

# 藏羚羊与藏绵羊心肌、骨骼肌中肌红蛋白含量和乳酸脱氢酶活性的比较

马兰 杨应忠 靳国恩 格日力\*

青海大学医学院 高原医学研究中心 西宁 810001

**摘要:**为了探讨藏羚羊(*Pantholops hodgsonii*)对低氧环境的适应机制。以生活在同海拔(4 300 m)的藏绵羊(Tibetan Sheep)为对照,用分光光度法测定2种动物心肌、骨骼肌中肌红蛋白(myoglobin, Mb)含量、乳酸(lactic acid, LD)含量及乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)活力。结果显示,藏羚羊心肌和骨骼肌中Mb含量明显高于藏绵羊( $P < 0.05$ ),但心肌和骨骼肌的Mb含量无差别( $P > 0.05$ ),而藏绵羊心肌Mb含量明显高于骨骼肌( $P < 0.05$ );藏羚羊心肌和骨骼肌中LD含量及LDH活力明显低于藏绵羊( $P < 0.05$ ),且2种动物心肌中的LDH活力均明显低于其骨骼肌( $P < 0.01$ )。结果表明,藏羚羊尽管生活在高寒缺氧地区,其心肌和骨骼肌细胞仍然能得到丰富的氧供应,并非处于缺氧状态,这可能是通过增加心肌和骨骼肌中Mb的含量,提高其在低氧环境获取和储存氧的能力,从而提高有氧获能水平。与之相反,藏绵羊尽管也生活在高寒缺氧地区,但其心肌和骨骼肌中Mb含量相对于藏羚羊较低,且LD含量和LDH活力较高,说明其心肌和骨骼肌细胞内氧供不如藏羚羊丰富,提示藏绵羊可能主要以糖酵解获能。我们推测这种差异可能与两种动物不同的运动习性密切相关,且认为藏羚羊较高的Mb含量可能是其适应高原缺氧条件的分子基础之一。

**关键词:**藏羚羊;藏绵羊;肌红蛋白;乳酸;乳酸脱氢酶

中图分类号:Q494 文献标识码:A 文章编号:0250-3263(2012)03-35-05

## Comparison on the Myoglobin Contents and Lactate Dehydrogenase Activity in Cardiac and Skeletal Muscles between Tibetan Antelope and Tibetan Sheep

MA Lan YANG Ying-Zhong JIN Guo-En GE Ri-Li\*

Research Center of High Altitude Medicine, Qinghai University Medical College, Xining 810001, China

**Abstract:** To explore the adaptive mechanism to hypoxia in Tibetan Antelope (*Pantholops hodgsonii*), we compared the contents of myoglobin (Mb), lactic acid (LD) and the activity of lactate dehydrogenase (LDH) in cardiac and skeletal muscles by spectrophotometry in Tibetan Antelope and Tibetan Sheep from the same elevation. The results showed that the contents of Mb in cardiac and skeletal muscles of Tibetan Antelope were significantly higher than in Tibetan Sheep ( $P < 0.05$ ), while no significant difference was observed between

**基金项目** 国家973计划项目(No. 2012CB518200),国家留学人员科技活动项目(青人专字[2009]8号),青海大学中青年科研项目(No. 2008-QY-03);

\* 通讯作者, E-mail: geriligao@hotmail.com;

