

各種動物組織 및 癌組織의 LDH isoenzyme 및 RNase, RNase inhibitor 活性에 關한 研究

Studies on LDH isoenzymes, RNase and RNase inhibitor activities in varying animals including parasites, and cancer tissues

서울大學校 醫科大學 生化學教室

李 基 寧 · 朴 相 哲

I. 序 論

分子生物學의 發達에 따라 生命現象의 究明에 關한 많은 研究가 活潑하게 展開되고 있으며, 特히 遺傳情報機構인 核酸과 生體機能單位體인 蛋白質의 分野에 있어서는 이미 龐대한 業績이 報告되어 있다. 이러한 核酸과 蛋白質은 모든 生物體에 共通되는 것으로 生物의 系統發生學의 差異뿐만 아니라, 生體周圍環境의 變移에 따른 適應의 異變等을 分子 level에서 볼 수 있을 것이며 이미 여러 측면에서 探究되어 있는 것은 周知의 事實이다.

本 實驗에서는 生物의 核酸 및 蛋白質代謝 調節에 重要な 役割을 하는 것으로 믿어지는 RNase (ribonucleic acid hydrolase)와 生物細胞呼吸 및 에너지生成에 重要な 調節機能을 갖는 LDH (lactate dehydrogenase)를 選擇하여 여러 種類의 動物, 特히 軟體動物과 魚類등의 冷血動物을 主要對象으로하여 肝 또는 肝脾組織 및 筋肉組織에 있어서의 活性도와 그 抑制劑에 對한 影響 및 電氣泳動分劃相等에 關하여 比較하고, 아울러 2種의 寄生蟲 및 그 宿主組織 그리고 또 2種의 人體癌組織과 그 對照組織과의 差異等도 比較檢討한 것이다.

한편 RNase는 RNA(리보核酸)의 分解酵素로 活性의 最適 pH에 따라 acid RNase와 alkaline RNase로 구분하며, acid RNase는 주로 lysosome 分劃속에 다른

acidhydrolase와 같이 들어있고, alk. RNase는 cytoplasmic RNA와 密接한 關係에 있으며^{1,2)}, 特히 alk. RNase는 組織上澄液에 存在하는 alk. RNase inhibitor라는 物質에 依해 抑制되어 있다하며,³⁾ 이 inhibitor 物質은 여러 高等動物組織에 두루 存在하여 RNase 活性을 調節하고, 이 物質은 glycoprotein으로 推測되고 있다.^{4,5)} 또한 RNase는 ribosome 또는 mRNA를 不安定狀態에 빠지게하나, supernatant inhibitor에 依해 그 機能이 抑制되어 RNA의 安定化를 期한다.^{6,7,8,9)} 따라서 이러한 RNase의 活性도와 inhibitor의 抑制機能이 動物種類나 生活環境에 따라 變化하리라는 것은 쉽게 理解할 수 있다.

LDH는 乳酸의 脫水素化酵素로서 解糖作用의 終產物인 pyruvate와 lactate間的 酸化還元反應을 촉매하는 酵素로서, 이에 關하여는 여러 方面에서 많은 研究가 報告되어 있다. 特히 LDH는 高等動物의 組織에서 電氣泳動으로 쉽게 여러 分劃으로 分離되며, 이들은 Kaplan, Markert等에 依해 일찌기 2가지의 polypeptide 單位體(H型, M型)가 4個모여 이루어진 hybrid-tetramer임이 밝혀졌고^{10,11,12)}, 또 이들이 動物의 種類 또는 各種組織에 따라, 差異가 있음이 이미 알려졌으며^{13,14,15,16)}, 또 이 酵素는 系統發生學의 및 個體發生學의 差異가 뚜렷하고, 生態學의으로 重要な 差異가 있는 것도 報告되어 있다. 即 低酸素呼吸狀態에서 LDH 活性이 높아지고, 그 isoenzyme 양상도 物理的, 化學的, 또는 免疫學的 面에서 서로 다르다는 事實도 이미 알려졌다.^{16,17)}

* 本研究은 1973年度 文敎部研究費로 施行하였음.

本研究는 上述한 2가지 酵素活性等을 여러種의 動物, 特別히 軟體動物과 魚類等을 主要對象으로 하여 그 筋組織 및 肝組織 또는 肝膵組織에서 調査比較한 것으로, 即 LDH는 全體活性和 電氣泳動으로 分離된 分割相을 比較하고 RNase는 free RNase活性和 그 inhibitor를 抑制한다고 보고된 試藥인 pHMB (para hydroxy-mercury benzoate)를 添加하여 그 抑制양상을 比較觀察하는 한편 牛의 肝과 牛肝에 寄生하는 吸虫間, 그리고 豚小腸과 그곳에 寄生하는 豚蛔虫間에서의 差異點, 아울러 가장 흔한 癌種인 胃癌과 子宮頸部癌의 2種의 癌組織에 對하여 양상을 함께 比較檢討하여 여기 報告하는 바이다.

II. 實驗材料 및 方法

1) 酵素源

各種 海産物들은 釜山 또는 서울 및 仁川市場 등에서 산動物로 구입하였고, 牛肝과 그 吸虫 및 豚小腸과 그 蛔虫은 馬場洞屠殺場에서 屠畜 즉시 求得하였으며, 2種의 癌組織은 서울大學病院手術室에서 手術時 癌組織을 얻은 것으로 또 이 可視癌組織의 周邊으로부터 5cm 이상 밖의 同一 척추組織을 正常(對照) 組織으로 삼아 各各 試料로 하였다.

各動物에서는 求得即時 肝膵臟組織 또는 肝組織과 筋組織을 分離採取하고, 蛔虫에서는 筋組織만을, 肝吸虫은 虫全體를 그대로 使用하였으며 癌組織은 手術場에서 바로 온반하여 곧 處理하였다. 各試料는 即時 0°C에서 Teflon homogenizer 또는 mortar로 冷凍류수를 使用하여 20%(W/V) 組織液으로 homogenize 하였다. 各組織의 homogenize는 0°C에서 20分間 6,000×g로 冷遠沈하여 그 上澄液을 酵素源으로 使用하였다. 本實驗에서는 特別히 言及되지 않는 限, 以下 모두 0°C~4°C에서 實驗한 것이고, 各試料는 대개 3~5例를 取하였으며, 여기서 얻은 實驗値는 거의 비슷하여 平均値를 求한 것으로, 個體의 크기가 몹시 작아 바로 測定이 困難한 試料들은 10餘마리 또는 그 이상을 pool로하여 測定하였다(1例分).

