

寒冷環境에 順應시킨 흰쥐의 血清酵素 및 同位酵素의 活性

鄭 愛 順* · 南 相 烈

(경희대학교 대학원 생물학과)

Serum Enzyme and Isozyme Activities of Rats Acclimated to
Cold Environment

(Ai Soon Chung* and Sang Yul Nam)

(Department of Biology, Kyung Hee University)

(1985. 12. 19. 접수)

ABSTRACT

The activities of serum lactate dehydrogenase (SLDH), serum alkaline phosphatase (SALP), serum creatine phosphokinase (SCPK), and their isozymes were determined in adult male Sprague-Dawley rats acclimated to cold environment ($4\pm 1^\circ\text{C}$) for 36 days. The SLDH activity was significantly higher in the early stage of acclimated period. The steady state of SLDH activity seemed to be reached by the end of acclimated period. Electrophoretic separation of serum of control rat showed three SLDH isozymes. Isozymes SLDH4 and SLDH5 appeared most prominently, whereas only trace of SLDH1 or SLDH2 was found. The increase in SLDH level during acclimation to cold environment is a reflection of an immediate increase in the SLDH1, SLDH2, and SLDH3 type of SLDH isozyme. The acclimation to cold environment increased significantly level of SALP in the early state of acclimated period. SALP activity showed a attaining steady state with the resting level after transient rise.

Electrophoretic separation of SALP of control rats showed the SALP1 and SALP2 fractions. The transient rise in SALP activity of rats acclimated to cold environment coincided with a transient rise in SALP1 fraction. Immediately after exposure to cold environment, there was significant elevation in SCPK activity. Value returned to normal after transient rise. A new steady state of SCPK activity seemed to be reached by 36 days. It may be inferred from the above data that thermal compensation appears to result from a change in the activity of an enzyme and that the SLDH, SLDH-isozyme, SALP-

* 現：三育看護專門大學

isozyme, and SCPK may be involved directly or indirectly in thermoregulation during acclimation to cold environment.

서 론

환경온도는 생물계에서 수명, 동물의 행동등에 영향을 주는 주요한 요인이다. 극한의 온도에 대한 저항성 적응현상은 생체의 조직검사나 효소의 활성을 측정하므로 알 수 있다. (Prosser, 1958).

한냉에 있어서 효소활성의 변화는 2종 혹은 여러종의 동위효소 비율의 변화와 관련이 있으며 순화의 경우, 열적보상(熱的補償)은 양적인 효소의 변화에 의해 생성되는 것으로 생각되고 있다.

개의 저체온(29~27°C)시, 혈장속의 ALP (alkaline phosphatase), 아밀라아제 (amylase), GOT (glutamic oxalacetic transaminase), GPT (glutamic pyruvic transaminase)의 활성치가 유의성있게 증가하였다(Hurkat and Sharda, 1977). 숙신산탈수소효소(succinic dehydrogenase), 치토크롬산화효소(cytochrome oxidase) 및 말산탈수소효소(malic dehydrogenase)의 활성은 한냉에 순화시킨 흰쥐의 간 및 근육에서 증가하였다(Hannon, 1960; Hannon and Vaughan, 1960).

You 및 Sellers (1951)와 Seller et al. (1951)은 한냉환경(1.5°C)에 노출된 흰쥐의 간의 숙신산산화효소(succinoxidase)의 활성과 대사율에 관하여 보고한 바 있다.

대사적 보상성(補償性)에 관한 기작은 어느 특정된 온도 범위 안에서 효소의 동위효소 적응이라 할 수 있다(Prosser, 1967). 특정 혈청 동위효소의 상승은 상해된 조직의 세포에서 동위효소의 누출에 기인되고 또한 병리적 상태의 반응이다(Wroblewski et al. (1966).

Baldwin 및 Hochachra (1970)는 한냉에 순화시킨 송어의 아세틸콜린에스테라제 (acetylcholinesterase, AChE)의 동위효소에 관하여 보고한 바 있다.

포유동물에서 물리적 스트레스는 혈청 젖산탈수소효소 (serum lactate dehydrogenase, SLD) 활성의 상승을 가져온다(Garbus et al., 1963; Altland et al., 1968; Manger et al., 1968; Nam and Chang, 1970).

Vessell 및 Bearn(1961)과 Starkweather et al. (1966)에 의하면, 사람에서 심장, 적혈구, 신장에서는 역동도가 빠른 동위효소 LDH₁과 LDH₂가 많이 직출되며, 한편 간과 골격근의 동위효소는 LDH₄와 LDH₅가 주된 동위효소라고 하며, LDH₃가 가장 많이 존재하는 것은 비장, 췌장, 갑상선, 부신, 임파절등의 조직이다.

Kaplan 및 Ciotti(1961)는 LDH 동위효소의 분포는 한종의 동물의 상이한 체조직에서 장기 특이성을 나타내며 또한 다른 종에서 같은 조직에서 다양성을 띠고 있다고 보고하였다. Market 및 Faulhaber(1965)는 어류의 LDH의 동위효소분획수에 관하여, 한편 Hochachka (1965)는 한냉에 순화시킨 금붕어의 간에 관하여 보고한 바 있다. 혈청 및 조직 LDH₄ 동위효소 활성의 변화는 매우 광범위한 병리적 상태, 다시 말하면 심장장해(Wroblewski et al., 1960), 종양(Starkweather and Schock, 1962), 혈액장해(Bollomley et al., 1964) 및 근육장해(Wieme, 1963)등에 기인되어 영동패턴의 변화를 가져온다.

혈청 ALP(serum alkaline phosphatase, SALP)는 주로 간에서 담즙속으로 분비된다는 증

거가 있으나, 또한 ALP는 대부분의 조직, 간, 소장, 신장 및 태반에 존재하고 있으며, 간(혹은 다른 조직)이 혈청속의 ALP 활성의 상승에 기여하고 있다는 가능성이 암시되고 있다(Gutman, 1959). 개의 저체온 시 SALP의 유의성 증가는 한냉의 결과 간세포에 의하여 단축속으로 배제 감소에 기인하는 것으로 생각된다고 보고된 바 있다(Hurkat and Sharda, 1977). 물리적 스트레스에 의하여 혈청, 비장, 재생간, 백혈구, 소장의 ALP 활성의 변화와 활성변화 양상은 다양하여(Robinson *et al.*, 1965; Hyodo, 1966; Nam *et al.*, 1974), 증가, 감소 불변화등 여러 보고가 있다. Haije 및 de Jong(1963)은 사람의 혈청과 조직의 알칼린 포스파타제 동위효소(alkaline phosphatase isozyme, ALP-isozyme)의 연구에 한천겔 전기영동법을 사용하였으며 이들의 결과에 의하면 3개의 중요 활성대를 나타내고 있다. 다시 말하면 I은 α_2 -글로불린(globulin) 보다 약간 늦고 II는 약간 빠르며, 한편 III은 α_1 과 α_2 글로불린 사이의 역동도를 가지고 있으며 혈청에서 IV의 대(band)가 α -1글로불린과 같이 이동하고 있다. 혈청속의 늦은 영동대가 간에서 유래한다는 사실은 진분겔 전기영동 후 효소의 용출에 의해 증명되었으며(Kowlessar *et al.*, 1959), 골격, 간, 소장, 태반등의 각 조직은 상이한 동위효소를 지니고 있다(Fishman, 1974).

