

五种裂腹鱼亚科鱼类外胚层发育不良因子 A 受体基因 *Edar* 的克隆和序列分析

郭新异^{1,2}, 谢玲^{1,2}, 张清泽³, 冀银发¹, 庞礴^{1,2}, 郭松长^{1*}

(1. 中国科学院西北高原生物研究所 中国科学院高原生物适应与进化重点实验室, 中国青海 西宁 810008 ;
2. 中国科学院大学, 中国北京 100049 3. 青海民族大学, 中国青海 西宁 810007)

摘要:裂腹鱼亚科鱼类具有丰富的体表附属器官变异, 而 *Edar* 是控制这类结构发育的关键基因。以 5 种裂腹鱼的代表物种为材料克隆其 *Edar* 基因的编码区片段, 序列分析表明: 该基因编码的蛋白在裂腹鱼中存在长度不同的组氨酸重复序列, 串联组氨酸插入可能与蛋白定位有关; 基因树支持裂腹鱼与金线鲃具有最近的亲缘关系; 分子进化分析未检测到正选择信号, 裂腹鱼 *Edar* 基因的低复杂区可能是受选择区域。以上结果说明裂腹鱼 *Edar* 基因的结构变异可能与裂腹鱼表型变异和演化有关。

关键词:裂腹鱼亚科; 体表附属器官; 基因克隆; 序列分析

中图分类号: Q951

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2015)01-0049-05

Cloning and Sequence Analysis of Ectodysplasin-A Receptor Gene *Edar* in Five Schizothoracine Fishes

GUO Xin-yi^{1,2}, XIE Ling^{1,2}, ZHANG Xu-ze³, JI Yin-fa¹, PANG Bo^{1,2},
GUO Song-chang^{1*}

(1. Key Laboratory of Adaptation and Evolution of Plateau Biota, Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810008, Qinghai, China; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China;
3. Qinghai University for Nationalities, Xining 810007, Qinghai, China)

Abstract: Schizothoracine subfamily fishes are rich in variations of skin appendages. The *Edar* gene plays a vital role in the development of these structures. The coding region segments of *Edar* gene were obtained from five representative Schizothoracine species. Histidine repeats of different lengths were found in the protein sequences of this gene in Schizothoracine. Tandem histidine inserts might account for the localization of the protein. The gene tree showed that Schizothoracine fishes clustered with the golden-line fish. Signals of positive selection were not detected in our molecular evolution analysis, while the low complexity region of this gene might be the target for selection. It is concluded from the above results that the structural mutations in Schizothoracine *Edar* gene might be related to the phenotypic variation and evolution in these species.

Key words: Schizothoracine; skin appendages; gene cloning; sequence analysis

(Life Science Research, 2015, 19(1): 049~053)

脊椎动物体表附属器官的变异一直是进化和发育生物学家关注的问题。早在 1875 年, 达尔文在《动物和植物在家养下的变异》一书中指出, 毛发、羽毛、蹄、角以及牙齿等体表附属器官具有共

同起源, 并描述了一户印度家庭四代人少汗和毛发牙齿等发育缺陷的男性遗传疾病^[1]。这种疾病后来被称为止汗或少汗型外胚层发育不良症(anhidrotic/hypohidrotic ectodermal dysplasia, HED/E-

收稿日期: 2014-05-16; 修回日期: 2014-08-22

基金项目: 中国科学院知识创新工程项目(KSCX2-EW-J-26)

作者简介: 郭新异(1989-), 男, 四川德阳人, 硕士研究生, 主要从事青藏高原裂腹鱼的分子进化研究, E-mail: mqhome@hotmail.com; * 通讯作者 郭松长(1976-), 男, 湖南冷水江人, 博士, 副研究员, 主要从事青藏高原土著动物抗逆分子生物学研究, E-mail: guosong2014@126.com.

