

不同海拔牦牛骨骼肌中乳酸脱氢酶 三种亚基基因表达的比较

李琳 周娟 秦鸿楠 张勤文*

青海大学农牧学院动物医学系, 三江源生态与高原农牧业国家重点实验室 西宁 810016

摘要: 为了阐明高原低氧对牦牛 (*Bos mutus*) 骨骼肌中乳酸脱氢酶 (LDH) 三种亚基基因 (*LDHA*、*LDHB* 和 *LDHC*) 表达的影响, 本实验分别选取高海拔 (4 200 m)、中海拔 (3 200 m) 和低海拔 (1 900 m) 三个海拔位置养殖的临床健康成年雄性牦牛各 5 头, 采用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 和蛋白质印迹法检测牦牛骨骼肌中 *LDH* 三种亚基基因的 mRNA 表达和蛋白表达水平。结果表明, 随海拔的升高, 牦牛骨骼肌中 *LDHA* mRNA 的表达逐渐下降; *LDHB* mRNA 先降低后升高, 在高海拔组牦牛中表达最高, 相对表达量为 2.82 ± 0.12 , 与低海拔组 (1.01 ± 0.07)、中海拔组 (0.73 ± 0.06) 牦牛 *LDHB* mRNA 表达量差异显著 ($P < 0.05$); *LDHC* mRNA 的表达量随海拔的升高呈下降趋势, 且低海拔组 (1.10 ± 0.16)、中海拔组 (0.86 ± 0.16)、高海拔组 (0.69 ± 0.12) 组间两两相比均差异显著 ($P < 0.05$)。LDHA 和 LDHC 蛋白表达量随海拔的升高呈下降趋势, 且 LDHA 蛋白表达量在低海拔组 (1.00 ± 0.00)、中海拔组 (0.88 ± 0.02)、高海拔组 (0.75 ± 0.02) 组间两两相比均差异显著 ($P < 0.05$), LDHC 蛋白表达量在低海拔组 (1.00 ± 0.00)、中海拔组 (0.89 ± 0.02)、高海拔组 (0.74 ± 0.02) 组间两两相比差异显著 ($P < 0.05$); LDHB 蛋白表达量随海拔的升高先降低再升高, 高海拔组牦牛骨骼肌中 LDHB 蛋白的表达量 (1.37 ± 0.02) 显著高于低海拔组 (1.00 ± 0.00) ($P < 0.05$) 和中海拔组牦牛 (0.95 ± 0.01) ($P < 0.05$)。LDH 是催化丙酮酸和乳酸转化的关键酶, 其含量和活性受到基因的调控。本研究不同海拔间牦牛骨骼肌内 *LDH* 的 mRNA 表达和蛋白表达量均具有差异, 推测高原牦牛骨骼肌为适应不同的氧分压环境, 其丙酮酸和乳酸代谢发生了相应变化, 无氧氧化代谢能力发生了适应性改变。

关键词: 牦牛; 乳酸脱氢酶; 乳酸脱氢酶亚基; 低氧适应

中图分类号: S955 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263 (2023) 02-277-08

Comparison of Gene Expressions of Three Lactate Dehydrogenase Subunits in Skeletal Muscle of Yaks at Different Altitudes

LI Lin ZHOU Juan QIN Hong-Nan ZHANG Qin-Wen*

State Key Laboratory of Sanjiangyuan Ecology and Plateau Agriculture and Animal Husbandry, Department of Veterinary Medicine,

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

基金项目 青海省自然科学基金项目 (No. 2023-ZJ-722);

* 通讯作者, E-mail: 82321200@qq.com;