골격근과 심근에는 많은 양의 크레아틴 포스포키나제(creatine phosphokinase, CPK)를 함유하는데 반하여 간과 적혈구에는 거의 존재하지 않는다(Hess *et al.*, 1964; Hunt and Bailie, 1967).

본 연구는 흰쥐의 한냉환경($4\pm 1^\circ\text{C}$, 상대습도 70~80%) 순화기간 중 보상 변화에 따른 혈청 젖산탈수소효소(serum lactate dehydrogenase-SLDH), 혈청 젖산탈수소효소 동위효소(serum lactate dehydrogenase isozyme, SLDH-isozyme), 혈청 알칼리 포스파타제(serum alkaline phosphatase), 혈청 알칼리 포스파타제 동위효소(serum alkaline phosphatase isozyme, SALP-isozyme) 및 혈청 크레아틴 포스포키나제(serum creatine phosphokinase, SCPK) 등의 활성변화를 추구 검토하는데 있다.

재료 및 방법

실험실 조건에 적응된 Sprague-Dawley계의 체중 170~190g의 웅성흰쥐를 사용하였다. 흰쥐를 2주간 실험실에 적응 사육 후 본 실험에 공시하였다. 대조군과 한냉순화군의 동물은 흰쥐용 고형사료(제일사료주식회사, 대전)와 물을 자유로이 섭취하도록 하였다. 대조군은 $20\pm 1^\circ\text{C}$ (상대습도 40~60%)가 유지되는 실험실에서 사육하였고 한냉순화군은 환경온도 $4\pm 1^\circ\text{C}$ (상대습도 70~80%)가 조절되는 한냉실($1\times 1\times 1\text{ m}$)에서 안정된 상태로 순화처리하였고 물과 먹이는 자유로이 섭취하도록 처리했으며 한냉실의 광의 조도는 실험실의 정상적인 낮과 밤의 조건과 근사하도록 조절하였다.

혈액표본은 경동맥에서 채취하였고 혈청은 상온에서 15분간 응고 시킨 후 30분간 3000 rpm에서 원심분리시켰으며 또한 각종 효소 및 동위효소가 측정되기까지 냉장고에 보존하였다. 혈청은 각 일구의 한냉순화처리가 끝난 직후에 채취하여 혈청 젖산탈수소효소, 혈청 젖산탈수소효소, 혈청 젖산탈수소효소 동위효소, 혈청 알칼린 포스파타제, 혈청 알칼린 포스파타제 동위효소 그리고 혈청 크레아틴 포스포키나제 등의 활성을 측정하였다.

대조군의 SLDH, SLDH 동위효소, SALP, SALP 동위효소 및 SCPK의 활성은 실험개시

일구, 3일구, 10일구, 14일구 및 36일구에 걸쳐서 측정하였으며 한냉순화군은 실험개시일구, 0.21일구, 1일구, 2일구, 3일구, 4일구, 14일구, 22일구, 30일구 및 36일구에 걸쳐서 측정하였다.

SLDH활성의 측정은 Cabaud 및 Wroblewski(1958)의 방법에 의한 Sigma Chemical Company(1982b)의 변법에 따라서 측정하였다. 측정은 상온에서 비색법에 의해서 Bausch-and Lomb의 Model Spectronic 20의 분광광도계의 파장 450nm에서 측정하였다.

시약은 Sigma Chemical Company (St. Louis, 미국)에서 제조된 키트형을 사용하였다. SLDH의 활성치의 단위는 B-B unit/ml (Berger-Broida unit/ml)로 표시하였다.

SLDH동위효소 활성의 측정인 전기영동법은 Rosalki(1974)의 방법에 의한 Sigma Chemical Company (1982C)의 변법에 따라 LKB Multiphor System의 전기영동장치로 박층 한천겔 (agarose gel)로 전위구배 12 volt/cm의 정전압 조건 하에서 30분간 영동하였다. 각 정점 하 면적은 Ultra Scan-Lasen Densitometer (603nm)-Recording Integrator로 측정하여 백분비를 구하였다. 시약은 앞서 기술한 바 있는 키트형을 사용하였다.

SALP의 측정은 Lowry et al. (1954)의 방법 [30분간(孵置)방법(lycine 완충액)]에 의한 Sigma Chemical Company(1982d)의 변법에 따라서 측정하였다. 측정은 상온에서 비색법에 의해, 앞서 기술한 바 있는 분광 광도계의 파장 420 nm에서 측정하였다. 시약은 앞서 기술한 바 있는 키트형을 사용하였다. SALP의 활성치의 단위는 Sigma unit/ml로 표시하였다.

SALP-동위효소 활성의 측정인 전기영동법은 Rosalki(1974)의 방법에 의한 Sigma Chemical Company(1981a)의 변법에 따라 LKB Multiphor System의 전기영동 장치로 박층 한천겔 (agarose gel)로 전위구배 12Volt/cm의 정전압 조건 하에서 40분간 영동하였다. 각 정점면적은 앞서 기술한 바 있는 계기로 파장 603nm에서 측정하여 백분비를 구하였다. 시약은 앞서 기술한 바 있는 키트형을 사용하였다.

SCPK활성의 측정은 Rosalki(1967)의 방법에 의한 Beckman Instruments, Inc. (1983)의 변법에 따라 측정하였다. 측정은 상온에서 비색법에 따라 앞서 기술한 바 있는 분광광도계의 파장 340nm에 측정하였다. 시약은 Beckman Instruments, Inc. (Caris bad, 미국)에서 제조된 키트형을 사용하였다. SCPK의 활성치의 단위는 U/L로 표시하였다.

결 과

한냉순화에 있어 총 36일간에 걸친 SLDH활성의 변화는 Fig. 1에 표시하였다. 대조군의 실험개시 영(零)일구의 평균활성치는 1380.7 ± 136.3 B-B unit/ml이며 총 36일 간에 걸쳐 시일이 경과함에 따라 별다른 변화는 볼 수 없었다. SLDH활성치는 한냉순화 36일 간에 걸쳐 순화초기, 다시 말하면 0.21일구에 급격히 1587.2 ± 72.4 B-B unit/ml로 상승하였으나 ($P < 0.05$, t-검정). 곧 이어 대조군의 활성치로 근접되었으며 한편 22일구에서는 약간 감소되었으나 1283.3 ± 89.2 B-B unit/ml로 무의성이었으며, 36일구까지 큰 변화없이 지속성 있게 효소활성이 항경상태를 나타내고 있다.

