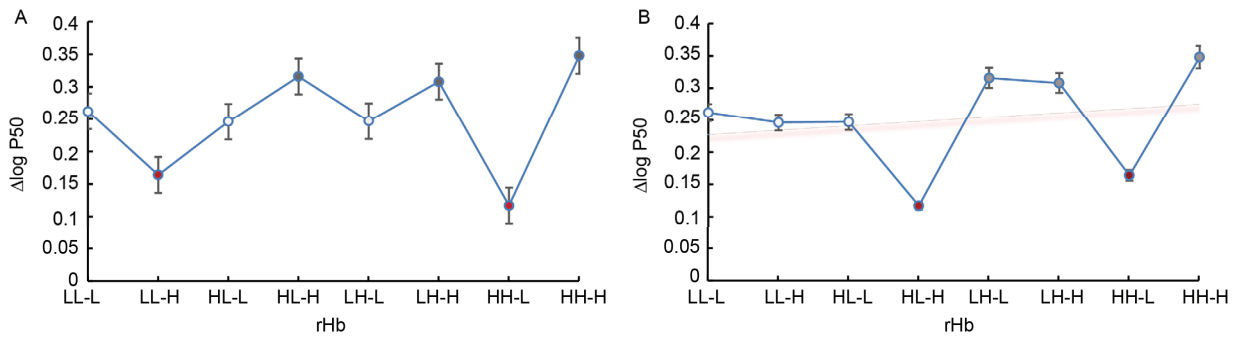


图 4 南美拉布拉多白足鼠种群的高低海拔基因型和对应表型变化(原始数据来自[34])

DPG 敏感度($\Delta\log P_{50_KCl^-}$ & DPG stripped)增加, 对应氧亲和力降低. A: 相同 α 基因型下, 成对比较 β 突变的表型变化, 表型变异取决于 α 基因型; B: 除 α 决定的显性基因型外, 相同 β 型而 α 突变的基因型趋于 DPG 敏感度增加(线性趋势线)

表 2 拉布拉多白足鼠种群间基因型-表型变化(原始数据来自文献[34])^{a)}

异位显性	重组血红蛋白 rHb($\alpha E2E3-\beta$)	DPG 敏感度($\Delta\log P_{50}$) (KCl^-+DPG) ⁻ 体外条件	氧亲和力 P_{50} (KCl^-+DPG) ⁺ 体内条件
Sign-HA	LL-L	0.262	10.46
	LL-H	0.164	7.65
	HH-L	0.117	8.63
	HH-H	0.348	10.13
No sign	HL-L	0.246	11.21
	HL-H	0.316	11.36
	LH-L	0.247	12.51
	LH-H	0.308	12.83

a) 发生在 α 背景下的高海拔标志异位显性(Sign-HA), 相反组合 β -H/L 基因型表现出对 DPG 敏感度($\Delta\log P_{50}$)减低和氧亲和力增加(P_{50} 降低), α 背景不固定下的无高海拔标志显性(No sign); $\alpha E2E3-\beta$ 代表第 2, 3 外显子和 β 亚基定点突变(rHb)基因型组合

(*Cavia porcellus*)和斑头雁)适应慢性低氧环境不同, 人类血红蛋白并不主要由遗传编码改变而是由基因表达水平变化来促进氧摄入^[26,113,154], 如影响高通气量(中海拔 DPG 水平变化)和酸碱平衡(高海拔 Bohr 效应)^[132]. 尽管如此, 相对于鸟类和哺乳类, 研究发现人类的调控机制较发达, 对氧利用的调节在更多调控因子作用下改变血红蛋白浓度, 如 HIFs 及其调控因子(EPAS1 等)^[84,111,112,134,155]. 当人类进入高海拔环境, 在到达中海拔(<3000 m)前红细胞中的 DPG 就开始增加, 血氧亲和力降低以满足组织氧释放; 从 3000 m 以上到更高海拔环境, 氧亲和力增加更占优势, 表现在氧平衡曲线更加陡峭以提高氧运输效率^[156,157].

以上研究结果表明, 高原世居和迁移种或种群是脊椎动物低氧适应研究的理想模型, 而对海拔梯度剧烈变化广布种的种群水平研究为探索低氧生理适应的微进化机制提供了极好的机会, 尤其是高低海拔土著种群(或定居种群)间低氧生理反应有一定差异但种群间又有高度基因流的广布种^[81]. 因而,

Dean 和 Thornton^[158]将不同地理位置高海拔环境下近缘分支的不同 Hbs 突变形成相同有利表型的平行进化过程归入第三种趋同进化.

3.2 血红蛋白基因与脊椎动物适应进化

以血红蛋白(α 亚基)和肌红蛋白(Mb)序列差异解释哺乳类-鸟类-爬行类的分类悖论^[159], 发现与爬行类相比, 鸟类与哺乳类间的蛋白序列平均差异较小(前者的两基因差异分别是后者的 72%和 73%), 进一步从生理代谢和形态解剖两个层次分析哺乳类和鸟类的相似度, 证明与氧代谢相关的球蛋白基因是哺乳类和鸟类分子水平趋同进化的一类典型代表^[160]. 鸟类和哺乳类 Hb 一级结构的区别表现在: β 亚基在鸟类的稳定性(如鸡形目和雀形目支系的深度分化)^[121]和哺乳类的基因逆转^[31]形成鲜明对比; 基因线性排列顺序不同^[161]; 不同亚型在个体发育过程中表达时间顺序的差异^[162].

以 Hbs 的脊椎动物系统进化为背景, 近缘或远缘物种间由于适应不同程度低氧需求的生活史差异

而具有不同的分子水平适应机制, 包括 R/T 状态转换、isoHbs 的组成差异和变构因子结合位点的变化, 并涉及趋同替代位点. 不同地域分布的近缘种间比较, 高海拔的斑头雁、安第斯雁 (*Chloephaga melanoptera*) 和低海拔灰雁, 由于 $\alpha 119$ 和 $\beta 55$ 替代减少了 $\alpha 1\beta 1$ 接触面积^[80,140], 促使 R 到 T 态转变以利于氧释放. 而适应极端高海拔环境的远缘种黑头鸥 (*Larus ridibundus*)^[163] 和白鹳 (*Ciconia ciconia*)^[141] 与安第斯雁的趋同位点 $\beta 55$, 属于相同性质的不同氨基酸替代. 黑白兀鹫 (*Gyps rueppellii*) 和牦牛 (*Bos grunniens*) 会同样表达不同氧亲合力的 isoHbs 以适应更宽范围的氧压^[128,130]; 哺乳类(驼类、猫科和反刍动物)和鸟类(鸵形目和雀形目)的趋同变异位点 $\beta 2$ -His, 分别具有涉及减少有机磷结合位点以提高氧亲合力的不同替代^[29,90,164].