2) LDH 活性測定法

LDH의 全活性은 340nm의 波長으로 固定된 Calbiochem의 Calbiometer로 25°C의 온도로 固定시켜 그 吸光度를 測定하였으며, 本반응은 Neiland 方法²²⁾에 準하였다. NAD還元에 依한 optical density의 增加는 15

초 간격으로 읽어, NADH의 extinction coefficient로 LDH 活性을 算出하였다. LDH의 1 unit는 酵素液 1ml가 1分 동안에還元시킨 NAD의 1 μmole로 定하였다.

3) LDH isoenzyme의 strip 電氣泳動法

LDH의 電氣泳動은 Preston, Briere 및 Batsakis²³⁾ 등의 方法에 따랐으며, Gelman 電氣泳動器具와 Schleichner & Schuell cellulose acetate membrane strip을 使用하였다. 電氣泳動은 strip當 3mA의 電流가 흐르게 하였고, Tris-veronal buffer를 pH 8.6, 이온강도 0.06으로 하고, cellulose strip은 전기영동 4시간전에 미리 pH 8.6, 이온강도 0.03인 Tris-veronal buffer에 담겨두었다가 使用하였고 strip의 陰極에서 3cm 되는 點에 酵素液을 50 μl 정도 spot 하였다. 電氣泳動은 80分間하고, 끝나친뒤, 미리 1.0 M sodium lactate 1 ml, nitrobluetetazolium液(1mg/ml) 3.0 ml, phenazine methosulfatet液(1mg/ml) 0.3 ml, 그리고 10mg의 NAD를 섞어 만든 染色液에 적시어둔 cellulose acetate strip과 重疊시켜 이 strip들을 37°C에서 30分間以上 暗室에서 formazan反應을 惹起시켜 LDH 活性을 可視化시켰고, 이들 strip을 다시 5% 醋酸용액에 20分以上 담구어 formazan反應을 固定시켜 可視화된 靑紫色帶를 Spinco Analytrol densitometer로 測定하여 planimeter로 積分하여 LDH各isoenzyme 分割의 活性을 算出하였다. 또 LDH 電氣泳動分割相의 對照群으로 白鼠心筋組織을 使用하였다.

4) RNase와 그 inhibitor 活性의 測定法

Free RNase의 活性은 Roth 方法²⁴⁾을, 全 RNase 活性은 Little과 Meyer 法²⁵⁾, 그리고 RNase inhibitor 活性은 Gribnau 法²⁶⁾에 準하였고, 基質인 RNA는 Vischer & Chargaff 法²⁶⁾에 따라 精製하였다.

RNase inhibitor 測定을 위한 RNase의 농도는 Sigma 製의 bovine pancreatic RNase에 gelatin을 섞어 0.05 μg/ml로 하였고, pHMB는 Tris-HCl buffer에 2mM 농도의 溶液으로 使用하였다.

Free RNase의 活性을 測定하기 위하여 0.2 ml 酵素液을 0.3 ml Tris-HCl buffer로 희석하였으며 全 RNase의 活性測定을 위해 0.2 ml 酵素液에 0.1 ml의 Tris-HCl buffer液과 0.2 ml의 pHMB液을 섞었고, RNase inhibitor 測定을 爲해서는 0.2 ml 酵素液에 0.2 ml Tris-HCl buffer와 0.1 ml의 RNase液을 加하였다.

위와같이 處理한 後 0°C에서 20分間 incubate 시킨

Table 1. activities LDH of hepatopancreatic (or liver) tissues from varying species of animals.

Sample	Total activity	Total protein	Specific activity	Isoenzyme distribution pattern (%)				
	$\mu\text{M}/\text{ml}$	mg/ml	unit/mg-protein	1	2	3	4	5
Stichopus japonicus 해삼	0.020	16.67	0.0012					
Haliotis gigantea discus Reeve 전복	0.016	30.56	0.0005					
Turbo cornutus 소라	0.020	47.42	0.0004					
Venericardia coreensis 피조개	0.020	42.40	0.0005					
Corbicula orientalis 바지락이	0.050	42.95	0.0012					
Meretrix lamarki 대합	0.080	35.75	0.0022					
Viviparus japonicus 우렁	0.050	79.56	0.0006					
Octopus vulgaris 낙지	0.240	24.00	0.0010					
Penaeus orientalis 새우	0.260	70.00	0.0037					
Eriocheir japonicus 게	0.520	58.00	0.0090					
Cynthia roretzi 우렁쉥이	0.100	88.49	0.0011					
Anguilla japonica 뱀장어	0.900	23.50	0.0383		38.6	13.3	48.2	
Carassus auratus 붕어	16.680	28.20	0.6612			38.6	24.1	37.3
Cyprinus carpio 잉어	21.701	38.69	0.5620	1.1	11.1	13.4	28.4, 29	17.0
Ophicephalus argus 가물치	0.725	68.50	0.0106		5.3	7.6	14.4	31.6, 38
Misgurnus fossils 미꾸라지	10.460	52.65	0.1987			1.7	86.5	11.8
Amyda japonica 자라	0.644	13.40	0.0496			10.0	80.0	10.0

다음 각 試料에 0.2ml RNA 를 加하고 30°C 時에서 45 분간 다시 incubate 시킨 後 各試料에 0.7ml 의 acid-alcohol 液을 添加하여 酵素反應을 中止시키고 10分間 0°C 下에서 International Refrigerating Centrifuge (PR II) 로 2,400 RPM 으로 冷速沈하였다. 速沈된 試料의 上澄液을 蒸溜水로 5배 희석하여 U. V. Spectrophotometer Hitachi-124로 260nm 에서 測定하였다. RNase 活性의 1mU 는 對照群과 酵素群에서의 O. D. 差가 0.001 일 때로 定義하였고⁷⁾ RNase inhibitor 活性의 1 unit 는 標準狀態下에서 0.005 μg RNase 의 活性을 50% 억제 시킨 酵素量으로 定義하였다.²⁵⁾

5) 蛋白質定量法

단백질 定量은 Lowry 方法^{27), 28)} 에 따랐으며, 표준 곡선은 micro-Kjeldahl 法으로 牛血清 albumin (Nutritional Biochem. Co.) 을 使用하여 決定하였다.

