

幼年 and 成年小白鼠 LDH 与 SOD 动态变化的电泳分析*

侯建国 刘慧 牛屹东 邵伟

(天津师范大学生物系 天津 300074)

摘要 采用聚丙烯酰胺凝胶圆盘电泳分析方法,研究了幼年鼠和成年鼠睾丸乳酸脱氢酶(LDH)同工酶与超氧化物歧化酶(SOD)的酶带变化。观察结果表明,成年鼠睾丸的凝胶电泳胶条,多数显现六种 LDH 同工酶带,其中 LDH₅ 和 LDH₄ 占优势,LDH₁、LDH₂、LDH₃ 显带较弱,在正极端 LDH 的下面是第 6 条酶带,相当于 C 亚单位(LDH_c)的 C₄。幼年鼠睾丸的凝胶电泳胶条,只显现 LDH₁ 和 LDH₂ 两条同工酶带,以 LDH₁ 占优势。酶谱的变化说明,幼年鼠睾丸的 LDH 同工酶是以 B 基因表达为主,成年鼠睾丸的 LDH 同工酶则转变成以 A 基因表达为主。LDH_c 酶带的出现,表明成年鼠睾丸还有 C 基因的表达。睾丸 SOD 活性带变化提示,成年鼠睾丸的 SOD 带活性强于幼年鼠的活性,这与成年鼠睾丸的 SOD 不断地清除超氧化物自由基对精子发生过程的损伤有关。

关键词 小白鼠 睾丸 聚丙烯酰胺凝胶圆盘电泳 乳酸脱氢酶同工酶 超氧化物歧化酶

哺乳动物的发育从受精卵开始,通过细胞增殖和细胞分化,逐步发育成复杂的有机体。目前认为,细胞分化是在一个稳定基因库中有选择性的基因表达和产生特异性蛋白质和酶的结果。因而,LDH 同工酶做为探索哺乳动物细胞分化中有选择性基因表达的一种标志物,了解不同组织的特异性及其在发育中的变化,曾运用电泳分析方法进行过许多研究^[1]。Markert 等^[2]最早观察到哺乳动物胎儿组织的 LDH 同工酶谱是以 LDH₅ 和 LDH₄ 占的比例最大,随着发育逐步又被 LDH₁ 和 LDH₂ 占优势所代替。Kanungo 等进一步发现^[2],即使是成年大鼠的同一组织,也会因不同年龄而发生 LDH 同工酶谱的变化。而 Markert 和 Masters^[3]的研究证明,脊椎动物在胚胎期和成年期的各种组织,它们的 LDH 同工酶谱是不同的。

关于哺乳动物睾丸组织的 LDH 同工酶谱,以大鼠为例可显现出五种酶带^[4],但是在人的精液^[5]或从其它动物睾丸 LDH 分析中^[3],能看到第六种同工酶-X 带(LDH_c),它相当于 C₄。这条酶带的出现是同精母细胞分化和性成熟有关。有关小白鼠睾丸的 LDH 同工酶谱和不同

发育时期酶谱的变化,以及不同发育时期 LDH 同工酶谱与 SOD 酶带活性之间的关系,至今尚缺乏具体资料。

本文于 1995 年 4 月至 1996 年 2 月用凝胶电泳分析方法,深入研究了幼年 and 成年小白鼠睾丸 LDH 同工酶谱动态变化,及其组织 LDH 同工酶谱与 SOD 酶带变化的相关性。

1 材料和方法

1.1 实验动物 引自天津医科大学选育的津白 I 号近交系纯种小白鼠^[6],在本实验室已繁殖多代。实验用幼年鼠和成年鼠均为同胎的雄性鼠。幼年鼠是生后 21 天的雄鼠,体重 8~9g,经镜检睾丸内无精子;成年鼠是生后三个月的雄鼠,体重 24~25g,镜检睾丸内有大量精子。用幼年鼠和成年鼠各 8 只,共计 16 只。

1.2 睾丸匀浆的制备 在乙醚麻醉状态下剪开小鼠腹腔,摘出睾丸,用生理盐水洗除血污。每鼠称取睾丸 80mg,分别加入 20 倍体积的

* 天津市高等教育委员会资助项目;

第一作者简介:侯建国,男,27岁,助教;

