

脊椎動物 腦와 網膜에 있어서 Lactate
Dehydrogenase Isozyme Pattern의 比較

金 淳 玉·朴 相 允*

(연세대학교 의과대학 해부학교실·*성균관대학 생물학과)

A Comparison of the Lactate Dehydrogenase (LDH)
Isozyme Patterns in Vertebrate Cerebrum and Retina.

Soon Ok Kim and Sang Yoon Park*

(Dept. of Anatomy, College of Medicine, Yon Sei University

*Dept. of Biology, Sung Kyun Kwan University)

(Received December 21, 1978)

SUMMARY

From the experimental results of cellulose acetate membrane electrophoresis we concluded the followings in explaining the LDH isozyme patterns found in the retina and cerebrum of vertebrata.

Lactate dehydrogenase of the retina and cerebrum of both *Carassinus carassinus* and *Cyprinus carpio* was found to have one diffused band located between LDH₂ and LDH₁. LDH isozyme patterns of heart, pectoral muscle, liver and stomach of the *Cyprinus carpio* had the same diffused band in all organs.

LDH isozyme patterns of the cerebrum of *Hynobius leechii* and *Rana nigromaculata* were observed to be different. in *Hynobius leechii* a single band moved to the negative pole and two bands of LDH₃ and LDH₄ were obtained in the *Rana nigromaculata*.

The retina and cerebrum of *Natrix tigrina lateralis* were observed as one band but *Amyda maakii* had different LDH isozymes of the retina and cerebrum. The retina of *Amyda maakii* had five distinct LDH isozyme bands which had decreasing activity in the order of LDH₅, LDH₄, LDH₃, LDH₂ and LDH₁. The cerebrum of *Amyda maakii*

had one band like *Natrix tigrina lateralis* but it moved to the negative pole.

LDH isozymes in the retina and cerebrum of *Gallus gallus domesticus* and *Melopsittacus undulatus* showed one band.

Five characteristic LDH isozyme bands were obtained from the retina of mammals, *Oryctolagus cuniculus*, *Canis familiaris*, *Sus scrofa*, *Bos taurus* and in the cerebrum of mouse, albino rat, *Rhinolophus ferrum-equinum kokoi*.

緒 論

대부분의 鳥類 및 哺乳類에서 體組織의 LDH는 다섯가지 isozyme으로 구성되어 있음이 이미 發表되었으며 (Markert and Möller, 1959; Wieland et al., 1959; Plagemann et al., 1960) 魚類, 兩棲類 및 爬虫類에서는 LDH isozyme이 鳥類나 哺乳類의 그것과는 크게 差異가 있음이 밝혀졌다 (Markert, 1968; 박등, 1971).

Lindsay (1963)는 LDH₁과 LDH₅의 subunit는 比較的 높은가 또는 낮은 호흡율 (respiratory rate)에 따른 組織內의 特性으로서 LDH₁의 出現은 高酸化代謝를 營爲하는 器官의 特徵이라고 하였다.

역시 Kaplan (1964)도 LDH isozyme pattern은 조직의 산소공급 상태와 密接한 關係이 있음을 시사한 바 있으며 산소를 비교적 많이 받는 심장은 LDH₁이 월등히 強하고 보다 豊富하지 못한 筋組織의 LDH isozyme은 LDH₅가 현저히 強하다고 하였다. 이러한 현상은 神經系에서도 나타나는데 Löwenthal et al. (1964)은 사람의 末梢神經系에서는 LDH isozyme pattern이 筋組織의 pattern과 유사하나 神經系의 다른 부분은 대체로 심장의 pattern과 유사하다고 하였다.

또한 cellulose acetate membrane 전기영동법으로도 사람을 위시하여 哺乳動物의 腦에 있어서는 LDH isozyme이 心臟型임이 알려졌으며 (Miura, 1966), Bonavita and Guaneri (1963)는 대체로 脊椎動物 腦의 LDH isozyme은 고등한 동물일수록 양극(+) 쪽으로 移動하는데 이와같은 현상은 음(-)으로 荷電된 subunit로 구성되어 있기 때문이라 하였다.

