

## 운동강도의 차이가 흰쥐의 심근 세포기질 및 미토콘드리아 LDH 동위효소 변화에 미치는 영향 이상학<sup>1</sup> · 윤진환<sup>\*</sup>

한남대학교 생활체육학과, <sup>1</sup>고려대학교 체육학과

Received December 22, 2004 / Accepted January 31, 2005

**Effects of Different Exercise Intensities on Cytosolic and Mitochondrial LDH Isozymes of Cardiac Muscle in Rats.** Sang-Hak Lee<sup>1</sup> and Jin-Hwan Yoon\*. *Department of Sports Science, Hannam University, Daejeon 133, Korea, <sup>1</sup>Department of Physical Education, Korea University, Seoul 136-701, Korea* - To achieve the purpose of this study, forty-eight male Sprague-Dawley rats were assigned to control and three endurance exercise group. 36 rats were forced to exercise according to exercise intensity for 8 weeks and 12 rats were untrained for control group. Cardiac cytosol was extracted from cardiac tissue and cardiac mitochondria was purified from the cytosol. Purified mitochondria were separated into four fraction: inner membrane, outer membrane inter membrane space and matrix. The changes of cytosolic and mitochondrial LDH isozymes activity were measure. Relative activity (%) of cytosol for low and control group showed the following order of prevalence :  $AB_3 > A_2B_2 > B_4 > A_3B > A_4$ , for moderate and high group :  $AB_3 > B_4 > A_2B_2 > A_3B > A_4$ . Outer membrane for low group showed  $AB_3 > B_4 > A_2B_2$ , for moderate group :  $B_4 > AB_3 > A_2B_2$ , for high and control group :  $B_4 > A_3B$ . Inter membrane space for low, moderate and high group showed  $B_4 > AB_3 > A_2B_2 > A_3B > A_4$ , for control group :  $B_4 > A_3B > AB_3 > A_2B_2 > A_4$ . Inner membrane for all group showed  $B_4 > AB_3 > A_2B_2 > A_3B > A_4$ . Matrix for control, low, moderate and high group showed  $B_4 > AB_3 > A_2B_2 > A_3B > A_4$ . These results suggest that long term exercise intensity effect on cardiac tissue cytosolic and mitochondrial activity and  $A_4$ ,  $A_3B$ ,  $A_2B_2$ ,  $AB_3$  and  $B_4$  isozymes were found entirely in mitochondrial fraction.

**Key words** – cytosol, mitochondria, LDH isozymes, exercise intensity

젖산탈수소효소(EC 1.1.1.27, lactate dehydrogenase; LDH)는 무산소성 해당계에 의해 ATP를 생성하는 필수 효소이며 젖산과 피루브산의 상호전환 반응을 촉매 하는 효소로서 분자량 140,000 정도의 사량체이다[18]. *Ldh-A* 및 *Ldh-B* 두 유전자에 의해 합성된 하부단위체 A와 B는 사차 구조의  $A_4$ ,  $A_3B$ ,  $A_2B_2$ ,  $AB_3$ , 및  $B_4$  동위효소를 만들고[6,17] 이들의 전기영동상은 무산소성 조직에서는  $A_4$  동위효소가, 유산소성 조직에서는  $B_4$  동위효소가 상대적으로 많이 존재하는 뚜렷한 조직특이성을 나타내고 있다[32].

운동시 인체에서 변화하는 다양한 요소 중 LDH는 인체의 심근 및 골격근 대사산물로서 인체 내의 변화를 관찰할 수 있는 것으로 보고 되고 있다[22,29]. 장기간 지구성 운동의 경우에는 LDH 효소의 활성도를 크게 증가시키는 것으로 보고 되고 있으며[10,19], 특히 무산소성 운동뿐 아니라 유산소성 운동에 의해서도 증가하고[25], 훈련정도에 따라서도 활성도에 영향을 받는 것으로 알려져 있다[7]. Ohkuwa 등[21]은 CK(creatine kinase)와 더불어 비 혈장특이성 효소들이 무산소성 대사과정의 활성도를 알 수 있는 지표로 이용된다고 보고하였으며 Guezennec 등[12]과 Roit 등[25]은 운동시에 나타나는 LDH의 변화로 체력을 평가하는 생화학적인 지표로 제안하였다. 반면, Sander 등[27]은 이들 LDH가 운동시 인체

에 가해지는 스트레스를 평가할 수 있는 지표라고 주장하였으며, Itoh 등[16]은 LDH의 혈중 활성도 증가는 곧 조직의 손상됨을 추측할 수 있다고 제시했다.

최근에 골격근에서의 젖산형성과 LDH 동위효소의 조직 내분포양상이 운동과 관련되어 활발하게 연구되고 있으며 [23] 세포내에서 젖산의 역할에 대하여 새로운 이론이 제기되고 있다[5,13].

젖산으로부터 피루브산의 형성은 근형질에 다량으로 존재하는 LDH에 의해서 촉매 되지만, 일부 LDH의 경우에는 근조직 추출물에서 얻은 미토콘드리아 분획에 존재한다고 보고 되었다[3,30,4].

