

## Metabolism of Lactate Dehydrogenase in Tissues from *Ldh-C* Expressed Mice (*Mus musculus*) in a Starvation State

Jung Joo Yum\* and Gyu Dong Kim

Department of Life Science, Cheongju University, Cheongju 28503, Korea

Received August 31, 2017 / Revised January 10, 2018 / Accepted January 16, 2018

To confirm the function of lactate dehydrogenase (LDH) (EC 1.1.1.27, LDH), its metabolism was studied by activity, kinetics, and isozyme analysis in tissues of *Ldh testis-specific C* expressing mice (*Mus musculus*) maintained in a state of starvation for 48 hr and 96 hr. In skeletal muscle, liver, and eye tissues, LDH and LDH A<sub>4</sub> activity increased and anaerobic metabolism predominated. While LDH activity in the heart and kidney tissues decreased, LDH B<sub>4</sub> activity increased and aerobic metabolism predominated, producing pyruvic acid. In the testis tissue, LDH C<sub>4</sub> activity decreased. In the brain tissue, LDH activity increased, but the isozyme change was small and the amount of pyruvic acid decreased.  $K_m^{PYR}$  increased in tissues other than kidney tissue, and the affinity for pyruvic acid decreased. Consequently, in *Ldh-A* and *B*-expressing tissues, the activities of isozymes with higher concentrations increased. However, in *Ldh-A*, *B*, and *C*-expressing tissue, C<sub>4</sub> decreased and the function of the tissue also decreased. In particular, LDH in brain tissue played a role as a pyruvate reductase. Therefore, this process might be the mechanism for producing energy in the state of starvation.

**Key words** :  $K_m^{PYR}$ , lactate dehydrogenase, LDH testis-specific C isozyme, *Mus musculus*, starvation

### 서 론

젖산탈수소효소(EC. 1.1.1.27, lactate dehydrogenase, LDH)는 *Ldh-A*, *B*, *C* 에 의해 생성되는 사랑체 동위효소로 NADH/NAD<sup>+</sup>를 사용하여 피루브산과 젖산의 상호전환을 촉매한다. LDH A<sub>4</sub> 동위효소는 골격근과 간조직 같은 혐기적 조직에서 젖산을 생성하고, B<sub>4</sub> 동위효소는 심장과 같은 호기적 조직에서 피루브산을 생성하며, 종과 조직에 따라 동위효소의 조성 및 발현을 조절하여 대사가 진행된다[6, 17]. LDH eye-specific C는 농어목 어류의 눈조직에서 주로 발현되며 서식 방법과 먹이를 습득하는 행동양식에 따라 발현 정도가 다른 것으로 나타났다[27, 28, 41, 42], LDH liver-specific C는 대구목과 잉어목 어류의 간조직에서 발현되며 붕어 간조직의 세포질과 피육시솜에서 NADH/NAD<sup>+</sup> 조절에 관여되는 것으로 보고되었다[26, 40]. 그리고 포유류와 조류의 정소조직에서만 발현되는 LDH testis-specific C는 정자가 수정하는데 필요한 에너지를 공급하며 ATP 항상성에 관여되는 것으로 보고되었으나[9, 21], 최근 저 산소 내성 토끼(*Ochotona curzoniae*) 골격근에서

도 나타났고[35] 종양세포에서도 발현되어 암 지표유전자로 사용되는 것으로 보고되었다[30]. 따라서 *Ldh-C*가 왜 특정조직에서만 발현되는지에 대해 *Ldh-C*가 발현되는 어류와 포유류 일부 중에서 연구 중이지만 에너지 대사과정에서의 LDH-C의 기능에 대한 연구는 아직 미흡한 실정이다. 그러므로 먹이 공급이 중단된 기아상태에서 생명체가 대사적으로 적응하는 것이 중요하므로, 기아상태에서 LDH A, B, C의 적응 양상을 확인하여 기능을 확인하고자 하였다. LDH eye-specific C와 liver-specific C가 발현되는 종을 선택하여 기아상태에서 연구한 결과 에너지 대사에 중요하게 관여하지만, liver-specific C 동위효소가 eye-specific C 동위효소보다 영향을 더 받는 것으로 확인되어[43] LDH-C에 따라 에너지 대사에서의 기능의 차이를 나타내는 것으로 나타났다. 따라서 기아상태의 포유류의 정소에서 발현되는 testis-specific C를 대상으로 연구하고자 하였다. 기아상태에서는 글리코젠이 고갈되고 간조직에서 피루브산, 젖산, 케톤체 같은 monocarboxylates가 monocarboxylate transporters (MCTs)에 의해 수송되어 뇌조직을 포함한 필요한 조직에 에너지를 공급하므로[31], 기아 생쥐의 간과 신장조직에서 MCT1이 증가되어 유입된 젖산을 사용하여 조절되며[11, 38] 48시간 기아 상태의 흰쥐에서도 뇌간에서 MCT2 mRNA가 증가되어 케톤체가 증가되므로 황체호르몬 분비를 억제하는 신호로 작용한다고 보고되었다[18]. 또한 기아 24시간 후 흰쥐와 돼지 간조직에서도 MCT1 mRNA가 증가되어[15] 기아상태에서 MCT 발현을 조절하여 조직에 에너지를 적절하게 공급하는 것으로 보고되었다[31]. 그리고 LDH 기질인

