

吴蓉蓉,晁燕,赵永丽,等. 裂腹鱼亚科鱼类 *Hif- α* 基因的分子进化及低氧诱导表达[J]. 中国实验动物学报, 2019, 27(4): 433 - 443.

Wu RR, Chao Y, Zhao YL, et al. Molecular evolution and hypoxia-induced mRNA expression of *Hif- α* in schizothoracine fish[J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2019, 27(4): 433 - 443.

Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2019.04.003

裂腹鱼亚科鱼类 *Hif- α* 基因的分子进化 及低氧诱导表达

吴蓉蓉^{1,2}, 晁燕³, 赵永丽^{1,2}, 陈祺昌^{1,2}, 郑志琴^{1,3}, 夏明哲¹, 祁得林^{1*}

(1. 青海大学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; 2. 青海大学生态环境工程学院, 西宁 810016; 3. 青海大学农牧学院动物科学系, 西宁 810016)

【摘要】 目的 探究低氧诱导因子 *Hif- α* 在裂腹鱼亚科鱼类适应低氧环境中的作用及表达调控。方法 利用 RT-PCR 技术获得了裂腹鱼亚科鱼类 13 个代表物种的 *Hif-1 α A*、*Hif-1 α B*、*Hif-2 α A* 和 *Hif-2 α B* 基因编码区序列, 基于裂腹鱼亚科鱼类系统进化关系开展了基因选择压力分析, 并选取花斑裸鲤进行低氧诱导表达研究。结果 *Hif-1 α A*、*Hif-1 α B*、*Hif-2 α A* 和 *Hif-2 α B* 基因编码区长度分别为 2196、2325、2544 和 2511 bp。通过序列比对发现裂腹鱼亚科鱼类 HIF1 α A NODD 结构域中保守脯氨酸羟基化基序 LxxLAP 发生缺失, 特化及高度特化的裂腹鱼的 HIF1 α B CODD 结构域中脯氨酸羟基化基序突变为 PxxLAP。与常氧组相比, 在重度缺氧条件下花斑裸鲤的脑和心脏组织中部分 *Hif- α* 基因表达量显著下降, 在中度低氧中心脏组织中的 *Hif-1 α A* 和 *Hif-2 α A* 基因表达量上调。结论 *Hif- α* 基因在 13 个物种中受到正向选择作用, 但具体物种分支有待进一步研究, 同时裂腹鱼亚科鱼类在适应慢性低氧和急性低氧环境可能存在两种不同的表达调控机制。

【关键词】 裂腹鱼亚科鱼类; 低氧诱导因子; 分子进化; 低氧环境

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2019) 04-0433-011

Molecular evolution and hypoxia-induced mRNA expression of *Hif- α* in schizothoracine fish

WU Rongrong^{1,2}, CHAO Yan³, ZHAO Yongli^{1,2}, CHEN Qichang^{1,2}
ZHENG Zhiqin^{1,3}, XIA Mingzhe¹, QI Delin^{1*}

(1. State Key Laboratory of Plateau Ecology and Agriculture, Qinghai University, Xining 810016, China.

2. College of Eco-Environmental Engineering, Qinghai University, Xining 810016.

3. Animal Science Department of Agriculture and Animal Husbandry College, Qinghai University, Xining 810016)

Corresponding author: QI Delin. E-mail: delinqi@126.com

【Abstract】 Objective To investigate the effect and expression regulation of hypoxia-inducible factor alpha (*Hif- α*) for schizothoracine fish under hypoxic environment. **Methods** We obtained the coding regions of *Hif-1 α A*, *Hif-1 α B*, *Hif-2 α A*, and *Hif-2 α B* genes for 13 species of schizothoracine fish, endemic to the Qinghai-Tibetan Plateau, using RT-PCR, then conducted molecular evolution analysis based on the schizothoracine fish phylogeny by comparing the non-synonymous/synonymous substitution ratios. *Gymnocypris eckloni* was selected to investigate the tissue expression patterns in

【基金项目】 国家自然科学基金项目(31460094)。

Funded by National Natural Science Foundation of China (31460094).

【作者简介】 吴蓉蓉(1994—)女, 硕士研究生, 研究方向: 资源生物学。Email: wuluobo55rong@163.com

【通信作者】 祁得林(1973—)男, 教授; 研究方向: 动物分子遗传与生态学。Email: delinqi@126.com

response to hypoxia. **Results** The coding regions of *Hif-1 α A*, *Hif-1 α B*, *Hif-2 α A*, and *Hif-2 α B* genes were 2196 bp, 2325 bp, 2544 bp, and 2511 bp in length, respectively. Sequence alignment showed that the conserved proline hydroxylation motif LxxLAP was deletion in the NODD domain of HIF-1 α A in schizothoracine fish, and the mutation from the proline hydroxylation motif to PxxLAP was observed in the CODD domain of HIF-1 α B in the specialized and highly specialized schizothoracine fish. Under severe hypoxic conditions, the expression of *Hif- α* gene in the brain and heart of *G. eckloni* decreased significantly compared to normoxia control. Under moderate hypoxic conditions, the expression of *Hif-1 α A* and *Hif-2 α A* in the heart was up-regulated compared to normoxia control. **Conclusions** The *Hif- α* genes are identified positively selected in 13 species, but which species under positively selected is not yet clear and needs further study. There may be two different gene expression regulations for the schizothoracine fishes to adapt to moderate hypoxic environment and severe hypoxic environment.

[Keywords] schizothoracine fish; hypoxia-inducible factor; molecular evolution; hypoxic environment

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

裂腹鱼亚科(Schizothoracinae)鱼类属于鲤形目(Cypriniforme),鲤科(Cyprinidae),是青藏高原水生鱼类区系中主要类群之一,广泛分布于上至海拔5000~6000 m雪线附近和下至海拔1000 m左右的高原边缘的湖泊河流^[1],包含11~12属共100多种^[2],根据形态特征将裂腹鱼分为3个类群,即原始、特化和高度特化类群^[3],研究表明三个类群代表了青藏高原持续隆起过程的特定阶段^[4-5]。青藏高原具有高寒、低氧、强紫外线辐射等特征^[6],高原水体溶解氧波动较大(4.0~7.4 mg/L)^[5],这种极端的水体环境对土著鱼类的分布、生存适应及进化模式等产生了深刻的影响,同时赋予了裂腹鱼亚科鱼类抗缺氧、耐高寒的优良生物学特性。目前,对裂腹鱼类的研究多集中在形态分类及生物学特征等方面^[7],而在低氧适应方面的研究仍有欠缺。

氧是机体进行新陈代谢和维持生存的必要因素^[8],环境缺氧将严重影响鱼类的生存、生长和繁殖^[9-10]。鱼类在长期进化过程中具有独特的适应机制,如通过低氧诱导因子(hypoxia inducible factors, HIFs)信号途径调节相关基因的转录进行低氧应答,增强低氧时的耐受性^[11-12]。HIFs是一组由低氧调节的 α 亚基和氧不敏感的 β 亚基组成的异二聚体转录因子^[13], β 亚基又称芳香烃受体核转运蛋白。 α 亚基是HIF唯一的氧调节亚基,即是低氧诱导的,它决定HIF的活性。在脊椎动物中发现HIF- α 基因至少存在3种亚型:*Hif-1 α* 、*Hif-2 α* 和*Hif-3 α* ,其皆具有N端保守的bHLH结构域,PAS和PAC结构域,氧敏感的ODD结构域以及C端负责转录激活的TAD结构域。其中HIF-3 α 仅有一个N-TAD,C-TAD缺失^[14]。

