

메기 (*Parasilurus asotus*)의 장기내 젖산수소이탈효소 아이소자임
형에 미치는 동이온의 영향에 관한 연구

鄭 英 憲 · 李 春 九

(淑明女大 生物學科)

Studies on the Effect of Copper Ion on the Lactate Dehydrogenase
Isozyme Patterns in Organs of Catfish, *Parasilurus asotus*

Young-Hun Jung and Choon-Koo Lee

(Department of Biology, Sookmyung Women's University)

(Received February 16, 1984)

SUMMARY

The effect of copper ion on the lactate dehydrogenase isozyme patterns in the heart, liver, kidney, skeletal muscle, and ovary of catfish, *Parasilurus asotus*, was studied by cellulose acetate gel electrophoresis.

1. The LDH-1 and LDH-2 of heart type appeared in the heart muscle of control fish. When the fish were exposed to copper ion, however, the LDH-1, LDH-2, LDH-3, and LDH-4 appeared. The amount of LDH-1 was decreased and those of LDH-2, LDH-3, and LDH-4 were increased.

2. There was one band of LDH-4 in the liver of normal fish. But the amount of LDH-4 was decreased and additional new LDH-5 appeared by exposure to copper ion.

3. There were LDH-1, LDH-2, and LDH-4 in the kidney tissue of both control and experimental groups. The LDH-1 was increased, whereas LDH-2 and LDH-4 were decreased after exposure to copper ion.

4. There was broad band of LDH-5 in the skeletal muscle of the control fish. However, the LDH-4 and LDH-5 with M sub-band appeared by the exposure to copper ion.

5. There was LDH-3 band only in the ovary of control, whereas all five LDH isozymes appeared in the ovary of the fish exposed to copper ion.

6. During the period of exposure to copper ion, the LDH isozyme of heart type which associated with aerobic metabolism was decreased, but the LDH isozyme of muscle type of anaerobic metabolism was increased in most of

heart, liver, and skeletal muscle. It seems that these organs are related to some of important functions for anaerobic metabolism during the copper poisoning period.

서 론

젖산수소이탈효소 (LDH)는 고등 척추동물과 같이 어류에서도 장기 특이적 분포, 생화학적 특성 및 유전학적 기능면등에서 매우 중요시 되고 있다.

정상인 어류의 LDH isozyme pattern에 관한 연구는 다양한 종 특이성을 밝히고 있다 (Markert and Faulhaber, 1965; Bailey and Wilson, 1968). 어류의 LDH isozyme의 생리화학적 특성에 관하여는 Markert와 Holmes (1969), Whitt와 Booth (1970), 그리고 Wuntch와 Goldberg (1970) 등이 많이 연구하였다. 이 밖에도 LDH isozyme 연구로써 어류의 분류, 유전적 다양성 및 종간 유연관계 등이 분명하게 밝혀져 왔다 (Clayton and Franzin, 1970; Lush, 1970; Whitt, 1970; Williscroft and Tsuyuki, 1970; Massaro, 1972).

가물치의 혈청과 근육에서는 수은 이온에 의하여 (Hong and Kwon, 1974), 그리고 붕어의 간장과 근육에서는 동이온에 의하여 (Lee and Choo, 1973) LDH isozyme의 활성이 감소되었다. 가자미의 간장과 신장에서는 동으로 인하여 지방대사의 저해가 일어나고 (Sprague, 1964; Sprague and Ramsay, 1965; Sprague *et al.*, 1965) 금붕어의 신장에서는 심한 병리적 회저가 일어났다 (Vogel, 1959).

한편 현대 산업의 급진적 발달에 의한 오염으로 인하여 인체내에서도 동의 양이 급증되면 아테롬성 동맥 경화증 (atherosclerosis)등이 일어난다 (Harmon, 1965). 이와같이 각 종 공해물질이 동물체 내로 흡수되면 단백질 합성에 관련된 여러가지 효소 분자와 결합하거나 활성을 저해하는 등, 일정량을 초과하면 급성 또는 만성적 독성의 영향을 미치는 것으로 알려져 있다.

