

腹腔注射腺病毒 pMultiRNAi-Ldhc 对高原鼠兔骨骼肌 *Ldhc* 基因的沉默效果

王志洁^① 汪洋^② 安志芳^② 魏琳娜^③ 魏莲^① 魏登邦^{①②*}

① 青海大学生态环境工程学院 西宁 810016; ② 青海大学医学院 西宁 810016; ③ 青海大学农牧学院 西宁 810016

摘要: 腹腔注射是一种简单且方便给药的方式, 为了验证腹腔注射腺病毒 pMultiRNAi-Ldhc 对高原鼠兔 (*Ochotona curzoniaca*) 骨骼肌 *Ldhc* 基因沉默的可行性, 将 27 只高原鼠兔分为干扰组、空壳组和空白对照组, 每组各 9 只个体, 干扰组和空壳组分别注射 0.65 ml 腺病毒 pMultiRNAi-Ldhc 和腺病毒 pMultiRNAi-NS, 空白对照组注射等量生理盐水, 注射后 7 d 检测骨骼肌中 *Ldhc* 基因 mRNA 和蛋白的表达水平, 测定了乳酸脱氢酶 (LDH) 活性和乳酸 (LD) 及三磷酸腺苷 (ATP) 的含量。结果表明, 与空白对照组相比, 干扰组在 mRNA 和蛋白水平上, *Ldhc* 基因表达分别降低了 41.73% 和 15.76%; 乳酸脱氢酶 (LDH) 活性、乳酸 (LD) 和 ATP 含量分别降低了 23.98%、51.08% 和 19.29%。结果说明, 腹腔注射腺病毒 pMultiRNAi-Ldhc 能有效沉默骨骼肌中 *Ldhc* 基因表达。

关键词: 腹腔注射; 高原鼠兔; 乳酸脱氢酶; 乳酸; 三磷酸腺苷

中图分类号: Q955 文献标识码: A 文章编号: 0250-3263 (2018) 03-439-07

The Silence of *Ldhc* in Plateau Pika Skeletal Muscle by Intraperitoneal Injection of Adenovirus pMultiRNAi-Ldhc

WANG Zhi-Jie^① WANG Yang^② AN Zhi-Fang^② WEI Lin-Na^③ WEI Lian^① WEI Deng-Bang^{①②*}

① *College of Eco-Environmental Engineering, Qinghai University, Xining 810016;* ② *College of Agriculture and Animal Husbandry, Qinghai University, Xining 810016;* ③ *Medical College of Qinghai University, Xining 810016, China*

Abstract: Plateau Pika (*Ochotona curzoniaca*) is a small mammal native to Qinghai-Tibet area of 3 000 - 5 000 m above sea level. Previous studies found that the sperm-specific lactate dehydrogenase (LDH-C4) gene is expressed in Plateau Pika skeletal muscle. Intraperitoneal injection is a simple and convenient method for drug injection. In order to verify the effect of *Ldhc* silence in Plateau Pika skeletal muscle by intraperitoneal injection of adenovirus pMultiRNAi-Ldhc as a method of RNAi, 27 Pikas were randomly divided into the RNAi-LDHC, RNAi-HK and control groups, each had nine individuals. The Pikas of RNAi-LDHC, RNAi-HK were injected with 4×10^9 pfu 0.65 ml adenovirus pMultiRNAi-Ldhc and

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 王志洁, 女, 硕士研究生; 研究方向: 高原动物资源保护与利用; E-mail: 411126871@qq.com。

收稿日期: 2017-10-12, 修回日期: 2018-01-08 DOI: 10.13859/j.cjz.201803012

pMultiRNAi-NS, respectively. The control group was injected the same amount of normal saline. Seven days after injection, swimming time and the expression level of *Ldhc* mRNA and protein in Plateau Pika skeletal muscle, and the levels of lactate dehydrogenase and lactic acid as well as the content of ATP were detected. The results showed that, compared to the control group, RNAi-LDHC group's swimming time reduced by 12.45% (Fig. 1). At the mRNA and protein levels, *Ldhc* gene expressions were reduced by 41.73% and 15.76%, respectively (Fig. 2). LDH, LD and ATP were reduced by 23.98%, 51.08% and 19.29%, respectively (Fig. 3). It is indicated that intraperitoneal injection of adenovirus pMultiRNAi-Ldhc can effectively silence *Ldhc* expression in Plateau Pika skeletal muscle.

