

# 亞黃酸가스가 白鼠組織의 Lactic Dehydrogenase-Isozyme 에 미치는 影響

延世大學校 醫科大學 豫防醫學教室

鄭 勇

=Abstract=

## Effects of Sulfur Dioxide on Lactic Dehydrogenase-Isozyme

Department of Preventive Medicine and Public Health,  
College of Medicine, Yonsei University

Yong Chung

Alterations of H-and M-isozymes of Lactic Dehydrogenase(LDH) were observed in the various tissues after exposing the rats to 50ppm and 250ppm of sulfur dioxide. These isozymes of the respective tissue were separated by Diethylaminoethyl (DEAE)-cellulose from the tissue homogenates of brain, lung and muscle, presenting the activities by rate of reduction of nicotinamide-adenine-dinucleotide (NAD<sup>+</sup>).

Pure LDH and the coenzyme (NAD<sup>+</sup>) were directly treated with sulfur dioxide in vitro in order to find out the direct to sulfur dioxide on LDH and NAD<sup>+</sup> and the results were as follows.

1. In the normal tissues, the H-isozyme activity was dominant in the brain and heart, and the M-isozyme in the muscle.
2. In the lung tissue of normal rats, there was no difference between the activity of H-and M-type of LDH.
3. When rats inhale sulfur dioxide gas in concentration of 50ppm and 250ppm, it appeared that the H-type tend to be suppressed in aerobic tissues and the M-type in anaerobic tissues.
4. In the lung tissue exposed to sulfur dioxide, both the LDH activities were suppressed.
5. It seems that LDH and the coenzyme (NAD<sup>+</sup>) are not directly affected by exposing in sulfur dioxide gas.

### 1. 緒 論

近來 都市의 膨脹과 더불어 交通機關, 工場 및 一般住宅에서 排出하는 有害가스는 甚한 大氣汚染을 惹起하여 公衆衛生上 生體의 健康維持에 많은 困難을 招來함으로써 深刻한 社會問題를 이루고 있다.

우리나라에서도 都市集中化와 工業化에 따른 大氣汚染도는 날로 增加하여 가고 있어, 尹(1967) 등은 서울 市內 主幹道路邊에서 測定한 SO<sub>2</sub> 平均濃도는 0.24ppm으로 美國의 Health Education and Welfare (HEW)의 人體有害限界를 超過하고 있다고 報告하였고 著者(1967)

등도 車輛增加로 因한 大氣汚染의 增加를 報告하며 있다.

한편 大氣汚染物質들이 生體에 미치는 影響에 對해서는 London (1952)에서의 慘禍가 亞黃酸가스 등의 汚染物質과 正比例하여 發生하였다는 實證이 있고 Stockinger (1965)는 亞黃酸가스가 動物의 呼吸器뿐만 아니라 消化器도 刺戟하며 또 各種 感染을 助長한다고 하였고 Balchum (1960) 등은 腦組織에도 쉽게 吸收되어 機能低下를 가져온다고 報告하였다. Kilroe-Smith (1963) 등은 木屑트를 dust에 露出시키면 肺에서 collagen形成에 關하여 succinic dehydrogenase와 succinic oxidase의 活性이

增加하고 cytochrom C oxidase의 活性이 減少하는 現象을 觀察하였고 Buckely (1967) 등은 물못트에 二酸化窒素를 吸入시키면 腎 組織에서  $SO_2$ 值가 增加하고 肺와 肝組織의 aldolase의 活性이 增加할 뿐 아니라 肺組織에서 LDH의 fast moving isozyme (H型)이 減少하는 反面 slow moving isozyme (M型)이 增加하는 것을 보아 이러한 現象들은 energy 代謝에 큰 影響을 미친다고 하였다. Garland (1967) 등은 各種 鹽類中에서 LDH가 高濃度の Pyruvate에 作用할 수 있는 機能이 低下되는 것을 報告하였다. 이러한 報告들은 有害가스가 生體內의 酵素系에 미치는 影響이 클 것이라 생각해 한다.

특히 有害가스中에서 亞黃酸가스는 各種 燃料에서 共通의 發生하는 것이며 生體에는 勿論 植物과 建物에 惡影響을 미치는 것이므로 大氣 및 有害作業場에서의 空氣汚染度의 指標로 삼고 있는 것이다.

한편 炭水化物代謝中 Lactic dehydrogenase (LDH) 酵素系는 energy 代謝過程中 好氣的 또는 嫌氣的 狀態에 따라 그 酵素의 活性에 變化가 크다. 더욱이 이 LDH는 Markert (1959) 등은 multiple form으로 存在한다는 것을 證明하였고 Kaplan (1962) 등은 이들은 各各 性質이 다른 두가지 isozyme(H型 及 M型)으로 構成되어 있다고 하였다.

權(1968)은 이러한 LDH酵素系에 對한 亞黃酸가스의 影響은 各 組織마다 特異하게 Subunit의 變化를 가져온다고 報告하였다.

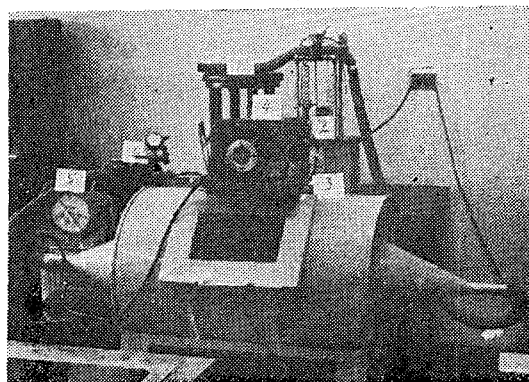
따라서 이러한 現象은 앞으로 더욱 大氣汚染의 增加와 더불어 亞黃酸가스 등에 依하여 急性 또는 慢性으로 酵素系에 直接 또는 間接으로 影響을 미쳐서 各 臟器의 機能과 生合成에 障害를 招來할 것이 豫測된다. 이때에 亞黃酸가스가 LDH의 活性과 그 isozyme의 分布에 變化를 가져오는 原因과 影響에 對해서는 報告가 없다. 그러므로 著者는 白鼠에 亞黃酸가스를 吸入시킨 後 各 臟器의 LDH活性과 두 isozyme의 變化를 觀察하였고 한편 LDH를 純粹分離하여 試驗管內에서 亞黃酸가스를 導入하므로써 LDH活性과 그 isozyme의 變化를 研究하여 若干의 知見을 얻었기에 報告하는 바이다.