DA)。HED 具有两大鲜明特征,一是同时影响多个外胚层发育而来的器官,二是受影响的人群主要为男性^[2]。引起 HED 的基因主要有 4 种^[3]:外胚层发育不良因子 A(Ectodysplasin-A *Eda*)、*Eda* 受体(Ectodysplasin-A receptor *Edar*)、*Eda* 受体相关的死亡结构域(*Edar* associated death domain, *Edaradd*)和 Wnt 基因家族成员中的 *Wnt10a*。研究表明,EDA 信号通路非常保守,上述基因的突变不仅在狗、牛、大鼠、小鼠和人等哺乳动物中造成相似的外胚层发育不良表型,在鸡、斑马鱼和青鳉等其他脊椎动物中也同样影响外胚层衍生的体表附属器官发育^[2,4-7]。

裂腹鱼亚科(Schizothoracine)是鲤形目鲤科鱼类的一个分支,因肛门和臀鳍基部两侧扩大的臀鳞状似腹部有裂缝而得名。该亚科广泛分布于青藏高原及其毗邻地区,包含 11~12 属共 100 多种^[8]。研究表明,在适应高原环境的过程中,裂腹鱼亚科鱼类的形态具有三大演化趋势:体鳞趋于退化、下咽齿行数趋于减少、触须趋于消失^[9]。值得注意的是,裂腹鱼类群中这些发生变异的结构,均为外胚层衍生的附属器官。已经证明,在模式动物斑马鱼和青鳉中,*Edar/Eda* 的突变会影响个体鳞片、鳍条和咽齿等结构的发育,且个体能存活到成体并具有可育性^[6,7,10]。然而这些研究均为人工突变体筛选得到的结果,自然选择是否会通过这些基因来促进物种演化还不得而知。

研究 EDA 信号通路在裂腹鱼亚科鱼类表型变异中的作用,有助于在分子水平理解自然选择下体表附属器官的变异机制以及生物的适应性演化。本研究首次对裂腹鱼亚科鱼类的 *Edar* 基因进行了克隆和序列分析,为揭示 *Edar* 基因在裂腹鱼亚科鱼类表型变异中的作用奠定了基础。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 动物样品的采集

青海湖裸鲤(*Gymnocypris przewalskii*)采集于青海省刚察县泉吉乡。由于青海湖裸鲤为国家二级保护动物,经当地有关部门批准,采用粘网捕获少量个体。异齿弓鱼(*Schizothorax o'connori*)、双须叶须鱼(*Ptychobarbus dipogon*)和尖裸鲤(*Oxygymnocypris stewartii*)购自西藏自治区拉萨市布达拉宫西鱼市。高原裸裂尻鱼(*Schizopygopsis stoliczkae*)采集于西藏自治区日土县,采用粘网捕

获。实验用鱼就地解剖并迅速将组织放入液氮中保存,带回实验室后置于-80℃冰箱保存。

1.1.2 主要试剂

RNAVzol 试剂盒购于北京威格拉斯生物技术有限公司,pGEM-T easy 载体购自 Promega 公司(美国),反转录试剂盒购于 Thermo 公司(美国),PCR 所需 10×Buffer、dNTP 和 Ex Taq 聚合酶购自大连宝生物公司,感受态 DH5 α 购自北京全式金生物公司,DNA 凝胶纯化试剂盒购自上海生工生物工程有限公司,其它生化试剂均为国产分析纯试剂。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 提取与第一链 cDNA 的合成

RNA 提取采用 RNAVzol 试剂盒,参照说明书执行。每个物种选取一个个体,取 100 mg 侧线上方白肌组织置于加入了预冷 RNAVzol 试剂的组织研磨器中,冰上迅速研磨至匀浆,裂解充分后经氯仿抽提、异丙醇沉淀和乙醇洗涤等步骤获得 RNA 沉淀。干燥的 RNA 沉淀以 0.1% DEPC 处理水溶解,利用 Nanodrop 2000 紫外分光光度计测定 OD_{260/280} 值以确定纯度,并通过 1%的琼脂糖凝胶电泳大致判断其完整性。第一链 cDNA 合成利用 Thermo Scientific RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit 进行。

