

石云,洪键.小鼠睾丸、肌肉和心脏 *Ldhc* 基因表达的比较研究[J].江苏农业科学,2017,45(13):43-45.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.13.011

小鼠睾丸、肌肉和心脏 *Ldhc* 基因表达的比较研究

石云¹,洪键²

(1.盐城卫生职业技术学院药学院,江苏盐城 224005; 2.盐城师范学院生命科学与技术学院,江苏盐城 224002)

摘要: *Ldhc* 基因仅在哺乳动物成熟的睾丸和精子中表达,并在哺乳动物的睾丸中普遍存在剪接体现象,但是 *Ldhc* 基因在肌肉和心脏组织中的表达情况以及与睾丸中该基因的表达丰度比较尚不清楚。因此,以小鼠为研究对象,首先检测小鼠肌肉和心脏组织中 *Ldhc* 基因的表达类型,然后采用荧光定量和 Western Blot 比较分析 3 个组织中 *Ldhc* 基因和蛋白的表达丰度。结果表明,在小鼠肌肉和心脏组织中未检测到 cDNA 全长,却发现 2 种 *Ldhc* 剪接体,参照小鼠 *Ldhc* 基因结构分析了选择性剪接体的结构;剪接体 1 包含完整酶的 NAD⁺ 结合结构域和酶的活性中心,有可能表达蛋白;剪接体 2 缺失第 4、7 外显子。对小鼠肌肉、心脏和睾丸组织乳酸脱氢酶(LDH)同工酶的电泳分析未检测到潜在的 *Ldhc* 剪接体的表达。荧光定量检测发现, *Ldhc* 基因在睾丸组织中的表达量要显著高于肌肉和心脏组织,而 Western Blot 仅在睾丸组织中检测到 LDHC4 蛋白的表达。以上结果表明,小鼠 *Ldhc* 基因的选择性剪接机制也存在于肌肉和心脏组织中,推测可能是调控该基因在肌肉和心脏组织中沉寂的方式之一。

关键词: 小鼠;乳酸脱氢酶-C;肌肉;心脏

中图分类号: Q786 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)13-0043-03

乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase,简称 LDH)是一类四聚体寡聚酶,广泛存在于脊椎动物、植物和细菌中^[1]。在哺乳动物中,LDH 存在 3 种类型的同工酶亚基:LDH-A(肌肉型)、LDH-B(心脏型)和 LDH-C(睾丸型),分别由 A、B、C 基因编码^[1]。而由 *Ldhc* 基因编码的乳酸脱氢酶-C4 首先是在多种哺乳动物、鸟类成熟睾丸组织和精子中被发现^[2-3]。研究表明,LDH-C4 由 4 个 C 亚基以四聚体形式组成,编码 LDH-C4 的 C 亚基基因也不同于编码 A、B 亚基的基因,而且不与 A、B 亚基结合^[4]。有关 LDH-C4 的基础研究已有较多报道,涉及酶的活力与分离纯化、酶学性质、免疫原性、细胞内的定位、酶活性随生长发育的变化等方面。

人、小鼠等哺乳动物 *Ldhc* 基因已经被克隆,*Ldhc* 基因由侧翼 5'端和 3'端调控序列、外显子以及内含子区域共同组成,编码区全长序列包括 8 个外显子,编码 332 个氨基酸^[5]。然而,Koslowski 等报道,在人的肿瘤细胞中共检测到 6 种 *Ldhc* 剪接变异体,而这些变异体在正常细胞中是不存在的^[6]。Coonrod 等通过蛋白组学的分析方法,在鼠卵细胞和着床前的早期胚胎中也意外地检测到了 LDH-C4 的表达,但是其功能尚不清楚^[7]。笔者在以前的研究中从牦牛、狗和大鼠睾丸组织中均发现了 4 或 5 种 *Ldhc* 剪接体,并且在牦牛肌肉和心脏组织中还意外地检测到 *Ldhc* 的 2 种剪接体^[8-9]。Huang 等在小鼠睾丸组织中检测到了 cDNA 全长和 *Ldhc* 的多种剪接体^[10]。因此,这些研究结果不仅改变了长期以来有关 LDH-C4 仅分布于睾丸和精子中的观点,而且能够为其进

