



低氧信号传导途径与鱼类低氧适应

肖武汉

中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072

E-mail: w-xiao@ihb.ac.cn

收稿日期: 2014-09-18; 接受日期: 2014-11-06

国家重点基础研究发展计划(批准号: 2010CB126303)、中国科学院战略性先导专项(批准号: XDA08010208)和国家自然科学基金(批准号: 31071212, 91019008)资助项目

摘要 低氧信号传导途径是从线虫到哺乳动物都十分保守的一个细胞信号传导途径系统, 它对于维持后生动物的氧稳态至关重要. 低氧诱导因子是该信号传导系统中最为关键的因子. 对低氧诱导因子的调控是对低氧信号途径网络进行有效调控的主要方式. 由于鱼类生存的水环境溶氧量的变化很大, 在长期进化过程中, 鱼类演化出适应不同浓度溶氧水环境的物种, 并发展出千差万别的低氧适应策略. 对鱼类低氧适应策略及其低氧适应机制的研究, 对于认识鱼类物种形成的动因和培育耐低氧鱼类新品种具有十分重要的意义. 本文在总结低氧信号传导及其调控机制研究进展的基础上, 综述了鱼类低氧信号途径、低氧适应策略、低氧信号途径网络调控等方面研究的概况.

关键词

低氧
低氧诱导因子
PHDs
pVHL
FIH
鱼类

大约 25 亿年前, 由于光合作用, 地球开始积累氧气. 尽管氧气对于许多厌氧生物是有毒的, 但是它促进了氧化磷酸化这一特殊、高效系统的演化. 这一系统可将储存在有机大分子碳键上的化学能转化为 ATP 上的高能磷酸键, 为生物细胞的生理、生化反应提供有效的能量供给^[1]. 此外, 氧分子作为氧化磷酸化的最终电子受体, 除了是生物能量产生的必需因子外, 还是许多酶的直接底物, 它对于生物的正常生长、发育和繁殖不可或缺. 因此, 后生动物演化出复杂的细胞代谢和生理系统来维持氧稳态 (oxygen homeostasis), 并发展出高效的信号传导系统来感受细胞内氧的变化^[2]. 一些重要的氧气感应信号途径主要通过激活转录或抑制翻译来提升对低氧的耐受能力. 这些信号途径主要包括: 能量和营养的信号感应途径——mTOR(mammalian target of rapamycin)信号

途径; 激活内质网胁迫压力的蛋白非折叠反应途径和核因子转录反应途径 NF- κ B(nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)^[3]. 但是, 低氧诱导因子(hypoxia inducible factor, HIF)介导的转录激活反应是细胞感受低氧的最为关键的信号传导途径^[4,5].

低氧信号传导途径在动物界非常保守. 目前已知, 从线虫到人类, 低氧信号都启动结构相同或相似的同源基因转录和调控, 并激活类似的生理、生化反应. 与陆生环境相比, 水环境呈现出更为宽广的溶氧含量的时空变化, 因此, 与鸟类和哺乳类相比, 终生生活于水体的鱼类能适应更为宽广的氧环境^[6]. 由于在长期演化历程中受到不同浓度溶氧水体的自然选择, 鱼类形成了适应不同溶氧水环境的物种. 即使是在同一海拔高度水体分布的近缘物种间或同一物种

引用格式: 肖武汉. 低氧信号传导途径与鱼类低氧适应. 中国科学: 生命科学, 2014, 44: 1227–1235

英文版见: Xiao W H. Hypoxia signaling pathway and hypoxic adaptation of fishes. Sci China Life Sci, 2015, 58, in press

的不同品系间, 它们对水体溶氧的适应力也存在显著差异. 此外, 对于分布于不同海拔高度水体的近缘物种间或不同品系间, 它们对水体溶氧适应能力的差异更大. 对于鱼类低氧适应机制的研究, 不仅在认识鱼类物种的分化以及低氧信号传导途径的系统演化和调控等方面具有十分重要的理论意义, 而且对于培育耐低氧鱼类新品种具有十分重要的实践意义.

1 低氧诱导因子与低氧信号途径的调控

到目前为止, 低氧诱导因子(HIF)是被鉴定到的低氧信号传导途径中最为关键的因子, 它们在所有的后生动物中都表达. HIF 由 HIF-1 α 或 HIF-2 α 和 HIF-1 β 2 个亚单位组成. 每个亚单位包含基本的 bHLH-PAS (helix-loop-helix-PAS)结构域, 它们介导异源二聚体的形成以及与 DNA 的结合. HIF-1 β 与其他 bHLH-PAS 蛋白形成异源二聚体并超量存在, 而 HIF-1 α 水平决定 HIF-1 的转录活性^[1,7].

常氧条件下, 脯氨酸羟化酶(prolyl hydroxylase, PHD, 包括 PHD1, PHD2 和 PHD3, 其中 PHD2 起主要作用)利用氧分子作为底物对低氧诱导因子(HIF-1 α 和 HIF-2 α)的特异脯氨酸位点进行羟基化^[8]. 在这一反应中, 一个氧原子插入脯氨酸残基, 另一个氧原子插入 α -酮戊二酸, 将它分解成 CO₂ 和琥珀酸酯. 羟基化后的低氧诱导因子被 pVHL(Von Hippel-Lindau)识别并结合, pVHL 招募 VBC(VHL, Elongin B, Elongin C)E3 泛素连接酶复合体, 导致低氧诱导因子通过蛋白酶体降解^[9]. 然而, 在低氧条件下, 由于缺乏氧分子, 脯氨酸羟化酶的活性受到抑制, PHD2 不能羟化低氧诱导因子(HIF-1 α 和 HIF-2 α), 因此, 低氧诱导因子不能与 VBC E3 泛素连接酶复合体结合, 使得低氧诱导因子的蛋白得到稳定; 稳定的低氧诱导因子转运到细胞核中, 与 HIF-1 β 结合, 形成异源二聚体, 该二聚体与其下游基因的低氧反应元件(hypoxia response element, HRE)结合, 再在一些转录激活因子(如 CBP/p300)的共同作用下, 激活下游基因的表达, 从而引起一系列的生理、生化反应^[1,4](图 1).