进一步可以从系统发育分析推断出脊椎动物间趋同替代位点(不同残基替代)的趋同进化机制, 如上述调控异构效应的有机磷结合位点 $\beta 2$ (NA2), 在以下远缘类群中由强碱性亲水氨基酸 His 替代为不带电荷的中性氨基酸: 驼类和象类(*Elephantidae*)为 Asn、猫科为 Phe^[165]、偶蹄类(*Artiodactyla*)为 Met、鸵鸟类和燕类(*Hirundinidae*)为 Gln^[64]. 除了系统发育, 相似的适应突变发生在个体发育中人类和除马以外反刍动物胚胎的 HbF, 表现为对有机磷的低亲合力和无离子状态下相对成体的低氧亲合力, 从而有利于氧通过胎盘从母体运输到到胚胎^[107,109].

在人类高原医学领域, 整合基因组研究和生理功能实验, 在之前大量研究中只发现 HIF 通路调控 Hb 浓度与低氧适应显著相关的基础上, 近两年来的研究进一步证明了 Hb 氧亲合力与浓度调控在不同人群和海拔梯度下的低氧适应的差异显著性^[85,142,166-168].

综上, 可用于脊椎动物系统发育分析的保守进化血红蛋白家族, 作为功能基因的适应性进化表现出不同类群分子适应机制的多样性和适应位点的趋同进化两种规律.

4 血红蛋白分子高级结构和脊椎动物适应性进化

19 世纪 30 年代, 人类血红蛋白的自然遗传变异研究结果首次证明由蛋白质的氨基酸变异导致表型的遗传变化^[169], 大多数物种间的氨基酸替代是功能

中性的, 表明氧化和去氧化状态的三、四级结构在脊椎动物中几乎保持不变^[170,171]. 接触面间至少有 1/2 氨基酸残基的空间结构网络模式在所有球蛋白保守^[171], 因而基于已知血红蛋白结构的立体化学, 可以从氨基酸序列变化推断其他同源物种的 Hbs 高级结构基础, 例如, 用灰雁的已有解析晶体结构同源模拟地山雀 HbA 的四级结构(图 1).

然而, 氧结合引起血红蛋白构象变化的不同结构域在脊椎动物中的进化率并非恒定. X 射线晶体学分析证明^[146,172], Hb 的 R/T 构象有显著的不同, 主要是 α 与 β 亚基间相互接触的变化. 比较不同结构域的进化率, Goodman 等人^[173]推断出 $\alpha 1\beta 2$ 滑动接触面位点积累核酸序列变异是整个四聚体分子平均进化率的 4 倍, 而 $\alpha 1\beta 1$ 稳定接触面位点只以整个分子平均变异率变化. 然而, 与该规律相反的例子发生在七鳃鳗类(*Lampreys*)和硬骨鱼(*Teleostean*)的 Hbs(α/β)分化阶段, $\alpha 1\beta 1$ 接触面位点的突变率是平均速率的两倍, $\alpha 1\beta 2$ 滑动面的变异率却与整个分子平均变异率一致^[42].

Hopkins 和 Powell^[174]认为高和低氧亲合力 Hbs 的氨基酸替代几乎都是分子表面的保守位点(除了 NA $\beta 2$ 位点), 分别替代为亲水稳定 R 结构以增加亲合力或疏水性氨基酸稳定 T 结构以降低亲合力. 除了高海拔动物表现前者机制外, 低或中海拔的象类也具有同样的机制, 可能与其祖先种群在阿尔卑斯山脉运输重物有关^[175]. 然而, Storz 等人^[176]发现血红素口袋在拉布拉多白足鼠高低海拔种群间的变异位点, 证明远端血红素口袋和接触面间的突变体现对结构和功能属性的累积作用, 组成异构效应的基础^[172]. 同时, 由于铁血红素结合氧的反应是放热的, 所以随着温度的升高, 大多数物种的氧亲合力降低, 但血红蛋白氧亲合的产热反应又可以被 T-R 状态转化所吸收, 例如人类和金枪鱼(*Thunnidae*)^[29]. 但是蛋白分子结构并不一定对异构效应起显著作用, 例如, 鸟类与哺乳类 Hbs 有机磷结合位点的氨基酸组成保守性^[14]. 与哺乳类不同的是, 鸟类具有第二个低氧亲合力的磷酸结合位点, 并于四聚体的中央空穴形成结合位点间的迁移通道, 而两种异构型间的高度保守位点 Lys99 α (与人类 HbA 相同)表明该潜在的第二个磷酸结合位点与进化适应及生活史的生理相关性, 如长距离迁徙的南极贼鸥(*Stercorarius maccormicki*)^[100]. 因

此, Hbs 的同促和异促效应总体趋于保守而又具有类群特异性变化, 对应适应性功能的改变。

然而, 分子结构也存在和功能进化不一致的结果, 如 Revsbech 等人^[177]对不同海拔分布松鼠科 (Sciuridae) 的 Hbs 功能和异构性研究, 发现实际离子效应与理论波尔效应增多的氨基酸残基效应相反, 证明细胞水平适应的短期调节中, 离子敏感度降低的异构效应更多是长期适应的结果。

5 讨论

分子适应性变化只受到少数功能位点的限制, 除了证明血红蛋白基因符合一般功能蛋白的进化规律外, 还说明大多数种群水平的进化改变是由随机漂变等中性机制引起的, 且受到并不显著的空间选择作用, 这种选择性改变并不一定和低氧适应功能直接相关^[81], 但是可能位于与低氧适应直接相关的功能域^[176], 并体现出空间分化选择^[81,176,178]和不同的表型可塑性^[21,151,179,180], 后者反映出不同的进化途径 (图 3)。同时, 有限的适应性进化功能位点限制了分子可选择的适应性策略, 成为系统分化物种间及远缘种间相同发育阶段 Hbs 趋同进化的同源性基础^[35,76]。在此基础上, 利用点诱导突变重组具有重要氨基酸变异位点的 Hbs, 例如, 高海拔耐受土著和迁移物种间, 表明个别点突变能改变多聚体蛋白分子内亚基间接触力, 从而为高海拔低氧适应的氧呼吸代谢提供重要的选择优势。而将鸟类和哺乳类的研究结果与蛋白质工程技术相结合, 在人类体内表达突变体, 为人类低氧适应 Hbs 的设计或者特定病理学 Hbs 研究提供有重要价值的参考^[181]。

然而, 脊椎动物的低氧耐受是通过降低代谢、保护和防止低氧细胞损伤和凋亡, 并对分子、细胞和系统水平的功能整合实现的。如果缺乏细胞和系统水平(如野外驯化实验)的功能实验验证, 单纯从有限的分子机制不足以理解低氧适应进化的实际规律, 也无法对临床预防低氧损伤研究提供基础研究背景和提出新的策略^[26]。在此意义上, 通过功能基因研究脊椎动物的低氧适应进化机制应该根据分子机制选择对应的细胞或器官系统水平进行功能机理实验, 如 Hbs 或 HIF 家族的细胞水平调控机制, Mb 和 GbE 的细胞水平调控机制与器官特异性的关系等。同时, 除了对应特定功能基因的分子适应机制外, 还应该考

