

花斑裸鲤 *Epo* 和 *Epor* 基因克隆 及其低氧诱导的 mRNA 表达

赵永丽^{①②} 吴蓉蓉^{①②} 晁燕^③ 陈祺昌^{①②} 夏明哲^① 祁得林^{①③*}

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: 促红细胞生成素(EPO)是一种糖蛋白激素,在动物低氧适应中发挥着重要作用。本研究采用RT-PCR方法克隆了花斑裸鲤(*Gymnocypris eckloni*) *Epo* 和 *Epor* 基因的编码序列,并开展了分子进化和低氧诱导表达研究。结果表明,花斑裸鲤 *Epo* 基因编码序列长度为 552 bp,编码 183 个氨基酸; *Epor* 基因编码序列长度为 1 590 bp,编码 529 个氨基酸。氨基酸序列同源性分析显示,花斑裸鲤促红细胞生成素(EPO)和促红细胞生成素受体(EPOR)与鲤科其他鱼类均有较高的同源性,表明在进化过程中具有较强保守性,同时花斑裸鲤 *Epo* 和 *Epor* 基因均未经过正向选择。在重度低氧[溶解氧为(0.3 ± 0.1)mg/L]和中度低氧[溶解氧为(3.0 ± 0.1) mg/L]胁迫下,花斑裸鲤部分关键组织如红肌、脑组织中 *Epo* mRNA 表达量急剧升高,表明促红细胞生成素(EPO)可能在花斑裸鲤运动、神经营养和神经保护方面发挥了重要作用,是对低氧环境适应的一种调节机制。

关键词: 花斑裸鲤; *Epo*; *Epor*; 表达; 分子进化; 低氧

中图分类号: Q786 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263 (2018) 02-220-14

cDNA Cloning and Hypoxia-Induced mRNA Expression of *Epo* and *Epor* Genes in *Gymnocypris eckloni*

ZHAO Yong-Li^{①②} WU Rong-Rong^{①②} CHAO Yan^③ CHEN Qi-Chang^{①②}
XIA Ming-Zhe^① QI De-Lin^{①③*}

① State Key Laboratory of Plateau Ecology and Agriculture, Qinghai University, Xining 810016; ② College of Eco-Environmental Engineering, Qinghai University, Xining 810016; ③ Animal Science Department of Agriculture and Animal Husbandry College, Qinghai University, Xining 810016, China

Abstract: Erythropoietin (EPO) is a glycoprotein hormone that plays a potential role in hypoxic adaptation in animals. In the present study, the encoding sequences of *Epo* and *Epor* genes were cloned in *Gymnocypris eckloni* by RT-PCR method. The coding region of *Epo* and *Epor* were 552 bp and 1 590 bp, which encoded

基金项目 青海省自然科学基金面上项目 (No. 2015-ZJ-901), 国家自然科学基金项目 (No. 31460094);

* 通讯作者, E-mail: delinqi@126.com;

第一作者介绍 赵永丽, 女, 硕士研究生; 研究方向: 资源生物学; E-mail: zhao_yongli123@126.com.

收稿日期: 2017-09-20, 修回日期: 2017-11-03 DOI: 10.13859/j.cjz.201802007

183 and 529 amino acid residues respectively (Fig. 1 and 2). The high homology of EPO and EPOR protein of *G. eckloni* with other cyprinid fishes indicated that the two proteins were evolutionary conserved (Table 2). Molecular evolution analysis suggested that *Epo* and *Epor* genes of *G. eckloni* did not undergo positive selection (Table 3). Under severe (the dissolved oxygen was 0.3 ± 0.1 mg/L) and moderate hypoxic (the dissolved oxygen was 3.0 ± 0.1 mg/L) conditions, the *Epo* mRNA levels in key tissues such as brain and red muscle were increased significantly (Fig. 4 and 5), implying its potential roles in movement, neuroprotection and neurotrophs, which may be a regulatory mechanism of fish to hypoxic adaptation.

Key words: *Gymnocypris eckloni*; *Epo*; *Epor*; Expression; Molecular evolution; Hypoxia

裂腹鱼亚科 (Schizothoracinae) 鱼类是青藏高原鱼类区系中的主体成分之一, 广泛分布于青藏高原及其毗邻地区主要内外流水系、湖泊 (武云飞等 1992, 陈毅峰等 2000)。由于该亚科鱼类主要分布于高海拔或高纬度地区, 在长期的进化中逐步形成了适应于高原低氧和季节性寒冷环境的独特特征, 如鳞片退化、生长缓慢等 (武云飞等 1992, Qi et al. 2012)。因此, 裂腹鱼亚科鱼类被认为是研究低氧和季节性寒冷适应机制的理想类群。花斑裸鲤 (*Gymnocypris eckloni*) 是裂腹鱼亚科的一个代表物种, 在黄河上游兰州以上河段深水缓流处或静水湖泊等水系中广泛分布 (祁得林 2009)。正如裂腹鱼亚科其他鱼类一样, 花斑裸鲤对水体环境的溶解氧波动 ($3.0 \sim 8.5$ mg/L) 表现出极强的习服特性。然而, 截止目前对花斑裸鲤的研究主要集中在形态分类 (Wei et al. 2015)、生物学特性、繁殖特性、系统发育和人工培育等方面 (鄢思利 2016), 而对其适应低氧的功能基因方面的研究仍较少。

促红细胞生成素 (erythropoietin, EPO) 是一种糖蛋白激素, 是细胞因子家族中的一员, 在红细胞生成过程中起着重要的调节作用 (Krantz 1991, Fried 2009)。EPO 的作用是通过与促红细胞生成素受体 (erythropoietin receptor, EPOR) 结合形成同源二聚体, 活化促红细胞生成素受体 (EPOR), 从而激活 JAK/STAT 信号通路, 引起红细胞的增殖和分化, 但是促红细胞生成素受体 (EPOR) 主要作用在红祖细胞上 (Ratajczak et al. 2001,

Jelkmann et al. 2004)。促红细胞生成素 (EPO) 作为一种糖蛋白激素, 能够刺激骨髓造血功能, 及时有效地增加红细胞的数量、血红蛋白含量和红细胞比积, 从而提高血液的携氧能力 (Katakura et al. 2014)。促红细胞生成素受体 (EPOR) 具有其家族的保守序列, 即胞外域的 4 个半胱氨酸残基和 1 个色氨酸-丝氨酸-X-色氨酸-丝氨酸结构 (Trp-Ser-X-Trp-Ser motif, WSXWS motif, X 表示任意氨基酸), 此结构在促红细胞生成素 (EPO) 的正确折叠过程中起关键作用。以往研究表明, *Epo* 是氧依赖型基因, 缺氧可以诱导 *Epo* 表达的增加, 从而调节红祖细胞的增殖、分化和成熟 (Ratajczak et al. 2001, Richmond et al. 2005)。另有研究报道, 在缺氧条件下低氧诱导因子 (hypoxia inducible factor, HIF) 通过转录水平的调节诱导哺乳动物和鱼类促红细胞生成素 (EPO) 的产生 (Semenza 2000)。然而, 针对裂腹鱼亚科鱼类 *Epo* 基因的分子进化和适应性表达调控方面的研究仍然欠缺。

本研究通过 RT-PCR 方法获得了花斑裸鲤 *Epo* 及 *Epor* 基因的编码序列, 研究其分子进化, 并通过相对定量 Real-time PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR) 方法检测 *Epo* 及 *Epor* 基因在花斑裸鲤不同组织中的低氧诱导表达水平, 为进一步探索 *Epo* 及 *Epor* 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 样本采集 花斑裸鲤 60 尾(体重约 150 g)来自于青海省玛多县黄河支流(海拔 4 200 m)。活鱼运送至实验室后暂养于 80 L 塑料桶中,水温保持在 10~13 °C。预实验 3 d,用空气充分曝气使溶解氧(dissolved oxygen, DO)维持在(8.4±0.1) mg/L(即为本研究中的常氧)。