正是由于低氧诱导因子 HIF- α 在低氧信号传导中的关键作用, 对低氧诱导因子的调控成为对低氧信号传导调控的主要方式. 对低氧诱导因子的调控包括在转录水平调控和翻译后调控. 目前对 HIF- α 的转录水平调控报道较少, 现有工作主要集中在对其

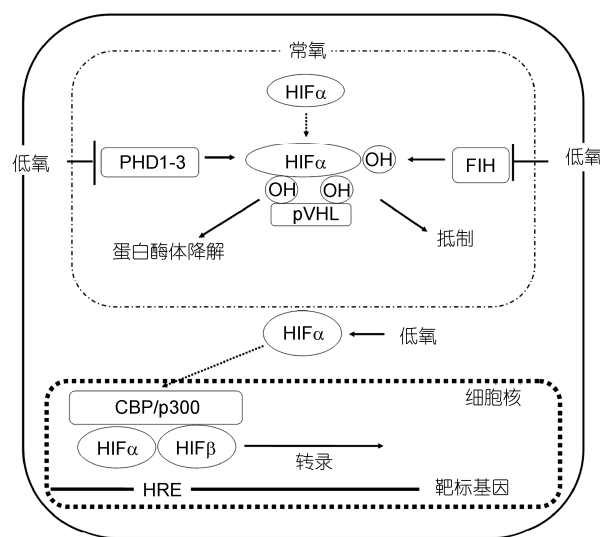


图 1 低氧信号传导途径

翻译后调控的研究上. NF- κ B 被发现可以诱导 HIF-1 α 的转录表达, 进而在先天免疫和炎症反应中发挥作用^[10]. HIF- α 的翻译后调控呈现在许多方面, 除了上述 VHL 介导 HIF- α 的降解这一经典调控方式外, 还存在 HIF- α 的乙酰化/去乙酰化、磷酸化/去磷酸化^[11]、SUMO 化、Neddylation 化^[12]等调控方式. 乙酰化转移酶 p300/CBP 与 HIF-1 α C 末端的结合可以显著增强 HIF-1 α 的转录活性^[13]. 依赖 NAD⁺ 的去乙酰化酶 Sirt1, Sirt3, Sirt6 和 Sirt7 都可对 HIF-1 α 和 HIF-2 α 进行正向或者反向调控, 这些调控在细胞代谢、寿命、肿瘤发生、心血管疾病等方面发挥重要作用^[14-21]. Shao 课题组^[22-24]研究表明, 低氧刺激导致 SUMO-1 的 mRNA 水平和蛋白水平显著增加; SUMO-1 与 HIF-1 α 在低氧情况下共同定位于核内, 并使 HIF-1 α 发生 SUMO 化; 而 SUMO 化可使 HIF-1 α 稳定性或转录激活活性增强.

此外, 能与 HIF-1 α 和 HIF-2 α 相互结合的许多蛋白, 尽管不能对 HIF-1 α 或 HIF-2 α 蛋白进行直接的修饰, 但可以通过一些特殊的机制对 HIF-1 α 和 HIF-2 α 蛋白稳定性或转录活性产生正面或负面的影响. PKM2(pyruvate kinase M2)能够直接跟 HIF-1 α 结合, 通过增强 HIF-1 招募 P300, 来达到增强 HIF-1 α 转录活性的目的; PHD3 能够通过羟化 PKM2 来增强 PKM2 发挥共激活因子的作用^[25]. SHARP1 通过把 HIF- α 推介到蛋白酶体上, 来促进 HIF- α 的降解^[26]. EAF2(ELL associated factor 2)是一个特异性受 HIF-

1 α 调控的基因,它只跟 HIF-1 α 结合,而不与 HIF-2 α 结合,并通过阻碍 p300/CBP 与 HIF-1 α 的结合,来抑制 HIF-1 α 的转录活性^[27].还有一些蛋白,尽管它们不能直接与 HIF- α 结合,但是可以通过与调控 HIF- α 的其他重要因子相互结合,例如,与 E3 泛素连接酶 pVHL 结合、与脯氨酸羟化酶 PHDs 结合等,来间接调控 HIF- α 的活性. E3 泛素连接酶 Siah2 通过调控脯氨酸羟化酶 PHDs 的蛋白稳定性来影响细胞中 HIF-1 蛋白质的含量,并介导低氧生理反应^[28]. E2-EPF 泛素运载蛋白(UCP)通过降解 pVHL 来调控 HIF-1 α 的稳定性^[29]. PML(progressive multifocal leukoencephalopathy gene)通过抑制 mTOR 信号途径来抑制 HIF-1 α 的翻译^[30]. Sentrin/SUMO 特异性蛋白酶 SENP3 在轻微的氧化应激压力下,通过对 P300 的去 SUMO 化修饰,来增强 P300 与 HIF-1 的结合,从而增强 HIF-1 的转录活性^[31]. LIMD1 蛋白作为桥梁分子通过增强 PHDs 与 pVHL 间的结合,来抑制 HIF-1 的活性^[32].

总之, HIF- α 作为低氧信号传导途径中最关键的分子,对直接或间接调控低氧信号传导途径起至关重要的作用,对其调控作用的研究也是低氧信号通路研究的重点和热点^[7].

2 鱼类低氧适应策略

水体溶氧随地理位置、季节、水体组成、水体环境、水流状态等变化而发生很大的变化. 鱼类在长期演化历程中发展出各种不同的适应策略. 在现存的 2 万余种鱼类中,它们对低氧的耐受能力表现出很大的差异. 完全依赖有氧代谢来进行快速游泳的种类,如鲑鱼(*Salmo salar*)和金枪鱼(*Thunnus albacares*),对低氧状态呈现出中度或超级敏感. 然而,像鲤(*Cyprinus carpio*)、鳗鲡(*Anguilla bicolor*)和狗鱼(*Esox masquinongy*)等,它们在低氧条件仍能生存^[6]. 鱼类对低氧的适应一般可分为长期适应和急性应激反应.

2.1 鱼类对低氧环境的长期适应策略

为了长期适应不同的水体溶氧环境,鱼类一般通过基因突变,引起一些相应的生理、生化变化,以及组织器官形态结构的改变,使其具备 3 个方面的能力: (i) 在低氧环境下,能够降低代谢率; (ii) 能够忍受一些代谢副产物的毒性; (iii) 能够避免或修复

复氧过程(reoxygenation)中导致的细胞损伤^[6].