2001年,由Soitamo等^[15]从虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)中首先克隆得到*Hif-1 α* ,在低氧时*Hif-1 α* 表

达量明显上升。Rojas等^[16]从斑马鱼(*Danio rerio*)中克隆获得*Hif-1 α* 和*Hif-2 α* 基因序列,发现与其他脊椎动物*Hif*基因高度同源。Rytkönen等^[17]研究发现硬骨鱼在早期发生的硬骨鱼类特异性全基因组复制中产生了6个*Hif- α* 基因:1 A/B,2 A/B和3 A/B。目前多数硬骨鱼类有一个旁系同源基因发生丢失,但鲤科鱼类中两者都有保留^[18]。为了深入研究青藏高原裂腹鱼亚科鱼类对高原低氧水体环境的适应机制,本研究选取裂腹鱼亚科鱼类不同等级13个代表物种,通过RT-PCR获得硬骨鱼类特异性*Hif- α* 基因(*Hif-1 α A/Hif-1 α B*和*Hif-2 α A/Hif-2 α B*)序列,并开展分子进化分析。同时,选择广布种—花斑裸鲤,利用qRT-PCR方法检测了低氧胁迫下*Hif- α* 基因在主要组织中的表达调控,为进一步探索*Hif- α* 基因在高原鱼类低氧适应中的作用和调控机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

在青藏高原范围内采集13个裂腹鱼亚科鱼类代表物种,见表1。其中,澜沧裂腹鱼(*Schizothorax lantsangensis*)、巨须裂腹鱼(*Schizothorax macropogon*)、光唇裂腹鱼(*Schizothorax lissolabiatius*)、西藏裂腹鱼(*Schizothorax labiatus*)为原始类群;厚唇裸重唇鱼(*Gymnodiptychus pachycheilus*)、双须叶须鱼(*Ptychobarbus dipogon*)为特化类群;高原裸裂尻鱼(*Schizopygopsis stoliczkae*)、尖裸鲤(*Oxygymnocypris stewartii*)、高原裸鲤(*Gymnocypris waddelli*)、拉萨裸裂尻鱼(*Schizopygopsis younghusbandi*)、花斑裸鲤(*Gymnocypris eckloni*)、黄河裸裂尻鱼(*Schizopygopsis pylzovi*)、极边扁咽齿鱼(*Platypharodon extremus*)为高

度特化类群。野外采样时,用 100 mg/kg 的戊巴比妥钠($C_{11}H_{17}N_2NaO_3$)对鱼进行麻醉,分别现场采集 13 个物种的肌肉、脑和鳃保存于液氮中,用于 HIF 基因克隆。

花斑裸鲤 30 尾(体重约 210 g)采集于青海省大通县湟水河支流—宝库河,活鱼运送并养于青海大学农牧实验室塑料桶中,经低氧处理后采集组织,检测各基因表达情况。

表 1 裂腹鱼亚科鱼类采样信息

Table 1 Sampling information of the schizothoracinae fishes

物种名 Species	采样地点 Locality	水系 Drainage system	发育阶段 Developmental stage	体长(mm)
澜沧裂腹鱼 <i>Schizothorax lantsangensis</i>	青海杂多 Zadoi, Qinghai	澜沧江 Mekong River	成年 Adult	242
巨须裂腹鱼 <i>Schizothorax macropogon</i>	西藏日喀则 Rikaze, Tibet	雅鲁藏布江 Tsangpo River	成年 Adult	410
光唇裂腹鱼 <i>Schizothorax lissolabiatu</i>	青海囊谦 Nangqian, Qinghai	澜沧江 Mekong River	成年 Adult	320
西藏裂腹鱼 <i>Schizothorax labiatus</i>	西藏阿里 Ali, Tibet	印度河 Indus River	成年 Adult	456
厚唇裸重唇鱼 <i>Gymnodiptychus pachycheilus</i>	青海河南 Henan, Qinghai	黄河 Yellow River	成年 Adult	276
双须叶须鱼 <i>Ptychobarbus dipogon</i>	西藏日喀则 Rikaze, Tibet	雅鲁藏布江 Tsangpo River	成年 Adult	253
尖裸鲤 <i>Oxygymnocypris stewartii</i>	西藏拉萨 Lhasa, Tibet	雅鲁藏布江 Tsangpo River	成年 Adult	192
高原裸鲤 <i>Gymnocypris waddelli</i>	西藏浪卡子 Langkazi, Tibet	羊卓雍湖 Yomzho Lake	成年 Adult	293
花斑裸鲤 <i>Gymnocypris eckloni</i>	青海大通 Datong, Qinghai	湟水河 Huangshui River	成年 Adult	233
高原裸裂尻鱼 <i>Schizopygopsis stoliczkae</i>	西藏阿里 Ali, Tibet	印度河 Indus River	成年 Adult	320
拉萨裸裂尻鱼 <i>Schizopygopsis younghusbandi</i>	西藏拉萨 Lhasa, Tibet	雅鲁藏布江 Tsangpo River	成年 Adult	210
黄河裸裂尻鱼 <i>Schizopygopsis pylzovi</i>	青海大通 Datong, Qinghai	湟水河 Huangshui River	成年 Adult	233
极边扁咽齿鱼 <i>Platypharodon extremus</i>	青海玛多 Madoi, Qinghai	黄河 Yellow River	成年 Adult	400

1.1.2 实验试剂

戊巴比妥钠(25 g 高纯级,容创),RNA Simple Total RNA kit(天根),FastQuant RT Kit(天根),Premix Ex Taq[®] Version 2.0 试剂盒(Takara),TIANGel Midi Purification Kit(天根),pMD19-T 载体(天根),SuperReal PreMix Plus(SYBR Green)试剂盒(天根)。

1.1.3 实验仪器

溶解氧测定仪 AZ8402(衡欣,台湾),氧泵(赛尔,浙江),高速冷冻离心机(Beckman Inc,美国),梯度 PCR 扩增仪(Bio-Rad,美国),Gel Doc XR+凝胶成像系统(Bio-Rad,美国),荧光定量 PCR 仪(Bio-Rad,美国),SX-500 高压灭菌锅(Tomy,日本)。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 提取及 *Hif-α* 基因 cDNA 序列扩增

分别提取 13 种裂腹鱼亚科鱼类肌肉、脑和鳃

RNA,而后合成 13 个物种的 cDNA 第一链。以 13 个物种组织 cDNA 为模板,对 *Hif-1αA*、*Hif-1αB*、*Hif-2αA* 和 *Hif-2αB* 基因进行克隆,引物见表 2。PCR 扩增程序:94℃ 预变性 3 min;94℃ 变性 30 s,55℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 1 min,循环 36 次;72℃ 续延伸 5 min。PCR 扩增产物经 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳后,进行回收纯化,然后连接转化以进行测序。

1.2.2 序列分析

测序完成后,利用 Lasergene 7.0 软件^[19]对测序结果分别进行分析;利用 Blastn 在线程序(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)进行确认并进行核酸比对;利用 DNAMAN 6.0(<http://www.lynnon.com>)分别计算其核苷酸组成,碱基变异情况及氨基酸同源性;利用 Smart(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)和 NCBI 中的 CDD 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)进行结构域分析。

表 2 裂腹鱼 *Hif-α* 基因 RT-PCR 引物及 qRT-PCR 引物Table 2 Primers for RT-PCR and qRT-PCR of *Hif-α* gene in the schizothoracine fish