1.2.2 引物设计

从 GenBank 获取人(*Homo sapiens*, NM_0223-36.3)、斑马鱼(*Danio rerio*, NM_001115064.1)、青鳉(*Oryzias latipes*, NM_001104759.1)的 *Edar* mRNA 序列,用 Primer Premier 6 (Premier Biosoft, USA) 软件在其高度保守区内设计引物,并利用 NCBI 的在线工具 Primer-BLAST 在斑马鱼 Refseq mRNA 数据库中检查引物特异性。最终设计的引物序列为 ER-F 5'-ATCGCCATGTCAACCATCTTC-ATC-3'和 ER-R 5'-CGTCTTACCACCGCCTT-ATCA-3'。

1.2.3 cDNA 克隆

以上述 cDNA 为模板,通过 RT-PCR 扩增 5 种裂腹鱼 *Edar* CDS 片段。反应体系为 50 μ L,其中 cDNA (浓度约 200 ng/ μ L)2 μ L,包含 10 \times Buffer 5 μ L,dNTP(浓度为 2.5 μ mol/L)2.5 μ L,上下游引物(浓度为 10 μ mol/L)各 2 μ L,Ex Taq 聚合酶(5 U/ μ L)0.5 μ L,加入 ddH₂O 补足体积。反应条件为:94℃预变性 5 min,94℃变性 40 s,57℃退火 40 s,72℃延伸 50 s,共 38 个循环,最后在 72℃下延伸 10 min。PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶

电泳检测后,通过凝胶回收试剂盒回收目的片段,连接至 pGEM-T easy 载体中,转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,通过氨苄青霉素抗性筛选得到阳性克隆,其中每个平板挑取的克隆数目不少于 3 个。采用含氨苄青霉素的 LB 培养基进行扩大培养后送上海生工生物公司,利用 M13 引物进行双向测序,若发现不同克隆的测序结果不一致,则增加测序的克隆数目。

1.2.4 序列比对与基因树的构建

测序结果通过 BLAST 确定是否为目标序列,同时从 GenBank 下载其他硬骨鱼 *Edar* 基因序列,纳入分析的物种包括:秀美花鲮(*Poecilia formosa*, XM_007557129.1)、三刺鱼(*Gasterosteus aculeatus*, DQ985077.1)、白斑狗鱼(*Esox lucius*, GATF01013030.1)、钳鱼(*Ictalurus punctatus*, JT414449.1)和狭孔金线鲃(*Sinocyclocheilus angustiporus*, GAHO01128845.1)。利用 MEGA5 软件^[11]对序列进行比对和人工处理,并利用 DNAMAN 软件生成氨基酸比对结果。通过 jModelTest 2.1.1 软件^[12]基于赤池信息准则(Akaike information criterion, AIC)选择最佳的核酸替代模型,进而构建最大似然树和贝叶斯树。最大似然树的构建采用 PAUP 4.0b10^[13]及 PaupUp 图形化界面,通过启发式搜索算法进行 1 000 次重复(方式为 random-addition-sequence),Bootstrap 进行 1 000 次重复以获得支持度。贝叶斯树的构建采用 MrBayes 3.2.1 软件^[14],两组重复同时进行,每组 4 条 Metropolis-coupled Markov chains(3 条热链和 1 条冷链),运行 10 000 000 代 Monte Carlo,取样频率为每 1 000 代,舍弃前 50% 样本,进而利用剩下的 5 002 棵样本树生成 50% majority-rule 一致性树。

1.2.5 分子进化分析

采用 PAML 4.7a 软件包^[15]中的 codeml 程序对裂腹鱼 *Edar* 基因进行分支模型、位点模型和分支位点模型分析。因裂腹鱼属(*Schizothorax*)最为

原始,在分析时将裂腹鱼支系和除裂腹鱼属的异齿弓鱼外的其他裂腹鱼支系分别作为前景支,其他物种作为背景支。所有嵌套模型均采用似然比检验法(LRT),利用卡方检验判断两模型间的似然函数对数值($\ln L$)的差异($2\Delta l$)是否显著。