(1) 改变呼吸器官结构或发展鳃以外的器官辅助呼吸是一些鱼类为了适应水体低氧环境的首选策略. 例如,泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*)除鳃外,还发展了皮肤和肠来进行辅助呼吸. 黄鳝(*Monopterus albus*)发展出口腔及喉腔的内壁表皮作为呼吸的辅助器官.

(2) 改变代谢途径和代谢方式也是鱼类长期适应低氧环境的策略之一. 鲫鱼(*Carassius crassius*)是目前已知最能耐受低氧的鱼类物种. 在低温条件下,它在低氧条件下可以生存数月^[33]. 其近缘品种——金鱼(*Carassius auratus*),在 5℃,其缺氧的半致死时间为 45 h;而在 20℃,其缺氧的半致死时间为 22 h. 在低氧条件下,代谢率的抑制被认为是鲫鱼能够生存的关键^[34-36]. 在极度缺氧的条件下,鲫鱼可行无氧代谢,能够将无氧糖酵解过程中产生的乳酸直接转化为乙醇,并分泌到水中^[37]. 与一些需要冬眠的龟类相比,鲫鱼在低氧或缺氧条件下,仍保持活力,而不是进入冬眠状态^[35]. 这主要是由于鲫鱼具备能利用储藏在肌肉和肝脏中的糖原、减少代谢、把乳酸转化为乙醇和二氧化碳来规避乳酸的酸性等特征^[34,37].

(3) 通过增加红细胞的数量和提高血红蛋白的载氧能力,也是鱼类长期适应低氧环境的策略之一^[38].

鱼类在演化历程中,经过多次的遗传分离,在许多与低氧适应相关的基因上呈现出结构和功能上的多态性. 在鲤科鱼类,低氧诱导因子基因(HIF- α)被发现基因组中进行了加倍. 尽管其一个拷贝保留古老类型的低氧刺激反应,但另一个拷贝却变得对低氧压力更为敏感,因此,鲤科鱼类的 HIF- α 基因在物种形成过程中,已经发生了亚功能的分化^[39]. 此外,Chi 等人^[40]还发现:在辐鳍鱼类和软骨鱼类的分化基部, HIF- α 基因呈现出不同形式的演化模式.

2.2 鱼类对低氧的急性应激反应

由于水体成分、水体温度或季节的改变,特别是在较高密度的养殖水体,经常会出现短期急性缺氧. 鱼类对于短期急性缺氧会产生强烈的应激反应. (i) 鱼类会试图利用“口”到水面直接进行呼吸,以尽可能获得空气中的氧,这就是常见的鱼类“浮头”现象; (ii) 通过腮形态和结构的改变,以增加氧气的交换^[41-46]; (iii) 通过改变心肌 ATP 敏感钾离子通道、代谢速率以及增加红血球的数量也是许多鱼类应对

急性低氧的重要策略^[47,48].

尽管鱼类可通过一些急性应激反应来应对水体短期缺氧,以维持其正常生理活动,但是水体的严重急性缺氧,往往引起鱼类瞬间大量死亡,这就是在水产养殖上通常所称的“翻塘”现象.研究表明,鱼类脑细胞和心肌细胞在缺氧状态下的凋亡,是导致“翻塘”,引起鱼类瞬间大量死亡的主要原因.与其他许多脊椎动物一样,低氧信号传导途径中的一些重要因子严格调控鱼类的这一生理过程^[49].

弄清急性缺氧引起鱼类死亡的原因和机制,对于在水产养殖上防止或减少养殖鱼类“翻塘”所造成的损失,具有重要的实践指导意义.

2.3 鱼类对低氧信号感应的基因调控网络

由于鱼类的特殊生境,对其低氧信号传导及其调控网络中关键因子的研究,早已引起人们的重视.到目前为止,一些与鱼类低氧适应相关的、低氧信号传导通路中的一些重要因子已被报道(表 1).

(1) 低氧诱导因子(HIF). 鱼类也拥有 HIF- α 和 HIF- β 的同源基因,它们在感受低氧信号中起与哺乳类 HIF 类似的作用.虹鳟鱼(*Oncorhynchus mykiss*)的 HIF-1 α 首先被报道,它由 766 个氨基酸组成,包含 HIF-1 α 的主要功能域(basic-helix-loop-helix, PAS 和 ODD)^[50].迄今, HIF-1 α 基因被克隆和报道的鱼类有细须石首鱼(*Micropogonias undulates*)^[51]、斑马鱼(*Danio rerio*)^[52,53]、武昌鱼(*Megalobrama amblycephala*)^[53]、裸鲤(*Gymnocypris przewalskii*)^[54]、梅花鲈(*Gymnocephalus cernuus*)、比目鱼(*Platichthys flesus*)、河鲈(*Perca fluviatilis*)、三棘鱼(*Gasterosteus aculeatus*)、俄罗斯鲟(*Acipenser gueldenstaedtii*)^[55]、美黑鲈(*Dicentrarchus labrax*)^[56]、印度鲶(*Clarias batrachus*)^[57]和沟鲶(*Ictalurus punctatus*)^[58]等. HIF-2 α 基因被克隆和报道的鱼类有斑马鱼^[52]、细须石首鱼(*Micropogonias undulates*)^[51]、草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)^[59]、印度鲶(*Clarias batrachus*)^[57]、沟鲶(*Ictalurus punctatus*)^[42]等.

