

- 民卫生出版社, pp 149.
- [3] 何申等译, 1985, 培养中的肿瘤与正常细胞, 第一版, 人民卫生出版社, pp 164.
- [4] 刘鼎新, 1990, 细胞生物学研究方法与技术, 第一版, 北京医科大学, 中国协和医科大学联合出版社, pp 156.
- [5] Brunt, J. V., 1991, *Biotechnology*, 9(2): 136.

中华大蟾蜍人工诱发冬眠后组织内 LDH 同工酶的变化

郝泗城 彭永康

(天津师范大学生物系 300074)

蟾蜍冬眠期与活动期组织内 LDH 同工酶的较研究已有过报道^[1],但仅限于血清方面,并且所检测材料系自然条件下的冬眠蟾蜍,对于人工诱发冬眠蟾蜍多种组织内 LDH 同工酶的变化迄今未见正式报道。本文以人工诱发的冬眠蟾蜍(4±1℃)为材料,对7种主要组织内 LDH 同工酶变化作了比较研究,试图为动物冬眠机理的探讨提供一些基础资料。

材料与方 法

一、材料及处理

实验材料为中华大蟾蜍(6月份从天津市郊采集),用自来水洗净后置室内养殖1周,然后将蟾蜍置低温(4±1℃)下人工诱发冬眠。取诱眠6周后的蟾蜍和室温下养殖的非冬眠蟾蜍为材料,分析 LDH 同工酶。

二、同工酶样品制备

取上述两种蟾蜍的心肌、脾脏、骨骼肌、肺、肝、胃、脂肪等组织各0.1g,加1ml预冷至4℃的0.1mol/L磷酸缓冲液(pH7.0),在冰浴中经匀浆后在冷冻离心机上15000×g离心10分钟,上清液作电泳分析样品。

三、电泳条件及染色

采用聚丙烯酰胺凝胶电泳法^[6],电泳点样量为100微升,电压控制在120V,电泳在冰箱内进行,时间约3.5小时。LDH 同工酶的染色参考金昊等^[2]介绍的方法,用CS-930岛津薄层扫描仪扫描记录实验结果。

结果与讨论

一、活动期蟾蜍 LDH 同工酶谱型特征

已知 LDH 是一种催化乳酸和丙酮酸相互

转化伴同发生 NAD 的氧化和还原的酶,这种酶由 A、B 两种亚基构成,为5种不同分子形式的四聚体(LDH₁=B₄, LDH₂=AB₃, LDH₃=A₂B₂, LDH₄=A₃B, LDH₅=A₄),由 Ldh-A, Ldh-B 两个基因编码。在活动期蟾蜍7种组织的提取物中,至少可以分离出3-5种具有不同活力的 LDH 同工酶谱带(表1)。在这检测的7种组织中, Ldh-A, Ldh-B 基因的表达有一定的组织特异性,从总的酶谱特征看,明显可以分为2种主要类型,即心肌型和骨骼肌型。如心肌中共检测出4种 LDH 同工酶(LDH₁—LDH₄),呈现出以 Ldh-B 基因表达的产物为主,其 A、B 亚基的比率是6:10。与这种谱型相似的组织还有脾脏。主行糖酵解反应活跃的骨骼肌中,可以明显看出是以 Ldh-A 基因表达的同工酶为主的,在这个组织中共检测到3种 LDH 同工酶(LDH₂, LDH₄, LDH₅)其 A、B 亚基的比率为8:4。与这种组织相似的有肝脏、胃和脂肪。上述3种组织均由4条 LDH 同工酶(LDH₂—LDH₅),其 A、B 亚基比率为10:6。肺中由3条谱带(LDH₂, LDH₄, LDH₅)组成, A、B 亚基比率为8:4。Ldh-A, B 基因在不同组织中表达能力上的差异可能与各类组织的生理机能和代谢类型有关。如在心肌中呈现出的以 Ldh-B 基因表达为主可认为心肌中存在充足的氧气,因为已经发现供氧充足的组织中 Ldh-B 基因的表达占优势,而在缺氧的组织中则 Ldh-A 基因的表达占优势^[3]。骨骼