1.1.2 分组与低氧处理 随机取 6 尾鱼作为对照组(常氧组),另取 6 尾鱼作为重度低氧组,其余 48 尾鱼作为中度低氧组。常氧组经预实验后快速解剖并分离所需组织保存于液氮中。重度和中度低氧处理均采用自制水族箱顶部覆盖塑料膜,水体充氮除氧方法而获得(Xia et al. 2016)。维持低氧期间,利用 AZ8402 溶解氧测定仪(台湾恒欣)定期监控水体溶解氧。重度低氧组 6 尾鱼置于 40 L 塑料桶中,1 h 内将溶解氧从(8.4±0.1) mg/L 下降到(0.3±0.1) mg/L,然后维持 4 h;中度低氧组 48 尾鱼置于 80 L 塑料桶中,1 h 内将溶解氧从(8.4±0.1) mg/L 下降到(3.0±0.1) mg/L,并维持 96 h,期间每 12 h 采集 6 尾鱼。重度和中度低氧组每期实验结束后,快速解剖样品并分离所需组织保存于液氮中备用。

1.2 方法

1.2.1 红肌总 RNA 的提取和 cDNA 第一链的合成 利用天根生化科技(北京)有限公司的 RNAprep Pure Tissue Kit 提取红肌组织总

RNA。cDNA 第一链的合成使用 RNA PCR Kit (AMV) ver.3.0 (Takara) 试剂盒,以花斑裸红肌总 RNA 为模板, Oligo dT 为反转录引物,按试剂盒推荐方法进行操作。

1.2.2 *Epo* 和 *Epor* 基因 cDNA 序列扩增 花斑裸鲤 *Epo* 全长编码序列(coding sequence, CDS)的克隆采用一对引物 EPO_F 和 EPO_R (Xu et al. 2016) (表 1)。*Epor* 全长 CDS 的克隆采用 2 对引物(EPOR_F1 和 EPOR_R1, EPOR_F2 和 EPOR_R2)分段克隆(表 1)。引物根据 GenBank 登录的安水金线鲃(*Sinocyclocheilus anshuiensis*)的 *Epor* cDNA 全长序列(XM_016451553)设计。*Epo* 和 *Epor* cDNA 的克隆以红肌 cDNA 第一链为模板,利用 Premix Ex Taq® Version 2.0 试剂盒进行 PCR 扩增。PCR 扩增程序:94 °C 预变性 3 min;98 °C 变性 10 s, 55~60 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 共 35 循环;最后一循环 72 °C 续延伸 5 min。PCR 扩增产物经 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳后,用 TaKaRa Agarose Gel DNA Purification Kit Ver.2.0 产物回收试剂盒进行回收纯化,然后克隆至 pMD19-T 载体中,转化感受态 *E. coli* JM109, PCR 检测阳性克隆后送生工(上海)生物有限公司进行测序,测序引物为 RV-M 和 M13-47 (表 1)。

1.2.3 序列分析 利用 Lasergene7.0 (Burland

表 1 花斑裸鲤 *Epo* 和 *Epor* 基因克隆及分析引物

Table 1 Primers for *Epo* and *Epor* gene cloning and analysis in *Gymnocypris eckloni*

引物名称 Primers	序列 Sequences (5'-3')	用途 Usage
EPO_F	CCGGAATTCTTGCGAATGTTTCACGGTTCA	RT-PCR
EPO_R	CGCGGATCCGGCCCTTGCTCAAAATTGTCTATC	
EPOR_F1	CCACCTGGAAAGGAGGATACACCTTTTCGGG	RT-PCR
EPOR_R1	GTCAGGCCAGAGTTTCTTAAGAAGAAACT	
EPOR_F2	CTGATCCTCTGCCTGCTGTCTCTGACT	RT-PCR
EPOR_R2	ATGACAGAGTATTCATTTTGGGTGAAC	
EPO_realF	TTGATTTTGATGTCTGGGAAGC	qRT-PCR
EPO_realR	CCCGCAGGAAGTTGATGTG	
EPOR_realF	TTCACCGCTGGAGGTTTATC	qRT-PCR
EPOR_realR	TGGGGACGAGATTCTGGGT	
β-actinF	GCCAACAGGGAAAAGATGAC	qRT-PCR
β-actinR	TTGCCAATGGTGATGACCTG	
RV-M	GAGCGGATAACAATTTACACAGG	测序引物
M13-47	CGCCAGGGTTTCCCAGTCAGGAC	

2000) 软件, 对所克隆的基因序列进行阅读框分析、氨基酸序列推定; Blastx 程序 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 进行蛋白质相似性搜索; 利用 DNAMAN Version 6.0 (<http://www.lynnon.com>) 进行氨基酸序列同源性比较; 利用 Smart (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 和 NCBI 中的保守结构域数据库 (conserved domain database, CDD) 进行结构域分析 (Marchlerbauer et al. 2005); 利用 ExPASy-Tools (<http://www.expasy.ch/tools/>) 对 EPO 和 EPOR 蛋白的生化特性和蛋白质功能位点进行预测分析。

1.2.4 系统发育分析 利用 MEGA6.0 (Kumar et al. 2004) 软件构建邻接 (neighbor-joining, NJ) 和最大似然 (maximum likelihood, ML) 系统发育树, 同时应用自举检验 (bootstrap test) 估计系统树中节点的支持率, NJ 和 ML 重复次数均为 1 000 次。系统发育分析中包括另外 14 种硬骨鱼类 EPO 和 EPOR 氨基酸序列 (表 2)。

1.2.5 选择压力分析 利用 PAML4.7 软件包 (Yang et al. 2007) 中的 codeml 程序来分析 *Epo* 和 *Epor* 基因在进化过程中选择压力的变化。依据序列比对的非同义替换 (nonsynonymous substitution) 与同义替换 (synonymous substitution) 比值 ($\omega = d_N/d_S$, d_N 表示密码子的非同义替换, d_S 表示密码子的同义突变率) 确定选择压力的方向和程度, 其中 $\omega = 1$ 、 $\omega < 1$ 和 $\omega > 1$ 分别表示中性选择、净化选择和正向选择。为了检测不同支系和特定支系的选择压力模式, 本研究在选择压力分析中采用 2 种模型: 支-特异模型 (branch-specific) 和支-位点模型 (branch-site)。首先利用支-特异模型中的自由比率 (free ratio) 模型检测不同支系的非同义突变与同义突变比值, 确定可能经历正向选择的支系, 然后通过支-位点模型进一步确定特定支系中 *Epo* 和 *Epor* 基因特定位点的正向选择情况。在支-位点模型分析中, 首先将花斑裸鲤作为前景支 (foreground), 而将其他物种作为背景支 (background), 分别检测花斑裸鲤

Epo 和 *Epor* 基因是否存在正向选择位点。然后, 再将花斑裸鲤和软刺裸鲤 (*Gymnocypris dobula*) 同时作为前景支, 其他物种作为背景支, 分别检测花斑裸鲤和软刺裸鲤这两种同属物种在 *Epo* 和 *Epor* 基因中是否存在相同的正向选择位点。在支-位点模型中, model A 模型 (正选择模型) 的备择假说有两种, model A 允许前景支 $\omega > 1$, 而在无效假设 Null A 中将所有支 ω 固定为 1 (Zhang et al. 2005)。然后通过似然比检验法 (likelihood ratio test, LRT) 来确定所选择的两个模型中哪一个模型更适合 *Epo* 和 *Epor* 基因所经历的选择压力估计, 并根据经验贝叶斯 (Bayes empirical Bayes, BEB) 方法确定 *Epo* 和 *Epor* 基因中潜在的正向选择位点。