收稿日期:1996-11-09,修回日期:1997-03-24

0.01mol/L 磷酸钠缓冲溶液(pH7.4)。在冰浴条件下匀浆,然后经 10 000 × g 离心,20 分钟,上清液保存在 4℃ 冰箱内,供电泳点样用。

1.3 辜丸 LDH 同功酶凝胶电泳 聚丙烯酰胺凝胶制备及电泳操作,按 Smith^[7]方法进行。酶液点样量 13μl/管,电极缓冲液是 Tris-甘氨酸,电泳仪为上海产品 Dy-1 型。电泳条件:电压 200V,电流强度 2mA/管,室温条件下泳动 4 小时。

辜丸 LDH 活力测定,用已制备的辜丸匀浆上清液进行 LDH 比色测定,按徐世康^[8]的方法操作。

1.4 辜丸 SOD 活性凝胶电泳 凝胶电泳操作和辜丸匀浆制备以及酶液点样,与 LDH 同功酶凝胶电泳相同。电泳后的胶条 SOD 活性显带,按 Beauchamp 和 Fridovich^[9]方法操作。

2 实验结果

2.1 幼年鼠和成年鼠辜丸的 LDH 同功酶带

2.1.1 成年鼠辜丸的凝胶电泳胶条,显色后多数能呈现五种不同类型 LDH 同功酶带,从负极端开始至正极端,酶带顺序是 LDH₅(A₄)、LDH₄(A₃B₁)、LDH₃(A₂B₂)、LDH₂(A₁B₃),最末是 LDH₁(B₄)。其中 LDH₅ 显带最宽,显色较深。LDH₄ 带宽略窄于 LDH₅,显色深度也不如 LDH₅(见图 1~2)。LDH₃、LDH₂ 和 LDH₁ 均为很窄的带,显色也比较浅淡,其中 LDH₃ 和 LDH₂ 较靠近。

另外,有些胶条显色后能呈现 6 条酶带,除通常的 5 条酶带之外,第 6 条酶带位于正极端(见图 1B 和图 2),文献中通常称之为“七”带,外观上是一条较窄的带,它被认为是 C 亚基组合的多聚体,相当于 LDH_c(C₄)。

2.1.2 幼年鼠辜丸的凝胶电泳胶条,显色后只呈现两条 LDH 同功酶带(见图 1 和图 2B),它们立于正极端处,相当于成年鼠的 LDH₁(B₄)和 LDH₂(A₁B₃)。两种同功酶带的宽度和显色情况,未见明显差别,外观上显带比较宽,不同于成年鼠辜丸的 LDH₁ 和 LDH₂ 的窄带,可见