2 结果

2.1 测序结果和序列比对

本实验获得 5 种裂腹鱼的 *Edar* 基因 CDS 片段长度为 585~612 bp,其中青海湖裸鲤的序列最长(612 bp),异齿弓鱼的序列最短(585 bp)。翻译成氨基酸后,本研究获得的序列对应 EDAR 蛋白的跨膜区和死亡结构域之间的区域,与斑马鱼相比,裂腹鱼的序列中具有不同程度的插入缺失(图 1)。此外,该基因在异齿弓鱼、双须叶须鱼和高原裸裂尻鱼分别存在两种单倍型(见表 1,分别编号为 1 和 2)。值得注意的是,与其他几种硬骨鱼相比,裂腹鱼类在该蛋白的一处低复杂区域存在不同长度的组氨酸(His, H)插入,其中异齿弓鱼无插入,双须叶须鱼插入 1 或 3 个,其他裂腹鱼类插入 3~5 个。

2.2 基因树的构建

基于获得的序列联合其他已知的硬骨鱼 *Edar* 序列,进行最大似然方法和贝叶斯方法的基因树构建,结果显示两种方法得到的基因树结构一致(图 2),且节点处的贝叶斯后验概率(bayesian posterior probability, BPP)及基于最大似然法的 bootstrap 值(BP)也较为一致。其中鲤形目的斑马鱼、狭孔金线鲃、裂腹鱼类聚为一支(BPP=91, BP=65),青鲮、秀美花鲮、三刺鱼和白斑狗鱼聚为一支(BPP=100, BP=100),钳鱼单独为一支。这一结果显示裂腹鱼类与金线鲃具有较近的亲缘关系。值得注意的是,裂腹鱼的特化类群形成一个支持度较高的多歧分支(BPP=100, BP=92),而该分支内部的系统发育关系却不能得到解析。

表 1 裂腹鱼种类及克隆测序结果

Table 1 Sampled taxa of Schizothoracine and the corresponding seq-by-clone result

Species	Locality	Number of sequenced clones	Number of haplotypes and respective clones
<i>Gymnocypris przewalskii</i>	Qinghai	4	1 (GCP:4)
<i>Schizothorax o'connori</i>	Tibet	7	2 (STO_1:3, STO_2:4)
<i>Ptychobarbus dipogon</i>	Tibet	11	2 (PBD_1:7, PBD_2:4)
<i>Oxygymnocypris stewartii</i>	Tibet	3	1 (OGS:3)
<i>Schizopygopsis stoliczkae</i>	Tibet	8	2 (SPS_1:5, SPS_2:3)

注:括号里的代号表示序列或单倍型名称,冒号后的数字表示对应的克隆数目。

Notes: Designated codes of the sequences or haplotypes were in parentheses, with the respective number of clones after a colon.