1.2.6 qRT-PCR 检测低氧条件下 *Epo* 和 *Epor* 基因的表达 白肌、红肌、心、脑和鳃组织总 RNA 提取采用 RNAprep Pure Tissue Kit [天根生化科技 (北京) 有限公司], 总 RNA 经 DNase I (RNase free) 处理, 平衡其起始浓度后, 利用 FastQuant RT Kit [天根生化科技 (北京) 有限公司] 反转录第一链。然后依照 SuperReal PreMix Plus (SYBR Green) 试剂盒在 iQ5 Multicolor Real-Time PCR Detection System (美国伯乐公司) 上进行 qRT-PCR 分析。qRT-PCR 反应体系 25 μ l: 2 $\times$ SuperReal PreMix Plus 12.5 μ l、上下游引物 (10 μ mol/L) 各 1 μ l、cDNA 模板 1 μ l、ddH₂O 9.5 μ l。qRT-PCR 时, 每份样品重复 3 次, 结果采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析 (Livak et al. 2012)。qRT-PCR 检测时 β -actin 基因表达量作为内标, 引物见表 1。

2 结果与分析

2.1 花斑裸鲤 *Epo* 和 *Epor* 基因 CDS 核苷酸序列及编码氨基酸序列分析

花斑裸鲤 *Epo* 和 *Epor* 基因 CDS 核苷酸序列长度分别为 552 bp 和 1 590 bp, 分别编码 183 和 529 个氨基酸。起始密码子为 ATG, 终止密码子分别为 TGA 和 TAA。序列分析显示, EPO

表 2 花斑裸鲤与其他硬骨鱼 EPO 和 EPOR 氨基酸序列比较

Table 2 Amino acid sequence homologies of EPO and EPOR between *Gymnocypris eckloni* and other teleost fish

物种 Species	EPO		EPOR	
	GenBank 登录号 GenBank accession No.	同源性 (%) Homology	GenBank 登录号 GenBank accession No.	同源性 (%) Homology
软刺裸鲤 <i>Gymnocypris dobula</i>	ALZ45041	97.8	ALZ45385	98.6
裸腹叶须鱼 <i>Ptychobarbus kaznakovi</i>	ALZ45042	97.3	ALZ45386	98.6
犀角金线鲃 <i>Sinocyclocheilus rhinoceros</i>	XP_016421789	95.6	XP_016377277	89.4
安水金线鲃 <i>Sinocyclocheilus anshuiensis</i>	XP_016310293	95.1	XP_016307039	84.6
鲤鱼 <i>Cyprinus carpio</i>	ABB83930	95.1	XP_018921469	86.1
鲫鱼 <i>Carassius auratus</i>	AGH20610	89.6	AGN92860	88.2
斑马鱼 <i>Dania rerio</i>	ABB77436	88.0	NP_001036799	75.3
虹鳟 <i>Oncorhynchus mykiss</i>	XP_021433597	62.8	XP_021413784	58.4
纳氏锯脂鲤 <i>Pygocentrus nattereri</i>	XP_017565797	71.4	XP_017575717	68.0
墨西哥脂鲤 <i>Astyanax mexicanus</i>	XP_007250217	71.0	XP_015458198	63.6
大西洋鲑 <i>Salmo salar</i>	XP_014062572	60.7	NP_001133707	59.3
大黄鱼 <i>Larimichthys crocea</i>	XP_010746579	59.0	XP_010748488	54.3
深裂眶锯雀鲷 <i>Stegastes partitus</i>	XP_008284440	59.0	XP_008297415	53.1
青鳉 <i>Oryzias latipes</i>	XP_004079700	54.6	XP_004072038	47.5

和 EPOR 均含有一个由 23 个氨基酸组成的信号肽序列 (图 1, 图 2-1 和 2-2)。此外, 花斑裸鲤 EPO 序列中存在 3 个 N-糖基化位点 (N-glycosylation site)、4 个酪蛋白激酶 II 磷酸化位点 (casein kinase II phosphorylation site) 和 1 个蛋白激酶 C 磷酸化位点 (protein kinase C phosphorylation site)。EPOR 包含一个受体-配体结合位点 (29~129)、5 个 N-糖基化位点、7 个酪蛋白激酶 II 磷酸化位点、8 个蛋白激酶 C 磷酸化位点、1 个 N-酰基化位点 (N-myristoylation) 和 2 个酪氨酸激酶磷酸化位点 (tyrosine kinase phosphorylation site)。

2.2 EPO 和 EPOR 氨基酸序列与其他硬骨鱼类同源性分析

应用 DNAMAN Version 6.0 软件, 比较花斑裸鲤鱼与软刺裸鲤、裸腹叶须鱼 (*Ptychobarbus kaznakovi*)、犀角金线鲃 (*Sinocyclocheilus rhinoceros*)、安水金线鲃 (*S. anshuiensis*)、鲤鱼 (*Cyprinus carpio*)、鲫鱼 (*Carassius auratus*)、斑马鱼 (*Dania rerio*)、虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*)、纳氏锯脂鲤

(*Pygocentrus nattereri*)、墨西哥脂鲤 (*Astyanax mexicanus*)、大西洋鲑 (*Salmo salar*)、大黄鱼 (*Larimichthys crocea*)、深裂眶锯雀鲷 (*Stegastes partitus*) 和青鳉 (*Oryzias latipes*) 的促红细胞生成素 (EPO) 和促红细胞生成素受体 (EPOR) 氨基酸同源性。花斑裸鲤的 EPO 与以上物种的同源性 54.6%~97.8%; 以上物种与花斑裸鲤 EPOR 的同源性在 47.5%~98.6% 之间 (表 2)。

2.3 系统发育分析

基于花斑裸鲤 *Epo* 和 *Epor* 基因序列和 GenBank 公布的其他 14 种硬骨鱼的相应序列分别构建了系统发育树。*Epo* 和 *Epor* 基因进化树具有高度相似的拓扑结构, 细微差异仅存在于个别支系的支持率上, 故仅给出 *Epo* 基因进化树 (图 3)。

2.4 选择压力分析

系统发育分析结果显示, *Epo* 和 *Epor* 基因进化树与已报道的物种进化树基本一致 (Saitoh et al. 2006), 因此在选择压力分析中将 *Epo* 基因进化树作为输入树 (input tree)。支-特异模