III. 實驗結果

1) 各種動物의 肝 및 筋組織의 LDH 및 RNase 活性

(a) LDH 의 比活性과 그 isoenzyme 分劃相

LDH 의 단위 蛋白質當 比活性度를 比較한 全 LDH 活性度는 各種動物의 肝組織 또는 肝膵組織에서는 Table 1 과 같이 軟體動物群에서 극히 낮고 甲殼類에서는 이보다 약간 높았으나 이에 反하여 魚類에서는 상당히 높았다. 그러나 脊索動物인 우렁쉥이는 오히려 節足動物인 甲殼類보다 낮은 것이 특징이다. 또한 電氣泳動의 移動度 및 分離양상을 보면 軟體動物에서는 isoenzyme 들이 上記 實驗條件에서는 分離가 잘되지 않았으며, 다만 전복의 肝膵組織에서 약간 分離 되었을 뿐이다. 魚類에서는 比較的 分離가 되었으나 포유류에서와 같은 깨끗한 5 band 의 分離相이 아니고 tailing 이 심하였다. 興味있는 事實은 뱀장어類에서 LDH-2 equivalent band 가 LDH-3 equivalent band 보다 더 强하게 나왔고 잉어類에서는 上記條件에서 5 band 分離相이 아닌 6 band 가 나온 例가 많았고, 爬虫類인 자라에서는 LDH-4 equivalent 가 가장 뚜렷하였다. 哺乳類에서는 典型的인 5 band 의 肝 LDH isoenzyme 양상을 보였다.

한편 各種動物의 筋組織에서 본 LDH 의 양상은 Table 2 와 같이 軟體動物群에서 역시 活性이 낮았으나 全般적으로 肝組織에서 보다는 若干 높은 値를 보이고 進化系統樹의 上位部로 갈수록 全 LDH 活性은 증가하

Table 2. LDH activities of muscle tissues from varying species of animals.

Sample	Total activity	Total protein	Specific activity	Isoenzyme distribution (%)				
	$\mu\text{M}/\text{m}^l$	mg/m^l	$\text{unit}/\text{mg. protein}$	1	2	3	4	5
Stichopus japonicus 해삼	0.320	28.77	0.0111					
Haliotis gigantea discus Reeve 전복	0.113	41.35	0.0027					
Turbo cornutus 소라	0.030	40.87	0.0007				78.5	21.5
Venericardia coreensis 꾀조개	0.064	29.95	0.0021					
Corbicula orientalis 바지락이	0.050	27.20	0.0022					
Meretrix lamarki 대합	0.130	24.00	0.0054					
Viviparus japonicus 우렁	0.160	76.17	0.0021					
Octopus vulgaris 낙지	0.210	30.30	0.0069		32.8	7.7	59.6	
Penaeus orientalis 새우	0.630	18.05	0.0349					
Eriocheir japonicus 게	0.130	11.80	0.0110					
Cynthia roretzi 우렁쟁이	0.640	50.16	0.0128					
Anguilla japonica 뱀장어	2.270	8.75	0.2594		29.5	24.6	45.9	
Carassus auratus 붕어	14.80	4.20	3.5238	76.1		16.4	2.6	4.9
Cyprinus carpio 잉어	36.28	12.02	3.2362	15.7	33.0	25.9	25.1	
Ophicephalus argus 가물치	17.39	12.80	1.3582	3.0	3.0	26.4	67.6	
Misgurnus fossilis 미꾸라지	19.32	10.25	1.8850				25.6	74.4
Amyda japonica 자라	9.66	4.06	2.3952				6.7	93.3

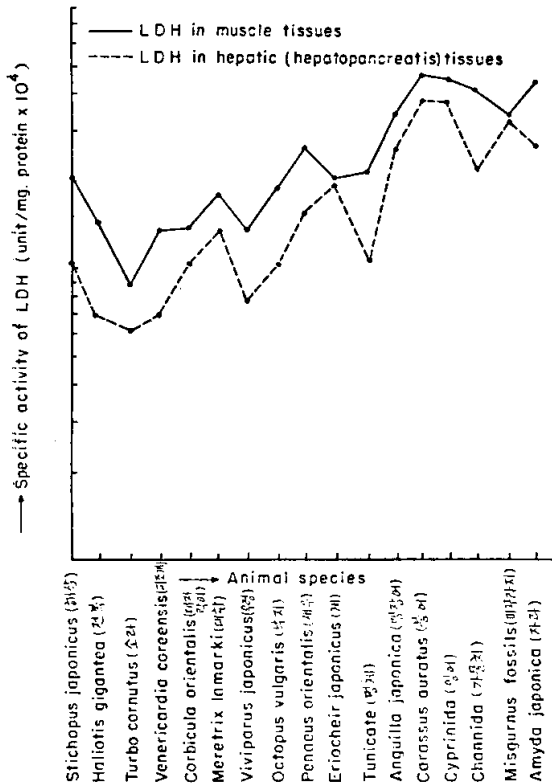


Fig. 1. Phylogenetic profile of specific activities of LDH in hepatic and muscle tissues from varying animals

는 傾向이다. (Fig. 1) 또한 電氣泳動相으로 보면 筋組織에서 肝組織 보다 뚜렷한 分劃相을 나타냈고 특히 肝 또는 肝膵組織에서 잘 分離되지 않았던 軟體動物의 LDH isoenzyme 둘도 筋組織에서는 比較의 分離가 잘되었다. 그러나 게, 새우 등의 甲殼類에서는 LDH isoenzyme의 分離양상이 뚜렷하지 않았으며, 魚類에서는 分劃이 깨끗하였으나 爬蟲類인 자라의 筋組織에서는 LDH-4의 活性이 가장 뚜렷하다.