一般的으로 網膜에 있어서는 다른 組織에 比하여 포도당 酸化過程이 더욱 활발하며 (Di Pietro and Weinhouse, 1959) 好氣性 및 嫌氣性 젖산 생산도 활발한 사실도 이미 발표되었다 (Brotherton, 1962). 그러므로 이 組織에서 pyruvate代謝의 조절은 특히 중요한 것으로 看做된다. 그러나 脊椎動物 網膜의 LDH isozyme pattern을 밝힌 연구는 稀有하다. 따라서 본 연구는 몇 種의 脊椎動物 網膜과 腦의 LDH isozyme pattern을 밝히는데 目的이 있으며 이러한 目的은 앞으로 脊椎動物 相互間의 계통관계를 究明하는 한편 遺傳學的, 生態學的인 연구를 하는데 기초적인 도움이 되리라 생각한다.

實驗材料 및 方法

實驗動物은 서울近郊에서 채집한 것과 서울市內에서 구입한 건강한 成體를 使用하였다. 魚類로는 잉어 (*Cyprinus carpio*), 붕어 (*Carassinus carassinus*); 兩棲類로는 도롱뇽 (*Hynobius leechii*), 참개구리 (*Rana nigromaculata*); 爬虫類로는 자라 (*Amyda maakii*), 유희목이 (*Natrix tigrina lateralis*); 鳥類로는 닭 (*Gallus gallus domesticus*), 사랑새 (잉꼬, *Melopsittacus undulatus*); 哺乳類로는 mouse (*Mus musculus musculus*), 흰쥐 (Albino rat), 집토끼 (*Oryctolagus cuniculus*), 관박쥐 (*Rhinolophus ferrum-equinum korai*), 개 (*Canis familiaris*), 돼지 (*Sus scrofa*), 소 (*Bos taurus*)를 擇하여 단두도살한 즉시 얼음판 위에서 가급적 速히 網膜과 腦를 剔出하여 各各 實驗材料로 使用하였다. 개, 돼지, 소는 安養도살장에서 도살한 즉시 ice-box에 채워 실험실까지 운반하여 網膜을 剝離하였다.

組織 homogenate는 조직과 증류수의 比率을 1:6 (W/V)으로 하여 얼음에 채운 glass homogenizer로서 마련하였으며 LDH (Lactate dehydrogenase, L-Latate: NAD oxidoreductase, EC 1.1.1. 27) isozyme은 cellulose acetate 전기영동법으로 분리하였는데 그 方法은 박·조 (1972)에 따랐다.

Cellulose acetate membrane strip은 Cellotate (Millipore)를 使用하였고 원충액은 pH 8.6의 barbital buffer를 使用하였다.

본 실험에서 다른 器官과의 LDH isozyme pattern을 比較하기 위하여 網膜과 腦 이외의 몇가지 器官도 實驗하였다.

結 果

1. 脊椎動物 網膜의 LDH isozyme pattern.

붕어와 잉어의 網膜에 있어서 LDH isozyme은 LDH₁과 LDH₂에 해당하는 부위에 몇 개의 band가 겹쳐진듯한 넓게 퍼진 彌滿한 상으로 관찰되었다 (Fig. 1, A, B).

유희목이에서는 sample을 點滴한 原點 即 出發點 (origin)에서 약간 양극(+)쪽으로 移動된 단일 band가 觀察되었으며 (Fig. 1, D) 자라의 網膜에서는 5個의 band가 모두 觀察되었다. 다만 LDH₁과 LDH₂는 極히 희미한 흔적 程度로 관찰되었다 (Fig. 1, C). 같은 爬虫類인메드 유희목이에서는 하등동물에서 관찰되는 pattern을 보이고 자라에서는 일 반척추동물에서 관찰되는 pattern을 보이고 있다.

닭과 사랑새의 網膜에서는 點滴한 原點 即 出發點에서 약간 음극(-)쪽으로 移動된 단일 band가 관찰되었다. 단지 두 種 사이의 다른 點은 사랑새에서 LDH isozyme band가 彌滿性을 보이는 點이다 (Fig. 1, E, F).