虑整个脊椎动物进化史中的趋同和趋异规律, 才能更好地完善对极端环境下不同类群特异性适应进化机制的研究方案并找到最终答案。

由分子进化规律和适应机制可见, Hbs 既可以保守地反映一定的脊椎动物的系统进化规律, 又可以体现分子进化本身的普遍和特殊机制, 包括基因多效性(氧代谢通路上的不同作用)和异位显性作用(标志性), 尤其是比较高海拔世居的土著动物和短期移居动物的种内和种间分子适应机制。另一方面, 高海拔低氧适应研究需要考虑动物类群的系统发育规律和种群历史, 以及所适应环境的具体特点, 例如, 受纬度和季节性共同影响的大气压海拔效应^[19]可能是造成藏人和安第斯人(远离赤道)与埃塞俄比亚高原人群(赤道附近)遗传基础差异的原因之一^[83]。在整个过程中, 生理功能实验和系统进化分析的结合对研究功能基因适应性进化本身有重要意义。

无论在低氧适应进化和高原医学研究领域, 对血红蛋白的研究都占有不可替代的重要地位。人类高原病研究在基因组学 (genomics)- 转录组学 (transcriptomics)- 外显子组 (exomics)- 代谢组学 (metabolomics)- 蛋白质组学 (proteomics) 的“omics”时代仍然没有完全摸清低氧适应机理及其进化机制^[110,182], 生理和病理学研究的各种悖论可以适应进化的适合度理论^[183,184]来解释, 同一遗传背景下的低海拔移居人群对高原适应与短时间进入高原过程中的未适应状态分别可能发生 CMS 和 AMS 两种病理表型, 而比较在不同遗传背景下的高原土著和低海拔移居人群在适应过程中分别出现的适应和非适应 (maladaptation) 病理表型, 表现为 CMS 的舒缓和加剧^[83]。不同地域的高原土著人群适应程度不同, 首先和他们本身的遗传背景(如藏族特有的丹尼索瓦人祖征^[185])密切相关, 进一步的溯祖理论 (coalescent theory)^[186]分析发现由较早分化高原人群的高海拔迁移时间和 CMS 分枝的较短分化时间共同决定了是否具有 CMS 表型的分化^[115], 每种不同表型都是适应进化过程中的一个环节, 整合分析可以打破单一分析方法^[18]和研究对象^[187]的局限性。

由于各种研究方法都有其局限性, 即使是前沿的组学技术, 其显著性同时受到样本量、种群特异性和生物学过程的趋同性及基因多效性的限制。因此, 候选基因研究方法对人类高原病的预防和治疗有组学研究不可替代的参考价值^[182], 近年来的研究焦点

已从组学领域过渡到已知生理功能网络的候选基因, 如 HIF 通路. 进化生物学的系统发育方法作为对候选基因预测的无偏估计^[115], 是对受限于样本量的基因组 SNP 基因型筛选、局部基因组候选区域的补充, 通过进化生物学的最近共祖理论 (the most recent common ancestor, TMRCA), 系统发育树的拓扑结构比较, 分化时间和祖先性状推断, 可以确定高海拔迁移发生的时间及受到的自然选择效应, 并进一步推断受选择的基因组区域, 从而以进化中的自然选择原理和种群遗传显著性解释和推断高原病成因, 为高原医学研究提供了很好的范例^[115]. 同时高原土

著、世居和迁移种或种群(如高低海拔人群)是脊椎动物低氧适应研究和高原医学研究的理想模型.

在生理功能实验对表型分化的验证基础上, 进一步深入分析分子遗传规律, 如异位显性规律, 包括高级结构的构象标志异位显性^[188]. 同时, 基因间异位显性效应又可能形成生态成种的遗传架构基础^[189], 因此分子进化和物种进化规律可能统一于同一种进化机制, 在同一体系中研究诸如高海拔适应等进化过程中的微进化和宏进化现象及成因, 针对解释不同层面问题的研究对象, 为基于功能蛋白的生物进化问题提供更加全面的解决方案.

参考文献

- 1 Koch L G, Britton S L. Aerobic metabolism underlies complexity and capacity. *J Physiol*, 2008, 586: 83–95
- 2 Thannickal V J. Oxygen in the evolution of complex life and the price we pay. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2009, 40: 507–510
- 3 Richalet J P. A proposed classification of environmental adaptation: the example of high altitude. *Rev Environ Sci Bio*, 2007, 6: 223–229
- 4 Brown E A. Genetic explorations of recent human metabolic adaptations: hypotheses and evidence. *Biol Rev Camb Philos Soc*, 2012, 87: 838–855
- 5 Weber R E, Ostojic H, Fago A, et al. Novel mechanism for high-altitude adaptation in hemoglobin of the Andean frog *Telmatobius peruvianus*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2002, 283: 1052–1060
- 6 Rezende E L, Gomes F R, Ghalambor C K, et al. An evolutionary frame of work to study physiological adaptation to high altitudes. *Rev Chil Hist Nat*, 2005, 78: 323–336
- 7 Cheviron Z A, Brumfield R T. Migration-selection balance and local adaptation of mitochondrial haplotypes in Rufous-collared sparrows (*Zonotrichia capensis*) along an elevational gradient. *Evolution*, 2009, 63: 1593–1605
- 8 Storz J F, Scott G R, Cheviron Z A. Phenotypic plasticity and genetic adaptation to high-altitude hypoxia in vertebrates. *J Exp Biol*, 2010, 213: 4125–4136
- 9 Cheviron Z A, Bachman G C, Storz J F. Contributions of phenotypic plasticity to differences in thermogenic performance between highland and lowland deer mice. *J Exp Biol*, 2013, 216: 1160–1166
- 10 Galen S C, Natarajan C, Moriyama H, et al. Contribution of a mutational hot spot to hemoglobin adaptation in high-altitude Andean house wrens. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112: 13958–13963
- 11 Wake D B, Wake M H, Specht C D. Homoplasy: from detecting pattern to determining process and mechanism of evolution. *Science*, 2011, 331: 1032–1035
- 12 Orsini L, Andrew R, Eizaguirre C. Evolutionary ecological genomics. *Mol Ecol*, 2013, 22: 527–531
- 13 Monge C, Leon-Velarde F. Physiological adaptation to high altitude: oxygen transport in mammals and birds. *Physiol Rev*, 1991, 71: 1135–1172
- 14 Storz J F, Moriyama H. Mechanisms of hemoglobin adaptation to high altitude hypoxia. *High Alt Med Biol*, 2008, 9: 148–157
- 15 McCracken K G, Barger C P, Bulgarella M, et al. Signatures of high-altitude adaptation in the major hemoglobin of five species of Andean dabbling ducks. *Am Nat*, 2009, 174: 631–650
- 16 Peng Y, Yang Z, Zhang H, et al. Genetic variations in Tibetan populations and high-altitude adaptation at the Himalayas. *Mol Biol Evol*, 2011, 28: 1075–1081
- 17 Beall C M. Two routes to functional adaptation: Tibetan and Andean high-altitude natives. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104 Suppl 1: 8655–8660
- 18 Storz J F, Wheat C W. Integrating evolutionary and functional approaches to infer adaptation at specific loci. *Evolution*, 2010, 64: 2489–2509
- 19 West J B, Lahiri S, Maret K H, et al. Barometric pressures at extreme altitudes on Mt. Everest: physiological significance. *J Appl Physiol*, 1983, 54: 1188–1194
- 20 Weber R E, Campbell K L. Temperature dependence of haemoglobin-oxygen affinity in heterothermic vertebrates: mechanisms and biological significance. *Acta Physiol (Oxf)*, 2011, 202: 549–562

