Journal of the Pharmaceutical Society of Korea
13, 101~110 (1969)

# 亞黃酸가스에 露出된 白鼠組織 Lactic dehydrogenase의 Isozyme 變化에 關한 硏究

權 肅 杓

## Sook Pyo Kwon; A Study on the Isozyme Alterations of Lactic Dehydrogenase in the Tissues of Albino Rat by the Exposure in Sulfur Dioxide.

(Received Nov. 17, 1969)

The isozyme alteration of lactic dehydrogenase in the tissues of albino rat inhaled $SO_2$ were studied in vivo and in vitro, with the following results:

(1) The H-type of LDH activity relatively dominated in the normal brain, heart and kidney tissues of rat, M-type in the normal lung, liver, and muscle tissues of the animal.

(2) When rats inhale $SO_2$ in the concentration of 250 ppm, it appears that the M-type tends to predominate in the anaerobic tissues such as liver, kidney and muscle tissues and the H-type in the aerobic tissues such as brain and heart tissues.

(3) When 5% $SO_2$ is introduced into tissue homogenates, LDH activities in the heart, lung, liver and muscle tissues are increased more than that of introducing room-air only.

With same treatment, LDH activity is decreased in the kidney tissue and no alteration is observed in the brain tissue.

(4) Although, after the aeration of $SO_2$, the oxygen tension seems to bring decreases in the level of LDH activity in the anerobic tissues such as liver and muscle tissues, while, on the other hand, increases in the level of the activity in the aerobic tissues, such as the brain, heart and lung tissues.

(5) Accordingly, $SO_2$ affects LDH activities, its isozyme pattern of each organs, and their metabolic pathway by its absorption of the gas.

## 緖 論

刺戟性 有害 gas의 生體에 미치는 影響에 대해서는 여러 報告가 있다. 即 動物體를 Ozone에 露出시키면 肺의 alkaline phosphatase와 Succinic dehydrogenase의 活性이 低下되는 反面에 血淸中에서는 增加된다는 報告[1]가 있고 $NO_2$ gas에 대해서 mormot는 肺뿐 아니라 胃腸

*College of Medicine, Yonsei University

組織에서도 經時的으로 $QO_2$ 價가 增加하는 同時에 肺의 aldolase 活性이 顯著히 增加하는 한편 Lactic dehydrogenase (LDH)의 M 型은 減少되고 反對로 H 型이 增加된다함은 Buckley[2)3)] 등이 밝힌 바 있다.

또 Markert 等[4)]은 silica dust에 露出시킨 mormot의 肺에서는 Succinic dehydrogenase와 Succinic oxidase의 活性이 增加되고 反對로 Cytochrom c oxidase의 活性은 減少됨을 觀察하였다.

이와같이 有害 gas에 吸入시킨 動物에서는 組織障害에 앞서서 各組織의 酵素活性에 대한 適應的인 變化가 比較的 빨리 招來됨이 알려져 있다. 따라서 이러한 有害 gas를 吸入시킨 試驗動物의 組織에 있어서의 各種 酵素뿐만아니라 어떤 特定酵素의 變化에 對한 調査는 그 gas의 毒性判斷에 있어서 銳敏한 하나의 指標가 되리라고 思料된다.

$SO_2$ gas는 $NO_2$ gas와 같이 普遍的 空氣汚染物質로서 呼吸器疾患등에 대해 높은 相關性이 있음이 밝혀진 바 있다.[5)]

著者는 $SO_2$ gas의 呼吸系에 대한 疾患은 該當生體內에서 酵素的인 變化를 隨伴할 것으로 豫測하고 그 臟器特異性을 띈 LDH isozyme을 指標酵素로 擇하여 $SO_2$ gas를 吸入시킨 動物에 있어서의 그 pattern의 變化를 究明코저 本研究를 試圖하였던바 이에 대한 知見을 얻었기에 報告하는 바이다.

## 實 驗 方 法

### Ⅰ. 生體實驗

#### 1. 實驗動物 및 $SO_2$ gas 吸入

體重 120~160 g의 Albino rat(♂)를 擇하여 各各 15~20 마리씩을 對照群 및 試驗群으로 區分하였다.