Brooks 등[4]에 의하면 젖산전기영동과 전자현미경으로 조직특이성을 나타내는 LDH 동위효소의 분포형태를 관찰한 결과, 심근조직의 경우 미토콘드리아 내에는 LDH  $B_4$ 의 활성이 우세하였고 세포기질 및 세포소기관 주위에는 LDH  $A_4$ 가 우세하였으며, 간조직의 경우 LDH  $A_4$ 의 활성이 우세했지만 특히 미토콘드리아에서  $A_4$ 의 활성이 매우 우세했다고 보고 하였다. 또한 포유류의 간과 근육의 미토콘드리아는 외인성 젖산을 산화할 수 있는데, 이는 젖산의 산화를 촉진하는 내부의 LDH pool 때문이라고 하였다.

이와 같이 젖산의 새로운 기능에 대한 이론이 제기되고 새로운 대사적인 측면에서 젖산의 기능을 이해하고자하는 노력이 이루어지고 있는 시점에서 젖산의 기능을 보다 확실하게 이해하기 위해서는 미토콘드리아내 LDH 동위효소들의

### \*Corresponding author

Tel : +82-42-629-7990, Fax : +82-42-629-8402

E-mail : yoonjh@hannam.ac.kr

특성을 이해하는 것이 필요하다고 생각한다.

따라서 본 연구는 흰쥐를 8주간 강도별로 운동시킨 후 심장조직을 적출하여 세포기질을 추출하고, 미토콘드리아를 순수 분리하여 이들을 외막, 막간물질(외막과 내막사이), 내막 및 매트릭스로 분리한 후 겔 전기영동 및 효소활성을 측정하여 세포기질과 미토콘드리아내의 LDH 동위효소 분포와 운동강도에 따른 활성변화를 측정하였다.

## 재료 및 방법

### 실험동물 및 훈련방법

본 실험에 사용된 동물은 국가공인동물취급업체로부터 공급받은 체중 250-300 g되는 Sprague-Dawley 계열 흰쥐를 사용하였으며, 3일간의 환경(온도는 22-24℃, 습도는 60%, 명암 주기 12시간) 적응 기간을 거치게 한 후에 적응 여부를 판단하여 무작위 표본 추출에 의해서 저장도집단 12마리, 증강도집단 12마리, 고강도집단 12 마리, 통제집단 12마리, 총 48마리를 선정하여 Bedford 등[1]의 방법에 따라 지구성 트레드밀 운동을 시켰다(Table 1).

### 조직시료의 준비

모든 동물은 훈련을 실시한 후 일시적 운동의 효과를 배제하기 위하여 48시간 경과 후에 마취제 ether를 이용하여 마취시킨 후 사지를 고정시키고 심장을 적출하여 증류수로 세척하여 혈액을 완전히 제거한 다음 4℃ 0.25 M sucrose를 포함하는 5 mM potassium phosphate buffer (pH 6.5) 용액을 각 시료조직의 3배(w/v) 가한 후 Autohomogenizer (Rikakikai GTR-1000)로 파쇄 하였다.

### 세포기질 효소원의 준비 및 LDH 확인

상기 시료액을 1,000 g에서 15분간 원심분리 하여 핵을 제거하고, 다시 이 시료액을 10,000 g에서 30분간 원심분리 하였다. 이 상등액을 다시 20,000 g에서 30분간 원심분리 하여 침전물은 제거하고 상등액을 세포기질 효소원으로 사용하여 LDH 활성측정법에 따라 활성을 측정하고 전기영동 하였다.

Table 1. Endurance training program

Group	N	Duration (weeks)	Frequency (days/week)	Intensity		Exercise time (min)
				speed(m/min)	grade (%)	
Control	12	8	-	-	-	-
LIE <sup>a</sup>	12	8	4	5-8	0	30
MIE <sup>b</sup>	12	8	4	14-16	0	30
HIE <sup>c</sup>	12	8	4	22-25	0	30

a : Low Intensity Exercise Group

b : Moderate Intensity Exercise Group

c : High Intensity Exercise Group

### 미토콘드리아 막의 분리

Schanitman and Greenawalt [28]의 방법에 따라 내막과 매트릭스, 외막과 막간물질을 각각 분리하여 전기영동 및 효소활성을 측정하기위한 시료로 사용하였다.

### LDH 활성측정

LDH 동위효소의 활성은 1.50 mM 피루브산과 0.14 mM NADH를 함유하는 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 6.85)에 시료를 가한 후 NADH로부터 NAD<sup>+</sup>로 산화되는 정도를 spectrophotometer (Shimadzu UV-160A)를 사용하여 25℃, 340 nm에서 측정하였다. 활성의 단위는 1분 동안 감소되는 흡광도 1.0을 1 unit로 하였다.

### 전기영동 Native-PAGE

Polyacrylamide gel은 항온기(Rikakikai CA-1100, Japan)를 사용하여 4℃로 유지시킨 polyacrylamide vertical slab system (Hoefer SE250, USA)으로 실시하였다. Davis [8]의 방법에 따라 7.5% acrylamide separation gel과 3% acrylamide stacking gel이 되도록 slab gel을 만들었다. 시료에는 50% sucrose와 0.05% bromophenol blue용액을 1:1(V/V)로 가한 후 Tris-glycine buffer (pH 8.3)를 사용하여 100 V에서 20분간 전개시킨 다음 200 V에서 2시간 10분 동안 전기영동 하였다. 효소 염색은 Whitt [31]의 방법에 따라 DL-Lactate, NBT (nitroblue tetrazolium), PMS (phenazine methosulfate) 및 NAD<sup>+</sup> 혼합 용액에 gel을 넣어 37℃에서 염색한 후 15% acetic acid로 고정된 후 동위효소를 확인하였다.

