

文章编号:1005-3832(2026)02-0007-08

鲫 *hif1 α* 基因序列特征及其在碱度胁迫下的表达分析

康颖^{1,2}, 张渴新¹, 黄晶¹, 常玉梅¹, 鲁翠云¹, 刘天奇¹, 郑先虎^{1,2}

(1. 中国水产科学研究院黑龙江水产研究所, 淡水鱼类育种国家地方联合工程实验室, 农业农村部淡水水产生物技术与遗传育种重点实验室, 黑龙江省特殊生境鱼类种质特性与抗逆育种重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150070;

2. 大连海洋大学水产与生命学院, 辽宁 大连 116023)

摘要: 为研究鲫 (*Carassius auratus*) 低氧诱导因子-1 α (hypoxia-inducible factor-1 α , HIF1 α) 在碱度胁迫中的作用, 本研究结合生物信息学分析其编码蛋白质的理化性质与结构, 并利用实时荧光定量 PCR (qPCR) 检测鲫 *hif1 α* 及其下游靶基因 *ca9*, *vegf* 以及 *epo* 的表达特征。序列分析结果显示, *hif1 α* 基因的开放阅读框 (ORF) 全长为 2 085 bp, 编码 694 个氨基酸, 包含保守的碱性螺旋-环-螺旋 (helix-loop-helix, HLH) 结构域 (第 80~135 位氨基酸)、PAS (Per/ARNT/Sim) 结构域 (第 146~350 位氨基酸) 和 PAS 基序 (PAC) 结构域 (第 356~399 位氨基酸), 预示其功能的保守性。鲫 *hif1 α* 基因编码的氨基酸序列与鲤 (*Cyprinus carpio*)、斑马鱼 (*Danio rerio*) 相似性高, 与人 (*Homo sapiens*) 和小鼠 (*Mus musculus*) 亲缘关系较远。荧光定量 PCR 结果显示, *hif1 α* 基因在鲫各个组织中均有表达, 其中, 鳃中表达量最高, 脑次之。在 50 mmol/L 碱度胁迫下, *hif1 α* 基因在鳃中的表达先上升后下降, 并在第 3 d 时显著上调达到峰值。*hif1 α* 关键靶基因 *ca9*, *vegf* 以及 *epo* 在碱度胁迫 5 d 时表达上调, 显著高于淡水组 ($P < 0.01$)。综上所述, *hif1 α* 基因可能在调控碱度耐受中发挥作用。本研究为进一步解析在高碱环境下的分子生理机制奠定了基础。

关键词: 鲫; *hif1 α* ; 基因表达; 碱度胁迫

中图分类号: S917.4

文献标识码: A

Sequence Characteristics of *Carassius auratus hif1 α* Gene and Its Expression Analysis Under Alkalinity Stress

KANG Ying^{1,2}, ZHANG Kexin¹, HUANG Jing¹, CHANG Yumei¹, LU Cuiyun¹, LIU Tianqi¹, ZHENG Xianhu^{1,2}

(1. Heilongjiang Province's Key Laboratory of Fish Stress Resistance Breeding and Germplasm Characteristics on Special Habitats, Key Laboratory of Freshwater Aquatic Biotechnology and Breeding, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, National and Local Joint Engineering Laboratory of Freshwater Fish Breeding, Heilongjiang River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Harbin 150070, China;

2. College of Fisheries and Life Sciences, Dalian Ocean University, Dalian 116023, China)

Abstract: To exploring the function of hypoxia-inducible factor-1 α (HIF1 α) in crucian carp (*Carassius auratus*) under alkalinity stress, we characterized its physicochemical properties and structure by bioinformatics, and detected the expression characteristics of *hif1 α* and its downstream target genes *ca9*, *vegf*, and *epo* by real-time quantitative PCR (qPCR). The result of sequence analysis showed that its open reading frame (ORF) was 2,085 bp long, encoding a peptide of 694 aa. The deduced HIF-1 α protein contained three typical domain, including helix-loop-helix (HLH) domain (80 - 135 aa), PAS (Per/ARNT/Sim) domain (146 - 350 aa), and PAS motif (PAC motif) domains (356 - 399 aa), which indicated functional conservation of the protein. The *hif1 α* sequence of crucian carp showed high similarity with common carp (*Cyprinus carpio*) and zebrafish (*Danio rerio*), but was distantly related to humans (*Homo sapiens*) and mice (*Mus musculus*). The qPCR results demonstrated ubiquitous expression of the *hif1 α* gene across crucian carp tissues, with the highest levels observed in the gills, followed by the brain. As the first line of defense between fish and the outside world, the expression of *hif1 α* gene in gills increased first and then decreased under alkalinity stress (50 mmol/L). It was significantly up-regulated and reached the peak on the third day. The key target genes of *hif1 α* , including *ca9*, *vegf*, and *epo* were up-regulated by about 19 times under alkalinity stress for 5 d significantly higher than that in the freshwater group ($P < 0.01$). These results suggest that *hif1 α* gene

收稿日期: 2025-07-15

基金项目: 中央级科研院所基本业务费项目 (HSY202403M).

作者简介: 康颖 (2000-), 女, 硕士研究生, 从事水产动物基因组与分子育种研究. E-mail: kky0521@163.com

通信作者: 郑先虎, 研究员, 从事水产动物基因组与分子育种研究. E-mail: zhengxianhu@hrfri.ac.cn

may play a role in regulating alkalinity tolerance. This study provides a foundation for further analysis of the molecular and physiological mechanism in a high-alkaline environment.