一步的功能分析以及表达调控等方面研究提供新线索。这些研究结果同时提示,LDH-C4 基因的选择性剪接现象不但在不同物种中普遍存在,而且也极有可能在同一物种不同的组织中广泛存在。虽然在小鼠睾丸组织中也检测到了 *Ldhc* 基因的剪接体,但 *Ldhc* 基因在乳酸脱氢酶分布非常丰富的肌肉和心脏组织中是否也存在剪接体,并且其表达方式和丰度与睾丸中有什么不同尚不清楚。本研究探讨了小鼠肌肉和心脏组织中 *Ldhc* 基因的表达方式以及与睾丸组织中该基因的表达丰度比较。

1 材料与方 法

1.1 材 料

试验所用成年雄性 C57BL/6 小鼠($n=6$),购自扬州大学比较实验动物中心。小鼠采用腹腔注射麻醉致死,采集腓肠肌、心脏和睾丸组织,样品均保存于 -70 ℃。

1.2 方 法

1.2.1 小鼠肌肉组织总 RNA 的提取 将小鼠腓肠肌和心脏组织于液氮中研磨成粉,称取 40 g 组织样,用 TRIzol 试剂(Invitrogen 公司)按操作说明从组织中提取总 RNA。提取的总 RNA 按照 RNA PCR Kit (AMV) Ver. 3.0 (TaKaRa 公司)试剂盒的操作反转录。

1.2.2 小鼠 *Ldhc* cDNA 的克隆 根据小鼠的 *Ldhc* 基因序列(GenBank 登录号为 NM_013580)设计 PCR 引物,PCR 正向、反向引物依次为:5'-CGGAGTCAGCAGTAAGGCTCAAC-3'、5'-AGCAGATTTCGGTTTGAGGTCAG-3';引物由上海 Invitrogen 公司合成。

PCR 反应程序:94 ℃ 1 min;94 ℃ 30 s,65 ℃ 30 s,72 ℃ 1 min,共 30 个循环;72 ℃ 延伸 10 min。扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。PCR 扩增产物经胶纯化试剂盒直接纯化后,采用 TaKaRa 公司的 pMD 19-T 载体进行克隆,宿主菌为

收稿日期:2016-12-20

基金项目:江苏高校品牌专业建设工程(编号:PPZY2015A097);盐城市医药卫生科技项目(编号:YK2013048)。

作者简介:石云(1982—),女,吉林集安人,硕士,讲师,主要从事天然药用活性物质研究。Tel:(0515)88233192;E-mail:shiyun210@163.com。

大肠杆菌 DH5 α 。挑取 60 个阳性克隆经 PCR 鉴定后,插入片段大小不同的克隆产物送上海 Invitrogen 公司进行双链测序,引物为 pUC 系列载体的通用引物 M13F 和 M13R。用 VectorNTI 软件对克隆子的核酸序列进行比对分析。

1.2.3 小鼠肌肉、心脏和睾丸组织 *Ldhc* 基因的荧光定量检测 根据美国国立生物技术信息中心 (NCBI) 网站上的 GenBank 数据库,找到 *Ldhc* 基因的 mRNA 序列,通过 Primer Premier 5.0 引物设计软件,并进行同源性比较,选取同源性

较高、无重复序列、跨内含子的序列,设计荧光定量 PCR 引物。引物由南京金唯智有限公司合成,引物序列见表 1。

统计方法使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法^[11]。计算公式如下:

$$\Delta\Delta C_T = (C_{TTargetx} - C_{TPIAx}) - (C_{TTargetc} - C_{TPIAc})$$

其中:以对照组的的目的基因 $C_{TTargetc}$ 和内标基因 C_{TPIAc} 差值的平均值为参照进行计算, x 表示任意一个样本,通过上述公式计算出每个样本目标基因的表达,通过肽基异构酶 A (PPIA) 校正后得到相对于对照组的的目标基因表达的倍数。

表 1 Real-Time PCR 引物序列

引物名称	序列(5'→3')	GenBank 登录号
LDHC	上游: TCGCGAGTCAGCAGTAAG; 下游: TCGTATCAGCGCTAACAA	NM_013580.4
PPIA	上游: GCAAGACCAGCAAGAAGA; 下游: CACTGAGAGCAGAGATTACA	NM_008907.1

