

小鼠睾丸发育中乳酸脱氢酶 C₄ 个体发生的研究

陈燕翔 梁志国

(国家计划生育委员会科学技术研究所,北京,100081)

当小鼠睾丸中精母细胞开始发育成熟时,睾丸特异酶乳酸脱氢酶 C₄(LDH-C₄) 也开始合成。从出生到间质细胞分化完成的一段时间里, LDH-C₄ 活性还检测不出来,当体重长到 8 克,睾丸重长到 15 毫克时, LDH-C₄ 开始出现。此时约为小鼠出生后 15 天。出生后 15—25 天,睾丸生长、分化迅速。同时, LDH-C₄ 活性也显著增加。组织化学研究表明, LDH-C₄ 活力主要分布在靠近睾丸曲细精管管腔细胞中。

关键词: 小鼠,乳酸脱氢酶 C₄, 个体发生

体细胞组织乳酸脱氢酶的 5 种同工酶通常存在于脊椎动物,特别是哺乳动物和鸟类中,虽然所有 5 种同工酶并不同时等量存在于各种组织中,但对于某一种特定组织的发育状态,各个同工酶的发生和含量却是相对恒定的。而睾丸特异的乳酸脱氢酶 C₄(LDH-C₄) 在电泳性质、热稳定性和动力学性质上都有别于 LDH-A₄、LDH-B₄ 等其它同工酶^[1]。LDH-C₄、LDH-A₄ 和 LDH-B₄ 的合成分属于 3 个不同的基因 (*Ldh-C*、*Ldh-A* 和 *Ldh-B*) 控制^[1], *Ldh-C* 仅在精子发生的特定阶段才表现出活性。我们用 α -酮戊二酸、 α -羟基戊酸作为 LDH-C₄ 的特异性底物,确定了 LDH-C₄ 合成发生的较准确的时间。并通过分光光度法、电泳和组织定位的方法对昆明小鼠睾丸特异的 LDH 的个体发生进行了研究。

材料和方法

(一) 小鼠 从中国科学院动物研究所购买。动物在我实验室饲养适应后,按 1:3(♂:♀) 交配,雄雌合笼 5 天后分离饲养。从孕鼠产仔日起,每隔 5 天取雄幼鼠 5—8 只,称重,剖取睾丸称重,以备分析用。连续采样至出生后 60 天。

(二) LDH 同工酶酶液的制备 从昆

明小鼠中剥离出睾丸,以 1:4(w/v) 加入 0.1 mol/L, pH6.0 的磷酸盐缓冲液,匀浆,15,000 rpm (4℃) 离心 30 分钟,取上清液供测定酶活性和电泳分析用。

(三) LDH-C₄ 的活性测定及特异染色方法 参照陈啸梅^[1] 的方法。特异染色时,将乳酸换成 α -羟基戊酸。

(四) 蛋白质含量测定 参照徐宜为方法^[2]。

(五) 组织定位 取新鲜的小鼠睾丸,经冷冻切片(4 μ m)后,贴于载玻片上,加特异染色液,37℃ 避光染色 20 分钟,水洗,甘油封片,光镜观察和拍照。

结 果

(一) 小鼠 LDH 活力、体重和睾丸重的变化

为了正确的分析 LDH 同工酶的个体发生,我们连续观察了出生后两个月中小鼠体重和睾丸重的变化情况(图 1)。出生后 10 天体重和睾丸重开始逐渐增加,到 15 天后生长速度明显加快,25 天后生长速度减缓。与此生长速

Chen Yanxiang et al.: The Ontogenesis of Lactate Dehydrogenase C₄ in Mouse Testes
本文于 1989 年 11 月 2 日收到。

度变化相对应, LDH-C₄ 活力在出生后第 10 天甚低,而在第 15 天就可测出明显的 LDH-C₄ 活性,此后, LDH-C₄ 活性显著增加,到 25 天后基本保持恒定,其相应的辜丸重量和体重分别为 15—100mg 和 8—22g。而总活力始终基本保持恒定(图 2)。由电泳图谱(图 3)中也可以看出, LDH-C₄ 的发生,在小鼠出生后第 15—17 天开始, 25 天后, LDH-C₄ 活力基本保持恒定。