鉴于 HIF 基因在低氧信号传导中的重要作用, HIF 基因的表达与低氧的关系已在一些鱼类得到阐明.河鲈(*Perca fluviatilis*)是一类对低氧敏感的淡水鱼类,急性低氧能增强 HIF-1 α 在其脑和肝中的表达,然而,慢性低氧导致其肌肉中 HIF-1 α 的表达发生变化^[60].印度鲶是一类对低氧耐受性较强的鱼类,短期

表 1 鱼类低氧信号传导途径中的重要蛋白

基因名	鱼类
hif-1 α	虹鳟(<i>Oncorhynchus mykiss</i>)
	细须石首鱼(<i>Micropogonias undulates</i>)
	斑马鱼(<i>Danio rerio</i>)
	草鱼(<i>Megalobrama amblycephala</i>)
	裸鲤(<i>Gymnocypris przewalskii</i>)
	梅花鲈(<i>Gymnocephalus cernuus</i>)
	比目鱼(<i>Platichthys flesus</i>)
	河鲈(<i>Perca fluviatilis</i>)
	三棘鱼(<i>Gasterosteus aculeatus</i>)
	俄罗斯鲟(<i>Acipenser gueldenstaedtii</i>)
	美黑鲈(<i>Dicentrarchus labrax</i>)
	印度鲶(<i>Clarias batrachus</i>)
hif-2 α	沟鲶(<i>Ictalurus punctatus</i>)
	斑马鱼(<i>Danio rerio</i>)
	细须石首鱼(<i>Micropogonias undulates</i>)
	草鱼(<i>Ctenopharyngodon idellus</i>)
	印度鲶(<i>Clarias batrachus</i>)
phd	沟鲶(<i>Ictalurus punctatus</i>)
	斑马鱼(<i>Danio rerio</i>)
	大西洋鲑(<i>Salmo salar</i>)
	尼罗罗非鱼(<i>Oreochromis niloticus</i>)
fih	斑马鱼(<i>Danio rerio</i>)
vhl	沟鲶(<i>Ictalurus punctatus</i>)
	斑马鱼(<i>Danio rerio</i>)

低氧暴露导致 HIF-1 α 和 HIF-2 α 在脑、肝和肾中的表达增加,但长期低氧暴露导致 HIF-1 α 在脾和 HIF-2 α 在肌肉中的表达增加^[57].此外,在另一类对低氧具有极高耐受性的鱼类沟鲶中, HIF- α mRNA 的表达量在低氧条件下,首先表达量减少(1.5 h),随后表达量增高(5 h)^[42].

(2) 脯氨酸羟化酶(PHD). PHD 蛋白属于 Fe(II)和 2-酮戊二酸(2-oxoglutarate)依赖的加氧酶超家族,它的活性紧紧依赖于氧,因此,它们被认为是细胞的氧感应器(oxygen sensor)^[61].已有大西洋鲑(*Salmo salar*)、沟鲶、尼罗河罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)和斑马鱼的 PHD 蛋白被鉴定和报道^[62].尽管目前对鱼类 PHD 蛋白的功能知之较少,但一般认为,它们可能跟其他物种的 PHD 蛋白类似,对于 HIF- α 蛋白的稳定性起决定作用.

(3) 天冬氨酸羟化酶(HIF-1 asparaginyl hydroxylase, FIH-1). FIH-1 也是一类羟化酶,与 PHD 有类似的地方,但它对 HIF- α 的羟化,并不导致 HIF- α 的蛋白酶体降解,而是阻碍一些转录激活因子

(如 CBP/p300)与 HIF- α 蛋白的结合,从而抑制 HIF- α 的活性.迄今,已有斑马鱼^[63]和沟鲈^[58]的 FIH-1 蛋白被鉴定和报道.

(4) pVHL 蛋白. pVHL 蛋白是 VBC 泛素连接酶复合体的主要成员,起 E3 泛素连接酶的作用.在常氧条件下,它与羟基化的 HIF- α 结合,引起 HIF- α 的蛋白酶体降解,在低氧信号的调控中起重要作用.迄今,对斑马鱼 VHL 基因的功能已有了较为清楚的了解.通过突变体的筛选,已获得 VHL 基因突变的斑马鱼品系.与哺乳动物类似,VHL 突变纯合体导致胚胎致死.此外,该突变体还发生多红细胞症^[64].

3 鱼类低氧适应的机制

证据表明,鱼类对低氧长期适应最关键方面就是减少代谢率和代谢需求.但是,低氧耐受鱼类在缺氧情况下,如何将其代谢率降低到最低水平?其机制仍不清楚.到底是 ATP 供应的调节,还是 ATP 需求的调节,或者是它们两者的共同调节?众所周知,蛋白质合成需要消耗大量 ATP.对于耐低氧的鲫鱼,在低氧或缺氧条件下,其蛋白质合成迅速降低;但对不耐低氧的鱼类,在低氧或缺氧条件下,其蛋白质合成并不降低.在这一过程中,AMP 激酶可能是一个感应器,它能调节低氧介导的蛋白合成.在细胞内 AMP 增加时,AMPK 被激活;而细胞内 ATP 增高时,它被抑制,此外,它还受磷酸化修饰的调节^[65].

腺苷(adenosine)是一个低氧信号分子.在低氧耐受性鱼类(如鲫鱼)中,腺苷对于蛋白合成和钠-钾 ATP 酶活性具有强烈的抑制作用^[66].腺苷受体的封闭可以提高 3 倍乙醇的释放^[67].另外,腺苷和腺苷受体的封闭对于鲫鱼的脑血流还有特别的效果.在缺氧条件下,鲫鱼脑血流增加 2.2 倍,然而,灌注氨茶碱使得脑血流增加消失.因此,腺苷似乎是一个重要的缺氧信号分子,介导血管舒张和脑血流^[68].

对乳酸代谢终产物的耐受也代表了鱼类低氧耐受的一个机制.鲫鱼可利用乙醇作为无氧代谢的终产物.在缺氧条件下,鲫鱼的肝细胞具备保持离子梯度和将乳酸转化为乙醇的能力.乙醇通过鳃排除体外,避免了乳酸的积累^[69].

对于鱼类低氧耐受的另一个重要的方面就是避免在复氧过程中自由氧所带来的损伤.一些鱼类,如鲫鱼,不能持续表达一些抗自由氧的典型分子,但在

低氧或复氧状态时,能够增加那些抗自由氧分子的表达^[70].在缺氧条件下,一般类型酶的活性不增加,但抗氧化酶的活性特异性增加,如脑 Se-GPX、肝过氧化氢酶、葡萄糖六磷酸脱氢酶等^[71].低氧处理几个小时后,鲤鱼肝、脑、和鳃中超氧化物歧化酶活性显著增强^[72].