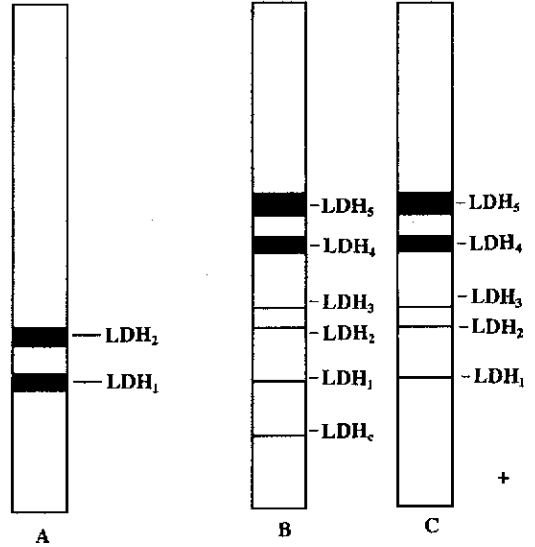


图 1 成年鼠和幼年鼠辜丸凝胶电泳 LDH 同功酶谱示意图

A. 幼年鼠辜丸,同功酶只显示 LDH₁ 和 LDH₂ 带; B 与 C 均为成年鼠辜丸,分别示同功酶 5 条和 6 条带。

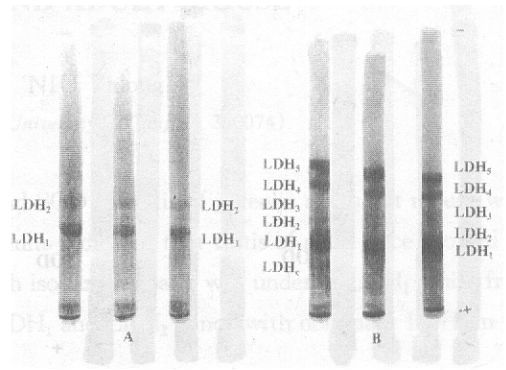


图 2 成年鼠和幼年鼠辜丸凝胶电泳的 LDH 同功酶谱

A. 示 3 只幼年鼠辜丸同功酶只显示 LDH₁ 和 LDH₂ 2 条带; B. 示 3 只成年鼠辜丸同功酶,在侧及中间有 LDH 同功酶 5 条带,左侧有 LDH 同功酶 6 条带。

幼年鼠和成年鼠辜丸的 LDH₁ 和 LDH₂ 之间,在酶量方面不一样。

2.2 幼年鼠和成年鼠辜丸的 LDH 活性 实验结果(见表 1)。

表 1 成年鼠和幼年鼠睾丸 LDH 的活性情况

组别	鼠数	LDH(O·D) ($\bar{X} \pm S \cdot D$)	酶活性(U)
三个月成年鼠	4	0.276 ± 0.007	625
21天幼年鼠	4	0.157 ± 0.018	125

从表 1 测定的数据说明,成年鼠睾丸的 LDH 活性显著高于幼年鼠,例如成年鼠睾丸的 LDH 活性平均为 625 活力单位,而幼年鼠仅是 125 活力单位。这一现象和凝胶电泳的显带是吻合的,即成年鼠睾丸的凝胶电泳可显出 5~6 条酶带,而幼年鼠只显两条酶带。

2.3 成年鼠和幼年鼠睾丸的 SOD 活性显带

2.3.1 成年鼠睾丸的凝胶电泳胶条经 SOD 活性显带后,在暗色背景上于近正极端一侧,呈现出一条透明的 SOD 带(见图 3A)。各鼠的睾丸 SOD 带宽度基本一致,说明它们的 SOD 活力大体相同。

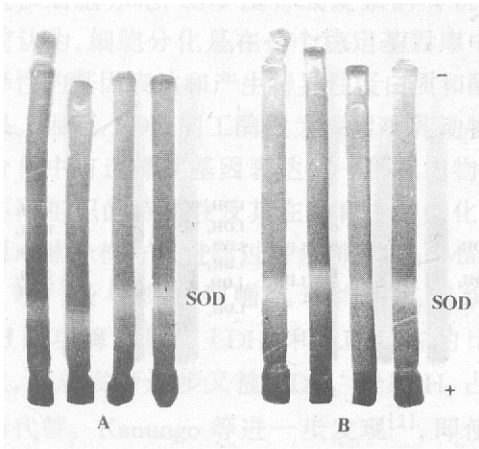


图 3 成年鼠和幼年鼠睾丸凝胶电泳的 SOD 活力显带酶谱 A.4 只幼年鼠睾丸每一酶谱也只有一条 SOD 活性带,但带宽及透明度弱于成年鼠;B.4 只成年鼠睾丸,每一酶谱只有一条 SOD 活性带为透明带。

2.3.2 幼年鼠睾丸的凝胶电泳胶条经 SOD 活性显带,在暗色背景并于近正极端一侧的同样区域,也呈现一条 SOD 带(见图 3B),但是带的宽度和透明度均弱于成年鼠睾丸的 SOD 带,说明幼年鼠睾丸的 SOD 活性不如成年鼠。

3 讨论

同功酶,是酶的一种不同分子形式。现已知 LDH 同功酶是催化丙酮酸和乳酸的相互转换,它在二倍体基因组中,由 A 和 B 两个独立基因座编码产生 A 和 B 两种亚单位的四聚体,并按不同比例相互结合产生五种同功酶。一些证据表明^[2~3],以 A 亚单位占优势的同功酶——LDH₅ 和 LDH₄,在低氧压条件时生成,故称肌肉型(M);以 B 亚单位占优势的同功酶——LDH₁ 和 LDH₂,在氧压升高时产生,故称心型(H)。因此一些学者^[2~4],以 LDH 同功酶做为了解不同组织特异性的标志物,对需氧组织和厌氧组织的 LDH 同功酶谱及其不同发育时期的变化,曾进行了广泛的研究,有些组织的 LDH 同功酶谱情况,至今尚不十分清楚。