試驗群은 Fig. 1과 같은 裝置를 使用하여 內容 210 $l$의 Exposing chamber 內에 넣고 albino rat의 呼吸量이 平均 100cc/min[6)] 임을 考慮하여 gas 流量計로 計測하면서 空氣는 2000 cc/min의 速度로 導入시키고 이 空氣中에 約 20% $SO_2$ gas를 Dual infusion/with drawal pump에 依하여 2 cc/min의 速度로 導入混和하였다.

$SO_2$ gas 濃度는 每 15分마다 Midget impinger gas analyzer로 繼續測定하고 $SO_2$ gas 濃度가 約 250 ppm이 되도록 維持시키며 6時間 導入시켰다.

#### 2. 試料調製(組織homogenate)[7)]

吸入實驗終了後 即時 實驗動物을 屠殺하여 腦, 心臟, 肺 및 臀部筋肉組織을 摘出하였다.

摘取된 組織 各 1 g에 氷浴內에서 冷却한 0.25 M Sucrose 液을 注加하여 homogenizing 하고 다시 0.25 M Sucrose 液으로 約 20%(w/v)가 되게 稀釋하였다. 이 homogenate를 冷凍遠心分離機(international centrifuge PR-2)를 使用하여 6,000×g로 15分間 遠心沈澱시켜 上澄液을 取하여 再次 12,500×g로 30分間 遠心分離한 後 上澄液을 酵素活性度 및 isozyme 分離實驗의 試料로 使用하였다.

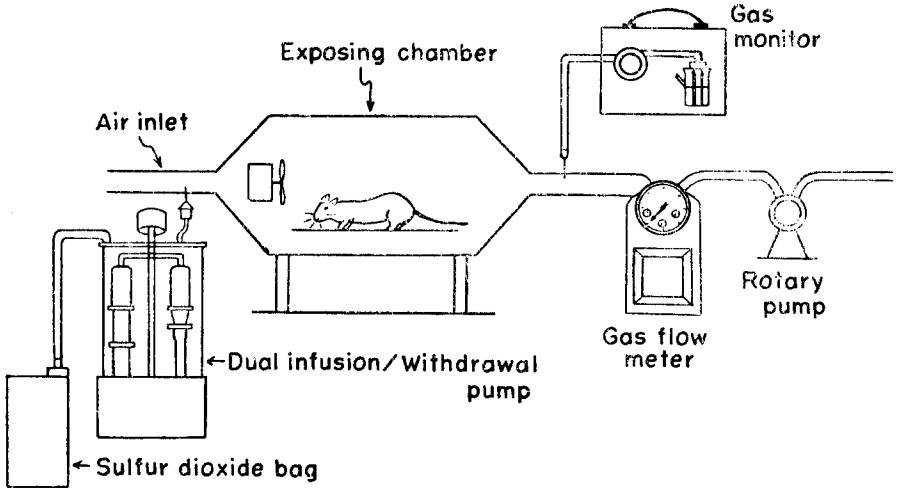


Fig. 1. Apparatus for Inhalation of Sulfur Dioxide.

### 3. LDH isozyme의 電氣泳動法에 依한 分離 및 同定

LDH isozyme은 Preston等[8]의 一般的方法에 準하여 試料 20 $\mu l$를 Cellulose-acetate strip (Sepraphore III, Gelman Inst. Co.)의 陰極側에서 約 1.5 cm의 位置上에 線滴하고 每 slide마다 1 mA의 電流를 通하여 約 90分間 泳動시켜서 isozyme를 完全히 分離하고 分離된 LDH는 直接 strip上에서 nitrobluetetrazolium을 使用하여 37°C의 孵卵器內에서 30分間 反應시켜 呈色케하고 5% 醋酸液中에 5分間 浸漬한 後 蒸溜水로 洗滌한 다음 脫水風乾하여 Analytol로 scanning하여 planimeter로 全體에 對한 各部分의 百分率을 算出하였다.

## Ⅱ. 試驗管內試驗

### 1. gas의 導入

體重 約 120 g의 Albino rat 10마리를 前記 生體試驗과 同一한 方法에 準하여 組織을 摘出하고 組織別로 合한 다음 各各 그 1 g를 取하여 氷冷한 0.25 M Sucrose液으로 homogenizing하고 約 20%(w/v) 組織 homogenate를 調製한 後 遠心分離하여 上澄液을 試料로 使用하였다.

이 試料를 各各 4個의 試驗管에 20 m$l$씩 分注하여 다음과 같은 條件으로 gas 및 空氣를 Fig. 2와 같은 裝置를 使用하여 gas의 濃度와 流速을 一定이 維持하며 通過시켰다.