引物名称 Primers	序列(5'-3') Sequences	用途 Usage
Hif-1αA1F	AGCGAAGGAAGGAGAAATCC	RT-PCR
Hif-1αA1R	AATGCCATCTGTTGTGTGGA	RT-PCR
Hif-1αA2F	AAATCTGCCTCCTGGAAGGT	RT-PCR
Hif-1αA2R	TGGGATCTGGAAGAATCAGG	RT-PCR
Hif-1αA3F	GCCCTCTTCAAGTGTCTGTC	RT-PCR
Hif-1αA3R	GTAGCTCTCCCTCTGTAGC	RT-PCR
Hif-1αB1F	CCTGTCTGAAGATGGAGACAT	RT-PCR
Hif-1αB1R	TGCACGGGAGCGTTGACTT	RT-PCR
Hif-2αA1F	CAACTCAGGCCGCACAGT	RT-PCR
Hif-2αA1R	TGACTTATCATGCCTGTGT	RT-PCR
Hif-2αA2F	CAACTCAGGCCGCACAGT	RT-PCR
Hif-2αA2R	GTTGACTTATCATGCCTGAGT	RT-PCR
Hif-2αB1F	CAAACAGCACCAGCTCACAT	RT-PCR
Hif-2αB1R	GCGGCTCTTTAAATCCACAC	RT-PCR
Hif-2αB2F	CAGGCCACCTGAAGGTGTAT	RT-PCR
Hif-2αB2R	TGTCTCTTGCGTGTCCAAAG	RT-PCR
Hif-2αB3F	ATGGCCACCACTTTCTCTGT	RT-PCR
Hif-2αB3R	TGGCCTGGTCTAATGCCTCTT	RT-PCR
Hif-1αArealF	CCCCACGGCGTCACCTCTAA	qRT-PCR
Hif-1αArealR	GGAAGGCCCAGGCAGTTGCT	qRT-PCR
Hif-1αBrealF	ACTGGACCTGTTGAGAAAATG	qRT-PCR
Hif-1αBrealR	TGGCTGACAAAAGATGAGGG	qRT-PCR
Hif-2αArealF	AATGGACGGTGAGGACTTCG	qRT-PCR
Hif-2αArealR	CGTTTGGTGGGTTTGGT	qRT-PCR
Hif-2αBrealF	GAAGGTGTATAACGGCTGTCCC	qRT-PCR
Hif-2αBrealR	CAGGTTCTGGTGGCTTTTGG	qRT-PCR
β-actinF	GCCAAACAGGAAAAGATGAC	qRT-PCR
β-actinR	TTGCCAATGGTGATGACCTG	qRT-PCR
M13-47	CGCCAGGCTTTTCCCAGTCACGAC	测序引物
RV-M	GAGCGGATAACAATTTACACAGG	Sequencing primers

1.2.3 选择压力分析

在遗传学中,通过比较其非同义替换率(dN)和同义替换率(dS)之间的比率(ω),判断基因是否有选择压力作用。 $dN/dS > 1$,则为正向选择; $dN/dS = 1$,则为中性选择; $dN/dS < 1$,则为纯化选择。基于 13 个裂腹鱼亚科鱼类的物种进化树,使用 Paml 的 codeml 程序进行最大似然法分析,包括位点模型,支模型和支位点混合模型,具体方法见 Qi 等^[20]文献。Bayes Empirical Bayes (BEB) 用于计算模型中发现的正选择位点的可能性。

1.2.4 低氧处理

本研究中所涉及裂腹鱼亚科物种多分布在偏远地带,因此选择离实验室较近的裂腹鱼亚科代表种—花斑裸鲤开展低氧实验。活鱼运送至实验室后,暂养于塑料桶中的 30 尾花斑裸鲤,使水充分曝气将溶解氧(dissolved oxygen, DO)保持在 (8.4 ± 0.1) mg/L,水温在 $10 \sim 13^\circ\text{C}$ 。预养 3 d 后,随机采集 3 尾花斑裸鲤白肌、红肌、心脏、脑、鳃组织作为对

照组。24 尾作为中度低氧组置于 40 L 塑料桶,1 h 内将溶解氧浓度从 (8.4 ± 0.1) mg/L 降低至 (3.0 ± 0.1) mg/L,并保持 96 h,每隔 12 h 采集 3 尾各组织。取 3 尾作为重度低氧组置于另一 40 L 塑料桶,1 h 内将溶解氧浓度降低至 (0.3 ± 0.1) mg/L,并保持 4 h,采集组织。低氧处理时,塑料桶顶部覆盖塑料膜,水体充氮除氧获得预期溶解氧浓度。维持低氧期间,利用溶解氧测定仪定期监控水体溶解氧浓度,氧含量若降低使用氧泵增氧至目的浓度。

1.2.5 qRT-PCR 检测低氧诱导下 *Hif-α* 基因的表达

将花斑裸鲤各低氧条件处理下的白肌、红肌、心、脑和鳃组织分别提取总 RNA,平衡各起始浓度合成 cDNA 第一链,然后进行荧光定量 PCR 分析。反应体系 25 μL : $2 \times$ SuperReal PreMix Plus 12.5 μL 、上下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各 1 μL 、cDNA 模板 1 μL 、ddH₂O 9.5 μL 。每个样品重复 3 次,结果采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法分析^[21]。qRT-PCR 测定时 β -actin 基因表

达量作为内标,引物见表 2。由于所测荧光定量原始数据量过多,在本研究中不再以表格形式展示。

2 结果

2.1 13 个裂腹鱼亚科鱼类 *Hif-α* 基因序列分析

13 个物种的 *Hif-1αA*、*Hif-1αB*、*Hif-2αA* 和 *Hif-2αB* 基因编码区核苷酸序列分别为 2196、2325、2544 和 2511 bp,分别编码 731、774、847、836 个氨基酸,见表 3。13 个物种间各 HIF- α 基因的同源性为 93.6%~99.4%、92.7%~99.9%、92.6%~99.8%、93.5%~99.8%,各类群代表物种间同源性大于 95%。同一物种的 HIF-1 α A 与 HIF-1 α B 的相似性为 50%~53%,HIF-2 α A 与 HIF-2 α B 的相似性为

54%~58%。裂腹鱼亚科鱼类 HIF- α 具有 bHLH 结构域、PAS 和 PAC 结构域、ODD 结构域以及 TAD 结构域。在高度特化等级、特化等级和原始等级类群中分别选取高原裸鲤、厚唇裸重唇鱼和巨须裂腹鱼作为代表种,将三个物种的 HIF- α 蛋白序列进行多序列比对,结果见图 1。HIF- α N 端的 bHLH-PAS 结构域是高度保守的,但 ODD 区域保守性较低,特别是在氧依赖性脯氨酸羟基化位点附近。在 13 个物种的 HIF- α 序列中检测到两个保守的脯氨酸羟基化序列 LxxLAP,但 13 个物种在 HIF-1 α A 的 NODD 中检测到特异性缺失,并且特化及高度特化类群的 HIF-1 α B 的 CODD 结构域中脯氨酸羟基化序列突变为 PxxLAP。

