

만손열두조충에서 젖산탈수소효소와 말산탈수소효소의 분포와 특징

곽기훈, 전은우, 김창환*

경상대학교 자연과학대학 생물학과

초록: 만손열두조충의 스파르가눔(흰쥐에서 적출한 r-스파르가눔, 뱀에서 적출한 s-스파르가눔)과 성충을 재료로 하여 젖산탈수소효소와 말산탈수소효소의 조직내 분포 및 동위효소의 특징을 효소조직화학적 방법과 전기영동법으로 조사하였다. LDH와 MDH는 외피하근층에서 강한 활성이 나타났으며, 실질조직(parenchyma)에서는 약하게 나타났다. 그러나 MDH는 스파르가눔의 외피조직에서도 활성이 나타났으나 성충의 외피조직에는 나타나지 않았다. LDH의 동위효소 유형은 s-스파르가눔, r-스파르가눔과 성충에서 각각 2개, 4개, 2개가 분리되었고, 45 kDa의 분획이 공통적으로 주분획이었으며 MDH의 동위효소는 s-스파르가눔, r-스파르가눔과 성충에서 각각 2개, 3개, 4개의 분획이 분리되었고, IEF에 의해 성충에 존재하는 4개의 MDH 동위효소 분획의 등전점(PI)은 각각 6.0, 6.5, 6.7, 7.1이었으며, 이 중 6.0이 주분획이었다. 또 최적 pH는 7이나 활성 범위가 pH 6~8이었으며, 최적온도는 40°C였으며, 50°C 이상에서는 활성이 급격히 감소하였다. MDH의 최적 활성도는 s-스파르가눔, r-스파르가눔과 성충에서 각각 19.4, 24.5, 108.0이었다. 위의 결과로 보아, 외피하근층으로 흡수된 양분은 충체 중앙으로 이동하면서 산화분해되며 유충에 비해 성충에서 물질 대사가 활발함을 알 수 있고, 또한 만손열두조충의 스파르가눔과 성충이 숙주와 기생 장소를 달리하지만 기생 환경에 따라 젖산탈수소효소와 말산탈수소효소의 동위효소들이 활성을 달리하므로써 숙주 환경에 적응한다는 사실을 알 수 있다.

서 론

만손열두조충을 비롯한 대부분의 조충류는 포도당과 갈락토오스를 주 에너지원으로 호흡대사의 기질로 이용하여 무기호흡을 주로 하면서 임의적으로 유기호흡도 병행한다(Bryant, 1978). 체표를 통해 흡수된 양분의 호흡대사 과정은 일반 고등동물의 조직에서와 유사하게 진행되나 전자전달계를 거치는 지는 분명치 않고 lactate, succinate, acetate, propionate 등의 최종산물이 축적된다는 보고가 있다(Barrett, 1984).

조충류에 있어서의 효소학적 연구는 축소조충을 재료로 한 다수의 보고가 있으나(Logan *et al.*, 1977; Moon *et al.*, 1977), 이 중에 대한 효소학적 연구는 Fukase *et al.*(1984 & 1985)의 가수분해 효소 연구를 비롯하여 몇몇 보고가 있으나 발육에

따른 유충과 성충간의 효소조직화학적 비교 및 동위효소(isozyme)에 관한 연구는 거의 접하지 못한 상태이다. 본 연구에서는 중간숙주와 종숙주간의 기생 부위의 차이와 또 중간숙주 중 번온동물(뱀)과 정온동물(흰쥐)이란 상이한 환경조건에서 발육에 따른 산화환원효소에 의한 에너지대사에서 pyruvate와 lactate의 가역반응을 촉매하는 lactate dehydrogenase(LDH, EC. 1.1.1.27), malate와 oxaloacetate의 가역반응을 촉매하는 malate dehydrogenase(MDH EC. 1.1.1.37)의 충체내의 분포를 효소조직화학적으로 조사하였고, 또 이들 효소의 isozyme의 특성을 알아보기 위하여 polyacrylamide gel electrophoresis(PAGE)를 이용하여 동위효소의 유형과 등전점(PI), 열에 대한 안정성 등을 조사하였으며, spectrophotometer를 이용하여 pH와 온도의 영향 등 효소의 특성을 추구하고 있다.

재료 및 방법

1. 실험재료

스파르가눔: 유헤목이(*Rhabdophis tigrina*)를 해

• 논문접수 1995년 11월 27일, 수정후 게재확정 1995년 12월 22일.

* 책임 저자

부하여 피하조직에 기생하고 있는 만손열두조충의 유충을 적출한 다음, 두절과 경부가 포함되게 5 mm 길이로 잘라 체중 200 g의 흰쥐(*Wistar immarichi albino*)에 인공경구감염 시켰다. 감염 후 12주 경과한 흰쥐를 해부하여 피하조직에서 성장한 스파르가눔을 회수하였다. 배의 조직에서 적출한 s-스파르가눔과 흰쥐에서 회수한 r-스파르가눔을 유충 재료로 사용하였다.