- 21 Cheviron Z A, Whitehead A, Brumfield R T. Transcriptomic variation and plasticity in Rufous-collared sparrows (*Zonotrichia capensis*) along an altitudinal gradient. *Mol Ecol*, 2008, 17: 4556–4569
- 22 Wood S C, Gonzales R. Hypothermia in hypoxic animals: mechanisms, mediators, and functional significance. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 1996, 113: 37–43
- 23 Scott G R, Cadena V, Tattersall G J, et al. Body temperature depression and peripheral heat loss accompany the metabolic and ventilatory responses to hypoxia in low and high altitude birds. *J Exp Biol*, 2008, 211: 1326–1335
- 24 Dosek A, Ohno H, Acs Z, et al. High altitude and oxidative stress. *Respir Physiol Neurobiol*, 2007, 158: 128–131
- 25 Yang S, Feng E, Yan Z, et al. Effect of oxidative stress in development of acute high altitude response during the process of strong physical work at high altitude. *Chin J Appl Physiol*, 2011, 27: 457–460
- 26 Ramirez J M, Folkow L P, Blix A S. Hypoxia tolerance in mammals and birds: from the wilderness to the clinic. *Annu Rev Physiol*, 2007, 69: 113–143
- 27 Powell F L. The influence of chronic hypoxia upon chemoreception. *Respir Physiol Neurobiol*, 2007, 157: 154–161
- 28 Li X, Wu Z, Wang Y, et al. Characterization of adult α - and β -globin elevated by hydrogen peroxide in cervical cancer cells that play a cytoprotective role against oxidative insults. *PLoS One*, 2013, 8: e54342
- 29 Perutz M F. Species adaptation in a protein molecule. *Mol Biol Evol*, 1983, 1: 1–28
- 30 Prisco G D, Giardina B, Weber R E. Hemoglobin Function in Vertebrates: Molecular Adaptation in Extreme and Temperate Environments. Milan: Springer-Verlag Italia Srl, 2000. 126
- 31 Storz J F, Natarajan C, Cheviron Z A, et al. Altitudinal variation at duplicated β -globin genes in deer mice: effects of selection, recombination, and gene conversion. *Genetics*, 2012, 190: 203–216
- 32 Straub A C, Lohman A W, Billaud M, et al. Endothelial cell expression of haemoglobin α regulates nitric oxide signaling. *Nature*, 2012, 491: 473–477
- 33 Rummer J L, McKenzie D J, Innocenti A, et al. Root effect hemoglobin may have evolved to enhance general tissue oxygen delivery. *Science*, 2013, 340: 1327–1329
- 34 Natarajan C, Inoguchi N, Weber R E, et al. Epistasis among adaptive mutations in Deer mouse hemoglobin. *Science*, 2013, 340: 1324–1327
- 35 Weber R E. Hemoglobin adaptations to hypoxia and altitude—the phylogenetic perspective. In: Sutton J R, Houston C S, Coates G, eds. *Hypoxia and the Brain*. Burlington: Queen City Printers, 1995. 33–38
- 36 McCracken K G, Barger C P, Sorenson M D. Phylogenetic and structural analysis of the HbA (α A/ β A) and HbD (α D/ β D) hemoglobin genes in two high-altitude waterfowl from the Himalayas and the Andes: Bar-headed goose (*Anser indicus*) and Andean goose (*Chloephaga melanoptera*). *Mol Phylogenet Evol*, 2010, 56: 649–658
- 37 Yang Z. Inference of selection from multiple species alignments. *Curr Opin Genet Dev*, 2002, 12: 688–694
- 38 Yang Z, Bielawski J P. Statistical methods for detecting molecular adaptation. *Trends Ecol Evol*, 2000, 15: 496–503
- 39 Burmester T, Hankeln T. What is the function of neuroglobin? *J Exp Biol*, 2009, 212: 1423–1428
- 40 Burmester T, Hankeln T. Function and evolution of vertebrate globins. *Acta Physiol (Oxf)*, 2014, 211: 501–514
- 41 Schwarze K, Campbell K L, Hankeln T, et al. The globin gene repertoire of lampreys: convergent evolution of hemoglobin and myoglobin in jawed and jawless vertebrates. *Mol Biol Evol*, 2014, 31: 2708–2721
- 42 Dickerson R E, Geis I. Hemoglobin structure and function. In: Hagopian P, ed. *Hemoglobin: Structure, Function, Evolution, and Pathology*. New York: The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc, 1983. 103–108
- 43 Ordway G A, Garry D J. Myoglobin: an essential hemoprotein in striated muscle. *J Exp Biol*, 2004, 207: 3441–3446
- 44 Avivi A, Gerlach F, Joel A, et al. Neuroglobin, cytoglobin, and myoglobin contribute to hypoxia adaptation of the subterranean mole rat spalax. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107: 21570–21575
- 45 Campbell K L, Roberts J E, Watson L N, et al. Substitutions in Woolly mammoth hemoglobin confer biochemical properties adaptive for cold tolerance. *Nat Genet*, 2010, 42: 536–540
- 46 Moore L G, Zamudio S, Zhuang J G, et al. Analysis of the myoglobin gene in Tibetans living at high altitude. *High Alt Med Biol*, 2002, 3: 39–47
- 47 Nery M F, Arroyo J I, Opazo J C. Accelerated evolutionary rate of the myoglobin gene in long-diving whales. *J Mol Evol*, 2013, 76: 380–387
- 48 Mirceta S, Signore A V, Burns J M, et al. Evolution of mammalian diving capacity traced by myoglobin net surface charge. *Science*, 2013, 340: 1234192
- 49 Hoffmann F G, Opazo J C, Storz J F. Differential loss and retention of cytoglobin, myoglobin, and Globin-E during the radiation of vertebrates. *Genome Biol Evol*, 2011, 3: 588–600