이 논문은 중급속 이온의 하나인 동이온이 어류에 미치는 생리적 및 병리적 영향을 규명하기 위하여 저서성 어류인 메기의 여러 조직내에 있는 LDH isozyme을 전기영동적으로 연구하여 보고한다.

재료 및 방법

재료—실험동물은 메기과 (Siluridae)의 메기 (*Parasilurus asotus*)로서 전 체장이 25 cm 내지 30 cm이었다. 이들은 오염이 거의 되지 않은 경기도 한탄강 상류에서 채집한 것을 2일간 실온에 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

사육—어류 사육용 수조는 80 l 용량의 plastic제 원형 수조이었으며 수조 내부에는 polyethylene film을 2중으로 깔았다. 사육 용수는 1분당 1 l의 속도로 수류를 일으켜 산소공급과 여과를 하였다. 사육 기간중에는 눈금 6 mm의 nylon망을 덮어 수조 밖으로 튀어 나오는 것을 방지하였다. 사육 기간중의 수온은 10°C 내외였으며 각 수조에는 메기를 10개체씩 넣었다.

처리—대조구의 메기는 동이온을 가하지 않은 환경수로 사육하였다. 처리구는 메기를 사

육하면서 cupric sulphate (CuSO₄·5H₂O) solution을 수조에 12시간 간격으로 3 ppm씩 첨가함으로써 60시간동안에 15 ppm까지 점차적으로 증가시켜 5일간 처리 사육하였다.

전기영동—전기영동에 사용한 조직은 심장, 간장, 신장, 골격근 및 난소의 5개 장기의 조직이었다. 시료는 조직 : 증류수를 1 : 1 (W/V)의 비율로 하여 homogenizer로 갈아 homogenate를 4,000 rpm으로 약 20분간 원심분리한 후 그 상층액을 사용하였다. 시료 약 2 μl를 cellulose acetate gel (2.0×7.6 cm)에 spotting하였다. Tris-barbital-sodium barbital buffer (pH 8.6, μ=0.029)를 사용하여 약 4°C의 냉장실에서 300 V (0.5 mA/cm)의 정전류로 40분간 전기영동하였다. Plate당 0.4 ml씩의 LDH isozyme 염색액 (NAD, 4.7 mM; Lithium lactate, 52.1 mM; MTT, 0.8 mM; PMS, 0.2 mM; NBT, 2.0 mM)으로 염색한 후 10분간 40°C의 향온기에 넣어 정색시킨 후 5% acetic acid로 탈색하였다. 분리된 LDH isozyme band는 densitometer (Autoscanner, Helena Co.)로 파장 570 nm에서 scanning하였다.

결과 및 고찰

메기물 등이온으로 처리한 경우의 LDH isozyme 형과 band의 분포율은 대조구와는 상이한 변화를 나타내었다 (Fig. 1, Table 1).

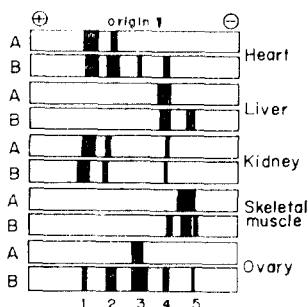


Fig. 1. Diagrammatic representation of LDH isozyme patterns in various tissues of *P. asotus* exposed to 15 ppm of copper ion. Numbers indicate the kind of LDH isozyme bands. A. Control; B. Treatment.