第一作者介绍 李琳, 女, 硕士研究生; 研究方向: 高原家畜形态学结构特点与高原环境的关系; E-mail: 1479875553@qq.com。

收稿日期: 2022-08-22, 修回日期: 2022-11-21 DOI: 10.13859/j.cjz.202302011

Abstract: [Objectives] In this study, we took Yak (*Bos mutus*) as studying object to illustrate the impact of low oxygen environment on the expression level of the three subunit genes (lactate dehydrogenase A, *LDHA*; lactate dehydrogenase B, *LDHB*; lactate dehydrogenase C, *LDHC*) of lactate dehydrogenase (*LDH*) gene in skeletal muscle. **[Methods]** Adult male Yaks that inhabit in different altitudes, including high altitude (altitude 4 200 m), medium altitude (altitude 3 200 m) and low altitude (altitude 1 900 m) were used in our study. Real-time PCR and western blot were utilized to detect the mRNA and protein content of various skeletal muscle subtypes in Yaks at different altitudes. The experimental data were compared by one-way analysis of variance (ANOVA) using SPSS 23.0. **[Results]** The results showed that *LDHA* mRNA expression decreased in the Yak skeletal muscle with elevation increase (Fig. 2). *LDHB* mRNA expression was first reduced and then increased in the Yak skeletal muscle with increasing elevation, and the expression of *LDHB* mRNA was highest among high-altitude Yaks (2.82 ± 0.12), and the expression of *LDHB* mRNA at high altitude was significantly different from that of low-altitude (1.01 ± 0.07) ($P < 0.05$) and medium-altitude Yaks (0.73 ± 0.06) ($P < 0.05$) (Fig. 2). The expression of *LDHC* mRNA decreased with elevation, and the difference between low altitude (1.10 ± 0.16), medium altitude (0.86 ± 0.16) and high altitude (0.69 ± 0.12) was significant ($P < 0.05$) (Fig. 2). The expression of LDHA and LDHC proteins decreased with the increasing altitude, the expression of LDHA protein was significantly different between low altitude (1.00 ± 0.00), medium altitude (0.88 ± 0.02), and high altitude (0.75 ± 0.02) ($P < 0.05$) (Fig. 3a, b), the expression of LDHC protein was significantly different between low altitude (1.00 ± 0.00), middle altitude (0.89 ± 0.02), and high altitude (0.74 ± 0.02) ($P < 0.05$) (Fig. 3e, f); with an elevation in altitude, the expression of LDHB protein firstly reduced and subsequently returned to normal, and high-altitude Yaks (1.37 ± 0.02) had significantly higher levels of LDHB protein expression in their skeletal muscles than did low-altitude (1.00 ± 0.00) ($P < 0.05$) and medium-altitude Yaks (0.95 ± 0.01) ($P < 0.05$) (Fig. 3c, d). **[Conclusion]** Lactate dehydrogenase is the key enzyme catalyzing conversion of pyruvate and lactate, its content and activity are regulated by genes. The results of this experiment report different mRNA expression and protein content of *LDH* in Yak skeletal muscle at different altitudes, which indicate adaptation of skeletal muscle in plateau-living Yaks to different oxygen partial pressure environments, as well as corresponding changes in pyruvate and lactic acid metabolism in skeletal muscle, and the oxidative metabolism capacity of anaerobic oxidation.

Key words: Yak; Lactate dehydrogenase; Lactate dehydrogenase subunit; Hypoxia adaptation

牦牛 (*Bos mutus*) 在高原低氧环境有良好的运动能力和适应性, 在长期进化过程中其骨骼肌在解剖学、组织学和分子水平已形成对低氧环境的良好适应 (张勤文等 2016)。已有研究表明 (Hoppeler et al. 2001), 氧供应和能量代谢相关酶是机体适应低氧或缺氧的重要因素, 其酶活性水平的改变不仅可以调节糖酵解代谢途径的速率或效率, 还可以调节糖酵解途径的利用程度 (Jurie et al. 2006)。研究表明, 机体暴露在低氧环境下可以改变与低氧调节相

关代谢酶的活性, 无论对于高原世居动物还是高原移居动物, 低氧调节相关代谢酶活性的水平都显得极为重要, 由于这些动物不仅持续承受低分压的氧气, 而且暴露在极低的环境温度下, 需要额外的新陈代谢成本来维持体温 (Baldwin et al. 1973)。骨骼肌保持正常功能与氧气输送密切相关, 是动物整体新陈代谢状态的极佳指示器 (Terrados et al. 1990)。运用免疫组织化学方法可将骨骼肌分为两类: 快肌和慢肌, 其中慢肌含丰富的肌红蛋白, 肌纤维较细,

收缩力小, 但耐力持久, 可保持较长时间的收缩力; 而快肌含较少肌红蛋白, 肌纤维粗大, 收缩力强, 但收缩持续时间较短。骨骼肌快肌以无氧酵解方式供能, 线粒体含量少, 其能量代谢关键酶为乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH)。在无氧呼吸阶段中, LDH 在细胞质基质中将葡萄糖不彻底氧化分解为乳酸, 同时释放出能量, 研究中经常使用乳酸脱氢酶的活性大小来评价生物机体的无氧代谢能力。在高等脊椎动物中, LDH 是由 3 种亚基构成的四聚体。其中, M 亚基, 由 *LDHA* 基因编码, 主要在骨骼肌中大量表达, *LDHA* 主要催化丙酮酸生成乳酸, 伴随着还原态烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (nicotinamide adenine dinucleotide reduced, NADH) 转化成烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (nicotinamide adenine dinucleotide, NAD⁺), *LDHA* 基因转录受到低氧诱导因子的调节, 并且有研究表明 (Maher et al. 2004), *LDHA* 在肿瘤的代谢、发展、侵袭和患者预后中起重要作用; H 亚基, 由 *LDHB* 基因编码, 主要在心肌中表达, *LDHB* 同工酶主要催化将乳酸盐转化为丙酮酸盐的反应, 主要表达于有氧代谢的组织, 被称为是糖酵解途径所生成乳酸的净化剂 (Osis et al. 2021); X 亚基, 由 *LDHC* 基因编码, 主要在睾丸和精子中表达, 其功能可能与精子的能量代谢和获能相关 (Wang et al. 2013)。在肌组织中, LDH 三个亚基按不同组合方式形成 5 种同工酶, 每一种同工酶都具有独特的组织表达性、动力学特征、理化特征和免疫特性。