#### \*Corresponding author

Tel : +82-43-229-8527, Fax : +82-43-229-8525

E-mail : jjyum@cju.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

피루브산은 눈과 뇌조직에서 항산화제로 작용하여 산화스트레스에 대해 방어 역할을 하므로[14, 36], 흰쥐의 뇌 손상 시 피루브산 화합물을 즉시 주입하면 대사가 조절되어 신경세포의 생존율을 향상시킨다고 보고하였다[7, 19]. 대사노폐물로 인식되었던 젖산은 운동 중 에너지원으로 사용되어[23] 여러 적응 현상에 관여하고 세포에서 산화환원 균형을 유지하며[22], 동화 작용에 관여하는 신호로 작용하고[25], 뇌조직에서 장기 기억을 유지하는데 역할을 하고 뇌의 가소성에도 관여되어[33, 39, 44] 젖산과 피루브산이 세포 대사에서 중심 역할을 하는 것으로 나타났다. 따라서 이들 기질의 수송체인 MCT에 표적인 약물이 개발되어 임상치료에도 활용되고, *in vivo*에서 대사 활성을 조사하기 위해 조직 내 과분극된  $^{13}\text{C}$ -lactate와  $^{13}\text{C}$ -pyruvate 변화를 측정하여 암환자의 대사 변화를 확인하는데 사용되므로[20] 최근 중요성이 대두되고 있다. 이와 같이 LDH의 기질과 수송체에 대한 연구는 활발하게 이루어지고 있지만 LDH의 동위효소의 기능에 대해서는 아직 미흡한 실정이다. LDH 동위효소 발현에 의하여 기질의 대사가 조절되므로 본 실험실에서 진행되고 있는 LDH의 기능을 확인하기 위한 연구의 일환으로 LDH testis-specific C가 발현된 생쥐를 기아 상태로 유지시킨 후 *Ldh-A*, B만 발현되는 조직과 *Ldh-C*가 발현되는 조직에서 *Ldh-A*, B, C의 발현을 확인하고 LDH 대사를 확인하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 실험재료, 기아환경 조건 및 조직 추출액 준비

포유류 설치목 쥐과 생쥐(*Mus musculus*, ICR)는  $33 \pm 2$  g 수컷으로 대한바이오링크에서 구입하였고, 온도  $22 \pm 2$ , 습도 40-60% 및 광 주기 12시간인 사육실 환경에서, 대조군(C, n=3) 먹이와 물을 공급하였고, 기아 상태의 생쥐 실험군(기아군)은 먹이 공급을 중단하고 물은 공급하여 사육시켰으며, Schutkowski [31]와 예비 실험 조건에 의해 48시간 기아 상태인 기아군(S1, n=3)과 96시간 기아 상태인 기아군(S2, n=3)의 시료를 사용하였다. 대조군, S1 및 S2의 골격근, 심장, 간, 신장, 정소, 눈 및 뇌조직을 각각 적출하여 혈액과 수분을 제거한 후 4, 0.1M potassium phosphate buffer (pH 6.85)를 3배(v/w) 가하여 glass homogenizer로 파쇄 하였다. 조직파쇄물은  $20,000 \times g$ 에서 1시간씩 2회 원심분리(Mega 21R, Hanil)하였으며, 상등액을 시료로 사용하였다. 본 실험은 청주대학교 동물실험윤리위원회 승인(CJUIACUC-B142012)을 받아 동물 윤리 준칙에 의거하여 진행하였다.

### Lactate dehydrogenase의 활성 측정 및 단백질 정량

LDH의 활성은 1.5 mM 피루브산과 0.14 mM NADH를 포함한 0.1M potassium phosphate buffer (pH 6.85) 3 ml에 시료를 가한 다음 NADH로부터  $\text{NAD}^+$ 로 전환되는 정도를 spec-

trophotometer (UV-160A, Shimadzu)를 사용하여 25, 340 nm에서 측정하였다[37]. 활성은 1분 동안 기질 1  $\mu\text{mole}$ 을 전환시키는 데 필요한 효소의 양을 1 unit로 하였고, millimolar coefficient 13.6을 사용하여 계산하였다. 단백질은 BSA를 표준단백질로 사용하여 Bradford 방법[2]에 따라 분광광도계로 595 nm에서 정량 하였다. LDH의 비활성은 units/mg으로 계산하였다.

### Native-polyacrylamide gel 전기영동

Native-PAGE는 polyacrylamide vertical slab system (SE 250, Hoefer)으로 7.5% acrylamide separation gel과 2.67% stacking gel로 circulator를 사용하여 4를 유지시키면서 시행되었다[5]. 시료에 sucrose와 bromophenol blue 용액을 1:1(v/v)로 섞은 후 well에 가하고, 5 mM Tris-glycine buffer (pH8.3)로 100 V에서 20분간, 200 V에서 130분간 전기영동 하였으며, LDH는 DL-lactate, NBT, PMS 및  $\text{NAD}^+$ 를 혼합한 용액으로 37에서 염색 시킨 후, 15% 초산용액으로 고정하였다[37].

### 피루브산의 정량 및 LDH의 피루브산에 대한 기질 의존성

피루브산은 pyruvate assay kit (Sigma)를 사용하여 양을 측정하였다. 조직을 적출한 후 중류수로 혈액을 제거하고 수분을 제거시킨 다음 무게를 측정하여 4, 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 6.85)를 3배(v/w) 가한 후 glass homogenizer로 파쇄 하였다. 조직 파쇄액은  $13,000 \times g$ 에서 2회 원심 분리 시키고 상등액을 ultra-2 10 K device (10,000 NMWL, Amicon)로 세포 기질 LDH를 제거시킨 용액을 시료로 사용하였다. 반응 혼합액 50  $\mu\text{l}$ 에 시료 50  $\mu\text{l}$ 를 가하여 25에서 30분간 반응시킨 후 microplate reader (Tecan Sunrise, Switzerland)로 570 nm에서 측정하였다. 피루브산 0.01-10 mM에서 농도 단계별로 대조군과 기아군(S1, S2)의 골격근, 심장, 간, 신장, 정소, 눈 및 뇌조직 추출액의 LDH 활성을 측정하였고, 측정된 최대 활성을 기준으로 상대적 활성( $V/V_{\text{max}}$ , %)을 측정하여 피루브산에 대한 억제 정도를 확인하였으며, Lineweaver-Burk plot에 의해 조직 별  $K_m^{\text{PYR}}$ 과  $V_{\text{max}}^{\text{PYR}}$ 을 구하였다.