Key words: *Carassius auratus*; *hif1 α* ; gene expression; alkalinity stress

低氧诱导因子-1 (hypoxia-inducible factor-1, HIF-1) 是碳酸酐酶 9 (carbonic anhydrase 9, *ca9*) 等 100 多个低氧应答基因的关键转录因子, 在低氧信号转导通路中起重要作用^[1-4]。HIF-1 的活性主要取决于氧敏感的 α 亚基 (hypoxia-inducible factor-1 α , HIF1 α)。常氧条件下, 新合成的 HIF1 α 立即被泛素系统水解, 而在低氧条件下, HIF1 α 降解途径被阻断, HIF1 α 积累并转移到细胞核发挥作用^[5]。

目前, 在鱼类中有关 *hif1 α* 基因的研究多集中在低氧适应的调控方面^[6-9], 即通过激活 *hif1 α* 基因, 调控下游靶基因适应低氧环境。除了响应低氧环境外, *hif1 α* 基因在多种非低氧环境胁迫中也发挥重要作用。已有研究表明, 低温条件可激活鲫 (*Carassius auratus*) 中 *hif1 α* 基因的表达, 从而提高其糖原储量与耐低氧能力^[10]。此外, 大鳞鲃 (*Luciobarbus capito*) 在高盐胁迫下, HIF-1 信号通路也呈现显著富集^[11]。在高碱环境中, 瓦氏雅罗鱼 (*Leuciscus waleckii*) 经碱度胁迫后鉴定到 HIF 家族成员高表达, 推测其可能与长期适应高碱极端环境相关^[12]; 大鳞鲃在碱度胁迫下同样出现 HIF-1 信号通路显著富集^[13]。研究显示, 瓦氏雅罗鱼通过 *hif1 α* 基因负向调控 RHBG 以增强氨排泄, 从而适应极端的碱性环境^[14]; 韩青青^[15]通过对 *hif1 α* 靶基因 *vegf* 在不同组中的相对含量的分析, 证明 *hif1 α* 基因参与青海湖裸鲤 (*Gymnocypris przewalski*) 和鲫对碱性环境的应答。综上所述, *hif1 α* 基因也响应低温、高盐和高碱等多种胁迫环境, 然而对其在非低氧环境胁迫下的功能响应方面的相关研究尚不多见。

鲫隶属于鲤形目 (Cypriniformes) 鲤科 (Cyprinidae)、鲫属 (*Carassius*), 是中国重要的淡水养殖品种, 2024 年总产量超过 2.8×10^6 t, 在全国淡水养殖鱼类中位列第 5^[16]。鲫表现出极强的环境适应性, 对内蒙古达里湖的高碳酸盐碱度条件具有显著的耐受能力, 并成为该湖区的主要经济鱼类之一, 是研究耐碱分子机制的理想材料^[17-19]。本研究以达里湖鲫子代为研究对象, 对 *hif1 α* 基因进行序列分析以及不同组织中表达情况进行研究, 同时通过 50 mmol/L 碳酸盐碱度胁迫实验, 分析 *hif1 α* 基因在胁迫不同天数下

转录表达变化, 并通过 *hif1 α* 通路的靶基因 *ca9*、*vegf* 及 *epo* 的表达水平表征 *hif1 α* 的激活与否, 揭示碱度胁迫下达里湖鲫激活 *hif1 α* 适应环境变化的分子响应策略, 将 *hif1 α* 基因功能拓展至碱度胁迫响应范畴, 为系统理解鱼类适应高碱水体的分子机制提供重要依据。

1 材料与方法

1.1 *hif1 α* 基因序列分析

根据在 Ensembl 上查找 *hif1 α* 基因 (ENSCARP00000045486) 的 CDS 区, 通过 ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/>) 查询获得 *hif1 α* 基因开放阅读框 (ORF)。借助在线工具 ExPASy-ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) 对目标蛋白的基本理化参数进行评估; 利用 TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 分析其跨膜拓扑结构, 并通过 SignalP (<https://services.healthtech.dtu.dk/SignalP/>) 鉴定信号肽的存在。随后, 应用 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 识别蛋白质的功能结构域, 采用 SOPMA (<https://npsa.lyon.inserm.fr/>) 预测其二级结构组成。最后, 基于 SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>) 平台构建该蛋白的三级结构模型。

1.2 *hif1 α* 基因序列比对及系统发育树构建

本研究共选取了 12 个物种, 分别是鲈形目的大黄鱼 (*Larimichthys crocea*)、金头鲷 (*Sparus aurata*)、梭鲈 (*Sander lucioperca*), 鲱形目的大菱鲆 (*Scophthalmus maximus*), 鲑形目的大西洋鲑 (*Salmo salar*)、虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*)、褐鳟 (*Salmo trutta*), 鲤形目的鲤 (*Cyprinus carpio*)、斑马鱼 (*Danio rerio*), 多鳍鱼目的苇栖多鳍鱼 (*Erpetoichthys calabaricus*), 以及小鼠 (*Mus musculus*) 和人 (*Homo sapiens*) 进行序列比对和系统发育树构建。系统发育树由 MEGA12^[20] 软件构建, 采用最大似然法 (ML) 进行系统发育分析, 并采用 bootstrap 方法对系统发育树每个节点的支持率进行 1 000 次检验。序列比对由 DNAMAN 软件完成, 并利用 NCBI smartBlast 工具进行 HIF1 α 蛋白序列与其他物种的相似性比

较分析。分析中使用的所有序列来自于 Ensembl 数据库与 NCBI 数据库(表 1)。

表 1 HIF1 α 蛋白序列用于多序列比对和系统发育树构建
Tab. 1 HIF1 α protein sequences are used for multi-sequence alignment and phylogenetic tree construction

