

系,五组实验均采用含有巨噬细胞的单核样细胞悬液。我们用的 RPMI-1640 培养液含有 15% 的人 AB 型血清。J. Brochier<sup>[8]</sup>认为在 RPMI-1640 培养液中加入 AB 型血清,有利于 B 淋巴细胞增殖研究,加入 15% 胎牛血清,则有利于浆细胞成熟研究。我们的实验结果也表明,在含有 15% AB 型血清的琼脂培养基内 B 淋巴细胞仅能增殖。在各实验组的压片中未能找到浆细胞。上述细胞形态学差异反映出培养环境能直接影响 B 淋巴细胞的增殖与分化。

Izaguirre 等<sup>[2]</sup>提出接种后第三天就有明显的集落形成,而我们发现在接种后第二天就有较多的典型集落出现。这与种植细胞密度高和 B 淋巴细胞增殖速度快有关。但在 B 淋巴细胞集落形成过程中,是否存在两个或两个以上的 B 淋巴细胞同时增殖而形成一个集落的可能性?是值得探讨的。

此外, Jean-Pierre Farcet 等<sup>[7]</sup>曾提出在琼脂培养基上形成的细胞集落不能表示定向祖细胞的特性。Winkelstein 等用表面球蛋白研究证明 B 淋巴集落形成细胞是成熟的 B 淋巴细胞。因此,琼脂培养基上的 B 淋巴集落形成细胞必定服从于淋巴细胞的增殖规律。所以我们的各实验组的集落计数峰值均出现在接种后的第六天。到第八天时已明显下降,当然不排除营养物质不足及细胞活动产物的影响。

## 小 结

为研究人外周血 B 淋巴细胞在琼脂培养基内的增殖能力,选用 LPS、0.5% MRBC 和 5% BSA 作为丝裂原,和单层琼脂离体培养技术。比较研究人外周血 B 淋巴细胞在琼脂培养基内形成集落的能力。结果表明:在上述三种丝裂原单独或协同作用下, B 淋巴细胞集落形成良好。接种后第六天集落计数最高,第八天已明显下降。琼脂培养物离心沉淀后,制作的涂片中 96% 以上的细胞为 B 淋巴细胞。

## 参 考 文 献

- [1] J. Radnay., I. Goldman & L. A. Rozenszajn, 1979, *Nature*, 278:351-353.
- [2] C. A. Izaguirre., M. D. Minden., et al., 1980, *Br. J. Cancer*, 42:430-437.
- [3] 苏燎原等. 1977. 生物化学与生物物理进展, 3:14-16.
- [4] 马祥瑞, 汪涛等. 1982. 苏州医学院学报, 2:42-46.
- [5] Sudhir Gnpta & Rodert A. Good, 1980. *Seminars in Hematology* 17(1) 1-29.
- [6] 宗庭益等主编. 1980. 免疫学基础与临床, 安徽科学技术出版社. p 11-12.
- [7] Jean-Pierre Farcet & Ugo Testa, 1982, *Exp. Haematol.* 10(2):172-177.
- [8] J. Brochier & Lethichy, 1978, in "Human Lymphocyte differentiation: its application to cancer", p 69-70. Edited by B. Serru & C. Rosenfeld.

## 兔发育过程中乳酸脱氢酶—A、B 基因位点的活性\*

刘吉祥 赵国印 王田福

(武汉军区军医学校)

乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, 简称 LDH; EC 1.1.1.27, L-乳酸; NAD<sup>+</sup>氧化还原酶) 是糖酵解途径中的一种重要的酶。Meyerhof (1919) 首先发现此酶, Neidlands<sup>[1]</sup> (1952) 证明了它的不均一性, 为后来的同工酶研究开创了