表 3 基因编码区序列信息表

Table 3 Sequence information of the gene coding region

基因 Genes	CDS 长度 Length (bp)	氨基酸 Amino acids	分子量 Molecular weight ($\times 10^3$ Da)	等电点 pI	保守位点 Conserved sites	变异位点 Variable sites	同源性 Homology (%)
<i>Hif-1αA</i>	2196	731	78.93-81.02	5.15-5.34	2028	147	93.6-99.4
<i>Hif-1αB</i>	2325	774	84.83-85.68	4.95-5.14	2142	183	92.7-99.9
<i>Hif-2αA</i>	2544	847	93.35-94.10	6.02-6.24	2348	190	92.6-99.8
<i>Hif-2αB</i>	2511	836	89.97-93.26	6.24-6.68	2336	175	93.5-99.8

2.2 HIF- α 分子进化分析

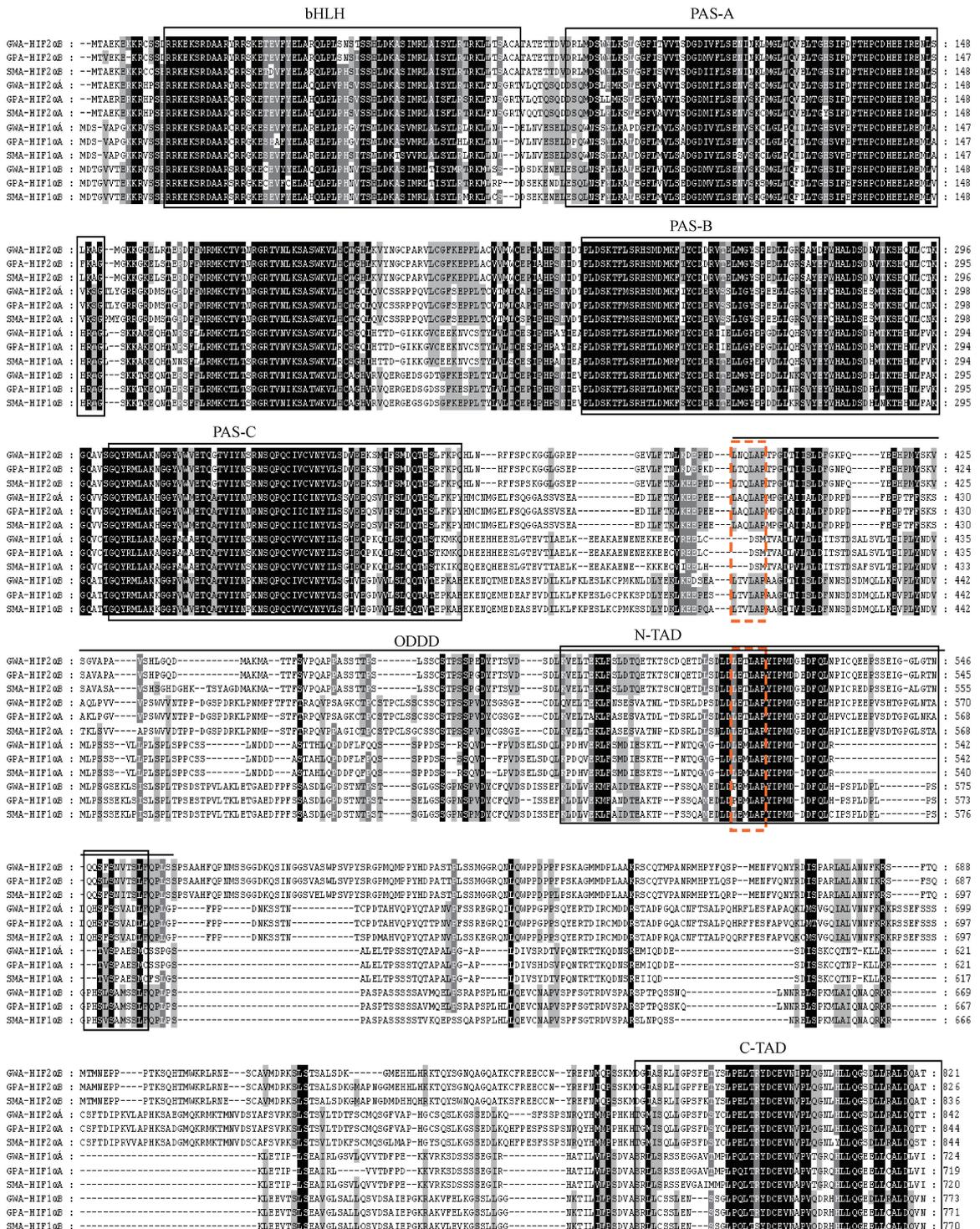
为了探索 HIF-1 α A、HIF-1 α B、HIF-2 α A 和 HIF-2 α B 在裂腹鱼亚科鱼类不同类群中是否发生选择作用,本文以 13 个裂腹鱼亚科鱼类的物种进化树作为输入树(图 2),运用 PAML 4.6 中 CODEML 程序的三个模型进行检测。位点模型中分析发现 HIF-1 α A、HIF-1 α B、HIF-2 α A 和 HIF-2 α B 存在正向选择作用($\omega > 1$),BEB 分析显示 HIF-1 α 和 HIF-2 α 中皆存在后验概率大于 0.95 的潜在选择位点(表 4)。支-位点混合模型中,以高度特化裂腹鱼亚科鱼类的 7 个代表物种作为前景支,其他物种作为背景支进行分子进化分析,结果显示 HIF-1 α A、HIF-1 α B 和 HIF-2 α B 中均未检测到正向选择位点($\omega = 1$),在 HIF-2 α A 中检测到一个正向选择位点(516 N),但后验概率小于 0.95。

为了进一步的检验 HIF-1 α 和 HIF-2 α 所有支系是否发生正向选择作用,本研究进行了支模型分析,结果表明 HIF-1 α A 中拉萨裸裂尻鱼及其祖先支(支 2、支 14 和支 18,图 2)、厚唇裸重唇鱼支(支 9)和澜沧裂腹鱼及其祖先支(支 12 和支 22)受到正向选择作用,HIF-1 α B 中极边扁咽齿鱼支(支 6)受到

选择作用,支 15 和支 16 也具有明显不同的进化速率,但具体的进化物种分支并未检测到。HIF-2 α A 中尖裸鲤支(支 7)、双须叶须鱼支(支 8)和西藏裂腹鱼支(支 10)受到正向选择作用,且支 14 和支 16 也具有明显不同的进化速率。HIF-2 α B 中花斑裸鲤支(支 5)受到选择作用,支 16 和支 22 也具有明显不同的进化速率,但具体的进化物种分支并未检测到。

2.3 低氧诱导下 *Hif-α* 基因的表达

在重度低氧处理 4 h 后,*Hif-1αA* 基因在花斑裸鲤白肌组织中的表达量显著上升($P < 0.01$),是常氧组的 9.8 倍;而在心脏中的表达量显著降低($P < 0.01$);在脑、鳃和红肌组织中的表达量基本保持不变($P > 0.05$)。*Hif-1αB* 基因在白肌、红肌、心脏和脑组织中显著降低($P < 0.01$);在鳃组织中表达量上调($P < 0.05$)。*Hif-2αA* 基因在心脏($P < 0.01$)和红肌($P < 0.05$)组织中表达量上升,且心脏组织中的表达量为常氧组的 38 倍;在脑组织中的表达量显著降低($P < 0.01$)。*Hif-2αB* 基因在白肌组织中的表达量上调($P < 0.01$);在心脏和脑组织中表达量显著下调($P < 0.01$)(图 3)。



注:GWA:高原裸鲤;GPA:厚唇裸重唇鱼;SMA:巨须裂腹鱼。

图 1 HIF-α 的蛋白序列比对

Note: GWA: *Gymnocypris waddelli*; GPA: *Gymnodiptychus pachycheilus*; SMA: *Schizothorax macropogon*.