## II. 實驗方法

### A. 實驗動物 및 亞黃酸가스 吸入

體重 160~180gm의 Albino rats(雄)를 對照群과 試驗群 各各 10마리씩 使用하였으며 試驗群은 2群으로 區分하여 約 210l의 密閉된 가스室에 넣고 Dual infusion/withdrawal pump(Model 600-910/920, Harvard Apparatus Co.)로 亞黃酸가스 濃度を 50ppm과 250ppm으

로 調節維持하는 同時에 酸素缺乏을 防止코져 白鼠分時 換氣量 [130ml/min, 鄭 (1961)]을 參酌하여 換氣流速을 調節하면서 各各 6時間씩 亞黃酸가스를 吸入시켰다.



第1圖 亞黃酸가스 吸入裝置

### 第1圖의 說明

1: Air inlet 2: Dual infusion/withdrawal pump  
3: Exposing chamber 4: Gas monitor 5: Gas flow meter 6: Rotary pump

가스室內의 亞黃酸가스의 濃度は Midget Impinger Gas Analyzer(Mine Safety Appliances Co.)로 6時間 동안 15分마다 繼續測定하면서 가스濃度を 調節하여 一定하게 維持하였다. 이때 使用한 亞黃酸가스는 金屬銅片과 濃黃酸을 kipp's裝置內에서 加熱反應시켜, 發生된 가스를 polyvinyl袋中에 捕集하여 使用하였다. 가스에 露出시킨 動物은 直時 屠殺하여 腦, 心臟, 肺 및 大腿筋을 切取하였다.

### B. 實驗 組織液의 調製

採取한 組織은 4°C 以下로 冷却한 0.25M Sucrose 液과 같이 4°C 冷凍室에서 호모지나이저(homogenizer)로 磨碎하여 冷却한 sucrose液으로 40%(w/v)가 되도록 하였다.

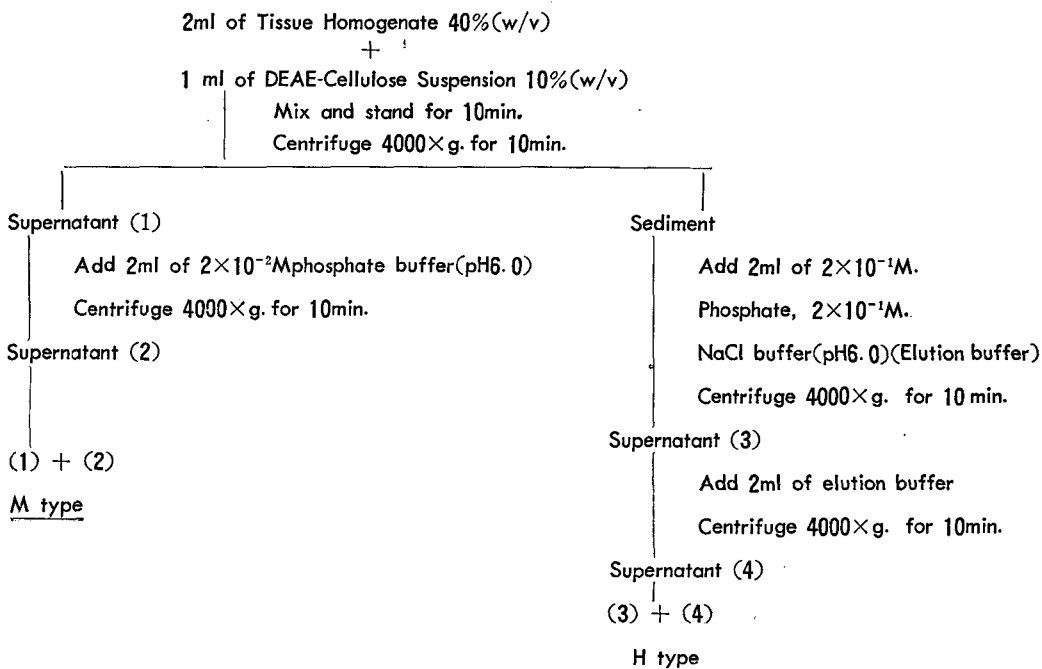
磨碎液은 細胞片을 除去하기 爲하여 二重꺼즈로 濾過하고, 部分을 除去하기 爲하여 600×g로 15分間 遠心沈澱시켰다. 이 上清液은 mitochondria 部分을 除去하기 爲하여 12,500×g로 30分間 遠心沈澱시켜 cytoplasm 液層을 얻어 이것을 試驗組織으로 使用하였다. 이때 遠心沈澱은 冷凍遠心分離機(International Centrifuge Model PR-2, International Equipment Co.)를 使用하였다.

