

高原鼠兔肝中 *Ldh-c* 基因的表达及其对无氧糖酵解水平的影响

魏琳娜 魏 莲 汪 洋 李 筱 许利娜 魏登邦*

青海大学农牧学院 西宁 810016

摘要: 高原鼠兔 (*Ochotona curzoniae*) 对高原低氧环境有很强的适应性。我们研究发现, 精子特异性乳酸脱氢酶 (LDH-C₄) 在高原鼠兔肝组织中表达。为了阐明LDH-C₄对高原鼠兔肝组织无氧糖酵解水平的影响, 将20只高原鼠兔随机分为抑制剂组和空白对照组, 每组10只。抑制剂组注射1 mol/L LDH-C₄ 特异性抑制剂*N*-异丙基草氨酸盐 (*N*-isopropyl oxamate) 于高原鼠兔股二头肌, 双侧各注射500 μ l, 空白对照组注射等剂量的0.9%生理盐水。应用荧光定量PCR和western blot方法, 测定了精子特异性乳酸脱氢酶基因 (*Ldh-c*) 在高原鼠兔肝组织中的表达水平, 应用高压液相色谱法测定了血液中抑制剂的浓度, 用生物化学方法测定了抑制剂组和空白对照组高原鼠兔肝组织中乳酸脱氢酶 (LDH) 比活力以及乳酸 (LD) 和ATP含量。结果表明, 在mRNA和蛋白水平, *Ldh-c*基因在高原鼠兔肝组织中均有表达, mRNA相对表达水平为 0.22 ± 0.04 , 蛋白相对表达水平为 0.97 ± 0.20 ; 当肌肉注射1 mol/L的抑制剂30 min后, 血液中抑制剂浓度为0.08 mmol/L, 肝组织中乳酸脱氢酶比活力抑制剂组和空白对照组分别为 $(4\ 990 \pm 290)$ U/g和 $(7\ 360 \pm 420)$ U/g, 抑制剂组和空白对照组乳酸含量分别为 (0.38 ± 0.05) mmol/g和 (0.53 ± 0.03) mmol/g, 抑制剂组和空白对照组ATP含量分别为 (5.84 ± 0.83) μ mol/g和 (7.78 ± 1.06) μ mol/g, 经单因素方差分析, 抑制剂组的乳酸脱氢酶比活力和乳酸及ATP含量均显著下降 ($P < 0.01$); 抑制剂对乳酸脱氢酶比活力和乳酸及ATP含量的抑制率分别为 $30.19\% \pm 3.90\%$ 、 $32.22\% \pm 8.70\%$ 和 $24.94\% \pm 7.80\%$ 。以上结果说明, *Ldh-c*在高原鼠兔肝组织中表达, LDH-C₄通过催化无氧糖酵解过程, 为其肝组织生命活动提供至少24%的ATP, 这可能使高原鼠兔减小了在低氧环境中对氧气的依赖, 增强了对低氧环境的适应力。

关键词: 高原鼠兔; 肝组织; *Ldh-c* 基因; *N*-异丙基草氨酸盐; 乳酸脱氢酶活力

中图分类号: Q955 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263 (2015) 06-846-09

Expression of the Sperm-specific Lactate Dehydrogenase Gene (*Ldh-c*) in Plateau Pika (*Ochotona curzoniae*) Liver and Its Influence on the Anaerobic Glycolysis

WEI Lin-Na WEI Lian WANG Yang LI Xiao XU Li-Na WEI Deng-Bang*

基金项目 国家自然科学基金项目 (No. 31260512), 青海省自然科学基金项目 (No. 2012-Z-905);

* 通讯作者, E-mail: weidengbang@163.com;

第一作者介绍 魏琳娜, 女, 硕士; 研究方向: 野生动植物资源保护; E-mail: weilinna92@163.com。

收稿日期: 2015-01-20, 修回日期: 2015-05-10 DOI: 10.13859/j.cjz.201506004

College of Agriculture and Animal Husbandry, Qinghai University, Xining 810016, China