因此, 为了阐明栖息于不同海拔牦牛骨骼肌有氧、无氧代谢关键酶变化特点, 本研究运用分子生物学方法检测 *LDH* 三种亚基 (A、B、C 亚基) 的 mRNA 和蛋白表达水平, 以阐述不同海拔牦牛骨骼肌中 LDH 不同亚基对高原低氧环境的适应性表达。

1 材料与方法

1.1 动物及处理

选取青海省班玛县成年牦牛 (栖息地海拔 4 200 m, 采样时间为 2021 年 10 月, 以下简称高海拔组), 海晏县成年牦牛 (栖息地海拔 3 200 m, 采样时间为 2020 年 11 月, 以下简称中海拔组)、化隆县成年牦牛 (栖息地海拔 1 900 m, 采样时间为 2021 年 10 月, 以下简称低海拔组), 所有牦牛均为雄性, 年龄均 5 岁左右, 临床健康。另选取化隆县习服黄牛 (*B. taurus*), 栖息地海拔 1 900 m, 采样时间为 2021 年 10 月, 与低海拔组牦牛比较。每个地区实验动物各取 5 头。将实验动物颈部放血处死后采取骨骼肌组织 (股四头肌) 大约 50 g, 置于液氮中保存备用。

1.2 方法

1.2.1 *LDH* 三种亚基的 mRNA 含量的测定
于 GenBank 查询牦牛 *LDHA* (XM_014479751)、*LDHB* (XM_005893232) 和 *LDHC* (XM_014479750) 基因序列, 及 *TUBB* 内参基因 (XM_005906954) 序列, 利用 Oligo7 软件设计特异性引物 (表 1), 由生工生物工程有限公司合成。

表 1 牦牛 *LDHA*、*LDHB* 和 *LDHC* 以及 *TUBB* 基因引物序列

Table 1 Primer sequences of Yak *LDHA*, *LDHB*, *LDHC* and *TUBB* genes

| 基因 Gene | 引物类型 Primer type | 序列 Sequence (5' - 3') | 产物大小 Product size (bp) | 退火温度 Annealing temperature (°C) |
|-------------|------------------|-----------------------|------------------------|---------------------------------|
| <i>LDHA</i> | 正向引物 Forward | GCTCGCTTCCGTTATCTC | 188 | 55 |
| | 反向引物 Reverse | CACGCTTCCACTGTTC | | |
| <i>LDHB</i> | 正向引物 Forward | CTGTAGTGGGTGTTGGAC | 194 | 55 |
| | 反向引物 Reverse | ATGGCAGTGACAGAGTAA | | |
| <i>LDHC</i> | 正向引物 Forward | GTTGTAATCTAGACTCTGCC | 139 | 55 |
| | 反向引物 Reverse | CCAGCAACATTTACTCCAC | | |
| <i>TUBB</i> | 正向引物 Forward | CCCTCGTGCTATCTGGT | 155 | 55 |
| | 反向引物 Reverse | GCTCGCTCCCTCTGTAT | | |

称量 100 mg 骨骼肌组织样品, 在 RNAiso Plus 中充分裂解, 经过氯仿、异丙醇溶液的沉淀得到总 RNA。对 RNA 纯度进行分析, 经核酸蛋白检测仪测定浓度后, 取 $2 \mu\text{g}$ $A_{260}/A_{280} \geq 1.8$ 的 RNA 样品, 使用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性。按照反转录试剂盒 [天根生化科技(北京)有限公司, 货号 KR118] 说明书反转录出 cDNA, 置 -20°C 冰箱保存备用。以合成的 cDNA 为模板, 选择 $2 \times \text{Tap PCR MasterMix II}$ [天根生化科技(北京)有限公司, 货号 KT211] 进行 PCR, 反应完成后使用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测引物特异性及产物大小。

为比较不同海拔 LDH 三个亚基 mRNA 的表达水平, 选择 TB Green Premix Ex Taq II [宝生物工程(大连)有限公司, 货号 RR420Q] 进行 Real Time PCR。实验中内参基因为 *TUBB*, 并且内参基因和目的基因分别设 3 个平行。