## 결과 및 고찰

### 기아상태 생쥐의 lactate dehydrogenase의 활성 측정 및 단백질 정량

LDH-A, B, C의 기능을 확인하기 위해서 LDH testis-specific C가 발현된 생쥐를 48시간(S1) 및 96시간(S2) 기아 상태로 사육시킨 후 대조군, S1 및 S2의 골격근, 심장, 간, 신장, 정소, 눈 및 뇌조직의 LDH 활성 및 LDH 비활성(units/mg)을 비교하였다(Table 1). 골격근조직의 LDH 활성이 74.18 units로 가장 크고, 이에 비해 S1에서 감소되었고 S2에서 99.68 units로 증가되었다. 간조직의 LDH 활성은 49.92 units로 S1에서 64.69

Table 1. LDH activity and protein concentration in various tissues from mouse (C: control, S1: 48 hr starvation, S2: 96 hr starvation)

Tissues		Skeletal muscle	Heart	Liver	Kidney	Eye	Brain	Testis
LDH activity (units/g)	C	74.18±8.12	28.68±4.53	49.92±3.31	33.44±3.88	6.22±0.73	7.91±1.13	5.47±0.59
	S1	65.34±6.05*	34.53±4.10*	64.69±5.83	38.20±3.44	7.81±0.71*	4.21±0.29	6.22±0.48*
	S2	99.68±9.69*	26.37±2.93	66.94±7.32*	29.45±1.94	8.84±0.88*	13.76±1.99	5.07±0.31
Protein (mg/g)	C	24.67±0.94	54.96±7.66	62.96±6.36	47.10±4.75	66.73±7.46	20.60±1.20	40.72±2.92
	S1	34.92±2.20*	54.28±3.42	61.36±3.86	42.58±7.25	73.04±4.60	16.50±1.04*	26.86±1.69*
	S2	24.33±1.53	41.88±2.63	51.47±5.20*	114.75±10.07*	70.58±4.44	48.23±4.87*	30.53±1.92*
Specific activity (units/mg)	C	3.01	0.52	0.79	0.71	0.09	0.38	0.13
	S1	1.87	0.64	1.05	0.90	0.11	0.26	0.23
	S2	4.10	0.63	1.30	0.26	0.13	0.29	0.17

Data are mean ± SD, n=3, \*Significantly different from the corresponding control value using the Student's t-test,  $p < 0.05$ .

units, S2에서 66.94 units로 모두 증가되었다. 심장조직의 LDH 활성은 28.68 units이며 S1에서 34.53 units로 증가되었고 S2에서 26.37 units로 조금 감소되었으며, 신장조직도 33.44 units에서 S1의 38.20 units로 증가되었고 S2에서 29.45 units로 감소되었다. 정소조직의 LDH 활성은 5.47 units로 낮았으나 S1에서 6.22 units로 증가되었고 S2에서 5.07 units로 조금 감소되었다. 눈조직의 LDH 활성은 6.22 units이고 S1의 7.81 units, S2의 8.84 units로 증가되었고, 뇌조직의 경우 활성이 7.91 units로 낮지만, S1에서 4.21 units로 감소되고 S2에서 13.76 units로 증가되었다. 따라서 S2에서 뇌조직의 LDH 활성이 가장 크게 74% 증가되었고, 간과 눈조직의 LDH 활성이 S1과 S2에서 증가되었지만, 골격근과 뇌조직은 S1에서 감소되었고 S2에서 증가되었다. 눈조직의 LDH 활성은 42% 증가되었고, 골격근과 간조직의 경우 증가 폭이 34%로 유사하였다. 심장, 신장 및 정소조직은 S1에서 증가되었고 S2에서 각각 8, 12, 7% 감소되어 유사한 경향을 나타냈으며 신장조직의 LDH 활성이 가장 크게 감소되었다. LDH 비활성은 S2의 간조직 1.30 units/mg으로 65%, 골격근조직 4.10 units/mg으로 33%, 정소조직은 S1에서 0.23 units/mg으로 77%, S2에서 0.17 units/mg로 31% 증가되었으나, 뇌와 신장조직은 단백질 양이 증가되어 LDH 비활성이 각각 0.29, 0.26 units/mg으로 24%, 63% 감소되었다.

본 실험에서 기아 시 골격근의 LDH 활성이 증가되고 뇌의

LDH 활성이 가장 크게 증가된 것은, 운동 중에 골격근에서 생성된 젖산이 뇌로 수송되어 에너지를 공급한다는 보고[29]와 유사하게 생각할 수 있다. 심장조직은 식이상태에서 젖산과 포도당이 산화 되지만 기아 상태에서 지방산의 산화가 우세하며 MCT2와 MCT4 mRNA 농도가 감소되어 젖산의 산화가 감소된 것으로 보고되었다[16, 31]. 따라서 본 실험에서 기아 시 심장조직의 LDH 활성이 조금 감소되지만 LDH B<sub>4</sub> 동위효소가 증가되어(Fig. 1) 피루브산이 증가되므로 항산화 작용 및 에너지를 생성하는 것으로 사료된다. 기아 시 중에 따라 차이가 나타나고 특히 간과 신장조직에서 차이를 나타냈으며 [8, 20] LDH liver-specific C가 eye-specific C보다 영향을 많이 받았고, 특히 간과 뇌조직에서 LDH 활성이 크게 증가되었다는 보고[43]와 비교하면 본 실험결과 간조직 LDH 활성이 증가되는 정도는 liver-specific C가 발현된 중에 비해 낮게 확인되었다. 그러나 전자현미경에 의해 간조직에서 세포질과 퍼옥시좀에서 LDH가 확인되었고[1] 원형질막, 미토콘드리아 및 퍼옥시좀 막에서 MCT를 확인하여 산화환원 균형은 물론, 지방대사와 관련된다는 보고[40]에 의해 기아 시 간조직에서 피루브산 등 monocarboxylate를 사용하고 지방 대사를 하는 것과 관련 지을 수 있다. 48 hr 기아 생쥐의 조직에서 MCT 발현을 분석하여 간조직에서 MCT1과 MCT2가 증가되고 신장조직에서 MCT1만 증가되므로 젖산을 유입하여 당 신생과정을 통해

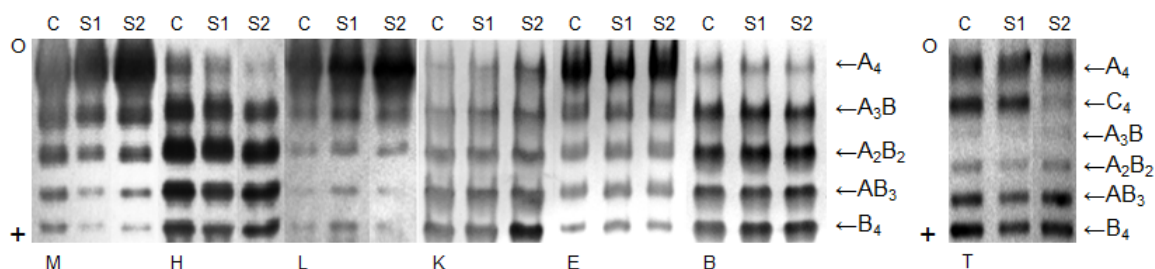


Fig. 1. Native-polyacrylamide gel electrophoresis zymograms of LDH isozymes in various tissues from mouse. (C: control, S1: 48 hr starvation, S2: 96 hr starvation, M: skeletal muscle, H: heart, L: liver, K: kidney, E: eye, B: brain, T: testis.)