(b) RNase 및 RNase inhibitor 活性

各種動物의 肝組織 또는 肝膵組織 및 筋肉組織의 free RNase 와 total RNase 活性은 Table 3 및 Table 4에 表示한 바와 같다. 即 動物은 進化함에 따라 free RNase 活性值가 약간 上昇하는 傾向이 있는듯 하나 確實치 않다. 같은 目的의 動物, 特別히 軟體動物의 各目에서는 그 變動이 심하고 또 軟體動物에 있어 total RNase 活性이 free RNase 活性值보다도 훨씬 낮다는 것이 또한 特異하다. 即 pHMB를 利用한 RNase inhibitor complex의 inhibitor 變性を 통한 RNase 活性增加(total RNase 活性)가 軟體動物에서 오히려 그 反對現象을 나타냈음은 後述하는 바와 같이, 蛋白質 복합체인 RNase 및 그 inhibitor system의 種에 따른 差異를 想像케 한다.

2) 宿主組織과 寄生蟲間의 LDH 및 RNase의 活性 比較

Table 3. RNase activities of hepatopancreatic or liver tissues from varying species of animals.

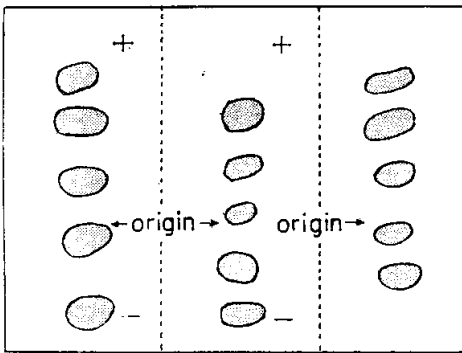
Sample	Total protein	Free RNase	Total RNase
	mg/ml	mU/mg	mU/mg. protein
<i>Stichopus japonicus</i> 해삼	16.67	661.37	283.44
<i>Haliotis gigantea</i> discus Reeve 전복	30.56	62.99	78.20
<i>Turbo cornutus</i> 소라	47.42	512.97	424.40
<i>Venericardia coreensis</i> 피조개	42.40	82.95	28.89
<i>Corbicula orientalis</i> 바지락이	42.95	142.61	28.52
<i>Meretrix lamarki</i> 대합	35.75	112.59	56.78
<i>Viviparus japonicus</i> 우렁	79.56	260.43	274.98
<i>Octopus vulgaris</i> 낙지	24.00	269.79	204.17
<i>Penaeus orientalis</i> 새우	70.00	242.50	297.50
<i>Eriocheir japonicus</i> 게	58.00	313.76	252.24
<i>Cynthia roretzi</i> 우렁쟁이	88.49	53.40	71.19
<i>Anguilla japonica</i> 뱀장어	23.50	67.02	83.40
<i>Carassus auratus</i> 붕어	28.25	148.67	180.53
<i>Cyprinus carpio</i> 잉어	38.69	179.12	189.46
<i>Ophicephalus argus</i> 가물치	68.50	221.24	245.18
<i>Misgurnus fossils</i> 미꾸라지	52.65	243.63	267.90
<i>Amyda japonica</i> 자라	13.40	1358.21	1397.39

Table 4. RNase activities of muscles from varying species of animals.

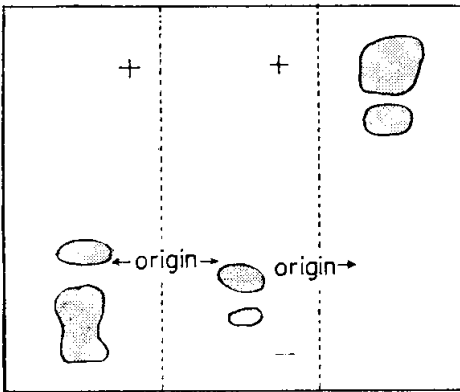
Sample	Total protein	Free RNase	Total RNase
	mg/ml	mU/mg	mU/mg. protein
<i>Stichopus japonicus</i> 해삼	28.77	62.04	122.04
<i>Haliotis gigantea</i> discus Reeve 전복	41.35	81.26	12.70
<i>Turbo cornutus</i> 소라	40.87	42.82	—
<i>Venericardia coreensis</i> 피조개	29.95	35.06	58.43
<i>Corbicula orientalis</i> 바지락이	27.20	128.68	25.06
<i>Meretrix lamarki</i> 대합	24.00	51.04	58.04
<i>Viviparus japonicus</i> 우렁	76.17	70.30	82.01
<i>Octopus vulgaris</i> 낙지	30.30	284.16	261.35
<i>Penaeus orientalis</i> 새우	18.05	333.52	581.72
<i>Eriocheir japonicus</i> 게	11.80	142.37	201.69
<i>Cynthia roretzi</i> 우렁쟁이	50.16	143.04	198.86
<i>Anguilla japonica</i> 뱀장어	8.75	40.00	56.00
<i>Carassus auratus</i> 붕어	4.20	791.67	916.67
<i>Cyprinus carpio</i> 잉어	12.02	43.63	101.91
<i>Ophicephalus argus</i> 가물치	12.80	437.50	442.97
<i>Misgurnus fossils</i> 미꾸라지	10.25	324.41	345.92
<i>Amyda japonica</i> 자라	4.05	648.15	1953.09

Table 5. Activities and electrophoretic patterns of LDH of parasites and their host tissues.

Sample	Total activity	Total protein	Specific activity	Isoenzyme distribution (%)				
	$\mu\text{M}/\text{ml}$	mg/ml	$\text{unit}/\text{mg. protein}$	1	2	3	4	5
Cow								
liver	11.270	69.00	0.1633	9.2	46.1	17.2	9.8	17.2
bile duct	1.932	16.25	0.1189	19.0	18.0	26.0	20.0	17.0
liver fluke	0.258	9.35	0.0276	47.7	14.3	4.7	9.5	23.8
Pig								
small intestine	1.288	8.2	0.1524	—	13.3	22.1	26.0	40.0
ascaris	0.580	6.6	0.0879	—	4.8	59.7	35.5	—



Bovine liver tissue Bovine liver fluke Bovine bile duct



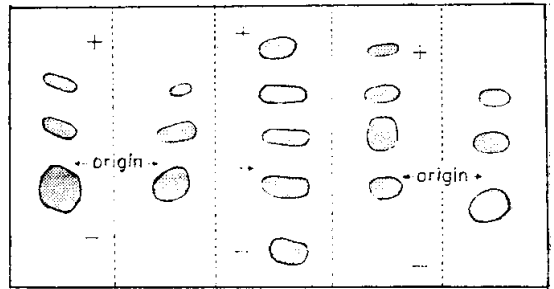
swine small intestine swine ascaris swine heart

