

Insulin 이 흰쥐의 LDH Isozyme 에 미치는 影響

林中基·崔奇松

成均館大學校 藥學大學

(Received February 25, 1976)

Chung Ki Lim and Ki Song Choi (*College of Pharmacy, Sung Kyun Kwan University, Seoul 110*): The Effect of Insulin on Lactate Dehydrogenase Isozyme in the Liver, Muscle and Serum of Albino Rats.

Abstract—A series of experimental groups has been studied in the state of hypoglycemia caused by a single intraperitoneal injection of insulin after 24 hrs of fasting albino rats and then the variation of LDH activities and LDH isozyme patterns in the liver, muscle and serum had been reported. The total LDH activity has been elevated in the liver and the muscle above the average level for control group, but increased continuously during 20 min and decreased in the 20~45 min intervals and increased again in 45 min in the serum. The change of LDH isozyme patterns had been shown that in the liver LDH₅ was increased, LDH₄ was decreased and in the muscle LDH₁ was diminished by 30 min, was restored again after 45 min and LDH₂ decreased about 94 percentage at 30 min, increased again to the average value and LDH₅ increased to 30 min, decreased by 45 min and increased greater again after 45 min and in the muscle LDH₃, LDH₄, and LDH₅ were increased to the greatest by 20 min, decreased in 20~45 min intervals and increased again after 45 min.

Lactate dehydrogenase(LDH)는 各種 疾患狀態에서 그 活性이 增大된다는 것이 알려져 있으며 特히 病的器管에서 LDH isozyme pattern이 特徴的으로 變化된다는 것도 밝혀져 있어 臨床 酵素學的으로 利用되고 있다. 그中 糖尿病과 LDH isozyme 活性 變化에 關한 報告도 있다.

한편 insulin이 糖代謝에 미치는 影響에 關해서는 多角的으로 研究되어 報告된 바가 많으나³⁻¹⁷⁾ insulin이 LDH isozyme에 미치는 影響에 對해서는 報告된 바가 別로 없으므로 著者는 insulin을 흰쥐에 投與하여 肝, 筋肉 및 血清의 LDH 活性과 LDH isozyme의 pattern 變化를 研究하여 多少의 知見을 얻었기에 報告한다.

實 驗

體重 170~220 g 되는 흰쥐의 암컷을 6마리씩 6群으로 나누어 24時間 絶食시킨 후 對照群 (a), insulin 投與後 10分 경과群 (b), 20分 경과群 (c), 30分 경과群 (d), 45分 경과群 (e) 및 60分 경과群 (f)로 나누어 b, c, d, e 및 f 群에 各各 體重 1 kg 當 30 unit 의 insulin (Eli Lilly, inj.)을 腹腔注射¹⁸⁾하고 時間 經過에 따라 b, c, d, e 및 f 群을 各各 處理하였다.

LDH isozyme 의 分離—肝 및 大腿筋을 各各 증류수로 5倍의 homogenate 로 만든 다음, 遠心分離(3,600 rpm)해서 얻은 上澄液과 血液을 處理하여 얻은 血清을 各各 2.5×7.5 cm 의 cellulose acetate plate (Titan III, Helena Co.)에 spotting 한 후 Tris-barbital buffer (pH 8.8)를 使用하여 180V, 0.8 mA/cm 電流로 40分間 泳動分離하고 (Helena Co; Titan, Cat. 1500) nitro-blue tetrazolium 으로 染色한 후, 5% acetic acid 용액으로 固定시켜 水洗한 다음 건조시켜서 densitometer (Helena Co; Quick Scan Cat. 1020)로 LDH isozyme 의 分布曲線을 作成하고 integration 하여 LDH isozyme 의 濃度比를 算出하였다.