SLDH동위효소 영동대는 한냉순화군에 있어 36일 간에 걸쳐 동위효소분획에 대하여 균등한 반응을 나타내지 않고 있다(Fig. 2). SLDH 동위효소 활성에 대한 각 분획 백분비의 평균치는 Fig. 2에 각각 표시하였다. 대조군의 실험개시 영일구에서의 전기영동상은 LDH,

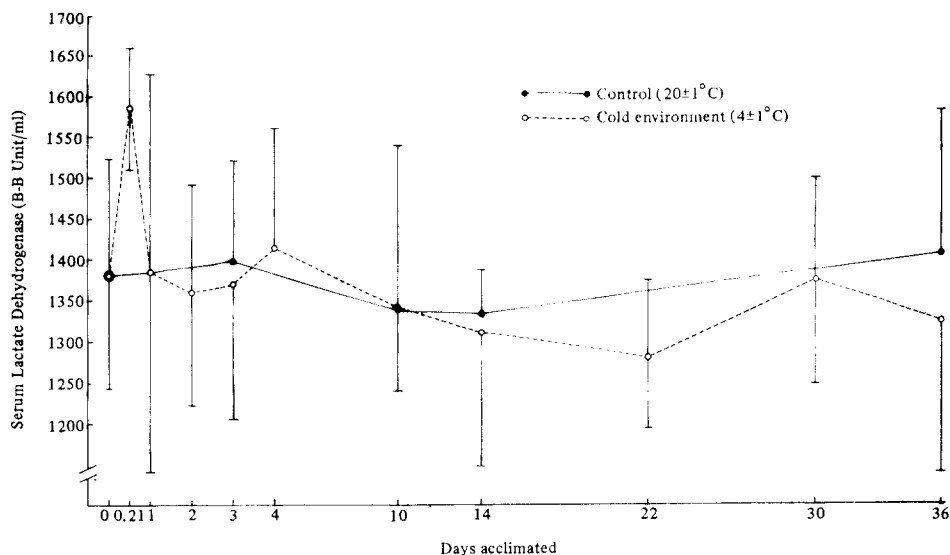


Fig. Change of serum lactate dehydrogenase activity level of rats acclimated to 4±1°C. Vertical bars indicate the standard error of the mean. Six rats were used for each measurements.

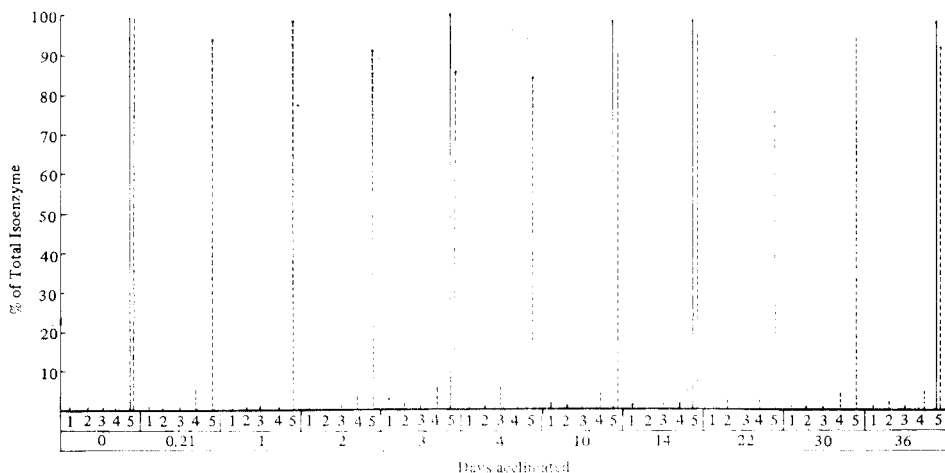


Fig. 2. Serum lactate dehydrogenase isoenzyme activity level of rats acclimated to 4±1°C. Serum lactate dehydrogenase isoenzyme activities of control groups were determined at 0, 3, 10, 14, and 36 days. Distribution of isoenzyme expressed as percentage of total lactic dehydrogenase activity. Band 1 is the more electrophoretically mobile (anodal) isoenzyme. Band 5 is the least mobile (cathodal) isoenzyme. Solid lines indicate control rats (20±1°C); broken lines cold-acclimated rats. Six rats were used for each measurements.

(0.10%)와 LDH₅(99.0%)를 나타내고 있으나, 10일구에서는 LDH₂(1.04%), LDH₄(0.24%) 및 LDH₅(98.72%)를 나타내며, 한편 36일구에서는 LDH₁(0.66%), LDH₄(0.46%) 및 LDH₅

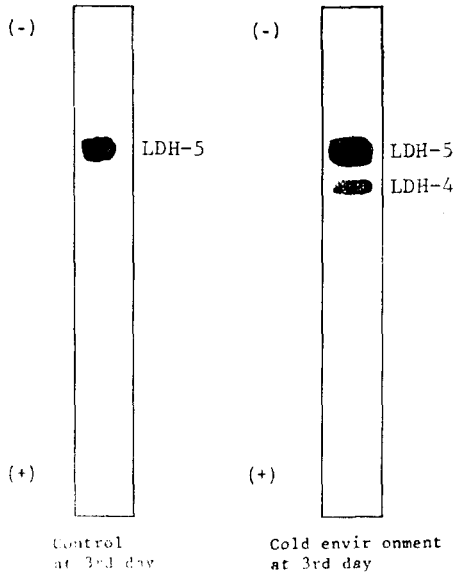


Fig. 3. Lactate dehydrogenase bands obtained by electrophoresis on agarose gels of serum from rats acclimated to $4\pm 1^{\circ}\text{C}$ and control rats ($20\pm 1^{\circ}\text{C}$).

(98.88%)에 활성치를 나타내고 있다. 한냉순화군의 0.21일구에서는 SLDH 활성이 증가하였으며 (Fig. 1), 이에 수반하여 한냉순화군의 0.21일구 SLDH 동위효소의 LDH₅ 분획의 활성치는 대조군의 실험개시 영일구의 99.90%에서 93.62%로 감소하는 대신 새로운 분획인 LDH₁(0.12%), LDH₂(0.47%), LDH₃(0.21%) 및 LDH₄(5.58%)의 활성이 나타났으나 1일구에서 LDH₅가 대조군 값에 근접하며 36일까지 이값의 지속을 나타내고 한편 36일구까지 일반적으로 LDH₁, LDH₂, LDH₃의 활성이 나타나고 있다. 한냉순화군의 SLDH의 활성치는 한냉순화 초기에 대조군의 값에 근접되는 경향을 나타내나, 이에 비하여 SLDH 동위효소는 순화기간 중 분획 백분율의 변화상 패턴이 지속성을 나타내고 있다.