此外,由于低氧诱导因子及其调控的分子网络在低氧信号传导中的关键作用,鉴定低氧诱导因子激活的下游基因并解析它们的生物学功能是阐明鱼类低氧适应分子机制的主要手段.Zhong 等人^[73]利用鲫鱼囊胚细胞系,通过抑制性消减杂交技术,筛选到一些在鲫鱼细胞系中受低氧调控的基因,如 *ERO1-L*, *P53*, *CPO*, *HO-1*, *MKP2*, *PFK-2*, *cystatin B*, *Glut1*, *BTG1*, *TGF-beta1*, *PGAM1* 等. Liao 等人^[74]还针对鲫鱼耐低氧的特性,进行了鲫鱼转录组的测序,发现了一些与低氧耐受相关的、糖酵解和糖异生途径中的酶类基因. Everett 等人^[75]分析了短期低氧暴露对鱼类代谢基因表达的影响.此外,利用斑马鱼模型, Chen 等人^[76]对低氧诱导的肌肉蛋白变化进行了分析.

到目前为止,已有许多受低氧诱导的、与鱼类低氧适应性相关的基因被鉴定和报道.受低氧诱导、与鱼类代谢相关的基因有葡萄糖转运子 *GLUTs*(glucose transporters).它们编码细胞膜上的葡萄糖转运蛋白.在低氧条件下被诱导表达,加强细胞葡萄糖的转运,以增强细胞能量需求.草鱼的 *GLUT* 已被克隆,它受低氧诱导并在肾脏中高度表达^[77].当暴露于低氧条件下,大西洋鳕(*Gadus morhua*)的 *GLUT1* mRNA 在鳃中诱导表达^[78]. Terova 等人^[79]发现,在一种对低氧敏感的美黑鲈, *GLUT2* mRNA 对于低氧的刺激,其拷贝数发生相应变化,这支持了 *GLUT* 与低氧适应性相关的认识.

受低氧诱导、与鱼类红细胞生成相关的基因是红细胞生成素(erythropoietin, EPO).它是一类糖蛋白激素,控制红细胞的发生.第一个被克隆的鱼类 EPO 是河豚(*Takifugu rubripes*)EPO.河豚 EPO 受低氧的诱导,主要表达在心脏^[80-82].但在其他硬骨鱼类,如缸鳉、鲤和鳊等,其肾脏中表达较高的 EPO,这与肾脏是硬骨鱼类的主要红细胞发生器官相符合^[83].

受低氧诱导、与鱼类新生血管生成的基因是 VEGF.它编码的 VEGF 蛋白刺激血管生成,加强氧气供应.在青石斑鱼,低氧激活 VEGF 的表达,并增强氧气供给.此外,在鲑鱼,也发现低氧对 VEGF 的

表达有显著的诱导作用^[84,85]。

为进一步解析这些受低氧诱导基因的功能, 人们利用细胞系或斑马鱼模型对这些基因的功能进行了分析。Wang 等人^[86]克隆了鲫鱼受低氧诱导的 HO-1, 发现 HO-1 对于抗低氧诱导的细胞凋亡具有重要的作用。Feng 等人^[49]发现, 斑马鱼 P53 能够通过抑制低氧诱导细胞凋亡基因 BNIP3 的表达, 对低氧诱导的细胞凋亡起保护作用。此外, HIF-1 α 在斑马鱼早期胚胎发育过程中, 起非常重要的作用, 特别是调控神经嵴和中枢神经系统的形成^[87,88]。

与小鼠模型相比, 早年利用斑马鱼模型进行基因敲除一直存在很大困难, 因此, 对于鱼类与低氧适应相关基因的在体功能的研究非常欠缺, 对于它们的在体生物学功能还知之甚少。近年来, 由于 TALEN 和 CRISP/Cas9 技术的建立和快速发展, 使得利用斑马鱼进行基因缺失研究变得较为便利。因此, 在不久的将来, 应可获得大量鱼类低氧适应相关基因的在体生物学功能数据。

由于大水面水产养殖不同程度地造成水质污染, 在保护水生态环境的大前提下, 池塘精养、“工厂化”

养殖等集约化养殖模式已成为水产业发展的根本出路。通过增加养殖密度并提高单位面积的产量将成为确保水产养殖产量稳步提升、并同时避免水环境污染的主要手段。由于单位水体养殖密度和产量的提高, 不可避免地要求养殖品种的耐低氧能力相应提高。

为了培育耐低氧鱼类新品种, 必须首先阐明鱼类低氧适应和耐低氧的机制。本课题组认为基本策略是: (i) 可以通过比较基因组、转录组和蛋白质组技术, 对同一水体分布的不同耐低氧能力鱼类物种或品系, 或分布于不同溶氧水体的近缘鱼类物种或品系, 进行系统的比较组学分析; (ii) 选取代表性的低氧敏感鱼类物种或代表性的低氧耐受鱼类物种, 进行低氧暴露处理, 利用基因芯片、转录组测序和蛋白组学分析; (iii) 利用生物信息学方法, 构建鱼类低氧适应或低氧耐受的基因调控网络, 鉴定关键节点基因; (iv) 利用基因功能的在体分析方法, 阐明这些关键节点基因的功能, 诠释它们对鱼类低氧耐受能力的贡献, 筛选出有效分子标记或低氧适应/耐受相关的关键变异; (v) 在此基础上, 利用转基因技术或传统杂交技术, 培育耐低氧鱼类新品种。