(a) LDH의 比活性和 isoenzyme 分劃相

Table 5 및 Fig. 2 과 같이 牛肝組組과 그 膽管內에 寄生하는 肝吸虫間의 LDH를 比較하여 보면 原始動物인 肝吸虫의 LDH 分劃相이 軟體動物등보다 훨씬 더 뚜렷하여, 宿主인 牛의 肝組織과, Fig. 1에서 보는 바와같이, isoenzyme 分劃上에 유사점이 크다. 한편 豚腸管寄生虫인 蛔虫의 筋組織의 LDH는 上記 肝吸虫처럼 뚜렷하지는 않았으나 單下等動物인 甲殼類, 脊索動物 등의 筋組織보다 LDH 活性도 높고 分劃相도 比較的 뚜렷하였다.

(b) RNase 및 RNase inhibitor 活性

Table 6에서 보는 바와 같이 牛肝吸虫은 RNase의 活性에 있어서 單下等動物들보다 훨씬 높은 值를 보이며 RNase inhibitor complex의 양상도 宿主의 肝組織과 pHMB의 影響, inhibitor 活性等에 있어 類似하다고 보



Cervix cancer Cervix control Control rat heart muscle Stomach cancer Stomach control

Fig. 2. Electrophoretic patterns of LDH of 2 species of parasites and their host tissues.

Fig. 3. Electrophoretic patterns of LDH of stomach and cervix cancer tissues.

Table 6. RNase activities of parasites and their host tissues.

Sample	Total protein	Free RNase	Total RNase	*c̄ Pancreatic RNase	Inhibitor activity
	mg/ml	mU/mg. protein	mU/mg. protein	mU/mg. protein	unit
Cow					
liver	60.0	1189.2	1225.7	1214.6	1.11
bile duct	24.5	292.9	688.6	395.7	0.75
liver fluke	34.6	74.8	138.6	128.5	1.30
Pig					
small intestine	8.45	1434.9	1546.1	1343.8	1.06
ascaris	6.60	0	132.5	238.6	0.33

* change of free RNase activity due to the addition of bovine pancreatic RNase (0.05µg/ml).

Table 7. Activities of LDH from 2 kinds of cancer tissues.

Sample	Total activity	Total protein	Specific activity	Distribution of isoenzyme (%)				
	µM/ml	mg/ml	unit/mg. protein	1	2	3	4	5
Stomach control	1.256	4.0	0.310	—	14.3	22.5	63.1	—
Stomach cancer	3.542	5.1	0.687	1.6	1.9	44.5	39.3	12.6
Cervix control	1.932	6.3	0.306	—	—	15.2	21.7	63.0
Cervix cancer	4.831	1.6	3.019	—	3.9	10.5	24.6	61.0

Table 8. RNase activities of 2 kinds of cancer and control tissues.

	Total protein	Free RNase	Total RNase	c̄ Pancreatic RNase	Inhibitor activity
	mg/ml	mU/mg. protein	mU/mg. protein	mU/mg. protein	unit
Stomach control	4.95	3323.2	3818.0	3818	—
Stomach cancer	5.15	2635.9	3704.0	2309	0.43
Stomach cancer*	3.75	3645.0	3702.0	3824	0.06
Cervix control	6.30	2472.0	2972.0	2527	0.17
Cervix cancer	1.60	1800.0	3096.9	1800	0.23

* necrotic tissue of stomach cancer

졌으나, 豚小腸과 그 蛔虫에서는 뚜렷한 類似性은 없고 蛔虫에서는 RNase 活性이 낮고, inhibitor 活性이 높다.

3) 癌組織과 그 對照組織間的 LDH 및 RNase의 活性比較

a) LDH 比活性과 그 isoenzyme 分劃相

Table 7 및 Fig. 3 에서 보는 바와 같이 胃癌組織의

LDH는 對照組織보다 活性이 높았고, 특히 LDH-1 分劃이 뚜렷하였으며, LDH-3, 4分劃도 對照組織에 比하여 높았다. 子宮頸部癌組織에서는 對照組織보다 LDH-4, 5分劃이 뚜렷하였고 全 LDH 活性도 對照群보다 높았다.

b) RNase 및 RNase inhibitor 活性

Table 8 에서 보는 바와 같이 胃癌 및 子宮頸部癌組織

의 RNase 活性은 그 對照值보다 낮고, pHMB 에 依한 抑制實驗結果는 對照值보다 全 RNase 活性이 增加되어 있다. 그러나 一例의 胃癌中 癌壞死組織에서는 free RNase 活性이 높고 inhibitor 活性이 낮은 値를 보였다.

IV. 考 察

棘皮, 軟體, 節足 및 脊椎動物 等の 各動物群에서 本 LDH 의 活性度는 動物이 進化됨에 따라 단위 蛋白質當 活性度가 점차 높아지는 傾向을 보이며(Fig. 3) 牛肝의 寄生虫인 肝吸虫과 豚 蛔虫에서는 LDH 活性度가 오히려 軟體, 節足動物群보다 높았고, 또 電氣泳動으로 本 LDH isoenzyme 分劃相도 棘皮, 軟體動物等과는 달리, 宿主인 哺乳動物의 組織과 類似한 양상을 보임은 興味로운 事實이다, 各種動物의 LDH 活性度를 보던 肝組織 보다는 筋組織에서 더 높고, 낙지, 소라등の一部 軟體動物에서는 그 筋組織에서 2 band 정도의 分劃相을 보였으나, 기타 軟體動物에서는 LDH band 가 spot 된 area 에서 移動이 別로 되지 않은 채 하나의 band 로 묻혀 있었다. 또 脊椎동물인 魚類中에서는 붕어組織의 LDH 活性이 잉어, 가물치 및 미꾸라지 等の 組織보다 높았다.