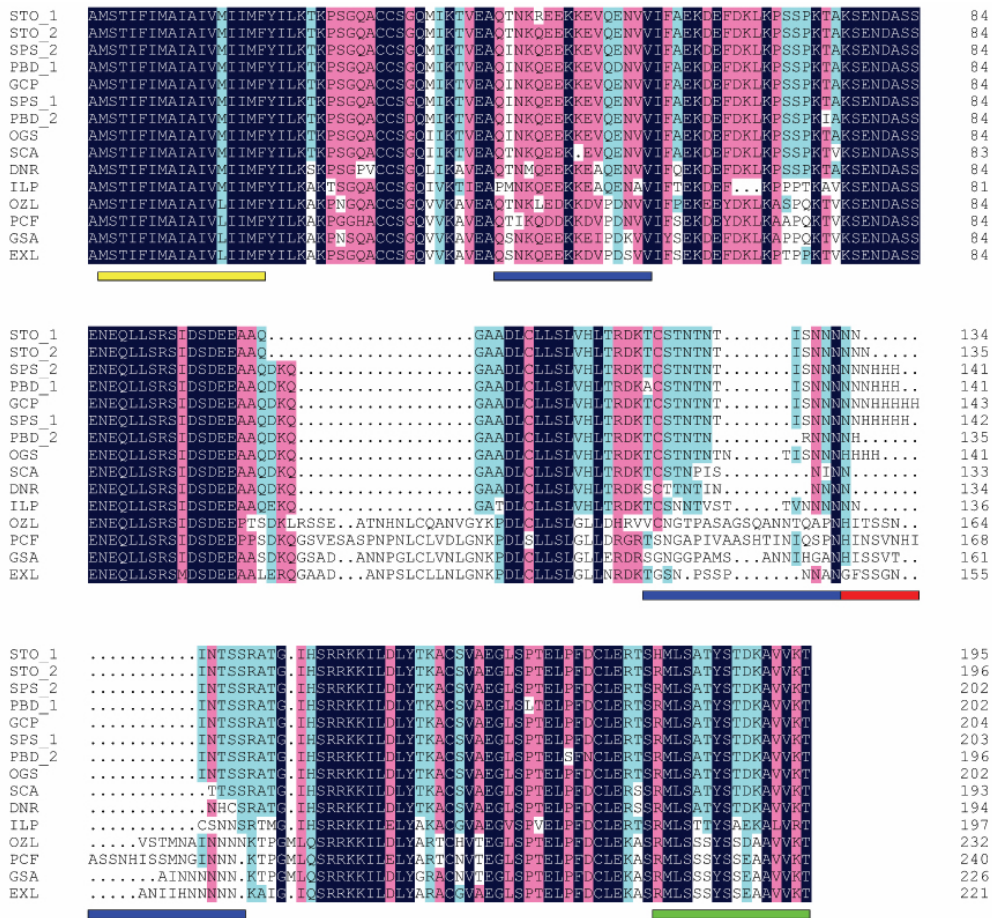


图 1 多物种 *Edar* 基因片段编码的氨基酸序列比对

蓝色条带表示低复杂度区域,黄色条带表示跨膜区,绿色条带表示死亡结构域,红色条带表示组氨酸插入。裂腹鱼物种代号同表 1,其他物种也一并并用三字母代号表示,分别为:SCA(狭孔金线鲃)、DNR(斑马鱼)、ILP(钳鱼)、OZL(青鳉)、PCF(秀美花鳉)、GSA(三刺鱼)和 EXL(白斑狗鱼)。

Fig.1 Amino acid sequence alignment coded by *Edar* gene segments of multi-species

Blue bars indicate the low complexity region, yellow bar indicates the transmembrane region, green bar indicates the death domain, and the red bar indicates the histidine inserts. Designated codes of Schizothoracine can be found to Table 1, and the following three-letter-codes are used to represent other species, specifically, SCA for *Sinocyclocheilus angustiporus*, DNR for *Danio rerio*, ILP for *Ictalurus punctatus*, OZL for *Oryzias latipes*, PCF for *Poecilia formosa*, GSA for *Gasterosteus aculeatus*, and EXL for *Esox lucius*.

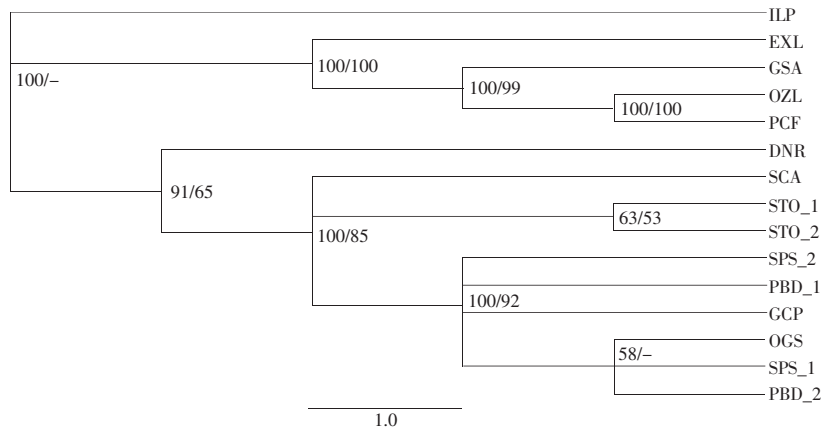


图 2 基于硬骨鱼 *Edar* 基因片段的基因树

节点处的支持度分别表示贝叶斯后验概率和最大似然树的 Bootstrap 值。

Fig.2 Gene tree topology based on *Edar* gene segments of teleosts

Support values at the nodes indicate Bayesian posterior probability and maximum likelihood bootstrap value, respectively.