Key word: Intraperitoneal injection; Plateau Pika, *Ochotona curzoniaca*; Lactate dehydrogenase; Lactic acid; Adenosinetriphosphate

高原鼠兔 (*Ochotona curzoniaca*) 是一种栖息在青藏高原海拔 3 000 ~ 5 000 m 的高寒草甸及高寒荒漠草原地带的小型哺乳类土著动物, 对低氧有很强的适应性 (施银柱等 1980)。乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase) 是一种糖酵解酶, 广泛存在于动物组织中, 催化丙酮酸和乳酸相互转化 (Smithies 1959, Wang et al. 2013)。乳酸脱氢酶同工酶有 3 个不同基因 (*Ldha*、*Ldhb*、*Ldhc*) 编码的亚基 (LDH-A、LDH-B、LDH-C) 组成的同源或异源四聚体蛋白 (Markert et al. 1975), C 亚基通常不与 A、B 亚基结合, 因此精子特异性乳酸脱氢酶是由 C 亚基组成的。先前的研究认为, *Ldhc* 在哺乳动物和鸟类的精子中表达 (Gupta 1999), 我们的研究表明, *Ldhc* 不仅在高原鼠兔的精子中表达, 而且在其体细胞中也广泛表达 (Wang et al. 2013)。LDH-C₄ 通过提高高原鼠兔骨骼肌无氧糖酵解的水平, 增强了其对低氧环境的适应能力 (Wang et al. 2015)。

腹腔注射是比较常见的给药方式, 操作简单易行, 且容易控制给药量 (祝青春等 2012); 段乙南等 (2016) 通过注射环磷酸胺建造大鼠 (*Rattus norvegicus*) 模型发现, 腹腔注射的小分子物质经腹膜吸收后其代谢产物作用于全身各处。大分子物质腹腔注射后经过肠系膜上的毛细血管和淋巴管吸收后, 通过门静脉进入肝, 通过肝的首过效应后, 代谢成为无毒或低毒物再进入体循环, 减轻动物体不良反应 (郭花等

2008), 同时导致药物的损耗, 进入血液的药物减少。大分子的腺病毒 pMultiRNAi-Ldhc 通过腹腔注射后, 经肝作用后能否有效地到达骨骼肌而发挥作用, 本文在腹腔注射腺病毒 7 d 后研究腺病毒对高原鼠兔骨骼肌 *Ldhc* 基因的沉默效果。

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脊山, 样本量 27 只, 体重 150 ~ 200 g, 随机分为 3 组, 每组 9 只。第 1 组为干扰组 (RNAi-LDHC), 腹腔注射 4×10^9 pfu (即病毒粒子的数量) 0.65 ml 的腺病毒 pMultiRNAi-Ldhc; 第 2 组为空壳组 (RNAi-HK), 注射等剂量的腺病毒 pMultiRNAi-NS; 第 3 组为空白对照组 (control), 注射等剂量生理盐水。高原鼠兔分组注射后饲养 7 d, 实验前静息 30 min, 进行抗疲劳实验, 精疲力竭后, 采集骨骼肌组织样品立即保存于液氮。

1.2 RNA 干扰在高原鼠兔体内抑制 *Ldhc* 基因表达的研究

1.2.1 *Ldhc* 基因 shRNA 表达质粒干扰片段的设计 参照王志洁等 (2017), 根据 GenBank 报道的高原鼠兔 *Ldhc* 基因的 cDNA 序列 (HQ704678), 选择 2 个靶位点 (321 ~ 339 和 855 ~ 875), 用 Blast 软件进行序列同源性分析,