第1群 : 空氣 및 gas를 導入하지 않은 對照群

第2群 : 空氣를 20分間 導入한 群

第3群 : $SO_2$ gas 5 ppm을 含有한 空氣를 20分間 導入한 群

第4群 : 第3群과 같이 處理한 後 10分間 純酸素를 導入한 群

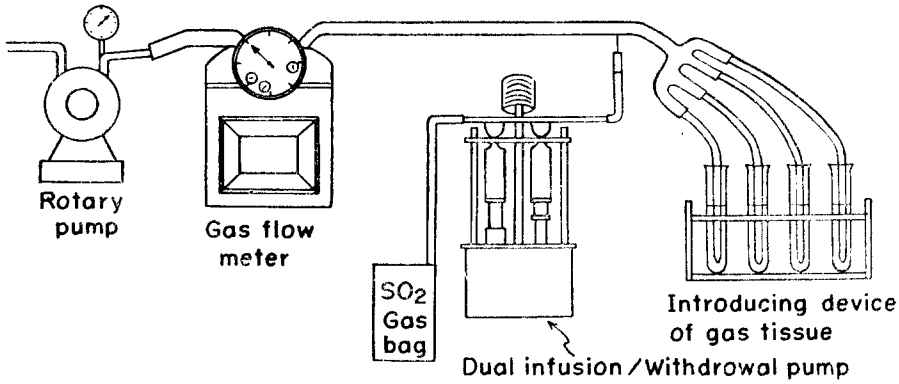


Fig. 2. Apparatus for Introducing Gas to Homogenized Tissue.

### 2. LDH 活性度測定

LDH 活性度測定은 Neilands의 方法[9]에 準하여 0.1 M Glycine buffer (pH 10.0) 1.8 m*l*, 0.2 M 乳酸나트륨液 0.1 m*l*, $2\times10^{-2}$ M NAD 液 0.1 m*l*의 混合試液에다 試料 0.2 m*l*를 急速히 添加하여 340 m$\mu$에서 吸光度의 變化를 1分間隔으로 測定하였다. 測 m*l*當 每分間에 生成된 $NADH_2$의 $\mu$M 濃度를 $\frac{1}{6.22\times10^3}$의 換算係數를 乘하여 酵素活性値를 計算하였다. 이때 LDH activity 1 unit는 $10^{-3}$ $\mu$M $NADH_2$를 表示하였다.

## 實 驗 結 果

### I 生體試驗

試驗群 및 對照群의 各組織에 對해서 總 LDH 活性에 對한 各分率의 平均値($\bar{X}$)와 標準偏差(SD), 回數(n) 그리고 對照群에 對한 試驗群의 t value

$$\left(t=\frac{|\bar{X}_1-\bar{X}_2|}{\sqrt{\frac{(SD_1)^2}{n}+\frac{(SD_2)^2}{n}}}\right)$$

를 Table I 및 Fig. 3에 表示하였다.

腦組織의 LDH isozyme 1부터 5(以下 $L_1$~$L_5$)까지 對照群은 各各 39.3, 10.8, 8.0, 29.8, 12.1% 이고 試驗群은 各各 21.9, 20.6, 20.4, 28.3, 8.8% 였다.

試驗群에 있어서는 對照群에 比해서 $L_1$과 $L_{4,5}$는 減少하는 反面에 $L_{2,3}$은 增加하였다.

肺組織은 對照群과 試驗群에서 $L_{1,2,3}$은 檢出되지 않았으며 $L_4$ 및 $L_5$는 對照群에서 約 27.0과 73.0% 의 比率이고 試驗群은 25.3과 74.7% 로서 $SO_2$ gas 吸入에 의한 isozyme pattern의 變化를 認定할 수 없었다.