LDH activity 의 測定—肝 및 筋肉組織의 1000倍 homogenate 를 遠心分離(3600 rpm)하여 그 上澄液을 6倍로 稀釋하여 試料로 使用하고 Berger & Broida 法¹⁹⁾에 準하여 LDH 活性度로 比色定量하였다. 基質緩衝液(pyruvic acid 100mg, K₂HPO₄ 132.5 mg 를 증류수로 1000 ml 로 함. pH 7.8) 1 ml 에 β-NADH₂ (Sigma Chemicals) 1.0 mg 를 溶解시켜 37° 水浴에서 2~3 分間 加溫한 후 試料 homogenate 0.1 ml 를 넣고 37° 水浴에서 30分間 反應시킨 후 2,4-dinitrophenyl hydrazine 液 (2,4-dinitrophenyl hydrazine 200 mg, C-HCl 85 ml 를 증류수로 1000 ml 로 함) 1.0 ml 를 넣어 常溫에서 20分間 放置 후 0.4 N-NaOH 溶液 10 ml 를 넣어 5分間 放置하였다가 25分 以內에 spectrophotometer (Coleman junior model 6C)로 525 nm 에서 optical density 를 測定하였다. 미리 作成해 둔 calibration curve 에 依하여 血清 1 ml 및 肝, 筋肉組織 各各 1 g 中の LDH 活性度를 B-B unit¹⁹⁾로 算出하였다.

LDH isozyme 의 活性度는 LDH isozyme 의 濃度比에 依해 各各 配分 算出하였다.

血糖의 定量—Somogy-Nelson 法^{20,21)}에 準하여 比色定量하였다.

結果 및 考察

LDH 活性度—肝, 筋肉 및 血清의 LDH 活性度 測定結果는 Table I에 表示한 바와 같다.

肝에서는 insulin 投與後 時間이 경과함에 따라 LDH 活性度が 上昇하였으며 f 群에서는 對照群에 比해 約 9×10^4 unit 나 上昇되었다.

筋肉에서도 insulin 投與後 LDH 活性度が 增加되었고 f 群은 對照群에 比해 13×10^4 unit 가 增加되었으나 c 群에서는 對照群보다 4×10^4 unit 가 低下되고 있다.

血清에서도 e 群을 除外한 모든 群이 對照群보다 LDH 活性도가 上昇되고 f 群은 對照群의 約 2 倍인 660 unit 로서 300 unit 가량이 增加되었고 e 群은 約 50 unit 가 低下되고 있다.

Flatt 등²²⁾이 rat 에 insulin 을 投與하였을 때 adipose tissue 의 lactate 生成率이 增加한다는 報告를 한바 있고, Clarissa 등²³⁾은 rat 에 insulin 投與로 筋肉에서의 lactate 增加를 報告하고 있다. 本 實驗에서 insulin 投與로 rat 의 肝, 筋肉 및 血清에서의 LDH 活性도가 增大된다는 結果를 얻은 것은 以上 報告를 뒷받침하는 事實이라 하겠다.

