

# 不同代龄 SME-1 细胞和南方鲶上皮组织同工酶的初步分析

刘勇 洪锡钧

(西南师范大学生命科学系 重庆 630715)

**摘要** 以不同代龄的 SME-1 细胞和南方鲶为材料,用聚丙烯酰胺圆盘电泳对 LDH、MDH、 $\alpha$ -EST、 $\beta$ -EST 和 SOD 同工酶进行了分析。2 月龄和 12 月龄个体上皮组织中仅  $\alpha$ -EST 和 MDH 有明显差异,后者酶活力较高。个体和 SME-1 细胞仅少数谱带一致,多数酶谱明显不同,SME-1 细胞中酶谱较少。不同代龄 SME-1 细胞酶谱有差异,酶活力随着细胞代龄的增加而升高。本文为 SME-1 细胞的研究及其在细胞生物学、生物工程等方面的应用提供了生化资料。

**关键词** 同工酶 SME-1 细胞 南方鲶 聚丙烯酰胺圆盘电泳

同工酶是遗传分析的标记之一,它作为基因产物,在发育中经历了一系列的时空变化。研究同工酶基因的表达,可以把基因、酶、性状与结构、功能和调控关系连接起来<sup>[1]</sup>。

培养细胞系或细胞株属一种较简单的系统,细胞类型单一,是研究同工酶的好材料。细胞具一定特异性,表现为特异的形态特征和代谢特征,它是基因差别表达的结果。作为基因产物的同工酶,可以为细胞特异性、细胞鉴别、细胞遗传动向的改变和细胞转化机理的探讨提供遗传标记<sup>[2,3-5]</sup>。研究不同代龄细胞的同工酶,能从简捷途径推测基因表达的变化,为基因调控提供理论基础。

有关鱼类同工酶报道很多<sup>[6-9]</sup>,但鱼类上皮组织同工酶未见报道,不同代龄培养细胞同工酶分析仅见李亚南对鲤科五种培养细胞的研

究<sup>[7]</sup>。SME-1 细胞系是我国第一个鲶鱼细胞系<sup>[10]</sup>,尚未进行系统的生化分析。本文旨在了解 SME-1 细胞系的生化特征及其在培养过程中生化特征的改变,为 SME-1 细胞系的进一步培养和它在细胞生物学、生物工程学方面的应用提供生化资料。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

南方鲶取自本系动物教研组鱼池,为 2 月龄和 12 月龄个体。

SME-1 细胞系为南方大口鲶胚胎上皮型细胞系<sup>[10]</sup>,取 15、30、40 和 50 代龄细胞各 10-

---

**第一作者介绍:**刘勇,男,27岁,助教,硕士;现在第三军医大学预防医学系 重庆 630038;

收稿日期:1996-04-05,修回日期:1996-07-01。

15 瓶,全部细胞源于一个体。

## 1.2 方法

1.2.1 细胞培养 参照洪锡钧的方法<sup>[10]</sup>。

1.2.2 SME-1 细胞电泳样品制备 取传代后 4-5 天生长旺盛的细胞,用 0.1mol/L PBS (pH7.0)洗 2-3 次;常规胰酶消化法收集细胞;按 1ml PBS/100 万细胞加入预冷的 PBS,在冰浴中匀浆 30min;4℃、12000 转/分的条件下离心 30min;取上清,按 1:0.9 比例加入 40% 蔗糖液,于 -40℃ 保存待用。

1.2.3 上皮组织电泳样品制备 取南方鲇胸部上皮组织,用 0.1mol/L PBS 洗 3-5 次;称 0.3-0.5g 组织按 1:4(组织湿重:PBS)比例加入 PBS,匀浆;匀浆后的制备过程同 1.2.2。