성충: 유혈목이에서 해부 적출한 스파르가눔을 고양이에게 인공경구감염시켜 3주 후 성충으로 발육한 충체를 회수하여 해부현미경 하에서 생식기관의 발육 및 충란 발생상태를 확인한 다음 미성숙편절, 성숙편절, 수태편절로 구분해서 실험재료로 사용하였다.

배와 흰쥐에서 얻은 스파르가눔의 체부와 인공경구감염시켜 고양이에서 얻은 성충의 각 편절을 냉동절편으로 만들고, 일부는 0.01 M PBS(pH 7.4)에 넣어 -70°C 냉동실에 보관한 후 전기영동용 재료로 사용하였다.

2. 효소조직화학적 염색

냉동절편의 제작: 살아 있는 충체를 -25°C 에서 embedding matrix로 냉동포매하여 냉동절편기(Reichert Histo Stat)로 8 μm 두께의 냉동절편을 만들어 -30°C 냉동실에 보관하였다가 효소검정재료로 사용하였다.

효소의 검정: Lactate dehydrogenase(LDH) 발색반응은 tetrazolium salt procedure(Lojda et al., 1979)에 따라 저장용액(0.1 M phosphate buffer pH 7.3 20 ml, 0.03% nitroblue tetrazolium 20 ml, 0.05% NaCN 8 ml, 1% MgCl_2 8 ml, D.W. 16 ml)을 준비하고, 이 저장용액 20 ml에 NAD^+ 30 mg과 1 M lactate 2 ml를 첨가시킨 반응액(pH 7.4)을 조직에 첨가하여 빛을 차단한 37°C 습실에서 30분간 반응시켜 LDH의 소재를 검사하였다.

Malate dehydrogenase(MDH) 발색반응도 tetrazolium salt procedure를 이용하여 저장용액 20 ml에 1 M malate 2 ml, phenazine methosulfate(PMS) 2 mg을 섞은 반응액(pH 7.4)을 조직에 첨가하여 빛을 차단한 37°C 습실에서 30분간 정온반응시켜 발색반응으로 MDH의 소재를 확인하였다.

반응이 끝난 조직절편은 후처리하여 카나다발삼으로 봉입하고 광학현미경으로 관찰 후 사진촬영하였다. 충체 조직에 발색된 효소의 분포는 Hotta가 기술한 방법(Hotta et al., 1978)에 따라 외피층 tegument), 외피하근층(subtegumental musculature), 실질근층(parenchymal musculature)으로 구분하여, Barry가 기술한 방법(Barry and Lionel, 1968)을 약간 변형하여 발색반응의 상대적 강도에 따라 강양성반응(+++), 중양성반응(++), 약양

성반응(+), 음성반응(-)으로 구분 판정하였다.

3. 전기영동에 의한 동위효소 검정

냉동시킨 유충과 성충을 막자바위(mortar and pestle)와 초음파분쇄기(ultrasonicator)로 균질화한 후 15,000 rpm으로 4°C 에서 2회 원심분리하여 상정액을 취했다. 이 상정액을 4°C 에서 24시간 동안 0.01 M PBS(pH 7.4)로 투석하였다. s-스파르가눔, r-스파르가눔, 성충의 시료액을 단백질 정량한 다음, 단백질 200 μg 씩 똑같이 함유된 시료로 만들어서 각 시료를 주입구(well)에 주입하였다. 전기영동은 7.5~15% polyacrylamide gradient gel을 이용하여 전개하였다.

분자량 측정을 위해 native M.W. marker(Sigma)를 사용하였고 0.01%(w/v) bromophenol blue 수용액을 tracking dye로서 사용하였다. 4°C 에서 3 mA로 13시간 동안 전개시킨 겔(gel)은 다음과 같은 방법으로 반응시켜 발색반응시켰다.

LDH, MDH의 동위효소 분획: 동시포착법(simultaneous capture method; Jakoby, 1971)에 따라 1 M sodium lactate 10 ml, 1% NAD^+ 10 ml, 0.1 M NaCl 10 ml, 5 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) 25 ml, 0.1% PMS 2.5 ml를 섞은 혼합액을 준비한 다음, LDH 염색반응은 이 혼합액 102.5 ml에 1 M lactate 2.5 ml를 첨가하여 반응액을 만들고, MDH 염색은 1 M malate disodium salt 10 ml를 섞은 반응액을 만들어 이 용액에 37°C 암실에서 30분간 겔을 각각 정온반응시켜 각 동위효소의 유형과 분자량을 확인하였다.

IEF에 의한 등전점: IEF(isoelectric focusing)는 Hames method(Hames and Rickwood, 1990)를 변형하여 2.7% pH 3.5-10 native gel을 이용하여 30V, 50V, 80V의 전압에서 차례로 1시간, 1시간, 15시간 동안 전기영동을 전개한 다음 r-스파르가눔과 성충에 존재하는 MDH의 등전점을 Allen and Hyncik(1963)의 방법과 simultaneous capture method(Jakoby, 1971)를 이용하여 확인하였다.