Abstract: The plateau pika (*Ochotona curzoniae*) has a strong adaptability to hypoxic plateau environment. We found that the sperm-specific lactate dehydrogenase (LDH-C₄) gene was expressed in plateau pika liver. In order to shed light on the effect of LDH-C₄ on the anaerobic glycolysis in plateau pika liver, 20 pikas were randomly divided into the inhibitor group and the control group, the sample size of each group was 10. The pikas of inhibitor group were injected 1ml 1mol *N*-isopropyl oxamate, a LDH-C₄ specific inhibitor, in biceps femoris muscle of hind legs, each leg 500 μ l, and the control individuals were injected with the same amount of 0.9% saline. The expression level of *Ldh-c* gene in plateau pika liver was determined by real-time PCR and western blot. The concentration of *N*-isopropyl oxamate in blood was determined by high pressure liquid performance (HPLP), and the activities of lactate dehydrogenase (LDH) and the contents of lactate (LD) and ATP in liver were measured by biochemical methods. The results in Fig. 1 indicated that the expression levels of *Ldh-c* mRNA and protein were 0.22 ± 0.04 and 0.97 ± 0.20 , respectively. After 30 min of injection of 1 ml *N*-isopropyl oxamate (1 mol/L) in biceps femoris muscle, the concentration of *N*-isopropyl oxamate in blood was 0.08 mmol/L. In the liver of inhibitor group and control group, the LDH activities were $4\ 990 \pm 290$ U/g and $7\ 360 \pm 420$ U/g, the contents of LD were 0.38 ± 0.05 mmol/g and 0.53 ± 0.03 mmol/g, and ATP contents were 5.84 ± 0.83 μ mol/g and 7.78 ± 1.06 μ mol/g, respectively, as shown in Fig. 2a, 2b and 2c. The data were analyzed statistically by one-way analysis of variance, and the results showed that the LDH activities, the contents of LD and ATP in liver of the inhibitor group were decreased significantly ($P < 0.01$), and the inhibition rate of *N*-isopropyl oxamate to LDH, LD and ATP were $30.19\% \pm 3.90\%$ 、 $32.22\% \pm 8.70\%$ and $24.94\% \pm 7.80\%$, respectively, as shown in Fig. 2d. These results suggest that the sperm-specific lactate dehydrogenase gene is expressed in plateau pika liver, and the liver harvest at least 24% ATP from anaerobic glycolysis for its life activities. As a result, the pika is able to reduce dependence on oxygen and enhance the adaptation to the hypoxic environments.

Key words: Plateau pika (*Ochotona curzoniae*); Liver tissue; *Ldh-c* gene; *N*-isopropyl oxamate; LDH enzymatic activity

青藏高原平均海拔 3 000 m 以上, 其典型的气候特征是低氧、寒冷、干旱和强辐射 (牛亚菲 1999)。低氧对动物的生存、繁殖等生命活动有着深刻影响 (Beall et al. 2001, Hoppeler et al. 2003, 杨静等 2006)。生活在青藏高原高海拔低氧环境中的土著动物, 在长期适应低氧环境的过程中, 形成了一系列与氧的摄取、转运和利用有关的机制, 土著高山动物肺体积增大、肺泡数目多、表面积大、气血屏障薄 (陈秋红 2001, 陈秋红等 2003, 魏登邦等 2006, Wang et al. 2008), 有利于从低氧环境中有效摄取氧; 血液中红细胞数目多、体积小、血红蛋

白含量高 (Wei et al. 2006, 王晓君等 2008), 血红蛋白氧离曲线左移, 有利于在肺部结合氧, 在组织中释放较多的氧 (顾浩平等 1991, 王晓君等 2008); 组织中毛细血管丰富, 缩短了氧气在组织中的弥散距离 (Avivi et al. 1999, Weibel 1999, 郑亚宁等 2011)。高原鼠兔 (*Ochotona curzoniac*) 是青藏高原特有的土著动物, 生活在海拔 3 000 ~ 5 000 m 的高寒草原, 对低氧环境具有很强的适应性 (Kilic et al. 2004, 齐新章等 2008, Wang et al. 2008, Zhu et al. 2009, 朱瑞娟等 2012, Gonzales 2013)。不同物种对低氧环境适应的生理机制有所差异,

高原鼠兔除了具有上述的适应特征外,表现出一些特异的低氧适应特征,其红细胞压积小(Wei et al. 2006),骨骼肌中肌红蛋白含量低,线粒体数目少,主要以无氧糖酵解获能(Zhu et al. 2009, Sun et al. 2013),肝中乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)同工酶以LDH-B₄、LDH-AB₃和LDH-A₂B₂为主,肝中糖异生能力强(Cahn et al. 1962, Sun et al. 2013)。这些生理特征,使高原鼠兔减少了在低氧环境中对氧的依赖程度。近期,我们的研究发现,精子特异性乳酸脱氢酶(sperm-specific lactate dehydrogenase, LDH-C₄)基因不仅在其睾丸和精子中表达,而且在心、肝、肺、肾、肝和骨骼肌等组织中也有表达(Wang et al. 2013)。

精子特异性乳酸脱氢酶是乳酸脱氢酶的一种同工酶(Gupta 2012),催化丙酮酸和乳酸(lactate, LD)之间的转化(Smithies 1959, Everse et al. 1973, Wang et al. 2013)。控制合成乳酸脱氢酶的基因有3个等位基因,即*Ldh-a*、*Ldh-b*和*Ldh-c*,*Ldh-c*控制精子特异性乳酸脱氢酶亚基(LDH-C)的合成(Li 1989, Li et al. 1989),LDH-C与LDH-A和LDH-B不结合,所以精子特异性乳酸脱氢酶在细胞中以同源四聚体(LDH-C₄)的形式存在(Blanco et al. 1963, Gupta 1999)。先前的研究认为,精子特异性乳酸脱氢酶基因(*Ldh-c*)只在鸟类和哺乳类的精子中特异表达(Goldberg 1975),而在体细胞中不表达(Wheat et al. 1977, Goldberg 1985)。LDH-C₄与生殖有关,敲除*Ldh-c*基因的小鼠(*Mus musculus*),其睾丸中精子的产生和数量正常,但精子中ATP含量显著下降,精子运动能力显著下降,导致雄性不育(Odet et al. 2008, 2011)。酶促动力学研究结果表明,LDH-C₄对丙酮酸的亲和力是其对乳酸亲和力的60多倍,且当乳酸浓度高于体内环境中的50倍时,其酶活力不受影响(Hereng et al. 2011),说明LDH-C₄有利于无氧糖酵解进行;当精子线粒体呼吸链上的细胞色素氧化酶活性被抑制时,精子中ATP含量及其运动不受影响,但当精子中