한냉순화에 있어 총 36일 간에 SALP의 활성변화는 Fig. 4에 표시하였다. 대조군 실험개시 영일구의 평균활성치는 9.08 ± 1.08 Sigma unit/ml로 나타내었으며, 총 36일 간에 걸쳐 균등한 값을 나타내고 있다. 한냉순화군에 있어 1일구에서는 13.19 ± 0.85 Sigma unit ($P < 0.05$)인 상승값을 나타내었으나 곧이어 정상군 값으로 근접되고, 10일구(11.60 ± 0.94) 및 14일구(11.80 ± 2.83)에 약간 증가하는 경향이었으나 무의상이었으며, 이어서 36일까지 효소활성의 항정상태를 나타냈다.

SALP 동위효소 영동상이 한냉순화군에 있어 36일 간에 걸쳐 동위효소분획의 활성에 대하여 균등한 반응을 나타내지 않고 있다 (Fig. 6). SALP 활성의 각 분획에 대한 백분비의 평균치는 Fig. 5에 표시하였다. 대조군의 실험개시 영일구에서 전기영동상은 두개의 분획, 다시 말하면 ALP₁과 ALP₂는 실험개시 영일구에 각각 69.64% 및 30.36%를 나타내고 있으며, 일반적으로 36일간에 걸쳐 ALP₁의 함량은 ALP₂에 비하여 큰 백분율을 차지하고 있다. 한냉순화군에서 SALP는 초기상태에 증가하였으며 (Fig. 4), 이에 수반하여 한냉순화군의 SALP 동위효소의 ALP₁는 0.21일구부터 14일까지 감소되며 즉 0.21일구(54.38%), 2일구(45.38%), 3일구(54.00%), 10일구(53.72%) 및 14일구(60.53%)에서 감소되며 여기에 반하여 ALP₂는 일반적으로 0.21일구부터 14일까지 상승되고 있음을 알 수 있다. 즉 0.21

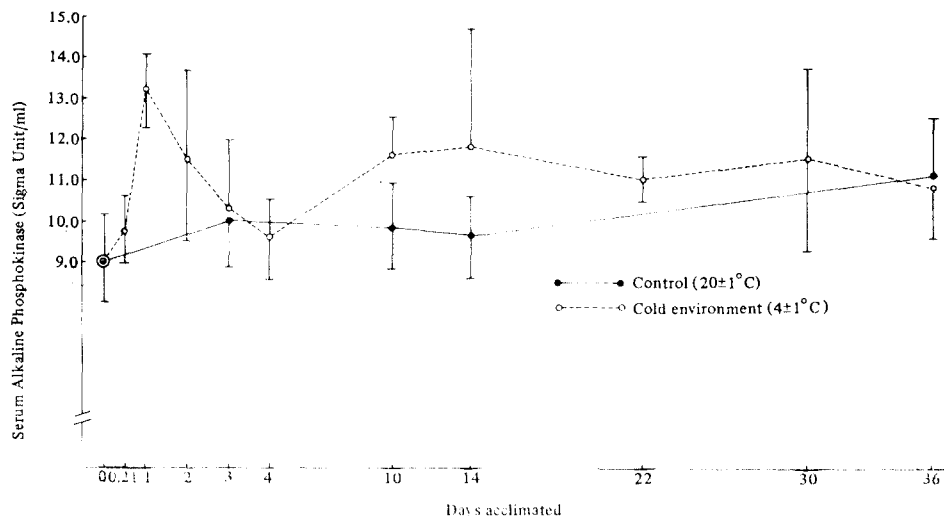


Fig. 4. Change of serum alkaline phosphokinase activity level of rats acclimated to $4\pm 1^\circ\text{C}$. Vertical bars indicate the standard error of the mean. Six rats used for each measurements.

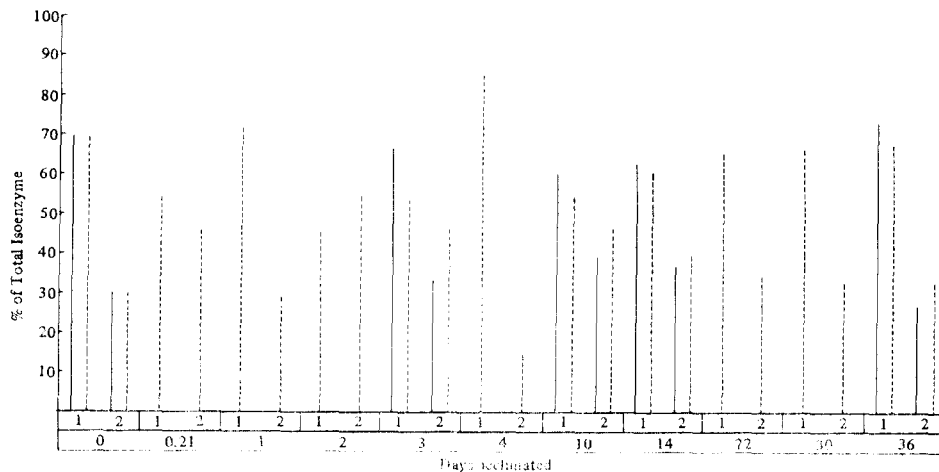


Fig. 5. Serum alkaline phosphatase isoenzyme activity level of rats acclimated to $4\pm 1^\circ\text{C}$. Serum alkaline phosphatase isoenzyme activities of control groups were determined at 0, 3, 10, 14, and 36 days. Distribution of isoenzyme expressed as percentage of total alkaline phosphatase activity. ALP 1 is the more electrophoretically mobile (anodal) isoenzyme. ALP 2 is the least mobile (anodal) isoenzyme. Solid lines indicate control rats ($20\pm 1^\circ\text{C}$); broken lines cold-acclimated rats. Six rats were used for each measurements.