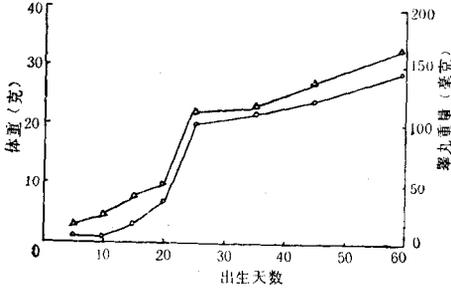


图 1 辜丸重和体重的生长曲线
△: 体重; ○: 辜丸重。

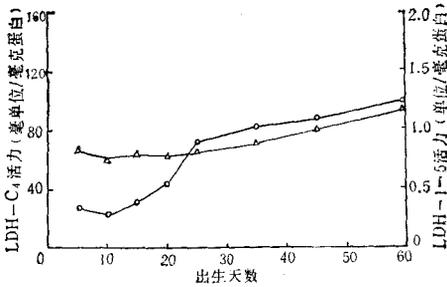


图 2 小鼠 LDH 活力与鼠龄的关系
△: LDH 总活力; ○: LDH-C₄ 活力。

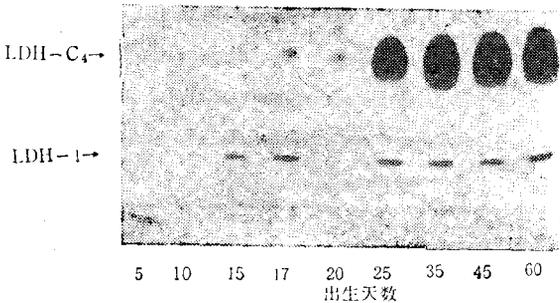


图 3 LDH-C₄ 带的聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱
从左到右数字分别为小鼠出生后 5—60 天的,酶染色底物为特异底物羟基戊酸。

(二) LDH-C₄ 的组织化学定位

为了将 LDH-C₄ 的个体发生与辜丸中特定的细胞形态联系起来,我们研究了 LDH-C₄ 在辜丸组织中的定位。用 LDH-C₄ 的特异底物 α -羟基戊酸的特异染色液染色的结果表明,在出生后 15 天前的辜丸切片中,无 LDH-C₄ 特异反应的产物甲臍沉淀产生(图 4A),而成熟的小鼠辜丸切片中有色度较深的甲臍沉淀,表明 LDH-C₄ 活力较强,且反应都发生在曲细精管管腔周围(图 4B)。而管腔周围的细胞都是初级精母细胞和次级精母细胞。管腔周边细胞和间质细胞部分无甲臍沉淀可见,表明尚无 LDH-C₄ 产生。

讨 论

国内近年来有少量对 LDH-C₄ 研究的报道^[1,3,4],其主要是对成熟的人精子、小鼠辜丸中 LDH-C₄ 的研究。但 LDH-C₄ 的个体发生却只是在国外有少量报道^[9,11]。本文旨在把 LDH-C₄ 的生物合成与精子发生过程中细胞分化的特定形态联系起来。

在新生小鼠辜丸中,绝大多数细胞都是未分化的精原细胞,而从精原细胞向精母细胞转化的过程是突发的,在出生后 8—10 天,辜丸管腔中 87% 的细胞都是减数分裂前的精原细胞。性成熟(即附辜中出现成熟精子)发生在出生后约 30 天,此时辜丸管腔中各类细胞的比例近乎趋于恒定。在新生小鼠中,辜丸精细管之间与雄激素产生有关的间质细胞为数甚少,但出生之后,这些细胞立即成倍增加,到出生后第 15 天这种情况才算结束^[8]。因此,可以推断,此后的细胞分化是与精子发生联系在一起的。

辜丸中 LDH-C₄ 的出现与精子发生有着密切联系。LDH-C₄ 活力的变化与曲细精管中细胞分化的变化是相对应的,精原细胞中无 LDH-C₄ 活力。出生后 15—25 天,精原细胞迅速向精母细胞转化,同时, LDH-C₄ 活力也在出生后 15—25 天内出现并快速增长。可见在精原细胞向精母细胞转化的特定时期, *Ldh-c* 基因的激活启动了 C 亚基的合成。

