

## 백서 재생간조직의 낙산탈수소효소 A-유전자 발현의 전사활성

김 해 영 · 이 승 기

서울대학교 약학대학

(Received August 1, 1988)

### Transcriptional Control of Lactate Dehydrogenase A-Gene Expression during the Pre-replicative Phase of Regenerating Rat Liver

Hae-Young Kim and Seung-Ki Lee

College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

**Abstract**—Transcriptional rate of lactate dehydrogenase A-gene(LDH-A) during the pre-replicative phase of regenerating rat liver was determined by *in vitro* run-off transcription assay. The results show that the transcription rate of LDH A-gene increases between 12 hours and 15 hours peaking at 13 hours after partial hepatectomy of rat liver. The increased rate of LDH A-gene transcription was interfered after DL-propranolol treatment intraperitoneally injected twice at 1 hour and 8 hours after partial hepatectomy indicating that the transcriptional control of LDH A-gene expression may be mediated by beta adrenergic receptor and cAMP as a second messenger. And also was it shown that the temporally increased rate of LDH A-gene transcription was maximum one hour after the second cAMP-surge which is known to play an important role for the initiation of DNA replication during regeneration of rat liver. And the transcriptional rate of LDH A-gene was decreased to the basal level at the time period when the hepatocytes proliferate rapidly suggesting that the induced LDH A-isozyme may be required for the initiation of DNA replication during regeneration of rat liver. These data may be supporting for the hypothesis suggesting that the induced LDH A-isozyme during the pre-replicative phase of regenerating rat liver may play bifunctional roles as a glycolytic enzyme and a helix destabilizing protein as well.

낙산탈수소효소(LDH)는 M(muscle) type과 H(heart) type의 subunits가 각각 다른 비율로 구성된 해당과정의 효소로 LDH-1부터 LDH-5 까지 5종의 isozyme의 형태로 존재하며 그 성상이 가장 많이 연구된 효소이다. 그러나 아직도 이들 5종의 isozyme이 organ 및 tissue에 따라 왜 다른 구성으로 분포되어있으며 그 기능의 차이는 무엇인지 잘 알려진 바 없다. 이 LDH는 세포의 성장 분화과정중 다른 종류의 isozyme 발현이 유도될뿐 아니라 cAMP를 second messenger로 작용하는 호르몬에 의해 그 발현이 조절되는 효소로 알려져 있다.<sup>1)</sup>

백서의 뇌 종양으로부터 분리된 C6-glioma cell culture system에서는 catecholamine이나

dibutyryl cAMP로 처리하면 LDH-5 isozyme의 생합성이 대조군에 비해 약 10배 정도 증가되며 상기 호르몬에 의한 생합성 유도기전은 전사 단계에서 조절된다는 것이 보고되었다.<sup>2)</sup>

이들호르몬에 의한 LDH-5 isozyme 생합성 유도가 왜 발생해야 하는가는 아직 알려져 있지 않으나 최근 보고된 문헌에 의하면 백서의 간조직으로부터 분리된 helix destabilizing protein (HDP)의 아미노산 서열, ssDNA binding활성, NADH의 cofactor를 이용한 pyruvate로부터 lactate의 합성 효소활성 및 immunological cross-reactivity등이 LDH-5 isozyme과 매우 유사하기 때문에 LDH-5 isozyme이 hepatocyte의 세포분화과정중 DNA 생합성, 전사과정 및 유전자 재

조합등에 중요한 역할을 하는 것으로 밝혀진 HDP와 같은 기능을 할 것이라고 제시되고 있다.<sup>3,4,5)</sup>

본 연구에서는 호르몬에 의해 발현이 조절되는 LDH-5 isozyme이 *in vivo* system에서도 *in vitro* 실험결과와 같이 HDP의 기능을 수행할 가능성을 검토하기 위해 백서의 간을 partial hepatectomy(PH) 수술후 유도되는 재생간조직을 모델로 이용하였다.