### LDH 동위효소의 분석

LDH 동위효소의 활성정도는 PAGE gel을 Bioprofile image analysis system(Vilber Lourmat, France)으로 사진을 찍은 후 BIO-ID++ 소프트웨어를 이용하여 분석하였다. 밀도계에 의해 정량한 동위효소들의 밀도 또는 양은 각 동위효소 밴드를 구성하는 모든 점들의 합,  $V = \sum_{i=1}^n I_i$  로 계산 되었으며, 각 동위효소의 밀도는 동위효소를 이룬 모든 점들의 합을 기준으로 하여 상대농도(%)로 재 측정하였다.

### 자료처리방법

본 실험에서 얻은 자료 중 심근 세포기질 LDH 동위효소는 IBM PC SAS package (version 8.0)를 이용하여 평균 및 표준편차를 산출하였으며, 운동강도에 따른 집단간의 평균치 차이를 비교하기위하여 one way-ANOVA을 실시하였다. 유의수준은  $p < .05$ 로 설정하였다.

## 결 과

### 세포기질 LDH 동위효소 분포 및 활성변화

흰쥐의 심장조직의 세포기질 LDH 동위효소 활성도는 비

훈련 집단  $192.84 \pm 29.19$ , 저강도 훈련집단  $249.56 \pm 12.85$ , 중강도 훈련집단  $204.42 \pm 9.92$ , 고강도 훈련집단  $185.18 \pm 15.70$ 으로 나타났으며(Table 3A), 전집단간에 유의한 차이가 나타났다. 또한 각 집단간 LDH 활성도의 분산분석은 각 집단에 따라 유의한 차이가 나타났다(Table 3B)( $P < .000912$ ).

Fig. 1의 전기영동상과 Table 4에 나타난 바와 같이 하부단위체 A, B를 포함하는 LDH 동위효소의 활성 정도는 전집단간에 활성의 차이가 나타났으며, A<sub>4</sub> 동위효소의 활성은 매우 약한 반면, B subunit를 포함하는 A<sub>3</sub>B, A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>, AB<sub>3</sub>와 B<sub>4</sub> 동위효소의 활성은 강하게 나타났다. LDH AB<sub>3</sub>는 모든 집단에

Table 3A. The change of cytosolic LDH activity of heart tissue among groups after followed 8 weeks exercise training in rats

Tissue	Group	MS±SD (unit/g)			
		control (n=12)	low (n=12)	moderate (n=12)	high (n=12)
heart		$192.84 \pm 29.18$	$249.56 \pm 12.85$	$204.42 \pm 9.92$	$185.18 \pm 15.70$

Table 3B. The result of one-way ANOVA on the changes of LDH isozymes of heart tissue among groups after followed 8 weeks exercise training in rats

Item	Source	df	SS	MS	F	Pr>F
heart	Group	3	7751.817	2583.939	7.9519	<.000912
	Error	8	2599.561	324.945		
	Total	11	10351.378			

df : Degree of Freedom

SS : Sum of squares

MS : mean square

F : Significance Level

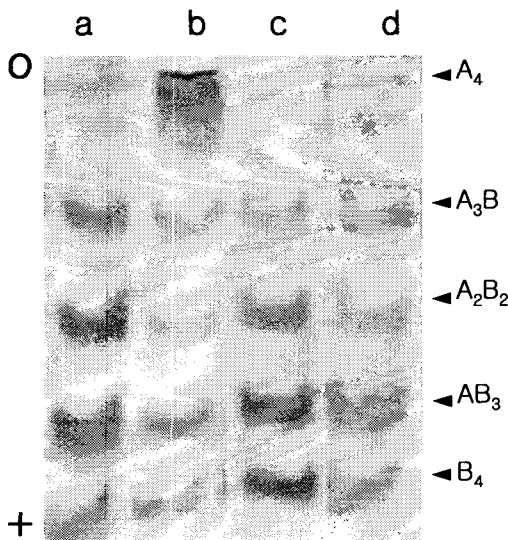


Fig. 1. Polyacrylamide gel electrophoresis of heart cytosol. a, control group; b, low intensity group; c, moderate intensity group; d, high intensity group.

서 가장 강한 활성을 보이고, 그중에서도 저강도 집단에서 가장 큰 활성을 나타냈다(Table 4).

**미토콘드리아 외막 LDH 동위효소 분포 및 활성변화**

외막의 경우 통제집단과 고강도 집단은 AB<sub>3</sub>, B<sub>4</sub> 동위효소만 약하게 활성을 나타냈고 저강도와 중강도 집단은 A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>, AB<sub>3</sub>, B<sub>4</sub>의 활성이 나타났다(Table 5). 또한 동위효소의 활성변화는 저강도와 중강도에서 B<sub>4</sub> 쪽으로 활성이 강하게 나타났으며, AB<sub>3</sub>, B<sub>4</sub> 동위효소가 저강도에서 활성이 가장 크게 나타났다. 대체적으로 외막에서의 LDH 동위효소의 활성은 B subunit를 포함한 동위효소의 활성이 우세하게 나타났다(Fig. 2).

**미토콘드리아 막간물질 LDH 동위효소 분포 및 활성변화**

막간물질의 경우 통제군을 포함한 모든 훈련집단에서 활성이 나타났다(Table 6). 통제군에서는 B<sub>4</sub> 동위효소를 제외한 나머지 동위효소들이 아주 약하게 활성을 보였으나 모든 집단에서 A<sub>4</sub>와 A<sub>3</sub>B의 활성은 매우 약하며 비슷한 정도로 나타났다. 반면 B<sub>4</sub> 동위효소의 활성은 전집단에서 가장 큰 활성을 보였으며 그중 통제집단의 활성이 가장 강하게 나타났다. 전집단에서 동위효소의 활성이 A<sub>4</sub>에서 B<sub>4</sub>쪽으로 증가하는 변화를 보였다(Fig. 3).

