

稀土对大鼠6种组织中乳酸 脱氢酶同工酶谱的影响^{*}

刘江燕 苏国钧 雷衡毅 苏应娟 王 艇 杨燕生

(中山大学化学与化学工程学院 生物化学系, 广州 510275)

摘 要 采用聚丙烯酰胺凝胶电泳技术,研究了含不同浓度硝酸铈饲料喂养大鼠,对大鼠体内6种组织(心、肝、肾、骨骼肌、胃和血)中乳酸脱氢酶同工酶谱的影响。结果表明:硝酸铈对血、肝、肾中乳酸脱氢酶同工酶谱的有正相关性影响,其中对肝、肾中乳酸脱氢酶活性有弱激活作用,而对血中乳酸脱氢酶谱则有较强激活作用;硝酸铈对心、骨骼肌酶谱有较大的负相关性影响,既对乳酸脱氢酶有一定的抑制作用。胃中硝酸铈不仅有激活乳酸脱氢酶的作用,还有刺激产生新酶谱带的现象,硝酸铈浓度在 $100\sim 200\mu\text{g/g}$ 对乳酸脱氢酶同工酶谱已有较明显的影响。

关键词 稀土, 大鼠组织, 乳酸脱氢酶

分类号 Q 504

稀土在养殖业中普遍用作动物饲料的添加剂,已从宏观上证明具有十分明显的促生长作用^[1],但长期以来一直没有解决的稀土毒性问题使稀土的应用受到了一定的限制。最近有人提出稀土矿区儿童智商明显低于非稀土区儿童智商^[2],可能与稀土进入体内后影响多种体内酶活性进而间接影响到大脑的能量供应有关。有关稀土进入人及动物体后的作用机理、生理生化变化以及稀土对生物体内代谢过程,特别是对生物体内酶系统的影响,研究得还不很清楚。

已有的研究主要集中在体外和离体的情况下,稀土对组织培养细胞的酶的作用以及稀土化合物对某些酶(如 Ca^{2+} - Mg^{2+} /ATPase, Cu^{2+} - Zn^{2+} /SOD)的结构、功能、结合位点及活性的影响^[3]。此外还有人研究了稀土及其化合物对动物内分泌、蛋白质及DNA等的结构和功能的影响^[4,5],但直接考察稀土对活体动物体内酶系统影响的研究还不多见。

同工酶能很灵敏地反映出生物体代谢过程的改变,是医学诊断中常用的生理生化指标,乳酸脱氢酶就是其中一种重要的诊断酶,它广泛存在于动物细胞的可溶性部分中。本文采用聚丙烯酰胺凝胶电泳技术对喂食含不同浓度 Ce^{3+} 的饲料后大鼠的5种主要器官乳酸脱氢酶同工酶的酶谱进行比较,初步研究了稀土对大鼠体内乳酸脱氢酶同工酶含量及活性的影响。

^{*} 国家自然科学基金 (29671034) 和广东省自然科学基金 (960048) 资助项目

收稿日期: 1997-04-16 刘江燕,男,34岁,讲师,中山大学访问学者,现在湖北民族学院化学系

1 材料和方法

1.1 稀土饲料的调制

稀土氧化物 CeO_2 购自珠江冶炼厂, 纯度不低于 99.95%. 通过盐酸溶解, 草酸沉淀, 再经硝酸处理后, 用 EDTA 标定其浓度, 动物标准饲料购自广东省动物实验场, 按饲料重量将稀土溶液分别喷洒于标准饲料上, 配制成 0, 20, 50, 100, 200, 300, 500, $800 \mu\text{g/g}$ 浆料, 搅拌均匀, 成型后烘干备用.

1.2 实验动物的饲养

实验用大鼠购自广东省实验动物厂 (批号: 960021A), 将大鼠随机分为 8 组, 每组 10 只, 其中 A 组为对照组, 其余各组分别饲喂含硝酸铈为 20, 50, 100, 200, 300, 500, $800 \mu\text{g/g}$ 的饲料, 自然进食和饮水, 饲养期 3 个月.