心臟組織에서는 $L_1$부터 $L_5$까지 對照群에서는 各各 26.5, 25.4, 20.1, 18.1, 9.9% 이고

**Table** Ⅰ. Distribution of LDH Isozyme in Each Organs of Rats (Exposed in $SO_2$ Gas and Control Group)

| Tissue | | LDH Isozyme band 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | $\bar{X}\pm SD$ | $\bar{X}\pm SD$ | $\bar{X}\pm SD$ | $\bar{X}\pm SD$ | $\bar{X}\pm SD$ |
| Brain | Control | 39.3±5.75 | 10.8±2.95 | 8.0±2.07 | 29.8±2.46 | 12.1±4.75 |
| $n=20$ | Exposed | 21.9±2.71 | 20.6±1.20 | 20.4±0.75 | 28.3±0.88 | 8.8±2.15 |
| | $t$ | 12.3° | 13.1° | 25.3° | 2.6° | 2.9° |
| Lung | Control | 0 | 0 | 0 | 27.0±2.86 | 73.0±3.02 |
| $n=15$ | Exposed | 0 | 0 | 0 | 25.3±3.03 | 74.7±2.85 |
| | $t$ | | | | 1.6× | 1.3× |
| Heart | Control | 28.5±5.93 | 25.4±4.89 | 20.1±3.93 | 18.1±4.59 | 9.9±2.81 |
| $n=20$ | Exposed | 29.8±3.18 | 26.7±5.41 | 18.7±2.81 | 17.8±4.89 | 7.0±4.52 |
| | $t$ | 2.2° | 0.8× | 1.3× | 0.2× | 2.4° |
| Liver | Control | 0.6±1.08 | 1.8±1.94 | 5.2±3.26 | 20.4±6.74 | 72.0±11.24 |
| $n=20$ | Exposed | 0 | 0 | 0 | 14.5±2.02 | 85.5± 3.16 |
| | $t$ | 2.5° | 4.3° | 9.1° | 3.8° | 5.2° |
| Kidney | Control | 35.2±7.61 | 8.3±2.59 | 7.1±1.82 | 19.9±5.57 | 29.6±4.83 |
| $n=20$ | Exposed | 20.1±2.40 | 13.4±1.43 | 8.5±2.02 | 25.9±2.08 | 32.1±2.65 |
| | $t$ | 8.5° | 2.7° | 2.3° | 4.5° | 2.0° |
| Muscle | Control | 3.6±1.40 | 4.7±1.87 | 11.0±2.68 | 24.8±6.10 | 55.9± 4.16 |
| $n=20$ | Exposed | 1.2±0.27 | 3.6±0.93 | 4.7±1.53 | 12.5±2.52 | 78.0±10.90 |
| | $t$ | 7.5° | 2.3° | 9.5° | 8.3° | 8.5° |

° ……statistically significant
× ……statistically unsignificant

試驗群은 29.8, 26.7, 18.7, 17.8, 7.0% 로서 $SO_2$ 吸入으로 因하여 $L_1$ 은 增加하였고 $L_5$ 은 減少하였다.

肝組織에서는 對照群의 $L_1$~$L_5$ 는 各各 0.6, 1.8, 5.2, 20.4, 72.0% 이고 한편 試驗群은 $L_1$ 부터 $L_3$ 까지는 檢出되지 않았고 $L_4$ 와 $L_5$ 는 各各 14.5, 85.5% 로서 $L_1$~$L_4$ 는 減少하였고 $L_5$ 는 增加하였다.

腎臟組織의 對照群에 있어서는 $L_1$~$L_5$ 는 各各 35.2, 8.3, 7.1, 19.9, 29.6% 이고 試驗群에서는 各各 20.1, 13.4, 8.5, 25.9, 32.1% 로서 $L_1$ 은 減少하였고 $L_2$ 부터 $L_5$ 까지는 增加하였다.

筋肉組織의 對照群에 있어서는 $L_1$~$L_5$ 는 各各 3.6, 4.7, 11.0, 24.8, 55.9% 이고 試驗群은 1.2, 3.6, 4.7, 12.5, 78.0% 로서 $L_1$ 부터 $L_4$ 까지는 減少하였고 $L_5$ 는 增加하였다.

### Ⅱ. 試驗管內 試驗

各組織 試料의 對照群과 試驗群의 LDH 活性은 Table Ⅱ 및 Fig. 4 에 表示하였다.