参考文献

- 1 Semenza G L. Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine. *Cell*, 2012, 148: 399–408
- 2 Semenza G L. Oxygen sensing, hypoxia-inducible factors, and disease pathophysiology. *Annu Rev Phytopathol*, 2014, 9: 47–71
- 3 Majmundar A J, Wong W J, Simon M C. Hypoxia-inducible factors and the response to hypoxic stress. *Mol Cell*, 2010, 40: 294–309
- 4 Dunwoodie S L. The role of hypoxia in development of the Mammalian embryo. *Dev Cell*, 2009, 17: 755–773
- 5 Schofield C J, Ratcliffe P J. Oxygen sensing by HIF hydroxylases. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2004, 5: 343–354
- 6 Bickler P E, Buck L T. Hypoxia tolerance in reptiles, amphibians, and fishes: life with variable oxygen availability. *Annu Rev Physiol*, 2007, 69: 145–170
- 7 Greer S N, Metcalf J L, Wang Y, et al. The updated biology of hypoxia-inducible factor. *EMBO J*, 2012, 31: 2448–2460
- 8 Aragones J, Fraisl P, Baes M, et al. Oxygen sensors at the crossroad of metabolism. *Cell Metab*, 2009, 9: 11–22
- 9 Kaelin W G. Von Hippel-Lindau disease. *Annu Rev Pathophysiol*, 2007, 2: 145–173
- 10 Rius J, Guma M, Schachtrup C, et al. NF-kappaB links innate immunity to the hypoxic response through transcriptional regulation of HIF-1 α . *Nature*, 2008, 453: 807–811
- 11 Flugel D, Grolach A, Michiels C, et al. Glycogen synthase kinase 3 phosphorylates hypoxia-inducible factor 1 α and mediates its destabilization in a VHL-independent manner. *Mol Cell Biol*, 2007, 27: 3253–3265
- 12 Ryu J H, Li S H, Park H S, et al. Hypoxia-inducible factor α subunit stabilization by NEDD8 conjugation is reactive oxygen species-dependent. *J Biol Chem*, 2011, 286: 6963–6970
- 13 Sang N, Fang J, Srinivas V, et al. Carboxyl-terminal transactivation activity of hypoxia-inducible factor 1 α is governed by a von Hippel-Lindau protein-independent, hydroxylation-regulated association with p300/CBP. *Mol Cell Biol*, 2002, 22: 2984–2992
- 14 Mehta R, Steinkraus K A, Sutphin G L, et al. Proteasomal regulation of the hypoxic response modulates aging in *C. elegans*. *Science*, 2009, 324: 1196–1198
- 15 Chen D, Thomas E L, Kapahi P. HIF-1 modulates dietary restriction-mediated lifespan extension via IRE-1 in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Genet*, 2009, 5: e1000486
- 16 Zhong L, D'Urso A, Toiber D, et al. The histone deacetylase Sirt6 regulates glucose homeostasis via Hif1 α . *Cell*, 2010, 140: 280–293

- 17 Lim J H, Lee Y M, Chun Y S, et al. Sirtuin 1 modulates cellular responses to hypoxia by deacetylating hypoxia-inducible factor 1alpha. *Mol Cell*, 2010, 38: 864–878
- 18 Dioum E M, Chen R, Alexander M S, et al. Regulation of hypoxia-inducible factor 2alpha signaling by the stress-responsive deacetylase sirtuin 1. *Science*, 2009, 324: 1289–1293
- 19 Gomes A P, Price N L, Ling A J, et al. Declining NAD⁺ induces a pseudohypoxic state disrupting nuclear-mitochondrial communication during aging. *Cell*, 2013, 155: 1624–1638
- 20 Hubbi M E, Hu H, Kshitiz Gilkes D M, et al. Sirtuin-7 inhibits the activity of hypoxia-inducible factors. *J Biol Chem*, 2013, 288: 20768–20775
- 21 Finley L W, Carracedo A, Lee J, et al. SIRT3 opposes reprogramming of cancer cell metabolism through HIF1alpha destabilization. *Cancer Cell*, 2011, 19: 416–428
- 22 Shao R, Zhang F P, Tian F, et al. Increase of SUMO-1 expression in response to hypoxia: direct interaction with HIF-1alpha in adult mouse brain and heart *in vivo*. *FEBS Lett*, 2004, 569: 293–300
- 23 Carbia-Nagashima A, Gerez J, Perez-Castro C, et al. RSUME, a small RWD-containing protein, enhances SUMO conjugation and stabilizes HIF-1alpha during hypoxia. *Cell*, 2007, 131: 309–323
- 24 Cheng J, Kang X, Zhang S, et al. SUMO-specific protease 1 is essential for stabilization of HIF1alpha during hypoxia. *Cell*, 2007, 131: 584–595
- 25 Luo W, Hu H, Chang R, et al. Pyruvate kinase M2 is a PHD3-stimulated coactivator for hypoxia-inducible factor 1. *Cell*, 2011, 145: 732–744
- 26 Montagner M, Enzo E, Forcato M, et al. SHARP1 suppresses breast cancer metastasis by promoting degradation of hypoxia-inducible factors. *Nature*, 2012, 487: 380–384
- 27 Chen Z, Liu X, Mei Z, et al. EAF2 suppresses hypoxia-induced factor 1alpha transcriptional activity by disrupting its interaction with coactivator CBP/p300. *Mol Cell Biol*, 2014, 34: 1085–1099
- 28 Nakayama K, Frew I J, Hagensen M, et al. Siah2 regulates stability of prolyl-hydroxylases, controls HIF1alpha abundance, and modulates physiological responses to hypoxia. *Cell*, 2004, 117: 941–952
- 29 Jung C R, Hwang K S, Yoo J, et al. E2-EPF UCP targets pVHL for degradation and associates with tumor growth and metastasis. *Nat Med*, 2006, 12: 809–816
- 30 Bernardi R, Guernah I, Jin D, et al. PML inhibits HIF-1alpha translation and neoangiogenesis through repression of mTOR. *Nature*, 2006, 442: 779–785
- 31 Huang C, Han Y, Wang Y, et al. SENP3 is responsible for HIF-1 transactivation under mild oxidative stress via p300 de-SUMOylation. *EMBO J*, 2009, 28: 2748–2762
- 32 Foxler D E, Bridge K S, James V, et al. The LIMD1 protein bridges an association between the prolyl hydroxylases and VHL to repress HIF-1 activity. *Nat Cell Biol*, 2012, 14: 201–208
- 33 Nilsson G E, Renshaw G M. Hypoxic survival strategies in two fishes: extreme anoxia tolerance in the North European crucian carp and natural hypoxic preconditioning in a coral-reef shark. *J Exp Biol*, 2004, 207: 3131–3139
- 34 Nilsson G E. Surviving anoxia with the brain turned on. *News Physiol Sci*, 2001, 16: 217–221
- 35 Lutz P L, Nilsson G E. Vertebrate brains at the pilot light. *Resp Physiol Neurobiol*, 2004, 141: 285–296
- 36 Stecyk J A, Stenslokken K O, Farrell A P, et al. Maintained cardiac pumping in anoxic crucian carp. *Science*, 2004, 306: 77
- 37 Shoubridge E A, Hochachka P W. Ethanol: novel end product of vertebrate anaerobic metabolism. *Science*, 1980, 209: 308–309
- 38 Roesner A, Mitz S A, Hankeln T, et al. Globins and hypoxia adaptation in the goldfish, *Carassius auratus*. *FEBS J*, 2008, 275: 3633–3643
- 39 Rytönen K T, Akbarzadeh A, Miandare H K, et al. Subfunctionalization of cyprinid hypoxia-inducible factors for roles in development and oxygen sensing. *Evolution*, 2013, 67: 873–882
- 40 Chi W, Gan X, Xiao W, et al. Different evolutionary patterns of hypoxia-inducible factor alpha (HIF-alpha) isoforms in the basal branches of *Actinopterygii* and *Sarcopterygii*. *FEBS Open Bio*, 2013, 3: 479–483
- 41 Nilsson G E, Dymowska A, et al. New insights into the plasticity of gill structure. *Resp Physiol Neurobiol*, 2012, 184: 214–222
- 42 Turko A J, Cooper C A, Wright P A. Gill remodelling during terrestrial acclimation reduces aquatic respiratory function of the amphibious fish *Kryptolebias marmoratus*. *J Exp Biol*, 2012, 215: 3973–3980
- 43 Dhillon R S, Yao L, Matey V, et al. Interspecific differences in hypoxia-induced gill remodeling in carp. *Physiol Biochem Zool*, 2013, 86: 727–739
- 44 Tzaneva V, Vadeboncoeur C, Ting J, et al. Effects of hypoxia-induced gill remodelling on the innervation and distribution of ionocytes in the gill of goldfish, *Carassius auratus*. *J Comp Neurol*, 2014, 522: 118–130