**第一作者介绍** 马兰,女,讲师;研究方向:高原低氧适应机制;E-mail: judym1-325@163.com。

收稿日期:2011-10-10,修回日期:2012-03-04

cardiac and skeletal muscles in Tibetan Antelope ( $P > 0.05$ ). However, the content of Mb in cardiac was significantly higher than that in skeletal muscle in Tibetan Sheep ( $P < 0.05$ ). The contents of LD and the activity of LDH in cardiac and skeletal muscles of Tibetan Antelope were significantly lower than in Tibetan Sheep ( $P < 0.05$ ), and the activity of LDH in cardiac muscle was significantly lower than that in skeletal muscle in the two groups. The results suggest that Tibetan Antelope could improve its ability to obtain and store oxygen under hypoxia by increasing the contents of Mb in cardiac and skeletal muscles, so that its cardiac and skeletal muscles could be supplied with rich oxygen in hypoxic environment. On the contrary, Tibetan Sheep is also a hypoxia-adapted species; it has less Mb, but higher LD content and LDH activity in cardiac and skeletal muscles, suggesting that it may obtain most energy from aerobic oxidation. Therefore, we speculate the above-mentioned differences might be related to different sports capabilities of two hypoxia-adapted species, and we consider that higher Mb content in Tibetan Antelope might be one of the molecular mechanisms for hypoxia adaptation.

**Key words:** Tibetan Antelope (*Pantholops hodgsonii*); Tibetan Sheep; Myoglobin; Lactic acid; Lactate dehydrogenase

高原低氧适应指世居高原人群或高原土生动物能在高原生存并适应低氧环境所产生的一种非可逆且可遗传的形态结构、生理生化方面的变化过程,是高原土生动物和高原世居人群世代在低氧环境中生存、进化的结果,也是机体克服低氧环境得以生存的有效途径。因此,生活在特殊环境中的人群和动物对低氧适应的机制更是引人关注。国内外学者已对高原土生动物进行了大量的研究。如高原鼠兔(*Ochotona curzoniaca*)<sup>[1-3]</sup>、高原麝鼠(*Myospalax rufescens-baileyi*)<sup>[4-6]</sup>、牦牛(*Bos grunniens*)<sup>[7-10]</sup>等世居于海拔3 000~6 000 m的土生动物都是高原最佳适应动物,这些动物经长期的自然选择,在生理、生化和形态学上已获得适应高原低氧的稳定遗传学特性。表现为无肺动脉高压及右心肥厚,胸廓及肺发育良好,较大的肺活量和较大的肺泡弥散面积及较高的通气储备;血液中低血红蛋白(hemoglobin, Hb)和红细胞压积(hematocrit, Hct)等。肌肉中肌红蛋白(myoglobin, Mb)表达明显增加,有氧代谢增强,无氧代谢明显降低。因此,高原土生动物对低氧适应并不太依赖于器官功能的变化,更多的是通过血液学特点和对细胞代谢的调整等来适应高原低氧环境。然而,由于各自生活及运动习性的不同,又有其各自独特的能量代谢方式及适应机制。

藏羚羊(*Pantholops hodgsonii*)是青藏高原特有的国家 I 级保护野生动物,栖息在海拔4 300~5 500 m的高寒草甸、高寒草原和高寒荒漠等缺氧环境中<sup>[11]</sup>。他们虽然常年生活在高寒缺氧地区,却能以60 km的时速连续奔跑70~100 km,是青藏高原土生动物中最具运动能力和低氧耐受能力的特有珍稀野生物种<sup>[12-13]</sup>。藏绵羊(Tibetan Sheep)长期繁衍生息在青藏高原及其毗邻的四川、云南、甘肃的高寒牧区,一般生活在海拔3 000 m以上,是长期自然选择和人工培育形成的地方品种,属于奔跑速度慢的家畜物种<sup>[12-13]</sup>。低氧作为一种应激因素能对人及动物机体的功能活动产生不利影响,但经过长期进化的高山土生动物藏羚羊和藏绵羊已经形成了各自的低氧适应机制,适应了高原低氧的环境。我们前期对藏羚羊的研究结果发现<sup>[11-16]</sup>,该物种在生理、形态和基因水平上已获得稳定的高原低氧适应性遗传学特征。表现为动脉血氧饱和度高;心肌细胞线粒体丰富,且线粒体中与氧传递相关基因的位点、片段长度和重复序列出现特异性变化; $\alpha$ -珠蛋白发生位点突变等,说明藏羚羊为了能够在低氧环境中生存形成了自己独特的低氧适应机制。然而,基于藏羚羊善于奔跑的特性,且有着极强的运动能力和低氧耐受能力,我们推测其心肌和骨骼肌在低氧适应方面有着独特的能量