### C. Lactic Dehydrogenase의 分離

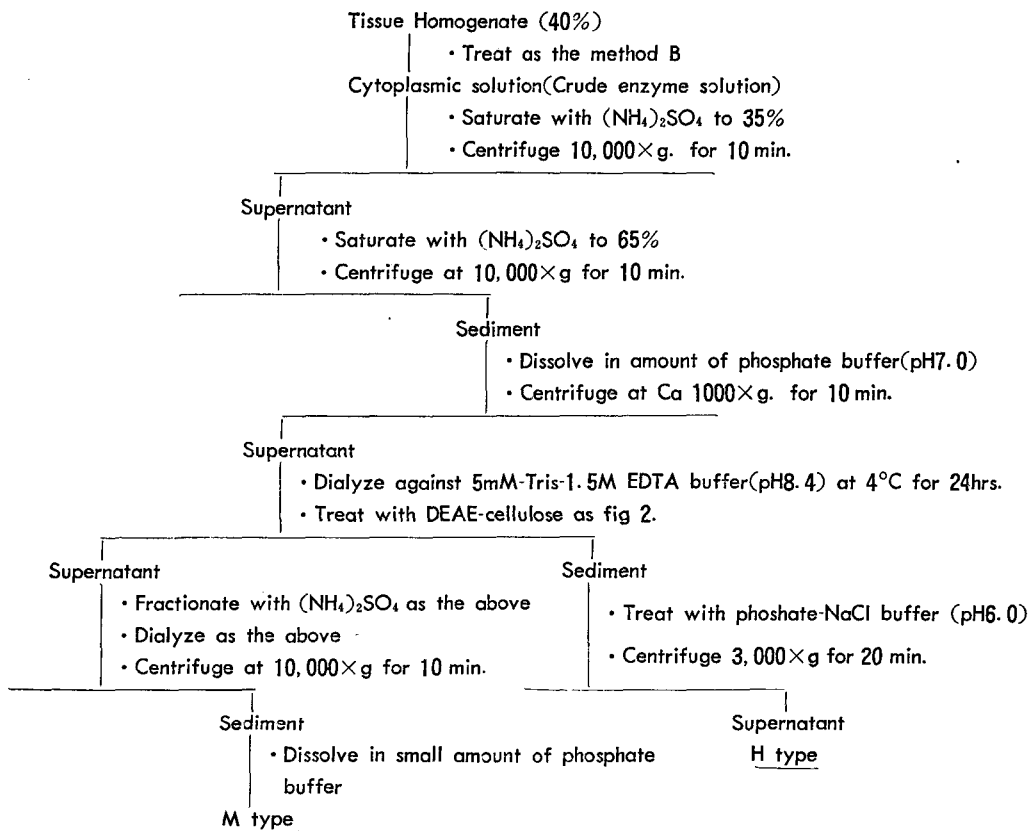
#### 1. Lactic Dehydrogenase 두 Isozyme의 分離

Bergmeyer(1963) 등의 方法에 依하여 DEAE-(dicitryl

—亞黃酸가스가 白鼠組織의 Lactic Dehydrogenase-Isozyme에 미치는 影響—



第2圖 LDH-isozyme의 分離



第3圖 LDH isozyme의 純粹分離

amino ethyl-) Cellulose를  $2 \times 10^{-2}M$  磷酸鹽緩衝液(phosphate buffer, pH6.0)에 10%(w/v)되게懸濁시킨後, 이 DEAE-cellulose懸濁液 1ml에 試驗組織液 2ml를加하고 잘混合後 10分間放置하여  $4,000 \times g$ , 10分間遠沈해서 그上清液을 얻고 다시  $2 \times 10^{-2}M$  磷酸鹽緩衝液 2ml를加해再遠心後前後의上清液을 흡하였다(M型分離).

다음 나머지 DEAE-cellulose 吸着部分은 溶出緩衝液(Elution Buffer;  $2 \times 10^{-1}M$  phosphate buffer,  $2 \times 10^{-1}M$  NaCl, pH6.0)을 2ml씩 2回遠心抽出하였다.(H型分離)(第2圖).

### 2. Lactic Dehydrogenase의 純粹分離

다음 第3圖와 같이 白鼠의 大腿部 筋肉을 分離한後 40% hemogenate를 만들고 細胞片과 mitochondria 部分을 除去後 35~65% 黃酸암모늄液에서沈澱되는部分을 DEAE-cellulose로 LDH의 H型和 M型을 各各 分離精製하였다.

本實驗에서는 LDH M型만을 使用하였다.

### D. Lactic Dehydrogenase의 確認

LDH Isozyme은 Smithies(1955)의 一般의 方法에 依하여 Spinco electrophoresis chamber(Beckman Co.)을 使用하여 cellulose acetate strip(Sepharose III, Gelman Co.)을顯微鏡用 Slide上에 놓고 水平 電氣泳動한後에 Rutenburg(1956)等의 方法에 따라 nitroblue tetrazolium 및 phenazin methosulfate가  $NAD^+$ 를 還元하여 生成되는 formazane의 鮮명한 紫色帶로 分離된 isozyme을 確認하였다.

### E. Lactic Dehydrogenase의 活性測定

Neilands(1955)의 方法에 따라서 LDH에 依하여 lactate가 pyruvate로 酸化할 때에 還元되는 coenzyme  $NAD^+$ (nicotinamide adenine dinucleotide)의 量을  $310\mu\mu$ 에서 光線吸收率로 測定하였다.

測定方法은 Beckman DU Spectrophotometer의 固定器에 1cm silica cell를 固定하고 正確히 4.2ml의 0.1M glycine buffer(pH10.0), 0.5ml의 0.1M Na-lactate 및 0.1ml의  $2 \times 10^{-2}M$   $NAD^+$ 液을 넣고 여기에 0.2ml의 酵素液을 反應液中에 迅速히 添加 混合하고 即時  $340\mu\mu$ 에서 吸光度의 變化를 時間函數(AE340)로서 記錄하였다. 여기에 每ml當 每分間에 減少하는 optical density (OD)를 extinction coefficient  $6.22 \times 10^3$ 로 除하여  $NAD^+$ 의  $\mu M$ 을 求하고 蛋白質 每mg當 比較活性(specific activity)으로 表示하였다.

### F. 蛋白質含量的 測定

蛋白質含量은 Lowry(1951)等의 方法으로 檢液에 Fo-

lin-Ciocalteau(1927)의 phenol試藥을 加하고 發色시킨後 Spectrophotometer(Spectronic 20, Bausch & Lomb Co.)로  $750\mu\mu$ 에서의 吸光度를 測定하여 標準曲線과 比較하였다.