- 45 Mitrovic D, Dymowska A, Nilsson G E, et al. Physiological consequences of gill remodeling in goldfish (*Carassius auratus*) during exposure to long-term hypoxia. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2009, 297: R224–R234
- 46 Zachar P C, Jonz M G. Oxygen sensitivity of gill neuroepithelial cells in the anoxia-tolerant goldfish. *Adv Exp Med Biol*, 2012, 758: 167–172
- 47 Cameron J S, DeWitt J P, Ngo T T, et al. Cardiac K(ATP) channel alterations associated with acclimation to hypoxia in goldfish (*Carassius auratus* L.). *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 2013, 164: 554–564
- 48 Capossela K M, Brill R W, Fabrizio M C, et al. Metabolic and cardiorespiratory responses of summer flounder *Paralichthys dentatus* to hypoxia at two temperatures. *J Fish Biol*, 2012, 81: 1043–1058
- 49 Feng X, Liu X, Zhang W, et al. p53 directly suppresses BNIP3 expression to protect against hypoxia-induced cell death. *EMBO J*, 2011, 30: 3397–3415
- 50 Soitamo A J, Rabergh C M, Gassmann M, et al. Characterization of a hypoxia-inducible factor (HIF-1alpha) from rainbow trout. Accumulation of protein occurs at normal venous oxygen tension. *J Biol Chem*, 2001, 276: 19699–19705
- 51 Rahman M S, Thomas P. Molecular cloning, characterization and expression of two hypoxia-inducible factor alpha subunits, HIF-1alpha and HIF-2alpha, in a hypoxia-tolerant marine teleost, Atlantic croaker (*Micropogonias undulatus*). *Gene*, 2007, 396: 273–282
- 52 Rojas D A, Perez-Munizaga D A, Centanin L, et al. Cloning of *hif-1alpha* and *hif-2alpha* and mRNA expression pattern during development in zebrafish. *Gene Expr Patterns*, 2007, 7: 339–345
- 53 Shen R J, Jiang X Y, Pu J W, et al. HIF-1alpha and -2alpha genes in a hypoxia-sensitive teleost species *Megalobrama amblycephala*: cDNA cloning, expression and different responses to hypoxia. *Comp Biochem Physiol Part B Biochem Mol Biol*, 2010, 157: 273–280
- 54 Cao Y B, Chen X Q, Wang S, et al. Evolution and regulation of the downstream gene of hypoxia-inducible factor-1alpha in naked carp (*Gymnocypris przewalskii*) from Lake Qinghai, China. *J Mol Evol*, 2008, 67: 570–580
- 55 Rytönen K T, Vuori K A, Primmer C R, et al. Comparison of hypoxia-inducible factor-1 alpha in hypoxia-sensitive and hypoxia-tolerant fish species. *Comp Biochem Physiol Part D Genomics Proteomics*, 2007, 2: 177–186
- 56 Terova G, Rimoldi S, Cora S, et al. Acute and chronic hypoxia affects HIF-1 alpha mRNA levels in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture*, 2008, 279: 150–159
- 57 Mohindra V, Tripathi R K, Singh R K, et al. Molecular characterization and expression analysis of three hypoxia-inducible factor alpha subunits, HIF-1alpha, -2alpha and -3alpha in hypoxia-tolerant Indian catfish, *Clarias batrachus* [Linnaeus, 1758]. *Mol Biol Rep*, 2013, 40: 5805–5815
- 58 Geng X, Feng J, Liu S, et al. Transcriptional regulation of hypoxia inducible factors alpha (HIF-alpha) and their inhibiting factor (FIH-1) of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) under hypoxia. *Comp Biochem Physiol Part B Biochem Mol Biol*, 2014, 169: 38–50
- 59 Law S H, Wu R S, Ng P K, et al. Cloning and expression analysis of two distinct HIF-alpha isoforms—gcHIF-1alpha and gcHIF-4alpha—from the hypoxia-tolerant grass carp, *Ctenopharyngodon idellus*. *BMC Mol Biol*, 2006, 7: 15
- 60 Rimoldi S, Terova G, Ceccuzzi P, et al. HIF-1alpha mRNA levels in Eurasian perch (*Perca fluviatilis*) exposed to acute and chronic hypoxia. *Mol Biol Rep*, 2012, 39: 4009–4015
- 61 Kaelin W G Jr, Ratcliffe P J. Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway. *Mol Cell*, 2008, 30: 393–402
- 62 Koivunen P, Tiainen P, Hyvärinen J, et al. An endoplasmic reticulum transmembrane prolyl 4-hydroxylase is induced by hypoxia and acts on hypoxia-inducible factor alpha. *J Biol Chem*, 2007, 282: 30544–30552
- 63 Nikinmaa M, Rees B B. Oxygen-dependent gene expression in fishes. *Am J Physiol-Reg I*, 2005, 288: R1079–R1090
- 64 van Rooijen E, Voest E E, Logister I, et al. Zebrafish mutants in the von Hippel-Lindau tumor suppressor display a hypoxic response and recapitulate key aspects of Chuvash polycythemia. *Blood*, 2009, 113: 6449–6460
- 65 Lindsley J E, Rutter J. Nutrient sensing and metabolic decisions. *Comp Biochem Physiol Part B Biochem Mol Biol*, 2004, 139: 543–559
- 66 Krumschnabel G, Biasi C, Wieser W. Action of adenosine on energetics, protein synthesis and K⁺ homeostasis in teleost hepatocytes. *J Exp Biol*, 2000, 203: 2657–2665
- 67 Nilsson G E. The adenosine receptor blocker aminophylline increases anoxic ethanol excretion in crucian carp. *Am J Physiol*, 1991, 261: R1057–R1060
- 68 Nilsson G E, Hylland P, Lofman C O. Anoxia and adenosine induce increased cerebral blood flow rate in crucian carp. *Am J Physiol*, 1994, 267: R590–R595
- 69 Krumschnabel G, Schwarzbaum P J, Lisch J, et al. Oxygen-dependent energetics of anoxia-tolerant and anoxia-intolerant hepatocytes. *J Exp Biol*, 2000, 203: 951–959
- 70 Hermes-Lima M, Zenteno-Savín T. Animal response to drastic changes in oxygen availability and physiological oxidative stress. *Comp biochem physiol C Toxicol pharmacol*, 2002, 133: 537–556