Table 1. Distribution of LDH isozyme bands in various tissues of *P. asotus* exposed to 15 ppm of copper ion

Tissue	Condition	LDH isozyme (%)				
		LDH-1	LDH-2	LDH-3	LDH-4	LDH-5
Heart	Control	81.3	18.7	—	—	—
	Treatment	42.4	42.3	0.2	15.1	—
Liver	Control	—	—	—	100.0	—
	Treatment	—	—	—	60.0	40.0
Kidney	Control	66.8	21.3	—	11.9	—
	Treatment	80.6	19.1	—	0.3	—
Skeletal muscle	Control	—	—	—	—	100.0
	Treatment	—	—	—	10.0	90.0
Ovary	Control	—	—	100.0	—	—
	Treatment	5.2	30.0	44.2	16.8	3.8

심장조직의 대조구에서는 양극쪽으로의 상대 이동도가 빠른 LDH-1과 LDH-2 band만이 나타나 전형적인 심장형 LDH isozyme형을 보이는데 비하여, 동치리구에서는 LDH-5를 제외한 4개의 LDH isozyme band가 모두 나타났다 (Fig. 1 and 2, Table 1). 정상인 붕어 (Park *et al.*, 1974)와 잉어 (Kim and Park, 1979)의 심장조직에서는 넓은 band가 하나 나타났으나 이 실험의 메기에서는 LDH-1과 LDH-2의 band가 분명하게 나타났다. 동이온 처리구의 메기에서는 유기대사작용을 주로 맡는 LDH-1이 81.3%에서 42.4%로 급격히 감소되었다. LDH-2는 18.7%로 부터 42.3%로 증가되고 LDH-3와 LDH-4는 낮은 비율로 새롭게 나타나 정상적인 경우와 많은 차이를 보였다. 이는 사람에서 심장 조직이 손상되어 심근 경색증 (myocardial infarction)을 일으키는 경우, LDH-2와 LDH-3가 급격히 증가되는 현상 (Brydon and Smith, 1973; Galen, 1977)과 비슷한 결과를 보였다. Brody와 Engel (1964)은 조직이 상해를 받았을 때 mitochondrial membrane이 손상되어 느슨하게 된다고 보고 하였는데 이와 비슷한 경향으로서 동이온이 mitochondrial membrane내의 호흡효소의 SH group과 강하게 결합하여 효소 활성을 저하시킴으로써 심장형 isozyme에 대하여 저해 작용을 나타내는 것으로 생각된다.

간장조직의 대조구에서는 폭이 넓은 LDH-4 band가 하나만 확인되었다 (Figs. 1 and 3, Table 1). 이는 잉어 (Kim and Park, 1979)의 간장조직에서와 같은 것이었다. 그러나 동이온 처리구의 간장조직에서는 60%의 LDH-4와 새로운 LDH-5가 40%로 나타났다. 이와

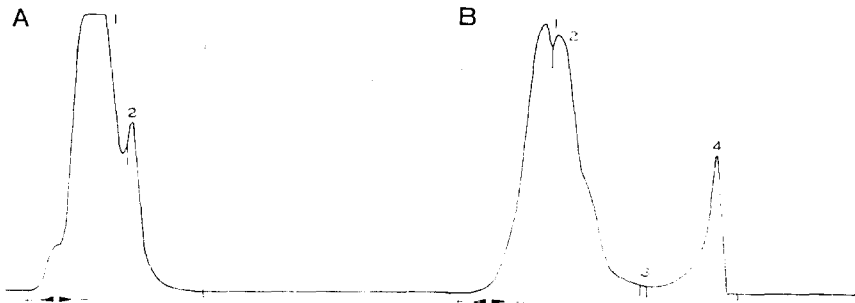


Fig. 2. Densitometric scan of cellulose acetate gel electrophoresis pattern of LDH isozymes in the heart of *P. asotus*. A. Control; B. Treatment.