PH 수술후 백서의 간조직에서는 순차적으로 4시간 및 12시간에 세포내 cAMP의 농도가 증가되며, 이중 beta-adrenergic antagonist에 의해 그중가가 억제되는 두번째 cAMP는 간세포의 DNA 합성유도에 중요한 역할을 할 것이라고 보고된 바 있다.<sup>6)</sup> 따라서 본 연구에서는 일차적으로 PH 수술후 hepatocyte의 DNA 생합성이 유도되기 전단계인 pre-replicative phase 기간중 LDH-5 유전자의 전사활성의 증가가 유도되며 이 전사활성을 유도하는 기전이 cAMP를 second messenger로 하여 발생하는 지를 밝히기 위해 *in vitro* run-off transcription 분석방법에 의해 분석한 결과 재생간조직의 pre-replicative phase 기간중 LDH-5 유전자의 활성이 PH 수술후 13시간에 최대치를 나타내어 두번째 cAMP농도가 증가된 후 1시간 후에 유도되었으며 DL-propranolol의 투여에 의해 LDH-5 유전자 전사활성이 억제됨을 관찰하여 재생간조직의 pre-replicative phase 기간중 발현이 유도되는 LDH-5 유전자의 전사활성 증가는 cAMP를 second messenger로 하는 유전자 발현유도기전에 관한 증거를 제시하고자 한다.

### 실 험 방 법

**실험동물 및 식이**—응성 Sprague-Dawley 150~200g을 실험군당 3~4마리를 사용하였으며 서울대학교 동물사육장에서 구입하여 모두 정상식이로 사육하였다.

**시약 및 재료**—LDH A-cDNA probe는 catecholamine으로 처리한 쥐의 C6-glioma cell culture로부터 cloning한 것으로 LDH A-mRNA

의 3'-말단으로부터 682 base를 함유한 pBR 322-recombinant DNA를 사용하였다.

Hybridization 실험에 사용한 nitrocellulose membrane은 Schleicher & Schull사 제품을, ATP, CTP, GTP, UTP는 PL-Biochemical사 제품을 사용하였고, [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] UTP(3,000 Ci/mmmole)은 Amersham 제품을 구입하였다. 그외의 시약은 Sigma에서 특급시약을 구입하여 사용하였다.

**방법**—Partial hepatectomy는 Higgins & Anderson(1931)<sup>7)</sup> 방법에 준하여 실시하였고, nitrocellulose membrane에 probe cDNA의 고정방법은 2mM-EDTA를 함유한 2M-NaOH 용액중에서 실온으로 5분간 변성시킨후 2M-NH<sub>4</sub>Ac(pH 4.7)로 중화시킨 pRLD42 cDNA probe 20 $\mu$ g을 nitrocellulose filter에 dotting 장치를 이용하여 일정한 면적에 점적시킨후 80°C 감압하에서 2시간 건조시켜 고정화하였다. DNA의 정량 방법은 Burton(1956)<sup>8)</sup> 방법에 의한 diphenylamine으로 발색시킨후 600nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였다.

***In vitro* Run-off Transcription** 분석—Nuclei의 분리 및 정제는 Blobel & Potter(1966)<sup>9)</sup> 방법에 따라 재생간조직을 분쇄한 후 2.3M-sucrose cushion을 이용하여 120,000 $\times$ g에서 1시간 30분 원심분리 하였고 *in vitro* transcription 분석은<sup>10)</sup>의 방법에 따라 분리정제된 일정량의 Nuclei를 1mM의 ATP, GTP 및 CTP, 100 $\mu$ Ci의 활성을 갖는 [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] UTP를 포함한 3 $\mu$ M의 UTP를 기질로 하여 25°C에서 50분간 반응시킨후 1mM UTP를 가하고 10분간 반응시켜 chasing 반응을 실시하였다. 반응액으로부터 <sup>32</sup>P-labeled RNA를 추출하고 pRLD42 probe를 고정된 nitrocellulose filter에 52°C에서 3일간 hybridization 시킨후 liquid scintillation counter를 이용하여 결합된 [<sup>32</sup>P]의 radioactivity를 측정하고 이를 사용한 총 [<sup>32</sup>P] CPM값에 대한 비율과 control 시험결과 계산된 hybridization efficiency 및 사용된 probe의 DNA size와 LDH A-mRNA의 size의 비율등을 계산하여 LDH A-유전자의 transcription rate를 산출하였다.