1.2.4 小鼠肌肉、心脏和睾丸组织 LDH 同工酶谱分析 分别称取 50 mg 小鼠肌肉和心脏组织,以及 30 mg 睾丸组织,加入 2.5 mL 0.2 mmol/L 的 Tris-HCl (pH 值 7.3),用电动匀浆器以约 12 000 r/min 速度在冰上匀浆 4 次,每次 20 s,20 000 g、4 °C 离心 15 min,取上清液。上清液中的 LDH 同工酶用分离胶浓度为 6% 的垂直板聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 分离,酶活性染色^[12]。

1.2.5 小鼠肌肉、心脏和睾丸组织 LDHC4 蛋白质免疫印迹 (Western Blot) 检测 分别提取小鼠睾丸、肌肉和心脏组织的总蛋白,SDS-PAGE 电泳,目的蛋白电转到硝酸纤维素膜上,3% 牛血清白蛋白 (BSA) 封闭过夜,分别与羊抗 *Ldhc* 多克隆抗体 (ab63966, Abcom) 4 °C 孵育过夜,磷酸缓冲盐溶液 (PBS) 洗涤后与辣根过氧化物酶 (HRP) 标记兔抗羊检测抗体室温孵育 2 h, PBS 洗涤后加入反应液,反应完成后使用 VersaDoc 4000MP BIO-RAD 成像系统的软件拍照。

2 结果与分析

2.1 小鼠肌肉和心脏组织 *Ldhc* 基因的克隆与序列分析

小鼠肌肉和心脏组织总 RNA 采用 RT-PCR 扩增,产物经纯化、连接、转化后,获得了阳性克隆,菌液的 PCR 扩增获得大小不同的片段 (图 1-A)。对片段克隆测序后,发现了 2 种 *Ldhc* 剪接体 (图 1-A 中的 2、3、5、7、8 和 4、6 泳道)。但笔者在检测中未发现肌肉和心脏组织中存在 *Ldhc* cDNA 全长的片段 (图 1-A)。根据 *Ldhc* 基因在进化上的保守性,参照小鼠 *Ldhc* 基因结构分析了 *Ldhc* 基因的选择性剪接体的结构,图 1-B 结果显示,剪接体存在外显子缺失:其中剪接体 1 缺失第 5、6、7 的 3 个外显子,剪接体 2 缺失第 4、7 的 2 个外显子。因为 LDHC4 酶的 NAD⁺ 结合结构域由 *Ldhc* 的外显子 2~4 编码,酶的活性中心由外显子 4 编码^[7]。所以剪接体 2 失去了大部分酶的 NAD⁺ 结合结构域和整个酶的活性中心;而剪接体 1 包含完整酶的 NAD⁺ 结合结构域和酶的活性中心,推测它有可能表达相应的蛋白质。

2.2 小鼠肌肉、心脏和睾丸组织 LDH 同工酶谱

用 PAGE 分离小鼠肌肉、心脏和睾丸组织中 LDH 同工酶,酶活性染色显示,小鼠肌肉和心脏组织 LDH 主要显示 5 条电泳区带 (图 2 中的 1、2 泳道),即 LDH5、LDH4、LDH3、LDH2、LDH1,而睾丸组织 LDH 主要显示 6 条电泳区带 (图 2 中的 3、4 泳道),即 LDH5、LDHC4、LDH4、LDH3、LDH2、

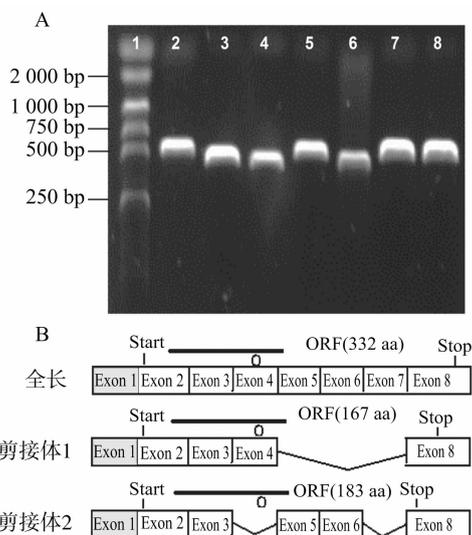
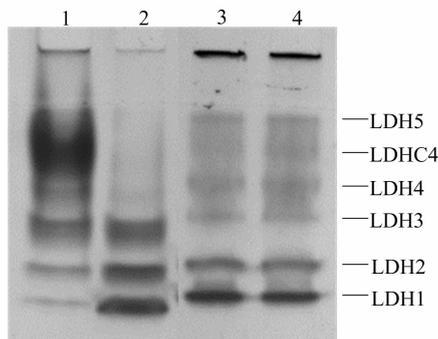