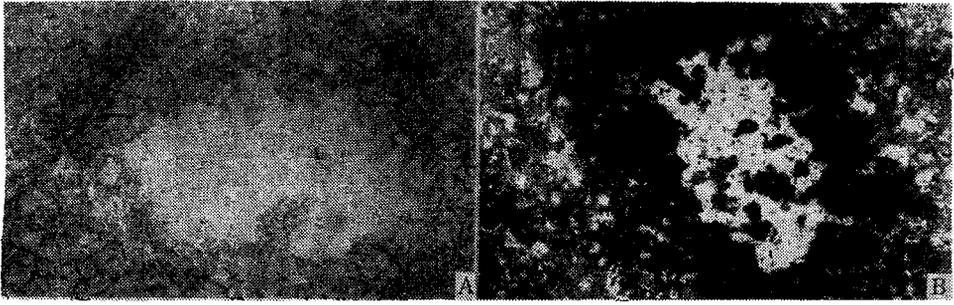


图4 小鼠成熟前后 LDH-C₄ 的个体发生与睾丸中特定的细胞形态

A. 出生 14 天的睾丸切片,经底物 α -羟基戊酸染色,无反应发生($\times 720$); B. 成熟小鼠的睾丸切片,经底物 α -羟基染色后的活力分布,在曲精细管管腔和周围有颜色很深的甲臍沉淀、距离管腔远的部位无反应发生($\times 720$)。

有足够的证据表明,在发育过程中,某一组织或器官的 LDH 酶组成会发生有序的变化。这种变化的发生伴随着构成 LDH-1 至 LDH-5 的 A、B 两亚基合成比例的改变^[6]。小鼠的许多组织在发育过程中每一 LDH 同功酶的相对含量也有变化。但对小鼠睾丸组织来说,并不这样,在小鼠睾丸中,这些酶的相对含量是恒定的,而且它们的动力学性质和比活性也不随生长的进行而发生变化。这表明,在小鼠或其它含 LDH-C₄ 的动物中,有一种高度特异的分化调控机制来调节精母细胞 LDH-C₄ 的合成,而不是简单地改变其亚基合成的不同比例。精母细胞中 LDH 生物合成的控制是通过抑制 A、B 两亚基的合成和激活新的精子特异的亚基的合成得以实现的。LDH 基因激抑的分子机制是什么,这是有待回答的一个问题。

LDH-C₄ 基因的启动仅仅在雄性发育的特定阶段才表现出来,并在睾丸发育和精子发生过程中有严格的时空特异性^[7],该基因活性的表现,严格发生在精母细胞粗线期后期,而且仅在雄性生殖细胞内表达,在雌雄动物的体细胞组织内均无发现。因此,LDH-C₄ 基因表达和

调控的研究是了解生殖过程中生化机理的一个理想模型。小鼠 LDH-C₄ cDNA 已经克隆^[10], LDH-C₄ cDNA 探针的获得为进一步研究精子发生特定阶段中 LDH-C₄ 基因的分化表达提供了有效手段。这一问题的深入研究,对于揭示精子发生过程的奥秘以及生育调节的实际应用具有重要的理论意义和应用前景。

参 考 文 献

- [1] 陈啸梅等: 1983. 中国医学科学院学报, 5(4): 223—226。
- [2] 徐宜为: 1979. 实验免疫学技术, 科学出版社, 第 199 页。
- [3] 谭委民等: 1985. 临床检验杂志, 3(2): 4—6。
- [4] 宋宝良等: 1988. 中华医学检验杂志, 11(6): 321—324。
- [5] Blackshaw, A. W. and J.S.H. Elkington: 1970a. *J. Reprot Fert.*, 22:69—75。
- [6] Dawson, D.M.et al.: 1964. *Science*, 143:929—933。
- [7] Goldberg, E.: 1977. *In: Isozymes, Vol I: Current Topics in Biological and Medical Research*, Academic Press, New York, pp. 79—124。
- [8] Hitzeman, J. W.: 1962. *Anat. Rec.*, 143:351—361。
- [9] Wieben, E.D.: 1981. *J. Cell Biol.*, 88: 492—498。
- [10] Wu, K. C.: 1987. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 146: 964—970。
- [11] Zinkham, W.H. et al.: 1964. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 121:571—588。