즉 LDH 는 isoenzyme 인 H型和 M型的 polypeptide 로 構成되어, 이들은 各各 다른 遺傳子에 依해 生成되고²⁰⁾, 物理的, 化學的 또는 免疫學的으로 差異가 있다는 것은 周知의 事實이며^{15), 17), 18), 19), 20), 21)} 이들의 複合體인 LDH 的 個體發生學的 差異도 많이 報告되어 있다^{13), 20)}, Kaplan 等에 依하면 各種動物에 있어서 LDH 的 크기 와 分子量은 거의 變動이 없고, 系統發生學的으로 서로 가까울수록 그 構成아미노산의 組成이 비슷하나, 物理化學的 및 電氣泳動相으로 구분이 된다고 보고 하였다.³¹⁾ 그러나 이들도 지적한 바와 같이 電氣泳動단으로는 올바르게 種間的 差異를 論할 수 없다. 本實驗에서와 같이 比較를 해보면, 軟體動物에 있어서는 LDH 가 不確實한 分離相을 보였으며 魚類에서는 그 分離相이 哺乳類와는 양상이 뚜렷이 다르다. 이는 Chilson 等이 數種의 魚類 筋組織의 LDH 를 가지고 報告한 바와 같이^{32), 33), 34)}, 種의 差異에 따른 구성 peptide 的 組成, 또는 立體構造의 差異等으로 因한 單位體로서 分離不能이라고 볼 수도 있겠으나, 이들 단백질分子와 cellulose acetate strip 間的 結合이 그 組織에 있는 어떤 factor 에 依해 견고하게 되었을 수도 있고, 또는 hybrid 結合이 반드시 tetramer 가 아닐 수도 있을 것이다. 위와

같은 事實에 對해서는 本고실에서 계속 究明中이다. 한편 胃癌과 子宮頸部癌에서 本 LDH 的 양상은 일찌기 Burk, Dickens, Warburg 等이 지적한 바와 같이, 癌組織에서는 低酸素呼吸으로 因한 嫌氣的 解糖作用이 增進되므로 全 LDH 活性이 높다는 事實^{26), 37), 38)}과 符合되며 또한 胃癌에서는 對照群과는 달리 LDH-1이 뚜렷하고, 子宮頸部癌에서도 LDH-4,5 특히 LDH-4 가 對照群보다 뚜렷하다는 事實은 Fountain³⁹⁾이 報告한 바와 一致한다. 그리고 血清內 LDH 가 上記 癌種에서 높다는 事實과 比較해 보면 癌組織 LDH 活性이 높다는 事實은 Widy 등⁴⁰⁾이 보고한 바와 같은 癌組織에서의 LDH 漏出단이 아닌 dedifferentiation 에 依한 enzyme 生成 增加로 말미암은 바라고 생각할 수 있다. 그리고 宿主와 寄生虫間에서 本 LDH 的 양상을 보던 豚蛔虫과 牛肝吸虫等의 寄生虫이 보다 進化된 軟體, 節足動物等에 比하여, 더 높은 全 LDH 活性值를 보이며, 또 isoenzyme 分劃相도 3~5 band 가 뚜렷하여, 宿主組織의 分劃相과 양상이 비슷하다는 點이 興味로운 事實이다. Watson⁴¹⁾이 指摘한 바와 같이 全 LDH 活性은 lumen 에 浮遊寄生하는 豚蛔虫에서 높고, 膽管에 吸着하는 肝吸虫에서 낮다는 事實은 本實驗結果와 一致하나, Watson 은 豚蛔虫이나 牛肝吸虫의 LDH 分劃相에 關하여는 言及한 바가 없으며, 또 寄生虫과 그 宿主動物組織과의 比較도 檢討한 바 없다. 本實驗에서 보는 바와 같이, obligatory anerobic 인 肝吸虫이 facultative anaerobic 인 豚蛔虫보다 LDH-1, LDH-2 type 的 活性이 높다는 것도 興味로운 事實이다.

以上과 같이 寄生虫인 肝吸虫과 豚蛔虫에 있어서 그 LDH 的 分子의 양태가, 더 進化된 軟體 또는 節足動物들 보다 哺乳類인 宿主에 가까와 宿主와 寄生虫間의 密接한 關係를 엿볼 수 있다.

RNase 는 前述한 바와 같이 最適 pH 에 따라 acid RNase 와 alkaline RNase 로 區別되며 生理學的 意義는 alk. RNase 가 더 크다.^{1), 2), 3)} alk. RNase 는 高等動物에 널리 分布되어 있는 RNase inhibitor 에 依해 기능이 억제되는데³⁾ 보통은 이 inhibitor 가 과량으로 存在하여 組織內 RNase 와 結合하여 不活性體를 이룬다고 생각된다.⁴²⁾ 이 inhibitor 는 alk. RNase 와는 달리 극히 不安定하여 SH 試藥의 極少量에도 敏銳하게 反應하여⁴³⁾ 그 作用이 抑制되는데 이러한 性狀이 RNA catabolism 에 支配的 역할을 한다고 생각된다. 動物組織에서 分離된 polyribosome 等은 內因性 RNase 로 말미암아 不安定狀態에 있어, 여기에 supernatant inhibitor 를 加하면 安定되어⁶⁾ 세포내 mRNA 的 安定度를 調節하는 데