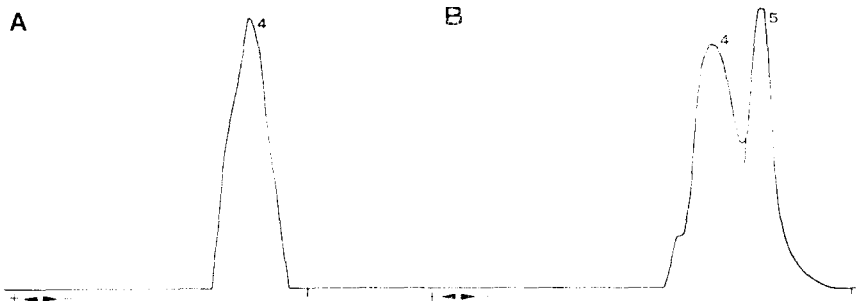


Fig. 3. Densitometric scan of cellulose acetate gel electrophoresis pattern of LDH isozymes in the liver of *P. asotus*. A. Control; B. Treatment.

비슷한 증가의 경향으로서 붕어의 간장에서는 동에 의하여 근육형 LDH isozyme이 증가되고 (Lee and Choo, 1973), 사람에서는 폐색성황달이나 간경변증과 같은 만성간장질환 등에서, 그리고 쥐나 원숭이에서도 carbon tetrachloride에 의하여 LDH-5의 양이 증가되었다 (Wieme and Van Maercke, 1961). 이와같은 근육형 LDH-5의 증가는 무기호흡대사에 중요하게 작용하는 것으로 보인다.

정상적인 신장조직에서는 LDH-1, LDH-2 및 LDH-4의 3개의 band가 각각 66.8%, 21.3% 및 11.9%로 나타났다 (Figs. 1 and 4, Table 1). 이것은 정상인 사람의 신장조직에서 LDH-1과 LDH-2가 주요하게 분포되어 있다는 보고 (Gelderman *et al.*, 1965; Plummer and Leathwood, 1967)와 비슷하다. 한편 동이온 처리구에서는 정상 신장조직에 비하여 양극쪽으로 약간 빠른 상대 이동도를 갖는 LDH-1, LDH-2 및 LDH-4가 각각 80.6%, 19.1% 및 0.3%로 나타났다. 신장에서 LDH-2와 LDH-4가 감소되는데 반하여 LDH-1이 증가된 것은 다른 장기보다 많은 혈액이 순환하는 신장에서는 유기대사를 하는데 보다 더 유리한 것으로 보인다.

정상인 골격근에서는 LDH-5가 100%로 나타났으나 동이온 처리구에서는 10%의 LDH-4와 90%의 LDH-5가 나타났다. LDH-5는 약간 좁아진 LDH-5 band와 또 하나의 좁은 M형 sub-band (5')로 나타났다 (Figs. 1 and 5, Table 1). 이 M형 sub-band가 생긴 것은 송어에서의 LDH isozyme band (Goldberg, 1966)와 guinea pig의 배에서의 M형 sub-band

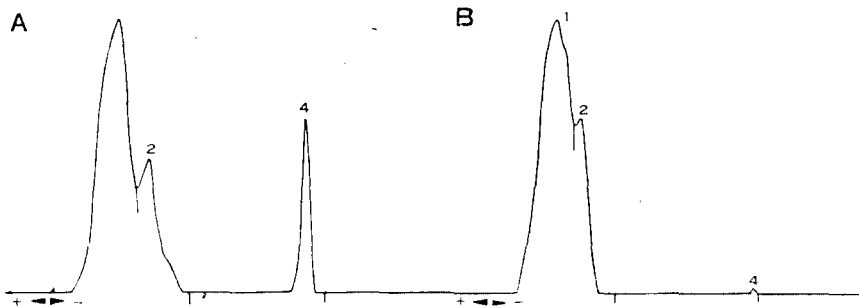


Fig. 4. Densitometric scan of cellulose acetate gel electrophoresis pattern of LDH isozymes in the kidney of *P. asotus*. A. Control; B. Treatment.