物种 species	登录号 accession number
鲫 <i>Carassius auratus</i>	ENSCARP00000045486
大黄鱼 <i>Larimichthys crocea</i>	ENSLCRP00005043846
大菱鲂 <i>Scophthalmus maximus</i>	ENSSMAP00000031962
大西洋鲑 <i>Salmo salar</i>	ENSSSAP00020009856
虹鳟 <i>Oncorhynchus mykiss</i>	ENSOMYP00000086855
金头鲷 <i>Sparus aurata</i>	ENSSAUP00010037668
鲤 <i>Cyprinus carpio</i>	ENSCCRP00000041097
苇栖多鳍鱼 <i>Erpetoichthys calabaricus</i>	ENSECRP00000000065
梭鲈 <i>Sander lucioperca</i>	ENSSLUP00000033182
褐鳟 <i>Salmo trutta</i>	ENSSTUP00000050085
斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	ENSDARP00000137924
人 <i>Homo sapiens</i>	EAW80809.1
小鼠 <i>Mus musculus</i>	NP_001300848.1

1.3 碳酸盐碱度胁迫实验

达里湖鲫具有耐受极端盐碱环境的优良性状,是开展耐盐碱鱼类良种选育、鱼类耐盐碱机制研究的优良种质资源。因此,本研究所用实验鱼为在呼兰实验站(淡水)中繁育和养殖的达里湖鲫 F₄ 代个体,4 月龄,体质量为(25.36 ± 4.00) g,体长为(10.25 ± 1.50) cm。将实验鱼 250 尾运回黑龙江水产研究所,在实验鱼养殖车间暂养 1 周,碱度胁迫期间停止投喂,并持续充氧,以备后续实验。

本研究设置淡水组(A0)和 50 mmol/L 碱度组(A50),碱度组设置 4 个时间点,分别为胁迫第 1 d、第 3 d、第 5 d 和第 7 d,使用碳酸氢钠(NaHCO₃)配置碱度,通过酸碱滴定测定碱度,以确保误差不超过 ± 0.5 mmol/L。每个时间点设置 2 个重复水族缸(30 cm × 30 cm × 45 cm, 35 L),每缸放养 10 尾实验鱼。实验期间持续充氧,每天监测水体 pH、温度以及溶解氧含量。pH 采用 pH400 便携式 pH 计测定;溶解氧采用便携式溶氧检测仪测定。分别于胁迫开始后第 1 d、第 3 d、第 5 d 和第 7 d 采集 10 个样本。使用鱼安定(MS-222)对实验鱼进行麻醉,待鱼静止不动时测量体质量和体长,随后采集鳃、肌肉、心脏、脑、肠、肝脏、肾脏和脾脏。采样过程全程冰上操作,样品采集后立刻放入液氮中速冻,然后移至超低温冰

箱中长期保存。

1.4 RNA 提取及反转录

采用 FreeZol Reagent 试剂盒进行 RNA 的提取。将采集的组织样本低温研磨,向裂解液中加入 dilution buffer,离心后取上清液,加入异丙醇离心,在管侧和管底可以看见白色凝胶状沉淀,加入 75% 乙醇清洗 2~3 次;室温放置晾干,加入 RNase-free ddH₂O 溶解沉淀,使 RNA 产物充分溶解,于 -80 °C 长期保存。

利用 PrimeScript™ FAST RT reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒进行反转录,合成的 cDNA 于 -20 °C 保存。

1.5 实时荧光定量 PCR(qPCR)

使用 Primer Premier 6 软件在鲫 *hif1 α* 基因、*ca9* 基因、*vegf* 基因以及 *epo* 基因的 CDS 保守区域设计荧光定量引物并合成(表 2),以各组织 cDNA 为模板,以 18S 为内参基因,利用 SYBR® Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus) 试剂盒进行 qPCR。每个样本设 3 个重复。qPCR 反应体系为 10 μ L,包括 TB Green Premix Ex Taq II 2x (5 μ L), ROX Reference Dye II (0.2 μ L), PCR forward primer (0.4 μ L), PCR reverse primer (0.4 μ L), dd H₂O 3 μ L, 模板 1 μ L。qPCR 反应条件为 95 °C 30 s, 95 °C 5 s, 60 °C 34 s, 40 个循环,最后 95 °C 15 s, 60 °C 1 min, 95 °C 15 s。使用 2^{- $\Delta\Delta C_t$} 相对定量方法计算基因在不同组织的相对表达量,数据分析采用 prism 软件中的单因素方差分析(one-way ANOVA),检验组间差异显著性。

1.6 血液指标测定

为了研究达里湖鲫在碱度条件下的生理反应,检测 *hif1 α* 基因信号通路两个关键生理表型:血红蛋白(Hgb)浓度和红细胞(Rbc)计数,使用全自动动物血液分析仪(BC-2800Vet)分析全血的 Hgb 浓度和 Rbc 计数。

2 结果与分析

2.1 *hif1 α* 基因序列分析及系统发育分析

hif1 α 基因的 ORF 开放阅读框全长为 2 085 bp, 编码 694 个氨基酸,蛋白质分子式为 C₆₁₉₅H₁₀₃₀₇N₂₀₈₅O₂₅₄₇S₅₄₀, 相对分子质量为 172 kDa, 理论等电点 pI 为 4.89, 不稳定系数为 51.52, 脂肪系数为 27.00, 亲水性平均系数为 0.879, 无跨膜结构和信号肽。鲫 HIF1 α 蛋白 N 端为碱性螺旋-环-螺旋(helix-