열에 대한 효소의 안정도: 성충의 상정액을 85°C 에서 각각 10초 간격으로 열처리(10초, 20초, 30초, 40초)한 다음 대조구를 포함한 5개의 시료를 gel에 주입하여 12.5% native PAGE를 이용하여 3 mA로 14시간 전개시켰다. 85°C 로 열처리된 sample gel은 동시포착법에 따라 MDH의 활성상태를 확인하였다.

4. Spectrophotometer를 이용한 효소활성 측정

pH의 영향: pH 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10의 7종류로 조절한 기질용액과 성충의 추출물인 상정액을 혼합하여 37°C 에서 30분 동안 정온반응시킨 다음 MDH 활성을 측정하였다.

온도의 영향: 0.1 M Tris-HCl buffer(pH 7.4)의 MDH의 기질액과 성충과 유충의 추출물인 상징액을 혼합하여 온도 20°C, 30°C, 40°C, 50°C, 60°C, 70°C, 80°C 하에서 각각 30분간 정온반응시킨 다음 O.D 값을 측정하였다.

효소의 최대활성도 측정: 전기영동에 사용된 r-스파르가눔과 성충의 상징액을 Bio-Rad의 manual에 따라 단백질을 정량하였다. MDH 활성을 측정하기 위해 0.1 M Tris-HCl buffer(pH 7.4) 1 ml, NAD + 2 mg, 1 M malate 0.1 ml를 혼합한 여과액을 기질용액으로 사용하였다. 이 기질액 1 ml에 총단백질 10 µg의 함량이 되는 상징액과 혼합하여 환원된 NADH 양을 340 nm의 파장으로 20분간 측정하였다. 측정된 O.D 값을 표준곡선에서 생성량으로 환산하여 총단백질 10 µg 속에 들어있는 효소가 37°C에서 1분 동안에 기질을 분해한 생성물 1 ng을 1 unit로 정의하여 활성도(activity)를 비교하였으며, 이 실험을 5회 실시하여 통계처리를 하였다.

결 과

1. 조직학적 효소분포

LDH: 조직에 분포하는 LDH는 nitroblue tetrazolium과 PMS(phenazine methosulfate)의 중합 반응으로 암청색의 불용성 포르마잔(formazan)이 형성되어 착색물질로 나타났다. LDH의 활성반응은 유충과 성충의 외피하근층(subtegumental musculature)에서는 강하게 나타났으며, 실질근층(parenchyma)에는 외피하근층에 비교하여 약하게 나타났다. 그러나 외피층에서는 r-스파르가눔과 성충에서는 나타나지 않았으나, s-스파르가눔에서는 약하게 반응하였고, 유충간의 활성 차이는 거의 없었다(Fig. 1, a-d). 또한 성충에서도 편절간의 활성 차이도 별로 없었으며, 유충과 성충 모두 외피하근층에서 다른 조직층에 비해 강한 반응이 발현되었다. 성충의 수태편절에서는 신경계와 정소에서 다소 강한 양성반응이 나타났다(Fig. 1, e-j; Table 1).

MDH: MDH의 조직내 분포는 포르마잔으로 착색되어 청색으로 나타났으며, 유충시기에는 s-스파르가눔과 r-스파르가눔 모두 외피층과 외피하근층에 양성반응이 나타났으며, 실질근층에서도 약간의 양성반응이 있었다(Fig. 2, a-d). 성충에서는 외피층에서 음성반응이 나타난 반면, 외피하근층에서는 강한 양성반응이 나타났고, 특히 미성숙편절의 실질근층에서는 다른 편절의 실질근층에 비해 다소 강한 반응이 나타났으며, 생식기관을 중심으로 각 기관에서도 상당량의 양성반응이 나타났다(Fig. 2, e-j; Table 2).

2. 전기영동에 의한 동위효소의 특성

LDH: LDH의 동위효소유형은 s-스파르가눔에서

2개(87 kDa, 45 kDa), r-스파르가눔에서 4개(87 kDa, 45 kDa, 39 kDa, 32 kDa), 성충에서 2개(280 kDa, 45 kDa)의 분획이 각각 분리되었으며, 45 kDa 분획이 유충과 성충에서 공통으로 갖는 동위효소이면서, 주분획(major band)을 이루었다. r-스파르가눔에서 4개의 분획으로 다른 숙주의 총체에 비해 다소 많은 분획이 분리되었으며, 유충과 성충간의 현저한 활성 차이는 없었다(Fig. 3).

MDH: s-스파르가눔, r-스파르가눔과 성충의 조직에 분포하는 MDH의 동위효소는 각각 2개(66 kDa, 52 kDa), 3개(140 kDa, 66 kDa, 52 kDa), 4개(280 kDa, 140 kDa, 105 kDa, 58 kDa)의 분획이 각각 분리되었다. 이 중 s-스파르가눔과 r-스파르가눔에서 52 kDa 분획이 공통적으로 주분획을 이루었으며, 성충에서는 140 kDa 분획이 r-스파르가눔과 공통 분획이었으며, 주분획으로 나타났다. s-스파르가눔에 비해 r-스파르가눔과 성충에 존재하는 MDH 동위효소의 활성이 훨씬 높게 나타났다(Fig. 4).