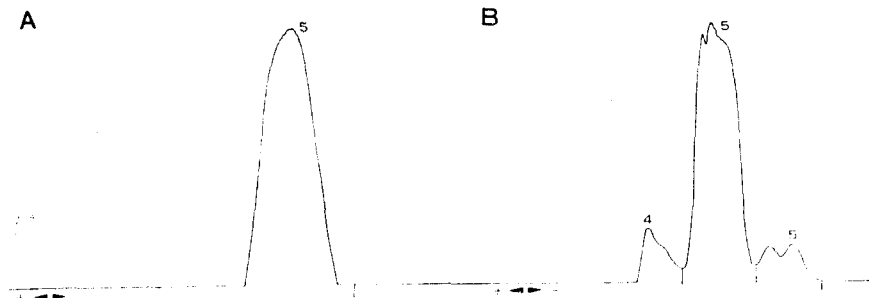


Fig. 5. Densitometric scan of cellulose acetate gel electrophoresis pattern of LDH isozymes in the skeletal muscle of *P. asotus*. A. Control; B. Treatment.

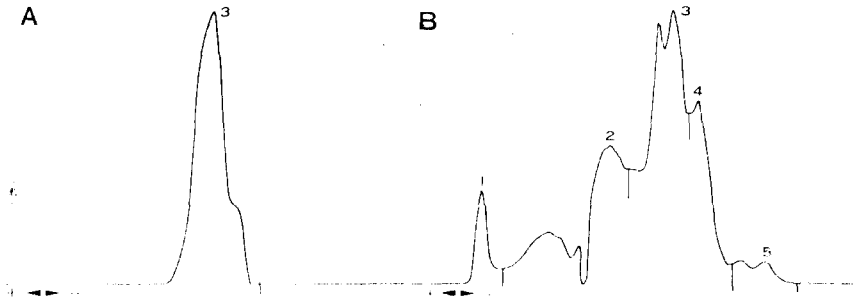


Fig. 6. Densitometric scan of cellulose acetate gel electrophoresis pattern of LDH isozymes in the ovary of *P. asotus*. A. Control; B. Treatment.

(Fieldhouse and Masters, 1968)에서와 같은 현상이었다. 또한 LDH-4와 LDH-5의 출현은 사람의 Duchenne muscular dystrophy에서 LDH-4와 LDH-5가 급격히 증가된다는 결과 (Yasmineh *et al.*, 1978)와 비슷한 것이었다. 메기 골격근의 동이온으로 인한 LDH-4와 LDH-5의 양적 및 형의 변화는 골격근 isozyme의 구조적 및 기능적 변화를 암시하는 것으로 생각된다. 또한 이상의 변화로 인하여 고도의 무기적 대사작용을 하는데 유리한 방향으로 진행되는 것이라고 생각된다.

대조구의 난소에서는 LDH-3 band만이 나타났고 동이온 처리구에서는 5개의 isozyme band가 각기 다른 비율로 모두 나타났다 (Figs. 1 and 6, Table 1). 이는 사람의 난소가 난소 정상피종 (dysgerminoma)에 걸리면 LDH-1이 증가되고 (Zondag, 1965), 정소가 정소정상피종 (seminoma)이나 기형종 (teratoma)일 때에는 LDH-1과 LDH-2가 증가되며 태생암 (carcinoma)일 때에는 LDH-3와 LDH-4가 많이 증가된다는 보고 (Zondag and Klein, 1968)와 비슷한 결과이다. 즉 동이온에 의하여 메기의 난소에서도 LDH-1부터 LDH-5까지의 5가지 LDH isozyme이 많은 양으로 증가되었다.

이상의 결과로 보아 독성 물질로 인하여 생기는 장기내 LDH isozyme의 변화 조사는 병적상태에 있는 어류의 여러가지 병변을 진단하는데에도 크게 활용할 수 있을 것으로 추론한다.

적 요

메기 (*Parasilurus asotus*)의 심장, 간장, 신장, 골격근 및 난소내의 젓산수소이탈효소 isozyme 형에 미치는 동이온의 영향을 cellulose acetate gel을 이용하여 전기영동법으로 연구하였다.