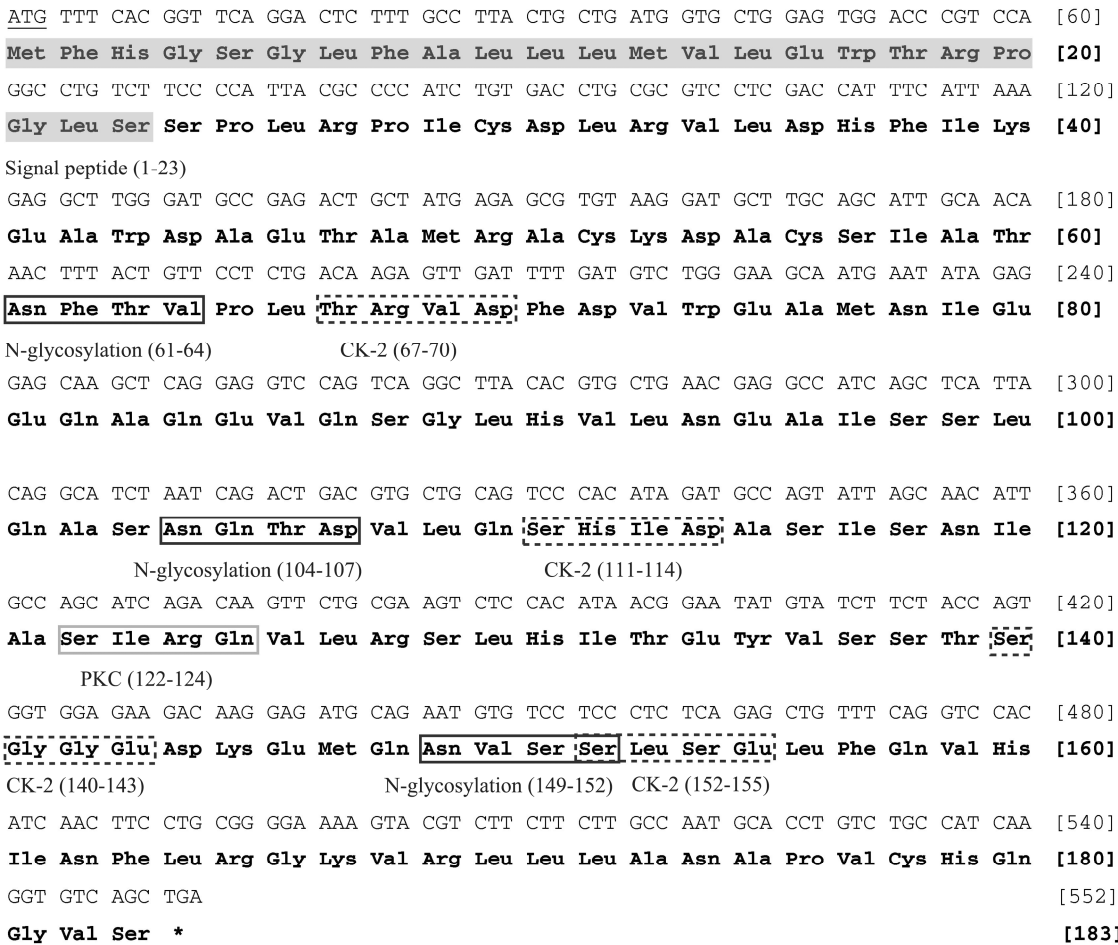


图 1 花斑裸鲤 *Epo* 基因编码序列及其推导的氨基酸序列

Fig. 1 The encoding sequences of *Epo* gene and the deduced amino acids sequence from *Gymnocypris eckloni*
下划线表示起始密码子 ATG; * 表示非编码氨基酸的终止密码子; 粗体字表示推导的氨基酸序列。灰色阴影表示信号肽序列; 黑色虚线框表示酪蛋白激酶 II 磷酸化作用位点 (CK-2); 黑色框表示 N-糖基化位点; 灰色框表示蛋白激酶 C 磷酸化作用位点 (PKC)。
Starting codon ATG are underlined. The asterisk in amino acid sequence indicates the non-encoding termination codon. Boldface characters represent deduced amino acid sequence. Signal peptide is in gray shadow. Casein kinase II phosphorylation sites (CK-2) are in black dotted boxes; N-glycosylation sites are in black boxes; Protein kinase C phosphorylation sites (PKC) are in gray boxes.

型中自由比率分析结果表明, 软刺裸鲤及其祖先支 (支 6, 图 3) *Epo* 基因具有明显不同的进化速率 ($\omega > 1$), 而在花斑裸鲤支中并未检测到正向选择 ($\omega = 0.38$)。同时, 在所有硬骨鱼类的 *Epor* 基因中均未检测到进化速率较高的支系 (图 3)。为了进一步澄清特定支系 *Epo* 基因是否发生了特定位点的正向选择, 本研究又进行了支-位点模型分析。结果表明, 当花斑裸鲤作为前景支, 而将其他物种作为背景支时,

在花斑裸鲤 *Epo* 和 *Epor* 基因中均未检测到正向选择位点 ($\omega_2 = 1$, ω_2 表示前景支相对于背景支的非同义替换与同义替换比值) (表 3)。然而将花斑裸鲤和软刺裸鲤的共同祖先支 (支 6, 图 3) 作为前景支, 而将其他物种作为背景支时, 祖先支 *Epo* 进化速率较高于其他支 ($\omega_2 = 1.54$, ω_2 花斑裸鲤和软刺裸鲤的共同祖先支相对于背景支的非同义替换与同义替换比值), 但是似然比检验法显示差异不显著 ($2 \Delta \ell =$

ATG ACA AAA ATG AGG AGT AAC AGA TTG AAA ATA GTT TTC ATG TTG TGT CTT GCT TCC GTC	[60]
Met Thr Lys Met Arg Ser Asn Arg Leu Lys Ile Val Phe Met Leu Cys Leu Ala Ser Val	[20]
ACT ACA GGA GGA CAA TAC TTT GAA AGT AAA GTG GCC CAG TTA CTC CAA GAC GAA ACA GAG	[120]
Thr Thr Gly Gly Gln Tyr Phe Glu Ser Lys Val Ala Gln Leu Leu Gln Asp Glu Thr Glu	[40]
Signal peptide (1-23)	
GAT ATT AAA TGT TTT GTG GAG GAA AAG GAT CTC ACA TGC TTT TGG GAA GAC GAG GAA GAG	[180]
Asp Ile Lys Cys Phe Val Glu Glu Lys Asp Leu Thr Cys Phe Trp Glu Asp Glu Glu Glu	[60]
AGG AAT AAT TCA CAC GAT CAA TAT ACC TTC ACG TAT TCT TTC GAG AAT AAG AAC AAG ATG	[240]
Arg Asn Asn Ser His Asp Gln Tyr Thr Phe Thr Tyr Ser Phe Glu Asn Lys Asn Lys Met	[80]
N-glycosylation (62-65)	
GCT TGT GCG GTT TCA TCT CTG TCT TTA CTG GCC AGT AAC AAA AGC GTC CTC TTC GGC ATA	[300]
Ala Cys Ala Val Ser Ser Leu Ser Leu Leu Ala Ser Asn Lys Ser Val Leu Phe Gly Ile	[100]
PKC (92-94) N-glycosylation (93-96)	
CTG CCC AAA CCC CCC CTC TTC ACG ACT ATT AAT GTG CAG GTT CTT CGT GAT GGC CGG AGG	[360]
Leu Pro Lys Pro Pro Leu Phe Thr Thr Ile Asn Val Gln Val Leu Arg Asp Gly Arg Arg	[120]
CTC TAC AGT CGT AGC CTA AAC ACT GAG AAT TTA TAT TTT CTC GAT CCT CCC CGA AAC CTC	[420]
Leu Tyr Ser Arg Ser Leu Asn Thr Glu Asn Leu Tyr Phe Leu Asp Pro Pro Arg Asn Leu	[140]
ACG GTC ATG AGC TCA GGG AAG GAA GGG CAG TTG AAC GTG AGC TGG TGG CCT CCT CCA GTC	[480]
Thr Val Met Ser Ser Gly Lys Glu Gly Gln Leu Asn Val Ser Trp Trp Pro Pro Pro Val	[160]
N-glycosylation (139-142) PKC (145-147) CK-2 (145-148) N-glycosylation (152-155)	
AAA TAC TTG TAT GAC AGT GTG ATA TAT GAG GTC AGA TAC GCA GTG GAG GGA AGT AAC ATG	[540]
Lys Tyr Leu Tyr Asp Ser Val Ile Tyr Glu Val Arg Tyr Ala Val Glu Gly Ser Asn Met	[180]
TKP (161-169) N-myristoylation (177-182)	
GGC AAG GTG GAG GTC ATT AAG GTC AGC ACA AAG CTG GTT TTG CGT GGC TTA CAG TCC GAC	[600]
Gly Lys Val Glu Val Ile Lys Val Ser Thr Lys Leu Val Leu Arg Gly Leu Gln Ser Asp	[200]
PKC (189-191)	
ACC AGA TAC AAG GTG TGG ATC CGT ACC AAA CCT GAT GGT GTT TCC TAC AAA GGC TAC TGG	[660]
Thr Arg Tyr Lys Val Trp Ile Arg Thr Lys Pro Asp Gly Val Ser Tyr Lys Gly Tyr Trp	[220]
CK-2 (209-212) TKP (208-216) PKC (215-217)	
AGT GCT TGG ACC GAG CCT GTG TTT GGA GTT ACT CCG CCA AGC GAC GTG GAT CCG CTG ATC	[720]
Ser Ala Trp Thr Glu Pro Val Phe Gly Val Thr Pro Pro Ser Asp Val Asp Pro Leu Ile	[240]
CK-2 (234-237)	
GTG TTA CTG GTT CTT TTC ATC GTG CTG ATC CTC TGC CTG CTG TCT CTG ACT GTG TTT CTG	[780]
Val Leu Leu Val Leu Phe Ile Val Leu Ile Leu Cys Leu Leu Ser Leu Thr Val Phe Leu	[260]
TCC CAG CAC AAG TTT CTT CTT AAG AAA CTC TGG CCT GAC ATC CCA ACA CCA GAG CAC AAG	[840]
Ser Gln His Lys Phe Leu Leu Lys Lys Leu Trp Pro Asp Ile Pro Thr Pro Glu His Lys	[280]
TTT CCT GGT CTT TTT AGT GTC TAC AAA GGA GAT TTT AAG GAG TGG ATG AGC CAA AAT AAT	[900]
Phe Pro Gly Leu Phe Ser Val Tyr Lys Gly Asp Phe Lys Glu Trp Met Ser Gln Asn Asn	[300]
GGC TAC ATG TGG GGC AGA TCA GTC CAT GTG TAC ACA GAG GAG CTT CTT TCA CCG CTG GAG	[960]
Gly Tyr Met Trp Gly Arg Ser Val His Val Tyr Thr Glu Glu Leu Leu Ser Pro Leu Glu	[320]
CK-2 (317-320)	