집토끼, 개, 돼지, 소의 網膜에서도 哺乳動物의 전형적인 5個의 isozyme이 모두 관찰되었다 (Fig. 2). 各 isozyme band는 LDH₄, LDH₃ 및 LDH₅의 順으로 그 농도가 減少되었고 돼지에 있어서 isozyme band의 강도가 本 實驗中 가장 낮았다. Albino rat에 있어서는 LDH₂와 LDH₄, 2個의 band만이 관찰되었다 (Fig. 2, A). 以上으로 미루어 보아 대체적으로 本 實驗에 使用한 魚類에서 鳥類까지는 거의가 sample 出發點에 가까운 위

치에서 단일 band로 관찰되었으나 자라만은 예외였다. 哺乳類에서는 5個의 band가 전부 관찰되었다. 다만 개에서만은 isozyme의 각 band 사이가 다른 實驗動物에 比하여 더욱 넓었다.

2. 脊椎動物 腦의 LDH isozyme pattern

붕어와 잉어의 腦에 있어서 LDH isozyme pattern은 붕어와 잉어 網膜의 LDH isozyme pattern과 同一하였다. 即 LDH₁과 LDH₂ band에 해당되는 부위가 넓게 퍼져 몇개의 band가 겹쳐진 것처럼 관찰되었다 (Fig. 3, A, B). 잉어의 心臟, 筋組織(홍근), 肝, 胃의 LDH isozyme pattern에서도 역시 몇개의 band가 겹쳐진 듯한 넓게 彌滿된 단일 band로 나타 났다 (Fig. 5).

도롱뇽 腦에서도 역시 음극쪽으로 단일 band가 관찰되며 개구리의 腦에 있어서는 LDH₃와 LDH₄ 2個의 band가 나타났다 (Fig. 3, C, D).

자라의 腦에 있어서는 도롱뇽 腦와 비슷한 단일 band가 관찰되었으나 (Fig. 3, E) 자라에서는 網膜과 腦의 LDH isozyme pattern이 相異하였다. 자라의 心臟, 胃, 筋組織(홍근), 肝, 腎臟의 LDH isozyme pattern을 조사한 결과 腦에서와 同一한 단일 band로 관찰되었다 (Fig. 6).

유혈목이 腦의 LDH isozyme pattern은 網膜에서와 동일하게 양극(+) 쪽의 단일 band가 관찰되었다 (Fig. 3, F).

사랑새와 닭의 LDH isozyme은各自的 網膜에서 관찰되는 isozyme pattern과 동일한 단일 band로 나타났다 (Fig. 4, A, B).

Mouse, albino rat, 관박쥐의 腦에 있어서는 역시 포유류의 전형적인 5個의 band가 관찰되었고 각 isozyme band의 농도는 일반 포유동물 網膜에서와 同一하게 LDH₄, LDH₃, LDH₂의 순서로 높았다. 관박쥐의 心臟, 筋組織, 肝, 腎臟의 LDH isozyme pattern은 다른 哺乳動物의 그것과 同一하였다 (Fig. 7).

以上の 結果로 보아 대체적으로 網膜과 腦의 LDH isozyme pattern이 一致함을 알수 있다.

考 察

붕어와 잉어의 網膜과 腦에 있어 LDH isozyme pattern은 LDH₁과 LDH₂에 해당하는 부위에 몇개의 band가 겹쳐진 것 처럼 보이는 彌滿性的인 단일 band가 관찰되었는데 이러한 현상은 박 등 (1971)의 실험결과와도 一致된다. Markert and Faulhaber (1965)는 魚類를 LDH isozyme형에 따라서 크게 네가지 유형으로 나누어 볼 수 있다고 하였다. 即 LDH isozyme의 band를 1개, 2개 및 3개 가진 것과 5개 가진 것으로 區分된다고 주장하였으며 魚類에 있어서는 비록 5개의 isozyme을 가지고 있어도 그 isozyme 分布가 binominal distribution을 보여 주지는 않는다고 밝힌 바 있다.