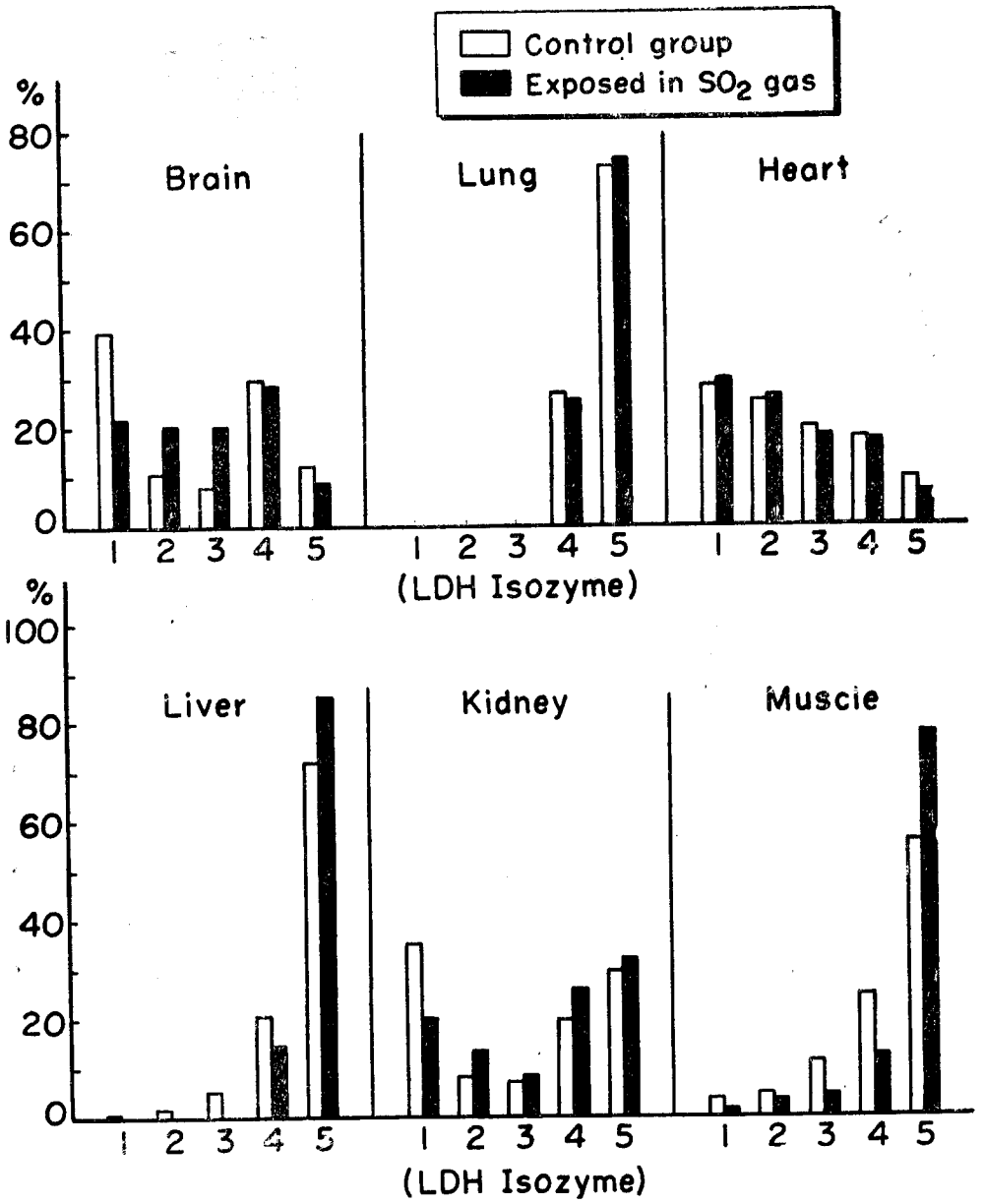


**Fig. 3.** Distribution of LDH isozyme in Each Organs of Rats (Exposed in $SO_2$ Gas and Control Group)

**Table Ⅱ.** Alteration of LDH Activities in Each Tissues by Aeration of Gases
(LDH Activity: Unit=$10^{-3}\mu$M $NADH_2/ml$)

| Organ | Control | Aerated with | | |
|---|---|---|---|---|
| | | Air | Air+$SO_2$ | $O_2$ |
| Brain | 27.2 | 20.9 | 20.5 | 22.1 |
| Heart | 106.0 | 109.4 | 112.6 | 122.6 |
| Kidney | 33.0 | 33.2 | 27.4 | 37.0 |
| Lung | 17.7 | 18.5 | 20.1 | 21.5 |
| Liver | 49.8 | 41.8 | 49.8 | 45.0 |
| Muscle | 67.6 | 55.5 | 58.0 | 54.7 |

腦組織의 LDH 活性은 第1群은 27.2 unit 이고 第2群은 20.9 unit 로서 急速히 減少하며 第3群에서도 20.5 unit 로 같은 程度로 維持되었고 第4群은 第2,3群보다 多少 增加하였다

肝과 筋肉의 組織에서는 第1群은 各各 49.8, 67.6 unit 이고 第2群은 各各 41.8, 55.5 unit 로서 다같이 減少하는 特徵이 있다. 第3群은 腦의 境遇와는 反對로 各各 49.8, 58.0 unit 로서 第2群보다 增加하였고 第4群은 45.0, 54.7 unit 로서 第3群보다 減少하였다.