Figure 1 Sequence alignment of HIF-α proteins

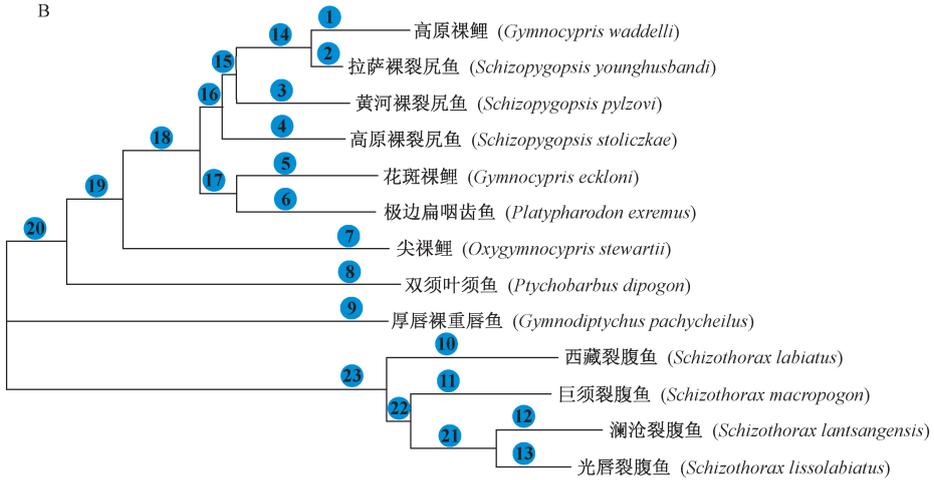
表 4 位点模型下似然率值和参数估计

Table 4 Likelihood and parameter estimates under locus model

基因 Genes	参数估计 Parameter estimates	似然率值 Likelihood values	正向选择位点 Positively selected sites
<i>Hif-1αA</i>	M0	$\omega = 0.56181$	4753.99
	M1a	$p0 = 0.679, p1 = 0.321$	4683.99
	M2a	$p0 = 0.729, p1 = 0.154, p2 = 0.117, \omega1 = 7.899$	4626.15
	M7	$p = 0.005, q = 0.00502$	4695.43
	M8	$p0 = 0.89, p = 0.005, q = 0.021 (p1 = 0.11), \omega1 = 8.417$	4626.27
<i>Hif-1αB</i>	M0	$\omega = 0.43$	4665.21
	M1a	$p0 = 0.561, p1 = 0.439$	4637.1
	M2a	$p0 = 0.9727, p1 = 0, p2 = 0.027, \omega1 = 36.433$	4581.56
	M7	$p = 0.005, q = 0.00737$	4637.64
	M8	$p0 = 0.999, p = 0.005, q = 0.007 (p1 = 0.00097), \omega1 = 999$	4560.76
<i>Hif-2αA</i>	M0	$\omega = 0.53$	5213.57
	M1a	$p0 = 0.549, p1 = 0.451$	5177.25
	M2a	$p0 = 0.558, p1 = 0.4408, p2 = 0.00098, \omega1 = 999$	5097.15
	M7	$p = 0.005, q = 0.00747$	5178.24
	M8	$p0 = 0.999, p = 0.005, q = 0.0075 (p1 = 0.00094), \omega1 = 999$	5097.50
<i>Hif-2αB</i>	M0	$\omega = 0.459$	5084.73
	M1a	$p0 = 0.611, p1 = 0.388$	5032.04
	M2a	$p0 = 0.634, p1 = 0.356, p2 = 0.00965, \omega1 = 86.565$	4960.77
	M7	$p = 0.005, q = 0.0073$	5032.11
	M8	$p0 = 0.99, p = 0.005, q = 0.00754 (p1 = 0.00967), \omega1 = 90.867$	4961.17

A

支模型 Branch models	dN/dS			
	HIF-1αA	HIF-1αB	HIF-2αA	HIF-2αB
1	0.57	<0.01	0.14	0.16
2	1.15*	0.12	<0.01	0.10
3	0.68	0.93	0.13	<0.01
4	0.49	0.16	0.55	0.71
5	0.21	0.28	0.77	1.26*
6	0.27	1.51*	0.19	0.31
7	0.82	0.56	3.44*	0.44
8	0.22	0.49	1.31*	0.44
9	1.13*	0.40	0.50	0.71
10	0.53	0.34	1.13*	0.45
11	0.47	<0.01	0.31	Inf
12	1.59*	0.75	2.33*	0.84
13	0.96	0.19	0.84	0.55
14	2.94*	0.37	1.99*	0.26
15	<0.01	3.61*	0.09	Inf
16	<0.01	2.33*	124.44*	1.21*
17	0.17	0.56	<0.01	Inf
18	203.69*	0.09	0.61	0.12
19	<0.01	0.34	0.28	0.43
20	Inf	Inf	0.43	Inf
21	<0.01	0.20	0.33	0.32
22	2.09*	0.86	Inf	324.53*
23	0.78	0.45	0.64	0.52