1. 정상인 메기의 심장에서는 LDH-1과 LDH-2가 나타났으나 동이온 처리구에서는 LDH-1, LDH-2, LDH-3 및 LDH-4가 나타났다. LDH-1의 양은 감소되고 LDH-2, LDH-3 및 LDG-4의 양은 증가되었다.

2. 정상인 메기의 간장에는 LDH-4만 있었으나 동이온 처리구에서는 LDH-4의 양이 감소되고 LDH-5가 새로 나타났다.

3. 신장에서는 대조구와 처리구, 2군에서 LDH-1, LDH-2 및 LDH-4가 나타났는데, 동

이온 처리후 LDH-1의 양은 증가되고 LDH-2와 LDH-4는 감소되었다.

4. 대조구의 골격근에는 넓은 band의 LDH-5가 하나 있었으나 처리구에서는 LDH-4와 LDH-5가 나타났는데 특히 LDH-5는 하나의 M형 sub-band를 가지고 나타났다.

5. 정상인 난소에서는 LDH-3 하나만 나타났으나 동이온 처리구에서는 LDH-1에서 LDH-5까지의 5개 LDH isozyme이 모두 나타났다.

6. 동이온 처리 기간중 심장, 간장 및 골격근에서는 대개 유기대사와 연관된 심장형 LDH isozyme은 감소되었지만 무기대사와 연관된 근육형 LDH isozyme은 증가되었다. 이들 기관은 동중독시의 무기대사의 중요한 기능과 어느 정도 관련이 있는 것으로 생각된다.

REFERENCES

- Bailey, G.S. and A.C. Wilson, 1968. Homologies between isozymes of fishes and those of higher vertebrates. *J. Biol. Chem.* 243 : 5943-5953.
- Brody, I.A. and W.K. Engel, 1964. Isozyme histochemistry: The display of selective lactate dehydrogenase isozymes. *J. Histochem. Cytochem.* 12 : 687-694.
- Brydon, W.G. and A.F. Smith, 1973. An appraisal of routine methods for the determination of the anodal isozymes of lactate dehydrogenase. *Clinica. Chemica. Acta.* 43 : 361-369.
- Clayton, J.W. and W.G. Franzin, 1970. Genetics of multiple lactate dehydrogenase isozymes in muscle tissue of lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*). *J. Fish. Res. Bd. Canada* 27 : 1115-1121.
- Fieldhouse, B. and C.J. Masters, 1968. Anomalous multiplicities of LDH. *Biochem. Biophys. Acta* 151 : 533-537.
- Galen, R.S., 1977. Myocardial infarction: A clinician's guide to isozymes. *Medical Times* 105 : 89-99.
- Gelderman, A.H., H.V. Gelboin, and A.C. Peacock, 1965. Lactic dehydrogenase isozymes in urine from patients with malignancies of the urinary bladder. *J. Lab. Clin. Med.* 65 : 132.
- Goldberg, E., 1966. Lactate dehydrogenase of trout: Hybridization *in vivo* and *in vitro*. *Science* 151 : 1091-1093.
- Harmon, D., 1965. The free radical theory of aging effect of age on serum copper levels. *J. Gerontol.* 20 : 151-153.
- Hong, S.U. and C.M. Kwon, 1974. Effects of mercuric ion on lactate dehydrogenase in the serum and muscle of snakehead. *Kor. J. Lim.* 7 : 75-79.
- Kim, S.O. and S.Y. Park, 1979. A comparison of the lactate dehydrogenase isozyme patterns in vertebrate cerebrum and retina. *Korean J. Zool.* 22 : 1-10.
- Lee, C.K. and I.Y. Choo, 1973. Studies on the effects of copper on the lactate dehydrogenase and esterase isozymes in various tissues of *Carassius carassius*. *Korean J. Zool.* 16 : 79-96.
- Lush, I.E., 1970. Lactate dehydrogenase isozymes and their genetic variation in coalfish (*Gadus virens*) and cod (*Gadus morrhua*). *Comp. Biochem. Physiol.* 32 : 23-32.
- Markert, C.L. and I. Faulhaber, 1965. Lactate dehydrogenase isozyme patterns of fish. *J. Exp. Zool.* 159 : 319-332.
- Markert, C.L. and R.S. Holmes, 1969. Lactate dehydrogenase isozymes of the flatfish, *Pleuronecti*.