1.2.2 蛋白含量的测定 准确称量 1 g 肌肉组织, 研磨, 匀浆后离心提取上清液。利用全蛋白提取试剂盒(江苏凯基生物技术有限公司, 货号 KGP250) 提取骨骼肌组织总蛋白, 并测定蛋白吸光度值, 计算浓度。将蛋白样品与 $4 \times$ 蛋白溶液以 3:1 的比例混合, 然后将其加热到 100°C 5 min。对 $40 \mu\text{g}$ 的骨骼肌变性蛋白进行电泳。在变性蛋白电泳结束后, 再进行膜转移。转膜完成后, 使用转膜液清洗 PVDF 膜, 然后用 5% 的脱脂牛奶封闭 3 h。反应后用 $1 \times$ TBST 清洗, 再将 PVDF 膜与一抗进行孵育, 孵育条件为 4°C , 15 h, 目的蛋白一抗分别为兔抗 LDHA 抗体(货号 NBP1-48336, 浓度 1:15 000)、兔抗 LDHB 抗体(货号 bs-20294R, 浓度 1:1 200) 和兔抗 LDHC 抗体(货号 bs-3827R, 浓度 1:1 500); 内参蛋白一抗鼠抗 Beta tubulin 抗体(货号 bsm-33034M, 浓度 1:1 000)。一抗孵育后用 $1 \times$ TBST 清洗, 再将 PVDF 膜与二抗进行孵育, 孵育条件为 25°C 摇床 90 r/min 2 h, 目的蛋白二抗为山羊抗兔 IgG H&L (HRP) (货号 ab6721, 浓度 1:20 000), 内参二抗为山羊抗小鼠 IgG H&L (HRP) (货号 ab205719, 浓度

1:10 000)。以上抗体均为武汉赛维尔生物科技有限公司产品。最后使用 Immobilon Western Chemilum HRP Substrate (Millipore 公司, 货号 WBKLSO500) 进行曝光。

1.3 数据处理

qRT-PCR 采用相对 $\Delta\Delta\text{Ct}$ 法 ($2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$) 对 *LDHA*、*LDHB* 和 *LDHC* mRNA 在骨骼肌组织中的转录水平进行统计分析。蛋白质印迹法 (western blot) 选用双重除法对样本数据进行计算, 用 AlphaView 软件对曝光后的蛋白条带灰度值进行分析。利用 SPSS 23.0 软件对相关数据进行单因素方差分析, 用“平均值 \pm 标准误” (Mean \pm SE) 来表示实时荧光定量 PCR 和蛋白质印迹的结果。

2 结果

2.1 牦牛骨骼肌中 *LDHA*、*LDHB* 和 *LDHC* 引物特异性验证

通过 PCR 扩增, 目的基因和内参基因均条带单一, 且清晰明亮, 说明引物特异性良好, 所用 4 对引物可以作为 qRT-PCR 的引物(图 1)。

2.2 不同海拔牦牛骨骼肌中 *LDHA*、*LDHB* 和 *LDHC* mRNA 定量

由实时荧光定量实验结果可知, 随海拔的升高, 牦牛骨骼肌中 *LDHA* mRNA 的表达逐渐下降, 但低海拔组(相对表达量 1.02 ± 0.01)、中海拔组(0.81 ± 0.02)、高海拔组(0.58 ± 0.04) 组间差异不显著 ($P > 0.05$), 而低海拔组黄牛骨骼肌中 *LDHA* mRNA 表达量 (2.02 ± 0.22) 显著高于牦牛的低海拔组、中海拔组和高海拔组 ($P < 0.05$); 牦牛骨骼肌中 *LDHB* mRNA 先降低后升高, 在高海拔组牦牛中表达最高 (2.82 ± 0.12), 与低海拔组牦牛 (1.01 ± 0.07) 和中海拔组牦牛 (0.73 ± 0.06) 相比差异显著 ($P < 0.05$), 低海拔黄牛骨骼肌中 *LDHB* mRNA 表达量 (2.61 ± 0.49) 显著高于低海拔组、中海拔组牦牛 ($P < 0.05$), 但与高海拔组牦牛差异不显著 ($P > 0.05$); *LDHC* mRNA 随海拔的升高, 其表达量呈下降趋势, 且低海拔

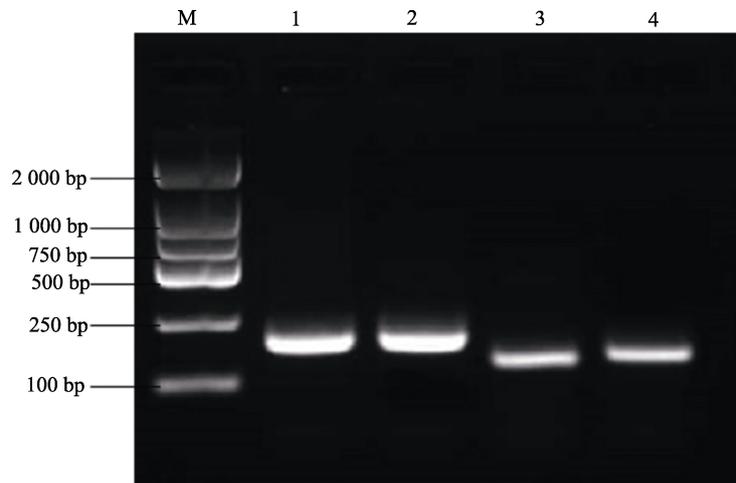


图1 *LDH* 基因荧光定量 PCR 引物进行普通 PCR 扩增结果

Fig. 1 Results of *LDH* gene fluorescence quantitative PCR primers for ordinary PCR amplification