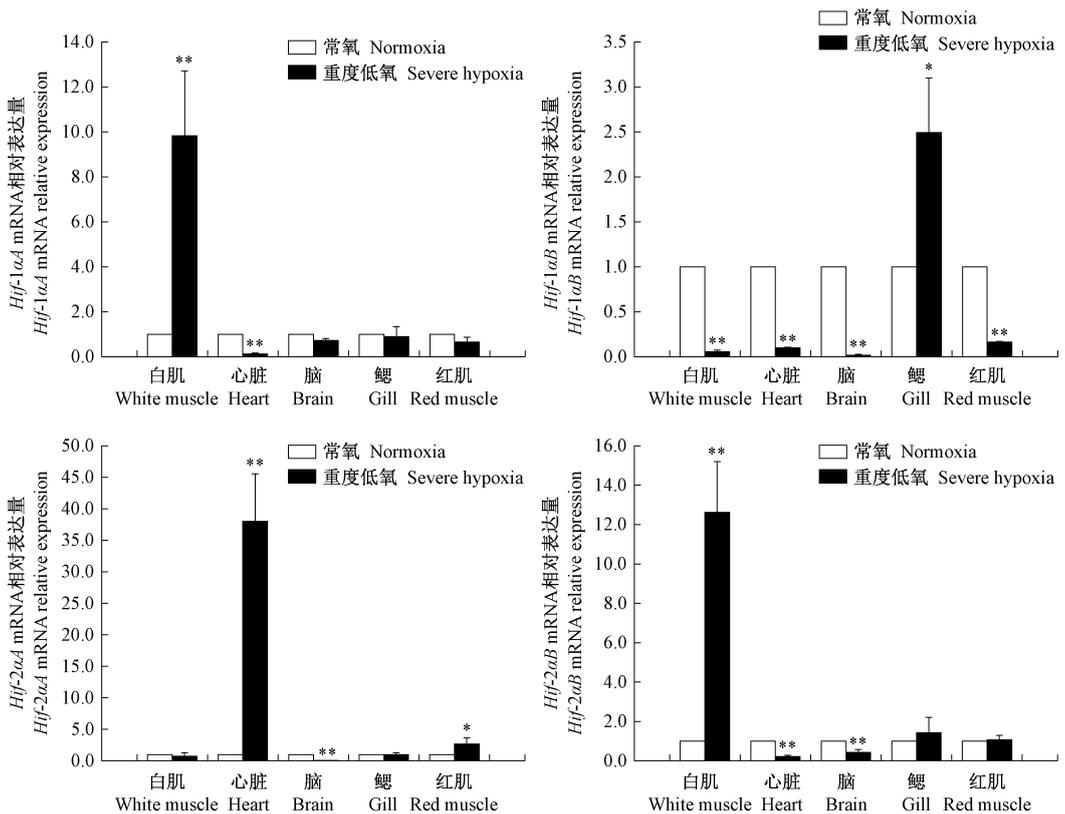


注:A 为不同支系 HIF-1 α A、HIF-1 α B、HIF-2 α A 和 HIF-2 α B 的 ω 值, B 中的分支编号是指 A 中系统发育树上的编号, * 表示 ω 值大于 1, Inf 表示相应 dN 值为 0, 其中 ω 值表示非同义替换与同义替换比值, dN 表示密码子的非同义替换。B 是 13 个裂腹鱼亚科鱼类的系统发育树。

图 2 13 个裂腹鱼亚科鱼类的系统发育树

Note. A is a phylogenetic tree of 13 subfamilies of schizothoracine fishes. B indicates the ω values of HIF-1 α A, HIF-1 α B, HIF-2 α A and HIF-2 α B. The numbers in B refer to the numbers on the phylogenetic tree in A. The symbol * indicates that the ω value is greater than 1, and Inf indicates that the corresponding dN value is 0, where the ω value indicates the ratio of nonsynonymous to synonymous substitutions, and dN indicates nonsynonymous substitutions at codons.

Figure 2 Phylogenetic tree of 13 subfamilies of schizothoracine fishes



注:单因子方差分析法检测各组织基因的表达量差异($n=3$),与常氧组相比差异显著(** $P<0.01$, * $P<0.05$)。

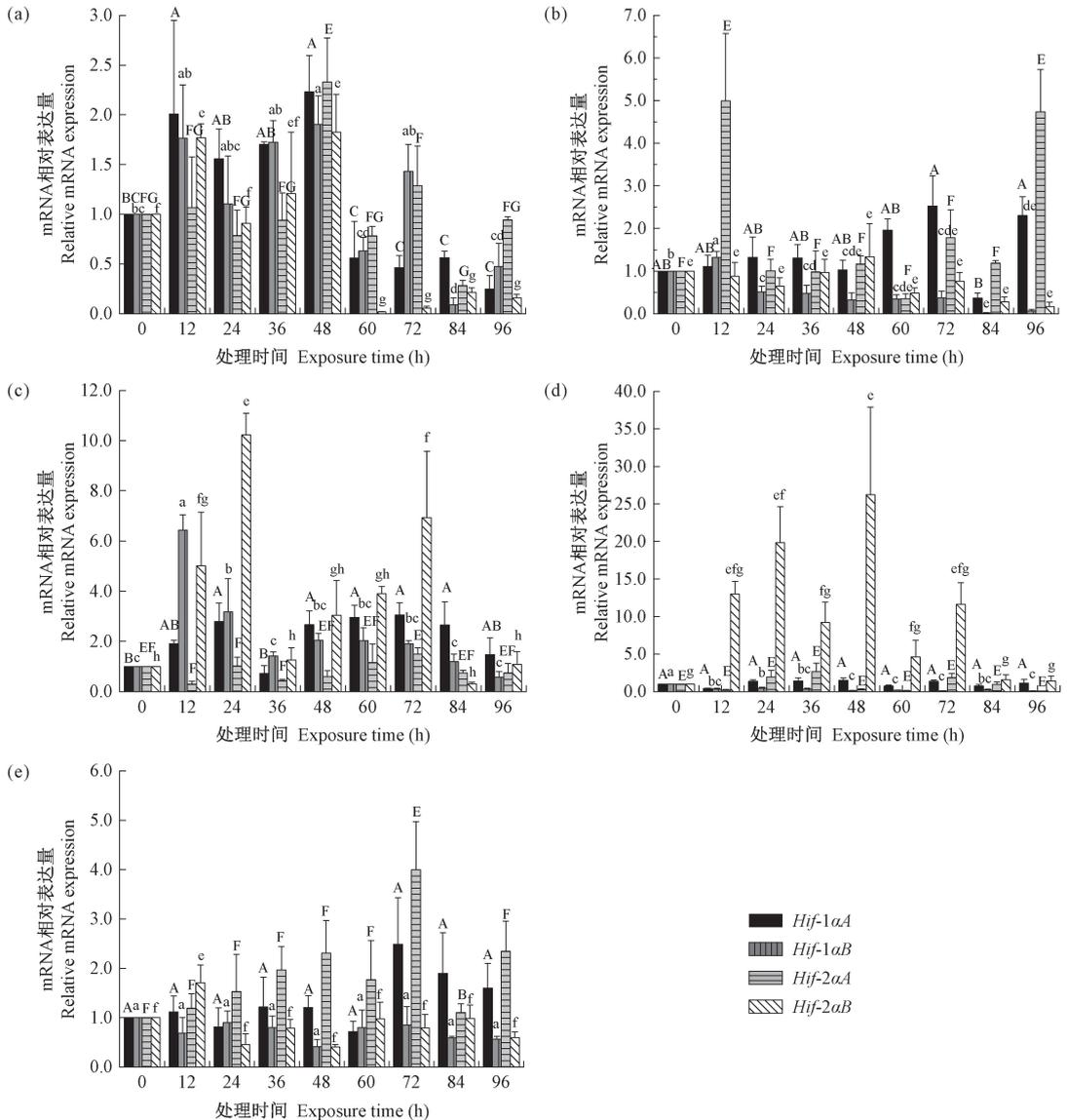
图 3 重度低氧和常氧条件下花斑裸鲤主要组织 Hif- α 基因的表达量

Note. Significant differences between tissues were analyzed by one-way ANOVA ($n=3$). Compared with the normoxia control group, the asterisks indicate significant difference (** $P<0.01$, * $P<0.05$).

Figure 3 Expression of Hif- α gene in main tissues of *Gymnocypris eckloni* under severe hypoxia and normoxia

中度低氧下,花斑裸鲤脑组织中 *Hif-1αA* 的表达量在 48 h 时达到最高,并且是 0 h 时的 2.2 倍,随后表达量急剧下调 ($P < 0.05$); 而 *Hif-1αB* 表达量从 0 h 开始逐渐上调,在 48 h 表达量最高,且 72 h 的表达量也明显高于 0 h ($P < 0.05$); *Hif-2αA* 表达量只在 48 h 和 72 h 时显著上调,在 84 h 时其表达量显著下调 ($P < 0.05$); 而 *Hif-2αB* 在脑组织中的表达量在 12 h 和 36 h 时显著高于 0 h,且在 48 h 时表达量最高,随后其表达量急剧下调。心脏组织中 *Hif-1αA* 的表达量在 72 h 和 96 h 显著高于 0 h ($P < 0.05$); 在 12 h 时 *Hif-1αB* 和 *Hif-2αA* 的表达量最高,且 *Hif-*