表 2 荧光定量所用引物序列
Tab. 2 Primer sequences used for fluorescence quantification

基因 genes	引物序列(5'-3') primer sequence (5'-3')	产物长度 /bp product length	序列号 accession number
<i>hif1α</i>	F-CTCCCACCTGGACAAAGCTG R-GTGTTTTGCTGGCCCTGATTG	89	XM_026226443.1
<i>ca9</i>	F-GGGTGGAAAGGACCTGGTGAAC R-TGCTGCGGTGCTGTCATTAAGA	118	XM_026223166.1
<i>vegf</i>	F-GGGAGGGAGGCAGAAGCACATA R-ACCACACAGGACGGGATGAAGA	145	XM_026210420.1
<i>epo</i>	F-CGGTGGAGAAGACGAGGAGACA R-TGGCAAGCAGATGACGCACTT	101	XM_026267268.1
<i>18S</i>	F-GGAGGTTCAAGACGATCAG R-GTGAGGTTCCCGTGTGAG	293	XM_026235016.1

loop-helix,HLH) 结构域 (80~135 aa)、2 个 PAS (Per/ARNT/Sim) 结构域 (146~350 aa)、C- 末端含 PAS 基序(PAC)结构域(356~399 aa)。

与其他物种 HIF1α 蛋白序列比对发现, 鲫与同为鲤形目的鲤和斑马鱼同源性最高, 相似性分别为 94.63%和 88.69%; 与鲈形目的大黄鱼、金头鲷相似性分别为 59.02%与 55.41%; 与鲑形目的褐鳟相似性为 61.85%, 与人和小鼠相似性分别为 61.47%和 59.08%。鲫 HIF1α 序列与其他物种相比, 相似性较高的区域集中在 HLH (80~135 aa)、PAS/PAC (146~399 aa)等功能结构域。

系统发育分析表明(图 1), 鱼类和哺乳类聚成两大支, 其中鲫与同为鲤形目的斑马鱼和鲤聚为一支, 然后与鲈形目的大菱鲂、鲈形目的大黄鱼、金头鲷等聚成一大支; 多鳍鱼目的苇栖多鳍鱼与哺乳动物聚为一个分支, 而人和小鼠聚为另一支。该进化关系与传统鱼类分类学的划分高度一致, 进一步印证了 *hif1α* 基因在进化上的保守性。

2.2 *hif1α* 基因在各组织中表达特征

本研究检测了淡水组中 *hif1α* 基因在鲫 8 个组织中的表达情况。qPCR 结果显示, *hif1α* 基因在所有组织中均有表达, 表达量由高到低依次为鳃(S)> 脑(N)> 肌肉(R)> 肠(C)> 肾(K)> 肝(G)> 脾(P)> 心脏(H), 其中鳃的 *hif1α* 基因表达量最高, 较心脏高约 10.5 倍(P<0.05), 这可能与鳃在维持生物体在碱性水环境下生理稳态的重要作用有关; 脑的 *hif1α* 基因表达量次之, 其表达水平较心脏高约 7.8 倍(P<0.05)(图 2)。

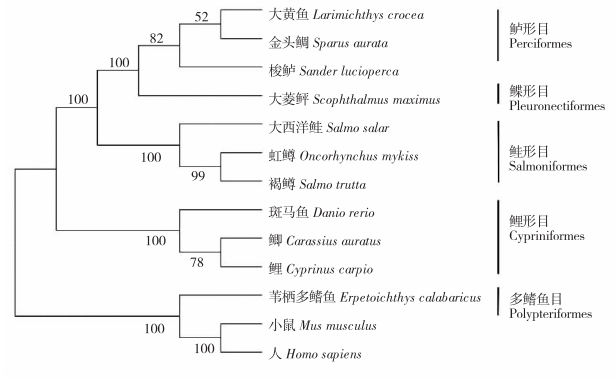


图 1 物种间 HIF1α 蛋白序列系统进化树

Fig. 1 Interspecies HIF1α protein sequence phylogenetic tree

2.3 碱度胁迫下 *hif1α* 基因和靶基因 *ca9*、*vegf* 以及 *epo* 在鳃组织中的表达特征

与淡水组(0 d)相比, 鳃中的 *hif1α* 基因表达在碱度胁迫不同时间有明显的变化趋势(图 3a), *hif1α* 基因表达量在碱度胁迫第 3 d 时显著上调, 并达到峰值(P<0.0001), 随后呈现下降趋势, 整体呈现先上升后下降的趋势。

通过检测 *hif1α* 基因的关键靶基因 *ca9*、*vegf* 以及 *epo* 在碱度胁迫不同时间的基因表达变化, 指示 *hif1α* 基因的激活情况。结果表明, 靶基因 *ca9*、*vegf* 以及 *epo* 变化趋势与 *hif1α* 基因表达变化相似, 即表达量随胁迫时间呈递增趋势, 在碱度胁迫第 5 d 时表达量达到峰值, 显著高于淡水组(P<0.05), 其表达水平较淡水组分别高约 19.07 倍、3.02 倍和 4.91 倍, 随后呈下降趋势(图 3b、c、d)。

hif1α 基因与 *ca9*、*vegf* 以及 *epo* 等靶基因的表

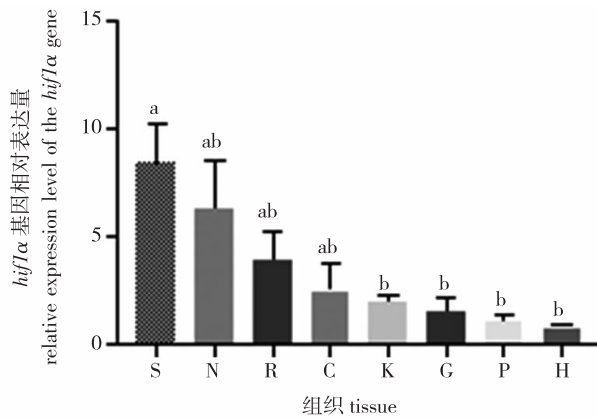


图 2 *hif1α* 基因在鲫不同组织中的相对表达量

Fig. 2 The relative expression levels of *hif1α* gene in different tissues of crucian carp