M. DL2000 DNA 分子量标准; 1~4 分别代表 *LDHA*、*LDHB*、*LDHC* 和 *TUBB* 的 PCR 扩增产物。

The amplification band M in the figure represents DL 2000 DNA Marker; 1 - 4 represent PCR amplification products of *LDHA*, *LDHB*, *LDHC* and *TUBB*.

组 (1.10 ± 0.16)、中海拔组 (0.86 ± 0.16)、高海拔组 (0.69 ± 0.12) 组间差异显著 ($P < 0.05$), 低海拔黄牛骨骼肌中 *LDHC* mRNA 表达量 (0.37 ± 0.07) 显著低于低海拔组、中海拔组、高海拔组牦牛 ($P < 0.05$) (图 2)。

2.3 不同海拔牦牛骨骼肌中 *LDHA*、*LDHB*、*LDHC* 蛋白表达

随海拔的升高, 牦牛骨骼肌中 *LDHA* 和 *LDHC* 蛋白表达量呈下降趋势, *LDHA* 蛋白表达量在低海拔组 (1.00 ± 0.00)、中海拔组 (0.88 ± 0.02) 和高海拔组 (0.75 ± 0.02) 三组间差异均显著 ($P < 0.05$), *LDHC* 蛋白表达量在低海拔组 (1.00 ± 0.00)、中海拔组 (0.89 ± 0.02)、高海拔组 (0.74 ± 0.02) 组间同样差异显著 ($P < 0.05$); *LDHB* 蛋白随海拔的升高其表达量先降低再升高, 高海拔组牦牛骨骼肌中 *LDHB* 蛋白的表达量 (1.37 ± 0.02) 显著高于低海拔组 (1.00 ± 0.00) 和中海拔组牦牛 (0.95 ± 0.01) ($P < 0.05$), 在中海拔组牦牛 (0.95 ± 0.01) 骨骼肌中表达最低, 并且中海拔组牦牛与低海拔组牦牛 *LDHB* 蛋白表达量差异不显著 ($P > 0.05$)。低海拔组黄牛骨骼肌中

LDHA 蛋白表达量 (1.22 ± 0.03) 和 *LDHB* 蛋白表达量 (1.13 ± 0.03) 均显著高于低海拔组牦牛 ($P < 0.05$), 但 *LDHC* 的蛋白表达量 (0.91 ± 0.01) 显著低于低海拔组牦牛 (1.00 ± 0.00) ($P < 0.05$) (图 3)。

3 讨论

当受到低氧胁迫或者长期处于低氧环境时, 机体会通过提高无氧代谢能力从而提供能量满足机体需求, *LDH* 是重要的无氧代谢标志酶, 可以催化丙酮酸和乳酸的转化, 其基因表达和活性在一定程度上可以反映机体无氧代谢能力。世居高原的动物通过长时间的进化已经对高原低氧环境产生独特的适应机制, 并形成最优化腺嘌呤核苷三磷酸 (adenosine triphosphate, ATP) 合成的特性。魏莲等 (2009) 对高原鼠兔 (*Ochotona curzoniae*) 和高原鼢鼠 (*Eospalax fontanierii*) *LDH* 低氧适应性研究发现, 二者的心肌 *LDH* 活性显著低于低海拔的大鼠 (*Rattus norvegicus*), 而骨骼肌中大鼠和鼠兔 *LDH* 活性则显著高于鼢鼠, 这些结果说明不同物种 *LDH* 对低氧的适应策略不同, 且呈现明