1.2.4 同工酶电泳 采用聚丙烯酰胺圆盘电泳。SOD 电泳分离,胶浓度为 7%,其余同工酶电泳分离胶浓度为 5.6%;浓缩胶浓度为 2.5%。电泳按 1:0.1 比例加入溴酚兰作前沿指示剂,电泳缓冲液为 Tris-Gly (pH8.3) 缓冲液,电流强度为 2mA/管。

1.2.5 同工酶染色及扫描 MDH、LDH 染色参照朱蓝菲的方法<sup>[9,11]</sup>进行; $\alpha$ -EST、 $\beta$ -EST 按王爱民的方法<sup>[8]</sup>染色;SOD 染色参照林信伟的方法<sup>[6]</sup>。全部胶条置于岛津 UV-240 型紫外分光光度计扫描仪 (Shimadzu) 上扫描,波长  $\lambda = 560\text{nm}$ ,走纸速度为 20mm/s。

## 2 实验结果

苹果酸脱氢酶 (MDHEC1.1.1.37) 南方鲇 MDH 同工酶与其它鱼类一样,分为线粒体型 (m-MDH) 和细胞质型 (s-MDH)<sup>[6]</sup>。s-MDH 由 A、B 两位点编码, SME-1 细胞中存在等位基因 B<sup>ab</sup>。在 2、12 月龄个体上皮组织中,强带分别为 s-MDHAB<sup>b</sup> 和 s-MDHA<sub>2</sub>,二者有一条共同弱带 s-MDHB<sub>2</sub><sup>b</sup>; SME-1 细胞中,都有一条远离原点的弱带 s-MDHB<sub>2</sub><sup>b</sup>, 30 和 40 代龄细胞中强带为 s-MDHB<sub>2</sub><sup>a/AB</sup>, 在 15 和 50 代龄细胞中则为 s-MDHB<sup>a</sup>B<sup>b</sup> (图 1, a)。m-MDH 由 C、D 基因编码,个体上皮组织中均为两条谱带; m-MD-

HC<sub>2</sub> 和 m-MDHD<sub>2</sub>; 不同代龄 SME-1 细胞中仅有一条相同谱带 m-MDHC<sub>2</sub> (图 1, a)。可见,在个体间、个体与 SME-1 细胞间、SME-1 细胞间 MDH 差异明显。

乳酸脱氢酶 (LDHEC 1.1.1.27) 南方鲇个体上皮组织和 SME-1 细胞中共检测出 3 条谱带,分别为 LDH<sub>1</sub>、LDH<sub>2</sub>、LDH<sub>3</sub> (图 1, b)。2、12 月龄上皮组织中 LDH 一致; SME-1 细胞中无 LDH<sub>3</sub> 谱带, 50 代龄细胞中有一条染色浅的 LDH<sub>1</sub> (图 1, b)。

$\alpha$ -酯酶 ( $\alpha$ -ESTEC 3.1.1.1) 酯酶按照电泳迁移率大小分为 A、B 两组 (图 1, c)。2 月龄上皮组织中,有一条染色深的  $\alpha$ -ESTA<sub>2</sub> 和一条弱带  $\alpha$ -ESTB<sub>3</sub>; 12 月龄上皮组织中有两条强带  $\alpha$ -ESTA<sub>1</sub> 和  $\alpha$ -ESTB<sub>1</sub>, 还有一条弱带  $\alpha$ -ESTB<sub>2</sub>, 二者无一共同谱带,说明  $\alpha$ -EST 在发育中差异性高。SME-1 细胞中仅有 A 组酯酶,明显有别于个体; 在 15、40 代龄细胞中为  $\alpha$ -ESTA<sub>2</sub>, 在 30、50 代龄细胞中为  $\alpha$ -ESTA<sub>3</sub> (图 1, c)。