조직에 에너지를 적절하게 공급한다는 보고[11, 38]로 본 실험 결과 간조직에서 LDH 활성이 증가된 것이 뒷받침될 수 있다.

**Native-polyacrylamide gel 전기영동**

*Ldh-A, B, C*의 발현을 확인하기 위해 생쥐 대조군, S1 및 S2의 골격근, 심장, 간, 신장, 정소, 눈 및 뇌조직의 LDH를 native-PAGE하여 동위효소의 발현을 확인하였다(Fig. 1). 대조군의 골격근 LDH는 음극 쪽에 A<sub>4</sub> 동위효소가 가장 강하고, AB<sub>3</sub>, B<sub>4</sub> 동위효소 활성이 약하게 확인되었다. 이에 비해 S1, S2에서 A<sub>4</sub>, A<sub>3</sub>B가 증가되고, AB<sub>3</sub>, B<sub>4</sub> 동위효소가 감소되었다. 심장조직은 A<sub>4</sub> 동위효소가 약하고 나머지 동위효소가 강하게 나타났으나, S1, S2에서 A<sub>4</sub>가 약해지고 B<sub>4</sub> 동위효소가 증가되었다. 간조직은 대조군에서 A<sub>4</sub>가 강하고 나머지 동위효소가 약하게 확인되었고, S2에서 A<sub>4</sub>가 증가되고 B<sub>4</sub> 동위효소가 약해졌으며, 신장조직은 대조군에 비해 S2에서 AB<sub>3</sub>와 B<sub>4</sub> 동위효소가 조금 증가되었다. 정소조직은 A<sub>4</sub>, C<sub>4</sub>, AB<sub>3</sub>, B<sub>4</sub>가 뚜렷하게 나타났으나, S2에서 A<sub>4</sub>와 B<sub>4</sub>가 유사하고 C<sub>4</sub>가 크게 감소되었다. 눈조직은 A<sub>4</sub>가 강하고 B<sub>4</sub>가 약하게 확인되었고, S2에서는 A<sub>4</sub> 동위효소가 조금 증가되었다. 뇌조직은 A<sub>4</sub>가 약하고 나머지 동위효소가 조금 강하게 확인되었으며, S1, S2에서도 동위효소가 거의 유사하였다. 따라서 골격근, 간 및 눈조직은 LDH A<sub>4</sub>가 증가되어 혐기적 대사가 증가되었고, 심장과 신장조직은 LDH B<sub>4</sub>가 증가되어 호기적 대사가 증가되었으며, 정소조직은 LDH C<sub>4</sub>가 크게 감소되었고, 뇌조직의 동위효소는 거의 유사하였으나 LDH 활성이 74% 증가 되었으므로 뇌조직의 젖산 농도는 동위효소 조성보다 LDH 활성에 의해 결정된다는 보고 [29]로 뒷받침될 수 있고, 어류 기아 중에서 liver-specific C와 eye-specific C가 간, 눈과 뇌조직에서 발현이 조절되고, 뇌조직에서 LDH A<sub>4</sub>가 증가되어 젖산의 대사가 우세하다는 보고 [10, 43]와는 차이를 나타냈다. 갑상선기능저하증 흰쥐의 골격근, 심장 및 정소에서 LDH 활성이 증가하여 혐기적 대사가 증가되고 눈조직은 호기적 대사가 증가되어[10] 유사하였다. 용존 산소를 급격히 증가시킨 환경에 LDH eye-specific C를 지닌 꺾지와 liver-specific C를 지닌 모래무지를 순응시킨 경우 골격근에서 LDH A<sub>4</sub>, 심장에서 B<sub>4</sub> 동위효소가 증가되어[3] 본 실험결과와 유사하였으며, 온도를 증가시킨 경우 liver-C가 발현된 간조직은 C<sub>4</sub>를 증가시켜 조절하였으나[13] 본 실험결과에서는 LDH testis-specific C가 발현된 정소조직에서 C<sub>4</sub>가 감소되었으므로 조건에 따라 에너지를 조절하기 위해 LDH C가 기능을 하는 것으로 확인되었다. LDH-C knock-out 생쥐

경우 생식력에 영향을 미칠 수 있고, 흰쥐 정소 Leydig cell을 젖산을 첨가하여 배양 시 testosterone이 증가되었다는 보고 [24]와 48 hr 기아상태의 흰쥐 뇌에서 MCT를 통해 케톤체 유입이 증가되어 황체호르몬 분비가 억제된다는 보고[18]에 의해 본 실험에서 정소의 LDH C<sub>4</sub>가 감소되어 생식기능이 저하된 것으로 볼 수 있다. 24 hr 기아 후 흰쥐와 돼지 간조직에서 MCT1과 MCT2가 증가되어 젖산이 공급된다는 보고[15]는 본 실험의 간조직에서 LDH A<sub>4</sub> 동위효소와 LDH 활성이 증가된 결과와 일치하므로 간조직에서 젖산이 에너지 생성을 하는 것으로 사료된다.