代谢机制。因此,本研究以生活在同海拔的高原适应动物藏绵羊为对照,通过测定这 2 种动物心肌和骨骼肌组织中肌红蛋白、乳酸(lactic acid, LD)含量及乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)活性,以期从能量代谢的角度探讨藏羚羊心肌和骨骼肌在低氧适应中的生物学机制。

## 1 材料与方法

**1.1 材料来源** 经国家林业局批准(林护批字[2009]46号)2009年4月在青海省可可西里国家级自然保护区(海拔4300m)捕获雄性藏羚羊4只。同时捕捉雄性藏绵羊5只。捕捉后立即运至格尔木市(海拔2800m)实验基地进行实验。每只动物颈总动脉采血后放血处死,就地解剖,取所需组织迅速投入液氮中,低温保存并运回西宁。

**1.2 仪器及试剂** DU800 核酸蛋白仪(BECKMAN 德国),高速冷冻离心机(BECKMAN 德国),高速组织匀浆机(Micra D-8 德国),乳酸含量测定试剂盒、乳酸脱氢酶活力测定试剂盒均购自南京建成生物工程研究所。

### 1.3 方法

**1.3.1 Mb 含量测定** 取出保存的藏羚羊和藏绵羊的心肌及骨骼肌组织,用冰冷生理盐水充分洗去残血,滤纸吸干。准确称取 0.5 g 组织,剪碎后加入 10 倍体积的缓冲液(3 mmol/L  $MgCl_2$ , 5 mmol/L EDTA, 75 mmol/L Tris, pH 7.2),匀浆后高速离心(4℃, 10 000 r/min, 10 min)。取离心上清液过滤,用紫外可见分光光度计测定。测定时先在 500~600 nm 范围内扫描,从吸收光谱图中可见有 2 个吸收峰,其中功能态 Mb(指此时 Mb 中血红素结合的是  $Fe^{2+}$ )的峰按文献<sup>[17]</sup>应位于 576 nm 附近,测定此处的吸收峰值  $A_{576}$ 。已知 Mb 在 576 nm 处的毫摩消光系数为 12.8,从测定的样本吸收峰值换算出心肌和骨骼肌样本的 Mb 含量,即  $C_{Mb} = (A_{576} \times \text{上清液体积}) / (12.8 \times \text{组织重量}) \mu\text{mol/g}$ 。

**1.3.2 LD 含量的测定** 准确称取藏羚羊和藏绵羊的心肌及骨骼肌组织各 0.5 g,按重量体积

比加入 9 倍的生理盐水制成 10% 的组织匀浆,2 500 r/min,离心 10 min,取上清分别用生理盐水稀释至 1% 和 2%,取 50  $\mu\text{l}$  1% 组织匀浆液用考马斯亮兰法测定蛋白浓度,然后取 20  $\mu\text{l}$  2% 的组织匀浆液按照 LD 含量测定试剂盒(南京建成生物工程研究所)的要求测定 A 值并计算 LD 含量。

**1.3.3 LDH 活力的检测** 将上述 10% 组织匀浆液用生理盐水稀释 100 倍至 0.1%,取 20  $\mu\text{l}$  0.1% 的组织匀浆液,按照 LDH 活力测定试剂盒(南京建成生物工程研究所)的要求测定 A 值并计算酶的活力。

**1.4 统计方法** 统计用 SPSS 13.0 统计软件处理,采用两样本均数的 *t*-test,数据用均数  $\pm$  标准差(Mean  $\pm$  SD)表示。

## 2 结果

### 2.1 藏羚羊、藏绵羊心肌和骨骼肌中 Mb 含量

研究结果显示,藏羚羊心肌和骨骼肌中 Mb 含量明显高于藏绵羊( $P < 0.05$ ),但心肌和骨骼肌的 Mb 含量无差别( $P > 0.05$ ),而藏羚羊心肌 Mb 含量明显高于骨骼肌( $P < 0.05$ )(图 1)。