LDH-C₄的活力被抑制时,精子中ATP含量和运动能力显著下降(Duan et al. 2003, Odet et al. 2008, 2011),说明精子运动的ATP主要依赖于LDH-C₄催化的无氧糖酵解反应(Mukai et al. 2004, Krisfalusi et al. 2006, Kim et al. 2007, Nascimento et al. 2008)。因此,我们推测,*Ldh-c*在高原鼠兔肝组织中的表达,有利于组织中无氧糖酵解的进行,从而为其组织细胞的生命活动提供ATP,减小高原鼠兔在低氧环境中对氧气的依赖,增强其对低氧环境的适应能力。

基于以上的理论分析和假设,本文测定了高原鼠兔肝组织中*Ldh-c*基因在mRNA和蛋白水平的表达。应用LDH-C₄特异性抑制剂*N*-isopropyl oxamate(Wong et al. 1997),研究抑制剂对高原鼠兔肝组织中LDH-C₄酶活力及乳酸和ATP含量的影响,进一步探讨高原鼠兔适应低氧的生理机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

高原鼠兔捕捉于青海省海南州贵德县拉鸡山(36°72'N, 101°28'E, 海拔3 900 m)。采样点氧分压为62 kPa,含氧量为182 g/m³。样本量20只,体重150~200 g,随机分为2组,每组10只,雌雄各半。第1组为空白对照组,注射1 ml 0.9%生理盐水于高原鼠兔股二头肌,每侧各注射500 μl;第2组为抑制剂组,注射1 ml 1 mol/L抑制剂*N*-异丙基草氨酸盐(*N*-isopropyl oxamate,由曲阜师范大学尤进茂博士合成并表征)于高原鼠兔股二头肌,每侧各注射500 μl。所有动物捕获后静息40 min,然后分别注射生理盐水和抑制剂,30 min后,动物用5%戊巴比妥钠麻醉,采集血液和肝组织样品,肝组织样品立即液氮保存。用EDTA₂K₂抗凝管从颈部采血2~3 ml,离心10 min(4 000 r/min),分离血浆,4℃保存。所有实验前处理均在采样现场进行。采样过程中所涉及到的处理动物的措施均按照国家《实验动物管理条例(GB14923-2010)》执行。

1.2 *Ldh-c* mRNA 表达水平的测定

Trizol (Invitrogen Life Technologies) 法提取肝组织总 RNA, 核酸蛋白含量检测仪测定 A_{260}/A_{280} 吸光度比值及浓度, 选取 A_{260}/A_{280} 介于 1.8 ~ 2.0 之间且浓度大于或等于 0.40 g/L 的 RNA 样品, 利用 1% 甲醛变性凝胶电泳检测其质量, 取 4 μ g 总 RNA 采用 First Strand cDNA Synthesis kit (Thermo Scientific) 试剂盒制备 cDNA。根据高原鼠兔 *Ldh-a*、*Ldh-b* 和 *Ldh-c* 基因 cDNA 序列, 在 *Ldh-c* 与 *Ldh-a* 和 *Ldh-b* 非同源区设计特异性引物用于荧光定量 RT-PCR。扩增 *Ldh-c* 基因的上游引物序列为 5'-TAT CGA GAA TCT GAT CGC AGA AGA C-3', 下游引物序列为 5'-GGG CAA GTT CAT CAG CCA AAT CC-3', 这对引物特异性扩增高原鼠兔 *Ldh-c*, 扩增片段长度为 130 bp (Wang et al. 2013)。扩增内参 β -actin 基因的上游引物序列为 5'-CTC TTC CAG CCC TCC TTC TT-3', 下游引物序列 5'-AGG TCC TTA CGG ATC TCC AC-3', 扩增片段长度为 98 bp。按照 Premix Ex Taq Version 试剂盒 (TAKARA) 说明配制反应体系进行 PCR 反应, 将产物切胶用 SanPrep 柱式胶回收试剂盒 (生工生物工程股份有限公司) 回收, 回收产物进行 10 倍梯度稀释, 设定 PCR 产物浓度为 1, 分别稀释为 1×10^{-1} 、 1×10^{-2} 、 1×10^{-3} 、 1×10^{-4} 、 1×10^{-5} 、 1×10^{-6} 、 1×10^{-7} 7 个梯度浓度的 DNA, 作为标准品备用。按照 SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II (Perfect Real Time) (TAKARA) 说明配制反应体系: 12.50 μ l SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II, 10 μ mol/L 的 PCR 特异引物 F、R 各 0.50 μ l, 1 μ l cDNA, 加水至总体积 25 μ l。反应条件: 95 $^{\circ}$ C 3 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 40 个循环。实时定量和半定量反应前模板浓度保持一致, 模板浓度均为 4.00 g/L, 每孔上样量为 1 μ l。BIO-RAD connect 软件采集和分析数据。各样品目的基因和内参基因的浓度结果直接由机器生成。每个样品的目的基因浓度与其内参基因浓度之比, 即为此样品目的基因校正后的相对