**피루브산의 정량 및 LDH의 피루브산에 대한 기질 의존성**

기질에 대한 LDH의 역학 실험은 동위효소의 구조와 대사를 이해하고, 종과 조직의 적응을 이해하는데 유용하므로[32] 피루브산을 정량하고, 피루브산에 대한 기질의존성을 측정하여 대사를 확인하였다. 생쥐 대조군과 S2의 골격근, 심장, 간, 정소, 눈 및 뇌 조직의 피루브산을 정량 하였다(Table 2). 대조군에서 0.04, 0.0637, 0.0770, 0.0637, 0.2991, 0.0918  $\mu\text{mole/g}$ 으로 측정되어 골격근조직에서 가장 적고, 눈조직에서 특히 많았다. S2에서 조직 별로 0.0682, 0.0726, 0.0859, 0.0859, 0.1984, 0.0696  $\mu\text{mole/g}$ 로 눈과 뇌조직에서만 감소되었고 다른 조직에서는 증가되었으며 골격근이 가장 크게 증가되었다. S2의 골격근에서 LDH A<sub>4</sub> 동위효소가 증가되어 젖산이 증가하지만 LDH 활성이 34% 증가되므로 피루브산이 증가된 것으로 볼 수 있다. 심장조직의 경우 S2에서 LDH 활성은 감소되지만 LDH B<sub>4</sub>가 증가되어 피루브산의 양이 증가된 것을 알 수 있었다. 특히 대조군의 눈조직에서 피루브산이 0.2991  $\mu\text{mole/g}$ 으로 높게 측정되어, 눈과 뇌조직에서 항산화제로서 작용을 한다는 보고[14, 36]에 의해 설명될 수 있고, S2에서 피루브산이 감소되므로 항산화 기능이 저하되는 것으로 보인다. 따라서 말뚝망둑어 골격근, 심장 및 눈조직의 피루브산이 0.18-0.30  $\mu\text{mole/g}$ 으로 높게 측정되어 육상에서 시식함으로써 생기는 산화스트레스에 대한 항산화기능을 하기 때문이라는 보고[12]와 유사하였다. 그리고 뇌조직의 경우 LDH 활성이 증가되고 피루브산이 24% 감소되는 것으로 측정되므로 그 결과 젖산이 증가되어 에너지원으로 사용되는 것으로 볼 수 있다. 그러므로 뇌조직에서 젖산이 장기기억을 유지하는데 역할을 하고 뇌의 가소성에 관여한다는 보고[22, 33, 39]에 의해 뒷받침 되고, 기아 시 LDH liver-specific C를 지닌 붕어와 eye-specific C를 지닌 파랑볼우렁의 뇌조직에서 젖산이 증가된다는 보고

Table 2. Pyruvate quantity of various tissues from mouse (C: control, S2: 96 hr starvation)

Tissues	Skeletal muscle	Heart	Liver	Eye	Brain	Testis
C	0.0400±0.003	0.0637±0.006	0.0770±0.007	0.2991±0.026	0.0918±0.008	0.0637±0.006
S2	0.0682±0.006	0.0726±0.006*	0.0859±0.007*	0.1984±0.017*	0.0696±0.006*	0.0859±0.007*

Data are mean ± SD, n=3, \*Significantly different from the corresponding control value using the Student's t-test, p<0.05.

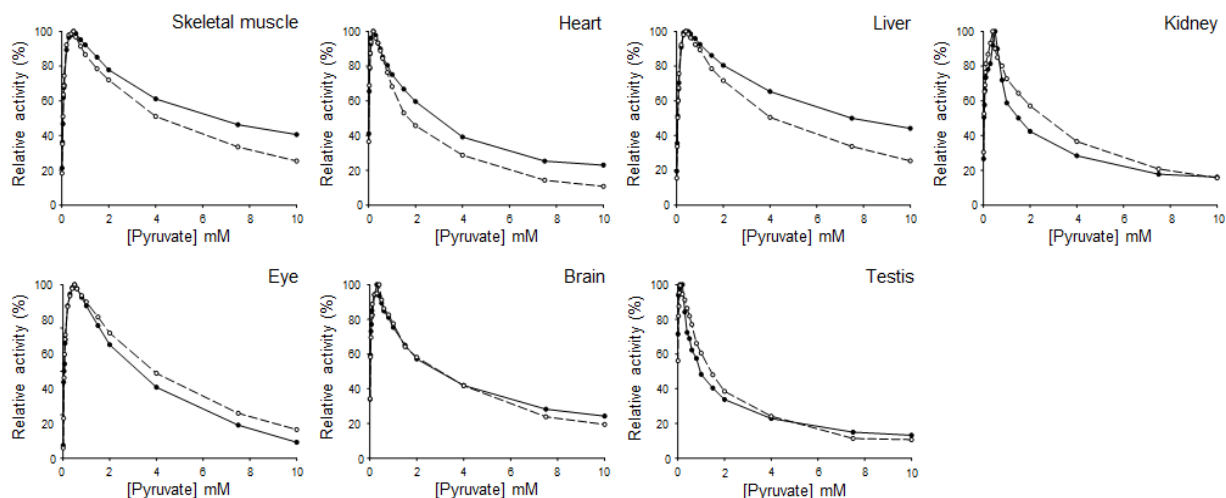


Fig. 2. Effect of pyruvate concentrations on the activity of LDH isozymes in various tissues from mouse. ●: control, ○: 96 hr starvation.

[43]와도 일치하였다. 정소조직의 피루브산이 35% 증가되었으나 LDH 활성은 감소되었으므로 젖산을 생성하는 LDH testis-specific C<sub>4</sub>가 크게 감소했기 때문인 것으로 보인다.

LDH의 기질의존성을 확인하기 위해 피루브산 0.01-10 mM 까지 농도 별로 활성을 측정하였다(Fig. 2). 피루브산에 의해 LDH 활성이 억제되는 정도는 간, 골격근, 눈, 뇌, 심장, 신장 및 정소조직 순서로 커졌으므로 하부단위체 A와 B보다 C가 크게 억제된 것을 알 수 있었다. 피루브산에 의한 간 및 골격근 조직의 LDH 활성이 44%, 41%로 측정되어 억제되는 정도가 가장 낮았고, S2에서 25% 활성이 남아 더 억제되는 것으로 나타났다. 따라서 기아군에서 피루브산의 농도가 증가됨에 따라 LDH 활성이 억제 되는 정도가 커졌으므로, 젖산이 대사에서 역할을 하는 것으로 사료된다. 심장조직의 LDH는 피루브산 10 mM에 대해 23% 활성을 나타내고, S2에서 11% 활성이 남아 크게 저해되었다. 신장과 정소조직의 LDH는 10 mM 피루브산에서 16%, 13%, S2에서 15%, 11%로 거의 유사하게 나타났다. 정소조직의 LDH가 급격히 억제되는 것이 특징적이었다. 눈과 뇌조직의 LDH는 10 mM 피루브산에서 27%, 24% 활성이고 S2의 뇌조직은 19%로 활성이 낮아 졌으므로 뇌조직에서 피루브산에 의한 억제 정도가 조금 크므로 젖산이 역할