일구(45.62%), 2일구(54.62%), 3일구(46.00%), 10일구(46.28%) 및 14일구(39.47%)에서 증가함을 알 수 있으며, 이어서 대조군의 값에 근접되는 경향이 있다. 따라서 한냉순화군의 SALP의 활성치의 일구 간에 걸친 변화양상과 SALP 동위효소의 활성치의 일구 간에 걸친 변화양상은 거의 일치되는 경향을 나타내고 있다. 한냉순화시 SALP 활성치의 증가는

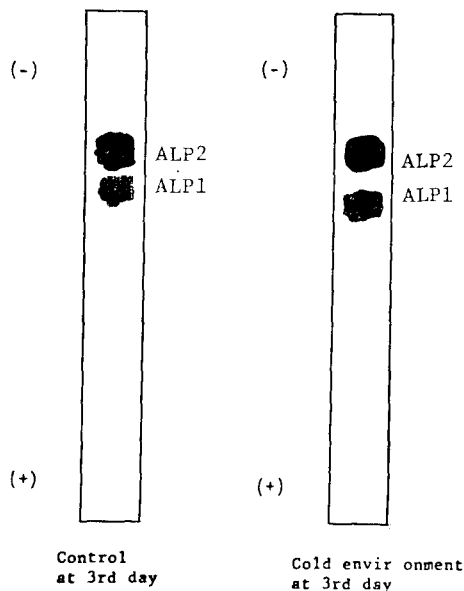


Fig. 6. Alkaline phosphatase bands obtained by electrophoresis on agarose gels of serum from rats acclimated to $4^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ and control rats ($20^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$).

SALP₁ 분획의 즉각적인 증가의 반영임을 알 수 있다.

한냉순화에 있어 총 36일 간에 걸쳐 SCPK 활성의 변화는 Fig. 7에 표시하였다. 대조군의 실험개시 영일구의 평균활성치는 2211.6 ± 258.0 U/L로 나타났으며 총 36일 간에 걸쳐 균등한 값을 나타내고 있다. 한냉순화군에 있어 0.21일구에서는 3361.9 ± 207.6 U/L ($P<0.001$)

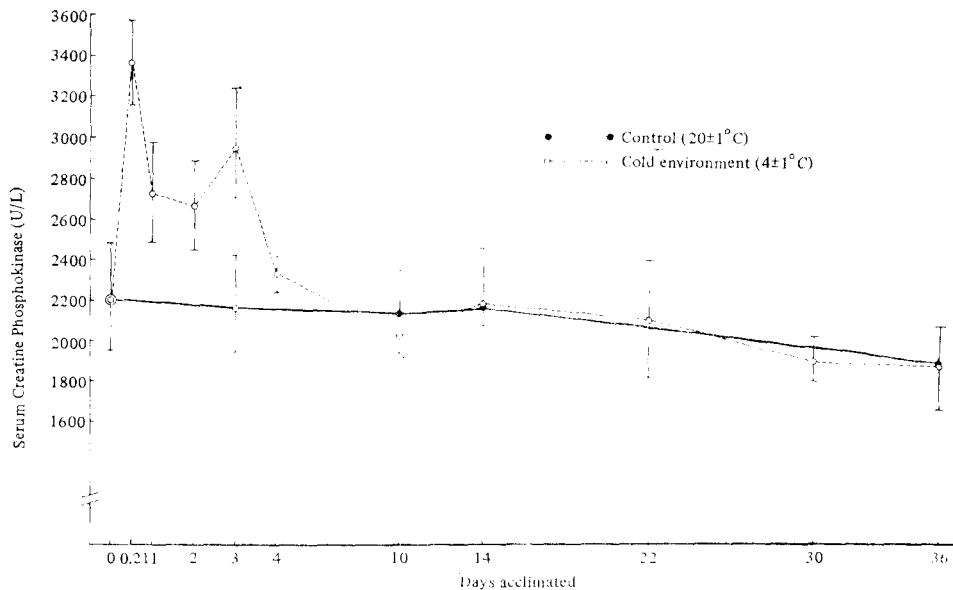


Fig. 7. Change of serum creatine phosphokinase activity level of rats acclimated to $4\pm 1^{\circ}\text{C}$. Vertical bars indicate the standard error of the mean. Six rats used for each measurements.

이며, 1일구 2722.1 ± 248.4 U/L ($P < 0.05$), 2일구 2654.3 ± 226.0 U/L ($P < 0.05$) 및 3일구 2964.6 ± 264.3 U/L ($P < 0.001$)인 상승값을 나타내고, 곧이어 대조군의 값에 근접되어 36일까지 지속적인 효소활성의 항정상태의 수준을 나타내었다.

고 찰

본 연구에서 한냉순화 기간중 대조군에 비하여 일반적으로 한냉순화군은 순화초기에 SLDH, SALP, SCPK의 활성이 유의하게 급상승하였으나 곧이어 안정치로 되돌아가서 효소활성의 항정상태를 유지하는 경향이었으며, 한편 SLDH동위효소 및 SALP 동위효소의 전기영동상도 한냉순화 초기에 큰 변화양상을 나타내고 있다(Fig. 3 및 Fig. 6).

한냉에 대한 고등동물의 순화는 특정 수용기에 대한 환경자극의 작용과 더불어 시작하는 생체의 장기 적응 반응이며 또한 신경내분비 인자에 의하여 유지된다고 하며(Prosser, 1967), 한편 조절기작에서 가장 중요한 역할은 교감신경계의 흥분에 의하여 또한 감상선 기능의 항진에 의해서 이루어지며, 이로 인한 기계적 활성의 결과로 열생산의 증가와 열방사의 감소를 가져온다(Meerson, 1975).

흰쥐를 한냉에 장시간 노출 후 혈청 GOT (glutamic oxalacetic transaminase)와 혈청 알돌라아제(aldolase)의 활성치가 유의성 있게 증가되었다(Highman and Altland, 1962). Knox (1958) 및 Prosser(1962)에 의하면 수종의 효소는 온도에 대한 단시간 순화 기간 중 효소의 농도에 있어 순화적인 변화가 있다고 보고한 바 있다.

한냉 2°C에 순화시킨 송어의 아세틸콜린에스테라제(acetylcholin esterase, AChE)는 고온에 순화시킨 어류에서의 AChE보다도 명확히 매우 낮은 역동율(易動率)을 나타낸 1개의 동위효소를 나타내는 반면 12°C에 순화시킨 송어는 2개의 동위효소를 나타낸다(Baldwin and Hochachra, 1970). 변온 동물에 있어서 한냉에 순화된 생체에서는 어느 특정의 지표효소의 농도 증가를 가져오며 또한 한정된 열적환경내에서 활성을 나타내는 새로운 동위효소의 생성을 가져온다(Hazel and Prosser, 1974).