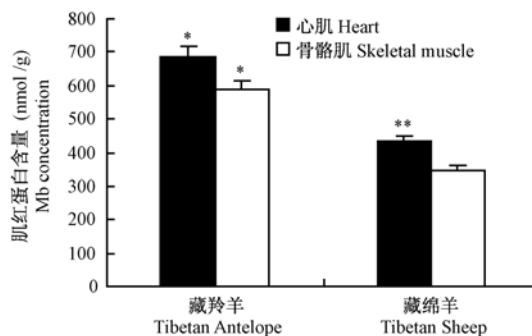


图 1 藏羚羊、藏系绵羊心肌和骨骼肌中肌红蛋白含量的比较

Fig. 1 Comparison of myoglobin (Mb) contents in cardiac and skeletal muscles between Tibetan Antelope and Tibetan Sheep

与藏绵羊相比, \*  $P < 0.05$ ; 与骨骼肌相比, \*\*  $P < 0.05$ 。

\*  $P < 0.05$  vs Tibetan sheep; \*\*  $P < 0.05$  vs Skeletal muscle.

**2.2 藏羚羊、藏绵羊心肌和骨骼肌中 LD 含量、LDH 活力** 研究结果见表 1,藏羚羊心肌和骨骼肌中 LD 含量及 LDH 活力均明显低于

表 1 藏羚羊、藏绵羊心肌和骨骼肌中 LD 含量、LDH 活力的比较

Table 1 Comparison of the LD content and LDH activity in cardiac and skeletal muscles between Tibetan Antelope and Tibetan Sheep

分组 Groups	例数 Numbers	乳酸含量 LD content (mmol/g prot)		乳酸脱氢酶活力 LDH activity (U/mg prot)	
		心肌 Cardiac muscle	骨骼肌 Skeletal muscle	心肌 Cardiac muscle	骨骼肌 Skeletal muscle
		藏羚羊 Tibetan Antelope	4	0.57 ± 0.24 *	0.87 ± 0.38 *
藏绵羊 Tibetan Sheep	5	1.30 ± 0.21	1.50 ± 0.14	6.70 ± 0.95 <sup>△</sup>	32.60 ± 3.92

与藏绵羊相比, \*  $P < 0.05$ ; 与骨骼肌相比,  $\Delta P < 0.05$ 。\*  $P < 0.05$  vs Tibetan Sheep;  $\Delta P < 0.05$  vs skeletal muscle.

藏绵羊, 统计学有显著性差异 ( $P < 0.05$ )。且 2 种动物心肌中 LDH 活力均明显低于其骨骼肌 ( $P < 0.05$ ), 而 LD 含量在 2 种动物的心肌中略低于其骨骼肌中, 但差异不显著 ( $P > 0.05$ )。

### 3 讨论

Mb 是存在于心肌和骨骼肌中具有储氧作用的蛋白质, 在同样的氧分压下结合氧能力是血红蛋白的 6 倍, 它通过可逆性地与氧结合或释放为肌细胞储存或转运氧<sup>[18]</sup>。动物肌肉 Mb 含量会随着基础新陈代谢率、体力活动、潜水时间和耐疲劳能力等的变化而有改变。在潜水的哺乳动物、鸟类以及某些适应地下缺氧和高海拔环境的哺乳动物肌肉中, Mb 含量更高, 这是动物生理适应性的体现<sup>[19-21]</sup>。肌细胞内 Mb 含量的差异从一个侧面反映了肌肉组织的氧供应情况。从而间接地反映了其 LDH 活力的大小。

本研究结果显示, 藏羚羊心肌和骨骼肌中 Mb 含量明显高于藏绵羊。提示藏羚羊生活在高寒缺氧环境中, 而且在如此高海拔地区能够以 60 km 的时速连续奔跑 70 ~ 100 km, 说明其通过增加心肌和骨骼肌中 Mb 的含量, 储存大量氧气来满足其氧耗, 从而维持正常的生理代谢所需要的氧气, 进一步增强其对低氧环境的适应能力。藏羚羊和藏绵羊心肌中 Mb 含量均高于骨骼肌, 说明动物心肌细胞对氧的需求远远高于骨骼肌细胞, 只有得到充足的氧, 心才能维持正常的生理代谢, 从而通过血液流动维持对全身的氧气及能量的供应, 及时清理机体的