개구리의 腦에서는 LDH₃와 LDH₄ 2個의 band가 관찰되었는데 이와 같은 결과는 Chen (1968)의 實驗結果와 一致된다. 개구리 腦의 LDH isozyme pattern은 種에 따라 差異가 있다고 報告되었다. *Bufo vulgaris*는 2個의 LDH isozyme을 가지고 있다는 보고가 있으며 (Wieland et al., 1959), Wright and Moyer (1966)는 *Rana pipiens*,

Rana pipiens sphenoccephala, *Rana palustris* 및 *Rana sylvatica*에서 LDH isozyme이 器官에 따라 3個에서 5個까지의 band로 나타난다고 하였으며 LDH₁의 位置에 3~5個의 subband가 있다고 하였다.

자라의 腦에서는 음극쪽에 하나의 band가 관찰되었는데 박 등 (1971)의 연구 결과도 이와 같았다.

유혈목이 網膜과 腦에 있어서 LDH isozyme pattern은 同一하였으며 電氣泳動像은 出發點에서 양극(+)쪽으로 약간 移動된 단일 band로 관찰되었는데 박 등 (1971)의 실험에서는 LDH₁과 LDH₂ 2個의 band가 검출되어 LDH₁의 活性도가 높고 LDH₂는 희미하게 나타난다고 밝혔는데 이는 本 實驗과 若干의 差異가 있다. 이 差異는 實驗動物사이의 생활방식과 서식지, 기타 生理的 條件에 따른 변화이든가 또는 電氣泳動法에 의한 해상력의 차이로 생각되어 명확한 것은 앞으로 더 구명하여 밝히고자 한다.

닭과 사랑새의 網膜에서 LDH isozyme pattern은 同一하였고 닭과 사랑새의 腦에서도 그 pattern이 同一하였다. 卽 出發點에서 若干 음극쪽으로 移動된 단일 isozyme band가 나타났다. 이와 같은 실험결과는 Bonavita and Guaneri (1963)가 닭에서 한개의 band를 검출한 실험결과와 박 등 (1971)의 그것과도 같은 결과이다.

Graymore (1964, 1965)는 흰쥐 網膜의 LDH isozyme을 전분—겔전기영동법으로 분리하였을 때 4個의 band가 관찰되었고 cellulose acetate 전기 영동법에서는 5個의 band가 검출된 바 이러한 결과는 서로 다른 전기영동법에 의한 해상력의 差異인 것 같다고 밝혔는데 本 實驗의 흰쥐 網膜에서는 哺乳類에서 관찰되는 전형적인 5個의 isozyme이 분리되지 않고 LDH₃와 LDH₄ 그리고 아주 희미한 흔적 程度의 LDH₅ 3個의 band만이 나타났다.

집토끼, 개, 돼지 및 소의 網膜에 있어서도 역시 哺乳動物의 다른 器官에서와 같이 5個의 isozyme을 區分할 수 있었다.

관박쥐의 眼球는 다른 哺乳動物의 그것에 비해 너무 적어 網膜의 剔出이 不可能하여 實驗材料로 사용하지 못하고 腦만을 사용하였다.

Mouse, 흰쥐, 관박쥐의 腦에서도 다섯개의 isozyme이 分離되었다 (Fig. 4). 그리고 本 實驗에서 사용한 哺乳類에서도 網膜과 腦의 LDH isozyme pattern은 비슷하였으며, LDH₄, LDH₃가 强하고 LDH₅와 LDH₂는 거의 같은 농도를 보였다.

Lindsay (1963)가 LDH₁과 LDH₅의 subunit는 比較的 높든가 낮은 호흡율에 따른 組織內의 特性으로써 LDH₁의 출현은 高酸化代謝를 영위하는 器官에서의 特徵이라고 주장한 것이 사실이라면 本 實驗에서 사용한 哺乳動物 腦와 網膜에서 LDH₄와 LDH₃가 가장 강한 농도를 보인 것은 성숙한 동물의 網膜과 腦를 代謝면에서 볼때 特別한 차이가 없는 것으로 暗示된다.

Bonavita and Guaneri (1963)의 주장대로 本 實驗에서도 高等動物 일수록 양극(+)쪽의 LDH isozyme band도 나타나기 시작하는 경향이 보인다.