물리적 스트레스 즉 한냉 및 고온에 폭로된 동물의 혈청에 있어서 효소활성의 증가는 일반적으로 세포투과성의 증가에 기인되는 것으로 생각되고 있다(Zierler, 1956; Blair *et al.*, 1961; Halonen and Kontinen, 1962; Highman and Altland, 1962; Kim and Nam, 1976). 변온 동물의 효소활성에 있어 온도 유발성 변화에 대한 동물의 조직 및 세포성 기능의 보상은 열적 순화 시 촉매적 활성의 보상성 형으로 해석되고 있다(Hazel and Prosser, 1974). 한냉노출 후 흰쥐에서 세포 투과성이 증가되며, 이는 혈청효소의 증가로 부분적으로 설명될 수 있다(Blair *et al.*, 1961; Highman and Altland, 1962). 반투과성은 에너지 의존성 과정이며 한냉으로 인한 세포대사의 감소는 세포막의 투과성 증가를 가져오며 그러므로 세포내 효소가 혈장속의 증가로 연결되는 것으로 생각될 수 있다(Blair *et al.*, 1961; Hurkat and Sharda, 1977).

SLDH 활성의 즉각적인 상승은 세포막의 투과성의 증가가 일어났음을 의미한다. 따라서 본 실험에서 흰쥐에 한냉노출에 있어 한냉초기에 SLDH 활성의 상승은 혈류속으로 조직의 효소의 유리에 기인되는 것으로 생각될 수 있으며 또한 한냉순화 초기 이후 SLDH 활성의 항정상태의 수준을 지속하고 있음을 알 수 있다. LDH에 대한 각 장기는 각각 특유의 효

소분획의 구성을 가지고 있으며, 질환의 경우 병변 조직세포의 괴사 혹은 세포막 투과성의 변화에 의하여 세포내 효소가 혈액 속으로 이탈되며 또 혈청속의 효소의 패턴이 병변조직의 그것에 근사되는 경우가 있다(Wroblewski and Gregory, 1961; Hawrylewicz and Williarn, 1966).

어류에서 LDH의 동위효소의 분획수는 포유류보다 매우 많아서 20분획수에 이르며, 대구과의 일종인 어류에서 4분획수의 상이한 유전자형이 LDH형에 의해서 밝혀진 바 있다(Market *et al.*, 1965). 한병에 순화된 금붕어의 간에서 5개의 LDH 전기영동대를 가지고 있으나, 온열에 순화된 금붕어는 3개만 있으며, 근육에는 15개의 대를 지니고 있다(Hochachka, 1965). 그러므로 온도 순화는 진체적으로 단백질의 하나인 동위효소의 합성과 관련이 있다고 한다(Prosser, 1967). 본 실험의 대조군에서는 일반적으로 3개의 분획인 LDH₄ 및 LDH₅가 그리고 LDH₁ 혹은 LDH₂가 주종을 이루고 있으나 한병순화 기간에는 일반적으로 5개의 분획 즉 LDH₁, LDH₂, LDH₃, LDH₄ 및 LDH₅가 나타나고 있다. 따라서 이러한 현상은 효소활성의 보상변화라고 생각될 수 있다.

여러 동물의 조직 속의 인산효소의 생성 및 분포는 조직학적 및 세포학적으로 연구된 바 있으며(Bradfield, 1950; Chevremont and Firket, 1953; Doyle, 1953; Jonek *et al.*, 1963) 또한 포유동물의 조직에서 ALP 활성이 높은 곳은 신장의 근위세뇨관, 소장, 골, 태반, 유선 등이며 조직 화학적 연구에 의하면, ALP의 국제부위는 신장에서 근위세뇨관의 흡수면, 소장은 접막, 간에서는 모세담관, 골에서는 골아세포등이다. 이러한 사실에서 ALP가 세포막을 통하여 수송에 관여하고 있다는 것을 암시하여 주며, 세균에서는 무기인산의 수송에 관계된다고 보고된 바 있다.

생리학적 변화, 다시 말하면 재생화, 발암, 성장 및 배발생등에서 ALP의 활성은 다양성을 나타내고 있다(Chevremont and Firket, 1953; Taguchi *et al.*, 1956). 생체내에서의 이 효소의 농도 및 활성을 제어하는 기작에 관하여서는 아직 완전히 밝혀져 있지 않다. 정상 사람의 혈청에 존재하는 ALP는 소장성(小腸性)의 가능성을 생각하고 있으나 일반적으로는 간에서 유래하는 것으로 생각되고 있는 경우가 많다(Fishman, 1974). 본 실험에서 SALP의 활성은 한병 초기에 증가하였으며 곧이어 항정상태의 수준을 유지하고 있다.

사람의 간 및 담도질환에서 증가하는 것은 ALP₁ 및 ALP₂이며 혈청 ALP의 활성이 상승하고 있는 골질환에서는 ALP₃가 증가하는데 ALP₃는 골유래의 ALP이며 ALP₂와 ALP₃는 구별되지 않은 경우도 있다(Chiandussi *et al.*, 1962; Posen, 1967).

본 실험의 한병순화 시 SALP 활성의 변화양상과 SALP 동위효소의 변화양상은 시상(時相)으로 거의 일치하는 양상을 띄고 있으므로, 효소활성의 보상변화를 나타내고 있다고 생각한다. SALP 동위효소는 SLDH 동위효소와 달리 한병순화 시 분획수의 증가를 나타내지 않고 다만 SALP₁ 및 SALP₂의 백분율의 차이만 나타내고 있는 것이 특색이라 할 수 있다. SALP 활성의 상승은 SALP₁ 동위효소의 즉각적인 상승의 반영이라고 생각된다.

근 질환에서는 혈청CPK 활성이 상승되며 심심근 장애에서도 혈청CPK 활성이 상승된다(Hess *et al.*, 1964; Lewis, 1967; Crowley, 1968; Goldberg and Winfield, 1972). 근육장애 시 근초는 다른 효소보다 CPK를 많이 투과시키고 있다(Aebi *et al.*, 1961). 한병 처리로 혈청 CPK에 대한 세포막 투과성이 증가된 때문이 아닌가 생각된다. 한병순화 시의 SCPK의 활성의 변화 폭은 SLDH 및 SALP에 비해서 적었으며 순화 시 이 효소 역시 효소의 항정상

태를 나타내어 현저한 보상변화를 나타냈다고 할 수 있다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때 한냉순화 초기에 세포막 투과성을 변경시켜 효소활성의 항정상태에 이상을 가져오며, 따라서 수종의 혈청효소의 활성치가 증가될 가능성을 생각해 볼 수 있으며 이러한 가능성은 한냉순화 초기에 일어나는 약간의 조직상해에 기인되는 것으로 생각된다. 그러나 초기 이후 순화기간 중에는 보상성 변화에 따른 효소활성의 항정상태의 수준을 지속하고 있음을 알 수 있다. 따라서 한냉순화 기간 중 SLDH, SLDH 동위효소, SALP, SALP 동위효소 및 SCPK가 열적조절에 직접 또는 간접적으로 관여되는 것으로 생각할 수 있다.