## 실험결과 및 고찰

**In vitro Run-off Transcription 반응조건—**

*In vitro* transcription 반응의 최적조건을 검토하기 위해 일차적으로 기질로 사용한 unlabeled UTP 농도에 따른 [ $\alpha$ - $^{32}$ P]UTP의 total RNA 합성에 도입되는 정도를 측정하기 위해 Table I과 같은 조건으로 실험해 본 결과 cold UTP 농도에 따른  $^{32}$ P-UTP의 도입 정도에 큰 차이는 보이지 않으나  $3\mu\text{M}$  UTP 농도에서 1시간 반응시 최대치를 보였기 때문에 이 조건을 채택하였다. 또한 재생간조직으로부터 분리정제된 nuclei양 (DNA농도로 환산)의 변화에 따른 total RNA 합성 효율을 측정한 결과는 Table II와 같이  $36\mu\text{g}$  이상의 DNA양을 사용할 경우 다소 감소하는 경향을 보이기 때문에 nuclei의 농도를  $36\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 로 설정하였다.

재생간조직의 LDH A-유전자 전사활성—Sham operation 및 partial hepatectomy 수술후 10시간, 12시간, 14시간 및 16시간인 재생간조직의 pre-replicative phase 기간중에 각 시험군당 4마리의 쥐에서 간을 적출하여 상기의 조건하에서 분리정제된 nuclei의 transcription enzyme system을 이용하여 [ $\alpha$ - $^{32}$ P]UTP를 기질로 *in vitro* run-off transcription을 실시하였다. 재생간조직중의

LDH A-유전자 전사활성은 Table III에서 보여주는 바와같이 partial hepatectomy 수술후 12시간부터 유의성이 있게 증가됨을 관찰하였고 13시간 후에 최대치를 보이고 그이후 감소하여 16시간 이후에는 steady level에 도달하였으나 대조군에 비해 약 2배 정도 높은 상태를 나타내었으며 LDH A-유전자 전사활성이 최대치를 보이는 PH 수술후 13시간의 전사활성률은 sham operation 시험군에 비해 약 25~50배의 증가율을 보였다. 이와같이 재생간조직의 LDH A-유전자 전사활성유도는 재생간조직의 partial hepatectomy 수술후 21~24시간에 DNA 생합성이 유도되는 기간 이전단계인 pre-replicative phase 기간중에 발생하여 DNA 생합성 단계에 LDH A-isozyme 역할이 암시 되고 있다.

LDH A-유전자 전사활성 유도기전—상기결과에서 제시된 바와같이 partial hepatectomy 수술 후 발생하는 LDH A-유전자의 발현유도 기전을 밝히기 위한 일환으로 실시한 실험결과는 Table III 및 Fig. 1과 같다.  $\beta$ -adrenergic receptor의 specific한 antagonist로 알려진 DL-propranolol ( $6\text{mg}/100\text{g}$  body weight)을 sham operation 및 partial hepatectomy된 실험군에 투여하고 수술 후 상기와 같은 pre-replicative phase 기간인 10시간, 12시간, 14시간 및 16시간에 각 시험군당 4마리의 쥐로부터 간을 적출하여 상기와 동일

Table I— Optimization of cold UTP concentration for *in vitro* run-off transcription reaction.