良好的开端。Markert 等<sup>[2]</sup> (1959) 用电泳法将牛 LDH 结晶分离出 5 条均具有催化活性的区

\* 本工作承华中师范学院生物系刘秉正教授、蔡亚娜副教授和河南医学院牛富文副教授指导, 本校刘加林同志提出宝贵意见, 特此致谢。

带,并提出了同工酶的概念,后来他又提出了LDH同工酶结构的亚单位假说,认为LDH同工酶分子是由分子量相同(3500)、电荷不同的H和M两种亚单位组成的4聚体。Markert<sup>[3]</sup>(1968)和Harris<sup>[4]</sup>(1975)用不同种属的体细胞杂交技术证明,决定M亚单位的LDH-A基因位点位于第11号染色体上,决定H亚单位的LDH-B基因位点位于第12号染色体上。人和动物不同组织细胞A、B位点的活性有明显差异,因此,LDH同工酶有组织特异性<sup>[5,6,7]</sup>。本实验系用电泳法对10个不同年龄组的兔心、肝、肾、脑组织LDH同工酶进行了分离、观察和分析,试图了解其A、B活性变化的规律。

### 材料与 方法

随机选择了本校动物室饲养的10个不同年龄组的日本大耳白兔(20天胚胎、出生后12小时、40小时、8天、15天、27天、36天、45天、65天和成年组),每个时相2—3只。空气栓塞致死,立即取心室肌、肝实质和肾、脑皮质(含少量髓质),生理盐水洗数次以去掉组织内的血液,滤纸吸干,0.1g组织加入0.2ml巴比妥缓冲液(pH 8.6)、匀浆后冻融5次,3500 rpm离心25分钟。每张琼脂糖凝胶板槽内加入10μl上清液, +4℃冰箱内电泳90分钟(电压120—130伏,电流4毫安/厘米;37℃染色20分钟(每张琼脂板染色液配方:1M乳酸钠1.6ml, 1%氯化硝基四氮唑蓝3.2ml, 0.1%酚噻二甲酯硫酸盐0.125ml, 0.1%辅酶I 0.5ml),固定30分钟(95%酒精75ml,蒸馏水25ml,冰乙酸5ml),蒸馏水洗两次并浸泡过夜。用BS 413数字式光密度计扫描,计算各同工酶区带光密度百分数,并根据各区带H和M亚单位的组成比例(LDH1-5分别为4:0、3:1、2:2、1:3、0:4),计算两种亚单位的相对含量及比值(H/M)。

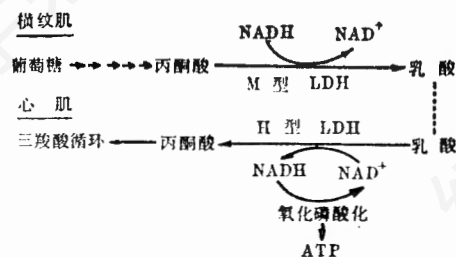
### 结果与 讨论

一、兔发育过程中心、肝、肾、脑组织A、B基因位点活性的变化规律。心、肾、脑及15天前肝LDH同工酶谱(图1—4)均显示出5条蓝紫色区带,LDH1泳动最快,LDH5最慢。27天后各组织肝酶谱(图2)呈现出6条区带,泳动最慢距LDH5较远的是一条附加带。胚胎期四