- 50 Storz J F, Opazo J C, Hoffmann F G. Phylogenetic diversification of the globin gene superfamily in chordates. *IUBMB Life*, 2011, 63: 313–322
- 51 Schwarze K, Burmester T. Conservation of globin genes in the “living fossil” *Latimeria chalumnae* and reconstruction of the evolution of the vertebrate globin family. *Biochem Biophys Acta*, 2013, 1834: 1801–1812
- 52 Blank M, Kiger L, Thielebein A, et al. Oxygen supply from the bird’s eye perspective: globin e is a respiratory protein in the chicken retina. *J Biol Chem*, 2011, 286: 26507–26515
- 53 Richter F, Meurers B H, Zhu C, et al. Neurons express hemoglobin α - and β -chains in rat and human brains. *J Comp Neurol*, 2009, 515: 538–547
- 54 Russo R, Zucchelli S, Codrich M, et al. Hemoglobin is present as a canonical $\alpha 2\beta 2$ tetramer in dopaminergic neurons. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1834: 1939–1943
- 55 Liu L, Zeng M, Stamler J S. Hemoglobin induction in mouse macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 6643–6647
- 56 Wride M A, Mansergh F C, Adams S, et al. Expression profiling and gene discovery in the mouse lens. *Mol Vis*, 2003, 9: 360–396
- 57 Newton D A, Rao K M, Dluhy R A, et al. Hemoglobin is expressed by alveolar epithelial cells. *J Biol Chem*, 2006, 281: 5668–5676
- 58 Nishi H, Inagi R, Kato H, et al. Hemoglobin is expressed by mesangial cells and reduces oxidant stress. *J Am Soc Nephrol*, 2008, 19: 1500–1508
- 59 Emara M, Turner A R, Allalunis-Turner J. Hypoxia differentially upregulates the expression of embryonic, fetal and adult hemoglobin in human glioblastoma cells. *Int J Oncol*, 2014, 44: 950–958
- 60 Vani R, Reddy C S, Asha Devi S. Oxidative stress in erythrocytes: a study on the effect of antioxidant mixtures during intermittent exposures to high altitude. *Int J Biometeorol*, 2010, 54: 553–562
- 61 Shiva S, Rassaf T, Patel R P, et al. The detection of the nitrite reductase and no-generating properties of haemoglobin by mitochondrial inhibition. *Cardiovasc Res*, 2011, 89: 566–573
- 62 Mairbaurl H, Weber R E. Oxygen transport by hemoglobin. *Compr Physiol*, 2012, 2: 1463–1489
- 63 Weber R E. Hemoglobin adaptations to hypoxia and altitude—the phylogenetic perspective. In: Sutton J R, Houston C S, Coates G, eds. *Hypoxia and the Brain*. Burlington Queen City Printers, 1995. 31–44
- 64 Weber R E. High-altitude adaptations in vertebrate hemoglobins. *Respir Physiol Neurobiol*, 2007, 158: 132–142
- 65 Arnold K, Bordoli L, Kopp J, et al. The swiss-model workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics*, 2006, 22: 195–201
- 66 Bordoli L, Kiefer F, Arnold K, et al. Protein structure homology modeling using swiss-model workspace. *Nat Protocols*, 2008, 4: 1–13
- 67 Kiefer F, Arnold K, Kunzli M, et al. The swiss-model repository and associated resources. *Nucleic Acids Res*, 2009, 37: D387–D392
- 68 Guex N, Peitsch M C. Swiss-model and the swiss-pdbviewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis*, 1997, 18: 2714–2723
- 69 Yuan Y, Tam M F, Simplaceanu V, et al. New look at hemoglobin allostery. *Chem Rev*, 2015, 115: 1702–1724
- 70 Grispo M T, Natarajan C, Projecto-Garcia J, et al. Gene duplication and the evolution of hemoglobin isoform differentiation in birds. *J Biol Chem*, 2012, 287: 37647–37658
- 71 Weber R E, Fago A. Functional adaptation and its molecular basis in vertebrate hemoglobins, neuroglobins and cytoglobins. *Respir Physiol Neurobiol*, 2004, 144: 141–159
- 72 Bulgarella M, Peters J L, Kopuchian C, et al. Multilocus coalescent analysis of haemoglobin differentiation between low- and high-altitude populations of Crested ducks (*Lophonetta specularioides*). *Mol Ecol*, 2012, 21: 350–368
- 73 Projecto-Garcia J, Natarajan C, Moriyama H, et al. Repeated elevational transitions in hemoglobin function during the evolution of Andean hummingbirds. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110: 20669–20674
- 74 Bohr C, Hasselbalch K, Krogh A. About a new biological relation of high importance that the blood carbonic acid tension exercises on its oxygen binding. *Skand Arch Physiol*, 1904, 16: 402–412
- 75 Perutz M F, Muirhead H, Mazzarella L, et al. Identification of residues responsible for the alkaline Bohr effect in haemoglobin. *Nature*, 1969, 222: 1240–1243
- 76 Weber R E. Molecular strategies in the adaptation in vertebrate hemoglobin function. In: Wood S C, Weber R E, eds. *Physiological Adaptations in Vertebrates: Respiration, Circulation, and Metabolism*. New York: Marcel Dekker, 1992. 258–259
- 77 Gillen R G, Riggs A. Enhancement of alkaline Bohr effect of some fish hemoglobins with adenosine-triphosphate. *Arch Biochem Biophys*, 1977, 183: 678–685
- 78 Maginniss L A. Red cell organic phosphates and Bohr effects in house sparrow blood. *Respir Physiol*, 1985, 59: 93–103
- 79 Roncales P, Martin M, Pineda M, et al. Metabolism of the organic phosphate regulators of oxygenation in cells of the erythrocyte series in birds and mammals. *Rev Esp Fisiol*, 1982, 38 Suppl: 87–90