并用 RNA structure 4.2 对其二级结构预测。SiRNA 干扰序列为 LDHC 321 (5'-TTT GTT AGT ACT TCA AAG ATT ACT TCA AGA CGG TAA TCT TTG AAG TAC TAA TTT TTT G-3') 和 LDH855 (5'-CCT CGC TAT TGG ACT GTC TGT GAT TCA AGA CGT CAC AGA CAG TCC AAT AGC TTT TTT G-3')。

1.2.2 *Ldhc* 基因特异性 shRNA 表达载体构建及腺病毒包装 参照王志洁等 (2017), 根据高原鼠兔和人 (*Homo sapiens*) *Ldhc* 基因的编码区序列, 设计并合成 shRNA 靶序列, 用合成的单链 shRNA 寡核苷酸退火后得到双链产物, 用低熔点的琼脂糖凝胶电泳回收, 并验证所回收的 DNA 片段, 构建 *Ldhc* 基因特异性 shRNA 表达线性化质粒载体, 转入感受态细胞, 挑取阳性克隆在培养基中培养过夜, 提取质粒, 测序鉴定插入序列。根据 DNA 测序结果, 将与所设计 shRNA 序列 100% 相同的重组质粒及空质粒分别进行腺病毒包装。序列的合成及测序、质粒的链接与病毒包装交由武汉晶赛生物有限公司完成。

1.3 抗疲劳实验

三组动物注射 7 d 后进行抗疲劳实验, 采用游泳法, 不同组高原鼠兔依次放入圆形木桶内, 水温控制在 18 °C 左右, 游泳力竭时间以动物沉入水底为准, 准确记录时间。

1.4 荧光 PCR 检测 mRNA 水平的表达

参照王志洁等 (2017), 采用 TRIzol (Invitrogen Life Technologies) 法提取骨骼肌组织总 RNA, 核酸蛋白含量检测仪测定 A_{260}/A_{280} 值 ($1.8 < A_{260}/A_{280} < 2.0$) 及浓度 (≥ 0.4 g/L), 取 4 μ g 总 RNA 采用 Fast Quant RT Kit (with gDNase) (TIANGEN) 试剂盒制备 cDNA。利用已有的高原鼠兔 *Ldha*、*Ldhb* 和 *Ldhc* 基因的特异性引物进行荧光定量 PCR。*Ldha* 基因的上游引物序列为 5'-TTG GTC CAG CGG AAT GTA-3', 下游引物序列为 5'-GGT GAA CTC CCA GCC TTT-3', 扩增序列长度为 220 bp。*Ldhb* 基因的上游引物序列为 5'-TGT TGG ACA

AGT CGG AAT G-3', 下游引物序列为 5'-CTG AAG AAA CAG GCT CCC-3'; 长度为 139 bp。*Ldhc* 基因的上游引物序列为 5'-CAG CAG GAG GGA GAA GGT-3', 下游引物序列为 5'-ATG ACA CGA GAG GCA GGT AA -3'; 长度为 179 bp。内参 β -actin 基因的上游引物序列为 5'-CTC TTC CAG CCC TCC TTC TT-3', 下游引物序列为 5'-AGG TCC TTA CGG ATC TCC AC-3'; 长度为 98 bp。按照 SYBR® Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus) (TaKaRa) 试剂盒说明配制反应体系: 10 μ l SYBR® Premix Ex Taq II, 0.8 μ l PCR Forward Primer, 0.8 μ l PCR Reverse Primer, 0.4 μ l Rox Reference Dye II, 2 μ l cDNA, 6 μ l RNase-Free ddH₂O。反应条件: 95 °C 30 s; 95 °C 5 s, 60 °C 34 s, 40 个循环。ABI 7500 实时荧光定量 PCR 仪 (美国) 采集和分析数据。