含量。

1.3 LDHC 蛋白表达水平的测定

取肝组织加入 RIPA 裂解液匀浆 (重量与体积比为 1 : 4), 提取细胞总蛋白, 用 BCA 法测定总蛋白浓度。取 40 μ g 蛋白进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE), 将蛋白电转到 0.22 PVDF 膜上。用 6% 脱脂奶粉稀释液常温封闭 2 h; 与一抗 (抗 LDHC, Sigma 公司抗兔单克隆抗体, 1 : 3 000 稀释; 抗 GADPH, Genetex 公司单克隆抗体, 1 : 4 000 稀释) 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜、洗涤; 采用羊抗兔 IgG (山羊抗兔, Santa Cruz 公司, 1 : 6 000 稀释) 常温孵育 2 h, 洗涤。应用 ECL 荧光试剂盒 (Thermo Scientific) 进行曝光, 用凝胶成像仪 (BIO-RAD, USA) 拍照。以样品 LDHC 蛋白条带的灰度值与内参 GADPH 的灰度值之比表示该样品的相对蛋白表达水平。

1.4 血液中抑制剂浓度的检测

取抑制剂组和空白对照组高原鼠兔的血浆各 250 μ l, 95 $^{\circ}$ C 水浴 15 min 热变性, 加入 250 μ l 10% 胰蛋白酶 (1 : 250, 表示 1 mg 酶有 250 U 的酶活), 充分搅拌混匀, 42 $^{\circ}$ C 水浴孵育 12 h, 再加入等体积 (500 μ l) 10% 三氯乙酸溶液, 震荡使其充分混匀, 10 000 r/min 离心 10 min, 取上清为无蛋白滤液。应用高压液相色谱法通过外标法测定上清中抑制剂的浓度。色谱条件, 固定相为色谱柱 C18 (Platisil ODS 5 μ m, 250 \times 4.6 μ m, Cat: 99503, USA)。流动相: 水 (A) - 甲醇 (B) 梯度洗脱 (0 ~ 40 min, B: 10% ~ 55%)。流速 1 ml/min, 柱温 25 $^{\circ}$ C, 检测波长 230 nm。

上清中抑制剂浓度计算公式 $C_1 \cdot V_1 / A_1 = C_2 \cdot V_2 / A_2$, 式中, C_1 、 V_1 、 A_1 分别表示抑制剂标准品的浓度、进样体积和峰面积, C_2 、 V_2 、 A_2 分别代表上清中抑制剂的浓度、进样体积和峰面积。血液中抑制剂浓度的计算公式 $C = C_2 \cdot N \cdot V$, 式中, N 为无蛋白滤液制作过程中血浆的稀释倍数, V 为高原鼠兔血液中血清体积占血液总体积的百分比, 因为高原鼠兔血液

中红细胞比容为 44% (Wei et al. 2006), 所以 V 为 56%。

1.5 乳酸脱氢酶活力及乳酸和 ATP 含量的测定

乳酸含量及乳酸脱氢酶活力测定: 肝组织用 0.90% 生理盐水冰浴匀浆, 重量与体积之比为 1:9, 4℃ 5 000 r/min 离心 10 min, 取上清液。按照乳酸含量测定试剂盒和乳酸脱氢酶活力测定试剂盒 (南京建成生物技术有限公司) 说明, 采用比色法检测组织中乳酸 (LD) 含量和乳酸脱氢酶 (LDH) 活力。

ATP 含量测定: 采用荧光素-荧光素酶法检测组织中 ATP 含量, 按照 ATP 试剂盒 (江苏碧云天生物技术有限公司) 说明操作。组织采用试剂盒中裂解液冰浴匀浆, 重量与体积比为 1:5, 4℃ 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清。以 ATP 浓度与裂解蛋白液浓度的比值来表示组织中 ATP 的相对含量 ($\mu\text{mol/g}$)。

1.6 抑制剂对乳酸脱氢酶活力及乳酸和 ATP 含量抑制率的计算方法

抑制剂对乳酸脱氢酶活力及乳酸和 ATP 含量的抑制率按下列公式计算, 抑制率 = (空白对照组平均值 - 抑制剂平均值) / 空白对照组平均值。

1.7 数据统计分析

利用 SPSS 22.0 统计软件, 采用 Kolmogoroe-Smirnov 和 Levene 分别检验数据的正态性和方差同质性。数据符合正态分布并具有同质性, 采用单因素方差分析 (One-way ANOVA)。所有结果均以平均值 \pm 标准差 (Mean \pm SD) 形式表示, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 高原鼠兔肝组织中 *Ldh-c* 基因的表达水平

荧光定量 PCR 方法和蛋白免疫印迹实验结果 (图 1), 高原鼠兔肝组织中 *Ldh-c* 基因在 mRNA 和蛋白水平均有表达, 相对表达水平分别为 0.22 ± 0.04 和 0.97 ± 0.20 。