注: 不同字母之间表示差异显著 ($P < 0.05$), 心脏 H 为参考样本, 鳃 (S), 脑 (N), 肌肉 (R), 肠 (C), 肾 (K), 肝 (G), 脾 (P), 心脏 (H)。

Notes: Different letters indicate significant differences ($P < 0.05$), and heart (H) is the reference sample, gill (S), brain (N), muscle (R), intestine (C), kidney (K), liver (G), spleen (P), heart (H).

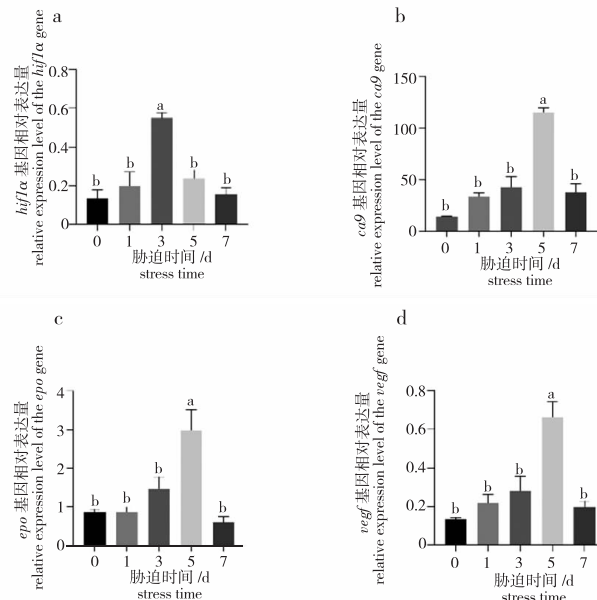


图 3 碱胁迫不同时间 *hif1α* (a)、*ca9* (b)、*epo* (c) 和 *vegf* (d) 的相对表达量

Fig. 3 The relative expression levels of *hif1α* (a), *ca9* (b), *epo* (c), and *vegf* (d) under alkaline stress at different time points

注: 不同字母之间表示差异显著 ($P < 0.05$), 淡水组以 0 d 为参考样本, 下同。

Notes: Different letters indicate significant differences ($P < 0.05$), and 0 d in the freshwater group was used as the reference sample, et sequentia.

达动态一致, 但达到响应峰值的时间不同。这可能是因为 *hif1α* 基因调控 *ca9*、*vegf* 以及 *epo* 等靶基因的表达需要一定的反应时间。

2.4 血液指标测定结果

与淡水组 (A0) 相比, Rbc 红细胞数目与 Hgb 血红蛋白浓度在 50 mmol/L 碱度 (A50) 胁迫后呈现上升趋势, 较淡水组分别高约 1.65 倍和 1.76 倍, 差异显著 ($P < 0.05$) (图 4a、b)。

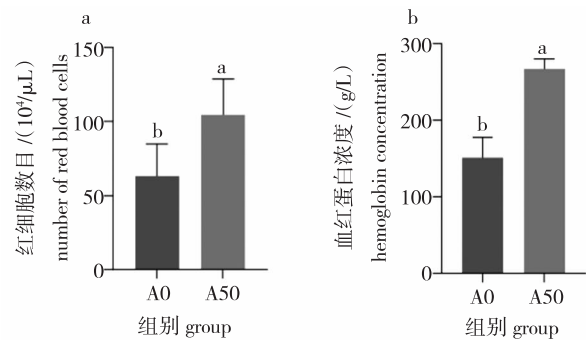


图 4 血液指标测定

Fig. 4 Blood indicators test

3 讨论

HIF1 是重要转录调节因子^[21,22], 是由 HIF1 α 和 HIF1 β 两个亚基构成的异源二聚体。在常氧环境中, HIF1 α 亚基表现出高度不稳定性, 通常在低氧等逆境环境中稳定并激活下游靶基因表达, 参与调控能量代谢、细胞增殖、血管生成、细胞凋亡等多种生理过程, 对维持机体逆境下的稳态至关重要^[23-25]。现有研究已在多种鱼类中证实, 低氧胁迫可显著上调该基因的表达。然而, 关于其在碱度耐受过程中的表达特征与生理作用, 目前尚未得到充分探索。

氨基酸序列比对结果显示, 鲫 HIF1 α 蛋白在结构上与其他鱼类及高等哺乳动物的对应蛋白相似, 均含有保守的 HLH、PAS 和 PAC 基序。这些功能区域的序列在多个物种间表现出高度一致性, 提示 HIF1 α 在进化历程中高度保守, 其功能也得以保留。然而, 对鱼类与哺乳类 HIF1 α 蛋白序列进行深入比较发现, 这些保守功能域之外的区域, 两者相似度显著下降, 存在多个同源性偏低的区段, 这一差异现象在系统发育分析中得到了进一步印证。鱼类 *hif1α* 基因基本形成独立分支, 与人和小鼠相距较远, 说明鱼类 *hif1α* 基因可能具有一些区别于