1.5 Western Blot 检测蛋白水平的表达

参照王志洁等 (2017), 用总蛋白提取试剂盒提取骨骼肌组织总蛋白, 采用 Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, USA) 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后, 转到 0.22 PVDF 膜上。用 5% 脱脂奶粉稀液常温封闭 2 h, 与一抗 (抗 LDH-C, abcam 公司兔单克隆抗体, 1 : 10 000 稀释; 抗 GAPDH, abcam 公司单克隆抗体, 1 : 4 000 稀释) 4 °C 孵育过夜; 用 TBST 洗涤后用羊抗兔 IgG (山羊抗兔, abcam 公司, 1 : 2 000 稀释) 常温孵育 2 h 并用 TBST 洗涤。采用 ECL 荧光试剂盒 (Thermo Fisher Scientific, USA) 曝光并用凝胶成像系统 (Bio-Rad, USA) 拍照。

1.6 组织中乳酸脱氢酶 (LDH) 活性和乳酸 (LD) 及 ATP 含量的检测

参考许利娜等 (2015) 方法, 骨骼肌组织按照质量/体积比为 1 : 9 用 0.9% 生理盐水冰浴匀浆, 4 °C 5 000 r/min 离心 10 min, 取上清液。采用比色法按照试剂盒 (南京建成生物技术有限公司, 中国) 说明操作检测组织乳酸脱氢酶 (LDH) 活性和乳酸 (LD) 含量。参考许

利娜等 (2015) 采用萤光素-萤光素酶法按照 ATP 试剂盒 (江苏碧云天生物技术有限公司, 中国) 说明操作检测组织中 ATP 含量。组织按照质量/体积比为 1:5 比例用试剂盒中裂解液冰浴匀浆, 4 °C 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液。以 ATP 浓度与裂解液蛋白浓度的比值来表示组织中 ATP 的相对含量 ($\mu\text{mol/g}$)。

1.7 干扰率的计算

干扰组干扰效率 = (空白对照组平均值 - 干扰组平均值) / 空白对照组平均值, 空壳组干扰效率 = (空白对照组平均值 - 空壳组平均值) / 空白对照组平均值 (王志洁等 2017)。

1.8 数据统计分析

使用 Excel 2007 和 SPSS 软件整理数据并分析实验数据, 采用单因素方差分析 (one-way ANOVA), 数据用平均值 \pm 标准差表示, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 抗疲劳实验

干扰组、空壳组和空白对照组高原鼠兔的力竭游泳时间依次为 (749.00 ± 67.76) s、(843.90 ± 77.12) s 和 (855.47 ± 47.41) s, 空壳组和空白对照组无显著差异 ($P > 0.05$), 干扰组游泳时间显著低于空壳组和空白对照组 ($P < 0.05$, 图 1)。

2.2 高原鼠兔骨骼肌组织 *Ldhc* 表达水平

在 mRNA 水平上, 高原鼠兔骨骼肌组织中 *Ldha*、*Ldhb* 和 *Ldhc* 基因均表达, 与空白对照组相比, 干扰组 *Ldha* 和 *Ldhb* 基因的表达均没有显著差异 ($P > 0.05$), 而 *Ldhc* 基因表达量极显著减少 ($P < 0.01$), 腺病毒对 *Ldhc* 基因的干扰率为 41.73%。在蛋白水平上, 高原鼠兔骨骼肌组织中 LDHA、LDHB 和 LDHC 亚基均表达, 与空白对照组相比, 干扰组 LDHA 和 LDHB 亚基表达均没有显著差异 ($P > 0.05$), 而 LDHC 亚基表达量极显著减少 ($P < 0.01$), 腺病毒对 *Ldhc* 基因的干扰率为 15.76% (图 2)。