요 약

한냉 환경에 Sprague-Dawley계 웅성 흰쥐를 순화시켜 SLDH, SLDH 동위효소, SALP, SALP 동위효소 및 SCPK 등의 활성치의 보상 변화에 따른 변화를 관찰 검토하였다. 한냉순화는 $4\pm 1^{\circ}\text{C}$ (상대습도 70~80%)에서 안정상태로 36일간 순화처리 하였으며 SLDH의 활성치는 한냉순화 초기에 유의성 있게 증가하였으나 곧 감소되어 정상치로 접근하며 36일구 까지 항정상태를 지속하였으며, 대조군의 SLDH 동위효소는 주로 3개의 전기영동분획 즉 LDH₁, LDH₂, LDH₄ 및 LDH₅ 를 나타냈으나 한냉순화 기간 중에는 3개의 분획 즉 LDH₁, LDH₂ 및 LDH₃가 나타났으며, 한냉순화 시의 SLDH의 상승은 SLDH₁, SLDH₂ 및 SLDH₃의 반영이라고 생각되며 SALP의 활성치는 한냉순화 초기에 유의적으로 증가하였으나 곧 감소되어 정상치로 접근하여 36일구까지 항정상태를 지속하였고, 대조군의 SALP 동위효소는 2개의 전기영동분획을 지속하고 있으며, 한냉순화군 초기의 SALP 활성치의 증가는 SALP₁ 분획의 즉각적인 증가의 반영임을 알수있고, 한냉순화로 인하여 SCPK의 활성치는 순화초기에 유의적으로 상승하였으나 곧이어 안정치로 접근하여 순화 말기까지 항정상태를 지속하였다. 한냉순화($4\pm 1^{\circ}\text{C}$)처리는 한냉 초기에 SLDH, SLDH 동위효소, SALP, SALP 동위효소 및 SCPK 활성치 모두에 영향을 끼치는 것으로 생각되며 따라서 상기 각종 효소가 직접 또는 간접적으로 열적조절에 관여하는 것으로 생각된다.

REFERENCES

- Aebi, U., R. Richterich, J.P. Colombo, and E. Rossi, 1961. Progressive muscular dystrophy. Biochemical identification of the carrier state in the recessive sex-linked juvenile (Duchenne) type by serum creatine phosphokinase determinations. *Enzyme* 1:61-64.
- Altland, P.D., B. Highman, and D. Nelson, 1968. Serum enzyme and tissue changes in rats exercised repeatedly at altitude: effect of training. *Am. J. Physiol.* 214:28-32.
- Baldwin, J. and P.W. Hochachra, 1970. Functional significance of isoenzymes in thermal acclimatization-acetylcholinesterase from trout brain. *Biochem. J.* 116:883-887.
- Beckman Instrument, Inc., 1983. Beckman Instruction 015-245478.
- Blair, E., R. Hook, H. Tolley, and G.E. Bunce, 1961. Serum glutamic oxaloacetic transaminase content in hypothermia. *Science* 133:103-106.
- Bollomley, R.H., S.L. Locke, and H.C. Ingram, 1964. Zone electrophoresis of human tumor lactate

- dehydrogenase. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* 5:3-7.
- Bradfield, J.R.G. 1950. The localization of enzymes in cells. *Biol. Rev.* 25:113-157.
- Cabaud, P.G. and F. Wroblewski, 1958. Colorimetric measurement of lactic dehydrogenase activity of body fluids. *Am. J. Clin. Pathol.* 30:234-236.
- Chevremont, M. and H. Firket, 1953. Alkaline phosphatase of the nucleus. *Internat. Rev. Cytol.* 2:261-288.
- Chiandussi, L., S.F. Greene, and S. Sherlock, 1962. Serum alkaline phosphatase fractions in hepatobiliary and bone disease. *Clin. Sci.* 22:425-429.
- Crowley, L. V., 1968. Creatine phosphokinase activity in myocardial infarction, heart failure, and following various diagnostic and therapeutic procedures. *Clinical chemistry* 14:1185-1192.
- Doyle, W.L., 1953. Quantitative histochemistry of phosphatase. *Internat. Rev. Cytol.* 2:249-260.
- Fishman, W.H., 1974. Perspective on alkaline phosphatase isoenzymes. *Am. J. Med.* 56:617-650.
- Garbus, J., B. Highman and P.D. Altland, 1963. Serum enzymes and lactic dehydrogenase isoenzyme after exercise and training in rats. *Am. J. Physiol.* 217:467-472.
- Goldberg, D.M. and D.M. Winfield, 1972. Diagnostic accuracy of serum enzyme assays for myocardial infarction in a general hospital population. *British Heart Journal* 34:597-604.
- Gutman, A.B., 1959. Serum alkaline phosphatase activity in disease of the skeletal and hepatobiliary systems. *Am. J. Med.* 27:875-882.
- Haije, W.G. and M. de Jong, 1963. Iso-enzyme patterns of serum alkaline phosphatase in agar-gel electrophoresis and their clinical significance. *Clin. Chim. Acta.* 8:60-623.
- Halonen, P.I. and A. Konttinen, 1962. Effect of physical exercise on some enzymes in serum. *Nature* 193:942-944.
- Hannon, J.P., 1960. Effect of prolonged cold exposure on components of the electron transport system. *Am. J. Physiol.* 198:740-744.
- Hannon and D.A. Vaughan, 1960. Effect of prolonged cold exposure on the glycolytic enzymes of copy liver and muscle. *Am. J. Physiol.* 198:375-380.
- Hawrylewicz, E.J. and H.B. William, 1966. Effect of gamma and proton irradiation on lactic dehydrogenase isoenzyme. *Rad. Res.* 28:538-547.
- Hazel, J.R. and C.L. Prosser, 1974. Molecular mechanisms of temperature compensation in poikilotherms. *Physiological Reviews* 54:620-677.
- Hess, J.W., R.P. MacDonald, R.J. Frederick, R.N. Jones, and D. Cross, 1964. Serum creatine phosphokinase (CPK) activity in disorders of heart and skeletal muscle. *Annals of Internal Medicine* 61:1015-1021.
- Highman, B. and P.D. Altland, 1962. Serum enzyme and histopathologic changes in rats after cold exposure. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 109:523-526.
- Hochachka, P.W., 1965. Isoenzymes in metabolic adaptation of a poikilotherm: Subunit relationships in lactic dehydrogenase of goldfish. *Arch. Biochem. Biophys.* 111:96-103.
- Hunt, D. and M. Bailie, 1967. The value of serum creatine phosphokinase estimations in the diagnosis of myocardial infarction. *Med. J. Aust.* 2:1031-1034.
- Hurkat, P.C. and S. Sharda, 1977. Biochemical, histological & histochemical studies in hypothermia induced dogs canis familiaris. *Indian. J. Ex. Biol.* 15:796-1000.
- Hyodo, Y., 1966. Effect of X-irradiation on phosphatase activity in the intestine of goldfish, Caras-