標準曲線은 미리 microkjeldahl法으로 總窒素量을 測定한 牛血清 albumin(National Biochemicals)을 使用하여 求하였다.

### G. LDH 及 $NAD^+$ 에 對한 亞黃酸가스의 作用

polyvinyl袋에 捕集된 亞黃酸가스를 注射器에 넣어 蒸溜水로 飽和시킨後 10,000ppm, 640ppm, 64ppm 及 0.64ppm의 濃度로 正確히 稀釋하여 5種의 濃度の 亞黃酸가스溶液을 만들었다. 이때에 溶液中의 亞黃酸濃度는 요오드法(West and Gaeke 法)으로 測定하였다. LDH와  $NAD^+$ 의 亞黃酸處理는 이를 亞黃酸가스 各種 濃度 溶液으로 各各 LDH( $120\mu M$  of NADH reduced/min/mg of protein)와  $NAD^+$ (0.02M)을 調製하여 處理된 酸素와 coenzyme으로 하고 한便 蒸溜水로 同濃度の LDH와  $NAH^+$ 溶液을 同時에 만들어 다음과 같이 4群으로 나누어 各各  $25^\circ C$  10分間씩 處理하여 LDH活性을 測定함으로써 亞黃酸가스가 LDH酵素系에 미치는 影響을 試驗하였다. 이때에 LDH는 純粹分離된 M type을 使用하였다.

1. 正常 LDH와 正常  $NAD^+$ 를 使用하여 測定한 對照群
2. 亞黃酸가스로 處理된 LDH와 正常  $NAD^+$ 를 使用한 實驗群
3. 正常 LDH와 亞黃酸가스로 處理된  $NAD^+$ 를 使用한 實驗群
4. LDH 及  $NAD^+$  모두 亞黃酸가스로 處理하여 使用한 實驗群

## III. 實驗成績

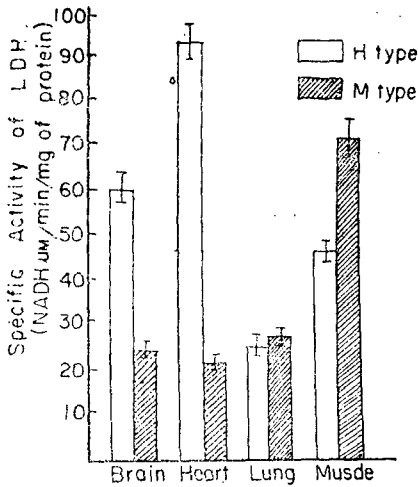
### A. 各 臟器의 正常 LDH-isozyme의 活性

對照群에 있어 各 臟器의 LDH isozyme 活性의 分布는 다음 第2表, 第3表 및 第4圖와 같이 腦와 心臟組織에 있어서는 H型の 活性이 各己 全 活性의 77.4%와 82.7%로 M型の 活性보다 優勢하였고 大腿筋組織에서는 M型の 活性이 全活性의 58.7%로서 H型보다 優勢하였다.(各己  $p < 0.01$ )

한편 肺組織에서는 H型和 M型的 活性分布가 48.6%와 51.4%로서 大差없이 類似하였다.

### B. 亞黃酸가스에 對한 LDH-isozyme의 活性變化

亞黃酸가스 露出 및 對照群의 各 組織에 對해서 蛋白質量 및 LDH-isozyme의 活性의 變化는 다음 第1表, 第



第4圖 白鼠組織의 LDH-isozyme의 分布

第1表 亞黃酸가스에 露出된 白鼠組織의 蛋白質含量變化(mg/ml Homogenate)

Kind of LDH type	Tissue	Control	Exposed Group	
			50ppm	250ppm
H type	Brain	1.10±0.12	1.87±0.14	2.55±0.30
	Heart	1.85±0.19	2.76±0.21	2.95±0.25
	Lung	2.25±0.35	2.85±0.32	2.78±0.28
	Muscle	2.50±0.20	3.03±0.31	3.23±0.40
M type	Brain	1.50±0.18	1.47±0.15	1.80±0.19
	Heart	1.70±0.17	2.30±0.16	1.75±0.14
	Lung	1.60±0.13	2.05±0.20	3.75±0.33
	Muscle	2.10±0.26	2.40±0.25	2.70±0.29

(Mean±SE)

第2表 및 3表와 같다.

腦組織에 있어서 LDH-isozyme의 活性(specific activity)의 變化는 H型에 있어 對照群의 58.6±4.3μM/min/mg에 비해 實驗群 即 亞黃酸가스露出群은 亞黃酸가스 50ppm 및 250ppm에 의해 33.7±3.0μM/min/mg과 31.6±3.1μM/min/mg으로 各各 對照群에 비해 34.3%, 45.1%의 活性低下를 보였다. (p<0.01) M型은 對照群 17.2±0.7μM/min/mg와 實驗群 16.4±0.9μM/min/mg

第2表 亞黃酸가스에 露出된 白鼠組織의 LDH 活性 變化(NADH μM/min/ml homogenate)

Kind of LDH type	Tissue	Control	Exposed Group	
			50ppm	250ppm
H type	Brain	64.3±7.2	72.4±6.3	80.4±7.0
	Heart	174.0±9.2	166.4±10.4	174.0±12.3
	Lung	55.5±3.9	56.3±4.7	48.3±5.2
	Muscle	110.9±8.8	130.3±10.2	143.1±11.3
M type	Brain	25.7±3.8	24.1±2.9	30.5±3.7
	Heart	32.1±2.5	44.2±3.3	30.5±2.7
	Lung	41.8±3.7	28.2±2.9	36.8±3.6
	Muscle	146.3±13.3	128.5±13.7	143.1±10.4

(Mean±SE)