을 하는 것으로 사료된다. 그리고 눈조직은 33%로 활성이 증가되어 억제 정도가 낮아 피루브산이 역할을 하는 것으로 볼 수 있었다. 대조군, S1 및 S2에서 조직 별  $K_m^{PYR}$ 과  $V_{max}^{PYR}$ 을 측정된 결과(Table 3),  $K_m^{PYR}$  값은 골격근 조직 0.0361 mM에서 S1 0.0762 mM, S2 0.0495 mM로 증가되었고 심장조직은 0.0163 mM에 비해 S2에서 0.0211 mM로 증가되었으며, 정소조직은 0.0043 mM에서 S1과 S2의 0.0081, 0.0091 mM로 증가되었고, 간조직도 0.0425 mM에 비해 S2에서 0.0664 mM로 크게 증가되었고  $V_{max}^{PYR}$ 이 117.17 units로 증가되었다. 신장조직은 0.0248 mM에서 S2의 0.0312 mM로 조금 감소되고,  $V_{max}^{PYR}$ 이 91.98에서 96.12 units로 증가되었다. 눈조직은 0.0285 mM에서 S2에서 0.0312 mM로 증가되고  $V_{max}^{PYR}$ 도 조금 감소되었으며, 뇌조직은 0.0202 mM에서 S1의 0.0341 mM로 증가되고  $V_{max}^{PYR}$ 도 122.24 units로 증가되었으나, S2에서 0.0201 mM로 대조군과 유사하고  $V_{max}^{PYR}$ 도 거의 유사하여 다른 조직과 다르게 확인되었다. 그 결과 기아군의 골격근, 심장, 간 및 정소조직 LDH는 피루브산에 대한 친화력이 감소하고  $V_{max}^{PYR}$ 이 증가되나, 신장조직은 피루브산에 대한 친화력이 증가하였고, 눈조직은 친화력이 감소하고  $V_{max}^{PYR}$ 도 감소되어 피루브산의 양이 감소된 것으로 확인되었다. 따라서 갑상선기능저하증 환

Table 3. Apparent Michaelis-Menten constant values for lactate dehydrogenase in various tissues from mouse (C: control, S1: 48 hr starvation, S2: 96 hr starvation)

Tissues		Skeletal muscle	Heart	Liver	Kidney	Eye	Brain	Testis
$K_m^{PYR}$ (mM)	C	0.0361	0.0163	0.0425	0.0248	0.0285	0.0202	0.0043
	S1	0.0762	0.0220	0.0459	0.0200	0.0346	0.0341	0.0081
	S2	0.0495	0.0211	0.0664	0.0220	0.0312	0.0201	0.0091
$V_{max}^{PYR}$ (unit/g)	C	94.28	106.99	99.33	91.98	99.61	102.04	103.27
	S1	112.55	111.63	100.22	99.17	99.12	122.24	104.96
	S2	106.39	114.03	117.17	96.12	97.37	101.93	107.04

쥐 골격근과 심장의  $K_m^{PYR}$ 과  $V_{max}^{PYR}$ 이 모두 증가하였다는 보고[10]와 유사하였다. 본 실험에서 10 mM 피루브산에 의해 심장조직 LDH의 활성이 23% 남아, 소(*Bos taurus*) B<sub>4</sub> 동위효소의 LDH 활성이 22% 남았다는 보고[4]와 거의 유사하였다. LDH B<sub>4</sub> 동위효소가 피루브산에 의해 더욱 억제되고 A<sub>4</sub> 동위효소는 억제되는 정도가 낮아 젖산이 축적된다고 하였으나[6] 기아 시 심장조직의 A<sub>4</sub>가 감소하고 B<sub>4</sub> 동위효소가 증가되어 피루브산이 증가되고 젖산을 지속적으로 증가시키지 않고 조절하는 것으로 보인다. 정소조직 LDH의  $K_m^{PYR}$  0.0043 mM과 S2의 0.0091 mM에 비해 생쥐 testis C는  $K_m^{PYR}$  0.76 mM [34]로 보고되어 차이를 나타냈고, LDH C는 기질특이성의 범위가 넓어 피루브산에서 젖산을 생성할 뿐 아니라  $\alpha$ -ketoglutarate에서 S-2-hydroxyglutarate도 생성하므로 저 산소에 적응하거나 암세포 같은 세포에서 LDH C에 의해 S-2-hydroxyglutarate가 증가된다고 보고되었다[34]. 그리고 기아상태 붕어의 골격근 LDH의  $K_m^{PYR}$ 도 대조군에 비해 조금 증가되었으나 [43], 생쥐 기아군 LDH의  $K_m^{PYR}$ 이 대조군에 대해 변화되는 정도가 더욱 크게 나타나 친화력이 크게 감소되고 에너지 대사의 변화가 큰 것으로 나타났다.

본 실험결과 기아상태에서 골격근, 간, 눈 및 뇌 조직은 LDH 활성이 증가되어 혐기적 대사가 증가되고 젖산을 사용하였으나, 심장과 신장조직은 LDH B<sub>4</sub>에 의해 피루브산이 증가되어 호기적 대사로 조절하는 것으로 보였다. 신장조직을 제외한 조직들에서  $K_m^{PYR}$ 이 증가되어 피루브산에 대한 친화력이 감소된 것으로 확인되었다. 눈과 뇌조직의 피루브산의 양이 감소되었고, 정소조직의 LDH 활성이 감소되고 LDH C<sub>4</sub> 동위효소가 감소되었다. 따라서 기아상태에서 *Ldh-A, B*만 발현된 조직에서는 상대적으로 활성이 높은 동위효소가 증가되었고, *Ldh-A, B, C*가 발현된 정소조직의 경우 *Ldh-C*에 의해 기질의 대사를 조절하여 에너지를 생성하는 것으로 확인되었다. 특히 뇌조직에서 LDH는 피루브산 환원효소로서 역할을 하여 에너지를 유지하지만, 눈조직에서는 항산화기능이 저하되고, 정소조직의 경우 생식기능에 영향을 미칠 수 있으므로 오랜 기아상태를 피해야 할 것으로 사료된다. 기아상태에서 LDH testis-specific C는 정소조직에서만 발현되어 에너지 생성에 관여되었으나, LDH liver-specific C와 eye-specific C의 경우 간, 뇌 및 눈조직에서 발현되고, liver-specific C가 eye-specific C보다 영향을 더 받는다는 보고[43]와 비교하면 척추동물 세 가지 종류의 LDH C가 순간 에너지 생성에 관여되는 것은 유사하지만 포유류의 정소 기능을 위해 LDH C가 더 진화된 것으로 보이므로, 이후 세 종류의 LDH C, 기질의 농도 및 MCT 수송체를 종합하여 연구한다면 LDH C 기능을 확실하게 밝힐 수 있을 것으로 사료된다.