- 80 McCracken K G, Barger C P, Bulgarella M, et al. Parallel evolution in the major haemoglobin genes of eight species of Andean waterfowl. *Mol Ecol*, 2009, 18: 3992–4005
- 81 Cheviron Z A, Natarajan C, Projecto-Garcia J, et al. Integrating evolutionary and functional tests of adaptive hypotheses: a case study of altitudinal differentiation in hemoglobin function in an Andean sparrow, *Zonotrichia capensis*. *Mol Biol Evol*, 2014, 31: 2948–2962
- 82 Hsia C C, Schmitz A, Lambert M, et al. Evolution of air breathing: oxygen homeostasis and the transitions from water to land and sky. *Compr Physiol*, 2013, 3: 849–915
- 83 West J B. High-altitude medicine. *Am J Respir Crit Care Med*, 2012, 186: 1229–1237
- 84 Storz J F. Genes for high altitudes. *Science*, 2010, 329: 40–41
- 85 Tashi T, Feng T, Koul P, et al. High altitude genetic adaptation in Tibetans: no role of increased hemoglobin-oxygen affinity. *Blood Cells Mol Dis*, 2014, 53: 27–29
- 86 Tucher V A. Respiratory physiology of house sparrows in relation to high-altitude flight. *J Exp Biol*, 1968, 48: 55–66
- 87 Scott G R, Meir J U, Hawkes L A, et al. Point: counterpoint: high altitude is/is not for the birds. *J Appl Physiol*, 2011, 111: 1514–1519
- 88 Scott G R. Elevated performance: the unique physiology of birds that fly at high altitudes. *J Exp Biol*, 2011, 214: 2455–2462
- 89 Meir J U, Milsom W K. High thermal sensitivity of blood enhances oxygen delivery in the high-flying bar-headed goose. *J Exp Biol*, 2013, 216: 2172–2175
- 90 Nothum R, Weber R E, Kusters J, et al. Amino-acid-sequences and functional differentiation of hemoglobin A and D from Swift (*Apus apus*, Apodiformes). *Biol Chem Hoppe-Seyler*, 1989, 370: 1197–1207
- 91 Gill F B. Metabolism. In: Corrae J, ed. *Ornithology*. 3rd ed. New York: W.H. Freeman And Company, 2007. 150–152
- 92 Kilgore D L, Jr., Boggs D F, Kilgore T J, et al. Ventilatory and metabolic responses of Burrowing owls, *Athene cunicularia*, to moderate and extreme hypoxia: analysis of the hypoxic ventilatory threshold vs. hemoglobin oxygen affinity relationship in birds. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 2008, 150: 247–257
- 93 Cheviron Z A, Brumfield R T. Genomic insights into adaptation to high-altitude environments. *Heredity*, 2011, 108: 354–361
- 94 Faraci F M. Adaptations to hypoxia in birds—how to fly high. *Annu Rev Physiol*, 1991, 53: 59–70
- 95 李慧敏, 谢月辉, 刘次全, 等. 蛋白质折叠、动力学以及蛋白质-配体结合的物理化学基础. *中国科学: 生命科学*, 2014, 44: 433–449
- 96 Scott G R, Schulte P M, Egginton S, et al. Molecular evolution of Cytochrome C oxidase underlies high-altitude adaptation in the Bar-headed goose. *Mol Biol Evol*, 2011, 28: 351–363
- 97 Liu Y, Dong D, Han N J, et al. Molecular cloning and evolutionary analysis of hemoglobin α -chain genes in bats. *Biochem Genet*, 2009, 47: 257–265
- 98 Riggs A F. Self-association, cooperativity and supercooperativity of oxygen binding by hemoglobins. *J Exp Biol*, 1998, 201: 1073–1084
- 99 Rana M S, Riggs A F. Indefinite noncooperative self-association of chicken deoxy hemoglobin D. *Proteins*, 2011, 79: 1499–1512
- 100 Prisco G D, Giardina B, Weber R E, eds. *Hemoglobin Function in Vertebrates: Molecular Adaptation in Extreme and Temperate Environments*. Milan: Springer-Verlag Italia Srl, 2000. 83–96
- 101 Riggs A F. The Bohr effect. *Annu Rev Physiol*, 1988, 50: 181–204
- 102 Berenbrink M. Evolution of vertebrate haemoglobins: histidine side chains, specific buffer value and Bohr effect. *Respir Physiol Neurobiol*, 2006, 154: 165–184
- 103 Weber R E. Enthalpic consequences of reduced chloride binding in Andean frog (*Telmatobius peruvianus*) hemoglobin. *J Comp Physiol B*, 2014, 184: 613–621
- 104 Damsgaard C, Storz J F, Hoffmann F G, et al. Hemoglobin isoform differentiation and allosteric regulation of oxygen binding in the turtle, *Trachemys scripta*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2013, 305: R961–R967
- 105 Weber R E, Fago A, Malte H, et al. Lack of conventional oxygen-linked proton and anion binding sites does not impair allosteric regulation of oxygen binding in Dwarf caiman hemoglobin. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2013, 305: R300–R312
- 106 Rollema H S, Bauer C. The interaction of inositol pentaphosphate with the hemoglobins of highland and lowland geese. *J Biol Chem*, 1979, 254: 12038–12043
- 107 Bunn H F. Differences in the interaction of 2,3-diphosphoglycerate with certain mammalian hemoglobins. *Science*, 1971, 172: 1049–1050
- 108 Taketa F. Organic phosphates and hemoglobin structure-function relationships in the feline. *Ann N Y Acad Sci*, 1974, 241: 524–537
- 109 Scott A F, Bunn H F, Brush A H. The phylogenetic distribution of red cell 2,3-diphosphoglycerate and its interaction with mammalian hemoglobins. *J Exp Zool*, 1977, 201: 269–288
- 110 Larson J, Drew K L, Folkow L P, et al. No oxygen? No problem! Intrinsic brain tolerance to hypoxia in vertebrates. *J Exp Biol*, 2014, 217: 1024–1039
- 111 Yi X, Liang Y, Huerta-Sanchez E, et al. Sequencing of 50 human exomes reveals adaptation to high altitude. *Science*, 2010, 329: 75–78
- 112 Bigham A W, Wilson M J, Julian C G, et al. Andean and Tibetan patterns of adaptation to high altitude. *Am J Hum Biol*, 2013, 25:

- 190–197
- 113 Lahiri S, Roy A, Baby S M, et al. Oxygen sensing in the body. *Prog Biophys Mol Biol*, 2006, 91: 249–286
- 114 Maxwell P H. Hypoxia-inducible factor as a physiological regulator. *Exp Physiol*, 2005, 90: 791–797
- 115 Ronen R, Zhou D, Bafna V, et al. The genetic basis of chronic mountain sickness. *Physiology (Bethesda)*, 2014, 29: 403–412
- 116 Goodman M, Weiss M L, Czelusniak J. Molecular evolution above the species level—branching pattern, rates, and mechanisms. *Syst Zool*, 1982, 31: 376–399
- 117 Tufts D M, Natarajan C, Revsbech I G, et al. Epistasis constrains mutational pathways of hemoglobin adaptation in high-altitude pikas. *Mol Biol Evol*, 2015, 32: 287–298
- 118 McBee R M, Rozmiarek S A, Meyerson N R, et al. The effect of species representation on the detection of positive selection in primate gene data sets. *Mol Biol Evol*, 2015, 32: 1091–1096
- 119 Storz J F, Opazo J C, Hoffmann F G. Gene duplication, genome duplication, and the functional diversification of vertebrate globins. *Mol Phylogenet Evol*, 2013, 66: 469–478
- 120 Hoffmann F G, Opazo J C, Storz J F. New genes originated via multiple recombinational pathways in the β -globin gene family of rodents. *Mol Biol Evol*, 2008, 25: 2589–2600
- 121 Hoffmann F G, Storz J F, Gorr T A, et al. Lineage-specific patterns of functional diversification in the α - and β -globin gene families of tetrapod vertebrates. *Mol Biol Evol*, 2010, 27: 1126–1138
- 122 Hoffmann F G, Opazo J C, Storz J F. Whole-genome duplications spurred the functional diversification of the globin gene superfamily in vertebrates. *Mol Biol Evol*, 2012, 29: 303–312
- 123 Storz J F, Hoffmann F G, Opazo J C, et al. Adaptive functional divergence among triplicated α -globin genes in rodents. *Genetics*, 2008, 178: 1623–1638
- 124 Lynch M, Katju V. The altered evolutionary trajectories of gene duplicates. *Trends Genet*, 2004, 20: 544–549
- 125 Spofford J B. Heterosis and the evolution of duplications. *Am Nat*, 1969, 103: 407–432
- 126 Proulx S R, Phillips P C. Allelic divergence precedes and promotes gene duplication. *Evolution*, 2006, 60: 881–892
- 127 Hiebl I, Weber R E, Schneegans D, et al. High-altitude respiration of birds. Structural adaptations in the major and minor hemoglobin components of adult Ruppell's griffon (*Gyps rueppelli*, Aegypiinae): a new molecular pattern for hypoxic tolerance. *Biol Chem Hoppe Seyler*, 1988, 369: 217–232
- 128 Weber R E, Hiebl I, Braunitzer G. High altitude and hemoglobin function in the vultures *Gyps rueppellii* and *Aegyptius monachus*. *Biol Chem Hoppe Seyler*, 1988, 369: 8
- 129 Reinhard N, Gerhard B, Inge H, et al. The hemoglobins of the adult Blackbird (*Turdus merula*, Passeriformes). The sequence of the major (HbA) and minor component (HbD). *Biol Chem Hoppe Seyler*, 1989, 370: 309
- 130 Weber R E, Lalthantluanga R, Braunitzer G. Functional characterization of fetal and adult yak hemoglobins: an oxygen binding cascade and its molecular basis. *Arch Biochem Biophys*, 1988, 263: 199–203
- 131 Gaudry M J, Storz J F, Butts G T, et al. Repeated evolution of chimeric fusion genes in the β -globin gene family of Laurasiatherian mammals. *Genome Biol Evol*, 2014, 6: 1219–1234
- 132 Winslow R M. The role of hemoglobin oxygen affinity in oxygen transport at high altitude. *Respir Physiol Neurobiol*, 2007, 158: 121–127
- 133 Butler P J. High fliers: the physiology of Bar-headed geese. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 2010, 156: 325–329
- 134 Beall C M. Andean, Tibetan, and Ethiopian patterns of adaptation to high-altitude hypoxia. *Integr Comp Biol*, 2006, 46: 18–24
- 135 Mathieu-Costello O, Agey P J, Wu L, et al. Increased fiber capillarization in flight muscle of finch at altitude. *Resp Physiol*, 1998, 111: 189–199
- 136 Hepple R T, Agey P J, Hazelwood L, et al. Increased capillarity in leg muscle of finches living at altitude. *J Appl Physiol*, 1998, 85: 1871–1876
- 137 Appenzeller O, Minko T, Qualls C, et al. Gene expression, autonomic function and chronic hypoxia: lessons from the Andes. *Clin Auton Res*, 2006, 16: 217–222
- 138 Saunders D K, Fedde M R. Physical conditioning—effect on the myoglobin concentration in skeletal and cardiac-muscle of Bar-headed geese. *Comp Biochem Physiol A Physiol*, 1991, 100: 349–352
- 139 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 Mol Biol*, 2001, 313: 123–137
- 140 Liang Y H, Liu X Z, Liu S H, et al. The structure of Greylag goose oxy haemoglobin: the roles of four mutations compared with Bar-headed goose haemoglobin. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2001, 57: 1850–1856

- 141 Manconi B, Olianias A, Sanna M T, et al. Functional characterization of the single hemoglobin of the migratory bird *Ciconia ciconia*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 2007, 147: 242–249
- 142 Simonson T S, Yang Y, Huff C D, et al. Genetic evidence for high-altitude adaptation in Tibet. *Science*, 2010, 329: 72–75
- 143 Weber R E, Jessen T H, Malte H, et al. Mutant hemoglobins (alpha 119-Ala and beta 55-Ser): functions related to high-altitude respiration in geese. *J Appl Physiol*, 1993, 75: 2646–2655
- 144 Orr H A. The genetic theory of adaptation: a brief history. *Nat Rev Genet*, 2005, 6: 119–127
- 145 Orr H A. The probability of parallel evolution. *Evolution*, 2005, 59: 216–220
- 146 Zhang J, Hua Z, Tame J R, et al. The crystal structure of a high oxygen affinity species of haemoglobin (Bar-headed goose haemoglobin in the oxy form). *J Mol Biol*, 1996, 255: 484–493
- 147 Jessen T H, Weber R E, Fermi G, et al. Adaptation of bird hemoglobins to high altitudes: demonstration of molecular mechanism by protein engineering. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88: 6519–6522
- 148 Weinreich D M. The rank ordering of genotypic fitness values predicts genetic constraint on natural selection on landscapes lacking sign epistasis. *Genetics*, 2005, 171: 1397–1405
- 149 Weinreich D M, Watson R A, Chao L. Perspective: sign epistasis and genetic constraint on evolutionary trajectories. *Evolution*, 2005, 59: 1165–1174
- 150 Weinreich D M, Lan Y, Wylie C S, et al. Should evolutionary geneticists worry about higher-order epistasis? *Curr Opin Genet Dev*, 2013, 23: 700–707
- 151 Tufts D M, Revsbech I G, Cheviron Z A, et al. Phenotypic plasticity in blood-oxygen transport in highland and lowland deer mice. *J Exp Biol*, 2013, 216: 1167–1173
- 152 Gould S J. Exaptation: a crucial tool for an evolutionary psychology. *J Soc Iss*, 1991, 47: 43–65
- 153 Rezende E L, Diniz-Filho J A. Phylogenetic analyses: comparing species to infer adaptations and physiological mechanisms. *Compr Physiol*, 2012, 2: 639–674
- 154 Pena F, Ramirez J M. Hypoxia-induced changes in neuronal network properties. *Mol Neurobiol*, 2005, 32: 251–283
- 155 Xu S, Li S, Yang Y, et al. A genome-wide search for signals of high-altitude adaptation in Tibetans. *Mol Biol Evol*, 2011, 28: 1003–1011
- 156 Turek Z, Kreuzer F, Scotto P, et al. The effect of blood O₂ affinity on the efficiency of O₂ transport in blood at hypoxic hypoxia. *Adv Exp Med Biol*, 1984, 180: 357–368
- 157 Turek Z, Kreuzer F, Hoofd L J C. Advantage or disadvantage of a decrease of blood oxygen affinity for tissue oxygen supply at hypoxia—theoretical study comparing man and rat. *Pflug Arch Eur J Phy*, 1973, 342: 185–197
- 158 Dean A M, Thornton J W. Mechanistic approaches to the study of evolution: the functional synthesis. *Nat Rev Genet*, 2007, 8: 675–688
- 159 Dickerson R E, Geis I. Hemoglobin structure and function In: Hagopian P, ed. *Hemoglobin: Structure, Function, Evolution, and Pathology*. New York: The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc, 1983. 98–101
- 160 Hedges S B. Molecular evidence for the origin of birds. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91: 2621–2624
- 161 Reitman M, Grasso J A, Blumenthal R, et al. Primary sequence, evolution, and repetitive elements of the *Gallus gallus* (chicken) β -globin cluster. *Genomics*, 1993, 18: 616–626
- 162 Alev C, Shinmyozu K, McIntyre B A, et al. Genomic organization of Zebra finch α and β globin genes and their expression in primitive and definitive blood in comparison with globins in chicken. *Dev Genes Evol*, 2009, 219: 353–360
- 163 Zimmermann J G, Kusters J, Braunitzer G, et al. Structural adaptation of bird hemoglobins to high-altitude respiration and the primary sequences of Black-headed gull (*Larus ridibundus*, Charadriiformes) α^A - and β/β' -chains. 1988, 369: 341–348
- 164 Isaacks R, Harkness D, Sampsel R, et al. Studies on avian erythrocyte metabolism. Inositol tetrakisphosphate: the major phosphate compound in the erythrocytes of the Ostrich (*Struthio camelus camelus*). *Eur J Biochem*, 1977, 77: 567–574
- 165 Hamilton M N, Edelstein S J. Cat hemoglobin: pH dependence of cooperativity and ligand binding. *J Biol Chem*, 1974, 249: 1323–1329
- 166 Simonson T S, Wei G, Wagner H E, et al. Increased blood-oxygen binding affinity in Tibetan and Han chinese residents at 4200 m. *Exp Physiol*, 2014, 99: 1624–1635
- 167 Simonson T S, Wei G, Wagner H E, et al. Low haemoglobin concentration in Tibetan males is associated with greater high-altitude exercise capacity. *J Physiol*, 2015, 593: 3207–3218
- 168 Wuren T, Simonson T S, Qin G, et al. Shared and unique signals of high-altitude adaptation in geographically distinct Tibetan populations. *PLoS One*, 2014, 9: e88252
- 169 Watt W B, Dean A M. Molecular-functional studies of adaptive genetic variation in prokaryotes and eukaryotes. *Annu Rev Genet*, 2000, 34: 593–622
- 170 Perutz M F. Structure and function of haemoglobin. *J Mol Biol*, 1965, 14: 645
- 171 Lesk A. The evolution of the globins: we thought we understood it. In: Bastolla U, Porto M, eds. *Structural Approaches to Sequence Evolution*. Berlin: Springer Berlin Heidelberg, 2007. 57–74