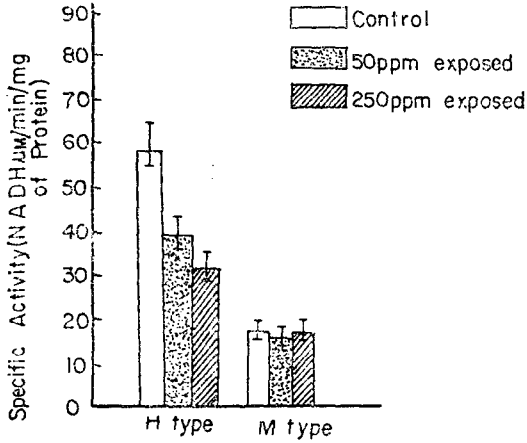
第3表 亞黃酸가스에 露出된 白鼠組織의 LDH 比較活性 變化(NADH μM/min/mg of protein)

Kind of LDH type	Tissue	Control	Exposed Group	
			50ppm	250ppm
H type	Brain	58.6±4.3	38.7±3.0	31.6±3.1
	Heart	93.0±4.6	60.3±2.8	58.6±3.2
	Lung	24.7±2.2	19.8±1.7	17.4±0.9
	Muscle	44.5±2.1	43.0±2.7	44.3±2.5
M type	Brain	17.2±0.7	16.4±0.9	17.0±1.0
	Heart	19.9±1.6	19.2±1.9	17.5±2.4
	Lung	26.2±2.0	13.8±0.7	9.8±0.6
	Muscle	69.7±5.2	53.6±3.3	53.1±2.9

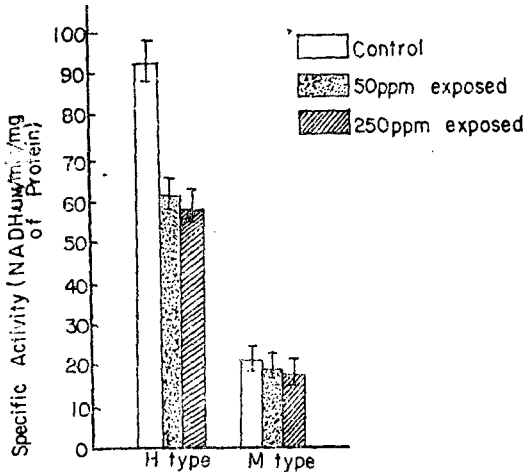
(Mean±SE)

及 17.0±1.0μM/min/mg으로 거의 活性의 變化는 없었다. (第5圖)

第3表 및 第6圖와 같이 心臟組織에 있어서는 腦組織과 같이 實驗群의 H型의 活性이 對照群에 비해 顯著한 減少를 보였다. (p<0.01) 即 對照群 93.0±4.6μM/min/mg에 비해 實驗群은 60.3±2.8μM/min/mg과 58.6±3.2μM/min/mg으로 各各 35.1%, 36.9%의 減少를 보였다. M型은 對照群 19.9±1.6μM/min/mg, 實驗群 19.2±1.9μM/min/mg, 17.5±2.4μM/min/mg으로 그 活性



第5圖 亞黃酸가스에 의한 腦組織의 LDH-isozyme의 變化

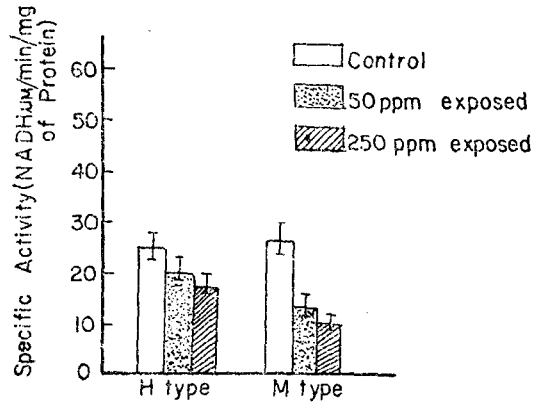


第6圖 亞黃酸가스에 의한 心臟組織의 LDH-isozyme의 變化

의 變化는 볼 수 없었다.

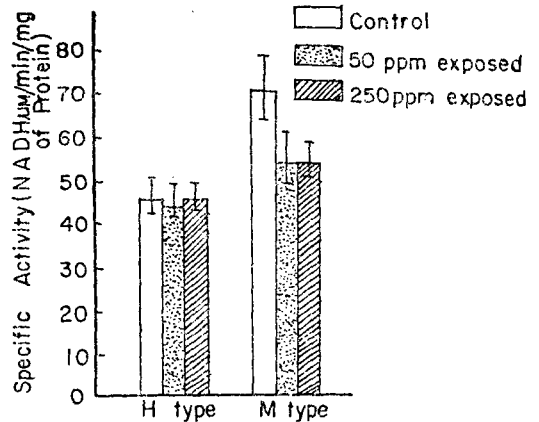
또한 肺組織에 있어서의 變化를 보면 第3表 及 第7圖에서와 같이 H型에 있어서는 對照群  $24.7 \pm 2.2 \mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ 에 비해 實驗群  $19.8 \pm 1.7 \mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ 과  $17.4 \pm 0.9 \mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ 으로 각기 19.8%와 29.5%의 減少를 보였고( $p < 0.01$ ), M型에 있어서는  $26.2 \pm 2.0 \mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ 에 비해 實驗群  $13.8 \pm 0.7 \mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ 과  $9.8 \pm 0.6 \mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ 으로 각기 47.3%와 58.8%의 減少를 보였었다( $p < 0.01$ ) LDH의 두 isozyme中에서 M型的 活性低下가 더욱 컸다.