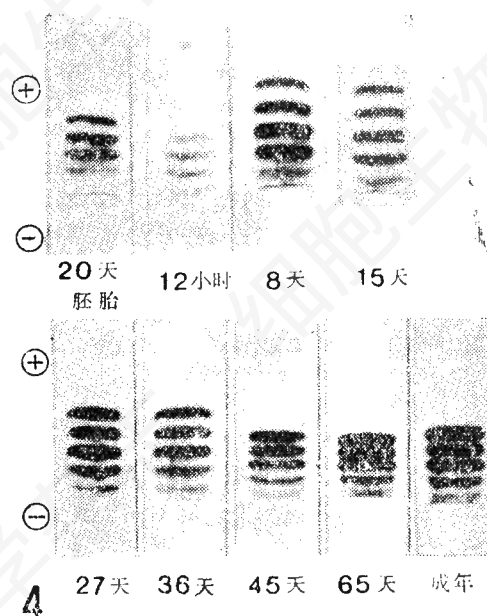
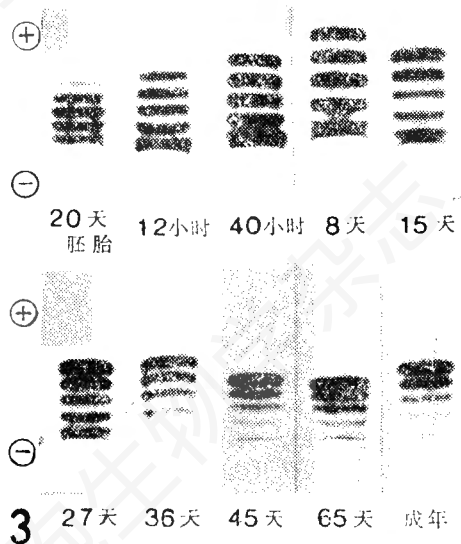
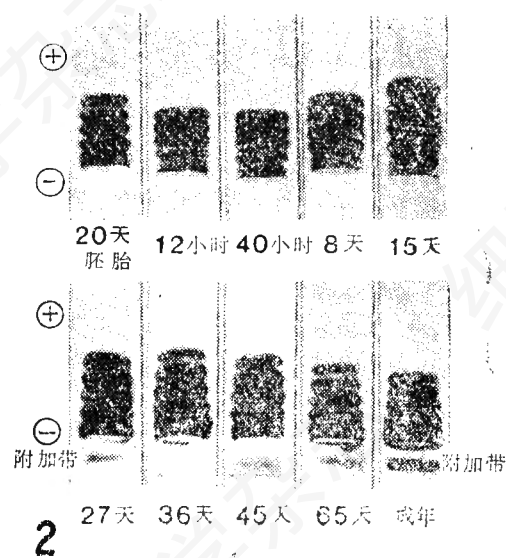
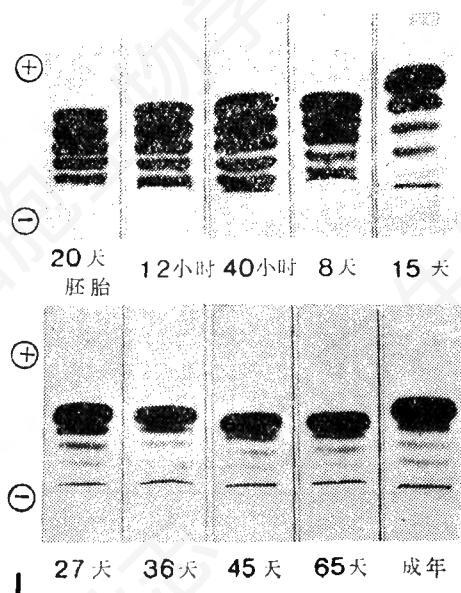
器官酶谱差别不大,都以杂化型为主;随着个体的发育,心肌组织LDH<sub>1</sub>反应逐渐增强,带域逐渐增宽,36天时已接近于成年,占总活性的95%。肾LDH<sub>1,2</sub>和脑LDH<sub>1,2,3</sub>活性逐渐增强,至成年时分别占78%和74%(表1);与此相反,出生后前8天,肝LDH<sub>5,4</sub>先减弱,尔后日趋增强。各年龄组四器官H和M亚单位的相对含量(表2)进一步表明,心、肾、脑组织LDH-B基因位点活性逐渐占优势,H亚单位的含量逐渐增多,H/M比值逐渐增大,尤以心肌为显著。肝脏A位点活性逐渐占优势,H/M比值逐渐下降。

Werthamer<sup>[8]</sup>发现人胎早期心脏与肝脏中M亚单位稍高于H亚单位,以后才发展成心脏中H占优势,认为与胎盘供氧功能提高有关,而死胎的心脏中这种发展则不充分。Lindsay<sup>[9]</sup>(1963)曾观察过猫个体发育过程中心、肝A和B型LDH比活力的变化,结果与兔的变化相似。

二、LDH存在于所有细胞中,LDH<sub>1</sub>至LDH<sub>5</sub>形成的酶谱标志着该组织的代谢类型<sup>[5,6,10]</sup>。Kaplan等<sup>[10]</sup>(1974)的实验结果指出,LDH<sub>1</sub>和LDH<sub>5</sub>虽属同工酶,但它们的生理功能并不相同,LDH<sub>1</sub>起乳酸脱氢酶的作用,且易为丙酮酸所抑制,使丙酮酸不还原成乳酸,而是进入线粒体中完全氧化,释放出能量;LDH<sub>5</sub>起丙酮酸还原酶的作用,催化丙酮酸还原成乳酸,据此提出以下模式:



成年兔心、肾、脑均以H型LDH为主,提示这些器官以有氧代谢为主,摄取血中乳酸,经LDH<sub>1</sub>催化转变成丙酮酸,然后进入三羧酸循环,是取得能量的一个重要途径。如在静息



兔发育的不同时期, 心(图1)、肝(图2)、肾(图3)、脑(图4)、LDH同工酶谱

状态下, 心肌能量的65%来自脂肪酸, 35%来自葡萄糖和乳酸; 经长期中度运动后, 60%的能量来自乳酸, 心肌内乳酸超过5 mM时, 就会转变为丙酮酸, 进入三羧酸循环充分氧化。

肝脏也是有氧代谢的器官, 但M型LDH为主, Wilkinson<sup>[10]</sup>认为组织中LDH同工酶的分布除与其功能有关外, 并与合成与分解速度也有一定关系, 肝脏合成LDH5快而分解慢, 故富

表1 兔发育过程中心、肝、肾、脑LDH同工酶的分布

| 分 组   | 心脑LDH同工酶(%) |    |    |    |    | 肝LDH同工酶(%) |    |    |    |    | 肾LDH同工酶(%) |    |    |    |    | 脑LDH同工酶(%) |    |    |    |    |
|-------|-------------|----|----|----|----|------------|----|----|----|----|------------|----|----|----|----|------------|----|----|----|----|
|       | 1           | 2  | 3  | 4  | 5  | 1          | 2  | 3  | 4  | 5  | 1          | 2  | 3  | 4  | 5  | 1          | 2  | 3  | 4  | 5  |
| 20天胚胎 | 21          | 27 | 29 | 15 | 9  | 18         | 24 | 25 | 25 | 8  | 7          | 23 | 32 | 27 | 12 | 22         | 38 | 25 | 12 | 4  |
| 12小时  | 31          | 32 | 23 | 8  | 6  | 18         | 29 | 33 | 16 | 5  | 18         | 20 | 23 | 20 | 20 | 4          | 18 | 33 | 29 | 16 |
| 40小时  | 34          | 33 | 20 | 9  | 5  | 19         | 25 | 37 | 13 | 6  | 24         | 28 | 24 | 14 | 11 |            |    |    |    |    |
| 8天    | 51          | 34 | 9  | 4  | 3  | 28         | 37 | 28 | 6  | 1  | 23         | 20 | 24 | 16 | 17 | 10         | 20 | 30 | 28 | 13 |
| 15天   | 79          | 17 | 3  | 2  | <1 |            |    |    |    |    | 40         | 22 | 9  | 9  | 21 | 17         | 20 | 35 | 22 | 7  |
| 27天   | 84          | 14 | 3  | <1 | <1 | 2          | 18 | 26 | 32 | 22 | 33         | 25 | 20 | 15 | 7  | 22         | 24 | 33 | 15 | 5  |
| 36天   | 89          | 6  | 5  | 1  | <1 | 4          | 25 | 32 | 26 | 13 | 48         | 25 | 17 | 9  | 1  | 19         | 24 | 32 | 18 | 8  |
| 45天   | 94          | 3  | 2  | 1  |    | 3          | 14 | 24 | 33 | 26 | 70         | 17 | 8  | 5  | 1  | 33         | 26 | 25 | 12 | 5  |
| 65天   | 88          | 6  | 4  | 2  | <1 | 2          | 13 | 23 | 32 | 30 | 85         | 8  | 5  | 3  |    | 49         | 36 | 13 | 2  | 1  |
| 成年    | 95          | 3  | 2  | <1 |    | 3          | 12 | 15 | 31 | 39 | 48         | 30 | 14 | 8  | <1 | 48         | 26 | 13 | 11 | 3  |