2.3 分子进化分析

利用 PAML 软件进行的分子进化分析结果见表 2。分支模型分析显示, 不论是否将异齿弓鱼纳入前景支进行分析, 似然比检验的结果均不支持裂腹鱼支系的氨基酸非同义/同义替换比率(d_N/d_S , ω)发生显著变化($P>0.05$)。同时, 分支位点模

型分析的结果也不支持裂腹鱼支系存在正选择位点($P>0.05$)。在位点模型分析中, M3 与 M0 模型比较显示该基因不同位点的氨基酸替换比率在物种间具有异质性($P=0$), 而 M8 和 M7 模型以及 M2 和 M1 模型的 LRT 检验均不支持 *Edar* 基因在硬骨鱼中存在正选择位点($P>0.05$)。

表 2 不同嵌套模型之间的似然比检验

Table 2 Likelihood ratio tests (LRTs) between different nested models

Model	df	2 $\Delta\ln L$	P value
Branch models			
Two ratio vs. M0 (include <i>Schizothorax o'conori</i>)	1	1.355	0.244
Two ratio vs. M0	1	0.946	0.331
Site models			
M3 vs. M0	4	98.346	0
M2a vs. M1a	2	0	1
M8 vs. M7	2	5.502	0.064
Branch-site models			
Model A vs. null (include <i>Schizothorax o'conori</i>)	1	0	1
Model A vs. null	1	0	1

3 讨论

本实验克隆了 5 种裂腹鱼亚科鱼类的 *Edar* 基因 CDS 片段, 并将其编码的氨基酸序列与其他硬骨鱼的该基因氨基酸序列进行了分子进化分析。*Edar* 基因为肿瘤坏死因子受体(tumor necrosis factor receptor, TNFR)超家族的一员, 其编码的 EDAR 蛋白为分泌型的跨膜蛋白, 包含信号肽序列、TNFR 位点、跨膜区、低复杂区域和死亡结构域^[2-16]。研究表明 *Edar* 的 5'UTR 和 3'UTR 区域在不同物种间差异较大, 其信号肽序列的同源性也不高, 且跨膜区两端的低复杂区域也具有较大变异, 说明该基因发挥生物学作用的途径可能具有物种特异性^[16]。本研究发现, 裂腹鱼 EDAR 蛋白的低复杂区域存在不同数目的组氨酸插入。已有研究表明, 蛋白序列中的串联组氨酸插入可能影响分泌型蛋白的靶向部位, 从而改变蛋白的生物学效应^[17]。此外, 裂腹鱼中的组氨酸插入呈现一定的规律性, 即具有不同插入缺失数目的物种正好可以对应曹文宣等^[9]划分的裂腹鱼的 3 个等级。然而, 在青海湖裸鲤和尖裸鲤中我们没有检测到其他单倍型, 这可能是由于测序的克隆数目不够。此外, 利用 *Edar* 片段构建的基因树并不能很好地反映裂腹鱼的进化关系, 这可能是由于该片段为核基因 CDS 片段, 积累的变异较少, 因此无法准确反映较低阶元的物种发生关系。另外, 本试验的分子进化分析并没有提供 *Edar* 基因发生正选择的

证据, 这可能是由于该基因所受自然选择正是发生在上述发生插入事件的低复杂区域, 而 PAML 软件无法对插入缺失的信息进行很好的处理^[15]。

影响生物表型变异与演化的因素有很多, 研究人员基于基因序列上的变化提出了两种假说, 即支持变异与演化由基因调控区域主导的“调控变异”(regulatory mutation)假说和支持由编码区变异主导的“结构变异”(structural mutation)假说^[18]。在本研究中, 裂腹鱼 *Edar* 基因在编码序列中存在结构变异, 即氨基酸序列的变异和插入缺失。鉴于该基因在外胚层衍生的体表附属器官发育中的重要作用, 我们推测这些结构变异与裂腹鱼相应结构的演化存在密切联系, 有必要在今后的工作中对裂腹鱼亚科鱼类 *Edar* 基因的表达调控及该信号通路上的其他基因如 *Eda*、*Edaradd* 等进行研究。