摘 要

脊椎動物 網膜과 腦에 있어서 LDH isozyme pattern을 系統的으로 밝히기 위하여

cellulose acetate 電氣泳動法을 이용하여 실험한 결과 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. 붕어와 잉어의 網膜과 腦의 LDH isozyme은 LDH₁과 LDH₂에 해당되는 부위에 彌滿된 단일 band가 觀察되었다. 잉어의 心臟, 胸筋, 肝臟, 胃의 LDH isozyme도 모두 다같이 퍼진 단일 band로 나타났다.

2. 도롱뇽과 개구리의 腦에 있어서 LDH isozyme pattern은 다르게 觀察되었다. 도롱뇽에서는 음극으로 移動된 단일 band가, 개구리에서는 LDH₅와 LDH₄ 두개의 band가 검출되었다.

3. 유허목이의 網膜과 腦에서는 다같이 하나의 band로 觀察되나 자라에서는 網膜과 腦의 isozyme이 다르다. 즉 자라의 網膜에서는 5個의 isozyme band가 觀察되었는데 그 농도는 LDH₅, LDH₄, LDH₃, LDH₂ 및 LDH₁의 순으로 낮아 졌다.

자라의 腦는 역시 유허목이와 같이 단일 band이나 단지 음극쪽으로 移動된 것이 다르다.

4. 닭과 사랑새의 網膜과 腦에 있어 LDH isozyme은 다같이 단일 band로 나타났다.

5. 집토끼, 개, 돼지, 소의 網膜에서도 포유류의 特徵적인 5個의 isozyme band가 검출되었고 mouse, albino rat, 관박쥐의 腦에서도 5個의 band가 검출되었다.

이러한 사실들로부터 미루어 보아 網膜과 腦의 LDH는 그 電氣泳動像이 대체로 비슷하여 두 器官은 유사한 pyruvate 代謝가 이루어지고 있는 것으로 추측된다.

감사의 말씀

본 논문을 완성하는데 물질양면으로 도와주신 연세의대 해부학교실 박수연교수님께 감사드립니다.

REFERENCES

- Bonavita, V. and R. Guaneri, 1963. Lactate dehydrogenase isoenzymes in nervous tissue II: A comparative analysis in vertebrates. *J. Neurochem.* **10** : 743-753.
- Boyd, J.W., 1967. The disappearance of C-labelled isoenzymes 5 of l-lactate dehydrogenase from plasma. *Biochem. Biophys. Acta* **146** : 593.
- Brotherton, J., 1962. Studies on the metabolism of a rat retina with special reference to retinitis pigmentosa. I. Anaerobic glycolysis. *Exptl. Eye Res.* **1** : 234.
- Chen, P.S., 1968. Patterns of soluble proteins and multiple form of dehydrogenases in amphibian development. *J. Exp. Zool.* **168** : 337-350.
- Di Pietro and S. Weinhouse, 1959. Glucose oxidation in the rat brain slices and homogenates. *Archs. Biochem. Biophys.* **80** : 268-281.
- Graymore, C., 1964. Possible significance of isoenzymes of lactic dehydrogenase in the retina of the rat. *Nature* **20** : 615-616.
- Graymore, C., 1935. Metabolism of the developing retina. 7. Lactate dehydrogenase isoenzyme in the normal and degenerating retina. A preliminary communication. *Exp. Eye Res.* **3** : 5-8. In: Biochemistry of the retina (edited by Graymore C.) pp.83, Academic Press, London.
- Kaplan, N.O., 1964. Lactate dehydrogenase structure and function. *Brookhaven Symp.*