**미토콘드리아 내막 LDH 동위효소 분포 및 활성변화**

내막의 경우 동위효소의 활성은 모든 집단에서 나타났으나, A<sub>4</sub>는 전체적으로 매우 약한 활성을 보였다(Table 7). 그러나 Fig. 4에 나타난 바와 같이 B subunit를 포함하는 동위효

Table 4. Relative heart activity(%) of LDH isozymes among groups after followed 8 weeks exercise training in rats

Isozyme	Group	control	low	moderate	high
		(n=12)	(n=12)	(n=12)	(n=12)
heart					
A4		12.267	1.552	0.440	1.377
A3B		16.473	12.529	11.198	9.887
A2B2		23.026	25.505	23.294	21.390
AB3		31.351	39.710	35.311	34.384
B4		16.883	20.704	29.757	32.963

Table 5. Relative activity(%) of mitochondrial outer membrane LDH isozyme among groups after followed 8 weeks exercise training in rats

LDH	Group	control	low	moderate	high
outer membrane					
A4		-	-	-	-
A3B		-	-	-	-
A2B2		-	10.086	14.461	-
AB3		42.741	48.519	37.647	42.778
B4		57.259	41.395	47.892	57.222

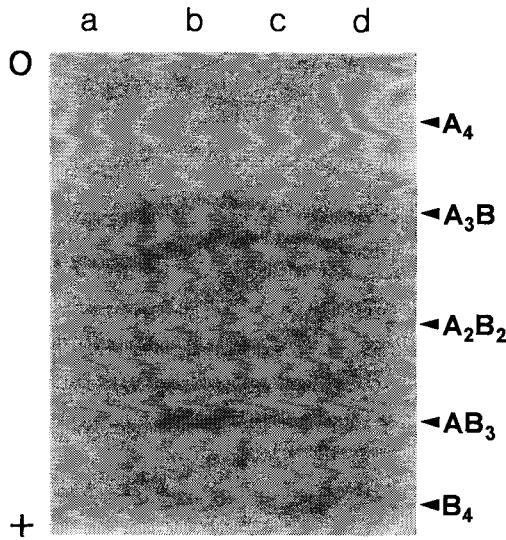


Fig. 2. Polyacrylamide gel electrophoresis of LDH isozyme in mitochondrial outer membrane of heart. a, control group; b, low intensity group; c, moderate intensity group; d, high intensity group.

Table 6. Relative activity(%) of mitochondrial intermembrane space LDH isozymes among groups after followed 8 weeks exercise training in rats

LDH	Group	control	low	moderate	high
intermembrane space					
A4		3.609	2.313	2.048	3.408
A3B		8.483	9.99	9.235	19.265
A2B2		7.588	14.434	14.374	18.516
AB3		7.955	23.811	14.911	15.952
B4		72.365	49.452	59.43	42.845

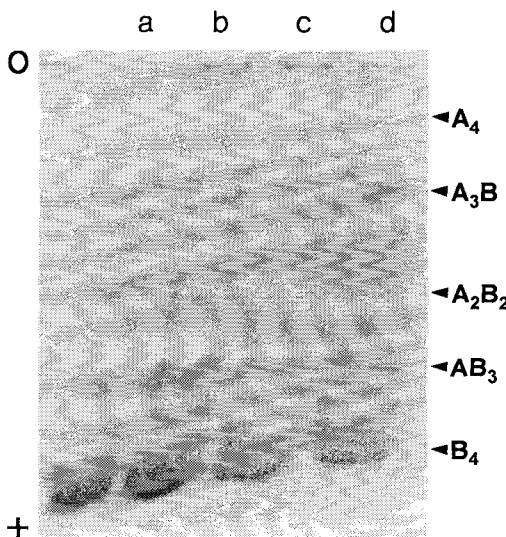


Fig. 3. Polyacrylamide gel electrophoresis of LDH isozyme in mitochondrial intermembrane space of heart. a, control group; b, low intensity group; c moderate intensity group; d, high intensity group.

Table 7. Relative activity(%) of mitochondrial innermembrane LDH isozymes among groups after followed 8 weeks exercise training in rats

LDH	Group	control	low	moderate	high
inner membrane					
A4		0.557	0.271	0.648	0.371
A3B		4.633	2.433	2.227	1.655
A2B2		8.266	18.031	16.118	17.678
AB3		29.412	37.801	36.867	45.373
B4		57.133	41.465	44.139	34.923

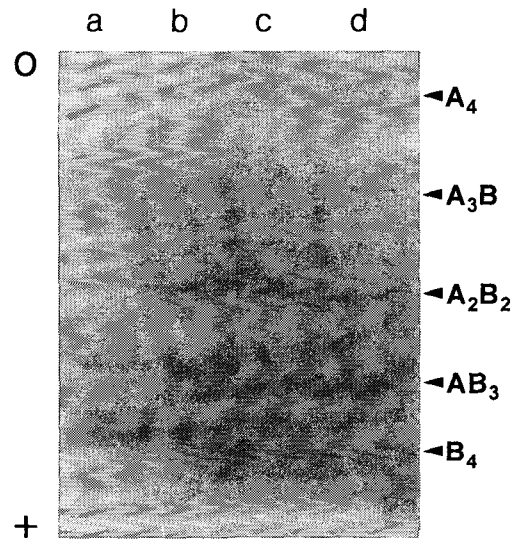


Fig. 4. Polyacrylamide gel electrophoresis of LDH isozyme in mitochondrial inner membrane of heart. a, control group; b, low intensity group; c, moderate intensity group; d, high intensity group.