## 감사의 글

이 논문은 2016~2017학년도 청주대학교 산업과학연구소가 지원한 학술연구조성비(특별연구과제) 지원에 의해 연구되었음.

## References

- Baumgart, E., Fahimi, H. D., Stich, A. and Völkl, A. 1996. L-Lactate dehydrogenase A4-and A3B isoforms are bona fide peroxisomal enzymes in rat liver evidence for involvement in intraperoxisomal NADH reoxidation. *J. Biol. Chem.* **271**, 3846-3855.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Cho, S. K. and Yum, J. J. 2005. Changes of activities and isozymes of lactate dehydrogenase in *Coreoperca herzi* and *Pseudogobio esocinus* acclimated to rapid increase of dissolved oxygen. *J. Life Sci.* **15**, 71-79.
- Cho, S. K., Park, S. Y. and Yum, J. J. 1993. Purification and immunochemistry of lactate dehydrogenase in *Lampetra japonica*. *Kor. J. Zool.* **36**, 505-513.
- Davis, B. J. 1964. Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **121**, 404-427.
- de Almeida-Val, V. M. F. and Val, A. L. 1993. Evolutionary trends of LDH isozymes in fishes. *Comp. Biochem. Physiol. B.* **105**, 21-28.
- Fang, R., Zheng, X. and Zhang, M. 2016. Ethyl pyruvate alleviates early brain injury following subarachnoid hemorrhage in rats. *Acta Neurochir.* **158**, 1069-1076.
- Furne, M., Morales, A. E., Trenzado, C. E., Garcia-Gallego, M., Hidalgo, M. C., Domezain, A. and Rus, A. S. 2012. The metabolic effects of prolonged starvation and refeeding in sturgeon and rainbow trout. *J. Comp. Physiol. B.* **182**, 63-76.
- Goldberg, E., Eddy, E. M., Duan, C. and Odet, F. 2010. LDH C: The ultimate testis specific gene. *J. Androl.* **31**, 86-94.
- Ha, E. S. 2017. Characterization of lactate dehydrogenase in methimazole-induced hypothyroid rats (*Rattus norvegicus*). MS. dissertation, Cheongju Univ., Cheongju, Korea.
- Hashimoto, T., Cook, W. S., Qi, C., Yeldandi, A. V., Reddy, J. K. and Rao, M. S. 2000. Defect in peroxisome proliferator-activated receptor alpha-inducible fatty acid oxidation determines the severity of hepatic steatosis in response to fasting. *J. Biol. Chem.* **275**, 28918-28928.
- Kim, G. D. 2016. Expression of lactate dehydrogenase and monocarboxylate transporters (MCT) and antioxidant function. MS. dissertation, Cheongju Univ., Cheongju, Korea.
- Kim, J. B., Cho, S. K. and Yum, J. J. 2004. Changes of activities and isozymes of lactate dehydrogenase in *Coreoperca herzi* acclimated to acute increase of temperature for short-term period. *J. Ind. Sci.* **22**, 43-50.