哺乳类的特殊功能。鲫 HIF1 α 蛋白序列与同属鲤科鱼类的鲤和斑马鱼亲缘关系最近,而与其他类群(如鲈形目、鲑形目及哺乳动物等)分别聚类为不同分支。多鳍鱼目分布于浅湾与沼泽中,因其极耐低氧并演化出的空气呼吸能力而与其他鱼类差异显著^[26],这一关键特征导致其在遗传进化树上与其他鱼类聚类较远。而 *hif1 α* 基因作为细胞感知和应对缺氧的核心分子开关,在这一过程中扮演了不可或缺的角色,确保了多鳍鱼目在艰难环境中的生存和繁衍。该进化关系与传统形态学分类结果高度一致,进一步印证了 *hif1 α* 基因功能的保守性。

鳃是鱼类等水生动物与外界环境接触的第一道防线,在维持碱性环境条件下的生理稳态中发挥关键作用,这在多个物种对碱耐受的研究中得到了印证。例如,脊尾白虾在碱度胁迫期间主要通过鳃调节渗透压平衡以适应环境^[27];王燕^[28]研究发现随碳酸盐碱度胁迫时间增加,尼罗罗非鱼体内 HCO₃⁻ 浓度累积逐渐升高,鳃作为呼吸和排泄器官,会进行相应调节。本研究发现 *hif1 α* 基因在鲫的鳃中高表达,推测 *hif1 α* 基因可能在鳃维持机体生理稳态过程中发挥了关键作用。这一结果与其他水产动物的研究结果一致,即 *hif1 α* 基因在多种水生动物的鳃组织中呈现高表达模式,并在维持机体稳态中起关键作用。李青等^[29]研究表明 *hif1 α* 基因在鲫的鳃中高表达,并在维持机体稳态方面发挥至关重要的作用;在鲶的研究中发现 *hif1 α* 基因在鳃中高表达^[30];Wang 等^[4]在对拟穴青蟹的研究中发现 *hif1 α* 基因在鳃中高表达。因此,在后续实验中将鳃组织确定为碱度胁迫实验的关键靶器官。

HIF1 α 是氧稳态的主要调节器。在常氧条件下,HIF1 α 通过 VHL 依赖的泛素-蛋白酶体通路快速被降解,低氧环境会导致 HIF1 α 蛋白积累,进而激活下游靶基因表达^[31]。但本研究发现,碱度胁迫会导致常氧条件下的 HIF1 α 蛋白积累,即在保证碱度胁迫过程中水体溶解氧充足的条件下,鳃中的 *hif1 α* 基因在胁迫 3 d 时显著升高,这说明碱度胁迫上调了 *hif1 α* 基因的转录表达水平。这一发现与韩青青^[15]在青海湖裸鲤和鲫中的研究结果一致。另外,*hif1 α* 基因的表达随碱度胁迫时间先上升后下降,这说明达里湖鲫在高碱度水体中呈现出“慢性效应”:随着暴露时间的延长,毒性效应从起初的不显著逐渐增强至显著水平^[32]。这与何景鸿^[33]在光唇

鱼幼鱼低氧胁迫研究一致,即 *hif1 α* 基因表达量随低氧胁迫时间增加逐渐升高,说明与低氧胁迫响应模式相似,HIF1 α 蛋白需要一定时长的高碱持续刺激才能充分积累并发挥作用。

碳酸酐酶(CA)是生物体内一种关键酶,在渗透压调节、离子平衡及酸碱稳态等核心生理过程中发挥重要作用^[34,35]。*ca9* 基因是该家族的重要成员之一,响应碱度胁迫,通过上调其表达水平来耐受碱性环境^[36]。*ca9* 基因也是 *hif1 α* 基因的重要靶基因之一,其上游启动子序列含有低氧反应元件(HRE)^[37],HIF1 α 蛋白可以直接与 HRE 结合并激活 *ca9* 基因表达^[38,39]。*ca9* 基因表达水平的变化可以指征 HIF1 α 信号通路的激活情况。在本研究中,*ca9* 基因的表达水平随碱度胁迫时间的增加呈现先上升后下降的趋势,并在第 5 d 时达到峰值,其变化趋势与 *hif1 α* 基因一致,这提示了在碱度环境中 HIF1 α 蛋白累积,并转移到细胞核激活了 *ca9* 基因的表达。综上所述,碱性环境可以导致 *hif1 α* 基因的上调,并激活了 HIF-1 信号通路,但激活 *hif1 α* 基因后是如何调控达里湖鲫碱度耐受的还需要进一步研究。

促红细胞生成素(EPO)是一种糖蛋白复合物^[40],而血管内皮生长因子(VEGF)则在血管内皮细胞的增殖、迁移以及血管重塑等过程中发挥核心作用,通过调控与内皮细胞分裂、增殖和迁移相关基因的表达,促进血管与淋巴管的生成与重构。在低氧条件下,细胞内 HIF1 α 蛋白表达上调,并从细胞质转移至细胞核,在核内与 HIF-1 β 亚基形成异源二聚体 HIF-1。该复合物随后识别并结合至下游靶基因调控区域的缺氧响应元件(HRE),进而激活 *epo* 以及 *veg* 等基因的转录,最终引发一系列细胞适应性反应以应对缺氧环境^[41]。本研究显示,在碱度胁迫下,*epo* 与 *veg* 基因的表达显著上调,这表明在碱性环境中 HIF-1 信号通路被激活,进而调控 *epo* 和 *veg* 基因的转录响应。相应地,在生理表型方面,碱度胁迫也引起红细胞数量(RBC)和血红蛋白浓度(HGB)的升高,进一步证实 HIF-1 信号通路在碱性条件下的激活作用。