参考文献 (References):

- [1] DARWIN C. The variation of animals and plants under domestication[M]. London: John Murray, 1868.
- [2] SADIÉ A, VIRIOT L, PANTALACCI S, *et al.* The ectodysplasin pathway: from diseases to adaptations[J]. Trends in Genetics, 2014, 30(1): 24–31.
- [3] CLUZEAU C, HADJ-RABIA S, JAMBOU M, *et al.* Only four genes (EDA1, EDAR, EDARADD, and WNT10A) account for 90% of hypohidrotic/anhidrotic ectodermal dysplasia cases[J]. Human Mutation, 2011, 32(1): 70–72.
- [4] KURAMOTO T, YOKOE M, HASHIMOTO R, *et al.* A rat model of hypohidrotic ectodermal dysplasia carries a missense mutation in the *Edaradd* gene[J]. BMC Genetics, 2011, 12(1): 91.
- [5] CUI C Y, KUNISADA M, PIAO Y, *et al.* *Dkk4* and *Eda* regulate distinctive developmental mechanisms for subtypes of mouse hair[J]. PLoS One, 2010, 5(4): e10009.

(下转第 67 页)

- 3297–306.
- [34] KIM K W, HWANG M, MORETTI L, *et al.* Autophagy upregulation by inhibitors of *caspase-3* and *mTOR* enhances radiotherapy in a mouse model of lung cancer[J]. *Autophagy*, 2008, 4(5): 659–668.
- [35] OPIPARI A W, TAN L, BOITANO A E, *et al.* Resveratrol-induced autophagocytosis in ovarian cancer cells[J]. *Cancer Research*, 2004, 64(2): 696–703.
- [36] SCARLATTI F, BAUVY C, VENTRUTI A, *et al.* Ceramide-mediated macroautophagy involves inhibition of protein kinase B and up-regulation of *Beclin 1*[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(18): 18384–18391.
- [37] KIM J Y, CHO T J, WOO B H, *et al.* Curcumin-induced autophagy contributes to the decreased survival of oral cancer cells[J]. *Archives of Oral Biology*, 2012, 57(8): 1018–1025.
- [38] WHITE E. Deconvoluting the context-dependent role for autophagy in cancer[J]. *Nature Reviews Cancer*, 2012, 12(6): 401–410.
- [39] JANKU F, MCCONKEY D J, HONG D S, *et al.* Autophagy as a target for anticancer therapy[J]. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 2011, 8(9): 528–539.
- [40] KUMA A, HATANO M, MATSUI M, *et al.* The role of autophagy during the early neonatal starvation period[J]. *Nature*, 2004, 432(7020): 1032–1036.
- [41] LEE I H, KAWAI Y, FERGUSSON M M, *et al.* *Atg7* modulates *p53* activity to regulate cell cycle and survival during metabolic stress[J]. *Science*, 2012, 336(6078): 225–228.
- [42] LI L, CHEN Y, GIBSON S B. Starvation-induced autophagy is regulated by mitochondrial reactive oxygen species leading to *AMPK* activation[J]. *Cell Signal*, 2013, 25(1): 50–65.
- [43] SUZUKI S W, ONODERA J, OHSUMI Y. Starvation induced cell death in autophagy-defective yeast mutants is caused by mitochondria dysfunction[J]. *PLoS ONE*, 2011, 6(2): e17412.
- [44] LIU L, YANG M, YANG M, *et al.* *HMGB1*-induced autophagy promotes chemotherapy resistance in leukemia cells[J]. *Leukemia*, 2011, 25(1): 23–31.
- [45] LIU L, YANG M, KANG R, *et al.* DAMP-mediated autophagy contributes to drug resistance[J]. *Autophagy*, 2011, 7(1): 112–114.
- [46] LIN Y W, TSAI M S, KUO Y H, *et al.* Down-regulation of *Rad51* expression overcomes drug resistance to gemcitabine in human non-small cell lung cancer cells [J]. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2010, 335(3): 830–840.
- [47] CHEN S, REHMAN S K, ZHANG W, *et al.* Autophagy is a therapeutic target in anticancer drug resistance[J]. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 2010, 1806(2): 220–229.
- [48] LIU D, YANG Y, LIU Q, *et al.* Inhibition of autophagy by 3-MA potentiates cisplatin-induced apoptosis in esophageal squamous cell carcinoma cells[J]. *Medical Oncology*, 2011, 8(1): 105–111.
- [49] LI J, HOU N, FARIED A, *et al.* Inhibition of autophagy by 3-MA enhances the effect of 5-FU-induced apoptosis in colon cancer cells[J]. *Annals of Surgical Oncology*, 2009, 16(3): 761–771.
- [50] CHEN N, DEBNATH J. Autophagy and tumorigenesis[J]. *Febs Letters*, 2010, 584(7): 1427–1435.
- [51] MESCHINI S, CONDELLO M, MARRA M, *et al.* Autophagy-mediated chemosensitizing effect of the plant alkaloid voacamine on multidrug resistant cells[J]. *Toxicology in vitro*, 2007, 21(2): 197–203.