1.3 酶提取液的制备

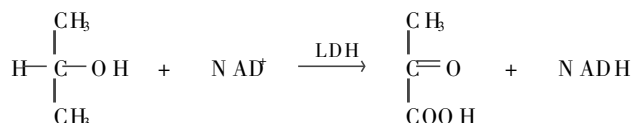
采用断头活杀法, 将收集的血于 35°C 保温 15 min, 待血清充分渗出后, 在 $4\,000\text{ r/min}$ 下离心 10 min, 取上层清液为酶提取液. 取大鼠的心脏、肝脏、肾脏、肌肉、胃等器官或组织, 用冷蒸馏水洗去表面血污, 液氮冷冻后, 按 $m(\text{器官}): V(\text{蔗糖溶液}) = 1:1$ 加入 20% 蔗糖 (内含少量溴酚蓝) 于研钵 (冰浴) 中, 研磨破碎细胞, $10\,000\text{ r/min}$ 的转速下离心分离 10 min, 取上清液 (即酶提取液) 于冰箱保存备用.

1.4 聚丙烯酰胺凝胶电泳

按文献 [6] 法, 制备 6% 的分离胶, 进行预电泳后, 再制备 3% 的浓缩胶, 分别取不同组别大鼠的同一器官的酶提取液 $20\sim 30\mu\text{L}$ 点样, 在 $40\sim 50\text{ mA}$ 的电流下恒电流电泳 $4\sim 5\text{ h}$, 至指示剂距下端 1 cm 时停止电泳, 取下胶板, 按文献 [6] 法染色, 所得电泳图谱见图 1.

2 结果与讨论

乳酸脱氢酶是糖类代谢中的必需酶, 几乎存在于脊椎动物的所有细胞中, 是胞液的标志酶. 它催化乳酸脱氢变成丙酮酸



哺乳动物 LDH 一般有 5 种同工酶, 按向阳极电泳速度的快慢可以依次编号为 LDH1, LDH2, LDH3, LDH4 和 LDH5. 这些同工酶都是 4 条肽链组成的四聚体, 由 2 种不同的亚基 (肽链) α 和 β 构成, 这 2 个亚基分别由 A 基因和 B 基因控制.

由同工酶谱图可见, 在不同浓度稀土的饲料喂养下, 大鼠体内各器官中的乳酸脱氢酶同工酶的活性有所差异.

(1) 在心脏中乳酸脱氢酶的 LDH 谱带强度随喂养稀土浓度的升高快速减弱趋势, 在稀土浓度为 $50\mu\text{g/g}$ 以上时 LDH 谱带强度几乎检测不到; LDH2 谱带的情形基本与之类似, 稀土浓度为 $100\mu\text{g/g}$ 以上时 LDH2 谱带强度已明显减弱; 稀土浓度为 $200\mu\text{g/g}$ 以上时 LDH3 活性也已明显减弱. 这些结果显示, 随着喂养稀土浓度增高, 稀土可以对大鼠心脏的乳酸脱氢酶起明显抑制作用.