IEF에 의해 성충에 존재하는 4개의 MDH 동위효소들의 등전점(PI)은 각각 6.0, 6.5, 6.7, 7.1이었으며, 이들 중 PI 6.0 분획이 주분획을 이루었다(Fig. 5).

성충에 존재하는 malate dehydrogenase의 동위효소는 85°C에서 열처리 하였을 때 대부분의 동위효소가 10초 이내에 급격히 불활성화 되었으며, 3번(105 kDa) 분획의 효소는 열처리 후 30초 경과 시까지 미약하나마 활성이 남아 있었다(Fig. 6).

3. Spectrophotometer를 이용한 활성도 측정

pH의 영향: MDH 동위효소는 pH 4~10까지의 7개 실험구 중에서 성충은 pH 6과 pH 8 사이에서 활성이 높았으나, 스파르가눔은 pH 7과 pH 8에서 높았다. 그러나 유충과 성충 모두 pH 7에서 최대 활성을 나타내었으며, pH에 따른 활성도는 현저한 차이가 나타났다(Fig. 7). 또한 유충에서 보다 성충에서 활성이 높았다.

온도의 영향: MDH 활성에 대한 최적 온도의 영향에서 유충과 성충 모두 40°C에서 최대 활성도를 나타내었고, 40°C를 기준으로 온도의 상승에 따라 활성도가 높아졌으나, 50°C 이상의 온도에서 활성도가 급격하게 감소되었고, 특히 80°C에서는 완전히 불활성화 되었다(Fig. 8).

활성도: pH 7.4로 맞춘 반응액을 40°C에서 측정한 MDH 최대활성도(maximum activity(unit))는 성충에서 108.0이고, r-스파르가눔, s-스파르가눔에서 각각 24.5, 19.4로 스파르가눔 보다 성충에서 훨씬 높은 활성을 나타내었다(Table 3).

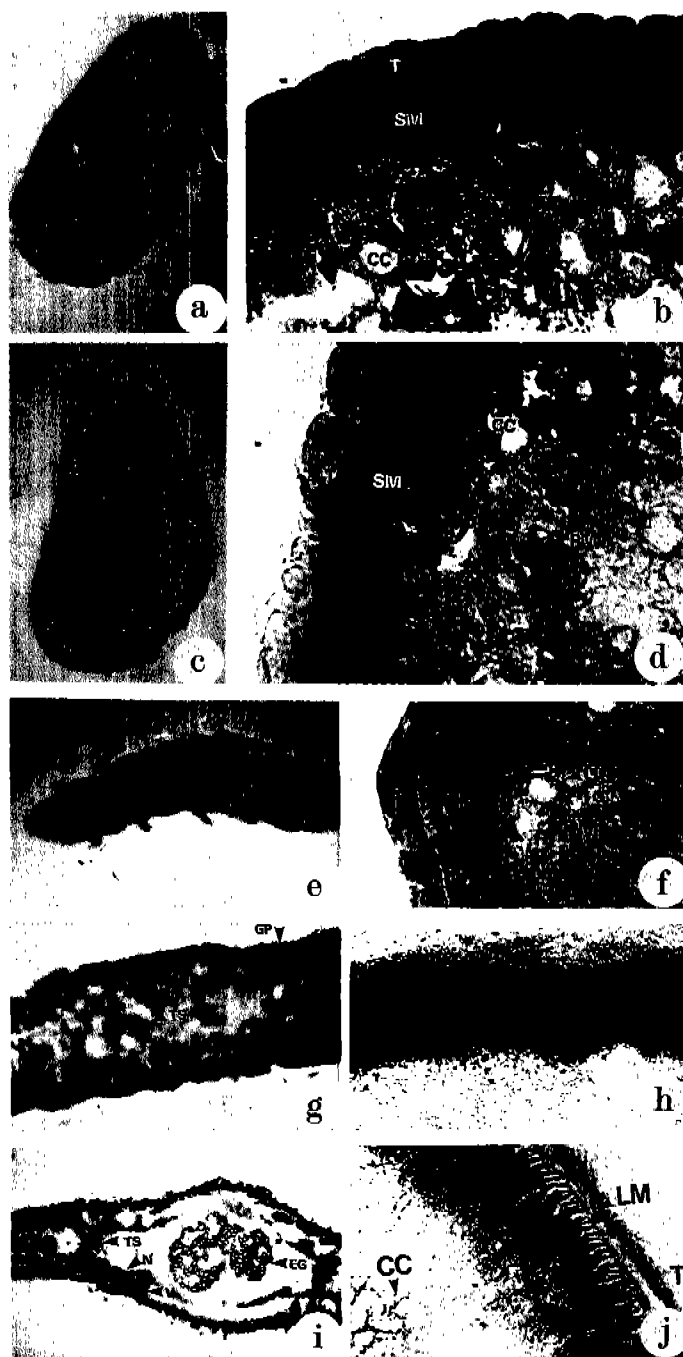


Fig. 1. Histochemical localization of lactate dehydrogenase on the sparganum and adult worm of *S. erinacei*. **a.** Snake sparganum (80 ×), **b.** Snake sparganum (400 ×), **c.** Rat sparganum (80 ×), **d.** Rat sparganum (400 ×), **e.** Immature proglottid (80 ×), **f.** Immature proglottid (400 ×), **g.** Mature proglottid (80 ×), **h.** Mature proglottid (400 ×), **i.** Gravid proglottid (80 ×), **j.** Gravid proglottid (400 ×). T, tegument; SM, subtegumental musculature; PM, parenchymal musculature; CC, calcareous corpuscles; TS, testis; V, vitelline gland; EG, egg; N, nerve trunk; LM, epidermal longitudinal musculature; GP, genital pore.