在常氧条件下,碱度胁迫仍可显著诱导 *hif1 α* 基因及其下游靶基因 *ca9*、*epo* 和 *veg* 基因的表达上调,另外 *ca9*、*epo* 和 *veg* 基因的表达动态与 *hif1 α* 基因基本一致,但达到峰值的胁迫时间略有延迟,这可能是与 *hif1 α* 基因对靶基因的调控方式有关,

hif1 α 基因转录后需要一定时间积累蛋白,并转移到细胞核与 HRE 结合来启动下游靶基因的表达。该发现突破了 *hif1 α* 基因经典调控机制的认知,即其稳定性主要依赖于低氧条件下脯氨酰羟化酶 (PHD) 活性抑制及蛋白酶体降解途径的减弱,揭示出一条独立于氧分压变化的新型调控方式。基于本研究结果并整合相关文献,推测该非低氧依赖的 *hif1 α* 基因激活机制可能源于以下过程: 在外界水体溶解氧充足的条件下,碱度胁迫下氨氮代谢、离子平衡调节等多种生理过程会产生对高能量代谢的需求,这可能引起细胞内部氧利用障碍或功能性缺氧,进而破坏机体生理稳态,最终触发 *hif1 α* 基因信号通路的激活以介导适应性应激响应。这一非低氧依赖的 *hif1 α* 基因激活机制,不仅是本研究最核心的创新点,也为理解鱼类在非缺氧环境胁迫(如高碱)下的适应策略提供了新的分子视角和理论依据。

综上所述,本研究对达里湖鲫 *hif1 α* 基因进行序列分析,达里湖鲫的 *hif1 α* 包含三个功能结构域,其中,PAS 结构域和 HLH 结构域参与异源二聚体形成,能够结合靶基因的 HRE。组织表达特征分析表明,*hif1 α* 基因在各个组织中均有表达,鳃组织含量最多,脑组织含量次之;*hif1 α* 基因的表达及其靶基因 *ca9*、*epo* 和 *vegf* 的表达随着碱度胁迫时间先上升后下降。本研究不仅解析了达里湖鲫 *hif1 α* 基因的基本分子特征和组织表达模式,更重要的是揭示了其在碱度胁迫响应中的核心调控地位,为深入理解该物种适应达里湖独特高碱环境的分子生理机制奠定了基础。

参 考 文 献

- [1] 韩青青,王华,李鑫,等. 鲤科鱼类 HIF-1 的研究进展[J]. 山西农业科学, 2018, 46(9): 1587-1590.
- [2] 王宪宗,宋晶,杨春娟. 虹鳟 *hif-1 α* 基因家族的拷贝数变异及分歧进化[J]. 河南农业科学, 2021, 50(11): 153-161.
- [3] 张高伟,吴彪,刘志鸿,等. 魁蚶 *HIF-1 α* 基因结构特征及对低氧胁迫的响应[J]. 中国水产科学, 2019, 26(4): 646-656.
- [4] WANG J, XU Z, HE J P. The role of *HIF-1 α* in the energy metabolism and immune responses of hypoxic *Scylla paramamosain* [J]. Aquaculture Reports, 2021, 20: 100740.
- [5] 许蕾,杨光路. HIF-1 与疾病相关性研究进展[J]. 世界最新医学信息文摘, 2019, 19(42): 91-92.
- [6] WHITEHOUSE L M, MANZON R G. Hypoxia alters the expression of *hif-1 α* mRNA and downstream HIF-1 response genes in embryonic and larval lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*) [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 2019, 230: 81-90.
- [7] GUAN F, LU X J, LI C H, et al. Molecular characterization of mudskipper (*Boleophthalmus pectinirostris*) hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) and analysis of its function in monocytes/macrophages [J]. PLoS One, 2017, 12(5): e0177960.
- [8] 李润,王秀利. 鱼类中低氧诱导因子表达及功能的研究进展[J]. 河北渔业, 2022(10): 26-30, 46.
- [9] 孙俊霄,韩广坤,刘娅,等. 杂交黄颡鱼与普通黄颡鱼幼鱼生长性能及耐低氧能力的比较[J]. 水生生物学报, 2019, 43(6): 1271-1279.
- [10] YANG Y, CAO Z D, FU S J. Variations in temperature acclimation effects on glycogen storage, hypoxia tolerance and swimming performance with seasonal acclimatization in juvenile Chinese crucian carp [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 2015, 185: 16-23.
- [11] SHANG X C, XU W, ZHANG Y, et al. Transcriptome analysis revealed the mechanism of *Luciobarbus capito* (*L. capito*) adapting high salinity: antioxidant capacity, heat shock proteins, immunity [J]. Marine Pollution Bulletin, 2023, 192: 115017.
- [12] 王楠,常玉梅,唐然,等. 瓦氏雅罗鱼耐碱性状相关分子标记的筛选[J]. 中国水产科学, 2015, 22(6): 1105-1114.
- [13] SHANG X C, GENG L W, YANG J, et al. Transcriptome analysis reveals the mechanism of alkalinity exposure on spleen oxidative stress, inflammation and immune function of *Luciobarbus capito* [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2021, 225: 112748.
- [14] ZHAO X F, ZHANG Y, LI S Q, et al. HIF1A regulates *Rhbg* expression to enhance ammonia excretion in Amur ide (*Leuciscus walechii*) under extreme alkaline conditions [J]. Biology, 2025, 14(5): 498.
- [15] 韩青青. 低氧诱导因子-1 (HIF-1) 对青海湖裸鲤和鲫鱼碱性环境适应的影响[D]. 金华: 浙江师范大学, 2019.
- [16] 农业农村部渔业渔政管理局, 全国水产技术推广总站, 中国水产学会. 2025 中国渔业统计年鉴[M]. 北京: 中国农业出版社, 2025.
- [17] 常玉梅,梁利群. 耐盐碱鱼类的生理和分子机制研究