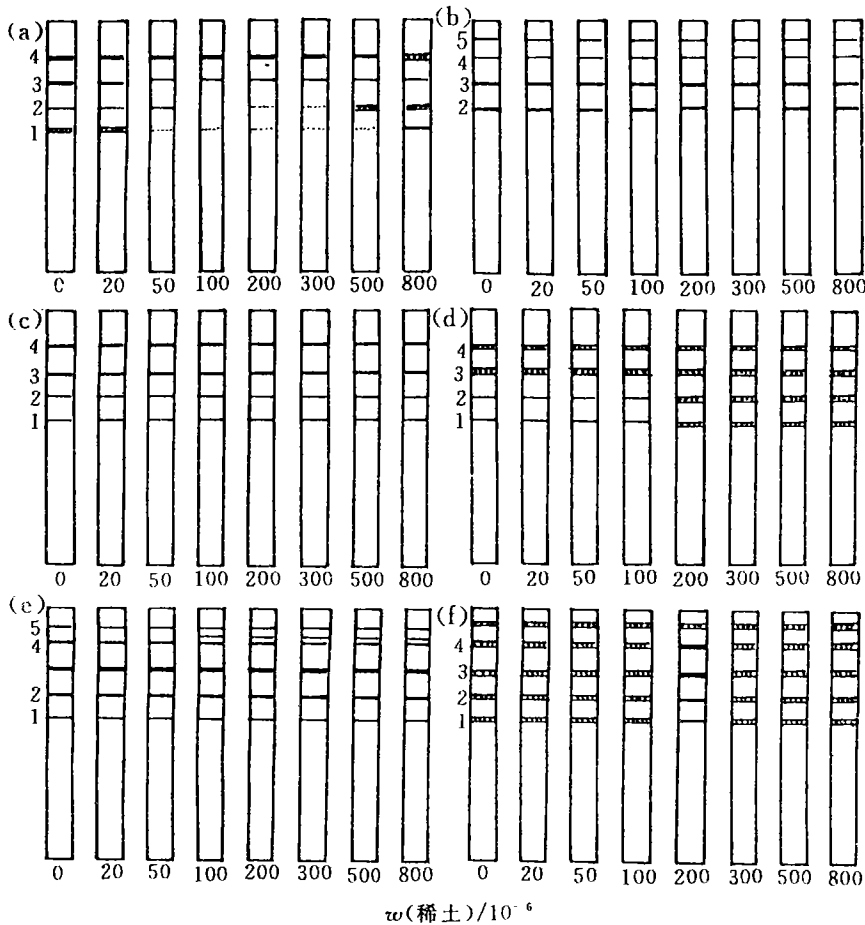


图1 乳酸脱氢酶同工酶谱 (正极在下)

(a) 心脏; (b) 肝脏; (c) 肾脏; (d) 骨骼肌; (e) 胃; (f) 血

(2) 与心脏情况不同,在肝脏中稀土对大鼠乳酸脱氢酶有一定激活作用,随着喂养稀土浓度增高,大鼠肝脏的乳酸脱氢酶 LDH2~ LDH5呈弱激活趋势,其中稀土组的 LDH5谱带强度比对照组的有明显增强.但从 0~ 800 μ g/g 组酶谱表明,稀土对大鼠肝脏中乳酸脱氢酶同工酶谱带的位置及谱带数均未有明显差异.

(3) 在肾脏中,随着喂养稀土浓度增高,稀土对大鼠肾脏中乳酸脱氢酶略有激活作用,其影响主要发生在 LDH3和 LDH4谱带上.而各组酶谱表明,稀土对肾脏中乳酸脱氢酶同工酶谱带的位置及谱带数均未有明显差异.

(4) 稀土对骨骼肌中乳酸脱氢酶的影响与心脏中情况相类似,既随着喂养稀土浓度增高,大鼠骨骼肌中的乳酸脱氢酶 LDH1~ LDH4呈减弱趋势,其中主要以 LDH1和 LDH2谱带受影响较明显.随浓度升高,稀土含量为 100 μ g/g和 200 μ g/g开始,LDH1和 LDH2显示出明显的抑制作用.骨骼肌中的 LDH1主要催化丙酮酸加氢,起丙酮酸加氢酶的作用,以保证骨骼肌在缺氧的情况下,从酵解途径中获得大量的能量,LDH1的减少无疑会对其活动能

力产生一定的影响. 从大鼠的宏观行为上看确实存在这种影响.

(5) 在胃中乳酸脱氢酶的 5 条同工酶带都能看到, 其中 LDH₁~LDH₄ 这 4 条谱带强度较大, 随稀土浓度升高, 胃中乳酸脱氢酶同工酶的略有加强, 其中 LDH₄ 加强趋势较为明显. 与其它器官不同的是, 在胃中随稀土浓度升高, 乳酸脱氢酶同工酶 LDH₄ 与 LDH₅ 之间出现一条新谱带 LDH₅; 其强度与稀土浓度有明显的正相关性.