2.3 骨骼肌组织乳酸脱氢酶 (LDH) 活性和乳

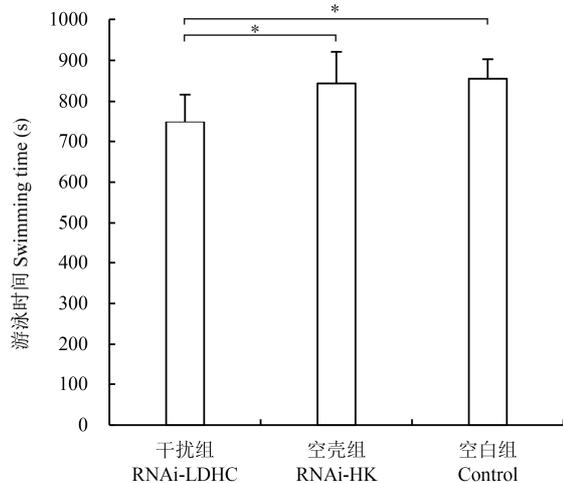


图 1 高原鼠兔力竭游泳时间 ($n = 9$)

Fig. 1 Swimming time of Plateau Pika

* $P < 0.05$.

酸 (LD) 及 TP 含量

与空白对照组和空壳组相比, 干扰组乳酸脱氢酶 (LDH) 活性和乳酸 (LD) 及 ATP 的含量均极显著减少 ($P < 0.01$), 空壳组和空白对照组间无显著差异 ($P > 0.05$), 腺病毒对 LDH、LD 和 ATP 的干扰率分别为 23.98%、51.08%和 19.29% (图 3)。

3 讨论

An 等 (2017) 在高原鼠兔骨骼肌直接注射腺病毒 pMultiRNAi-Ldhc, 与空白对照组相比, 骨骼肌组织中 mRNA 和蛋白水平上 *Ldhc* 基因表达量分别下降了 82.18%和 82.29%; 乳酸脱氢酶 (LDH) 活性和乳酸 (LD)、ATP 含量也分别降低了 28.21%、48.38%和 27.88%; 运动时间下降了 25.97%。王志洁等 (2017) 实验表明, 腹腔注射 0.65 ml 腺病毒 pMultiRNAi-Ldhc 能充分进入心肌、肝和脑组织中, 能显著沉默 *Ldhc* 基因; 在 mRNA 和蛋白水平上, 心肌组织中 *Ldhc* 基因表达量分别下降了 48.11%和 19.27%; 肝组织中 *Ldhc* 基因表达量分别下降了 70.16%和 25.82%; 脑组织中 *Ldhc* 基因表达量分别下降了 49.08%和 25.36%; 乳酸脱氢酶 (LDH) 活性和乳酸 (LD) 及 ATP 的含量也