한편 大腿筋組織에서는 H型的 活性은 對照群과 實驗群이 각기  $44.5 \pm 2.1 \mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ ,  $43.0 \pm 27 \mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ 及  $44.3 \pm 2.5 \mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ 으로 亞黃酸가스에 의한 影響



第7圖 亞黃酸가스에 의한 肺組織의 LDH-isozyme의 變化

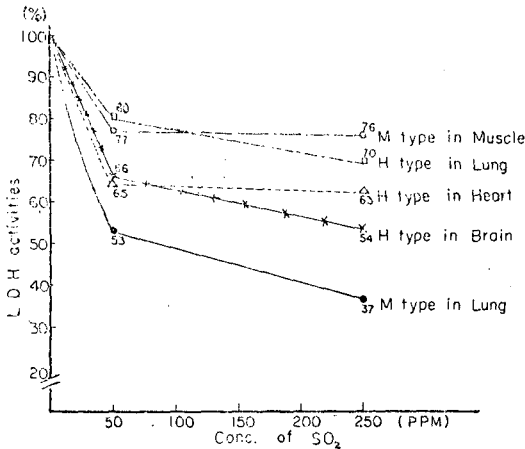
은 別로 볼 수 없었으나 M型에 있어서는 對照群  $69.7 \pm 5.2 \mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ 에 비해 實驗群이  $53.6 \pm 3.3 \mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ 及  $53.1 \pm 2.9 \mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ 으로 顯著한 活性의 低下를 보였었다( $p < 0.01$ ), 이들은 각기 23.1%와 23.8%의 活性 低下였었다(第8圖).



第8圖 亞黃酸가스에 의한 大腿筋組織의 LDH-isozyme의 變化

亞黃酸가스에 의한 各 組織의 LDH Isozyme 活性의 低下率은 第9圖와 같이 肺組織의 M型的 活性이 제일 甚하였고 다음 腦組織의 H型和 心臟組織의 H型이, 그리고 肺組織의 H型和 大腿筋組織의 M型的 順이었다.

또한 肺組織의 H 및 M型和 腦組織의 H型은 亞黃酸가스의 濃도에 따라 比例적으로 그 活性이 低下되었으나 心臟組織의 H型 및 大腿筋組織의 M型은 亞黃酸가스濃度 50ppm에서 最高의 活性低下率을 나타내었다.



第9圖 亞黃酸가스에 의한 組織의 LDH活性 低下率

C. 亞黃酸가스가 LDH酵素系에 미치는 影響

直接 高濃度의 亞黃酸가스(1%)에 依해서는 NAD<sup>+</sup>에 미치는 影響이 顯著하였으나 LDH에 미치는 影響은 疑問視된다. 이때 그 活性의 低下는 LDH를 處理한 過量의 亞黃酸가스가 NAD<sup>+</sup>에 作用한 것으로 보인다. 低濃度의 亞黃酸가스(64ppm 以下)가 LDH 及 NAD<sup>+</sup>에 直接 미치는 影響은 보이지 않는다(第4表).

第4表 亞黃酸가스의 LDH 및 그 Coenzyme에 미치는 影響

Method of Treatment Conc. of SO <sub>2</sub> (ppm)	Normal NAD <sup>+</sup> + Normal LDH	NAD <sup>+</sup> Treated + Normal LDH	Normal NAD <sup>+</sup> + LDH Treated	NAD <sup>+</sup> Treated + LDH Treated
10,000	100.0	4.4	56.7	3.7
640	100.0	81.2	92.3	—
64	100.0	95.3	100.0	—
6.4	100.0	97.6	100.0	—
0.64	100.0	100.0	—	—

따라서 生體에 亞黃酸가스가 미치는 影響은 LDH나 그 助酵素에 直接 미치는 것이 아닌 것으로 推測된다.

IV. 考 按

炭水化物代謝에서 好氣性 및 嫌氣性狀態에 많은 影響을 받는 LDH는 Markert와 Möller(1959)에 依해 multiple form으로 存在한다는 것이 밝혀지고 이들은 性質이 다른 2型의 isozyme(H型 及 M型)으로 이루어진다는 것

이 Kaplan(1962) 등에 依해 證明되었다. Cahn(1962-63) 등은 이 LDH 두 isozyme은 서로 다른 物理化學的 性質, 觸媒作用 및 免疫學的 性質을 가지고 있다고 하였고 더욱이 Kaplan (1962-63) 등은 이들은 각기 다른 遺傳因子에 依해 그 生合成이 支配된다고 報告하였다. 또한 Markert(1963) 등과 權(1968)은 이들 두 LDH는 生物의 種과 器管에 따라 特異的으로 存在한다고 하였고 Vesell(1964) 등은 그 基質의 影響에 關하여서 H型은 基質인 pyruvate의 3×10<sup>-4</sup>M 濃度 以上에서 그 活性이 抑制를 받으며 M型은 高濃度의 pyruvate 1×10<sup>-2</sup>M 以上에서 그 活性이 抑制된다고 報告하였다. 또한 Pesce (1964)는 酸素分壓에 關하여서 H型은 好氣的으로 作用하는 反面 M型은 嫌氣的으로 作用한다고 하였다. 그리고 Cahn (1962) 등은 두 isozyme은 各 組織에 特異的으로 알맞게 配合體를 이루어 5個의 subunit로 되어 各 組織의 特性을 나타낸다고 報告하였다.

白鼠 各 組織의 正常 LDH 두 isozyme의 活性은 權(1968)의 cellulose acetate strip上에 電氣泳動 結果 나타난 組織化學的 結果와 大體로 一致하였다. 即 心臟 組織에서는 H型이 M型의 活性보다 優勢하였고 大腿筋 組織에서는 M型의 活性이 보다 優勢하였다. 이러한 現象은 酸素分壓이 높은 好氣性 組織에서는 H型의 活性이 優勢한 反面에 酵素分壓이 比較的 낮은 嫌氣性 組織에서는 M型의 活性이 優勢하다는 것을 立證하여 준다.