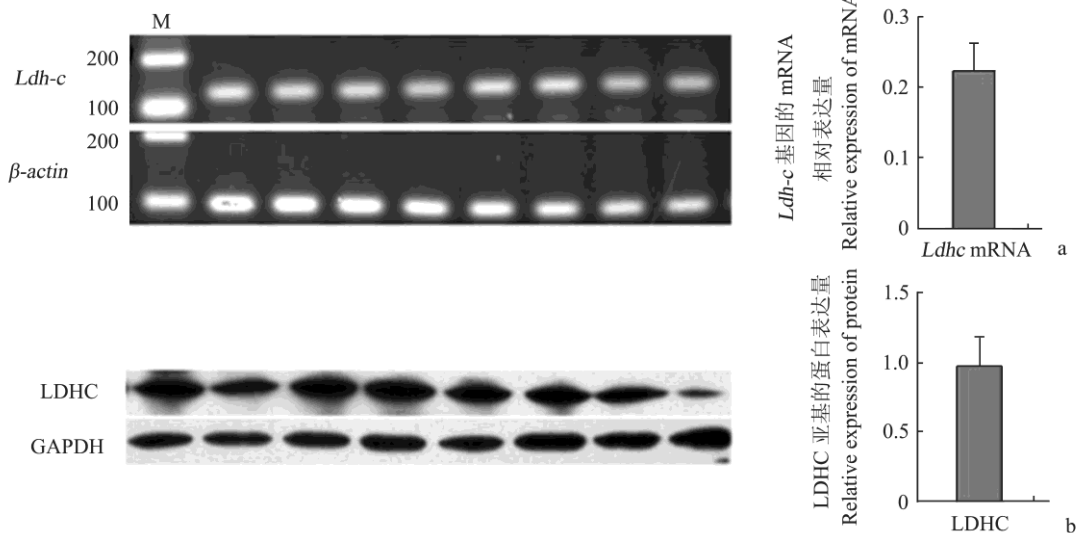


图 1 高原鼠兔肝组织中 *Ldh-c* 基因的表达水平 ($n = 8$)

Fig. 1 The expression level of *Ldh-c* gene in plateau pika liver

a. 高原鼠兔肝组织中 *Ldh-c* 基因 mRNA 水平的表达; b. 高原鼠兔肝组织中 LDHC 蛋白水平的表达。a 和 b 图中左侧电泳图分别表示每个肝组织样本中 *Ldh-c* mRNA 和 LDHC 蛋白亚基表达模式。

a. The expression level of *Ldh-c* mRNA in plateau pika liver; b. The expression level of LDHC protein in plateau pika liver. In Fig. a and b, the electrophoretogram represents the expression models of *Ldh-c* mRNA and LDHC protein in each liver tissue samples.

2.2 高原鼠兔血液中抑制剂浓度

当肌肉注射 1 ml 1 mol/L 抑制剂 30 min 后, 应用高压液相色谱法检测血液中抑制剂浓度为 0.08 mmol/L。

2.3 高原鼠兔肝组织中乳酸含量、乳酸脱氢酶活力和 ATP 含量

抑制剂组高原鼠兔肝组织中乳酸脱氢酶 (LDH) 比活力、乳酸 (LD) 含量和 ATP 含量均极显著下降 ($P < 0.01$, 图 2a ~ c)。抑制剂对高原鼠兔肝组织中 LDH 比活力及 LD 和 ATP 含量的抑制率分别为 $30.19\% \pm 3.90\%$ 、 $32.22\% \pm 8.70\%$ 和 $24.94\% \pm 7.80\%$ (图 2d)。

3 讨论

高原鼠兔肝细胞中线粒体数目多, 表面积大 (朱瑞娟等 2012), 肝组织中乳酸脱氢酶 (LDH) 同工酶以 LDH-B₄、LDH-B₃A 和 LDH-B₂A₂ 为主, LDH-H 亚基含量为 68%, LDH 比活力小 (刘国富等 1985), 说明高原鼠兔肝是有氧代谢水平较高的器官之一。但是, 我们先前及本文研究结果均表明, 高原鼠兔的肝组织中有 *Ldh-c* 基因的表达 (Wang et al. 2013)。比较研究结果表明, *N-isopropyl oxamate* 对乳酸脱氢酶同工酶 LDH-C₄、LDH-A₄ 和 LDH-B₄