- 71 Lushchak V I, Lushchak L P, Mota A A, et al. Oxidative stress and antioxidant defenses in goldfish *Carassius auratus* during anoxia and reoxygenation. *Am J Physiol-Reg I*, 2001, 280: R100–107
- 72 Vig E, Gabrielak T, Leyko W, et al. Purification and characterization of Cu, Zn-superoxide dismutase from common carp liver. *Comp Biochem Physiol Part B Biochem Mol Biol*, 1989, 94: 395–397
- 73 Zhong X P, Wang D, Zhang Y B, et al. Identification and characterization of hypoxia-induced genes in *Carassius auratus* blastulae embryonic cells using suppression subtractive hybridization. *Comp Biochem Physiol Part B Biochem Mol Biol*, 2009, 152: 161–170
- 74 Liao X, Cheng L, Xu P, et al. Transcriptome analysis of crucian carp (*Carassius auratus*), an important aquaculture and hypoxia-tolerant species. *PLoS One*, 2013, 8: e62308
- 75 Everett M V, Antal C E, Crawford D L. The effect of short-term hypoxic exposure on metabolic gene expression. *J Exp Zool A Ecol Genet Physiol*, 2012, 317: 9–23
- 76 Chen K, Cole R B, Rees B B. Hypoxia-induced changes in the zebrafish (*Danio rerio*) skeletal muscle proteome. *J Proteomics*, 2013, 78: 477–485
- 77 Zhang Z, Wu R S, Mok H O, et al. Isolation, characterization and expression analysis of a hypoxia-responsive glucose transporter gene from the grass carp, *Ctenopharyngodon idellus*. *Eur J Biochem*, 2003, 270: 3010–3017
- 78 Hall J R, Richards R C, MacCormack T J, et al. Cloning of GLUT3 cDNA from Atlantic cod (*Gadus morhua*) and expression of GLUT1 and GLUT3 in response to hypoxia. *Biochim Biophys Acta*, 2005, 1730: 245–252
- 79 Terova G, Rimoldi S, Brambilla F, et al. *In vivo* regulation of GLUT2 mRNA in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) in response to acute and chronic hypoxia. *Comp Biochem Physiol Part B Biochem Mol Biol*, 2009, 152: 306–316
- 80 Chou C F, Tohari S, Brenner S, et al. Erythropoietin gene from a teleost fish, *Fugu rubripes*. *Blood*, 2004, 104: 1498–1503
- 81 Chu C Y, Cheng C H, Chen G D, et al. The zebrafish erythropoietin: functional identification and biochemical characterization. *FEBS Lett*, 2007, 581: 4265–4271
- 82 Paffett-Lugassy N, Hsia N, Fraenkel P G, et al. Functional conservation of erythropoietin signaling in zebrafish. *Blood*, 2007, 110: 2718–2726
- 83 Pierron F, Baudrimont M, Gonzalez P, et al. Common pattern of gene expression in response to hypoxia or cadmium in the gills of the European glass eel (*Anguilla anguilla*). *Environ Sci Technol*, 2007, 41: 3005–3011
- 84 Vuori K A, Soitamo A, Vuorinen P J, et al. Baltic salmon (*Salmo salar*) yolk-sac fry mortality is associated with disturbances in the function of hypoxia-inducible transcription factor (HIF-1 α) and consecutive gene expression. *Aquat Toxicol*, 2004, 68: 301–313
- 85 Yu R M, Ng P K, Tan T, et al. Enhancement of hypoxia-induced gene expression in fish liver by the aryl hydrocarbon receptor (AhR) ligand, benzo[a]pyrene (BaP). *Aquat Toxicol*, 2008, 90: 235–242
- 86 Wang D, Zhong X P, Qiao Z X, et al. Inductive transcription and protective role of fish heme oxygenase-1 under hypoxic stress. *J Exp Biol*, 2008, 211: 2700–2706
- 87 Stevenson T J, Trinh T, Kogelschatz C, et al. Hypoxia disruption of vertebrate CNS pathfinding through ephrinB2 Is rescued by magnesium. *PLoS Genet*, 2012, 8: e1002638
- 88 Barriga E H, Maxwell P H, Reyes A E, et al. The hypoxia factor Hif-1 α controls neural crest chemotaxis and epithelial to mesenchymal transition. *J Cell Biol*, 2013, 201: 759–776