$\beta$ -酯酶 ( $\beta$ -ESTEC 3.1.1.1)  $\beta$ -EST 分别为 A、B 两组,共检测出 5 条谱带, A 组谱带染色较深, B 组谱带仅存在于个体 (图 1, d)。2、12 月龄个体上皮组织同工酶谱一致,为  $\beta$ -ESTA<sub>2</sub>、 $\beta$ -ESTB<sub>1</sub>、 $\beta$ -ESTB<sub>2</sub>。15、30 代龄细胞中为  $\beta$ -ESTA<sub>2</sub>, 40 代龄细胞中为  $\beta$ -ESTA<sub>1</sub>, 50 代龄细胞中为  $\beta$ -ESTA<sub>3</sub>, 差异明显 (图 1, d)。

超氧化物歧化酶 (SODEC 1.15.1.1) 鱼类 SOD 分为上清液型 SODA 和线粒体型 SODB<sup>[6]</sup>, 我们仅分析了 SODA。南方鲇 SODA 为二聚体,一个位点、两个等位基在 A<sup>ab</sup> 编码,形成两个二聚体。在个体上皮组织中; A<sup>ab</sup> 表达一致,两条谱带: SODA<sub>2</sub><sup>a</sup> 和 SODA<sub>2</sub><sup>b</sup>; 在 SME-1 细胞中,仅 A<sup>a</sup> 基因表达,一条 SODA<sub>2</sub><sup>a</sup> 谱带 (图 1, e)。