代谢产物。这一结果与魏登邦等<sup>[22]</sup>和齐新章等<sup>[23]</sup>对高原土生动物高原鼠兔及高原鼯鼠的研究结果一致。藏绵羊虽然也生活在高海拔地区, 但其心肌和骨骼肌 Mb 含量明显低于藏羚羊的, 说明其心肌和骨骼肌中氧供不如藏羚羊丰富, 提示藏绵羊可能主要以糖酵解获能。

LDH 活性大小从根本上取决于机体细胞内氧分压的高低, 当细胞内氧分压降低时, LDH 的合成加快, 其活性增大, 催化丙酮酸合成 LD; 当细胞内供氧充足时, LDH 活性合成受到抑制。本研究结果显示, 藏羚羊心肌及骨骼肌中的 LD 含量和 LDH 活力显著低于藏绵羊。这可能是因为藏羚羊心肌和骨骼肌中具有较高含量的 Mb, 肌细胞氧供应充足, 这样 LDH 的合成受到抑制, 其活性较低。肌细胞主要通过有氧代谢获取能量以满足机体对氧的需求。相反, 藏绵羊虽然也生活在高海拔缺氧地区, 但是其心肌和骨骼肌 Mb 含量低, 储氧量小, 所以肌细胞氧分压低, 氧供应相对不足, 这样就促进了 LDH 的合成, 其活性增加, 导致肌细胞内 LD 合成增加。提示藏绵羊在低氧环境中只能通过增加无氧代谢来满足组织细胞对能量的需要。以上这些差异可能与这 2 种动物不同的生境及运动习性密切相关。藏羚羊属于野生物种, 生性机警, 为了自然生存的需要, 通常以极快的速度奔跑来避险, 因此, 其肌细胞需要充足的氧供, 主要通过有氧代谢的方式来满足机体对能量的需求。而藏绵羊是长期自然选择和人工培育形成的地方品种, 一般奔跑速度比较慢。

综上所述,藏羚羊和藏绵羊尽管都生活在高寒缺氧地区,都是高原适应动物,但是由于2种动物生境及运动习性不同,其肌肉组织在能量代谢方面形成了各自独特的适应机制。藏羚羊通过增加心肌和骨骼肌中 Mb 的含量,提高其在低氧环境获取和储存氧的能力,从而提高有氧获能水平。而藏绵羊心肌和骨骼肌中 Mb 含量相对于藏羚羊较低,且 LD 含量和 LDH 活力较高,说明其心肌和骨骼肌氧供不如藏羚羊丰富,从而间接提示藏绵羊肌细胞可能主要以糖酵解获能。由此,我们推测藏羚羊较高的 Mb 含量可能是其适应高原缺氧条件的分子基础之一。