(6) 在血液中随着喂养稀土浓度增高, 稀土对大鼠肾脏中乳酸脱氢酶略有激活转向抑制的作用过程, 其转向峰位与 $200 \mu\text{g/g}$ 稀土浓度组相对应, 其中 LDH₁, LDH₂ 和 LDH₃ 谱带变成情况非常明显. 在现代医学中, 血液乳酸脱氢酶同工酶谱对多种疾病具有诊断性价值. 临床证明: 凡患有肝炎、心肌梗塞症、肺梗塞症充血性心力衰竭及某些恶性肿瘤等, 此酶活性水平较正常值高出 6~10 倍, 尤其是患异常癌症或肺癌以及恶性贫血症的人, 此酶活性水平较正常值要高出更多倍.

总结上述结果可以发现: 稀土对大鼠体内乳酸脱氢酶的影响因器官而异. 其中稀土对肝、肾中同工酶酶谱的影响相对较小, 在这些器官中对部分同工酶活性有一定的激活作用; 而对心、肌肉酶谱的影响相对较大, 且多数是起抑制乳酸脱氢酶活性的作用, 稀土抑制浓度在 $100 \sim 200 \mu\text{g/g}$ 左右. 对胃中乳酸脱氢酶的影响则表现为不仅有激活作用, 还有刺激产生与稀土浓度有明显的正相关性的新 LDH₅ 的现象.

乳酸脱氢酶是一种广泛存在于动物体各种器官中的含锌酶, 它是由相对分子质量约为 35 000 的 2 种亚基组成的四聚体. 它们在体内主要催化丙酮酸和乳酸之间的氧化与还原反应, 是糖的无氧酵解的重要酶系之一. 同时, LDH 还有维持细胞内 NAD^+/NADH 比值衡定的生理功能, 从而影响到细胞的各种代谢反应. 大鼠体内各器官中乳酸脱氢酶同工酶酶谱的上述变化无疑会对其体内的氧化还原反应、生理活动所需能量的获取及其生理代谢产生重要的影响. 特别是稀土对肌肉及胃中 LDH 酶谱的影响, 在我们研究的浓度范围内呈线性关系, 稀土浓度越大, 其对 LDH 酶同工酶活性的抑制作用越显著, 这将会影响到大鼠肌肉及胃在剧烈运动后氧气供应不足时进行的葡萄糖的无氧酵解过程, 从而在宏观上对其耐力等产生十分重要的影响. 此外, 由于大鼠与人不仅同属哺乳动物类, 而且大鼠与人基因有许多相似性. 故上述大鼠各器官中乳酸脱氢酶同工酶谱带的变化很值得人们注意和进一步研究.

参 考 文 献

- 1 郭伯生. 农业中的稀土. 北京: 中国农业科学出版社, 1988. 8
- 2 朱为方. 稀土区儿童智商调查研究. 科学通报, 1996, 41 (10): 914~916
- 3 Gschneidner K A Jr, Eyring L. Handbook on the physics and chemistry of rare earths, 1990. 431
- 4 张金红, 魏继中, 吴隼平, 等. 稀土离子对红血细胞中 ATPas 的影响. 中国稀土学报, 1993, 11 (2): 163~167
- 5 倪嘉瓚. 稀土生物无机化学. 北京: 科学出版社, 1995
- 6 胡能书, 万国贤. 同工酶技术及其应用. 长沙: 湖南科学技术出版社, 1985

Effects of Rare Earth Ion Ce^{3+} on the Lactate Dehydrogenase Isozyme Patterns of Six Mouse Organs

Liu Jiangyan^{} Su Guojun Lei Hengyi Su Yingjuan Wang Ting Yang Yansheng*

Abstract Effect of rare earth ion Ce^{3+} on the lactate dehydrogenase isozyme patterns of six organs of mouse (heart, liver, kidney, muscle, stomach) were investigated by utilizing PAGE methods. The results indicated Ce^{3+} not only can make some LDH bands deleted but also can induce some new bands. Under the action of Ce^{3+} , the shades of some LDH bands were changed and the shade variations were different from organ to organ. In the muscle, it appeared the shade of LDH bands was related to the rare earth concentration in the feed. Rare earth can affect the muscle LDH patterns widely and apparently.

Keywords rare earth, mouse organs, LDH isozymes

* School of Chemistry and Chemical Engineering, Zhongshan University, Guangzhou 510275