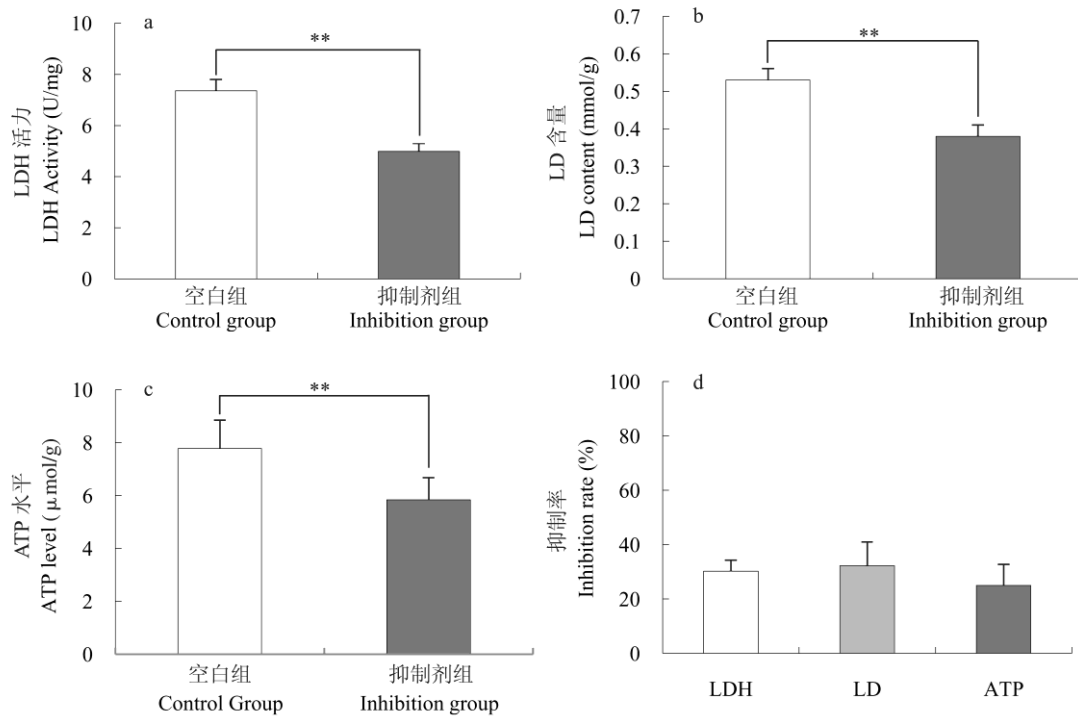


图 2 抑制剂对高原鼠兔肝组织中乳酸脱氢酶比活力及乳酸和 ATP 含量的影响 ($n = 10$)

Fig. 2 Effects of *N-isopropyl oxamate* on the activity of LDH, and the contents of LD and ATP in plateau pika liver ($n = 10$)

a. 抑制剂对高原鼠兔肝组织中乳酸脱氢酶比活力的影响; b. 抑制剂对高原鼠兔肝组织中 LD 含量的影响; c. 抑制剂对高原鼠兔肝组织中 ATP 含量的影响; d. 抑制剂对高原鼠兔肝组织中乳酸脱氢酶 (LDH) 比活力及乳酸 (LD) 和 ATP 含量的抑制率。* $P < 0.01$ 。

a. Effect of *N-isopropyl oxamate* on the activity of LDH in plateau pika liver; b. Effect of *N-isopropyl oxamate* on the content of LD in plateau pika liver; c. Effect of *N-isopropyl oxamate* on the content of ATP in plateau pika liver; d. The inhibition rate of *N-isopropyl oxamate* to LDH, LD and ATP in plateau pika liver. ** $P < 0.01$.

的抑制常数 K_i 值分别为 0.01、0.40 和 0.80 mmol/L (Wong et al. 1997), 说明 *N-isopropyl oxamate* 对 LDH-C₄ 具有较强的抑制作用, 而对 LDH-A₄ 和 LDH-B₄ 的抑制作用较小 (Wong et al. 1997)。在 0.10 mmol/L 浓度时, *N-isopropyl oxamate* 对 LDH-C₄ 的抑制率达到了 70%, 而对 LDH-A₄ 和 LDH-B₄ 没有影响 (Wong et al. 1997)。本文结果表明, 当给高原鼠兔股二头肌注射 1 ml 1 mol/L 的 *N-isopropyl oxamate* 时, 30 min 后血液中 *N-isopropyl oxamate* 浓度为 0.08 mmol/L, 高原鼠兔肝组织中乳酸脱氢酶比活力及乳酸和 ATP 含量显著下降, *N-isopropyl oxamat* 对高原鼠兔肝组织中乳酸脱氢酶比活力及乳酸和 ATP 含量的抑制率分别为 30.19%、32.22% 和 24.94%。而在该浓度抑制剂条件下, 分离纯化得到的高原鼠兔 LDH-A₄ 和 LDH-B₄ 酶活性不会受到抑制, 但对 LDH-C₄ 酶活力抑制率接近 70% 左右 (Wang et al. 2015)。这些结果提示, 注射 1 ml 1 mol/L 的 *N-isopropyl oxamate* 只抑制了高原鼠兔肝组织中约为 70% 的 LDH-C₄ 酶活力, 对 LDH 其他同工酶活力没有影响。