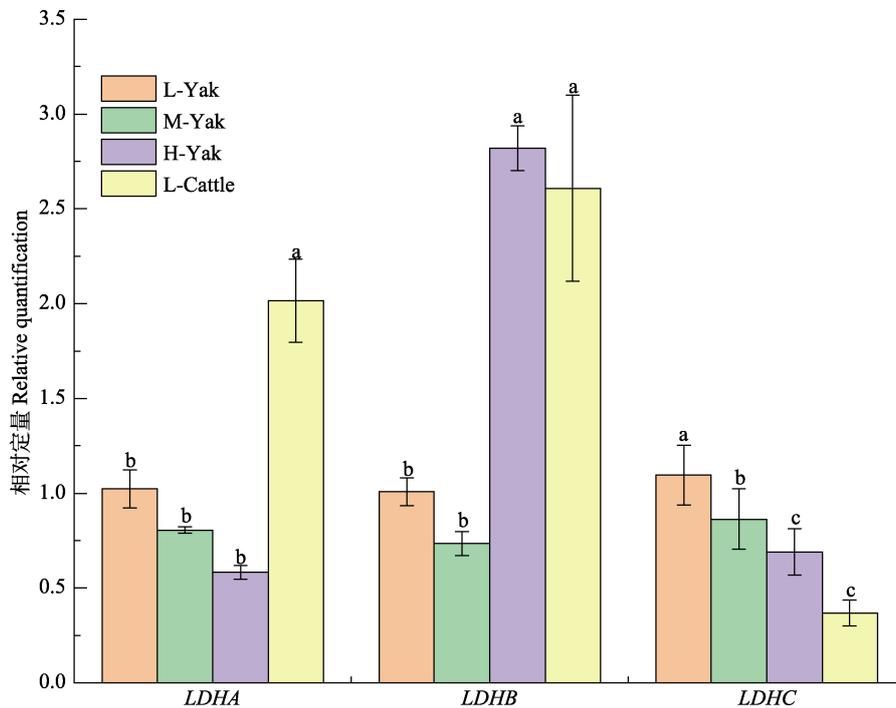


图 2 不同海拔牦牛和低海拔黄牛骨骼肌中 LDHA、LDHB 和 LDHC mRNA 表达量

Fig. 2 Expressions of LDHA, LDHB and LDHC mRNA in skeletal muscle of Yak and Cattle at different altitudes

L-Yak. 低海拔牦牛; M-Yak. 中海拔牦牛; H-Yak. 高海拔牦牛; L-Cattle. 低海拔黄牛。图上标注字母不同代表差异性显著 ($P < 0.05$), 相同字母代表差异性不显著 ($P > 0.05$)。

L-Yak. Yaks of the low-altitude group; M-Yak. Yaks of the medium-altitude group; H-Yak. Yaks of the high-altitude group; L-Cattle. Cattle of the low-altitude group. Different letters above figure represent significant differences ($P < 0.05$), and the same letters represent insignificant differences ($P > 0.05$).

显的组织特异性, 这种特异性可能与动物栖息地的生境相关 (王慧慧 2014)。

丙酮酸和乳酸是骨骼肌中能量代谢的关键代谢底物, LDH 是催化丙酮酸和乳酸转化的酶, 是介导细胞内丙酮酸和乳酸稳态的重要因素。LDH 的含量和活性受到其基因表达的调控, 对牦牛骨骼肌 LDHA、LDHB、LDHC mRNA 研究显示, 随海拔的升高, LDHA 和 LDHC mRNA 的表达量呈下降趋势, 提示环境中氧含量的降低会导致 LDHA 和 LDHC mRNA 的表达下调。LDHB mRNA 表现出先降低后升高的趋势, 即高海拔组牦牛骨骼肌中 LDHB mRNA 显著大于低海拔组和中海拔组牦牛。LDHA、LDHB、LDHC 蛋白表达结果与其基因定量结

果呈现相同趋势, 说明不同海拔牦牛骨骼肌中 LDH 三种亚基 mRNA 和蛋白表达均具有一致性。高原牦牛 LDHA mRNA 和蛋白表达均显著低于平原黄牛, 这说明高原牦牛为适应低氧环境, 提高了骨骼肌无氧代谢能力, 而三个海拔牦牛骨骼肌的 LDHA mRNA 和蛋白表达随着海拔的升高逐渐下降, 这说明随着海拔的升高, 牦牛骨骼肌的无氧代谢能力逐渐下降, 这可能是由于机体为防止骨骼肌组织出现乳酸过度堆积对机体造成损伤, 从而降低了无氧代谢水平。但是, LDHB 在高海拔牦牛骨骼肌中高表达, 并不是呈统一的下降趋势, 而是先降低后升高。有研究表明, LDHA 亚基和 LDHB 亚基表达受组织中氧浓度的影响, 氧浓度越高 LDHA 亚基