14. Kim, J., Lee, Y. M., Kim, C. S., Sohn, E., Jo, K., Shin, S. D., and Kim, J. S. 2013. Ethyl pyruvate prevents methylglyoxal-induced retinal vascular injury in rats. *J. Diabetes Res.* **2013**, 460820.
15. König, B., Fischer, S., Schlotte, S., Wen, G. and Eder, K. 2010. Monocarboxylate transporter 1 and CD 147 are up-regulated by natural and synthetic peroxisome proliferator activated receptor alpha agonists in livers of rodents and pigs. *Mol. Nutr. Food Res.* **54**, 1248-1256.
16. Laepinsh, E., Makrecka, M., Kuka, J., Makarova, E., Vilskersts, R., Cirule, H., Sevostjanovs, E., Grinberga, S., Pugovics, O. and Dambrova, M. 2014. The heart is better protected against myocardial infarction in the fed state compared to the fasted state. *Metabolism* **63**, 127-136.
17. Markert, C. L., Shaklee, J. B. and Whitt, G. S. 1975. Evolution of a gene. Multiple genes for LDH isozymes provide a model of the evolution of gene structure, function and regulation. *Science* **189**, 102-114.
18. Matsuyama, S., Ohkura, S., Iwata, K., Uenoyama, Y., Tsukamura, H., Maeda, K. and Kimura, K. 2009. Food deprivation induces monocarboxylate transporter 2 expression in the brainstem of female rat. *J. Reprod. Dev.* **55**, 256-261.
19. Moro, N., Ghavim, S. S., Harris, N. G., Hovda, D. A. and Sutton, R. L. 2016. Pyruvate treatment attenuates cerebral metabolic depression and neuronal loss after experimental traumatic brain injury. *Brain Res.* **1642**, 270-277.
20. Morze, C., Chang, G. Y., Larson, P. E. Z., Shang, H., Allu, P. K. R., Bok, R. A., Crae, J. C., Olson, M. P., Tan, C. T., Marco-Rius, I., Nelson, S. J., Kurhanewicz, J., Pearce, D. and Vigneron, D. B. 2016. Detection of localized changes in the metabolism of hyperpolarized gluconeogenic precursors <sup>13</sup>C-lactate and <sup>13</sup>C-pyruvate in kidney and liver. *Magn. Reson. Med.* **77**, 1429-1437.
21. Mukai, C. and Okuno, M. 2004. Glycolysis plays a major role for adenosine triphosphate supplementation in mouse sperm flagella movement. *Biol. Reprod.* **71**, 540-547.
22. Nalbandian, M. and Takeda, M. 2016. Lactate as a signaling molecule that regulates exercise-induced adaptations. *Biology* **5**, 38.
23. O'Brien, J., Kla, K. M., Hopkins, I. B., Malecki, E. A. and McKenna, M. C. 2007. Kinetic parameters and lactate dehydrogenase isozyme activities support possible lactate utilization by neurons. *Neurochem. Res.* **32**, 597-607.
24. Odet, F., Duan, C., Willis, W. D., Goulding, E. H., Kung, A., Eddy, E. M. and Goldberg, E. 2008. Expression of the gene for mouse lactate dehydrogenase C (*Ldhc*) is required for male fertility. *Biol. Reprod.* **79**, 26-34.
25. Oishi, Y., Tsukamoto, H., Yokokawa, T., Hirotsu, K., Shimazu, M., Uchida, K., Tomi, H., Higashida, K., Iwanaka, N. and Hashimoto, T. 2015. Mixed lactate and caffeine compound increases satellite cell activity and anabolic signals for muscle hypertrophy. *J. Appl. Physiol.* **118**, 742-749.
26. Park, S. Y. and Yum, J. J. 1993. Lactate dehydrogenase isozymes of Cypriniform and Perciform fishes: Expression of the *Ldh-C* gene. *J. Ind. Sci.* **11**, 265-277.
27. Park, E. M. and Yum, J. J. 2010. Purification and characterization of lactate dehydrogenase isozymes in *Channa argus*. *J. Life Sci.* **20**, 260-268.
28. Park, E. M. and Yum, J. J. 2011. Activities of lactate dehydrogenase and ratios of lactate dehydrogenase/citrate synthase in tissue of *Odontobutis interrupta*. *J. Ind. Sci.* **28**, 15-24.
29. Quistorff, B. and Grunnet, N. 2011. High brain lactate is not caused by a shift in the lactate dehydrogenase A/B ratio. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **108**, E21.
30. Scanlan, M. J., Simpson, A. J. and Old, L. J. 2004. The cancer/testis genes: review, standardization, and commentary. *Cancer Immun.* **4**, 1.
31. Schutkowski, A., Wege, N., Stangl, G. I. and König, B., 2014. Tissue-specific expression of monocarboxylate transporters during fasting in mice. *PLoS ONE* **9**, E112118.
32. Sensabaugh, G. F. and Kaplan, N. O. 1972. A lactate dehydrogenase specific to the liver of gadoid fish. *J. Biol. Chem.* **247**, 585-593.
33. Suzuki, A., Stern, S. A., Bozdagi, O., Huntley, G. W., Walker, R. H., Magistretti, P. J. and Alberini, C. M. 2011. Astrocyte-neuron lactate transport is required for long-term memory formation. *Cell* **144**, 810-823.
34. Teng, X., Emmett, M. J., Lazar, M. A., Goldberg, E. and Rabinowitz, J. D. 2016. Lactate dehydrogenase C produced S-2-hydroxyglutarate in mouse testis. *ACS Chem. Biol.* **11**, 2420-2427.
35. Wang, Y., Wei, L., Wei, D., Li, X., Xu, L. and Wei, L. 2015. Testis-specific lactate dehydrogenase (LDH-C4) in skeletal muscle enhances a pika's sprint-running capacity in hypoxic environment. *Int. J. Environ. Res.* **12**, 9218-9236.
36. Wang, X., Perez, E., Liu, R., Yan, L. J., Mallet, R. T. and Yang, S. H. 2007. Pyruvate protects mitochondria from oxidative stress in human neuroblastoma SK-N-SH cells. *Brain Res.* **1132**, 1-9.
37. Whitt, G. S. 1970. Developmental genetics of the lactate dehydrogenase isozymes of fish. *J. Exp. Zool.* **175**, 1-35.
38. Xu, J., Xiao, G., Trujillo, C., Chang, V., Blanco, L., Joseph, S. B., Bassilian, S., Saad, M. F., Tontono, P., Lee, W. N. and Karland, I. J. 2002. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) influences substrate utilization for hepatic glucose production. *J. Biol. Chem.* **277**, 50237-50244.
39. Yang, J., Ruchti, E., Petit, J. M., Jourdain, P., Grenningloh, G., Allaman, I. and Magistretti, P. J. 2014. Lactate promotes plasticity gene expression by potentiating NMDA signaling in neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **111**, 12228-12233.
40. Yeon, J. H. 2011. Characterization of lactate dehydrogenase and expression of monocarboxylate transporters (MCT) 1, 2, 4 in liver from *Carassius auratus*. MS. dissertation, Cheongju Univ., Cheongju, Korea.
41. Yum, J. J. 2008. Characterization of lactate dehydrogenase in *Acanthogobius hasta*. *J. Life Sci.* **18**, 264-272.
42. Yum, J. J. and Ku, B. R. 2012. Biochemical properties of lactate dehydrogenase eye-specific C4 isozyme: *Lepomis macrochirus* and *Micropterus salmoides*. *J. Life Sci.* **22**, 209-219.
43. Yum, J. J. and Kim, G. D. 2016. Metabolism of lactate de-



hydrogenase in tissues from *Ldh-C* expressed fish at starved state. *J. Life Sci.* **26**, 101-109.

44. Zilberter, Y., Zilberter, T. and Begestovski, P. 2010. Neuronal

activity *in vitro* and the *in vivo* reality: The role of energy homeostasis. *Trends Pharmacol. Sci.* **31**, 394-401.

---

### 초록 : 기아상태에서 *Ldh-C*가 발현된 생쥐(*Mus musculus*) 조직의 젖산탈수소효소의 대사

염정주\* · 김규동

(청주대학교 생명과학과)

젖산탈수소효소(Lactate dehydrogenase, EC 1.1.1.27, LDH)의 기능을 확인하기 위해서 *Ldh testis-specific C*가 발현된 생쥐(*Mus musculus*)를 48 hr과 96 hr 기아상태로 유지시킨 후 조직들의 LDH 대사를 LDH 활성, 역학 및 동위효소를 분석하여 연구하였다. 골격근, 간 및 눈조직에서 LDH와 LDH A<sub>4</sub>활성이 증가되어 혐기적 대사가 우세하였고, 심장과 신장조직의 LDH 활성은 감소되지만 LDH B<sub>4</sub> 활성이 증가되어 피루브산을 생성하는 호기적 대사가 우세하였다. 하지만 정소조직에서는 LDH C<sub>4</sub>가 감소되었고, 뇌조직의 LDH 활성은 조직 중에서 가장 많이 증가되었지만 동위효소의 변화가 작고 피루브산의 양이 감소되었다. 신장조직을 제외한 조직들에서  $K_m^{PYR}$ 이 증가되어 피루브산에 대한 친화력이 감소된 것으로 확인되었다. 실험결과 *Ldh-A, B*가 발현된 조직에서는 상대 농도가 큰 동위효소의 활성이 증가되었으나 *Ldh-A, B, C*가 발현된 정소조직은 LDH C<sub>4</sub>가 감소되어 기능이 저하되었으며 특히 뇌조직에서 LDH는 피루브산 환원효소로서 역할을 하는 것으로 확인되었다. 따라서 이 과정은 기아상태에서 에너지를 생성하는 기작이 될 수 있는 것으로 사료된다.