图 2-1 花斑裸鲤 *Epor* 基因编码序列及其推导的氨基酸序列Fig. 2-1 The encoding sequences of *Epor* gene and the deduced amino acids sequence from *Gymncypriis eckloni*



图 2-2 花斑裸鲤 *Epor* 基因编码序列及其推导的氨基酸序列

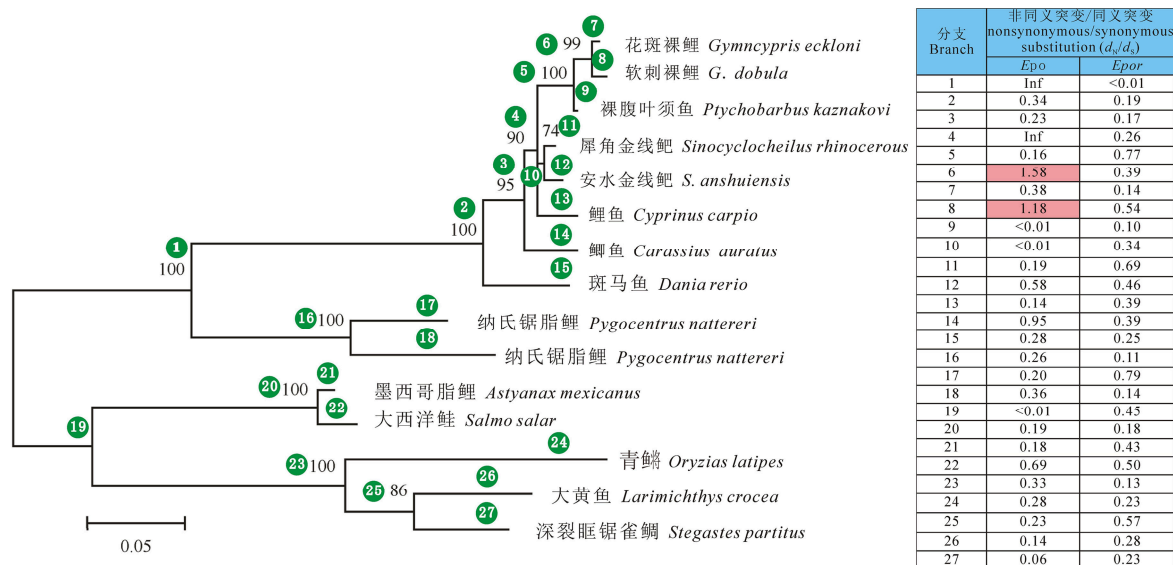
Fig. 2-2 The encoding sequences of *Epor* gene and the deduced amino acids sequence from *Gymnocypris eckloni*
下划线表示起始密码子 ATG; * 表示非编码氨基酸的终止密码子; 推导的氨基酸序列; 灰色阴影表示信号肽序列; 黑色虚线框表示酪蛋白激酶 II 磷酸化作用位点 (CK-2); 黑色框表示 N-糖基化位点; 灰色框表示蛋白激酶 C 磷酸化作用位点 (PKC)。黑色虚线表示 N-酰基化位点; 黑色粗线表示酪氨酸激酶磷酸化位点。

Starting codon ATG are underlined. The asterisk in amino acid sequence indicates the non-encoding termination codon. Boldface characters represent deduced amino acid sequence. Signal peptide is in gray shadow. Casein kinase II phosphorylation sites (CK-2) are in black dotted boxes; N-glycosylation sites are in black boxes; Protein kinase C phosphorylation sites (PKC) are in gray boxes; N-myristoylation sites are in black dotted lines; Tyrosine kinase phosphorylation sites are in Black thick lines.

1.1, $df=1$, $P=0.38$); 同样, 花斑裸鲤和软刺裸鲤的共同祖先支 *Epor* 基因中也未检测到正向选择位点 ($\omega_2=1$) (表 3)。

2.5 花斑裸鲤低氧胁迫下 *Epo* 和 *Epor* 基因在组织中的表达

与常氧相比, 花斑裸鲤重度低氧[DO=(0.3 ± 0.1) mg/L]胁迫 4 h 后, *Epo* 基因在白肌 ($P<0.01$)、脑 ($P<0.01$) 和红肌 ($P<0.05$) 组织中的表达量显著上升, 而在心和鳃组织中的表达量无明显变化 ($P>0.05$) (图 4a); *Epor* 基

图3 花斑裸鲤与其他物种基于 *Epo* 基因序列的邻接系统发育树Fig. 3 The neighbor-joining phylogenetic tree for *Gymnocypris eckloni* and other teleost fish based on *Epo* gene sequences

左图为基于 *Epo* 基因序列的系统发育树，节点上数据表示 1 000 次重复的支持率 (%)。右图为不同支系 *Epo* 和 *Epor* 基因 ω 值，右图中的分支编号是指左图系统发育树上的编号，红色阴影表示 ω 值大于 1，Inf 表示相应 d_N 值为 0，其中 ω 值表示非同义替换与同义替换比值， d_N 表示密码子的非同义替换。各物种 *Epo* 基因序列登录号分别为：软刺裸鲤 KT188754、裸腹叶须鱼 KT188755、犀角金线鲃 XM_016566303、安水金线鲃 XM_016454807、鲤鱼 DQ278877、鲫鱼 KC460317、斑马鱼 DQ278896、虹鳟 XM_021577922、纳氏锯脂鲤 XM_017710308、墨西哥脂鲤 XM_007250155、大西洋鲑 XM_014207097、大黄鱼 XM_010748277、深裂眶锯雀鲷 XM_008286218 和青鳉 XM_004079652。

The left part is phylogenetic tree based on *Epo* gene sequences. Numbers at the nodes denote the bootstrap values of 1 000 replicates (%). The right part indicates the ω values of *Epo* and *Epor* genes. The numbers in the right part refer to the numbers marked on the phylogenetic tree. The values being greater than 1 are showed in red shadow. Inf refers to ω value with d_N being zero. Among them ω values refer to nonsynonymous/synonymous substitution ratios. GenBank accession numbers of *Epo* gene sequences used are: *Gymnocypris dobula*, KT188754; *Ptychobarbus kaznakovi*, KT188755; *Sinocyclocheilus rhinoceros*, XM_016566303; *Sinocyclocheilus anshuiensis*, XM_016454807; *Cyprinus carpio*, DQ278877; *Carassius auratus*, KC460317; *Dania rerio*, DQ278896; *Oncorhynchus mykiss*, XM_021577922; *Pygocentrus nattereri*, XM_017710308; *Astyanax mexicanus*, XM_007250155; *Salmo salar*, XM_014207097; *Larimichthys crocea*, XM_010748277; *Stegastes partitus*, XM_008286218; *Oryzias latipes*, XM_004079652.