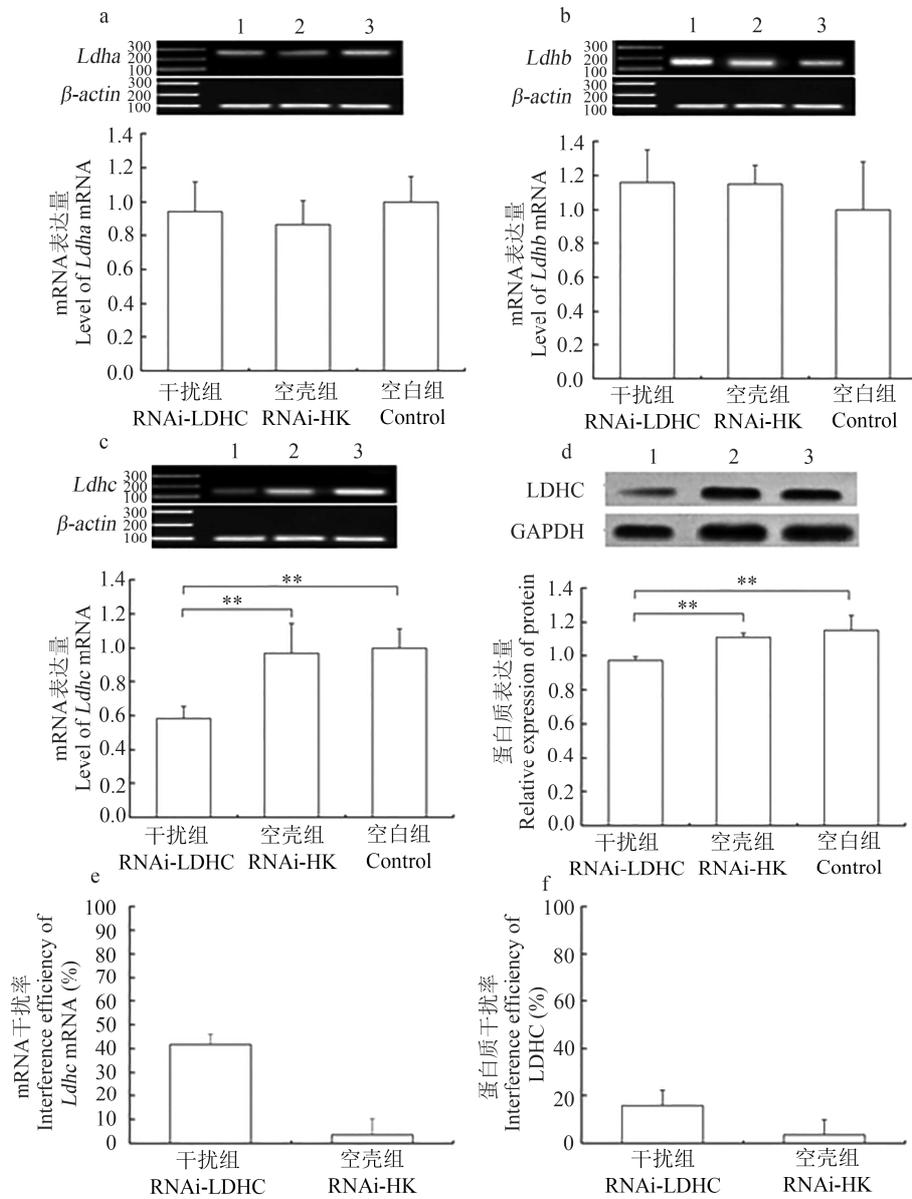


图2 高原鼠兔骨骼肌组织 *Ldhc* 表达水平 ($n = 9$)

Fig. 2 The expression level of *Ldhc* in Plateau Pika skeletal muscle

a. *Ldha* 基因的表达水平; b. *Ldhb* 基因的表达水平; c. *Ldhc* 基因的表达水平; d. LDHC 蛋白的表达水平; e. 腺病毒 pMultiRNAi-Ldhc 对 *Ldhc* 基因的干扰效率; f. 腺病毒 pMultiRNAi-Ldhc 对 LDHC 蛋白的干扰效率。图 a、b、c 和 d 中电泳图分别代表 *Ldha*、*Ldhb*、*Ldhc* 基因和 LDHC 蛋白的表达模式, 其中的 1、2 和 3 分别代表干扰组、空壳组和空白对照组。** $P < 0.01$ 。

a. Expression level of *Ldha* mRNA; b. Expression level of *Ldhb* mRNA; c. Expression level of *Ldhc* mRNA; d. Expression level of LDHC; e. Interference efficiency of pMultiRNAi-Ldhc on *Ldhc* gene; f. Interference efficiency of pMultiRNAi-Ldhc on LDHC protein. In figure a, b, c and d, the electrophoresis results represent the expression pattern of *Ldha*, *Ldhb*, *Ldhc* mRNA and LDHC protein, respectively. 1, 2 and 3 represent RNAi-LDHC, RNAi-HK and control, respectively. ** $P < 0.01$.