2αA 表达量在 96 h 时较 0 h 显著上调 ($P < 0.05$)。鳃组织中, *Hif-1αA* 的表达量除 36 h 外其他时间段均高于 0 h 的表达量 ($P < 0.05$); *Hif-1αB* 和 *Hif-2αB* 基因的表达量在 36、84 和 96 h 时基本保持不变 ($P > 0.05$),其他时间段显著上调 ($P < 0.05$); *Hif-2αA* 的表达量在 12 h 和 36 h 表达量降低 ($P < 0.05$)。白肌组织中,中度低氧胁迫时 *Hif-2αA* 的表达量远远高于其他三个基因,并在 48 h 时表达量最高; *Hif-1αA* 和 *Hif-2αA* 基因在各个时间段的表达量与 0 h 相比均无明显变化 ($P > 0.05$); *Hif-1αB* 各个时间段的表达量均比 0 h 的表达量显著下调 ($P < 0.05$)。



注: a: 脑; b: 心脏; c: 鳃; d: 白肌; e: 红肌。单因子方差分析法检测各组组织的基因表达量差异 ($n=3$), 不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

图 4 中度低氧和常氧条件下花斑裸鲤主要组织 *Hif-α* 基因的表达量

Note. a: Brain. b: Heart. c: Gill. d: White muscle. e: Red muscle. Significant differences between tissues were analyzed by one-way ANOVA ($n=3$). Different letters indicate significant differences ($P < 0.05$).

Figure 4 Expression of *Hif-α* gene in main tissues of *Gymnocypris eckloni* under moderate hypoxia and normoxia

红肌组织中, *Hif-1αA* 和 *Hif-2αA* 基因在 72 h 表达量最高, 而 *Hif-1αB* 和 *Hif-2αB* 表达量在 24 h-96 h 时间段较 0 h 均无明显变化 ($P > 0.05$) (图 4)。

3 讨论

鱼类具有同源基因 *Hif-αA* 和 *Hif-αB*, 并与人类 *HIF-α* 基因具有很高的相似性, 同时鱼类中的 *Hif-α* 基因可能在氧依赖基因的表达中产生的作用^[22]。裂腹鱼亚科鱼类 *HIF-αA* 和 *HIF-αB* 氨基酸序列长度与鲤科其他鱼类如鳙鱼 (*Hypophthalmichthys nobilis*)、鲤鱼 (*Cyprinus carpio*)、鲫鱼 (*Carassius auratus*) 及斑马鱼基本一致, 并具有 bHLH 结构域、PAS 和 PAC 结构域、ODD 结构域以及 TAD 结构域。目前大多数硬骨鱼类丢失其中一个同源基因, 鲤科鱼类二者皆有保存, 以上表明 *HIF-αA* 和 *HIF-αB* 在鲤科鱼类长期进化过程中体现出较高的保守性, 与其产生的生物学功能一致。本研究获得了 13 个裂腹鱼亚科代表物种 *Hif-1αA*、*Hif-1αB*、*Hif-2αA* 和 *Hif-2αB* 基因编码区完整序列, 其 N 端的 bHLH-PAS 结构域是高度保守的, 但 ODD 结构域保守性较低, 特别是氧依赖性脯氨酸羟基化位点附近。*HIF-α* 中检测到两个保守的脯氨酸羟基化序列 LxxLAP, 但在 13 个物种 *HIF-1αA* 的 NODD 中检测到特异性缺失, 并且特化及高度特化的裂腹鱼的 *HIF-1αB* 的 CODD 结构域中脯氨酸羟基化序列突变为 PxxLAP。*HIF* 羟基化途径在后生动物中受氧依赖性脯氨酸羟基化酶 (prolyhydroxylases, PHD) 家族的调控^[23]。在哺乳动物中, CODD 结构域中 Pro-564 是 PHD 与 *HIF-1α* 结合的重要位点^[18]。缺氧条件下, PHD 失活使 *HIF-α* 的羟基化受到抑制, 从而与 *HIF-1β* 形成异源二聚体, 结合 DNA 序列上的低氧反应元件以激活下游基因的表达进行耐氧适应性反应^[24-25]。由此可以推断, 发生在 ODD 区域中的缺失和特异突变可能是裂腹鱼亚科鱼类在低氧适应中进化表现。

目前, 对于裂腹鱼亚科鱼类 *HIF-α* 分子进化研究报道甚少。管丽红等^[18] 在裂腹鱼亚科鱼类中首次克隆出 *Hif* 的旁系同源基因, 并结合其他鲤科鱼 *HIF-α* 中序列仅发现 *HIF-1αB* 中存在正向选择作用, 且在特化及高度特化的裂腹鱼中存在选择作用位点, *Hif-1αB* 基因是裂腹鱼适应低氧环境中重要的调节因子, 同时 *Hif-α* 基因的正向选择可能反映了裂腹鱼亚科鱼类在高海拔地区缺氧环境的适应性进化^[26]。本研究进一步对裂腹鱼亚科不同进化等级物种间是否存在选择压力进行分析, 结果表明 *HIF-1αA*、*HIF-1αB*、*HIF-2αA* 和 *HIF-2αB* 中皆存在

潜在的受到正向选择作用的氨基酸位点, 且后验概率大于 0.95。同时, 支模型表明 *HIF-α* 在特化各物种、高度特化各物种及其祖先支具有明显不同的进化速率, 但具体的进化物种分支并未检测到。在支位点混合模型中, 以高度特化等级物种作为前景支, 仅在 *HIF-2αA* 中存在正向选择作用。由此看来, *HIF-α* 在 13 个物种间存在正向选择作用, 但 *HIF-1αA*、*HIF-1αB* 和 *HIF-2αB* 仅检测到特化等级支及高度特化支中存在选择作用, 具体物种分支有待进一步研究。

低氧诱导因子作为氧敏感的转录激活因子, 在低氧条件下可被诱导表达参与反应调节。*HIF-1α* 和 *HIF-2α* 两者具有不同的激活域从而形成了各自的特异性靶基因以及各自独特的功能^[23]。本研究结果表明, 重度缺氧条件下 *Hif-1αA* 和 *Hif-2αB* 基因在白肌组织中显著上升, 且在中度缺氧时, *Hif-2αB* 在白肌组织中的表达量远高于另外 3 个基因。*Hif-1αB* 在重度缺氧条件下在鳃组织中表达量显著升高。*Hif-2αA* 在重度缺氧条件下在心和红肌中的表达量显著上升, 并在中度缺氧条件的 12 h 和 96 h 具有较高的表达量。在不同组织中 *Hif-α* mRNA 表达不同, 可能是对氧气敏感度不同, 缺氧表达的动力学取决于氧气水平并存在组织器官特异性。在对尼罗罗非鱼的研究中发现硬骨鱼 *Hif-1αA/B* 和 *Hif-2αA/B* 基因在缺氧条件下的转录调节中存在物种特异性, 也还受缺氧的组织及缺氧状态的影响^[27]。在重度缺氧条件下, 花斑裸鲤的脑组织中 *Hif-1αB*、*Hif-2αA* 和 *Hif-2αB* 基因表达量显著下降, 心脏组织中 *Hif-1αA*、*Hif-1αB* 和 *Hif-2αB* 基因表达量显著下降, 可能在急性低氧环境中可以保护物种本身, 在中度低氧的后期, 心脏组织中的 *Hif-1αA* 和 *Hif-2αA* 基因表达量上调, 可能是为了提高携氧能力从而弥补机体缺氧而做出的应激性应答。由此推断, 裂腹鱼亚科鱼类在适应长期低氧和应激性低氧环境可能存在两种不同的机制。

参 考 文 献 (References)

- [1] 武云飞. 青藏高原鱼类 [M]. 成都: 四川科学技术出版社, 1992, 541-544.
Wu YF. The Fishes of the Qinghai-Xizang Plateau [M]. Chengdu: Sichuan Science and Technology Press, 1992, 541-544.
- [2] 代应贵, 肖海. 裂腹鱼类种质多样性研究综述 [J]. 中国农学通报, 2011, 27(32): 38-46.
Dai YG, Xiao H. Review of studies on the germplasm resources of the schizothoracinae fishes [J]. Chin Agric Bull, 2011, 27(32): 38-46.