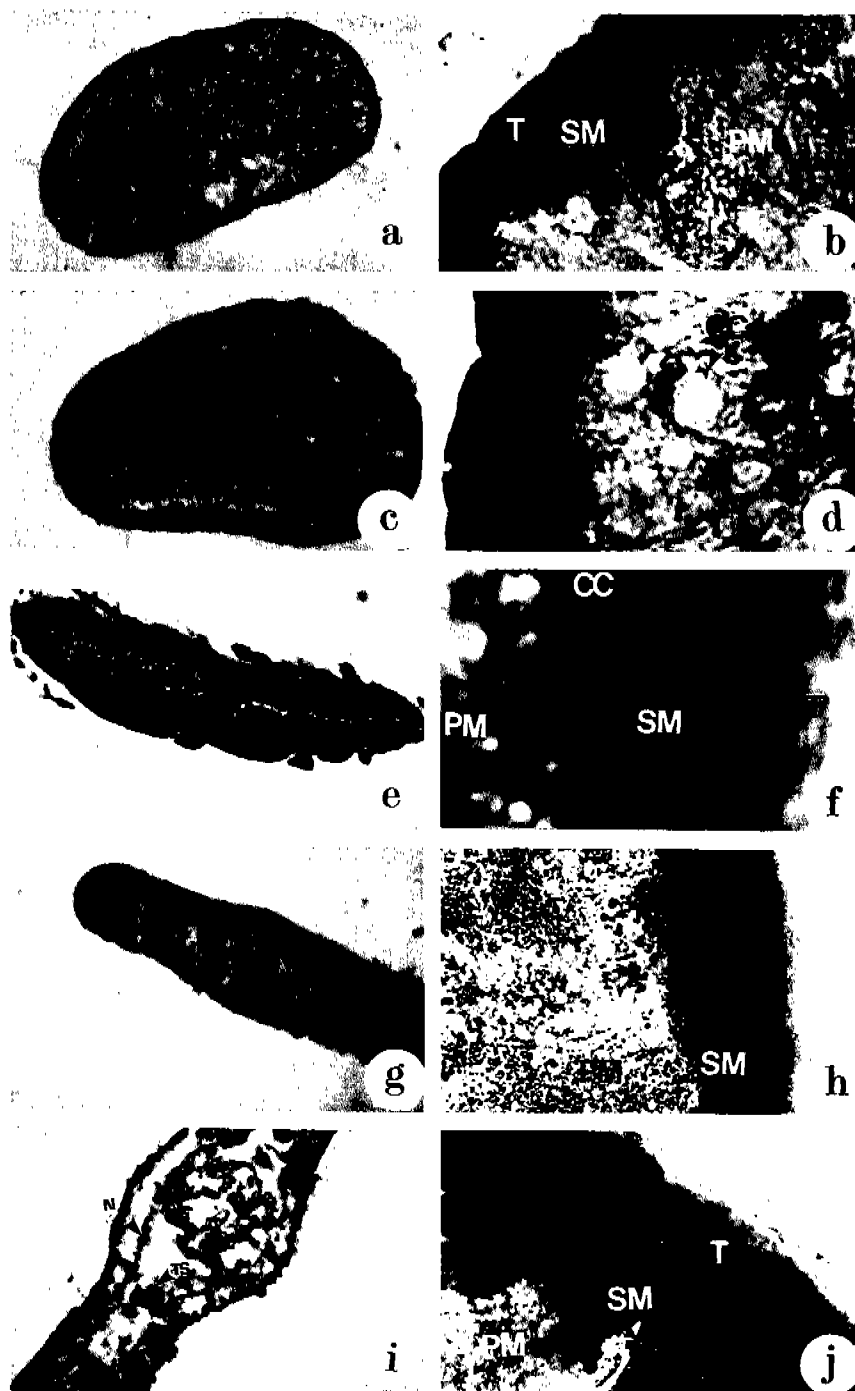


Fig. 2. Histochemical localization of malate dehydrogenase on the sparganum and adult worm of *S. erinacei*. **a.** Snake sparganum (80 \times), **b.** Snake sparganum (400 \times), **c.** Rat sparganum (80 \times), **d.** Rat sparganum (400 \times), **e.** Immature proglottid (80 \times), **f.** Immature proglottid (400 \times), **g.** Mature proglottid (80 \times), **h.** Mature proglottid (400 \times), **i.** Gravid proglottid (80 \times), **j.** Gravid proglottid (400 \times). T, tegument; SM, subtegumental musculature; PM, parenchymal musculature; CC, calcareous corpuscles; TS, testis; N, nerve trunk.