소의 활성이 다른 동위효소에 비해 강한 활성을 보였고, 그 중에서 AB<sub>3</sub> 와 B<sub>4</sub>가 가장 크게 나타났다. 운동 강도에 따른 동위효소의 변화는 운동 강도가 커지면서 동위효소의 활성 역시 증가했으며, AB<sub>3</sub> 동위효소는 고강도 집단에서 가장 큰 활성을 나타냈고, B<sub>4</sub>는 저강도 훈련집단에서 가장 큰 활성을 보였으나 전체적인 활성은 고강도 집단이 가장 크게 나타났다.

**미토콘드리아 매트릭스 LDH 동위효소 분포 및 활성변화**

매트릭스의 경우 통제군을 제외한 모든 운동집단에서 LDH A<sub>4</sub> 동위효소의 활성이 나타나지 않았다(Table 8). Fig. 5의 전기영동상에 나타난 바와 같이 A<sub>3</sub>B 와 A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>의 활성은 약한 반면 AB<sub>3</sub> 와 B<sub>4</sub>의 활성은 강하게 나타났으며, 상대적으로 B<sub>4</sub>의 활성은 매우 강하게 나타났다. 운동강도에 따른 전 집단의 동위효소 활성변화는 Table 9에 나타난 것처럼 운동 강도가 커짐에 따라 활성이 뚜렷하게 커지는 현상을 보였으며 대체적으로 중강도와 고강도 집단에서 큰 활성을 보였다. 운동 강도 별 B<sub>4</sub> 동위효소의 활성은 고강도에서 가장 크게 나타났다.

Table 8. Relative activity(%) of mitochondrial matrix LDH isozymes among groups after followed 8 weeks exercise training in rats

LDH	Group	control	low	moderate	high
matrix					
A4		4.651	-	-	-
A3B		5.809	10.356	5.856	5.621
A2B2		11.558	14.861	12.263	8.916
AB3		25.303	30.872	24.91	25.763
B4		52.679	43.911	56.97	59.7

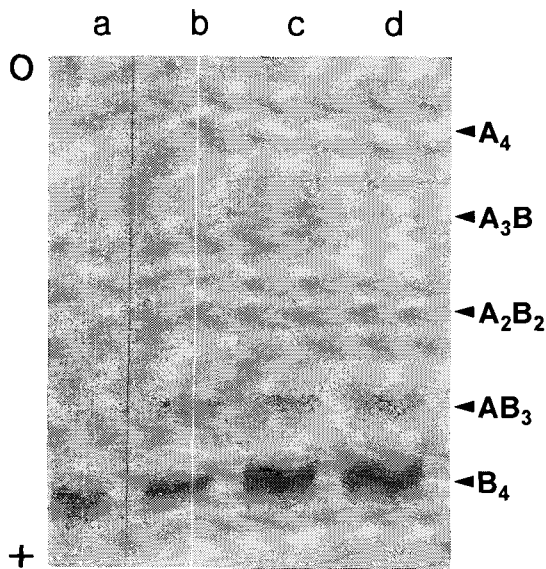


Fig. 5. Polyacrylamide gel electrophoresis of LDH isozyme in mitochondrial matrix of heart. a, control group; b, low intensity group; c, moderate intensity group; d, high intensity group.

### 고 찰

#### 세포 기질 및 미토콘드리아 LDH 동위효소의 활성변화

장기간 지구성 트레이닝은 신체의 생리학적, 생화학적 및 조직화학적 측면에서 다양한 변화를 나타내는데, 이러한 훈련에 대해 신체적으로 적응되면 심박출량이 크게 증가되며, 골격근 세포에서 미토콘드리아의 수와 크기의 증가 및 미토콘드리아의 산화효소 활성도가 현저하게 증가된다는 다양한 연구가 보고 되어 있다[14,15,26]. 이와 같은 생화학적특성의 중요성은 신체적 운동수행 능력의 증진과 피로의 지연 및 보다 빠른 회복에서 더욱 그 중요성을 찾아볼 수 있다. 그러나 신체적 트레이닝으로 인한 대사적 특성이 성별, 연령별, 운동 형태에 따라 다르게 나타나고 있다.

LDH 동위효소는 주로 세포질에 존재하지만 일부는 미토콘드리아와 정자 표면에 존재하기도 한다. 이러한 특성은 고농도의 젖산과 저농도의 피루브산에서 젖산을 피루브산으로

전환하거나 미토콘드리아 산화를 통해서 ATP를 생산하는데 용이하다[20].