研究表明, 高原鼠兔骨骼肌 LDH 活力血液中乳酸含量明显高于同地区分布的高原鼫鼠 (*Myospalax baileyi*) (刘国富等 1985, Sun et al. 2013), 通过血液循环, 使其肝等其他组织器官中乳酸浓度也明显上升 (Zhu et al. 2009)。丙酮酸转化为乳酸是无氧糖酵解最后一步, 催化这一转化过程的乳酸脱氢酶同工酶主要是 LDH-A₄ 和 LDH-C₄。酶促动力学研究表明, 以丙酮酸为底物时, LDH-C₄ 的 K_m 值为 0.030 mmol, LDH-A₄ 的 K_m 值为 0.170 mmol/L; 以乳酸为底物时, LDH-C₄ 的 K_m 值为 2.00 mmol/L (Wong et al. 1997, Hereng et al. 2011), 高原鼠兔 LDH-C₄ 的 K_m 值为 3.43 mmol (另文发表), 说明 LDH-A₄ 相对于 LDH-C₄ 而言, 对丙酮酸的亲和力较低, 当体内外环境中乳酸浓度较高时, LDH-A₄ 酶活力容易被抑制, 而 LDH-C₄ 酶活力不易被高浓度乳酸抑制, 有利于催化无氧糖酵解反应。虽然, 丙酮酸转化

乳酸不能直接产生 ATP, 但对无氧糖酵解的持续进行和 ATP 的快速产生非常重要 (Hereng et al. 2011)。因此, 我们认为, *Ldh-c* 在高原鼠兔肝中表达, 增强了肝组织在低氧环境中通过无氧糖酵解获得 ATP 的能力。

尽管高原鼠兔肝是以有氧呼吸为主的器官, 但 LDH-C₄ 通过催化肝组织中糖的无氧酵解过程为其生命活动提供部分 ATP, 这可能使高原鼠兔减小了在低氧环境中对氧的依赖, 增强了对低氧环境的适应力。

参 考 文 献

- Avivi A, Resnick M B, Nevo E, et al. 1999. Adaptive hypoxic tolerance in the subterranean mole rat *Spalax ehrenbergi*: the role of vascular endothelial growth factor. *FEBS Letters*, 452(3): 133–140.
- Beall C M, Laskowski D, Strohl K P, et al. 2001. Pulmonary nitric oxide in mountain dwellers. *Nature*, 414(6862): 411–412.
- Blanco A, Zinkham W H. 1963. Lactate dehydrogenases in human testes. *Science*, 139(3555): 601–602.
- Cahn R D, Zwilling E, Kaplan N O, et al. 1962. Nature and development of lactic dehydrogenases: the two major types of this enzyme form molecular hybrids which change in makeup during development. *Science*, 136(3520): 962–969.
- Duan C, Goldberg E. 2003. Inhibition of lactate dehydrogenase C4 (LDH-C4) blocks capacitation of mouse sperm *in vitro*. *Cytogenetic and Genome Research*, 103(3/4): 352–359.
- Everse J, Kaplan N O. 1973. Lactate dehydrogenases: structure and function. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*, 37: 61–133.
- Goldberg E. 1975. Lactate dehydrogenase-X from mouse testes and spermatozoa. *Methods in Enzymology*, 41: 318–323.
- Goldberg E. 1985. Reproductive implications of LDH-C4 and other testis-specific isozymes. *Experimental and Clinical Immunogenetics*, 2(2): 120–124.
- Gonzales G F. 2013. Serum testosterone levels and excessive erythrocytosis during the process of adaptation to high altitudes. *Asian Journal of Andrology*, 15(3): 368–374.
- Gupta G S. 1999. LDHC4: a unique target of mammalian