Table I—The activities of liver, muscle and serum and its distribution

group	Total LDH activity B-B unit	LDH ₅ (%)	LDH ₄ (%)	LDH ₃ (%)	LDH ₂ (%)	LDH ₁ (%)	
liver	a	13.9×10 ⁵	12.4×10 ⁵ (88.2)	1.6×10 ⁵ (11.8)			
	b	14.1×10 ⁵	12.2×10 ⁵ (86.8)	1.9×10 ⁵ (13.2)			
	c	14.7×10 ⁵	13.3×10 ⁵ (90.5)	1.4×10 ⁵ (9.5)			
	d	14.4×10 ⁵	13.3×10 ⁵ (92)	1.4×10 ⁵ (8)			
	e	14.7×10 ⁵	13.4×10 ⁵ (91)	1.3×10 ⁵ (9)			
	f	14.8×10 ⁵	14.8×10 ⁵ (100)	0			
muscle	a	10.6×10 ⁵	57.8×10 ⁴ (54.1)	20.1×10 ⁴ (19)	11.2×10 ⁴ (10.6)	9.3×10 ⁴ (10.6)	8×10 ⁴ (9.6)
	b	10.9×10 ⁵	66.5×10 ⁴ (61)	22.1×10 ⁴ (20.3)	10.5×10 ⁴ (9.6)	7.1×10 ⁴ (9.6)	2.8×10 ⁴ (2.6)
	c	10.2×10 ⁵	62.8×10 ⁴ (61.6)	20.5×10 ⁴ (20.1)	8.7×10 ⁴ (8.6)	6.6×10 ⁴ (8.6)	3.3×10 ⁴ (3.2)
	d	10.8×10 ⁵	86.5×10 ⁴ (80.1)	17.2×10 ⁴ (15.9)	3.8×10 ⁴ (3.5)	0.5×10 ⁴ (3.5)	0(0)
	e	11.6×10 ⁵	63.9×10 ⁴ (55.1)	27.9×10 ⁴ (24.1)	15.6×10 ⁴ (13.4)	5.9×10 ⁴ (13.4)	2.7×10 ⁴ (2.3)
	f	11.9×10 ⁵	89.1×10 ⁴ (74.9)	16.1×10 ⁴ (13.5)	5.6×10 ⁴ (4.7)	5.6×10 ⁴ (4.7)	2.6×10 ⁴ (2.2)
serum	a	360	109(30.7)	16(4.5)	67(18.7)	67(18.7)	73(20.2)
	b	475	209(44.1)	55(11.9)	81(17)	81(17)	41(8.6)
	c	600	192(32)	120(20.1)	131(21.8)	131(21.8)	65(10.9)
	d	400	104(26.1)	33(8.2)	83(20.6)	83(20.6)	78(19.6)
	e	310	58(18.7)	29(9.4)	66(21.5)	66(21.5)	70(22.7)
	f	660	142(21.6)	130(15.6)	139(21)	139(21)	124(18.9)

LDH isozyme 의 pattern 變化—肝, 筋肉 및 血清의 LDH isozyme pattern 은 Table I에 表示한 바와 같다.

肝은 各群에서 LDH₄와 LDH₅ 2個의 pattern 만이 確認되었다. LDH₅는 insulin 投與後 增加되었고 f 群은 對照群에 比해 約 24×10⁴ unit 가 增加되었으며 LDH₄는 反對로 insulin 投與後 減少되어 j 群에서는 消滅되고 말았다. 肝組織에서의 主 LDH 는 LDH₅ 로 알려져 있으며²⁴⁾ insulin 投與로 glycolysis 의 增大로 因한 pyruvate 의 生成增大로 pyruvate 의 濃도에 크게 影響을 받지 않은 LDH₅의 活性이 相對的으로 增加되고 LDH₄의 活性은 減少된 結果라고 생각된다.

筋肉에서는 LDH₁에서 LDH₅까지 5個의 isozyme 이 全群에서 測定되었고, LDH₁, LDH₂, LDH₃ 및 LDH₄는 insulin 投與後 30分까지는 점차 活性이 低下되었으며, LDH₁는 30分經過群에서는 消滅되고 있다.

또한 LDH₂는 30分 經過시에 對照群의 約 1/18, LDH₃는 約 1/3로 크게 活性이 低下되며 LDH₄는 約 3×10⁴ unit 가 減少되고 있다. 反對로 LDH₅는 對照群에 比해 約 50%에 該當하는 29×10⁴ unit 가 增加되고 있다. 그러나 30分 經過以後는 LDH₂, LDH₃, LDH₄가 反對로 增加되기 시작하여 LDH₁도 다시 測定되었으며 45分 經過以後는 LDH₅를 除外한 各 isozyme 이 다시 減少되고 있다.