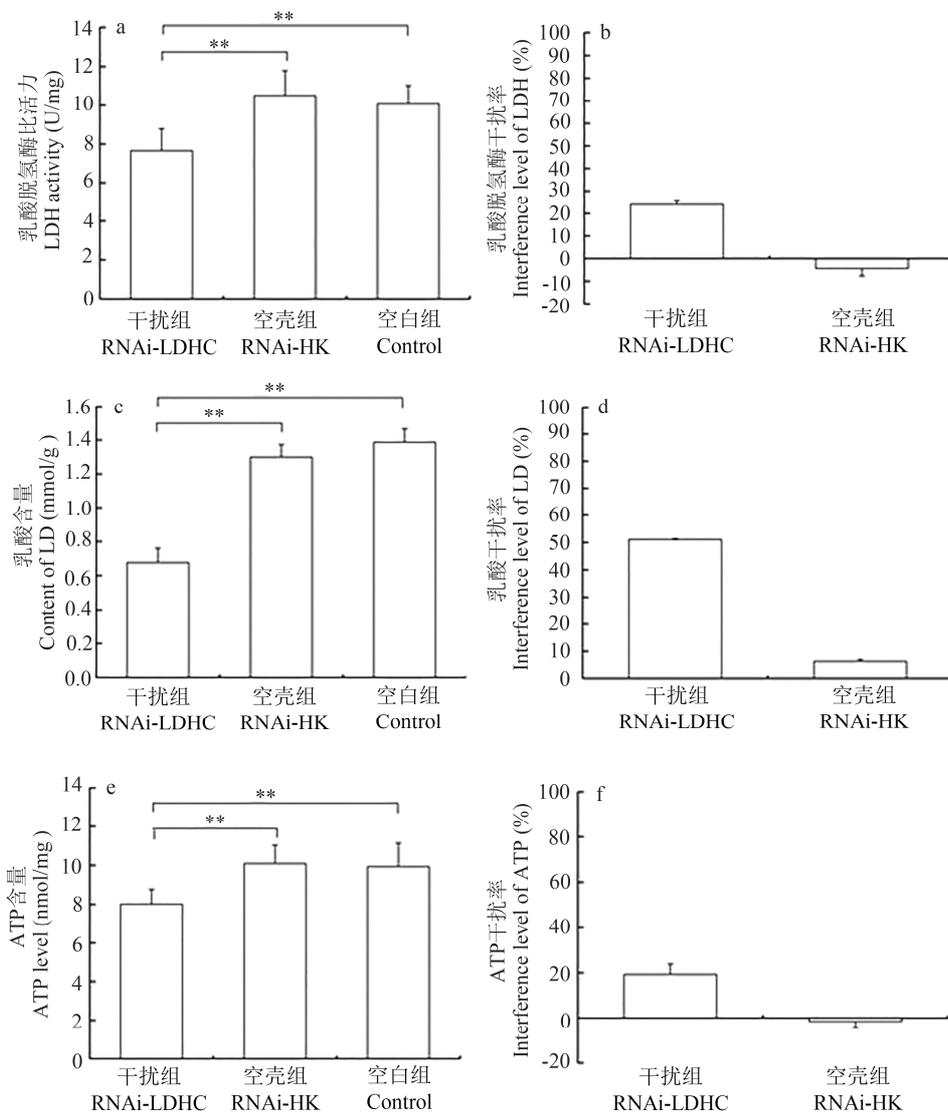


图3 高原鼠兔骨骼肌组织中乳酸脱氢酶 (LDH) 活性和乳酸 (LD) 及 ATP 的含量 ($n = 9$)

Fig. 3 The contents of lactate dehydrogenase (LDH), lactic acid (LD) and ATP in Plateau Pika skeletal muscle ($n = 9$)

a. 腺病毒 pMultiRNAi-Ldhc 对高原鼠兔骨骼肌组织中 LDH 活性的影响; b. 腺病毒 pMultiRNAi-Ldhc 对高原鼠兔骨骼肌组织中 LDH 活性的干扰效率; c. 腺病毒 pMultiRNAi-Ldhc 对高原鼠兔骨骼肌组织中 LD 的影响; d. 腺病毒 pMultiRNAi-Ldhc 对高原鼠兔骨骼肌组织中 LD 的干扰效率; e. 腺病毒 pMultiRNAi-Ldhc 对高原鼠兔骨骼肌组织中 ATP 的影响; f. 腺病毒 pMultiRNAi-Ldhc 对高原鼠兔骨骼肌组织中 ATP 的干扰效率。 ** $P < 0.01$ 。