골격근에서 생성된 젖산은 순환계로 분비되어 간, 심장 및 혈액으로부터 신체에 흡수되며, 혈액에서 젖산수준이 증가하면 휴식기 골격근 뿐 만 아니라 운동 근에 의해서도 흡수된다[24]. 근육으로 들어온 젖산은 CO<sub>2</sub> 와 H<sub>2</sub>O로 산화되거나 glycogenesis에 사용되며, 이때 피루브산이 첫 번째 산물이 된다. 근육에서 dynamic lactate metabolism에 대한 최근 견해에 대하여는 Brooks [5]와 Hall [13]의 연구에서 찾아볼 수 있다. Lactate로부터 pyruvate의 형성은 근형질에 다량으로 존재하는 LDH에 의해서 촉매 되지만 일부 LDH의 경우에는 근조직 추출물에서 얻은 미토콘드리아 분획에 존재한다고 보고되었다[3,4,30]. 이와 같은 사실은 "intracellular lactate shuttle"이 lactate를 mitochondria matrix로 운반하여 LDH에 의하여 피루브산으로 산화한다[4]는 사실을 제기하는 것으로서 근육에서의 젖산산화를 설명하기 위하여 제안되었으며, 세포내 대사개념에 대한 중대한 결과를 야기하는 것으로, 이러한 이론의 중심 견해는 미토콘드리아 내에 LDH가 존재하는가의 여부에 달려있다. Brooks 등[4]은 겔 전기영동과 전자현미경을 이용한 LDH 동위효소의 분포형태를 관찰한 결과, 심근조직 미토콘드리아 내에 LDH B<sub>4</sub>의 활성이 우세하나 세포질 및 세포소기관 주위에는 A<sub>4</sub>의 활성이 우세하며, 분리된 미토콘드리아의 LDH 동위효소 형태는 세포 분획을 둘러싸고 있는 LDH 동위효소들과 뚜렷한 차이가 있음을 보고하였으며, LDH A<sub>4</sub>의 활성은 간에서 우세했지만 특히 간조직의 미토콘드리아에서 매우 특이적인 활성이 있음을 보고하였다. 또한 미토콘드리아의 내막에 위치하는 MCTs (monocarboxylate transporters)에 의해 미토콘드리아의 매트릭스로 젖산이 운반된다는 "intracellular lactate shuttle" 모델을 제안하고, 전기영동과 면역세포화학법을 이용한 실험에서 분리된 미토콘드리아에 LDH가 존재함을 보고하였다.

운동강도의 차이에 따른 본 실험 결과에서도 심장조직의 세포기질 LDH 동위효소의 분포는 훈련집단과 비 훈련집단에서 A, B-type 모든 동위효소의 활성을 나타냈으나, A-type에 비하여 B-type 동위효소의 활성이 강하게 나타나는 것을 볼 수 있었으며, 활성도는 훈련 8주 후 전집단 간에 모두 유의한 차이가 있었다.

따라서 본 연구결과 운동강도가 증가함에 따라 심장조직 세포기질에서 LDH 동위효소의 B-type subunit의 활성이 증가하는 결과를 보였으며, 전체적인 LDH 활성 면에서는 중강도 훈련집단에서 가장 큰 활성을 나타냈다.

Dawson[9]은 동물 근조직에 산소 공급을 충분히 해주면 A subunit의 합성이 억제되며, 상대적으로 B subunit의 합성이 촉진됨을 증명하였다. 그러나 전신지구력 트레이닝을 실시함에 따라 LDH의 활성도 및 LDH 동위효소의 분포 변화에 대한 원인에 대해서는 현재 명확하게 설명되어 있지 않다.

유산소적인 에너지 대사 능력은 근육의 미토콘드리아 용량에 의해 결정되는 산화과정 효소활성에 영향을 받을 뿐만 아니라 산소나 에너지 기질을 공급하는 말초순환계와 밀접한 관계가 있다. 그중에서도 모세혈관 밀도의 증가는 지구성 트레이닝에 의해 가장 현저하게 나타나는 것으로 보고되어 있다. 이와 같은 지구성 트레이닝으로 인하여 근육량의 증가에 따른 근육의 모세혈관 밀도, hemoglobin 및 myoglobin 함량, 세포 내의 미토콘드리아 및 호흡효소가 증가[19]하여, 근육의 산소 추출능력을 증가시킴으로서 최대산소섭취량( $VO_2max$ )에 영향을 미치게 된다.

본 실험에서 운동강도의 차이에 따른 미토콘드리아 내에서의 LDH 동위효소 분포와 활성도는 외막의 경우 저강도와 중강도 운동집단에서는 LDH  $AB_3$ 와  $B_4$ 의 활성이, 외막과 내막 사이는 통제군을 포함한 모든 집단에서  $AB_3$ ,  $B_4$  동위효소의 활성이 나타났으며, 내막의 경우  $A_2B_2$ ,  $AB_3$ ,  $B_4$ 의 활성이 역시 모든 집단에서 나타났고, 매트릭스의 경우도 모든 집단에 걸쳐  $A_3B$ ,  $A_2B_2$ ,  $AB_3$ ,  $B_4$  동위효소의 활성이 나타났으나, 외막에서 내막 쪽으로 이동하면서 LDH 동위효소의 분포가 많아지며 특히 B-type 동위효소들의 활성이 강해지는 결과를 나타냈다.

이러한 결과는 대부분의 선행 연구결과와 일치되는 결과로서 장기간 훈련의 결과 근세포의 미토콘드리아 수가 증가하고 그 결과 LDH B-type subunit을 증가시켜, 운동 강도가 커짐에 따라 대사의 ATP 요구량이 증가하여 해당과정 이 활발하게 일어나고 이에 대한 적응 현상으로  $B_4$  동위효소가 미토콘드리아 내로 들어오는 젖산을 피루브산으로 산화하여 급격하게 요구되는 에너지 대사의 균형에 이바지하는 것으로 사료된다.