- formes*: Kinetic, molecular and immunochemical analysis. *J. Exp. Zool.* **171** : 85-104.
- Massaro, E.J., 1972. Isozyme patterns of coregonine fishes: Evidence for multiple cistrons for lactate and malate dehydrogenase and achromatic bands in the tissues of *Prosobtum cylindraceum* (Pallas) and *P. coulteri* (Eigenmann and Eigenmann). *J. Exp. Zool.* **179** : 247-262.
- Park, S.Y., M.S. Lee, and D.H. Cho, 1974. Comparative studies of isozyme in vertebrate. V. Lactate dehydrogenase in water fishes. *Korean J. Zool.* **17** : 127-130.
- Plummer, D.T. and P.D. Leathwood, 1967. Some properties of lactate dehydrogenase found in human urine. *Biochem. J.* **103** : 172.
- Sprague, J.B., 1964. Lethal concentration of copper and zinc for young Atlantic salmon. *J. Fish. Res. Bd. Canada* **21** : 17-26.
- Sprague, J.B. and B.A. Ramsay, 1965. Lethal levels of mixed copper-zinc solutions for juvenile salmon. *J. Fish. Res. Bd. Canada* **22** : 425-432.
- Sprague, J.B., P.F. Elson, and R.L. Saunders, 1965. Sublethal copper-zinc pollution in a salmon river, field and laboratory study. *Int. J. Airwater Pollut.* **9** : 531-543.
- Vogel, F.S., 1959. The deposition and exogenous copper under experimental conditions with observations on its neurotoxic and nephrotoxic properties in relation to Wilson's disease. *J. Exptl. Med.* **110** : 801-809.
- Whitt, G.S., 1970. Developmental genetics of the lactate dehydrogenase isozymes of fish. *J. Exp. Zool.* **175** : 1-36.
- Whitt, G.S. and G.M. Booth, 1970. Localization of lactate dehydrogenase activity in the cells of the fish (*Xiphophorus helleri*) eye. *J. Exp. Zool.* **174** : 215-224.
- Wieme, R.J. and Y. Van Maercke, 1961. The fifth (electrophoretically slowest) serum lactic dehydrogenase as an index of liver injury. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **94** : 898-911.
- Willisroft, S.N. and H. Tsuyuki, 1970. Lactate dehydrogenase systems of rainbow trout: Evidence for polymorphism in liver and additional subunits in gills. *J. Fish. Res. Bd. Canada* **27** : 1563-1567.
- Wuntch, T. and E. Goldberg, 1970. A comparative physico-chemical characterization of lactate dehydrogenase: Isozyme in brook trout, lake trout and their hybrid splake trout. *J. Exp. Zool.* **174** : 233-252.
- Yasmineh, W.G., G.A. Ibrahim, M. Albasnezhad, and E.A. Awad, 1978. Isozyme distribution of creatine kinase and lactate dehydrogenase in serum and skeletal muscle in Duchenne muscular dystrophy, collagen disease, and other muscular disorders. *Clin. Chem.* **24** : 1985-1989.
- Zondag, H.A., 1965. Enzymes in clinical chemistry. ed. Ruysen, R. and L. Vandendriessche, Amsterdam. 120.
- Zondag, H.A. and F. Klein, 1968. Clinication of lactate dehydrogenase isozyme: Alterations in malignancy. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **151** : 578.