도 關與한다고 추측하고 있다. 특히 catabolism 이 旺盛한 phagocyte 등의 細胞에서는 inhibitor 活性이 낮고 RNase 活性이 높다는 사실도 알려졌으며⁸⁾ inhibitor 活性이 낮았던 淋巴球가 phytohemagglutinin 에 의해 blastlike cell 로 變했을 때 inhibitor 活性이 급격히 증가한다는 사실도 報告되었다⁹⁾, 즉 inhibitor/RNase 比率이 높을수록 cytoplasmic RNA 은 增加되고 比率이 낮을수록 RNA 는 catabolism 쪽으로 기울게 되는데, 이러한 사실들을 考慮에 넣어 볼 때 본 實驗에서 본 各種動物의 筋組織 및 肝 또는 肝脛組織의 RNase system 의 양상은 일반적으로 筋組織보다, 肝조직에서 RNase 活性이 높고, 動物이 進化함에 따라, 그 活性이 높아지는 傾向이 있는듯 하지만, 種에 따른 差異가 심하여 系統發生學的 意義는 찾기 어렵다. 특히 軟體動物群에서 볼 때 RNase inhibitor 를 抑制한다는 SH 試藥을 使用하여 組織의 RNase 活性을 增加시키기는 커녕, free RNase 活性值에도 未達하는 値를 보여준 事實을 보면 이러한 下等動物에 있어 SH 試藥인 pHMB 가 오히려 그 組織 RNase 의 抑制, 아니면 RNase inhibitor 作用의 補強等을 想起시키며, 혹은 inhibitor 의 缺如 또는 성질이 아주 判異한 單 特殊物質의 介在等도 考慮할 수 있다. 如何한 軟體動物에서는 哺乳類와는 다른 RNase system 의 RNase 및 inhibitor protein 으로 構成되어 있다고 推測할 수 있으며, 따라서 exogenous bovine pancreatic RNase 를 使用하여 測定한 inhibitor activity score²⁵⁾ 는 軟體動物에서는 意義가 없는 것으로 생각되며, 이러한 下等動物의 RNase 性狀에 關해서는 本 敎室에서 계속 追究中에 있다. 또한 宿主와 寄生蟲間의 關係로 본 RNase system 은 肝吸虫에서 RNase 의 活性이 상당히 높고, 그 inhibitor 活性도 宿主의 膽管보다는 오히려 크며, 肝實質組織보다는 낮다. 豚蛔虫에서는 위의 反對로 腸管筋肉組織보다 蛔虫에서 RNase 活性이 낮고, SH 試藥에 對한 inhibitor 抑制로 全RNase 가 상당히 높은 値를 보였다. 肝吸虫에 있어서 RNase 活性의 SH 試藥에 對한 影響도 다른 下等動物과는 달리 宿主組織과 비슷한 양상을 보여, 寄生蟲이 宿主조직 即 周圍環境에 分子의 適應이 되고 있음을 斷片的으로 示唆하고 있다. 한편 胃癌과 子宮頸部癌의 組織에 있어서 對照組織보다 약간 높은 inhibitor 活性을 보였고, free RNase 는 對照群보다 상당히 낮아 癌組織에서 RNA 의 分解가 抑制되어 따라서, 癌組織의 蛋白質代謝가 더 旺盛한 것으로 推測할 수 있다. 그러나 一例의 胃癌壞死組織에서 測定한 RNase 는 오히려 活性度가 높고, inhibitor 活性이 극히 낮아 Henryk 等⁴⁴⁾이 指摘한 바와 같이 癌

組織도 壞死組織과 增殖部位에 따라 RNase 活性에 큰 差異가 있고, 壞死組織의 RNA 分解가 旺盛함을 認볼 수 있다. 即 細胞環境餘件에 따라 酵素의 性狀에 差異가 있음을 보여 준다.

V. 結 論

棘皮動物 1種, 軟體動物 7種, 節足動物 2種, 脊索動物 1種 및 脊椎動物 6種에 對하여, 各動物의 肝組織(또는 肝脛組織)과 筋組織 및 2種의 寄生蟲과 그 宿主組織, 그리고 2種의 人體癌組織과 그 對照組織에서 各各 LDH 活性 및 그 分割相과 RNase 및 그 inhibitor 活性을 調査 比較하여 다음과 같은 結果를 얻었다.

1. 軟體動物의 全 LDH 活性은 굉장히 낮고 또 그 電氣泳動相에 있어, 哺乳動物에서와 같은 典型的인 isoenzyme 의 分離相은 볼 수 없고, 魚類에서도 哺乳動物과는 달리 isoenzyme 分離相에 tailing 이 甚했다. 또 total LDH 活性은 動物이 進化됨에 따라 점차 높아져가는 傾向을 보였고, 肝組織보다는 筋組織에서 全 LDH 活性이 높았다.

2. 軟體動物에서 본 RNase system 은 脊椎動物과는 달리 SH 試藥인 pHMB 에 依하여 RNase inhibitor 가 抑制되기는 커녕, 全 RNase 活性이 free RNase 活性보다 顯著히 低下되어 오히려 反對現象을 보였고, LDH 와는 달리 筋組織보다는 肝組織에서 그 活性이 높았다.

3. 牛肝吸虫의 LDH 의 電氣泳動에 의한 分割相은 單 下等動物과는 달리, 宿主인 哺乳動物 牛肝조직과 비슷하게, 뚜렷한 5 band 를 보였으나, 全 LDH 活性은 낮았다 또한 豚蛔虫의 筋組織에서 본 LDH 의 分割相은 뚜렷한 2 band 를 보였다. 牛肝吸虫에서의 全 RNase 活性은 宿主인 牛肝組織보다 낮고, RNase inhibitor 活性은 비슷하였다. 豚蛔虫에서는 RNase 의 全活性 및 RNase inhibitor 活性 共히 낮았다. 그러나 2種의 寄生蟲에서는 單 下等動物과는 달리, SH 試藥에 依한 RNase inhibitor 의 抑制가 이루어지고 있다.

4. 癌組織과 그 對照群에서 본 LDH 및 RNase system 에 있어서는 癌組織에 있어서 全 LDH 活性 및 RNase inhibitor 活性이 對照組織보다 더 높고, LDH 電氣泳動相도 癌組織에서 對照群과는 약간 다른, 즉 胃癌組織에서 LDH-1이 뚜렷하고, 子宮頸部癌에서 LDH-4가 對照群보다 높은 양상을 보였다.

ABSTRACT

Studies on LDH Isoenzymes, RNase and RNA Inhibitor Activities in Varying Animals Including Parasites, and Cancer tissues

Ki Yung Lee and Sang Chul Park

*Department of Biochemistry, College of Medicine,
Seoul National University*

The LDH isoenzyme and RNase activities of hepatic or hepatopancreatic and muscle tissues from varying species of animals were studied. The animals examined are 1 species of echinodermate, 7 species of mollusc, 2 species of arthropod, 1 species of chordate and 6 species of vertebrate.

The LDH isoenzymes and RNase activities were also examined on the parasites such as ascaris and liver fluke along with their host tissues with reference to host-parasite relationship, and the same approach was conducted with stomach and cervical cancers, comparing to their control tissues.

The following results were obtained.

1) The total activities of LDH from the hepatopancreatic and muscle tissues of molluscs were extremely low and the electrophoretic patterns of LDH isoenzymes were quite different from those of the equivalent tissues of mammals. The electrophoretic separation of LDH isoenzymes in fishes, was not clear with heavy tailing, as compared to that of mammalian tissues. The specific activities of tissue LDH of animals, seem to increase as animal evolves. The specific activities of muscle LDH were generally higher than those of hepatic or hepatopancreatic tissues.