在我们检测的五种同工酶活力上, 12 月龄个体上皮组织高于 2 月龄个体,随着培养细胞代龄的增加,酶活力呈增强趋势 (图 1, a-e)。

## 3 讨论

由结果可知, SME-1 细胞与个体同工酶谱

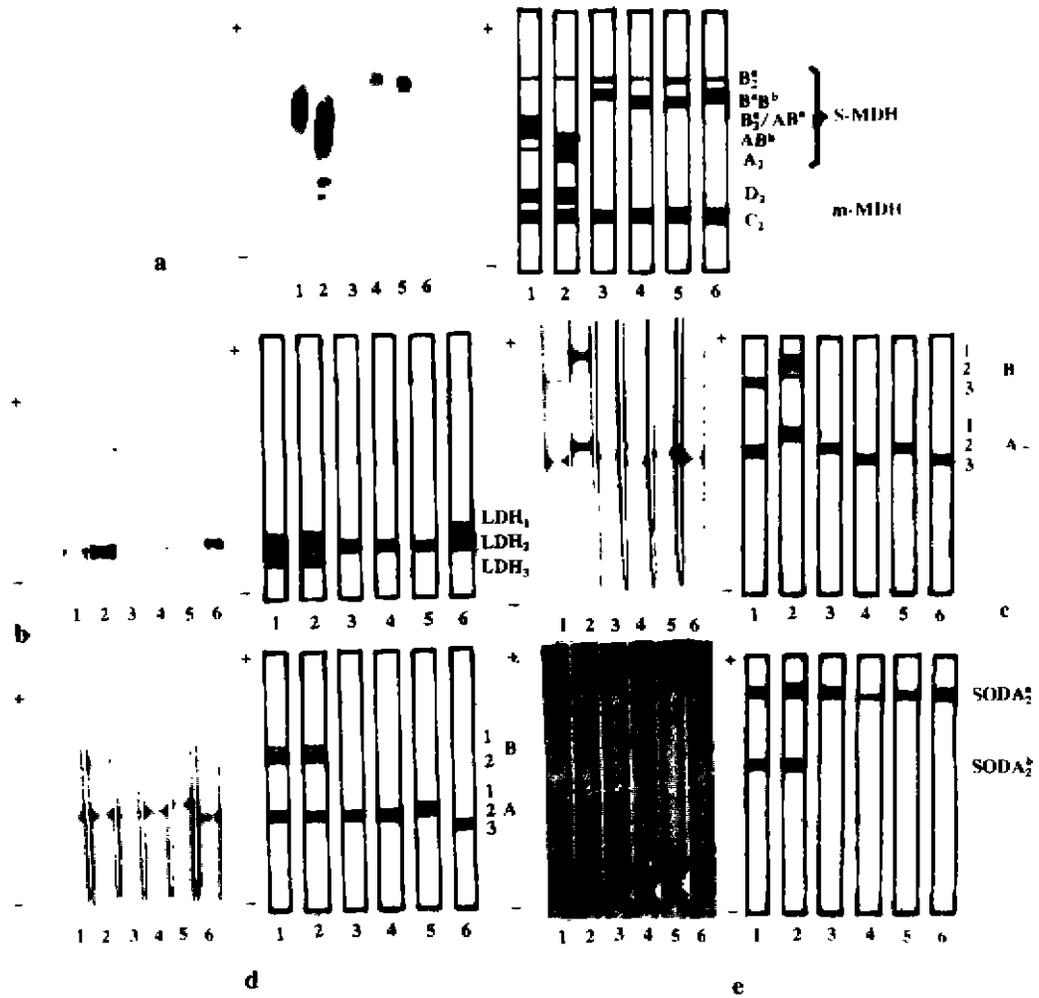


图1 南方鲷和 SME-1 细胞同工酶谱和模式图

a:MDH; b:LDH; c:α-EST;d:β-EST; e:SOD

1.2:2,12月龄南方鲷个体-皮组织;3.4.5.6:15,30,40,50代龄细胞

和谱带数明显不同,可能是基因差别表达的结果。SME-1 细胞在体外培养已达 4 年,细胞类型单一;个体上皮组织中细胞分化程度高,细胞类型多,与培养细胞明显不同。另一方面,个体的基因表达受体内激素、细胞间的接触、环境以及营养条件的调控。因此,SME-1 细胞基因表达必然有别于个体,部分位点基因关闭,而适应体外,特定代谢的基因表达。SME-1 细胞与个体同工酶谱有相同之处,推测可能与 SME \ | 1 细胞来源于上皮组织有关。

不同代龄 SME-1 细胞同工酶谱的差异,反应了基因表达的差异。体外培养的早期胚胎细

胞,同自然状态下的分化有一定相似之处,即由多能细胞到高分化的程序。但体外培养的有一定分化程度的细胞,基因表达及表达程度如何呢?我们认为取决于培养条件、分化程度和培养时间。例如 Johanson<sup>[12]</sup>认为:“低氧导致培养细胞中 IdhA 基因的表达。”李亚南认为:“随着细胞代龄增高,IdhB 逐渐表达。”50 代龄 SME-1 细胞中出现 LDH<sub>1</sub>(图 1, b),表明 IdhB 表达加强,这是细胞对不耐氧的人工环境的适应。其它几种酶谱的变化亦是如此,因此,随着细胞代龄增加或生长环境的改变,细胞会出现某些基因的表达,这是细胞生长的规律<sup>[7]</sup>。

诚然,在我们的实验中,酶谱的差异也不排除由于酶修饰作用引起酶空间构型或酶表面电荷差异导致的<sup>[6]</sup>。

随着细胞代龄的增加,SME-1 细胞内酶活力均呈增强趋势(图 1, a-e)。SME-1 细胞培养过程是一个不断增殖、分化、选择和淘汰的过程,部分高分化、低繁殖力细胞被淘汰。我们分析了 G<sub>2</sub> + M 期细胞在 22、30、40 代龄细胞群体中所占的比例分别为 1.6%、2.2%、4.6%,表明细胞增殖能力不断加强<sup>[10]</sup>。LDH 同工酶主要功能是调节细胞内 NAD/NADH<sup>+</sup> 比例,从而对细胞内一系生化反应起调节作用;MDH 则是三羧酸循环主要酶类;EST 催化脂类水解;SOD 主要功能是清除细胞内的超氧化物阴离子。因此,几种酶活力增加,标志着细胞氧化丙酮酸、乳酸及脂类能力加强,产生较多能量供细胞生长、繁殖和适应环境的需要。