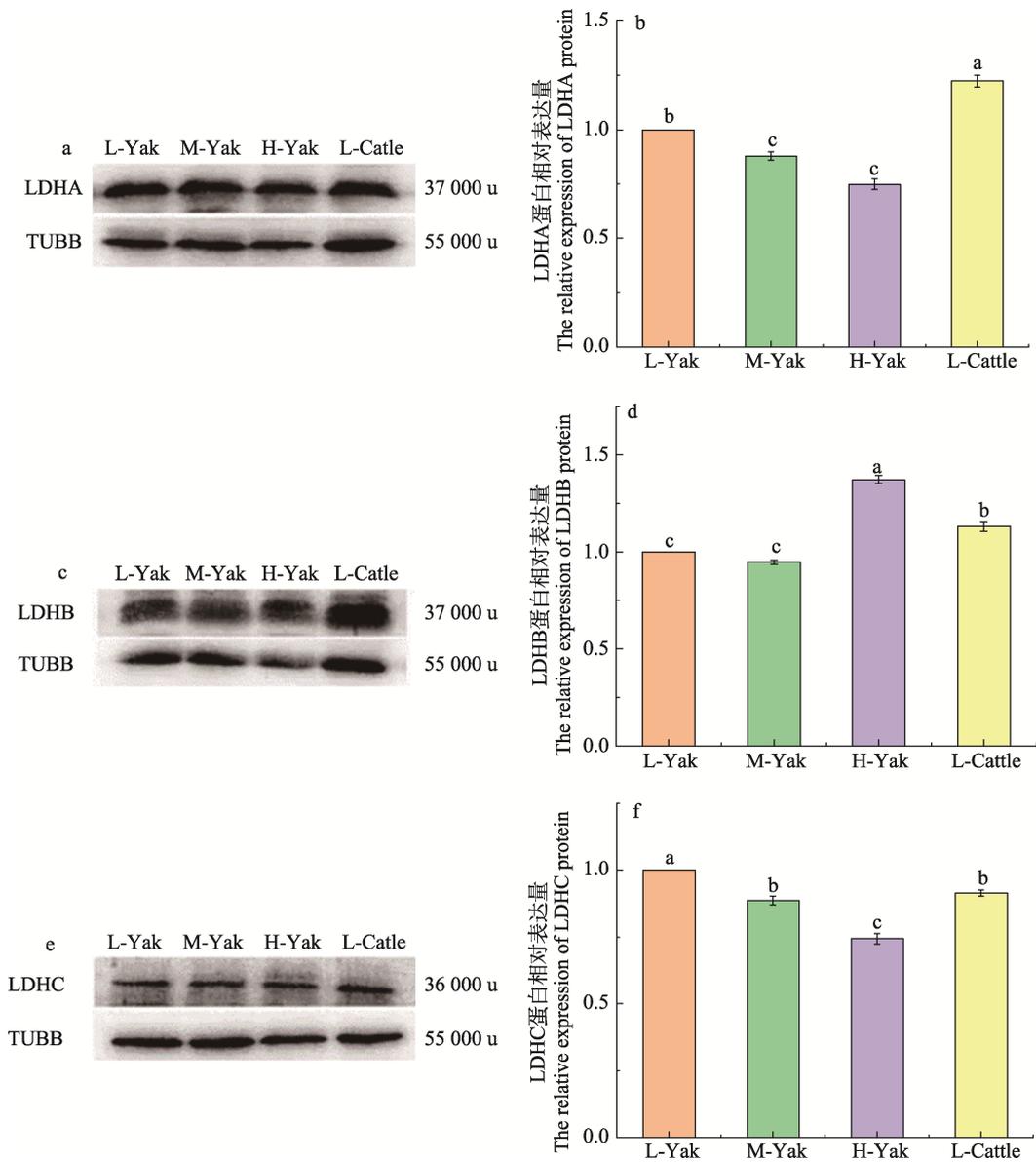


图 3 不同海拔牦牛和低海拔黄牛骨骼肌中 LDHA、LDHB、LDHC 蛋白印迹结果

Fig. 3 Western blot results of LDHA, LDHB and LDHC in skeletal muscle of Yak and Cattle at different altitudes

a. LDHA 蛋白印迹; b. LDHA 蛋白相对表达量; c. LDHB 蛋白印迹; d. LDHB 蛋白相对表达量; e. LDHC 蛋白印迹; f. LDHC 蛋白相对表达量。L-Yak. 低海拔牦牛; M-Yak. 中海拔牦牛; H-Yak. 高海拔牦牛; L-Cattle. 低海拔黄牛。图上标注字母不同代表差异性显著 ($P < 0.05$), 相同字母代表差异性不显著 ($P > 0.05$)。

a. Western blot of LDHA; b. Relative expression of LDHA; c. Western blot of LDHB; d. Relative expression of LDHB; e. Western blot of LDHC; f. Relative expression of LDHC. L-Yak. Yaks of the low-altitude group; M-Yak. Yaks of the medium-altitude group; H-Yak. Yaks of the high-altitude group; L-Cattle. Cattle of the low-altitude group. Different letters above figure represent significant differences ($P < 0.05$), and the same letters represent insignificant differences ($P > 0.05$).