### 参 考 文 献

- [ 1 ] Ge R L, Kubo K, Kobayashi T, et al. Blunted hypoxic pulmonary vasoconstrictive response in the rodent *Ochotona curzoniae* (pika) at high altitude. *Am J Physiol: Heart Circ Physiol*, 1998, 274(5): H1792 - H1799.
- [ 2 ] 马兰, 格日力. 高原鼠兔低氧适应分子机制的研究进展. *生理科学进展*, 2007, 38(2): 143 - 146.
- [ 3 ] 陈秋红. 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*, 2001, 17(2): 178 - 181.
- [ 4 ] Widmer H R, Hoppeler H, Nevo E, et al. Working underground: respiratory adaptations in the blind mole rat. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1997, 94(5): 2062 - 2067.
- [ 5 ] 王晓君, 魏登邦, 魏莲, 等. 高原鼯鼠和高原鼠兔红细胞低氧适应特征. *四川动物*, 2008, 27(6): 1100 - 1103.
- [ 6 ] 魏登邦, 张建梅, 魏莲, 等. 高原鼯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*, 2006, 52(5): 871 - 877.
- [ 7 ] Heath D, Williams D, Dickinson J. The pulmonary arteries of the Yak. *Cardio Res*, 1984, 18(3): 133 - 139.
- [ 8 ] Kuang L D, Zheng Y C, Lin Y Q, et al. High-altitude adaptation of Yak based on genetic variants and activity of lactate dehydrogenase-1. *Biochem Genet*, 2010, 48(5/6): 418 - 427.
- [ 9 ] Durmowicz A G, Hofmeister S, Kadyraliev T K, et al. Functional and structural adaptation of the yak pulmonary circulation to residence at high altitude. *J Appl Physiol*, 1993, 74(5): 2276 - 2285.
- [ 10 ] 郑玉才, 苏永杰, 文勇立, 等. 牦牛肌红蛋白的基因克隆测序、分离纯化、含量及其与乳酸脱氢酶和苹果酸脱氢酶活力的关系. *畜牧兽医学报*, 2007, 38(7): 646 - 650.
- [ 11 ] Xu S Q, Yang Y Z, Zhou J, et al. A mitochondrial genome sequence of the Tibetan antelope (*Pantholops hodgsonii*). *Genomics, Proteomics and Bioinformatics*, 2005, 3(1): 5 - 17.
- [ 12 ] 常荣, 杨应忠, 马祁生, 等. 藏羚羊和藏系绵羊左心室收缩功能的比较研究. *中国病理生理杂志*, 2010, 26(8): 1498 - 1502.
- [ 13 ] 张雪峰, 杨应忠, 裴志伟, 等. 藏羚羊和藏系绵羊血液内分泌激素水平的比较研究. *生理学报*, 2011, 63(4): 342 - 346.
- [ 14 ] 刘芳, 乌仁塔娜, 马兰, 等. 藏羚羊低氧诱导因子 1 $\alpha$  基因的克隆与组织表达. *生理学报*, 2011, 63(6): 565 - 573.
- [ 15 ] Yang Y Z, Yunden D, Jin G E, et al. Molecular cloning of hemoglobin alpha-chain gene from *Pantholops hodgsonii*, a hypoxic tolerance species. *Biochem Mol Biol*, 2007, 40(3): 426 - 431.
- [ 16 ] 马兰, 白振忠, 杨应忠, 等. 藏羚羊肌红蛋白(MGB) 基因编码区的克隆与分析. *动物学杂志*, 2007, 42(5): 70 - 75.
- [ 17 ] 陈铭, 杨欣, 周兆年. 心肌肌红蛋白含量的生化测定方法. *中国应用生理学杂志*, 1998, 14(3): 283 - 284.
- [ 18 ] Livingston D J, La Mar G N, Brown W D. Myoglobin diffusion in bovine heart muscle. *Science*, 1983, 220(4592): 71 - 73.
- [ 19 ] 朱世海, 齐新章, 王晓君, 等. 高原鼯鼠和高原鼠兔骨骼肌摄氧功能差异. *生理学报*, 2009, 61(4): 373 - 378.
- [ 20 ] Wright T J, Davis R W. The effect of myoglobin concentration on aerobic dive limit in a weddell seal. *J Exp Biol*, 2006, 209(13): 2576 - 2585.
- [ 21 ] Kanatous S B, Garry D J. Gene deletional strategies reveal novel physiological roles for myoglobin in striated muscle. *Respir Physiol Neurobiol*, 2006, 151(2/3): 151 - 158.
- [ 22 ] 魏登邦, 马建宾. 高原鼯鼠和小白鼠心肌及骨骼肌肌红蛋白含量与乳酸脱氢酶活力的比较研究. *青海大学学报: 自然科学版*, 2001, 19(2): 20 - 21.
- [ 23 ] 齐新章, 王晓君, 朱世海, 等. 高原鼯鼠和高原鼠兔心脏对低氧环境的适应. *生理学报*, 2008, 60(3): 348 - 354.