Table 1. Relative amount of lactate dehydrogenase activity on the sparganum and adult worm of *S. erinacei*

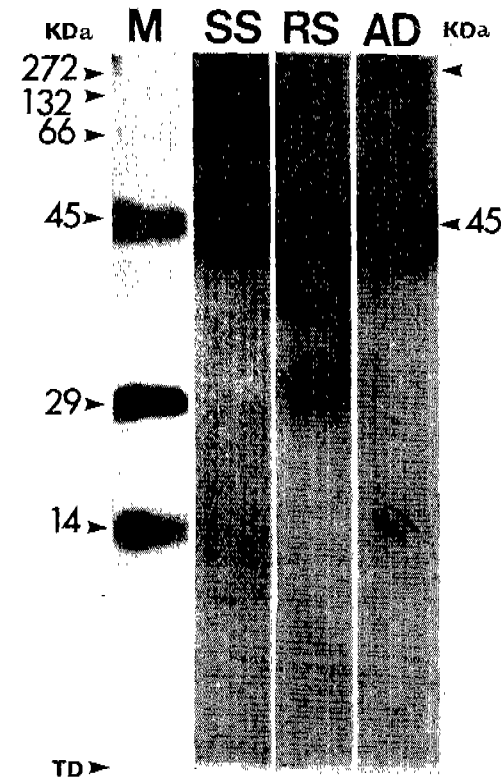
Tissue	Sparganum from		Adult		
	Snake	Rat	Immature proglottid	Mature proglottid	Gravid proglottid
T	+	-	-	+	+
SM	+++	+++	++	+++	+++
PM	+	+	+	+	+

T, tegument; SM, subtegumental musculature; PM, parenchymal musculature; +++, intensively stained; ++, moderately stained; +, slightly stained; -, not stained.

Table 2. Relative amount of malate dehydrogenase activity on the sparganum and adult worm of *S. erinacei*

Tissue	Sparganum from		Adult		
	Snake	Rat	Immature proglottid	Mature proglottid	Gravid proglottid
T	+++	+++	-	-	-
SM	+++	+++	+++	+++	+++
PM	+	+	++	+	+

T, tegument; SM, subtegumental musculature; PM, parenchymal musculature; +++, intensively stained; ++, moderately stained; +, slightly stained; -, not stained.



고 찰

만손열두조충은 전생활환을 통해 소화관의 발생이 없어 체표를 통해 능동수송 및 확산에 의해 양분을 흡수한다(Pappas and Read, 1975). 흡수된 영양물질은 충체의 조직세포내에서 분해된 다음 영양소의 상호전환 과정을 거쳐 최종적으로 포도당과 갈락토오스 형태로 되어 에너지대사에 이용된다(Pappas and Read, 1975; Bryant, 1978). Rhaman and Meisner(1973)는 *H. diminuta* (Cestoda)의 연구에서 산소환경과는 상관없이 젖산과 숙신산이 축적됨을 보고하였으며, Kwak and Kim(1992)은 만손열두조충에 LDH와 SDH가 다량으로 분포하여 젖산과 숙신산이 축적됨을 보고하였다. Barrett(1984)는 *S. dendriticum*의 유충과 성충 조직에서 최종 산물로 젖산과 숙신산이 축적되었으나 같은 숙인 *S. mansonioides*의 조직에서는 무기환경에서만 젖산과 숙신산 등의 산물이 축적됨을 보고

Fig. 3. Isozyme patterns of lactate dehydrogenase on the sparganum and adult worm of *S. erinacei*. SS, snake sparganum; RS, rat sparganum; AD, adult; TD, tracking dye; kDa, kilo-dalton; M, marker protein.

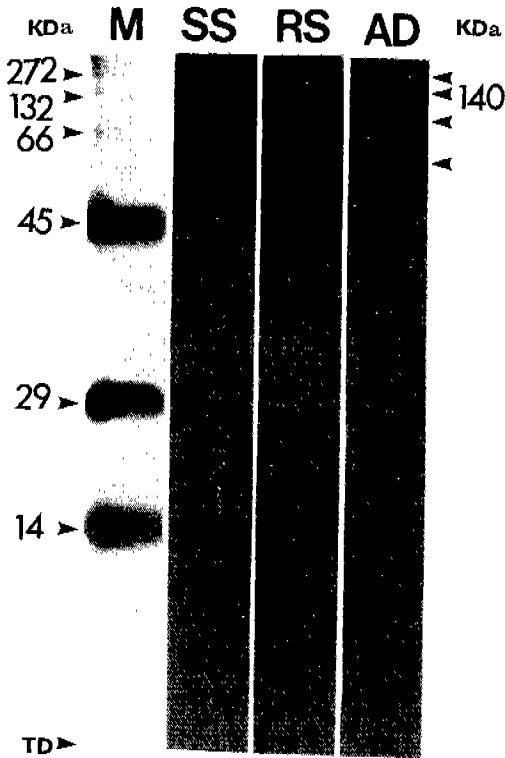


Fig. 4. Isozyme patterns of malate dehydrogenase on the sparganum and adult worm of *S. erinacei*. SS, snake sparganum; RS, rat sparganum; AD, adult; TD, tracking dye; kDa, kilo-dalton; M, marker protein.