Hermann 등¹³⁾은 흰쥐에 insulin 을 投與하였을 때 肝에서는 glycogen 生合成이 減少되나 筋肉에서는 insulin 投與後 45分까지는 反對로 glycogen 生合成이 增大된다고 하였다. 45分 以後

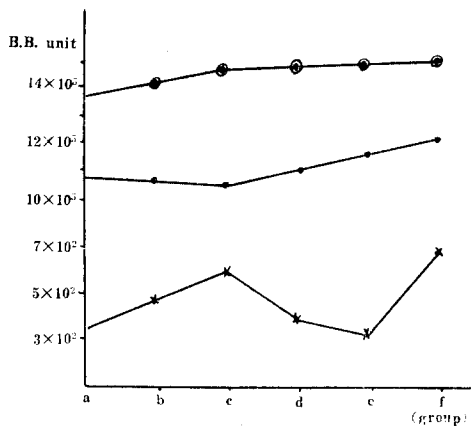


Fig. 1—The variation of LDH activities,
 a: control group.
 b: 10 min. after insulin administration.
 c: 20 min. after insulin administration.
 d: 30 min. after insulin administration.
 e: 40 min. after insulin administration.
 f: 60 min. after insulin administration.
 -○- Liver, -●- Muscle, -*- Serum.

LDH₅의 活成이 크게 增加되고 LDH₁~LDH₄의 活性이 다시 減少되고 있는 것은 Hermann 등의 報告한 바와 關係가 있는 것으로 생각된다.

血清에서는 LDH₁~LDH₅ 5種의 isozyme 이 分離 測定되었으며 LDH₄, LDH₅는 insulin 投與後 20分까지는 活性이 增加되었다가 20分~45分 사이에 減少되고 45分以後 다시 增加되는 傾向을 나타내었다. LDH₁, LDH₂는 45分까지 活性의 變動이 別로 없었으며 45分 經過 후에 活性의 增加를 나타내고 있다.

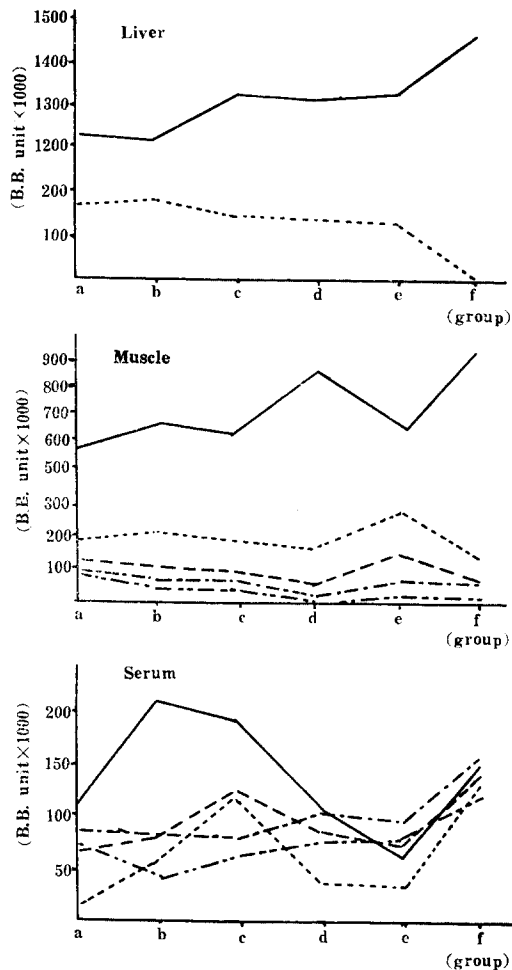


Fig. 2—The variation of LDH isozyme pattern of liver, muscle and serum.
 — LDH₅, ... LDH₄, --- LDH₃, ---- LDH₂, -.- LDH₁

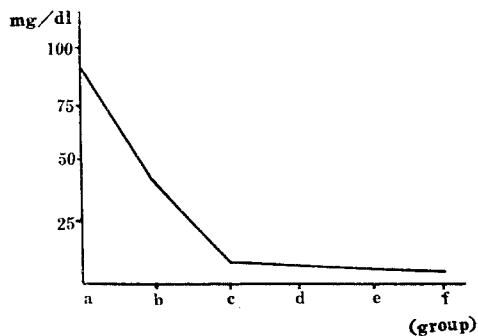


Fig. 3—The average blood sugar variation of each experimental group.