因在心和脑组织中的表达量显著上升 ($P < 0.05$)，而在白肌、鳃和红肌中的表达量基本保持不变 ($P > 0.05$) (图 4b)。

中度低氧胁迫 [$DO = (3.0 \pm 0.1) \text{ mg/L}$] 条件下，花斑裸鲤白肌 *Epo* 表达量从 12 h 开始显著升高，24 h 时达到峰值，随后有所下降，但是均显著高于 0 h 的表达量 ($P < 0.05$)，而白肌中 *Epor* 的表达量只有在 72 h 和 84 h 明显高

于 0 h，其余时间段的表达量与 0 h 相比无显著变化 ($P > 0.05$) (图 5a)；心组织中，*Epo* 表达量 12 h 和 36 h 时显著高于 0 h ($P < 0.05$)，84 h 显著下调，其余时间段与 0 h 相比无显著变化 ($P > 0.05$)，而 *Epor* 的表达量在 72 h 和 84 h 时显著上调 ($P < 0.05$)，在 12 h 和 48 h 时显著下调 ($P < 0.05$)，其余时间段与 0 h 相比无显著变化 ($P > 0.05$) (图 5b)；脑组织中，低氧

表 3 支位点模型下似然率值和参数估计
Table 3 Likelihood values and parameter estimates under the branch-site models

基因 Gene	前景支 Foreground	模型 Model	参数估计 Parameter estimate	似然率值 (ℓ) Likelihood value (ℓ)	差值 (P值) 2 Δℓ (P value)	正向选择位点 Positively selected sites
<i>Epo</i>	花斑裸鲤 <i>Gymnocypris eckloni</i>	Null A	$p_0 = 0.18, p_1 = 0.06, (p_2 + p_3 = 0.76), \omega_2 = 1.0$	- 3 274.06	0.02 (0.89)	不允许 Not allowed
		Model A	$p_0 = 0.18, p_1 = 0.06, (p_2 + p_3 = 0.76), \omega_0 = 0.15, \omega_1 = 1.0, \omega_2 = 1.0$	- 3 274.07		未检测到正向选择位点 Positively selected sites were not detected
	裸鲤属祖先支 Ancestor branch of genus <i>Gymnocypris</i>	Null A	$p_0 = 0, p_1 = 0, (p_2 + p_3 = 1.0), \omega_2 = 1.0$	- 3 272.11	0.74 (0.38)	不允许 Not allowed
		Model A	$p_0 = 0, p_1 = 0, (p_2 + p_3 = 1.0), \omega_0 = 0.16, \omega_1 = 1.0, \omega_2 = 1.54$	- 3 272.48		未检测到正向选择位点 Positively selected sites were not detected
<i>Epor</i>	花斑裸鲤 <i>Gymnocypris eckloni</i>	Null A	$p_0 = 0.79, p_1 = 0.20, (p_2 + p_3 = 0.01), \omega_2 = 1.0$	- 11 766.79	0 (1)	不允许 Not allowed
		Model A	$p_0=0.80, p_1= 0.20, (p_2+p_3= 0), \omega_0= 0.17, \omega_1= 1.0, \omega_2 = 1.0$	- 11 766.79		未检测到正向选择位点 Positively selected sites were not detected
	裸鲤属祖先支 Ancestor branch of genus <i>Gymnocypris</i>	Null A	$p_0 = 0.32, p_1 = 0.08, (p_2 + p_3 = 0.60), \omega_2 = 1.0$	- 11 765.33	0 (1)	不允许 Not allowed
		Model A	$p_0 = 0.32, p_1 = 0.08, (p_2 + p_3 = 0.60), \omega_0 = 0.17, \omega_1 = 1.0, \omega_2 = 1.0$	- 11 765.33		未检测到正向选择位点 Positively selected sites were not detected

p_0 表示净化选择的比例, p_1 表示中性选择的比例, $p_2 + p_3$ 表示正选择的比例; ω_0 、 ω_1 和 ω_2 分别为确定净化选择、中性选择和正向选择时的非同义替换与同义替换比值。

p_0 is the proportion of purifying selection; p_1 is the proportion of neutral selection; $p_2 + p_3$ is the proportion of positive selection. ω_0 , ω_1 and ω_2 are the nonsynonymous/synonymous substitution ratios to determine purifying, neutral and positive selection, respectively.

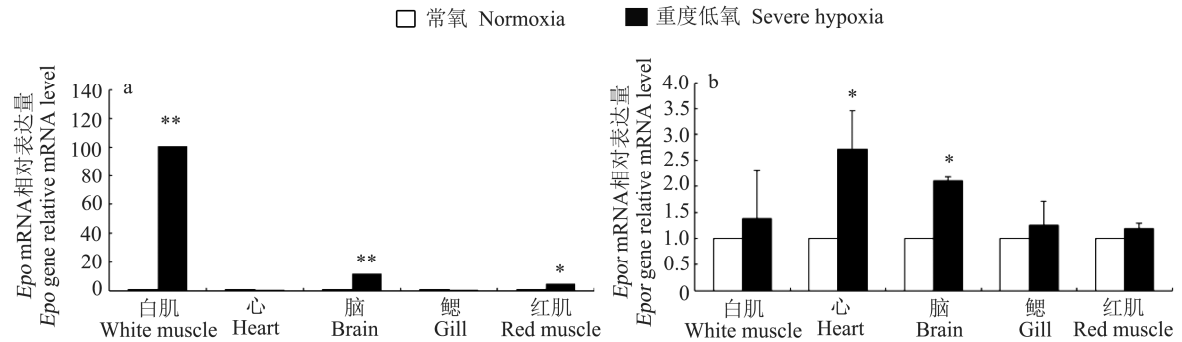


图 4 重度低氧和常氧条件下花斑裸鲤主要组织 *Epo* 和 *Epor* 基因的表达量

Fig. 4 Relative mRNA levels of *Epo* and *Epor* genes in white muscle, heart, brain, gill and red muscle under severe hypoxia and normoxia

a. *Epo* 基因的表达量; b. *Epor* 基因表达量; 星号表示与常氧组相比差异显著, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ 。
a. Relative mRNA levels of *Epo* gene; b. Relative mRNA levels of *Epor* gene. Asterisks indicate significant difference (** $P < 0.01$, * $P < 0.05$) from respective normoxia control.