- Biol.* **17** : 131-153.
- Lindsay, L.T., 1963. Isozymic patterns and properties of lactate dehydrogenase from developing tissues of the chicken. *J. Exp. Zool.* **152** : 75-89.
- Löwenthal, A., M. von Sande, D. Karcher and J. Richard, 1964. Protein and enzymes of the nervous system in different species. *Clin. Chem. Acta* **9** : 31-9. In: Comparative Neurochemistry, pp.139-148, Pergamon, London.
- Markert, C.L. and F. Möller, 1959. Multiple form of enzymes: Tissue ontogenetic and specific patterns. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **45** : 753-763.
- Markert, C.L. and J. Faulhaber, 1965. Lactate dehydrogenase isozyme patterns of fish. *J. Exp. Zool.* **159** : 319-332.
- Markert, C.L., 1968. The molecular basis for isoenzymes. *Ann N.Y. Acad. Sci.* **151** (Art. 1) : 14-40.
- Miura, S., 1966. Lactate dehydrogenase isozymes of the brain: Electrophoretic studies on regional distribution and ontogenesis. *Folia Psychit. Japan* **20** : 337-347.
- 박상윤, 홍사욱, 조동현, 1971. 척추동물의 Isozyme에 대한 비교연구 I. 수종동물의 뇌조직내 Lactate dehydrogenase에 관하여. 성대 논문집, **16** : 1-11.
- 박상윤, 조동현, 1972. Cellulose acetate 전기영동에 의한 수소 이탈효소 Isozyme의 분리. 동·학·지 **15** : 101-104.
- Plagemann, P.G.W., K.F. Gregory and F. Wroblewski, 1960. The electrophoretically distinct forms of mammalian lactic dehydrogenase. II. Properties and interrelationship of rabbit and human lactic dehydrogenase isozymes. *J. Biol. Chem.* **235** : 2288-2293.
- Wieland, T., G. Pfeleiderer, J. Haupt and W. Wörner, 1959. Über die Verschiedenheit der Milchsäure dehydrogenasen: IV Quantitative ermittlung einiger Enzymverteilungsmuster. *Biochem. Z.* **332** : 1-10.
- Wright, D.A. and F.H. Moyer, 1966. Parental influences on lactate dehydrogenase in the early development of hybrid frogs of the genus *Rana*. *J. Exp. Zool.* **163** : 215-230.

Explanation of Figures

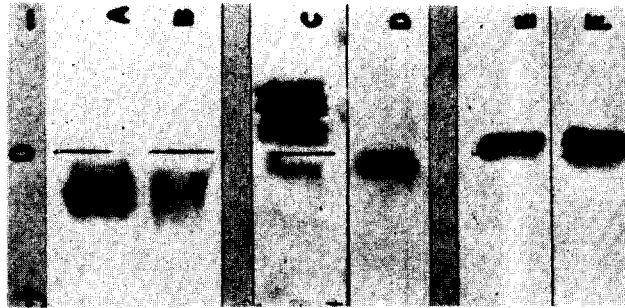


Fig. 1. The LDH isozyme patterns in the retinae obtained from vertebrates (separated by cellulose acetate electrophoresis)