心臟 및 肺組織에서는 第1群은 各各 106.0, 17.7 unit 이고 第2群은 各各 109.4, 18.5 unit 로서 第1群보다 增加하였고, 第3群은 各各 112.6, 20.1 unit 로서 계속 增加하였고 第4群은 各各 122.6, 21.5 unit 로서 역시 계속 增加하였다.

腎臟組織에서는 第1群은 33.0 unit 이고 第2群은 33.2 unit 로서 別差異를 認定할 수 없었고 第3群은 27.4 unit 로서 第2群보다 減少하였고 第4群은 37.0 unit 로서 第2,3群보다 增加하였다.

## 考 察

$SO_2$ gas 에 對해서는 Stockinger[5]가 動物實驗에서 呼吸器뿐만 아니라 消化器의 刺戟과 感染을 助長하고 1 ppm 의 濃度로 吸入하였을 때에도 氣管과 肺를 通해서 腦와 其他 器管에 容易하게 吸收된다고 指摘한 바 있다.

本實驗에서는 이와 같이 낮은 濃度의 $SO_2$ gas 에 長時間 反覆吸入시키므로서 發生하는 組織化學的 變化를 比較的 短時間內에 確認하기 위하여 生體試驗에서는 250 ppm, 試驗管內試驗에서는 5 ppm 의 $SO_2$ gas 를 通하여 組織의 急性變化를 觀察하였다. 即 肝 및 筋肉組織은 $L_5$ 의 百分率이 높은데 反하여 $L_1$~$L_4$ 의 百分率이 낮은 傾向이 있다. 即 이들 嫌氣性組織은 M 型의 LDH 가 H 型의 LDH 보다 더욱 優勢한 것은 모든 LDH isozyme 가 過剩의 Pyruvate 에 依하여 抑制되어도 M 型 isozyme 은 km value 가 낮다는 Wroblowski 와 Gregory 의 報告[10]를 想起케 한다.

維持 energy 가 心臟보다 낮은 筋肉이나 肝같은 組織에서는 H 型 isozyme 가 높은 km value 를 表示하는 傾向이 있다.

이러한 結果는 Dawson 等[11]의 報告와 類似하다.