a. Effect of pMultiRNAi-Ldhc on the activity of LDH in Plateau Pika skeletal muscle; b. Interference level on the LDH in Plateau Pika skeletal muscle; c. Effect of pMultiRNAi-Ldhc on the activity of LD in Plateau Pika skeletal muscle; d. Interference level on the LD in Plateau Pika skeletal muscle; e. Effect of pMultiRNAi-Ldhc on the activity of ATP in Plateau Pika skeletal muscle; f. Interference level on the ATP in Plateau Pika skeletal muscle. ** $P < 0.01$.

显著下降, 其中, 心肌组织中分别下降了 25.58%、41.94%、21.23%, 肝组织中分别下降了 28.16%、15.90%、24.66%, 脑组织中分别下降了 16.65%、12.78%、18.50%。本研究在高原鼠兔腹腔注射腺病毒 pMultiRNAi-Ldhc 7 d 后, 骨骼肌组织中 *Ldhc* 基因在 mRNA 和蛋白的表达水平上均显著下降, 分别下降了 41.73% 和 15.76%, 乳酸脱氢酶 (LDH) 活性和乳酸 (LD) 及 ATP 的含量也显著下降, 分别降低了 23.98%、51.08% 和 19.29%; 运动时间下降了 12.45%。与王志洁等 (2017) 的结果相结合, 腹腔注射法均能显著沉默心肌、肝、脑和骨骼肌组织的 *Ldhc* 基因表达, 说明腹腔注射高分子腺病毒包装的 SiRNA 能显著沉默组织细胞中基因的表达, 表明腹腔注射法能达到沉默效果。

参 考 文 献

- An Z F, Wei D B, Wei L, et al. 2017. The expression of *Ldhc* in the skeletal muscle of plateau pika (*Ochotona curzoniae*) enhances adaptation to a hypoxic environment. *Biology Open*, 6(9): 1336–1341.
- Gupta G. 1999. LDH-C₄: a unique target of mammalian spermatozoa. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 34(6): 361–385.
- Markert C L, Shaklee J B, Whitt G S. 1975. Evolution of a gene. Multiple genes for LDH isozymes provide a model of the evolution of gene structure, function and regulation. *Science*, 189(4197): 102–114.
- Smithies O. 1959. Zone electrophoresis in starch gels and its application to studies of serum proteins. *Advances in Protein Chemistry*, 14(10): 65–113.
- 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 Bio*, 3: 118–123.
- Wang Y, Wei L, Wei D, 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 & Public Health*, 12(8): 9218–9236.
- 段乙南, 夏志军, 许海楠. 2016. 环磷酸腺苷腹腔注射法及膀胱灌注法制备膀胱过度活动大鼠模型的研究. *中国医科大学学报*, 45(7): 587–590.
- 郭花, 朱金水. 2008. 胃癌腹腔化疗进展. *国际消化病杂志*, 28(1): 9–10.
- 施银柱, 樊乃昌. 1980. 草原害鼠及其防治. 西宁: 青海人民出版社, 67–105.
- 王志洁, 汪洋, 安志芳, 等. 2017. 高原鼠兔组织中精子特异性乳酸脱氢酶的作用机理. *四川动物*, 36(6): 624–631.
- 许利娜, 魏莲, 汪洋, 等. 2015. 高原鼠兔脑组织中精子特异性乳酸脱氢酶的作用. *兽类学报*, 35(4): 431–437.
- 祝春青, 陈冬波, 王喆, 等. 2012. 腹腔注射百草枯构建小鼠肺纤维化模型. *生物技术通讯*, 23(4): 563–566.