그러므로 energy 代謝에서 繼續的으로 pyruvate가 酸化되는 心臟과 같은 組織에서는 H型이 優勢하게 作用되어 好氣性 炭水化物代謝 過程을 促進的으로 進行維持할 것이며 筋肉組織과 같이 急速히 短時間內에 energy 放出이 要求되는 組織에서는 比較的 嫌氣的 條件下에서 energy 를 生産하여야 하므로 LDH가 과잉의 pyruvate 濃度에 그 活性이 抑制當하지 않는 M型이 作用하여 lactate로 還元하여 E. M. P.代謝 經路로 glycolysis를 維持할 것이다.

腦組織에서의 H型이 優勢한 것은 酸素分壓이 높은 好氣的 組織이라고 思料된다.

肺組織은 氣管枝를 通하여 外部로 부터 直接空氣를 呼吸하는 器管이므로 酸素의 分壓이 높은 好氣性 組織이라고 생각되어 H型의 活性이 優勢할 것이다 豫測하였으나 H型의 活性은 約 48.6%, M型의 活性은 約 51.4%로 H型의 優勢를 認定할 수 없었다. 그리고 肺의 LDH 活性은 他組織에 比해 弱하였다. 이러한 現象은 權(1968)의 報告에서도 言及한 것으로 LDH isozymogram에서도 LDH<sub>1</sub>, LDH<sub>2</sub>, 및 LDH<sub>3</sub>의 存在를 發見치 못하였고 LDH<sub>4</sub>와 LDH<sub>5</sub>만을 認定하였다. 따라서 肺組織

의 Energy代謝에 있어서는 그 好氣性和 關聯하여 앞으로 더욱 研究해야 할 것이다.

Koen(1967) 등에依하면 LDH는 5個의 subunit가 各已 두 isozyme으로 適當한 配合으로 tetramer를 이루고 各 subunit는 더욱 分化된 subunit로 이루어진다고 하였고 더욱이 이 分化된 各 subunit들은 두 isozyme인 H型 및 M型의 高른 分布로서 이루어지지 않고 生物體의 種마다 臟器마다 特異的으로 出現한다고 하였다. 따라서 電氣泳動에 나타난 LDH-isozyme의 subunit의 分布로서 두 LDH-isozyme의 分布를 알기 어려우며 더욱이 各已 subunit의 機能이 確實히 다르므로 mitochondria 및 cytoplasm에서 일어나는 energy代謝 即 各 臟器의 細胞內에서의 炭水化合物代謝過程이 特異的으로 好氣的 또는 嫌氣的으로 일어나는 것을 分別키 어렵다.

그러므로 有毒가스의 一種인 亞黃酸가스가 炭水化合物代謝 過程中 이러한 LDH 두 isozyme에 미치는 影響을 알기 爲하여 白鼠 各 臟器에서 LDH의 H型和 M型을 DEAE-cellulose로 分離하고 各已 그 活性을 測定하여 各 組織 LDH中の 總 H型和 M型の 比較活性으로서 對照群과 比較하였다.

腦及 心臟組織에서는 H型的 活性만이 抑制되는 反面 M型的 活性이 優勢한 大腿筋組織에서는 M型的 活性만이 抑制되는 傾向을 볼 수 있었다. 이러한 現象은 亞黃酸가스가 好氣的인 組織에서는 H型을, 嫌氣性인 組織에서는 M型的 活性에 特異的으로 影響을 미친다고 생각된다.

亞黃酸가스가 各 臟器中の LDH 두 isozyme의 한쪽만 選擇的으로 그 活性에 影響을 미치는 것을 보면 이것은 LDH 總活性의 低下를 말하며 이는 生體가 다른 補償作用을 못할 境遇에 總 energy代謝에 低下를 가져와 正常機能의 維持에 困難을 招來할 可能性이 있다고 생각된다.

더욱이 本 研究 結果 亞黃酸가스가 酵素系 即 LDH 自體 또는 그 coenzyme NAD<sup>+</sup>에 直接 作用하지 않는 것을 생각할 때에 酵素系 以前, 酵素의 生合性을 支配하는 各各의 다른 遺傳因子 또는 酵素系의 機能을 左右하는 因子에 미쳐서 間接的으로 오는 影響이라 생각된다. 따라서 앞으로 亞黃酸가스가 酵素系에 影響을 미치는 因子의 究明과 이 因子의 變化에 依해 酵素系뿐만 아니라 다른 新陳代謝에 미치는 影響과 그 補償作用을 더욱 追求해야 할 것이다.

### V. 結 論

白鼠의 亞黃酸가스急性中毒時의 組織酵素系中 lactic

dihydrogenase의 isozyme에 미치는 影響을 調查하기 爲하여 體內實驗으로는 50ppm 및 250ppm의 亞黃酸가스에 實驗動物을 露出시킨 後 各 組織에 對하여 LDH 두 isozyme을 DEAE-cellulose로 分離하고 各各의 活性變化를 觀察하였고, 亞黃酸가스가 直接 LDH 또는 그 coenzyme에 미치는 影響을 알기 爲하여 純粹 分離한 lactic dehydrogenase와 NAD<sup>+</sup>를 各各 試驗管內에서 亞黃酸가스와 作用시키고 LDH의 活性으로 그 影響을 觀察하여 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. 正常 쥐에서의 LDH活性은 腦 및 心臟組織에서는 H型이 優勢하고 大腿筋組織에서는 M型的 活性이 優勢하였다.
2. 肺組織에서는 LDH의 H型和 M型的 活性에 큰 差가 없었으며 그 活性도 他組織에 比해 弱하였다.
3. 亞黃酸가스에 露出된 쥐의 腦組織과 心臟組織에서는 LDH H型的 活性이 抑制되었으나 大腿筋組織에서는 M型的 活性이 抑制되었다.
4. 한편 肺組織에 있어서는 LDH의 H型 및 M型 모두 그 活性이 抑制되었으며 H型보다 M型的 活性이 더욱 抑制되었다.
5. 64ppm 以下의 亞黃酸가스濃도에 있어서는 LDH及 그 coenzyme(NAD<sup>+</sup>)는 直接的 影響을 받지 않는다.