血糖濃度—各 實驗群의 血糖濃度는 Fig. 3과 같다. 對照群은 88 mg/dl로서 正常이나 b群에서 約 1/2로 低下되었고 c群以後는 12 mg/dl 以下の 低血糖值를 나타내고 있다.

結 論

1) Insulin을 획취에 投與하여 肝, 筋肉 및 血清內의 LDH 總活性度 및 LDH isozyme pattern의 變化를 測定하였다.

2) LDH 總活性度は insulin 投與時 肝 및 筋肉에서 增加되나 血清에서는 insulin 投與後 20分까지는 增加되고 20分~45分 사이에 正常值로 되며 45分 後에 다시 增加되었다.

3) 筋肉의 LDH isozyme은 insulin 投與로 LDH₁의 活性은 크게 減少되며 LDH₅의 活性은 反對로 增加되었다.

4) 肝의 LDH isozyme도 insulin 投與로 LDH₅의 活性이 增加되나 LDH₄의 活性은 低下되었다.

5) 血清의 LDH isozyme은 insulin 投與로 모든 LDH isozyme의 活性이 若干 增加하는 傾向이나 LDH₃, LDH₄, LDH₅는 投與後 20分까지 크게 增加되고 20分~45分 사이에 減少되었다가 45分後 다시 增加되었다.

文 獻

1. F. Wroblewski and J.S. Ladue, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **91**, 210 (1955).
2. N.O. Kaplan, *Science*, **136**, 962 (1962).
3. J.S. Bishop and Lannan, *J. Biol. Chem.*, **242**, 1354 (1967).
4. D.F. Steiner and J. King, *J. Biol. Chem.*, **239**, 1292 (1964).
5. W. Kreutner and N.D. Goldberg, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **58**, 1515 (1967).
6. J.C. Hall, *J. Biol. Chem.*, **235**, 5 (1960).
7. N. Haugard and J.B. Marsh, *Mechanism of Insulin Action*, 1953.
8. R. Levin and M.S. Goldstein, *Recent Progress Hormone Res.*, **11**, 343 (1955).
9. E.J. Ross, *Medicine*, **35**, 355 (1956).
10. C. Park, *The Hypophysical Growth Hormone, Nature and Action, New York*, 1954, p-394.
11. W.C. Stadie, *Am. J. Med.*, **21**, 257 (1955).
12. C.F. Cori, *Harvey Lectures*, **41**, 253 (1945).
13. H.W. Levin and S. Weinhouse, *J. Biol. Chem.*, **232**, 749 (1958).
14. D.R. Drury and A.N. Wick, *J. Biol. Chem.*, **203**, 411 (1935).
15. E. Walaas and O. Walaas, *J. Biol. Chem.*, **195**, 367 (1952).
16. I.T. Simon, M. Chabieani and L.J. Robert, *J. Biol. Chem.*, **238**, 73 (1973).
17. W.C. Stadie, N. Haugaard and M. Permuter, *J. Biol. Chem.*, **172**, 567 (1948).
18. A.H. Gold, *J. Biol. Chem.*, **245**, 903 (1970).
19. L. Berger and D. Broider, *Sigma Tech. Bull.*, 500-8-60, 1964.
20. Somogyi, *J. Biol. Chem.*, **160**, 94 (1945).
21. N. Nelson, *J. Biol. Chem.*, **153**, 375 (1944).
22. J.P. Flatt and E.G. Ball, *J. Biol. Chem.*, **239**, 675 (1964).
23. H.B. Clarissa, D.P. Ruth and M.B. Rose, *J. Biol. Chem.*, **235**, 277 (1960).
24. R.G.W. Plagemann, K.F. Gregory and F. Wroblewski, *J. Biol. Chem.*, **235**, 228 (1960).