Reaction time(hour)	UTP concentration ( $\mu\text{M}$ )		
	0	3	300
	(CPM incorporated)		
1	$2.4 \times 10^4$	$3.2 \times 10^4$	$0.6 \times 10^4$
2	$2.3 \times 10^4$	$1.8 \times 10^4$	$0.5 \times 10^4$

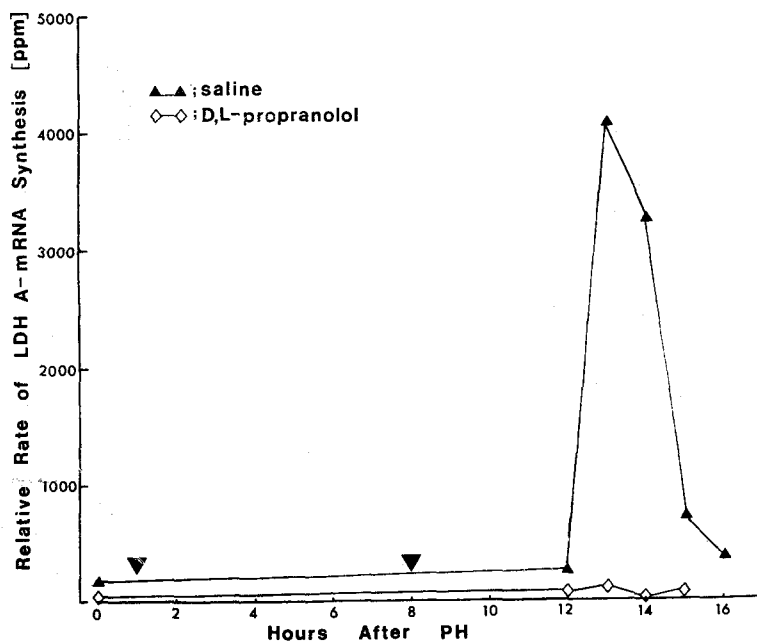
Table II—Optimization of the nuclei concentration for *in vitro* run-off transcription reaction.

Reaction time (hour)	Nuclei ( $\mu\text{g}$ DNA)			
	18	36	72	144
	(CPM incorporated)			
1	$0.32 \times 10^4$	$2.4 \times 10^4$	$5.2 \times 10^4$	$15 \times 10^4$
2	$0.72 \times 10^4$	$2.8 \times 10^4$	$3.6 \times 10^4$	$14 \times 10^4$

**Table III**—Transcription of lactate dehydrogenase A subunit-mRNA in isolated nuclei from regenerating rat liver.

Sample	Input of [ <sup>32</sup> P]-RNA ( $\times 10^{-5}$ CPM)	[ <sup>32</sup> P]-RNA hybridized to		Hybridization of [ <sup>3</sup> H]-cRNA (% of input)	Relative rate of LDH A-mRNA synthesis (PPM)
		pWR 34 (CPM)	pRLD 1.6 (CPM)		
Control	4.9	155	158	35	19.7
Sham	3.5	153	162	36	80.4
Partial hepatectomy (hour)					
0	4.8	155	168	38	154.6
12	3.3	160	190	37	269.2
13	4.2	218	753	35	4,094.0
14	7.0	406	1,212	40	3,238.9
15	5.5	292	403	32	709.6
16	2.6	112	149	33	354.0
DL-propranolol injection (hour)					
0	5.2	215	220	32	33.8
12	4.1	110	118	35	62.7
13	13.9	210	250	36	89.8
14	6.1	216	221	33	27.9
15	17.6	297	330	35	60.3

A rate of LDH A-mRNA synthesis (expressed in parts per million) =  $[(\text{CPM pRLD1.6} - \text{CPM pWR34}) / \text{CPM total RNA}] \times (100/\text{efficiency}) \times 1,800/1,600$ ; 1,800 is the length of LDH A-mRNA in nucleotides and 1,600 is the length in base pairs of the LDH A-cDNA inserted in pWR34 plasmid.



**Fig. 1**—Temporal induction of LDH A-gene transcription rate during regeneration of rat liver. Arrows indicate the injection time of DL-propranolol.