我们分析了 SME-1 细胞 DNA 指纹图,发现 15-30 代龄细胞内遗传物质稳定;50 代龄以上细胞基因组 DNA 序列变化极大,异倍化明显加快(另文发表),因此,进一步研究 SME-1 细胞同工酶的变化,不仅可以反映基因在体外的程序性表达,还可以从一定程度上把握 SME-1 细胞的遗传动向,为 SME-1 细胞的克隆化及其在生物工程等方面的研究提供生化资料。

**致谢** 本文实验是在李清漪副教授的指导下完

成的,特表感谢。

### 参 考 文 献

- 1 熊全沫. 鱼类同工酶谱分析(上)。遗传, 14(2):41-44。
- 2 Gbksman, R, G. Nimaik and P Rody. Comparison of aldolase isozymes in placenta, Hela cells and human fibroblast cultrues. *Enzyme (Basel)*, 1977, 22:416-419
- 3 Long, A. Regulation of CD3 expression in a protein kinase C isozymes-deficient T-cell line. *Immunology*, 1993, 80(4): 654-657
- 4 Tasaki, Yoko. Isozyme polymorphisnes in human diploid cell strains for research on cellular aging. *Exp. Gerontol.*, 1991, 26(5):441-452
- 5 Tokwa. Examination of Hela cell contamination of human cell lines derived from primary hepatomas using glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) and LDH. *Acta Med. Oodazyma*, 1989, 43(4):245-248
- 6 林信伟,熊全沫. 新银鱼属两种银鱼同工酶的比较研究. 武汉大学学报(自然科学版), 1991(3):121-124。
- 7 李亚南,毛树坚. 聚丙烯酰胺凝胶电泳对几种淡水鱼类培养细胞 LDH 同工酶分析. 中国细胞生物学论文摘要汇编. Vol 5:222.
- 8 王爱民,张晓岚,李红叶等. 黄兔尾鼠和草原豚鼠两种脂酶同工酶的比较分析. 遗传, 14(3):29-32。
- 9 朱蓝菲. 鱼类同工酶和蛋白质的聚丙烯酰胺梯度凝胶电泳法. 水生生物学报, 1992, 16(2):182-185。
- 10 洪锡钧,王明权. 南方鲇 SME-1 细胞系的建立及其生物学特性的研究. 西南农业大学学报(自然科学版), 1995, 17(5):419-422
- 11 朱蓝菲. 几种鲤科鱼类及杂交种的乳酸脱氢酶同工酶的比较. 水生生物学集刊, 1982, 7(4):542-545。
- 12 Johansson, G. Influence of Oxygen on the LDH isozyme pattern in Chang Liver Cells. *Exp. Cell Res.*, 1966, 43:95-97.

## A PRELIMINARY STUDY ON ISOZYME IN *SILURUS SOLDATOVIMERIDINALIS* AND SME-1 CELL LINE

LIU Yong HONG Xijun

(Dept. of life science, Southwest Normal University Chongqing 630715)

**ABSTRACT** Using polyacrylamide gel disc electrophoresis, the band patterns of LDH,  $\alpha$ -EST, MDH,  $\beta$ -EST and SOD isozyme of SME-1 cell line at different passage and epithelial tissue of *S. soldatovi meridinalis* have been studied. The results show that  $\alpha$ -EST and MDH isozyme electrophoretic patterns are significantly different in epithelial tissue of two month and twelve month old

individuals of *S. soldatovi meridinalis*. The isozymic activity is higher in the latter. A few isozymic patterns are the same, the major are different between SME-1 cell line and epithelial tissue. The electrophoretic patterns are dissimilar in SME-1 cells at different passage, and the isozymic activity increase when passage become higher, which conform to the metabolic change of the SME-1 cell line.

**KEY WORDS** Isozyme      *Silurus soldatovi meridinalis*      SME-1 cell line      Polyacrylamide  
disc electrophoresis