根据本文对幼年鼠和成年小白鼠睾丸组织 LDH 同功酶谱的电泳分析,证明生后 21 天幼年鼠的睾丸 LDH 同功酶谱只存在 LDH₁ 和 LDH₂ 酶带(见图 2B),表明它们是以 B 亚单位占优势,属于心型,因幼年鼠睾丸还处在生长和发育阶段,需要充足的有氧代谢提供能量,因此这阶段 B 基因处于启动状态。现已清楚了解到^[10],即使是生后 24 天的幼年小白鼠,睾丸内实心曲精小管才开始空腔化,刚见有精细胞,但尚未形成精子。成年鼠睾丸内曲精小管的生精上皮,始终处于周期性地形成精子过程,并且在睾丸内储存有大量的活动精子。为了避免在睾丸内产生过量对精子的损伤超氧化物自由基,以无氧酵解方式为精子形成提供能量更为有利。所以成年鼠睾丸的 LDH 同功酶谱出现以 LDH₅ 和 LDH₄ 酶带占优势(见图 2A),故属于肌肉型,A 基因处在启动状态。

在我们观察到的成年鼠睾丸的 LDH 同功酶谱中,有的电泳胶条显示 6 条酶带,即出现一条位于近正极端的 X 酶带。有人认为^[3],X 带是第三个基因,即基因表达的亚单位四聚体——LDH_c(C₄),它与精母细胞分化有关,因此只有在成年动物睾丸的 LDH 同功酶谱中才出现 X 带。

在比较成年鼠和幼年鼠睾丸的 SOD 活性酶带中,发现成年鼠的睾丸 SOD 酶带活性强于幼年鼠(见图 3),它与保护精子有关。据知^[1],机体内 SOD 活性与需氧量有关;对氧耐受的生物, SOD 含量较低,组织中 SOD 活性越高,防御超氧自由基的能力强。因为存在于机体内抗氧化保护体系的 SOD 可对超氧化物自由基进行歧化反应,消除其对细胞的损伤作用。由此可见,睾丸内 SOD 水平一定程度上能反映出精子的质和量的变化^[5]。

参 考 文 献

- 1 Maclean, N. The differentiation of cells. Edward Arnold, 1977. (严绍颐译. 北京:科学出版社,1982. 31~34.)
- 2 Kanungo, M. S. Biochemistry of ageing. Academic press, 1980. (陆中定等译. 北京:人民卫生出版社,1985. 129~134.)
- 3 Rider, C. C., C. B. Taylor. Isoenzyme. Chapman and Hall, 1980. (范培昌译. 北京:科学出版社,1987. 35~49.)
- 4 季汝祺. 细胞遗传学若干问题的探讨. 北京:北京大学出版社,1986. 56~67.
- 5 张秀成. 精子检测与分离. 北京:北京科学技术出版社,1993. 62~64;152~160.
- 6 李 漪,林炳水,李 华等. TAI 小鼠的生物学特征. 上海牧医通讯,1983,3(2):77~80.
- 7 Smith, I. Chromatographic and Electrophoretic Techniques. London. 1976. 2210~249.
- 8 徐世康. 临床生化检验. 上册. 上海:上海科学技术出版社,1979. 314~316.
- 9 Beauchamp, C., I. Fridovich. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide Gels. *Analytical Biochemistry*, 1971, 44, 276~287.
- 10 俞慧珠,叶百宽. 小白鼠胚胎发生. 北京:科学出版社,1985. 83~85.
- 11 郑荣梁. 自由基生物学. 北京:高等教育出版社,1992. 30~67.

ELECTROPHORIC ANALYSIS ON THE CHANGES ON LACTIC DEHYDROGENASE ISOENZYME AND SUPEROXIDE DISMUTASE IN TESTIS OF JUVENILE AND ADULT MOUSE

HOU Jiangguo LIU Hui NIU Yidong

(Department of Biological, Tianjin Normal University Tianjin 300074)

ABSTRACT A study of isoenzyme band changes on LDH and SOD in testis of juvenile and adult mouse were carried out using acrylamide gel disc electrophoresis. The results indicated that testis of adult mice showed six kinds of bands with obvious LDH₅ and LDH₄ bands. The sixth isoenzyme band was under of LDH₁ which from C sub unit LDH₄ of C₄. The testis of juveniles showed only LDH₁ and LDH₂ bands with dominant LDH₁ in the electrophoretic band.

Corresponding to the a change of isozyme patterns indicated that LDH isozyme of juvenile testis showed mainly expression of B gene, LDH isozyme of adult showed mainly expression of A gene, sixth LDH isozyme band of adult testis indicated expression of C gene. The SOD activity band of testis suggested that the SOD activity of adult mice was stronger than that of childhood mice. This is possibly related to the testis of adult SOD eradicates constantly the injury to of sperms by free radical of superoxide.

KEY WORDS Mouse Testis PAGE Lactic dehydrogenase-isoenzyme Superoxide dismutase