表1 冬眠与非冬眠蟾蜍乳酸脱氢酶同工酶组织分布与亚基比率

组 织	乳 酸 脱 氢 酶 同 工 酶	亚 基 比 率
心肌(CK)	LDH ₁ , LDH ₂ , LDH ₃ , LDH ₄ ,	6 A: 10 B
处理	LDH ₁ , LDH ₂ , LDH ₃ , LDH ₄ ,	6 A: 10 B
脾脏(CK)	LDH ₁ , LDH ₂ , LDH ₃ , LDH ₄ ,	6 A: 10 B
处理	LDH ₃ , LDH ₄ ,	5 A: 3 B
骨骼肌(CK)	LDH ₂ , LDH ₄ , LDH ₅ ,	8 A: 4 B
处理	LDH ₂ , LDH ₄ , LDH ₅ ,	8 A: 4 B
肺(CK)	LDH ₂ , LDH ₄ , LDH ₅ ,	8 A: 4 B
处理	LDH ₄ , LDH ₅ ,	7 A: 1 B
肝脏(CK)	LDH ₂ , LDH ₃ , LDH ₄ , LDH ₅ ,	10 A: 6 B
处理	LDH ₃ , LDH ₄ , LDH ₅ ,	9 A: 3 B
胃(CK)	LDH ₂ , LDH ₃ , LDH ₄ , LDH ₅ ,	10 A: 6 B
处理	LDH ₂ , LDH ₃ , LDH ₄ , LDH ₅ ,	10 A: 6 B
脂肪(CK)	LDH ₂ , LDH ₃ , LDH ₄ , LDH ₅ ,	10 A: 6 B
处理	LDH ₄ , LDH ₅ ,	7 A: 1 B

肌和肝脏 Ldh-A 基因表达占优势可以归因于这两个组织中主行糖酵解有关^[4],但在供氧充足的肺组织中,本实验并没有显示出 Ldh-B 基因表达占优势而是 Ldh-A,一些学者在研究树鼯和黄鼠肺组织中 LDH 同工酶时则表现出 Ldh-A, Ldh-B 基因表达活性接近相等状态^[3,4]。目前我们还不能合理解释蟾蜍肺组织所得 Ldh-A 基因表达占优势的现象。尽管调控 Ldh-A、B 两个结构基因的调节基因已经被发现^[7],并且很多学者将组织中的 LDH A、B 亚基表达上的差异从编码这两个亚基的 Ldh-A、Ldh-B 基因的阻遏与去阻遏的观点去解释。但在我们的实验结果中是否也有调节基因在起作用尚未找到直接的证据,而一些学者在树鼯、黄鼠肺组织 Ldh-A、Ldh-B 基因活性表达特性相等现象也未作进一步解释,因此,确切机理有待进一步探讨。

二、冬眠期蟾蜍 LDH 同工酶谱型的变化特征

经 $4 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 的低温条件诱眠 6 周后,所有 10 只蟾蜍全部进入冬眠状态,从这些蟾蜍的

的 7 种组织中, LDH 同工酶谱型变化的特点是:有 4 个组织中的 LDH 同工酶谱带数有不同程度的减少,它们分别是肝脏 LDH₂ 消失,脂肪 LDH₂、LDH₃ 消失、脾脏 LDH₁、LDH₂ 消失,肺组织中缺失 LDH₂。值得注意的是,在上述 4 个组织中的 LDH₂ 谱带在冬眠蟾蜍中均消失(图 1),这一结果曾为一些研究者在检测冬眠蟾蜍的血清 LDH 同工酶时看到,并认为,蟾蜍在冬眠低氧条件下 LDH₂ 不适合在厌氧条件下的糖酵解,因而消失^[1],在我们所检测的 7 个组织中 LDH₆ 均未产生变化,可以认为这种同工酶是适合在厌氧条件下的糖酵解的,但对于这种类似的实验结果有人用生物对低温条件的适应反应来解释,认为在低温条件下组织内某些同工酶的增加、减少或未产生变化都是生物对外界环境条件的一种适应反应,我们认为这种推测也是有一定道理的。