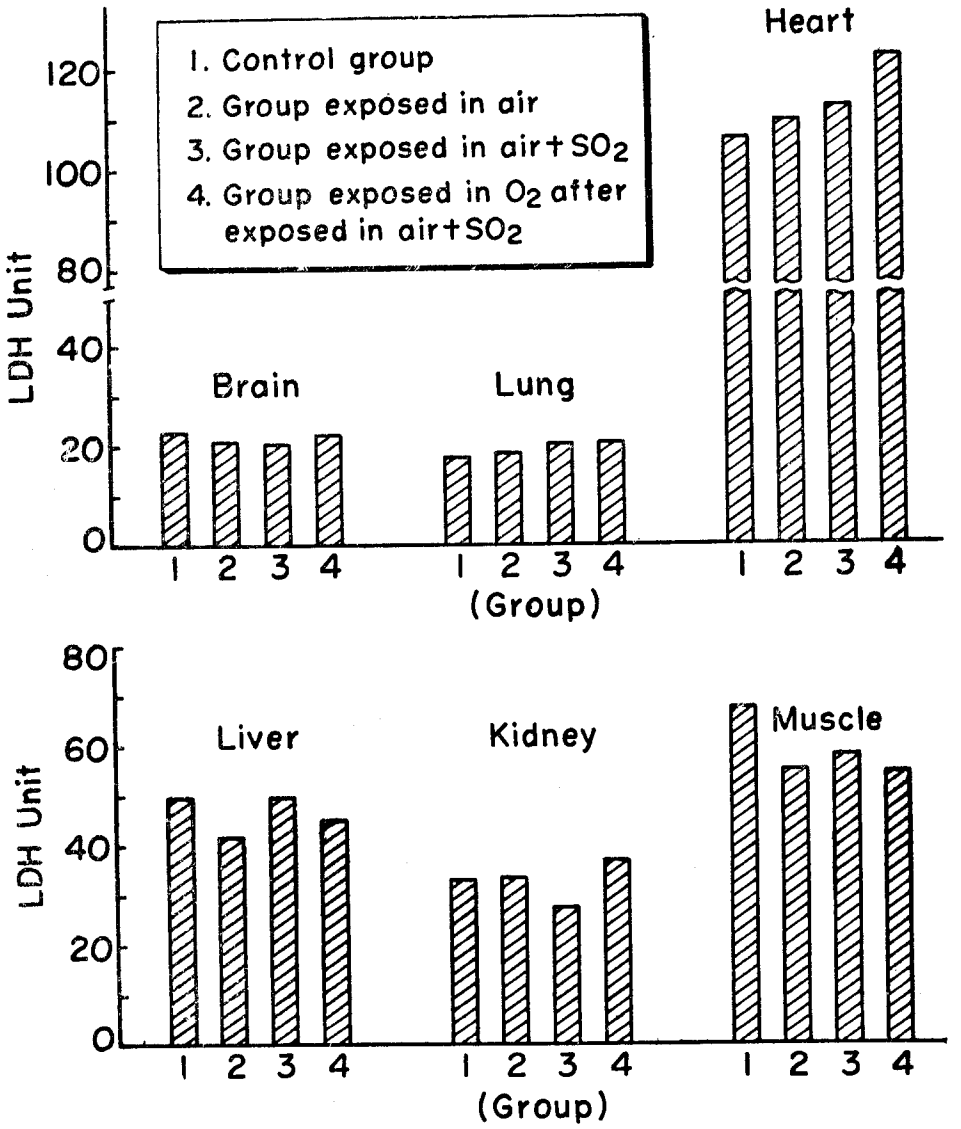


Fig. 4. Alteration of LDH Activities in Each Tissues by Gas Aeration
(LDH Activity; Unit=$10^{-3}$ M $NADH_2$/m*l*)

$SO_2$ gas의 吸入에 의해 各組織中에서는 TCA cycle이 抑制된다. 따라서 肝, 筋肉 및 腎臟組織에 있어서는 H型 LDH보다 M型 LDH가 더욱 作用이 強하게 나타난다. 이것은 $SO_2$ gas가 嫌氣性 isozyme의 M型을 刺戟하고 好氣性의 isozyme인 H型을 抑制하는 것으로 看做된다.

이와는 反對로 H型이 旺盛한 心臟組織에서는 $SO_2$ gas가 $L_1$의 活性을 높여 反對方向으로 作用하는 것으로 생각된다.

$SO_2$ gas를 吸入한 動物의 肺組織에서는 isozyme pattern에 何等 變化를 주지않는 것을 알았다. 이것은 gas가 肺에서 他組織으로 急速히 擴散되고 肺自體의 酵素에 作用할 機會를 주지 못한 것으로 推測된다.

그러나 腦組織은 $SO_2$ gas의 吸入에 依해서 $L_2$ 및 $L_3$이 增加하고 $L_1$, $L_4$, $L_5$는 抑制되었다. Table II에서 보는 바와 같이 試驗管內試驗에 있어서 腦組織은 空氣와 $SO_2$ gas導入에 依하여 LDH活性은 거의 變化하지 않았으나 酸素의 導入에 依해서는 多少의 增加를 보았다. 肝과 筋肉組織은 空氣와 $SO_2$ gas의 混合導入에 依해서는 減少하였다.

心臟과 肺組織에서는 空氣와 $SO_2$ gas의 混合導入으로 LDH活性은 增加하였고 再次 酸素의 導入으로 더욱 增加하였다.

腎臟組織은 空氣와 $SO_2$ gas混合導入으로 LDH活性은 多少減少하고 있으나 이것은 生體試驗에서 보는 바와 같이 그 減少의 原因이 $L_1$의 減少에 基因된다고 生覺된다. 이와같이 腎臟組織이 肝, 筋肉組織과는 달리 例外的인 結果를 나타내는 것은 그 特異한 向流循環部의 皮質과 髓質의 相異한 系統發生學的인 特性[12]에 基因하는 것으로 생각된다.