含量越高, LDHB 亚基含量越少, 低氧会限制 LDHB 基因的表达 (Frankel 1983, Rossignol et al. 2003)。刘友清等 (1995) 对 LDH 同工酶谱分析后发现, 在胚胎时期骨骼肌中主要以 LDHB 亚基组成的同工酶为主, 而成体后主要以 LDHA 亚基组成的同工酶为主。Liang 等 (2016) 报道, 过表达 LDHB 的肌肉具有增强的线粒体酶活性和增加的线粒体基因表达, 线粒体呼吸能力增加, 乳酸产生减少。因此, 我们推测当机体细胞内氧气降低到某一临界值, 牦牛骨骼肌会出现一定程度的适应性变化, 通过促进有利的肌肉代谢重编程, 如线粒体 ATP 产生、肌肉收缩能力等来有效提高肌肉适应性, 导致高海拔牦牛骨骼肌 *LDHB* mRNA 和蛋白表达明显高于低、中海拔牦牛。此外, 黄兴等 (2018) 的研究发现, 栖息于海拔 4 500 m 的类乌齐牦牛 (*B. grunniens*) 肺中 *LDHB* mRNA 的表达水平显著高于其他组织, 研究者认为类乌齐牦牛肺组织为适应低氧环境发生适应性改变, 也从另一方面证实了 *LDHB* 是牦牛抗低氧性状的相关基因。这些结果表明, *LDHB* 是由低氧诱导的, 并与牦牛骨骼肌代谢参数有关。Wang 等 (2013) 研究表明, *LDHC* 在高原鼠兔睾丸以外的组织表达, 并猜测这可能与高原鼠兔的低氧适应性相关。这与本实验结果一致, 随着海拔的升高, *LDHC* 表达逐渐下降, 牦牛骨骼肌通过调节 *LDHC* 的表达, 提高对缺氧环境的适应能力。

综上所述, 随海拔增加, *LDHA* 和 *LDHC* mRNA 和蛋白在牦牛骨骼肌中的表达逐渐下降, 而 *LDHB* mRNA 和蛋白在高海拔牦牛中表达最高, 推测与牦牛骨骼肌低氧适应性有关。

参 考 文 献

- Baldwin K M, Winder W W, Terjung R L, et al. 1973. Glycolytic enzymes in different types of skeletal muscle: Adaptation to exercise. *American Journal of Physiology*, 225(4): 962–966.
- Frankel J S. 1983. Lactate dehydrogenase tissue specificity and characterization in the teleost genus *Barbus*. *Comparative Biochemistry & Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 76(1): 103–105.
- Hoppeler H, Vogt M. 2001. Muscle tissue adaptations to hypoxia. *Journal of Experimental Biology*, 204(18): 3133–3139.
- Jurie C, Ortigues-Marty I, Picard B, et al. 2006. The separate effects of the nature of diet and grazing mobility on metabolic potential of muscles from Charolais Steers. *Livestock Science*, 104(1): 182–192.
- Liang X, Liu L, Fu T, et al. 2016. Exercise inducible lactate dehydrogenase b regulates mitochondrial function in skeletal muscle. *The Journal of Biological Chemistry*, 291(49): 25306–25318.
- Maher J C, Krishan A, Lampidis T J. 2004. Greater cell cycle inhibition and cytotoxicity induced by 2-deoxy-D-glucose in tumor cells treated under hypoxic vs aerobic conditions. *Cancer Chemotherapy Pharmacology*, 53(2): 116–22.
- Osis G, Traylor A M, Black L M, et al. 2021. Expression of lactate dehydrogenase A and B isoforms in the mouse kidney. *American Journal of Physiology Renal Physiology*, 320(5): 706–718.
- Rossignol F, Solares M, Balanza E, et al. 2003. Expression of lactate dehydrogenase A and B genes in different tissues of rats adapted to chronic hypobaric hypoxia. *Journal of Cellular Biochemistry*, 89(1): 67–79.
- Terrados N, Jansson E, Sylven C, et al. 1990. Is hypoxia a stimulus for synthesis of oxidative enzymes and myoglobin? *Journal Applied Physiology*, 68(6): 2369–2372.
- Wang D, Wei L, Wei D, et al. 2013. Testis-specific lactate dehydrogenase is expressed in somatic tissues of plateau pikas. *FEBS Open Bio*, 3: 118–123.
- 黄兴, 柴志欣, 王会, 等. 2018. 类乌齐牦牛乳酸脱氢酶基因克隆及组织表达. *西北农业学报*, 27(10): 1405–1415.
- 刘友清, 刘晓晴. 1995. 鲁西黄牛同工酶的研究. *内蒙古农牧学院学报*, 16(4): 29–32.
- 魏莲, 魏登邦, 王晓君, 等. 2009. 高原鼯鼠、鼠兔及大鼠心肌和骨骼肌乳酸脱氢酶活力及同工酶谱. *四川动物*, 28(1): 64–68.
- 王慧慧. 2014. 红尾沙蜥乳酸脱氢酶对高原低氧环境的适应. 兰州: 兰州大学硕士学位论文, 6–8.
- 张勤文, 李莉, 俞红贤, 等. 2016. 大通牦牛骨骼肌低氧适应的组织学特点. *中国兽医学报*, 36(1): 175–178, 184.