从 Ldh-A、B 两个基因的表达能力看,除脾脏从原来的 Ldh-B 基因表达占优势转变成 Ldh-A 基因表达占优势以外,其他 6 个组织中,尽管 LDH 同工酶谱带有所减少,但 Ldh-

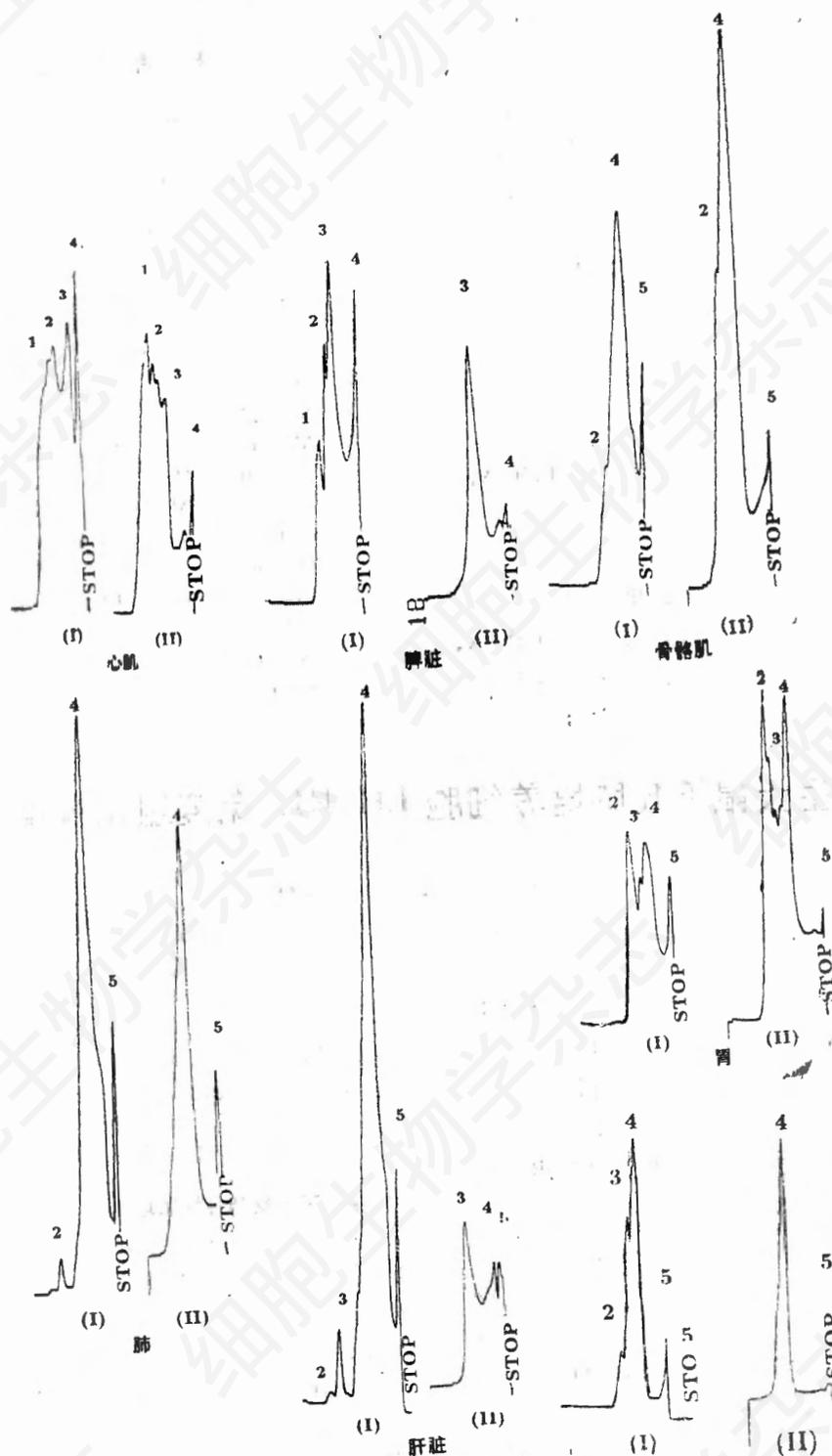


图1 活动期与冬眠期蟾蜍组织 LDH 同工酶比较
(I) 活动期; (II) 冬眠期

A、B两基因在各组织内表达的活性(A:B规律性)没有产生明显变化(表1)。这一结果与不少研究结果相吻合^[8-10],但与有人在研究小鼠、北京鸭^[6]等的某些组织不同发育期发现Ldh-A、B基因表达活性的转换现象不同,也许这是因为动物的发育(从胚胎期到幼体乃至成熟)与冬眠是两个完全不同的生理过程,动物在发育成熟后各组织内编码LDH同工酶基因的表达是稳定的。

摘 要

非冬眠中华大蟾蜍7种组织中分离出3~5种具不同活力的LDH同工酶谱带,Ldh-A、Ldh-B基因的表达有一定的组织特异性,其酶谱特征可分为心肌型和骨骼肌型两种类型。经 $4\pm 1^{\circ}\text{C}$ 低温条件诱眠6周后,脾脏、肺、肝脏和脂肪中的LDH同工酶谱带减少,但从Ldh-A、Ldh-B两个基因表达能力看,其各组织内表达

活性(A:B规律性)没有产生明显变化。

参 考 文 献

- [1] 李大筠等, 1987, 两栖爬行动物学报, 6: 63—65.
- [2] 金昊等, 1985, 遗传学报, 12: 295—301.
- [3] H. 哈里斯著(沈若谦、薛京伦、许宝孝译), 1981, 人类生化遗传学原理, 科学出版社.
- [4] 郑子修等, 1991, 动物学研究, 12: 85—91.
- [5] 吴鹤龄等, 1987, 遗传学报, 14: 135—141.
- [6] Davis, B. J., 1964, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 121: 404—427.
- [7] Matsuzawa, T. et al., 1973, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 142: 232—236.