2) The RNase activity patterns of hepatopancreas and muscle of molluscs were quite different from those of equivalent tissues of mammals.

It is noteworthy that the total RNase activities turned out to be much less than the free RNase activities in sea cucumber and most of molluscs, unlike higher animals, by using SH reagent (PHMB) which is well known to suppress the RNase inhibitor. Thus, SH reagent supposedly inhibited RNase activity or activated RNase inhibitor activity in lower animals in contrast with higher animals. The total RNase activities were generally higher in hepatopancreas or liver than in muscle, contrary to LDH activities.

3) The LDH isoenzymes in bovine liver fluke were

electrophoretically separated into clear-cut 5 bands, in contrast with lower animals, evidencing a close host-parasite relationship. The specific activity of LDH in liver fluke, however, was very low, as other lower animals. The LDH isoenzymes in muscle of swine ascaris was clearly fractionated into 3 bands on electrophoresis, unlike lower animals.

The total RNase activity of liver fluke was much lower than that of host liver, but the RNase inhibitor activity was similar to that of host tissue, and the activities of total RNase and RNase inhibitor in muscle of ascaris were low. It is of interest that SH reagent was proved to suppress the RNase inhibitor, contrary to lower animals.

4) The total activities of LDH and RNase inhibitor activities were higher in stomach and cervical cancer tissues than in their normal control tissues, and the electrophoretic patterns of LDH isoenzymes of these cancer tissues were slightly different from those of the control ones. The LDH-1 fraction was prominent in stomach cancer tissue, and the activity of LDH-4 fraction in cervical cancer tissue was higher than that of control group.

REFERENCES

1. Roth, J.S., *J. Biol. Chem.*, **208**, 181, 1954
2. Reid, E. & Nides, J.T., *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **81**, 618, 1959
3. Roth, J.S., *Biochim. Biophys. Acta.*, **21**, 34, 1956
4. Shortman, K., *Biochim. Biophys. Acta.*, **51**, 37, 1961.
5. Roth, J.S., *J. Biol. Chem.*, **231**, 1085, 1958.
6. Blobel, G. & Potter, V.R., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **55**, 1283, 1966
7. Little, B.W., *Science*, **170**, 747, 1970.
8. Kraft, N. & Shortman, K., *Biochem. Biophys. Acta.*, **217**, 164, 1970.
9. Gribnau, A.A.M., Schoenmakers, J.G.G. & Bloemendal, H., *Arch. Biochem. Biophys.*, **130**, 48, 1969.
10. Kaplan, N.O., *Science*, **131**, 393, 1960.
11. Apella, E. & Markert, C.L., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **6**, 171, 1961.
12. Markert, C.L. & Moller, F., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **45**, 753, 1959.
13. Cahn, R.D., Kaplan, N.O., Levine, L. & Zwilling, E., *Science*, **136**, 962, 1962.

14. Fine, I.H., Kaplan, N.O. & Kuftinec, D., *Biochemistry*, **2**, 116, 1963.
15. Vesell, E.S., *Science*, **150**, 1590, 1964.
16. Vesell, E.S., *J. Exp. Med.*, **116**, 797, 1962.
17. Wuntch, T., Chen, R.F. & Vesell, E.S., *Science*, **169**, 480, 1969.
18. Zondag, H. A., *Science*, **142**, 965, 1963.
19. Hellung-Larsen, P. & Anderson, V., *Exp. Cell Res.*, **54**, 201, 1969.
20. *Nutrition Review*, **24**, 143, 1968.
21. Kaplan, N.O. & Ciotti, M.M., *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **94**, 701, 1961.
22. Neiland, J.B., *J. Biol. Chem.*, **199**, 373, 1952.
23. Preston, J.A., Briere, R.O. & Batsakis, J. G., *Amer. J. Clin. Path.*, **43**, 256, 1965.
24. Roth, J.S. & Milstein, S.W., *J. Biol. Chem.*, **196**, 489, 1952.
25. Gribnau, A.A.M., Schoenmakers, J.G.G., Kraaikamp, M.V., Hilak, M. & Bloemendal, H., *Biochim. Biophys. Acta*, **224**, 55, 1970.
26. Vischer, E. & Chargaff, E., *J. Biol. Chem.*, **196**, 489, 1952.
27. Lowry, O.H., Rosenbrough, N. I., Farr, A.L. & Randall, R.J., *J. Biol. Chem.*, **193**, 265, 1951.
28. Oyama, V.I. & Eagle, H., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **91**, 305, 1956.
29. Rabionowitz, Y. & Dietz, A., *Biochim. Biophys. Acta*, **139**, 254, 1967.
30. Latner, A.L. & Skillen, A.W., *Isoenzymes in Biology and Medicine. Acad. Press*, 1968.
31. Kaplan, N.O., Wilson, A.C., Levine, L., Pesee, A., Reichlin, M. & Allison, W.S., *Federation Proceedings*, **23**, 1258, 1964.
32. Salthe, S.N., Chilson, O.P. & Kaplan, N.O., *Nature*, **207**, 723, 1965.
33. Chilson, O.P., *J. Mol. Biol.*, **10**, 349, 1964.
34. Chilson, O.P., *Biochemistry*, **4**, 271, 1965.
35. Markert, C.L., *J. Exp. Zool.*, **159**, 319, 1965.
36. Burk, D., *Cold Spring Harv. Symp. Quan. Biol.*, **7**, 420, 1939.
37. Dickens, F., *Cancer Res.*, **6**, 57, 1931.
38. Warburg, D., *Biochem. Zeitschr.*, **142**, 317, 1923.
39. Fountain, J. A., *Cancer Res.*, **30**, 998, 1970.
40. Widy, K., *Acta, Cytol.*, **11**, 131, 1967.
41. Watson, J.M., *Med. Helminthol., Acad. Press*, 1960.
42. Roth, J.S., *J. Biol. Chem.*, **231**, 1097, 1958.
43. Shortman, K., *Biophys. Biochim. Acta*, **55**, 88, 1962.
44. Henryk, S., *Cancer Res.*, **31**, 913, 1971.