- sius auratus, at different temperatures. *Annot. zool. Japon* 39:119-127.
- Jonek, J.S., Kosmider, and J. Kaiser, 1963. Histochemical studies on activity and distribution of acid phosphatase, nonspecific esterase, and E. 600 resistant esterase in jejunal mucosa during acute radiation disease. *Inn. J. Rad. Biol.* 7:411-419.
- Kaplan, N.O. and M.M. Ciotti, 1961. Evolution and differentiation of dehydrogenase. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 94:701-709.
- Kim, D.M. and S.Y. Nam, 1976. Effect of temperature acclimation on activities of serum and hepatic enzymes of the rat. *Annot. zool. Japon* 49:1-12.
- Knox, W.E., 1958. Adaptive enzymes in the regulation of animal metabolism. In *Physiological adaptation* (Prosser C.L. ed.), pp.107-125, Amem. Physiol. Soc., Washington, D.C.
- Kowlessar, O.D., J.H. Pert. L.J., Haelfner, and M.H. Slesinger, 1959. Localization of 5-nucleotidase and non-specific alkaline phosphatase by starch gel electrophoresis. *Soc. Exp. Biol. & Med.* 100:191-196.
- Lewis, M.J., 1967. Serum CPK activity in the diagnosis of acute myocardial infarction. *Pennsylvania Medicine* 70:70-82.
- Lowry, O.H., N.R. Roberto, M. Wu, W.S. Hiren, and E.J. Crawford, 1954. The quantitative histochemistry of brain. II. Enzyme measurement. *J. Biol. Chem.* 207:20-24.
- Manger, M., W.J. Blatt, and R.W. Newman, 1968. Lactic dehydrogenase isoenzymes: Variations in the plasma of men exposed to cold. *J. Appl. Physiol.* 24:616-618.
- Markert, C.L., F. Moller, and I. Faulhaber, 1965. Lactate dehydrogenase isozyme patterns of fish. *J. Exptl. zool.* 159:319-332.
- Markert, C.L. and G.S. Whitt, 1983. Isozymes, conceptual history and biological significance. In *Isozymes: Current Topics in Biological and Medical Research* (Rattazzi, A.C., Scandalios, J.B. and Whitt, G.S., eds.) Vol. 7. pp.1-18. Alan R. Liss, Inc., New York.
- Meerson, F.Z., 1975. Role of synthesis of nucleic acids and protein in adaptation to the external environment. *Physiological Reviews* 55:79-123.
- Nam, S.Y. and S.H. Chang, 1970. Effect of methylene blue on lactic dehydrogenase level and lactic dehydrogenase isoenzymes in rats exposed to gamma-irradiation. *Annot. zool. Japon* 43:79-87.
- Nam, S.Y., D.M. Kim, H.S. Kim, and T.W. Koo, 1974. Effect of methylene blue on serum alkaline and acid phosphatase activity of rats exposed to gamma-irradiation: Theses collection. *Kyung Hee Univ. Korea* 8:299-308.
- Posen, S., 1967. Alkaline phosphatase. *Ann. Intern. Med.* 67:183-187.
- Prosser, C.L., 1958. The nature of physiological adaptation. In *physiological Adaptation*, (Prosser, C.L., ed.) p.167. American Physiological Society, Washington, D.C.
- Prosser, C.L., 1962. Acclimation of poikilothermic vertebrates to low temperatures. In *Comparative Physiology of Temperature Regulation* (Hannon J.P. and Viereck. E. eds). pp.1-34. Arctic Aeromedical Lab., Fort Wainwright, Alaska.
- Prosser, C.L., 1967. Molecular mechanisms of temperature adaptation in relation to speciation. In *Molecular Mechanisms of Temperature Adaptation*. (Prosser, C.L., ed). pp351-376. American Association for the Advancement of Science, Washington, D.C.
- Robinson, E., E.M. Zakaria, and B. Rachmilewitz, 1965. The effect of total body and partial body irradiation on granulocytic alkaline phosphatase in the rat. *Rad. Res.* 26:527-533.

- Rosalki, S.B., 1967. An improved procedure for serum creatine phosphokinase determination. *J. Lab. Clin. Med.* **69**:696-705.
- Rosalki, S.B., 1974. Standardization of isoenzyme assays with special reference to lactate dehydrogenase isoenzyme electrophoresis *Clin. Biochem.* **7**:29-33.
- Sellers, E.A., S. Reichman, N. Thomas, and S.S. You, 1951. Acclimatization to cold in rats: Metabolic rates. *Am. J. Physiol.* **167**:651-655.
- Sigma Chemical Company, 1981a: Sigma Technical Bulletin No. 10-EP.
- Sigma Chemical Company, 1982b: Sigma Technical Bulletin No. 500.
- Sigma Chemical Company, 1982c: Sigma Technical Bulletin No. 705-EP.
- Sigma Chemical Company, 1982d: Sigma Technical Bulletin No. 104.
- Starkweather, W.H., H.H. Ipencer, E.L. Schwarz, and H.K. Schoch, 1966. The electrophoretic separation of lactate dehydrogenase isoenzymes and their evaluation in clinical medicine. *J. Lab. Clin. Med.* **67**:329-340.
- Starkweather, W.H., H.H. Ipencer, and H.K. Scheck, 1962. Some observation on the lactate dehydrogenase of human neoplastic tissue. *Biochem. Biophys. Acta.* **62**:440-442.
- Taguchi, S.H., H. Kobayashi, and K. Maruyama, 1956. Phosphatase activity of the skin of toad and tadpole. *Annot. zool. Japon* **29**:181-186.
- Vessel, E.S. and A.G. Bearn, 1961. isoenzymes of lactic dehydrogenase in human tissues. *J. clin. Invest* **40**:86-591.
- Wieme, R.J. 1963. Multiple molecular forms of enzymes and their use in clinical diagnosis. *Nature* **199**:437-439.
- Wroblewski, F. and K.F. Gregory, 1961. Lactic dehydrogenase isoenzymes and their distribution in normal tissue and plasma and in disease states. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **94**:912-921.
- Wroblewski, F. and K.F. Gregory, 1966. Isoenzymes and Myocardial Infarction, *New Engl. J. Med.* **263**:531-536.
- You, R.W. and E.A. Sellers, 1951. Increased oxygen consumption and succinoxidase activity of liver tissue after exposure of rats to cold. *Endocrinology* **49**:374-378.
- Zierler, K.L., 1956. Movement of aldolase from excised rat diaphragm. *Am. J. Physiol.* **185**:1-11,