한 조건하에서 *in vitro* run-off transcription 분석을 실시한 결과 재생간조직중의 LDH A-유전자 전사활성증가가  $\beta$ -adrenergic receptor blocker인 DL-propranolol 투여에 의해 억제된 결과를 보여주어 LDH A-유전자 발현유도억제효과가  $\beta$ -antagonist에 의한 직접적인지 혹은 간접적인 경로를 통한 효과인지는 아직 분명치 않으나 LDH A-유전자 발현유도는  $\beta$ -adrenergic receptor를 통하여 cAMP를 second messenger로 하는 발현유도 메카니즘임 가능성을 제시해주고 있다. 이러한 발현유도 메카니즘은 서론에서 밝힌 바와같이 동종의 실험동물인 쥐의 brain에서 분리한 C6-glioma cell culture system에서는 이미 증명된바 있다. 따라서 재생간조직중에서도 LDH A-유전자발현유도가 cAMP를 second messenger로 하여 이루어지고 있는가를 확인하기 위해서는 재생 hepatocyte의 tissue culture system을 이용하여 증명할 수 있으리라 판단된다.

**재생간조직중의 LDH A-유전자 발현유도의 생물학적 의의**—Partial hepatectomy 수술후 쥐의 재생간세포의 pre-replicative phase 기간중 LDH A-유전자의 전사활성에 대한 경시적 변화를 도표로 표시하면 Fig. 1과 같이 PH수술후 13시간에 최대치를 보이고 있으며 이 전사활성의 경시적 변화와 동기간중 재생간조직세포내에 존재하는 cAMP의 농도변화 및 DNA 합성의 경시적 변화(Ref. 6 참조)와 비교할 때 매우 흥미 있는 사실을 관찰하였다.

첫째는 LDH A-유전자 전사활성이 최대를 보이는 시간은 재생간세포내에 PH 수술후 유도되는 두번째 cAMP 농도의 증가를 보이는 12시간부터 1시간 후인 13시간에 발생하였으며 PH 수술후 8시간이후에  $\beta$ -blocker를 injection하여 두번째 cAMP 농도증가가 억제될때 또한 LDH A-유전자의 전사활성이 억제되었다는 사실이다. 둘째는 PH 수술후 LDH A-유전자발현 유도의 시기가 DNA합성과 세포분화가 시작되기 전단계인 pre-replicative phase 기간중에 발생한다는 사실이며, 셋째로  $\beta$ -adrenergic receptor blocker에 의해 second cAMP 농도의 증가, LDH A-유전자발현 및 DNA 생합성 유도가 동시에 억

제가 되는 사실들로 미루어 이들 간의 기능적 상호관계를 예측할 수 있다. 최근에 여러가지 *in vitro* system를 이용하여 얻은 결과에 의하면 DNA 복제, 전사 및 gene rearrangement에 중요한 역할을 하는 것으로 밝혀진 ss-DNA binding protein인 helix destabilizing protein(HDP)이 구조적으로 또 기능적으로 매우 유사하여 LDH A-subunit는 세포내에서 HDP와 같은기능을 할 것이라는 증거들이 여러 실험실에서 보고된 것으로 미루어 재생간조직중에 발현유도되는 LDH A-유전자 전사활성의 증가는 급속하게 성장, 분화하는 hepatocyte의 energy 공급을 위한 metabolism 증가를 위한 효소의 발현유도의 기능 이외에도 DNA 복제 및 전사활성증가에 필요한 HDP의 공급을 위해 LDH A-subunit의 발현유도가 발생할 가능성이 강력히 시사되는 결과로 *in vitro* 실험결과와 일치하고 있다.

## 결 론

cAMP를 second messenger로 하여 작용하는 호르몬에 의해 발현 유도되는 것으로 밝혀진 LDH A-유전자의 전사활성 유도가 흰쥐의 재생간조직중에서도 발생하는가를 밝히기 위해 실시한 *in vitro* run-off transcription 실험결과와 이 전사활성 유도가 재생간조직에서도 cAMP를 second messenger로 하여 발생하는가를 밝히기 위한 실험결과는 다음과 같다.

(1) 흰쥐의 재생간조직의 pre-replicative phase 중 LDH A-유전자 전사활성유도는 partial hepatectomy후 12시간부터 유의성있게 증가되며 13시간에 최대치를 보이고 그 이후 감소하여 16시간 이후에는 basal level을 보여주었으며 전사활성이 최대치를 보이는 13시간의 전사활성물은 sham operation 시험군에 비해 약 25~50배의 증가율을 보였다.