하여 약간의 차이가 있었다.

이 연구에 사용된 만손열두조충은 유충과 성충의 조직에서 LDH와 MDH가 많이 분포된 것으로 보아 젖산과 말산이 축적되며 유기호흡과 무기호흡을 병행하는 것으로 생각된다. 본 실험에서 LDH와 MDH는 외피하근층에서 가장 많은 활성을 가졌고 실질근층에서도 약간의 활성이 나타난 점으로 보아 만손열두조충에 흡수되어 분해된 양분은 점점 층체의 중앙으로 이동되면서 산화분해됨을 알 수 있었다. 또한 성충의 미성숙편질의 실질근층에 LDH와 MDH가 거의 음성반응을 나타냈으나 성숙편질과 수태편질의 생식기관에서 많이 분포한 점은 실질근층에 위치한 생식기관의 발육 및 층란의 발생에 왕성한 에너지대사가 요구되는 것으로 생각된다.

한편, Park and Ha(1980)는 양서류의 배자(embryo) 발생에 따른 LDH와 SDH의 효소활성이 발생 진행에 따라 점차 증가한다고 보고하였고, Watts and Fairbairn(1974)은 축소조충 연구에서 층체의 성장에 따라 젖산의 생성율은 점차 감소하고 숙신산의 생성율이 증가한다고 보고하였다. 성충의 외피층에 존재하는 MDH는 유충 시기에 비해 성충

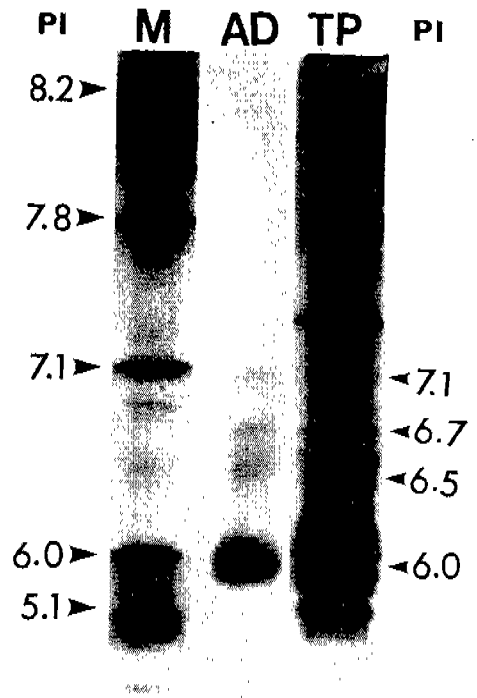


Fig. 5. Isozyme patterns of malate dehydrogenase by IEF on the sparganum and adult worm of *S. erinacei*. TP, Coomassie blue staining of total protein(adult); PI, isoelectric point; M, marker protein; AD, adult.

시기에 오히려 감소한 본 연구결과와 비교해 보면 종에 따라 차이가 있음을 나타냈다. Peter and Schroeder(1979)는 축소조충에서 2개의 LDH 동위효소를 분리하였는데 주분획의 분자량은 160 kDa 였다. Walky and Fairbairn(1973)과 Moon *et al.* (1977)은 축소조충에서 2개의 LDH 동위효소를 분리하였다. 이 연구에서는 s-스파르가눔과 r-스파르가눔에서 각각 2개, 4개, 성충에서 2개의 동위효소가 분리되었는데 45 kDa 분획이 주분획으로 나타나 조충류에서도 종에 따라 LDH 동위효소의 차이가 있었다.

Moon *et al.*(1977)은 축소조충의 유충에서 4개의 MDH 동위효소를 분리하였는데 49 kDa 분획이 주분획이었다. Peter and Schroeder(1979)는 축소조충의 성충에서 3개의 MDH 분획을 분리하여 gel chromatography를 통해 49 kDa의 주분획을 얻었고, 이 연구에서는 만손열두조충의 s-스파르가눔, r-스파르가눔, 성충의 조직에서 2, 3, 4개의 동위효소 분획이 분리되었고, 각각 주분획은 다르게 나타났다. 한편 Bennet *et al.*(1993)은 축소조충의 연구에서 층체의 물질대사는 숙주환경의 영향에 따라 달라진다고 하였으며, Moon *et al.*(1977)은 축소조충에서 발육에 따라 MDH의 활성도 변화가 뚜렷이