(上接第 53 页)

- [6] HARRIS M P, ROHNER N, SCHWARZ H, *et al.* Zebrafish *eda* and *edar* mutants reveal conserved and ancestral roles of ectodysplasin signaling in vertebrates[J]. *PLoS Genetics*, 2008, 4(10): e1000206.
- [7] KONDO S, KUWAHARA Y, KONDO M, *et al.* The medaka *rs-3* locus required for scale development encodes ectodysplasin-A receptor[J]. *Current Biology*, 2001, 11(15): 1202–1206.
- [8] QI D, CHAO Y, GUO S, *et al.* Convergent, parallel and correlated evolution of trophic morphologies in the subfamily schizothoracinae from the Qinghai-Tibetan plateau[J]. *PLoS One*, 2012, 7(3): e34070.
- [9] CAO W, CHEN Y, WU Y, *et al.* Origin and evolution of schizothoracine fishes in relation to the upheaval of the Xizang Plateau[C]//Tibetan Expedition Team of the Chinese Academy of Science. Studies on the period, amplitude and type of the uplift of the Qinghai-Xizang Plateau. Beijing: Science Press. 1981.118–130.
- [10] HARRIS M P. Comparative genetics of postembryonic development as a means to understand evolutionary change [J]. *Journal of Applied Ichthyology*, 2012, 28(3): 306–315.
- [11] TAMURA K, PETERSON D, PETERSON N, *et al.* MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2011, 28(10): 2731–2739.
- [12] DARRIBA D, TABOADA G L, DOALLO R, *et al.* jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing[J]. *Nature Methods*, 2012, 9(8): 772.
- [13] SWOFFORD D L. PAUP*: phylogenetic analysis using parsimony, version 4.0 b10[Z]. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, 2003.
- [14] RONQUIST F, TESLENKO M, VAN DER MARK P, *et al.* MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space[J]. *Systematic Biology*, 2012, 61(3): 539–542.
- [15] YANG Z. PAML 4: phylogenetic analysis by maximum likelihood[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2007, 24(8): 1586–1591.
- [16] 蒋丽, 王阳阳, 程安达, 等. 鲤鱼(*Cyprinus carpio*)外异蛋白 A 受体 *Edar* 基因的克隆及表达定位[J]. *生物技术通报*(JIANG Li, WANG Yang-yang, CHENG An-da, *et al.* Preliminary study of *Edar* gene cloning and localization of expression in *Cyprinus carpio*[J]. *Biotechnology Bulletin*), 2013, (12): 99–107.
- [17] SALICHS E, LEDDA A, MULARONI L, *et al.* Genome-wide analysis of histidine repeats reveals their role in the localization of human proteins to the nuclear speckles compartment[J]. *PLoS Genetics*, 2009, 5(3): e1000397.
- [18] HOEKSTRA H E, COYNE J A. The locus of evolution: *evo devo* and the genetics of adaptation[J]. *Evolution*, 2007, 61(5): 995–1016.