(2) 흰쥐 간의 재생기간중 발현 유도되는 LDH A-유전자의 발현유도 메카니즘은, 전사활성유도가 최대로 나타난 PH 수술후 13시간은 재생간조직중에 증가되는 두번째 cAMP surge후 1시간 후였으며 또한 DL-propranolol 투여로 두번째

cAMP농도의 증가와 LDH A-유전자 전사활성이 동시에 억제된 결과로 미루어 LDH A-유전자 발현유도기전은  $\beta$ -adrenergic receptor와 cAMP를 second messenger로 작용하는 호르몬에 의해 발현조절이 될가능성을 제시하고자 한다.

(3) LDH A-유전자 전사활성에 대한 PH 수술후 경시적 변화를 관찰할때 재생간조직의 DNA의 합성유도에 중요한 역할을 한다고 밝혀진 두번째 cAMP surge후 1시간에 최대치를 보였으며 이 두번째 cAMP 농도의 surge를  $\beta$ -blocker 투여에 의해 억제했을때 DNA 합성유도는 물론 LDH A-유전자 전사활성유도가 억제된 점으로 미루어 LDH A-subunit가 DNA 합성유도에 역할을 할 것이라는 것을 제시하고자 하며 이와같은 결과는LDH A-subunit는 구조적으로 또한 그 기능이 DNA 복제, 전사활성 및 gene arrangement에 중요한 기능을 한다고 밝혀진 helix destabilizing protein과 매우 유사하다는 *in vitro* 실험결과를 뒷받침하는 *in vivo* 실험결과로 판단된다.

#### 감사의 말씀

이 논문은 1987년도 문교부 학술진흥재단 및 과학재단의 지원의 일부에 의해 이루어졌습니다. 이에 감사를 드립니다.

#### 문헌

- 1) de Vellis, J. and Brooker, G.: Effect of catecholamines on cultured glial cells; Correlation between cyclic AMP levels and lactate dehydrogenase induction. *Fed. Proc.* 31, 513 (1972).
- 2) Derda, D.F., Miles, M.F., Schweppe, J.S., and Jungmann, R.A.: Cyclic AMP regulation of lactate dehydrogenase; Isoproterenol and dibutyryl cyclic AMP increase the levels of lactate dehydrogenase-5 isozyme and its messenger RNA in rat C6 glioma cells. *J. Biol. Chem.* 255, 11112 (1980).
- 3) Sharief, F.S., Wilson, S.H. and Li, S.S.-L.: Identification of the mouse low-salt-eluting single-stranded DNA-binding protein as a mammalian lactate dehydrogenase-A isozyme. *Biochem. J.* 233, 913 (1986).
- 4) Williams, K.R., Reddigari, S. and Patel, G.L.: Identification of a nucleic acid helix-destabilizing protein from rat liver as lactate dehydrogenase-5. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82, 5260 (1985).
- 5) Cattaneo, A., Biocca, S., Corvaja, N. and Calissano, P.: Nuclear localization of a lactate dehydrogenase with single-stranded DNA-binding properties. *Experimtl Cell Res.* 161, 131 (1985).
- 6) MacManus, J.P., Braceland, B.M., Youdale, T. and Whitfield, J.F.: Adrenergic antagonists, and a possible link between the increase in cyclic adenosine 3',5'-monophosphate and DNA synthesis during regeneration. *J. Cell Physiol.* 82, 157 (1973).
- 7) Higgins, G.M. and Anderson, R.M.: Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. *Arch. Path.* 12, 186 (1931).
- 8) Burton, K.: *Biochem. J.* 62, 315 (1956).
- 9) Blobel, G., and Potter, V.R.: *Science* 154, 1662 (1966).
- 10) Schrader, W.T. and O'Malley, B.W.: Laboratory manual for hormone action and molecular endocrinology. 9th ed., Baylor College of Medicine, Texas, U.S.A., 13 (1985).