본 실험의 결과는 Brooks 등[4]이 겔 전기영동과 전자현미경을 이용한 LDH 동위효소의 분포를 관찰한 결과, 분리된 미토콘드리아에서 LDH 동위효소의 형태는 세포구획을 둘러싸고 있는 LDH 동위효소들과 뚜렷한 차이가 있으며, 심장조직의 미토콘드리아 내에 LDH  $B_4$ 가 우세하며 미토콘드리아와 세포질 및 세포소기관 주위에 LDH  $A_4$ 가 존재한다는 결과와 일치했다.

이와 같은 이유는 운동강도에 따른 대사조절에서 효소의 항상성과 관련 하여 훈련강도가 높아짐에 따라 에너지 요구량이 많아지고 이에 상응하는 적응현상으로 사료되며, LDH  $A_4$  동위효소가 골격근조직 같은 무산소성조직에서 피루브산 환원효소로서 작용하고,  $B_4$  동위효소는 심장과 같은 유산소성조직에서 젖산 산화효소로서 작용한다[2,11]는 가설과 일치하는 결과를 나타냈다.

따라서 본 연구결과를 종합하여 볼 때, LDH 동위효소는 미토콘드리아 분획에 존재하며, 운동 강도에 따른 동위효소의 분포 및 활성의 변화는 미토콘드리아 LDH 동위효소의 대사상에서의 새로운 역할을 시사하는 것으로서, 앞으로 운

동생리학적 측면에서 근육에서의 젖산의 생성과 제거 및 세포질과 미토콘드리아에서의 젖산의 역할이 새롭게 조명되어야 할 것으로 사료된다. LDH 동위효소, 특히 LDH  $B_4$  동위효소가 미토콘드리아 매트릭스 내에 존재한다는 것은 젖산 또한 매트릭스 내에 존재함을 의미하는 것으로서, 매트릭스 내에서의 LDH  $B_4$  동위효소는 젖산을 피루브산으로 산화하여 ATP 생성을 용이하게 하는 역할을 담당하는 것으로 사료되며, 미토콘드리아 매트릭스 내부로의 젖산의 진입은 MCTs에 의해 이루어지는 것으로, 미토콘드리아 내막에서 MCTs의 역할 또한 중요한 의미를 지닌다고 할 수 있다. 따라서 본 연구자는 기존의 이론을 바탕으로 해당과정과 에너지대사의 흐름에 대한 지속적인 연구가 착실히 이루어져, 운동 후에 나타나는 신체의 대사적인 변화에 대한 보다 정확한 접근이 있어야 할 것으로 생각한다.

## 요 약

생후 7주령 흰쥐를 대상으로 저강도집단, 중강도집단, 고강도집단, 통제집단으로 분리하여 8주 동안 트레드밀 운동을 실시한 후 심장을 적출하여 조직의 세포기질을 분리하고 전기영동을 실시하여 세포기질 LDH 동위효소의 분포양상을 확인하였고, 활성을 측정하였다. 또한 미토콘드리아를 순수 분리한 뒤 분리된 미토콘드리아를 외막 내막 막간물질, 매트릭스로 각각 분리하여 각 분획을 전기영동을 실시하고 효소 활성을 측정하였다. 운동 강도에 따른 장기간의 지구성훈련으로 심장조직의 세포기질 LDH 동위효소 활성은 운동집단과 비 운동집단에서 모든 LDH 동위효소의 활성을 나타냈다. 세포기질 LDH 동위효소의 운동 강도에 따른 활성변화는 모든 동위효소가 운동강도의 증가에 따라 증가하는 결과를 나타냈으며 모든 강도에서  $AB_3$  동위효소의 활성이 가장 크게 나타났다. 심장조직 미토콘드리아 각 분획에서 운동 강도에 따른 LDH 동위효소의 분포와 활성은 외막의 경우 다른 분획에 비하여 동위효소의 분포 및 활성이 매우 약하게 나타났다. 운동강도가 증가하면서 모든 분획의 동위효소가  $B_4$ 쪽으로 활성이 강해지는 현상을 보이며, 외막에서 내막, 매트릭스로 이동하면서 각 분획에 LDH 동위효소의 분포도 많아지고 활성도 또한 증가하는 현상을 나타냈다.

## 참 고 문 헌

1. Bedford, T. G., C. M. Tipton, N. C. Wilson, R. A. Oppliger and C. V. Gisolfi. 1979. Maximum oxygen consumption of rats and its changes with various experimental procedure. *J. Appl. Physiol.* **47**(6), 1278-1283.
2. Blanco, A. and W. H. Zinkham. 1963. Lactate dehydrogenase in human testes. *Science* **139**, 601-602.
3. Brandit, R. B., J. E. Laux, S. E. Spainhour and E. S. Kline.