- [8] Burgos, N. M. G. De., 1973, *Biochemica et Biophysica Acta.*, 315: 250—258.
- [9] Hochachka, P. W., 1965, *Archives of Biochemistry and Biophysics.*, 111: 96—103.
- [10] Narita, J. I., 1983, *Comp. Biochem. Physiol.*, 64: 249—253.

新生大鼠下丘脑培养细胞 LH-RH 免疫组化观察*

王福庄 丁爱石 张崇理**

(军事医学科学院基础医学研究所 北京 100850)

作为神经系统和内分泌系统连接点的下丘脑,在神经内分泌研究中占有重要位置。由它合成和分泌的多种神经多肽和肽类激素是下丘脑参与调节机体多种生理功能的重要物质基础。其中促黄体生成素释放激素(LH-RH)是调节生殖功能的重要多肽激素。

多年来国外利用胎鼠或新生大鼠下丘脑细胞进行体外培养获得成功^[1-3],为研究下丘脑细胞的分泌功能及其调节提供了一个新的途径。迄今有关体外下丘脑细胞LH-RH免疫组化观察的研究国内尚未见报道。为了研究下丘脑细胞的LH-RH合成和分泌功能,我们实验室建立了新生大鼠下丘脑体外细胞培养的方法。培养的下丘脑细胞在体外可存活4周左右,在

培养过程中观察了下丘脑神经细胞的个体生长发育和形态分化,并进行了LH-RH和神经特异性稀醇化酶(NSE)免疫组化观察。

材 料 和 方 法

一、下丘脑神经细胞培养

下丘脑神经细胞的培养,采用我们实验室已建立的神经细胞培养方法^[4,5]。取当天出生的Wistar大鼠,在无菌条件下分离出下丘脑,用0.125%胰蛋白酶消化(37℃、30 min)分散细胞后,制备成 1×10^6 细胞/mL密度的细胞悬液。接种细胞悬液于涂有小牛皮胶的35 mm塑料培养皿中,每皿2 mL。置于36℃、10% CO₂的培养箱内培养。培养过程中每周换液两次,每

* 国家自然科学基金资助课题。

** 中国科学院动物研究所。