腦組織의 LDH活性은 $SO_2$ gas의 影響을 별로 받지 않고 肺와 心臟組織 그리고 肝과 筋肉組織은 $SO_2$ gas에 對해서 LDH活性이 增加하는 共通的 傾向을 보였고 酸素導入으로 腦, 肺, 心臟組織에서는 LDH活性이 더욱 增加하고 肝과 筋肉組織은 反對로 減少하는 結果를 表示하였다. 이것은 前記한 바와 같이 $SO_2$ gas의 導入으로 前者는 H型, 後者에서 M型이 各各 優勢하다는 것과 相關이 있다.

gas의 影響이 解消될수 있는가를 보기 爲해서 組織을 gas處理한 다음에 酸素를 導入하면 好氣性組織에서는 酵素活性이 增加하는데 이것과는 反對로 嫌氣性인 肝, 筋肉組織에서는 減少하였다. 이것은 Cahn等[13][14] 및 Dawson等[11]의 報告와 類似하다.

이와 같은 酸素分壓의 變化에서 일어나는 Subunit의 合成의 差는 M型과 H型 LDH의 固有한 生化學的 役割에 基因된다고 생각된다. 낮은 酸素分壓에서는 M型이 더욱 많이 合成되고 이 型은 嫌氣的 代謝에 가장 適合하며 높은 酸素分壓에서는 H型 LDH의 合成이 助長되고 好氣性組織에서 優勢해 진다.

## 結 論

$SO_2$ gas吸入에 의한 albino rat의 各組織 LDH isozyme pattern의 變化를 보기 위하여 生體 및 試驗管內試驗을 行하여 다음과 같은 結果를 얻었다.

(1) 正常 albino rat에 있어서 LDH活性은 腦, 心臟 및 腎臟組織에서 H型이 M型보다 強

하고 肺, 肝臟 및 筋肉組織內에서는 M型이 H型보다 強하다.

(2) 250 ppm의 $SO_2$ gas의 吸入으로 因하여 albino rat의 嫌氣性組織인 肝臟, 腎臟, 筋肉組織에서는 M型이, 好氣性組織인 心臟 및 腦組織에서는 H型이 더욱 強해 진다.

(3) 5 ppm의 $SO_2$ gas를 組織 homogenate에 導入하면 心臟, 肺, 肝臟, 筋肉組織의 LDH의 活性은 室內空氣만을 導入한 것보다 增加하며 腎臟組織에서는 減少하고 腦組織에서는 變化가 없다.

(4) $SO_2$ gas吸入後 다시 酸素를 導入하여 酸素分壓이 強해지면 嫌氣性組織인 肝臟, 筋肉組織에서는 LDH活性은 減少하며 好氣性組織인 腦, 心臟, 肺組織에서는 增加한다.

以上의 綜合的인 知見으로 $SO_2$ gas를 吸入시키면 各組織에 吸入되어 LDH活性과 그 isozyme pattern에도 變化를 가져와서 代謝過程에도 影響을 미친다.

## 文 獻


1) J. T. Mountain, *Report of the Air Pollution Research Conference of the Publ. Health Service and California Sate Dept. of Publ. Health, Univ. of Southern Calif., Los Angelis* (1961)
2) R.D. Buckley and O.J. Balchum, *Arch. Environ. Health*, **14**, 424 (1967)
3) R.D. Buckley and O.J. Balchum, *Ibid.* **14**, 687 (1967)
4) C.L. Markert and F.Möller, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **45**, 753 (1959)
5) H.E. Stokinger, *Respiration*, Ⅱ (1967)
6) 鄭淳東, 航空醫學 **9**, 190 (1961)
7) J.B. Neilands, *Methods in Enzymol.* **1**, 10 (1955)
8) J.A. Preston, R.O. Briere and J.G. Patsakis, *Am. J. Clin. Patho.* **43** 256 (1965)
9) J.B. Neilands, *Methods in Enzymol.* **1**, 449 (1955)
10) F. Wroblowski, K.F. Gregory, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **94**, 912 (1961)
11) D.M. Dawson, T.L. Goodfruend and N.O. Kaplan, *science*, **143**, 929 (1964)
12) L.O. Leonhardt and R.R. Landes, *New Eng. J. Med.*, **269**, 195 (1963)
13) R.D. Cahn, N.O. Kaplam, L. Levine and E. Zwilling, *Science*, **136**, 962 (1962)
14) R.D. Cahn, *J. Cell. Biol.*, **19**, 12A (1963)