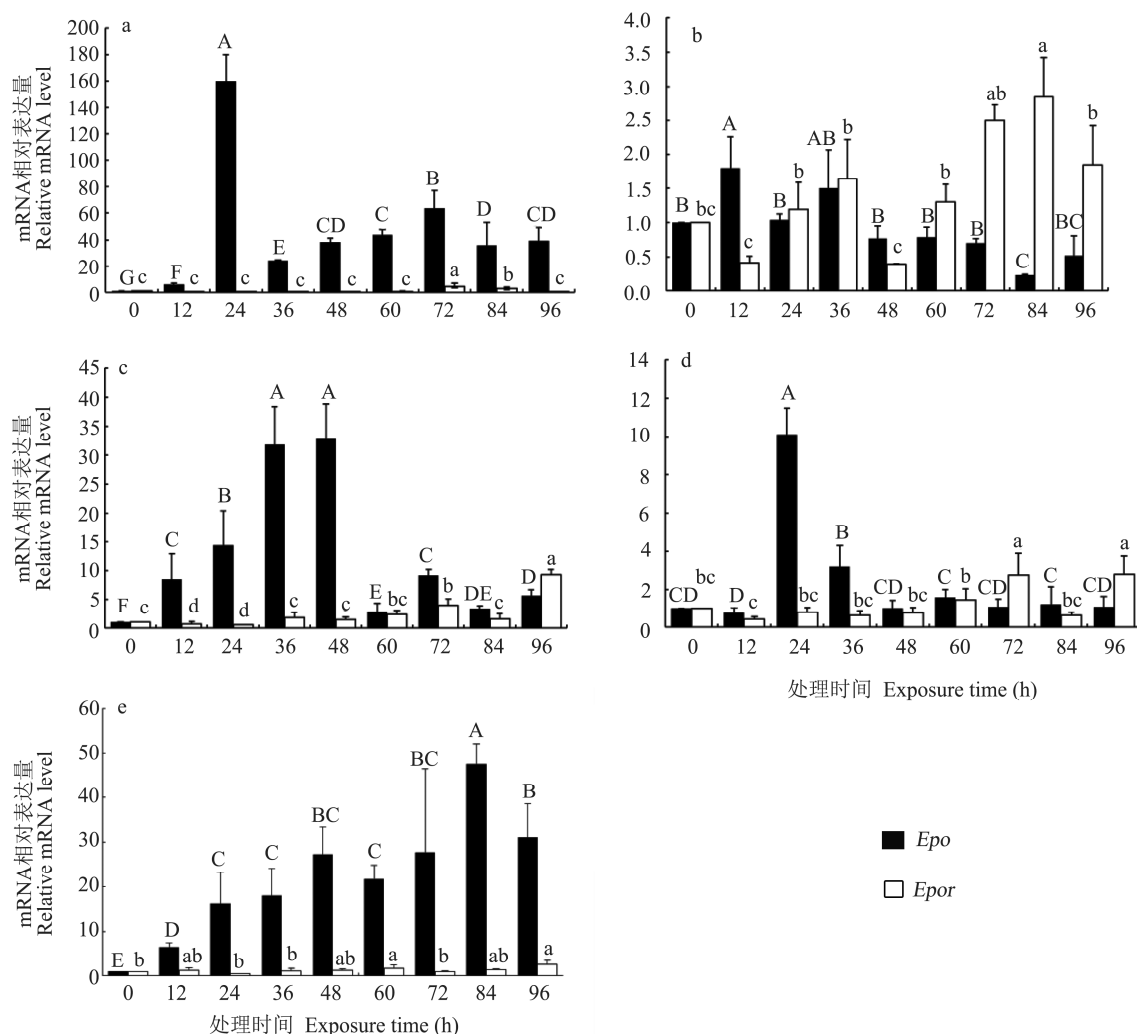


图5 中度低氧和常氧条件下花斑裸鲤主要组织 *Epo* 和 *Epor* 基因的表达量

Fig. 5 Relative mRNA levels of *Epo* and *Epor* genes in white muscle, heart, brain, gill and red muscle under moderate hypoxia and normoxia

a. 白肌; b. 心; c. 脑; d. 鳃; e. 红肌。单因子方差分析法检测各组织 *Epo* (大写字母) 和 *Epor* (小写字母) 基因的表达量差异, 不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

a. White muscle; b. Heart; c. Brain; d. Gill; e. Red muscle. One-way ANOVA is performed to determine the significant differences (uppercase letters for *Epo*, lowercase letters for *Epor*). Columns sharing different letters show significant difference ($P < 0.05$).

胁迫一开始 *Epo* 表达量显著上调, 在 48 h 达到峰值, 虽然其他时间段的表达量低于 48 h 的表达量, 但均显著高于 0 h 时的表达量 ($P < 0.05$), 而 *Epor* 表达量除了在 72 h 和 96 h 明显上调外, 其余时间段保持不变或稍有下调 (图 5c); 鳃组织中, *Epo* 表达量在 24 h 和 36 h 时明显上调

($P < 0.05$), 其余时间段表达量保持不变, 而 *Epor* 表达量在 72 h 和 96 h 时显著上调, 其余时间段与 0 h 相比无显著变化 (图 5d); 在红肌组织中, 低氧胁迫一开始 *Epo* 表达量显著上调, 在 84 h 达到峰值, 虽然其余时间段表达量低于 84 h, 但是均显著高于 0 h 时的表达量 ($P <$

0.05), 而 *Epor* 表达量除了 60 h 和 96 h 时有所上调外, 其余时间段与 0 h 相比无显著变化 ($P > 0.05$) (图 5e)。

3 讨论

青藏高原被誉为世界“第三极”, 是全球海拔最高的独特的地理单元。高寒、低氧、强紫外线辐射的独特高原气候环境对生活于其中的各种生物的分布、种群结构、生存适应、进化模式等产生了深刻的影响 (Qi et al. 2012)。裂腹鱼亚科鱼类是青藏高原鱼类区系的主体成分之一, 将花斑裸鲤作为实验对象, 研究高原土著鱼类低氧适应的生物学过程和分子机制具有很重要的意义。

花斑裸鲤 *Epo* 和 *Epor* 编码区翻译的促红细胞生成素 (EPO) 和促红细胞生成素受体 (EPOR) 氨基酸序列长度与鲤科其他鱼类如斑马鱼、鲤、鲫、金线鲃属鱼类基本一致, 而与其他亚科硬骨鱼稍有差异, 这表明无论是 EPO 还是 EPOR 在硬骨鱼类长期进化过程中保持着较强的保守性, 与其发挥的生物学功能相一致 (Xu et al. 2016)。基于 *Epo* 和 *Epor* 基因序列构建的系统发育树中, 花斑裸鲤与鲤科其他鱼类聚在一起, 而且与金线鲃属鱼类、鲤鱼表现出较近的亲缘关系, 这与基于形态学的鱼类系统发育研究结论一致 (武云飞 1992)。构建的系统发育树表明, *Epo* 和 *Epor* 基因进化树具有高度相似的拓扑结构, 而且该拓扑结构和前期研究报道的物种进化树基本一致 (Saitoh et al. 2006)。比如, 在该进化树中鲤科、脂鲤科 (Characidae)、鲑科 (Salmonidae)、鲟科 (Ictaluridae) 和石首鱼科 (Sciaenidae) 鱼类分别形成了相应的单系群。

截至目前, 有关裂腹鱼亚科鱼类功能基因分子进化方面的研究报道较少。Guan 等 2014 年首次鉴定了裂腹鱼亚科鱼类低氧诱导因子 (hypoxia-inducible factor, HIF) 旁系同源基因, 发现只有 HIF-1 α B 经历了正向选择, 同时提出 HIF-1 α B 可能在裂腹鱼亚科鱼类对高原水体环

境的适应性进化中起到最主要的调节作用。*Epo* 是 HIF 的下游基因, 也是调控红细胞生成的主要因子。近期研究发现, *Epo* 和 *Epor* 基因在高海拔裂腹鱼亚科鱼 (软刺裸鲤) 中存在正向选择位点, 并提出这是高海拔裂腹鱼亚科鱼类对高原低氧环境的适应性进化 (Xu et al. 2016)。本研究中花斑裸鲤来自于黄河支流, 选择压力分析中还包括软刺裸鲤和裸腹叶须鱼, 结果表明软刺裸鲤 *Epo* 基因的确经历了正向选择, 但是 *Epor* 中并未检测到正向选择位点, 更为重要的是花斑裸鲤与软刺裸鲤栖息环境具有相近的海拔 (4 200 m), 并且两者栖息地水体溶解氧几乎没有差异, 但是花斑裸鲤 *Epo* 和 *Epor* 基因中并未检测到正向选择位点, 这与前期对高海拔裂腹鱼亚科鱼 (软刺裸鲤) 研究结果不一致 (Xu et al. 2016)。由此看来, *Epo* 和 *Epor* 基因在个别高海拔裂腹鱼亚科鱼中所经历正向选择并非是所有高海拔裂腹鱼亚科鱼的共性特征, 也就是说 *Epo* 和 *Epor* 基因在裂腹鱼亚科鱼类中经历了适应性进化的观点有待进一步验证。

促红细胞生成素 (EPO) 的主要生物学作用是促进红系祖细胞的增殖、分化和成熟。早期红系祖细胞 (burst-forming unit-erythroid, BFU-E) 增殖受 EPO、IL-3、M-CSF 多种蛋白的调控; 晚期红系祖细胞的增殖分化主要由 EPO 调节 (Maxwell et al. 1997)。在低氧的诱导下, 人体 *Epo* 基因转录的效率仅提高 10 倍, 而 *Epo* mRNA 水平则增加 50 倍以上, 这种差异可能是因为 *Epo* mRNA 半衰期延长, 并认为 *Epo* mRNA 表达部分受自分泌机制的调控 (Ohigashi et al. 1996)。在斑马鱼中研究发现, 重度贫血突变体斑马鱼孵化后 48 h, 其 *Epo* 表达量急剧上调, 同时野生型成年斑马鱼在低氧条件下其心 *Epo* 表达量明显上升, 表明 *Epo* 在斑马鱼的低氧适应中发挥着重要作用 (Chu et al. 2007)。本研究结果表明, 在重度低氧条件下花斑裸鲤主要组织如白肌、脑和红肌组织 *Epo* 基因表达量明显上调, 而 *Epor* 基因只有在