### 參 考 文 獻

1. Balchum, D. J., Dybick, J., and Meneely, G. R.: *The Dynamics of Sulfur Dioxide Inhalation. Arch. Industrial Health.* 21: 564, 1960.
2. Bergmeyer, H. U., Bernt, E., and Hess, B.: *L-lactic Dehydrogenase. Methods of Enzymatic Analysis.* 736-743, 1963.
3. Buckley, R. D., and Balchum, O. J.: *Effects of Nitrogen Dioxide on Lactic Dehydrogenase Isozymes. Arch. Environ. Health.* 14:424, 1967.
4. Buckley, R. D., and Balchum, O. J.: *Enzyme Alterations Following Nitrogen Dioxide Exposure. Arch. Environ. Health.* 14: 687, 1967.
5. Cahn, R. D., Kaplan, N. O., Levine, L., and Zwillling, E.: *Nature and Development of Lactic Dehydrogenase. Science.* 136: 962, 1962.
6. 鄭勇, 孫仁培, 張承壁, 尹明照, 權肅杓: 各種 車輛의 排氣가스에 關한 調查研究. *現代醫學* 7:572, 1967.
7. 鄭淳東; 實驗動物의 生理(資料). *航空醫學* 9:1, 1961.



8. Dawson, D.M., Goodfriend, T., L., and Kaplan, N.O. : *Lactic Dehydrogenases. Functions of the Two Types. Science.* 143: 929, 1964.
9. Folin, O., and Ciocaltheau, V. : *Tyrosine and Trypto-phane Determinations in Proteins. J. Biol. Chem.* 73: 627, 1927.
10. Garland, R.C., and Kaplan, N.O. : *Salt-Induced Alteration of D(-) Lactate Dehydrogenase from Polysphondylium Pallium. Biochem. and Biophys. Communicatiions.* 26: 679, 1967.
11. Hogenhoom, G.H. : *Methods in Enzymology. Fractination of Cell Components of Animal Tissues. Academic Press. Inc. New York.* 1: 16, 1955.
12. Kaplan, : *Multiple Forms of Enzymes. Bact. Rev.* 27: 155, 1963.
13. Kearney, E.B., and Singer, T.P. : *Studies on Succinic Dehydrogenase. J. Biol. Chem.* 219: 963, 1956.
14. Kilroe-Smith, T.A., and Breyer, M.G. : *Changes in Activities of Respiratory Enzymes in Lungs of Guinea Pigs Exposed to Silica Dust. J. Indust. Med.* 20: 243.
15. Koen, A. L. : *A Tissue-Specific Shift in Lactic Dehydrogenase Sub-Band Patterns of the Mouse Bio-chem. Biophys. Acta.* 140: 480, 1967.
16. Koen, A.L. : *Lactic Dehydrogenase Isozyme Sub-Bands; New Bands Derived from Isolated Sub-Bands. Biochem. Biophys. Acta.* 140:496, 1967.
17. Kwon, S.P. : *A study on the Isozymic Alterations of Lactic Dehydrogenase in the Tissues of Rats Following Sulfur Dioxide Exposure. J. of the Pharm. Soc. of Korea.* 13, 101, 1969
18. Lowry, O.H., Rosecrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. : *Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. J. Biol. Chem.* 193: 265, 1951.
19. Markert, C.L., and Møller, F. : *Multiple Forms of Enzymes, Tissue Autogenetic and Species Specific Patterns. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* 45: 753, 1959.
20. Markert, C.L., in Locke, M. (Editor): *Twenty-first Symposium for the Society for Study of Development and Growth. Academic Press Inc. New York.* p. 63, 1963.
21. Neilands, J.B. : *Methods in Enzymology: Lactic Dehdrogenase of Heart Muscle. Academic Press Inc. New York.* 1: 449, 1955.
22. Pesce, A., Mckay, R. H., Stolzenbach, F., Cahn, R.D. and Kaplan, N.O. : *The Comparative Enzymology of Lactic Dehydrogeuase. J. Biol. Chem.* 239: 1753, 1964.
23. Pesce, A., Fondy, T.P., Stolzenbach, F., Castillo, F., and Kaplan, N. O. : *The Comparative Enzymology of Lactic Dehydrogenases III, Properties of the H<sub>4</sub> and M<sub>4</sub> Enzymes Form A Number of Vertebrates. J. Biol. Chem.* 242: 2151, 1967.
24. Ressler, N., and Tuttle, C. : *Significance of Sub-Bands of Lactic Dehydrogenase Isozymes. Nature.* 210: 1968, 1966.
25. Rutenburg, A.M., Gefstein, R., and Seligman, A.M. : *Preparation of New Tetrazolium Salt which Yields Blue Pigment on Reduction and its use in Demonstration of Enzymes in Normal and Neoplastic Tissues. Cancer Res.* 10: 113, 1950.
26. Smithies, O. : *Zone Electrophoresis in Starch Gels; Variations in the Serum Protein of Normal Human Adults, Biochem. J.* 61: 629, 1955.
27. Stockinger, H.E. : *Respiration. Edited by Fenn, W.O., and Rahn, H. American Physiological Society, Washington, D.C.* 2: 1067, 1965.
28. U. S. Deapartment of Health, Education, and Welfare Public Health Service: *Selected Methods for the Measurement of Air Pollutants 1967 ed.*
29. Vesell, E. S. : *Lactate Dehydrogenase Isozymes; Substrate Inhibition in Various Tissues. Science.* 1950: 1590, 1965.
30. Wilson, A.C., Cahn, R.D., and Kaplan, N.O. : *The Functions of the Two Forms of Lactic Dehydrogenase in the Breast Muscle of Birds. Nature.* 197: 331, 1963.
31. 尹明照, 李連遇, 鄭炳贊, 孫得明, 尹忠燮, 權肅杓; 서울市內 主幹道路邊 空氣汚染과 騒集에 對한 調査研究, 現代醫學 7:37, 1967.