图 1 小鼠肌肉和心脏组织 *Ldhc* 基因选择性剪接体电泳结果(A)与结构(B)示意



1—小鼠肌肉组织匀浆液; 2—小鼠心脏组织匀浆液; 3、4—小鼠睾丸组织匀浆液

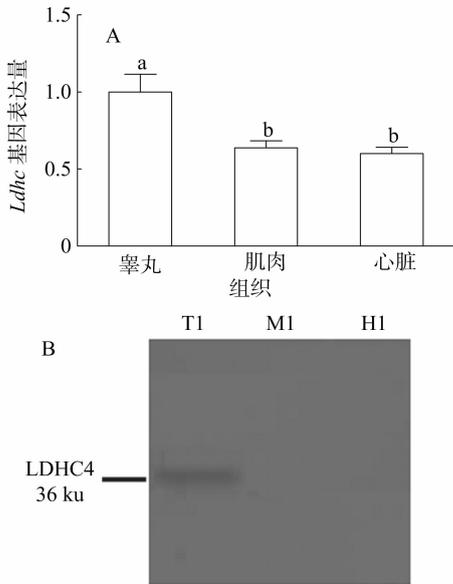
图 2 小鼠肌肉、心脏和睾丸组织 LDH 同工酶活性染色

LDH1, LDHC4 处于 LDH5 和 LDH4 之间。试验在肌肉和心脏组织中未观察到 LDHC4 以及 *Ldhc* 基因剪接体表达可能产生的 LDH 同工酶的带型。

2.3 小鼠肌肉、心脏和睾丸组织 *Ldhc* 基因的荧光定量检测和蛋白质免疫印迹检测

小鼠肌肉、心脏和睾丸组织 *Ldhc* 基因的荧光定量检测结果显示,小鼠睾丸组织中 *Ldhc* 基因的表达量要显著高于肌肉

和心脏组织;但蛋白质免疫印迹检测发现,小鼠 LDHC4 蛋白仅在睾丸组织中表达,肌肉和蛋白组织中未检测到该蛋白的表达(图 3),这与笔者在肌肉和心脏组织中未检测到 *Ldhc* 基因 cDNA 全长的表达结果一致。



A—以睾丸组织中 *Ldhc* 基因的表达为对照的各组织中基因的荧光定量检测结果。数据表示为“平均值 \pm 标准误”;2组之间标有不同小写字母代表差异显著, $P < 0.05$ 。B—不同组织中表达蛋白免疫印迹结果。T表示睾丸;M表示肌肉;H表示心脏

图3 小鼠肌肉、心脏和睾丸组织 LDH 基因和蛋白表达检测

3 讨论

基因的选择性剪接广泛存在,是基因表达的调控方式之一^[4]。有关 *Ldhc* 基因表达的调控,Zhou 等研究了小鼠 *Ldhc* 基因的启动子活性,发现 LDH - C4 的组织特异性由 60 bp 的核心启动子序列控制,LDH - C4 的 mRNA 和蛋白稳定性与其水平有直接关系^[13-14]。有研究表明,*Ldhc* 在正常的睾丸组织中的表达与其 mRNA 和 LDH - C4 蛋白稳定性有关;在睾丸以外的组织中的沉寂则与 *Ldhc* 启动子 CpG 岛甲基化有关^[15],还受 NF - 1 等转录调控因子的调控^[16]。相关研究提示,*Ldhc* 基因表达的调控是在多种水平上的。*Ldhc* 在睾丸和卵巢外的其他正常组织中不能检测到表达,但在肿瘤细胞中表达水平增加^[6]。通过阻止 *Ldhc* 启动子 CpG 岛甲基化,或诱导低氧诱导因子 - 1 (HIF - 1) 均不增加细胞系 T2、HCT116 在体外 *Ldhc* 的转录。