- spermatozoa. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 34(6): 361–385.
- Gupta G S. 2012. LDH-C4: a target with therapeutic potential for cancer and contraception. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 371(1/2): 115–127.
- Hereng T H, Elgstøen K B P, Cederkvist F H, et al. 2011. Exogenous pyruvate accelerates glycolysis and promotes capacitation in human spermatozoa. *Human Reproduction*, 26(12): 3249–3263.
- Hoppeler H, Vogt M, Weibel E R, et al. 2003. Response of skeletal muscle mitochondria to hypoxia. *Experimental Physiology*, 88(1): 109–119.
- Kilic B A, Dingil O, Erkula G, et al. 2004. Evaluation of the muscles around the knee in rabbits whose anterior cruciate and/or medial collateral ligaments were dissected. *Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery*, 124(9): 626–630.
- Kim Y H, Haidl G, Schaefer M, et al. 2007. Compartmentalization of a unique ADP/ATP carrier protein SFEC (Sperm Flagellar Energy Carrier, AAC4) with glycolytic enzymes in the fibrous sheath of the human sperm flagellar principal piece. *Developmental Biology*, 302(2): 463–476.
- Krisfalusi M, Miki K, Magyar P L, et al. 2006. Multiple glycolytic enzymes are tightly bound to the fibrous sheath of mouse spermatozoa. *Biology of Reproduction*, 75(2): 270–278.
- Li S S. 1989. Lactate dehydrogenase isoenzymes A (muscle), B (heart) and C (testis) of mammals and the genes coding for these enzymes. *Biochemical Society Transactions*, 17(2): 304–307.
- Li S S, O'Brien D A, Hou E W, et al. 1989. Differential activity and synthesis of lactate dehydrogenase isozymes A (muscle), B (heart), and C (testis) in mouse spermatogenic cells. *Biology of Reproduction*, 40(1): 173–180.
- Mukai C, Okuno M. 2004. Glycolysis plays a major role for adenosine triphosphate supplementation in mouse sperm flagellar movement. *Biology of Reproduction*, 71(2): 540–547.
- Nascimento J M, Shi L Z, Tam J, et al. 2008. Comparison of glycolysis and oxidative phosphorylation as energy sources for mammalian sperm motility, using the combination of fluorescence imaging, laser tweezers, and real-time automated tracking and trapping. *Journal of Cellular Physiology*, 217(3): 745–751.
- Odet F, Duan C W, Willis W D, et al. 2008. Expression of the gene for mouse lactate dehydrogenase C (*Ldhc*) is required for male fertility. *Biology of Reproduction*, 79(1): 26–34.
- Odet F, Gabel S A, Williams J, et al. 2011. Lactate dehydrogenase C and energy metabolism in mouse sperm. *Biology of Reproduction*, 85(3): 556–564.
- Smithies O. 1959. Zone electrophoresis in starch gels and its application to studies of serum proteins. *Advances in Protein Chemistry*, 14: 65–113.
- Sun S Z, Wei L, Wei D B, et al. 2013. Differences of glycolysis in skeletal muscle and lactate metabolism in liver between plateau zokor (*Myospalax baileyi*) and plateau pika (*Ochotona curzoniae*). *Acta Physiologica Sinica*, 65(3): 276–284.
- Wang D W, Wei L, Wei D B, et al. 2013. Testis-specific lactate dehydrogenase is expressed in somatic tissues of plateau pikas. *FEBS Open Biotechnology*, 3: 118–123.
- Wang X J, Wei D B, Wei L, et al. 2008. Characteristics of pulmonary acinus structure in the plateau zokor (*Myospalax baileyi*) and plateau pika (*Ochotona curzoniae*). *Acta Zoologica Sinica*, 54(3): 531–539.
- Wang Y, Wei L, Wei D B, et al. 2015. Testis-specific lactate dehydrogenase (LDH-C4) in skeletal muscle enhances a pika's sprint-running capacity in hypoxic environment. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 12(8): 9218–9236.
- Wei D B, Wei L, Zhang J M, et al. 2006. Blood-gas properties of plateau zokor (*Myospalax baileyi*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 145(3): 372–375.
- Weibel E R. 1999. Understanding the limitation of O₂ supply through comparative physiology. *Respiratory Physiology*, 118(2/3): 85–93.
- Wheat T E, Goldberg E. 1977. An allelic variant of the sperm-specific lactate dehydrogenase C4 (LDH-X) isozyme in humans. *Journal of Experimental Zoology*, 202(3): 425–430.
- Wong C, Rodríguez-Pérez L, Noguera B, et al. 1997. Selective inhibition of the sperm-specific lactate dehydrogenase isozyme-C4 by N-isopropyl oxamate. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1343(1): 16–22.

- Zhu S H, Qi X Z, Wang X J, et al. 2009. Difference in oxygen uptake in skeletal muscles between plateau zokor (*Myospalax rufescens baileyi*) and plateau pika (*Ochotona curzoniae*). *Acta Physiologica Sinica*, 61(4): 373–378.
- 陈秋红. 2001. 高原鼠兔肺动脉血管功能及形态变化. *中国应用生理学杂志*, 17(2): 178–181.
- 陈秋红, 刘凤云. 2003. 高原鼠兔低氧适应机制的研究概况. *动物学杂志*, 38(5): 109–113.
- 顾浩平, 杨之, 滕国奇, 等. 1991. 高原鼠兔血红蛋白氧亲和力 P_{50} 的测定. *中国应用生理学杂志*, 7(4): 365–367.
- 刘国富, 温得启, 胡晓梅. 1985. 高原鼠兔和高原鼢鼠乳酸脱氢酶同工酶的初步研究. *兽类学报*, 5(3): 223–228.
- 牛亚菲. 1999. 青藏高原生态环境问题研究. *地理科学进展*, 18(2): 163–171.
- 齐新章, 王晓君, 朱世海, 等. 2008. 高原鼢鼠和高原鼠兔心脏对低氧环境的适应. *生理学报*, 60(3): 348–354.
- 王晓君, 魏登邦, 魏莲, 等. 2008. 高原鼢鼠和高原鼠兔红细胞低氧适应特征. *四川动物*, 27(6): 1100–1103.
- 魏登邦, 张建梅, 魏莲, 等. 2006. 高原鼢鼠对低氧高二氧化碳环境适应的相关血液生理指标的季节变化. *动物学报*, 52(5): 871–877.
- 杨静, 李金刚, 何建平, 等. 2006. 甘肃鼢鼠血象及其与低氧适应的关系. *动物学杂志*, 41(2): 112–115.
- 郑亚宁, 朱瑞娟, 王多伟, 等. 2011. 高原鼢鼠血管内皮生长因子基因编码和 mRNA 的表达以及微血管密度: 与其它鼠类的比较. *生理学报*, 63(2): 155–163.
- 朱瑞娟, 饶鑫峰, 魏登邦, 等. 2012. 高原鼢鼠和高原鼠兔肝苹果酸天冬氨酸穿梭系统的功能差异. *生理学报*, 64(2): 177–186.