1987. Lactate dehydrogenase in rat mitochondria. *Arch Biochem Biophys.* **259**, 412-22.
4. Brooks, G. A., H. Dubouchaud, M. Brown, J. P. Sicurello and C. E. Butz. 1999. Role of mitochondrial lactate dehydrogenase and lactate oxidation in the intracellular lactate shuttle. *Proceedings of the national academy of sciences of the USA* **96**, 1129-1134.
  5. Brooks, G. A., E. E. Wolfel, G. E. Butterfield, A. Cymerman, A. C. Roberts, R. S. Mazzeo and J. T. Reeves. 1998. Mammalian fuel utilization during sustained exercise. *Am. J. Physiol.* **275**, R1192-R1201.
  6. Cahn, R. P., N. O. Kaplan, L. Levine and E. Zwillling. 1962. Nature and development of lactate dehydrogenase. *Science* **136**, 962-969.
  7. Costill, D. L., J. Daniels, W. Evans, G. Krahenbuhl and B. Saltin. 1976. Skeletal muscle enzymes and fiber composition in male and female track athletes. *J. Appl. Physiol.* **40**, 149-154.
  8. Davis, B. J. 1964. Disc electrophoresis-11. Method and application to human serum proteins. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **121**, 404-427.
  9. Dawson, D. M., T. L. Goodfriend and N. O. Kaplan. 1964. Lactic dehydrogenase, functions of the two types. *Sci.* **14**, 929-953.
  10. Fowler, W. M., G. W. Grandner, H. H. Kazerunian and W. A. Lauvstad. 1968. The effects of exercise on serum enzymes. *Arch. Phys. Med. Rehabil.* **49**, 4555-4565.
  11. Goldberg, E. 1972. Amino acid composition and properties of crystalline lactate dehydrogenase X from mouse testes. *J. Biol. Chem.* **247**, 2044-2048.
  12. Guezennec, C. Y., M. Giaoui, J. P. Voignier, H. Legrand and E. Fournier. 1986. Evolution of plasma level of LDH, CPK and myoglobin at the 100 km race and triathlon. *Sci. Sports.* **16**, 255-260.
  13. Hall, G. 2000. Lactate as a fuel for mitochondrial respiration. *Acta. Physiol. Scand.* **168(4)**, 643-56.
  14. Holloszy, J. O. and F. W. Booth. 1976. Biochemical adaptation endurance exercise in muscle. *Ann. Rev. Physiol.* **38**, 273-291.
  15. Holloszy, J. O. and E. F. Coyle. 1984. Adaption of skeletal muscle to endurance exercise and their metabolic consequences, *J. Appl. Physiol.* **56**, 831-838.
  16. Itoh, H., T. Ohkuwa, Y. Yamazaki, T. Shimoda, A. Wakayama, S. Tamura, T. Yamamoto, Y. Sato and M. Miyamura. 2000. Vitamin E supplementation attenuates leakage of enzymes following 6 successive days of running training. In *J. Sports Med.* Vol.21, Issue 5, 369-374.
  17. Markert, C. L. 1968. The molecular basis for isozymes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **151**, 14-40.
  18. Markert, C. L., J. B. Shaklee and G. S. Whitt. 1975. Evolution of a gene. *Science* **189**, 102-114.
  19. Mckechnie, J. K., W. P. Leary and S. M. Joubert. 1967. Some electrocardiographic and biochemical changes recorded in marathon runners. *S. African. Med. J.* **53**, 783-787.
  20. Mita, M. and P. Hall. 1982. Metabolism of round spermatids from rats: lactate as the preferred substrate. *Biol. Reprod.* **26**, 445-455.
  21. Ohkuwa, T. and M. Miharu. 1986. Plasma LDH activity and LDH isozymes after 400 m & 3000 m run in sprint & long distance runners. *J. Sports Med. Phys. Fitness.* **26**, 362-368.
  22. Ohman, E. M., K. K. Toe and A. H. Johanson. 1982. Abnormal cardiac enzyme responses after strenuous exercise alternative diagnostic aids. *Br. Med. J.* **285**, 1523-1526.
  23. Richardson, R. S., E. A. Noyszewski, J. S. Leigh and P. D. Wagner. 1998. Increased blood antioxidant systems of runners in response to training load. *J. Appl. Physiol.* **85**, 627-634.
  24. Richter, E. A., B. Kiens, B. Saltin, N. J. Christensen and G. Savard. (1988). Skeletal muscle glucose uptake during dynamic exercise in humans: role of muscle mass, *Am J Physiol.* **254**, E555-61.
  25. Roit, S. E., U. Iori, U. Guiducci, R. Emanuele, G. Robuschi, P. Bandini and A. Gnudi. 1981. Serum concentrations of myoglobin, creatin phosphokinase and lactic dehydrogenase after exercise in trained and untrained athletes. *J. Sports. Med.* **21**, 113-118.
  26. Saltin, B. and B. Rowell. 1980. Function adaptations to physical activity and inactivity, *Fed. Proceed.* **39**, 1506- 1513.
  27. Sanders, T. M. and C. M. Bloor. 1975. Effects of repeated endurance exercise on serum enzyme activities in well conditioned males. *Med. Sci. Sports.* **7**, 44-47.
  28. Schnaitman, C. and J. W. Greenawalt. 1968. Enzymatic properties of the inner and outer membranes of liver mitochondria. *J. Cell. Biol.* **38**, 158-175.
  29. Siegel, A. J., L. M. Silverman and B. L. Holmen. 1980. Elevated creatine kinase MB isozyme levels in marathon runners. Normal myocardial scintigrams suggest noncardiac source. *J.A.M.A.* **246**, 2049-2051.
  30. Szczesna and A. Kaczmarek. 1990. L-lactate oxidation by skeletal muscle mitochondrial respiration. *International Journal of Biochemistry* **22**, 617-620.
  31. Whitt, G. S. and G. M. Booth. 1970. Localization of lactate dehydrogenase isozymes of fish, *J. Exp. Zool.* **175**, 1-38.
  32. Wilson, A. C., N. O. Kaplan, L. Levine, A. Pesce, M. Reichlin and W. S. Allison. 1964. Evolution of lactic dehydrogenase. *Fed. Proc.* **23**, 1258-1265.