脑和心的表达量有所上调。在重度低氧条件下,花斑裸鲤 *Epo* 基因在白肌、脑组织和红肌的表达量急剧上升,对低氧的敏感性远高于心和鳃组织。前期研究发现,头肾是裂腹鱼亚科鱼类的主要造血器官,一般而言在鱼类头肾中促红细胞生成素(EPO)的含量很高,而且低氧会诱导头肾 *Epo* 基因的表达(Chu et al. 2007)。但是,本研究缺乏花斑裸鲤头肾的相关数据,有待后期研究。在中度低氧条件下,花斑裸鲤 *Epo* 基因的在肌肉、脑、心和鳃组织中的表达变化趋于先升高再下降,这可能是花斑裸鲤肌肉、脑、心和鳃组织对低氧应答比较敏感,通过提高 *Epo* 的表达量促进红细胞的分化,有效地增加红细胞的数量、血红蛋白含量,从而提高血液的携氧能力和增强机体对氧的利用,提高动物低氧耐受性。其后 *Epo* mRNA 表达量降低,可能是花斑裸鲤低氧习服后,通过增加 *Epo* mRNA 的表达量获取氧能力增强和细胞对氧利用率的提高,提供了机体生命活动所需要的氧气(Schmidt 2002),从而导致机体对低氧的敏感性减弱,引起组织中 *Epo* 表达量降低,这一结果与 Milledge 等(1985)对高海拔地区的人血清中促红细胞生成素的研究结果相似,其研究表明,人从平原进入高原后,体内促红细胞生成素(EPO)含量显著升高,持续一段时间后促红细胞生成素(EPO)下降。通常,促红细胞生成素(EPO)通过反馈机制抑制其生成,从而保持机体红细胞维持在正常水平,维持机体在低氧环境下的正常生理功能。因此,促红细胞生成素(EPO)很快会通过代偿机制的建立而下降(赵鹏等 2009)。花斑裸鲤部分关键组织如红肌、脑组织中 *Epo* mRNA 表达量升高可能在神经营养和神经保护方面发挥了重要作用,是对低氧环境适应的一种调节机制。

参 考 文 献

- Burland T G. 2000. Dnastar's lasergene sequence analysis software. *Methods in Molecular Biology*, 132(1): 71–91.
- Chu C Y, Cheng C H, Chen G D, et al. 2007. The zebrafish erythropoietin: functional identification and biochemical characterization. *Febs Letters*, 581(22): 4265–4271.
- Fried W. 2009. Erythropoietin and erythropoiesis. *Experimental Hematology*, 37(9): 1007–1015.
- Guan L H, Wei C, Xiao W H, et al. 2014. Analysis of hypoxia-inducible factor alpha polyploidization reveals adaptation to Tibetan plateau in the evolution of schizothoracine fish. *BMC Evolutionary Biology*, 14(1): 192–205.
- Jelkmann W, Wagner K. 2004. Beneficial and ominous aspects of the pleiotropic action of erythropoietin. *Annals of Hematology*, 83(11): 673–686.
- Katakura F, Katzenback B A, Belosevic M. 2014. Molecular and functional characterization of erythropoietin receptor of the goldfish (*Carassius auratus* L.). *Developmental & Comparative Immunology*, 40(2): 191–198.
- Krantz S B. 1991. Erythropoietin. *Blood*, 77(3): 419–434.
- Kumar S, Tamura K, Nei M. 2004. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics*, 5(2): 150–163.
- Livak K J, Schmittgen T D. 2012. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25(4): 402–408.
- Marchlerbauer A, Anderson J B, Cherukuri P F, et al. 2005. CDD: a conserved domain database for protein classification. *Nucleic Acids Research*, 33(Database issue): D192–D196.
- Maxwell P H, Ferguson D J, Nicholls L G, et al. 1997. Sites of erythropoietin production. *Kidney International*, 51(2): 393–401.
- Milledge J S, Cotes P M. 1985. Serum erythropoietin in humans at high altitude and its relation to plasma renin. *Journal of Applied Physiology*, 59(2): 360–364.
- Ohigashi T, Yoshioka K, Fisher J W. 1996. Autocrine regulation of erythropoietin gene expression in human hepatocellular carcinoma cells. *Life Sciences*, 58(5): 421–427.
- Qi D L, Cao Y, Guo S C, et al. 2012. Convergent, Parallel and Correlated Evolution of Trophic Morphologies in the Subfamily Schizothoracinae from the Qinghai-Tibetan Plateau. *PLoS One*, 7(3): e34070.
- Ratajczak J M, Majka J, Kijowski M, et al. 2001. Biological significance of MAPK, AKT and JAK-STAT protein activation

- by various erythropoietic factors in normal human early erythroid cells. *British Journal of Haematology*, 115(1): 195–204.
- Richmond T D, Chohan M, Barber D L. 2005. Turning cells red: signal transduction mediated by erythropoietin. *Trends in Cell Biology*, 15(3): 146–155.
- Semenza G L. 2000. HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *Journal of Applied Physiology*, 88(4): 1474–1480.
- Saitoh K, Sado T, Mayden R, et al. 2006. Mitogenomic evolution and interrelationships of the cypriniformes (Actinopterygii: Ostariophysi): The first evidence toward resolution of higher-level relationships of the world's largest freshwater fish clade based on 59 whole mitogenome sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 63(6): 826–841.
- Schmidt W. 2002. Effects of intermitten exposure to high altitude on blood volume and erythropoietic activity. *High Altitude Medicine & Biology*, 3(2): 167–176.
- Wei C J, Shen Z X, Jia Y T, et al. 2015. Comparison of aging methods and discrimination analysis on age classification for *Gymnocypris eckloni*. *Chinese Journal of Ecology*, 34(9): 2537–2541.
- Xia M Z, Chao Y, Jia J L, et al. 2016. Changes of hemoglobin expression in response to hypoxia in a Tibetan schizothoracine fish, *Schizopygopsis pylzovi*. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical Systemic & Environmental Physiology*, 186(8): 1033–1043.
- Xu Q H, Zhang C, Zhang D S, et al. 2016. Analysis of the erythropoietin of a Tibetan Plateau schizothoracine fish (*Gymnocypris dobula*) reveals enhanced cytoprotection function in hypoxic environments. *BMC Evolutionary Biology*, 16(1): 11–28.
- Yang Z. 2007. PAML 4: phylogenetic analysis by maximum likelihood. *Molecular Biology and Evolution*, 24(8): 1586–1591.
- Zhang J Z, Nielsen R, Yang Z H. 2005. Evaluation of an improved branch-site likelihood method for detecting positive selection at the molecular level. *Molecular Biology and Evolution*, 22(12): 2472–2479.
- 陈毅峰, 曹文宣. 2000. 裂腹鱼亚科 // 乐佩琦. 中国动物志: 鲤形目 (下卷). 北京: 科学出版社, 293–294.
- 祁得林. 2009. 黄河上游花斑裸鲤 *Cyt b* 基因的序列变异和遗传多样性. *动物学研究*, 30(3): 255–261.
- 武云飞, 吴翠珍. 1992. 青藏高原鱼类. 成都: 四川科学技术出版社.
- 鄢思利. 2016. 花斑裸鲤的生物学特性、繁殖特性、胚胎发育及人工培育的研究. 四川: 西华师范大学硕士学位论文.
- 赵鹏, 路瑛丽, 冯连世, 等. 2009. 低氧训练对大鼠 EPO/EPOR 及其表达的影响. *山东大学学报: 医学版*, 47(5): 5–15.