表2 兔发育过程中心、肝、肾、脑LDH同工酶H和M亚单位的变化

| 分 组   | 心 脏  |      |        | 肝    |      |       | 肾    |      |        | 脑    |      |       |
|-------|------|------|--------|------|------|-------|------|------|--------|------|------|-------|
|       | H    | M    | H/M    | H    | M    | H/M   | H    | M    | H/M    | H    | M    | H/M   |
| 20天胚胎 | 59.0 | 41.0 | 1.4:1  | 54.7 | 45.2 | 1.2:1 | 46.9 | 53.9 | 0.9:1  | 66.0 | 34.0 | 1.9:1 |
| 12小时  | 68.5 | 31.5 | 2.2:1  | 60.0 | 40.0 | 1.5:1 | 49.0 | 51.0 | 1:1    | 41.2 | 58.7 | 0.7:1 |
| 40小时  | 70.9 | 29.9 | 2.4:1  | 59.6 | 40.6 | 1.5:1 | 60.0 | 40.0 | 1.5:1  |      |      |       |
| 8天    | 82.0 | 18.0 | 4.5:1  | 71.2 | 28.7 | 2.5:1 | 54.0 | 46.0 | 1.2:1  | 47.5 | 53.0 | 0.9:1 |
| 15天   | 93.0 | 7.0  | 13.2:1 |      |      |       | 63.0 | 37.0 | 1.7:1  | 55.0 | 45.0 | 1.2:1 |
| 27天   | 95.0 | 5.0  | 19:1   | 37.0 | 63.0 | 0.6:1 | 65.4 | 34.3 | 1.9:1  | 61.0 | 39.0 | 1.6:1 |
| 36天   | 95.9 | 4.8  | 20:1   | 45.5 | 54.3 | 0.8:1 | 77.4 | 22.4 | 3.5:1  | 57.0 | 43.0 | 1.3:1 |
| 45天   | 97.4 | 2.4  | 40.5:1 | 34.0 | 66.0 | 0.5:1 | 87.9 | 12.9 | 6.8:1  | 67.0 | 33.0 | 2.0:1 |
| 65天   | 95.0 | 5.0  | 19:1   | 31.2 | 68.9 | 0.5:1 | 94.0 | 6.0  | 15.7:1 | 82.0 | 18.0 | 4.6:1 |
| 成年    | 98.2 | 1.7  | 57.8:1 | 27.2 | 72.7 | 0.4:1 | 79.6 | 20.5 | 3.9:1  | 76.0 | 24.0 | 3.1:1 |

注：H和M分别为H和M亚单位百分数。

含LDH6。有的人认为与动物的饮食习惯和运动量有关<sup>[6]</sup>，总之，目前缺乏有说服力的解释。

三、如前所述，27天后肝LDH同工酶谱中出现一条附加带，活性较低。此附加带也出现在成年中国长毛兔的肝酶谱中，大白鼠、小白鼠、豚鼠及人胎肝均未发现，关于它的生物学性质有待进一步研究。

### 参 考 文 献

- [1] Neidlands, J. B., 1952, *J. Biol. Chem.*, 199: 373-381.
- [2] Markert, C. L. et al, 1959, *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*, 45:753-763.
- [3] Markert C. L., 1968, *Ann. N. Y. Acad.*

*Sci.* 151:14-20.

- [4] Harris, H., 1975, *The principles of human biochemical genetic*, 52-60 pp, Amsterdam.
- [5] 方丁等. 1982. 同工酶在医学上的应用. 66-93 页, 人民卫生出版社, 北京.
- [6] 潘光熹. 1980. 国外医学临床生物化学与检验学分册, 1(4):6-13.
- [7] Schulthei, H. P., 1981, *Basic Res. Cardiol*, 76(6):681-685.
- [8] Werthamer, S., 1973, *Clin. Chem. Acta*, 45(1):5-9.
- [9] Lindsay, D. T., 1963, *J. Exptl. Zoology*, 152:75-88.
- [10] Bverse, J. and Kaplan, N. O., 1974, *Isozymes vol. 2*, 29-43 pp.
- [11] Wilkinson, J. H., 1970, *Clin. Chem.*, 16(11):882-886.