- [3] Li Y, Ren Z, Shedlock AM, et al. High altitude adaptation of the schizothoracine fishes (Cyprinidae) revealed by the mitochondrial genome analyses [J]. *Gene*, 2013, 517(2): 169-178.
- [4] 曹文宣, 陈宜瑜, 武云飞. 裂腹鱼的起源和演化及其与青藏高原的隆起关系 [A]. 见: 中国科学院青藏高原综合科学考察队, 青藏高原隆起的时代、幅度和形式问题 [M]. 北京: 科学出版社, 1981: 110-130.
- Cao WX, Chen YY, Wu YF. Origin and evolution of Schizothoracine fishes in relation to the upheaval of the Qinghai-Xizang Plateau [A]. In: Anonym. *Studies on the Period, Amplitude and Type of the Uplift of the Qinghai-Xizang Plateau* [M]. Beijing: Science Press, 1981: 118-130.
- [5] Cao YB, Chen XQ, Shen W, et al. Evolution and regulation of the downstream gene of hypoxia-inducible factor-1 α in naked carp (*Gymnocypris przewalskii*) from Lake Qinghai, China [J]. *J Mol Evol*, 2008, 67(5): 570-580.
- [6] Wang Z, Yonezawa T, Liu B, et al. Domestication relaxed selective constraints on the yak mitochondrial genome [J]. *Mol Biol Evol*, 2011, 28(5): 1553-1556.
- [7] 魏朝军, 申志新, 贾银涛, 等. 花斑裸鲤年龄鉴定材料的比较与年龄判别 [J]. *生态学杂志*, 2015, 34(9): 2537-2541.
- Wei CJ, Shen ZX, Jia YT, et al. Comparison of aging methods and discrimination analysis on age classification for *Gymnocypris eckloni* [J]. *Chin J Ecol*, 2015, 34(9): 2537-2541.
- [8] Wawrowski A, Gerlach F, Hankeln T, et al. Changes of globin expression in the Japanese medaka (*Oryzias latipes*) in response to acute and chronic hypoxia [J]. *J Comp Physiol B*, 2011, 181(2): 199-208.
- [9] Cheung CH, Chiu JM, Wu RS. Hypoxia turns genotypic female medaka fish into phenotypic males [J]. *Ecotoxicology*, 2014, 23(7): 1260-1269.
- [10] Shang EH, Yu RM, Wu RS. Hypoxia affects sex differentiation and development, leading to a male-dominated population in zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Environ Sci Technol*, 2006, 40(9): 3118-3122.
- [11] 李艳丽, 徐功玉, 肖金文, 等. 血红素加氧酶 1 在斑马鱼低氧应激中的保护作用研究 [J]. *水生生物学报*, 2017, 41(1): 43-49.
- Li YL, Xu GY, Xiao JW, et al. Studies on the protective role of zebrafish HO1 in response to hypoxia [J]. *Acta Hydrobiol Sin*, 2017, 41(1): 43-49.
- [12] Zhu CD, Wang ZH, Yan B. Strategies for hypoxia adaptation in fish species: a review [J]. *J Comp Physiol B*, 2013, 183(8): 1005-1013.
- [13] 常瑜, 孔祥会. 鱼类低氧诱导因子-1 基因的研究进展 [J]. *安徽农业科学*, 2008, 36(32): 13998-14000.
- Chang Y, Kong XH. Research progress in fish HIF-1 [J]. *J Anhui Agr Sci*, 2008, 36(32): 13998-14000.
- [14] Gu YZ, Moran SM, Hogenesch JB, et al. Molecular characterization and chromosomal localization of a third alpha-class hypoxia inducible factor subunit, HIF3 α [J]. *Gene Expr*, 1998, 7(3): 205-213.
- [15] Soitamo AJ, Rabergh CM, Gassmann M, et al. Characterization of a hypoxia-inducible factor (HIF-1 α) from rainbow trout. Accumulation of protein occurs at normal venous oxygen tension [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(23): 19699-19705.
- [16] Rojas DA, Perrz-Munizaga DA, Centanin L, et al. Cloning of hif-1 α and hif-2 α and mRNA expression pattern during development in zebrafish [J]. *Gene Expr Patterns*, 2007, 7(3): 339-345.
- [17] Rytik önen KT, Akbarzadeh A, Miandare HK, et al. Subfunctionalization of cyprinid hypoxia-inducible factors for roles in development and oxygen sensing [J]. *Evolution*, 2013, 67(3): 873-882.
- [18] Guan L, Chi W, Xiao W, et al. Analysis of hypoxia-inducible factor alpha polyploidization reveals adaptation to Tibetan Plateau in the evolution of schizothoracine fish [J]. *BMC Evol Biol*, 2014, 14: 192.
- [19] Burland TG. DNASTAR's Lasergene sequence analysis software [J]. *Methods Mol Biol*, 2000, 132: 71-91.
- [20] Qi DL, Chao Y, Zhao YL, et al. Molecular evolution of myoglobin in the Tibetan Plateau endemic schizothoracine fish (Cyprinidae, Teleostei) and tissue-specific expression changes under hypoxia [J]. *Fish Physiol Biochem*, 2018, 44(2): 557-571.
- [21] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{- $\Delta\Delta$ CT} method [J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [22] Mikko N, Rees BB. Oxygen-dependent gene expression in fishes [J]. *Am J Physiol Reg I*, 2005, 288(5): R1079-1090.
- [23] Kaelin WG, Ratcliffe PJ. Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway [J]. *Mol Cell*, 2008, 30(4): 393-402.
- [24] Schöde J, Grampp S, Maher ER, et al. Hypoxia, hypoxia-inducible transcription factors, and renal cancer [J]. *Eur Urol*, 2016, 69(4): 646-657.
- [25] 邹俊遐, 陈科. 缺氧诱导因子 (HIFs) 在肾癌发生中的作用及其分子机制 [J]. *遗传*, 2018, 40(5): 341-356.
- Zou JX, Chen K. Roles and molecular mechanisms of hypoxia-inducible factors in renal cell carcinoma [J]. *Hereditas*, 2018, 40(5): 341-356.
- [26] Yonezawa T, Hasegawa M, Zhong Y. Polyphyletic origins of schizothoracine fish (Cyprinidae, Osteichthyes) and adaptive evolution in their mitochondrial genomes [J]. *Genes Genet Syst*, 2014, 89(4): 187-191.
- [27] 姜华鹏, 张驰, 王丛丛, 等. 软刺裸鲤和齐口裂腹鱼 HIF1B 和 HIF2A 的克隆及低氧适应性的表达分析 [J]. *淡水渔业*, 2015, 45(5): 11-18.
- Jiang HP, Zhang C, Wang CC, et al. Cloning of HIF1B and HIF2A genes and their expressions response to hypoxia in *Gymnocypris dobula* and *Schizothorax prenanti* [J]. *Freshwater Fish*, 2015, 45(5): 11-18.