A. *Carassius carassinus*

B. *Cyprinus carpio*

C. *Amyda maakii*

D. *Natrix tigrina lateralis*

E. *Gallus gallus domesticus*

F. *Melopsittacus undulatus*

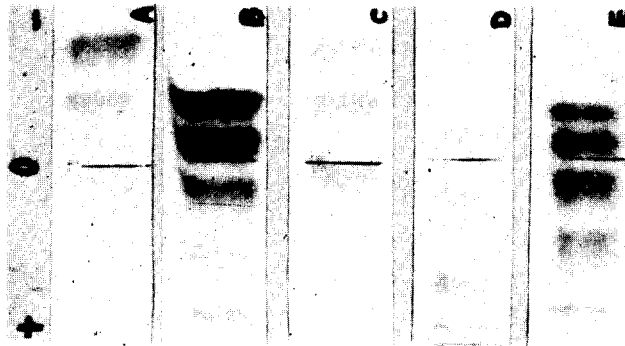


Fig. 2. The LDH isozyme patterns in the retinae obtained from vertebrates

A. Albino rat

B. *Oryctolagus cuniculus*

C. *Canis familiaris*

D. *Sus scrofa*

E. *Bos taurus*

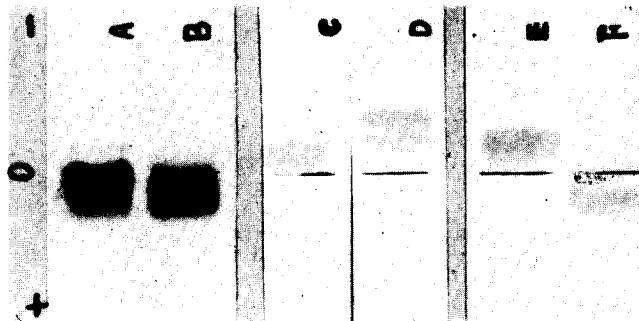


Fig. 3. The LDH isozymes in the brain from vertebrates

A. *Carassius carassinus*

B. *Cyprinus carpio*

C. *Hynobius leechii*

D. *Rana nigromaculata*

E. *Amyda maakii*

F. *Natrix tigrina lateralis*

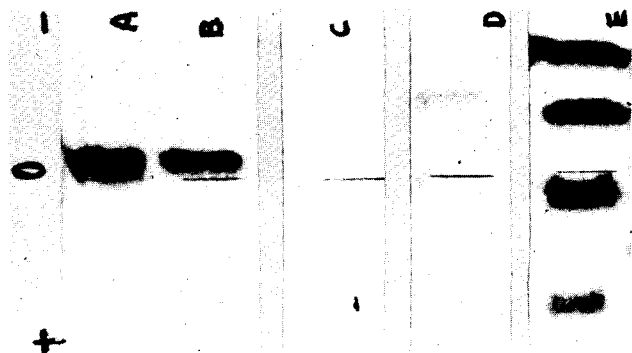


Fig. 4. The LDH isozymes in the brain from vertebrates:

- A. *Melopsittacus undulatus*
- B. *Gallus gallus domesticus*
- C. *Mus musculus musculus*
- D. *Albino rat*
- E. *Rhinolophus ferrum-equinum korai*

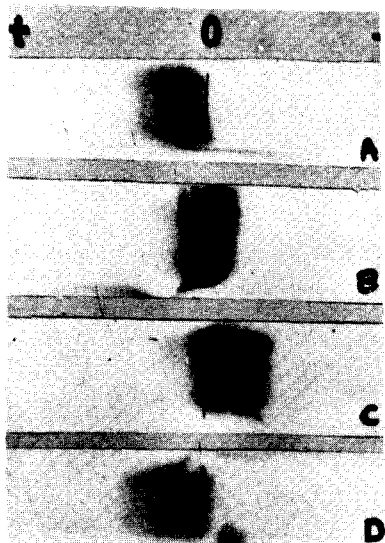


Fig. 5. Zymogram showing LDH isozyme patterns in the several organs of *Cyprinus carpio*:

- A. Heart
- B. Pectoral muscle
- C. Liver
- D. Stomach

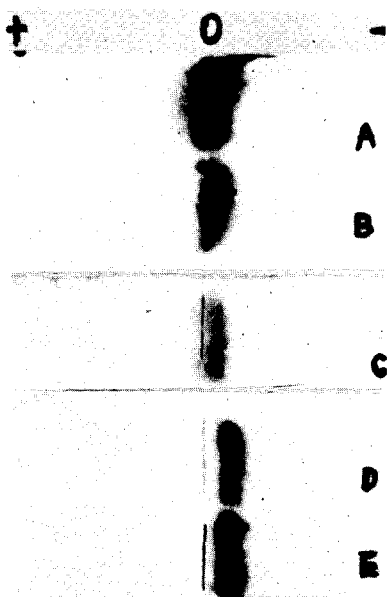


Fig. 6. The LDH isozyme patterns in the several organs of *Amyda maakii*:

- A. Heart
- B. Stomach
- C. Pectoral muscle
- D. Liver
- E. Kidney

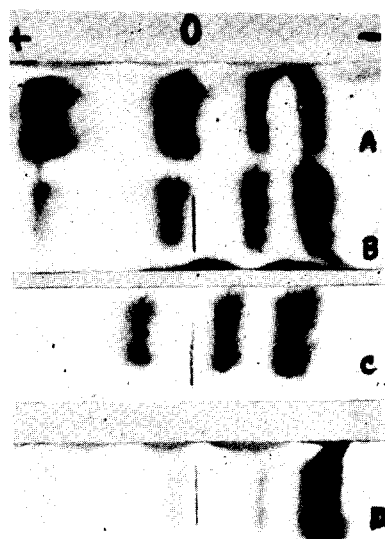


Fig. 7. The LDH isozyme patterns in the several organs of the bat (*Rhinolophus ferrum-equinum korai*):

- A. Heart
- B. Pectoral muscle
- C. Liver
- D. Kidney