- 进展[J].水产学报,2021,45(5):798-812.
- [18] 周伟江,梁利群,常玉梅,等.达里湖鲫对盐度和碱度突变和渐变的耐受性[J].淡水渔业,2013,43(5):14-20.
- [19] 赵雪飞.高碱环境下瓦氏雅罗鱼相关分子及生理适应机制研究[D].哈尔滨:东北林业大学,2023.
- [20] 周佳,刘天奇,孙志鹏,等.鲤 *PPAR γ* 基因序列特征及其与脂肪沉积的相关性[J].水产学杂志,2024,37(2):18-25.
- [21] 孙玲玲.麦穗鱼缺氧诱导因子 -1α 的鉴定与功能分析[D].保定:河北大学,2012.
- [22] 翟万营.牙鲆 IGFBP-1、HIF-1 α 基因的克隆及功能研究[D].上海:上海海洋大学,2012.
- [23] 薛艺佳,白雪,付应,等.低氧胁迫条件下 HIF-1 α 对凡纳滨对虾血淋巴免疫性能的影响[J].热带生物学报,2023,14(6):681-687.
- [24] 吴相春,冯书文.缺氧诱导因子 -1 研究进展[J].河北医科大学学报,2010,31(2):237-240.
- [25] 戴优武.香鱼低氧诱导因子 HIF-1 α 免疫调控机制研究[D].宁波:宁波大学,2022.
- [26] PACE C M, GIBB A C. Sustained periodic terrestrial locomotion in air-breathing fishes[J]. Journal of Fish Biology, 2014, 84(3): 639-660.
- [27] 秦桢.脊尾白虾响应碳酸盐碱度胁迫的多组学分析[D].上海:上海海洋大学,2022.
- [28] 王燕.碳酸盐碱度胁迫下尼罗罗非鱼 HCO_3^- 离子代谢和转运的途径[D].上海:上海海洋大学,2017.
- [29] 李青,葛传龙,欧阳力剑,等.贵州草海鲫鱼 *HIF-1 α* 和 *HIF-2 α* 基因克隆与表达分析[J].江苏农业科学,2022,50(17):31-38.
- [30] GENG X, FENG J B, LIU S K, et al. Transcriptional regulation of hypoxia inducible factors alpha (HIF- α) and their inhibiting factor (FIH-1) of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) under hypoxia[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2014, 169: 38-50.
- [31] 任倩妍,张木子,黎明,等.急性缺氧对大弹涂鱼 (*Boleophthalmus pectinirostris*) 肝脏中缺氧应答相关基因表达、蛋白含量及酶活性的影响[J].海洋与湖沼,2018,47(4):889-896.
- [32] 周伟江,常玉梅,梁利群,等.氯化钠盐度和碳酸氢钠碱度对达里湖鲫毒性影响的初步研究[J].大连海洋大学学报,2013,28(4):340-346.
- [33] 何景鸿.低氧胁迫对光唇鱼幼鱼生理生化以及相关基因表达的影响[D].舟山:浙江海洋大学,2022.
- [34] KOPACEK J, BARATHOVA M, DEQUIEDT F, et al. MAPK pathway contributes to density- and hypoxia-induced expression of the tumor-associated carbonic anhydrase IX[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression, 2005, 1729(1): 41-49.
- [35] 宋宇欣,刘凤钰,林岗.龟足碳酸酐酶(CA)基因家族的鉴定及表达分析[J].福建农业科技,2025,56(1):7-16.
- [36] CHICHE J, ILC K, LAFERRIERE J, et al. Hypoxia-inducible carbonic anhydrase IX and XII promote tumor cell growth by counteracting acidosis through the regulation of the intracellular pH[J]. Cancer Research, 2009, 69(1): 358-368.
- [37] KALUZ S, KALUZOVA M, LIAO S Y, et al. Transcriptional control of the tumor- and hypoxia-marker carbonic anhydrase 9: a one transcription factor (HIF-1) show?[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer, 2009, 1795(2): 162-172.
- [38] KESSLER J, HAHNEL A, WICHMANN H, et al. HIF-1 α inhibition by siRNA or chetomin in human malignant glioma cells: effects on hypoxic radioresistance and monitoring via CA9 expression[J]. BMC Cancer, 2010, 10: 605
- [39] MCDONALD P C, CHAFE S C, BROWN W S, et al. Regulation of pH by carbonic anhydrase 9 mediates survival of pancreatic cancer cells with activated KRAS in response to hypoxia[J]. Gastroenterology, 2019, 157 (3): 823-837.
- [40] 徐畅,丁炜东,曹哲明,等.急性低氧胁迫对翘嘴鲈抗氧化酶、呼吸相关酶活性及相关基因表达的影响[J].南方农业学报,2020,51(3):686-694.
- [41] 汤盈,侯天德,李爱红.缺氧诱导因子 -1 (HIF-1)对促红细胞生成素(EPO)等靶基因表达的影响[J].四川体育科学,2006(3):26-29.