- 172 Mailliet D H, Simplaceanu V, Shen T J, et al. Interfacial and distal-heme pocket mutations exhibit additive effects on the structure and function of hemoglobin. *Biochemistry*, 2008, 47: 10551–10563
- 173 Goodman M, Moore G W, Matsuda G. Darwinian evolution in the genealogy of haemoglobin. *Nature*, 1975, 253: 603–608
- 174 Hopkins S R, Powell F L. Common themes of adaptation to hypoxia—insights from comparative physiology. *Adv Exp Med Biol*, 2001, 502: 153–167
- 175 Yuan Y, Byrd C, Shen T J, et al. Role of $\beta/\beta101\text{Gln}$ in regulating the effect of temperature and allosteric effectors on oxygen affinity in Woolly mammoth hemoglobin. *Biochemistry*, 2013, 52: 8888–8897
- 176 Storz J F, Sabatino S J, Hoffmann F G, et al. The molecular basis of high-altitude adaptation in Deer mice. *PLoS Genet*, 2007, 3: e45
- 177 Revsbech I G, Tufts D M, Projecto-Garcia J, et al. Hemoglobin function and allosteric regulation in Semi-fossorial rodents (family Sciuridae) with different altitudinal ranges. *J Exp Biol*, 2013, 216: 4264–4271
- 178 Storz J F, and Kelly J K. Effects of spatially varying selection on nucleotide diversity and linkage disequilibrium: insights from Deer mouse globin genes. *Genetics*, 2008, 180: 367–379
- 179 Brutsaert T D. Population genetic aspects and phenotypic plasticity of ventilatory responses in high altitude natives. *Respir Physiol Neurobiol*, 2007, 158: 151–160
- 180 Cheviron Z A, Connaty A D, McClelland G B, et al. Functional genomics of adaptation to hypoxic cold-stress in high-altitude Deer mice: transcriptomic plasticity and thermogenic performance. *Evolution*, 2014, 68: 48–62
- 181 Varnado C L, Mollan T L, Birukou I, et al. Development of recombinant hemoglobin-based oxygen carriers. *Antioxid Redox Signal*, 2013, 18: 2314–2328
- 182 Simonson T S. Altitude adaptation: a glimpse through various lenses. *High Alt Med Biol*, 2015, 16: 125–137
- 183 Orr H A. Fitness and its role in evolutionary genetics. *Nat Rev Genet*, 2009, 10: 531–539
- 184 Saether B E, Engen S. The concept of fitness in fluctuating environments. *Trends Ecol Evol*, 2015, 30: 273–281
- 185 Huerta-Sanchez E, Jin X, Asan, et al. Altitude adaptation in Tibetans caused by introgression of Denisovan-like DNA. *Nature*, 2014, 512: 194–197
- 186 Mary K K. Coalescent genealogy samplers: windows into population history. *Trends Ecol Evol*, 2009, 24: 86–93
- 187 Frappell P B, Leon-Velarde F, and Rivera-Ch M. Oxygen transport at high altitude—an integrated perspective. Introduction. *Respir Physiol Neurobiol*, 2007, 158: 115–120
- 188 Ortlund E A, Bridgham J T, Redinbo M R, et al. Crystal structure of an ancient protein: evolution by conformational epistasis. *Science*, 2007, 317: 1544–1548
- 189 Arnegard M E, McGee M D, Matthews B, et al. Genetics of ecological divergence during speciation. *Nature*, 2014, 511: 307–311

Hemoglobins and High-altitude Adaptive Evolution in Vertebrates

ZHU XiaoJia^{1,2}, GUAN YuYan^{1,2} & LEI FuMin¹

1 Key Laboratory of Zoological Systematics and Evolution, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China;

2 College of Life Sciences, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

High-altitude environments provide a model system to investigate adaptive evolution of vertebrates that live in extreme conditions. In vertebrates, the key role of hemoglobin in respiration and oxidative metabolism received significance attention in both evolutionary biology and high-altitude medicine. It is difficult, however, to comprehensively understand different adaptive mechanisms of hemoglobins without a phylogenetic context. Additionally, functional adaptation in hemoglobins also results in the spatially varying patterns within and among species. Here, we review case studies of adaptative evolution of hemoglobins from both the ontogenetic and phylogenetic perspectives, further comparing distinct adaptation between highland residents and short-time migrants. We then systematically compare convergent and divergent adaptations to high-altitude hypoxia in birds and other vertebrates. In accordance with evaluations of relative merits of multiple molecular techniques and a common genetic basis of molecular evolution and speciation, we propose suggestions for future studies of adaptive evolution to high-altitude environment and high-altitude medicine. This review highlights the importance of functional evidences in adaptation studies and the significance of a phylogenetic and phylogeographic framework, emphasizing the integration of molecular, cellular and systematic studies.

adaptation to hypoxia, globins, hemoglobins, convergence, adaptive evolution, sign-epistasis

doi: 10.1360/N052015-00245