本试验中笔者在小鼠肌肉和心脏组织中检测到 *Ldhc* 基因的 2 种剪接体,但未检测到该基因 cDNA 全长,通过对剪接体的序列结构分析发现,剪接体 1 还保留完整酶的 NAD⁺ 结合结构域和酶的活性中心,推测该剪接体有可能翻译成相应的蛋白质,但通过 LDH 同工酶谱比较分析,在小鼠肌肉和心脏组织中未发现 LDHC4 以及 *Ldhc* 剪接体表达可能产生的 LDH 同工酶的带型。荧光定量检测发现 *Ldhc* 基因的 mRNA 在睾丸组织中的表达要显著高于肌肉和心脏组织,并且仅在睾丸组织中检测到 LDHC4 蛋白的表达。因此,笔者推测 *Ldhc* 基因的剪接机制在非睾丸组织中也普遍存在,可能是调控该基因在肌肉和心脏等非睾丸组织中沉寂的方式之一。

参考文献:

- [1] Markert C L, Shaklee J B, Whitt G S. Evolution of a gene. Multiple genes for LDH isozymes provide a model of the evolution of gene structure, function and regulation [J]. *Science*, 1975, 189 (4197): 102 - 114.
- [2] Goldberg E. Lactic and malic dehydrogenase in human spermatozoa [J]. *Science*, 1963, 139 (3555): 602 - 603.
- [3] Burgos C, Maldonado C, Gerez de Burgos N M, et al. Intracellular localization of the testicular and sperm - specific lactate dehydrogenase isozyme C4 in mice [J]. *Biology of Reproduction*, 1995, 53 (1): 84 - 92.
- [4] Gupta G S. LDH - C4: a unique target of mammalian spermatozoa [J]. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 1999, 34 (6): 361 - 385.
- [5] Sakai I, Sharief F S, Li S S. Molecular cloning and nucleotide sequence of the cDNA for sperm - specific lactate dehydrogenase - C from mouse [J]. *Biochemical Journal*, 1987, 242 (2): 619 - 622.
- [6] Koslowski M, Türeci O, Bell C, et al. Multiple splice variants of lactate dehydrogenase C selectively expressed in human cancer [J]. *Cancer Research*, 2002, 62 (22): 6750 - 6755.
- [7] Coonrod S, Vitale A, Duan C W, et al. Testis - specific lactate dehydrogenase (LDH - C4; Ldh3) in murine oocytes and preimplantation embryos [J]. *Journal of Andrology*, 2006, 27 (4): 502 - 509.
- [8] 洪键, 贺庆华, 郑玉才, 等. 睾丸特异乳酸脱氢酶 - C 基因选择性剪接的研究 [J]. *自然科学进展*, 2008, 18 (9): 1070 - 1074.
- [9] He Q H, Hong J, Zheng Y C, et al. Cloning and sequence analysis of multiple splice variants of lactate dehydrogenase C in yak testes [J]. *The Journal of Reproduction and Development*, 2008, 54 (3): 229 - 232.
- [10] Huang L, Lin Y Q, Jin S Y, et al. Alternative splicing of testis - specific lactate dehydrogenase C gene in mammals and pigeon [J]. *Animal Biotechnology*, 2012, 23 (2): 114 - 123.
- [11] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real - time quantitative PCR and the 2^{- $\Delta\Delta C_t$} method [J]. *Methods*, 2001, 25 (4): 402 - 408.
- [12] Dietz A A, Lubrano T. Separation and quantitation of lactic dehydrogenase isoenzymes by disc electrophoresis [J]. *Analytical Biochemistry*, 1967, 20 (2): 246 - 257.
- [13] Zhou W, Xu J, Goldberg E. A 60 - bp core promoter sequence of murine lactate dehydrogenase C is sufficient to direct testis - specific transcription *in vitro* [J]. *Biology of Reproduction*, 1994, 51 (3): 425 - 432.
- [14] Kroft T L, Li S M, Doglio L, et al. A transgenic analysis of mouse lactate dehydrogenase C promoter activity in the testis [J]. *Journal of Andrology*, 2003, 24 (6): 843 - 852.
- [15] Kroft T L, Jethanandani P, Mclean D J, et al. Methylation of CpG dinucleotides alters binding and silences testis - specific transcription directed by the mouse lactate dehydrogenase C promoter [J]. *Biology of Reproduction*, 2001, 65 (5): 1522 - 1527.
- [16] Jethanandani P, Goldberg E. *Ldhc* expression in non - germ cell nuclei is repressed by NF - I binding [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276 (38): 35414 - 35421.