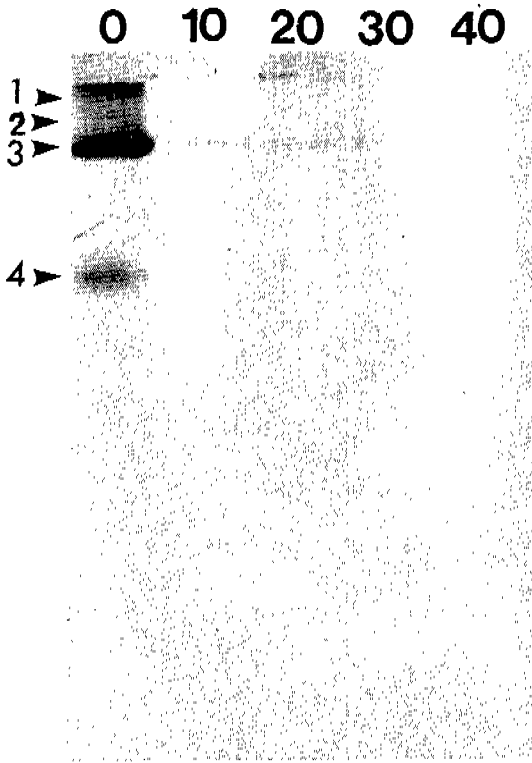


Fig. 6. The stability against heat treatment on the isozyme of malate dehydrogenase in adult worm, heating at 85°C for 10, 20, 30, 40s seconds, respectively. 0, control; 10, 10 sec.; 20, 20 sec.; 30, 30 sec.; 40, 40 sec.

Table 3. Enzyme activities of malate dehydrogenase on the sparganum and adult worm of *S. erinacei* (mean \pm SE)

Enzyme	Activity (Unit ^a)		
	Snake sparganum	Rat sparganum	Adult
MDH	19.4 \pm 1.2	24.5 \pm 0.8	108.0 \pm 4.5

^aOne unit: The enzyme activity was defined as 1 ng of substrate produced per min. at 40°C with 10 μ g crude protein of the worms.

나타난다고 보고하였다.

이러한 결과들로 볼 때 조충류에 존재하는 유기 호흡효소들의 동위효소는 종과 서식환경에 따라 다양함을 알 수 있다. 본 연구에서의 s-스파르가눔과 r-스파르가눔, 성충의 조직에 분포하는 MDH의 동위효소 유형 및 활성도는 발육단계에 따라 상당한 차이를 나타냈다. 이러한 차이는 중간숙주의 조직

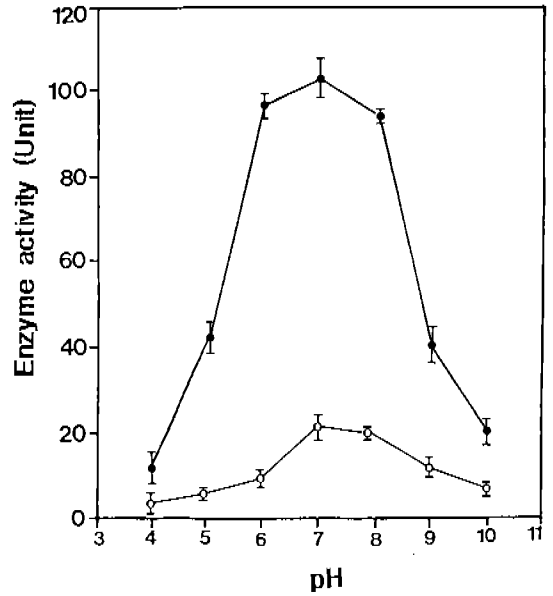


Fig. 7. The effect of pH on the activity of malate dehydrogenase in r-sparganum and adult worm. ● — ●, adult; ○ — ○, sparganum

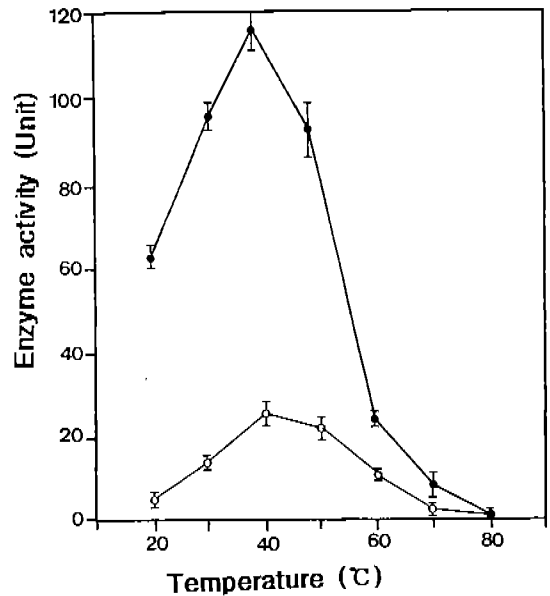


Fig. 8. The effect of temperature on the activity of malate dehydrogenase in r-sparganum and adult worm. ● — ●, adult; ○ — ○, sparganum

기생에서 유충 상태로 성장하고 종숙주의 소장에서는 성충으로 성장하는 근본적으로 다른 발육환경, 즉 숙주와 기생부위의 차이로 볼 수 있다. 이러한 서식환경의 차이에서 오는 효소들의 활성 또는 불활

성화 요인을 보다 깊이 있게 연구되어야 할 것으로 생각된다.

한편, 만손열두조충의 실질조직층에서 비세포성 석회과립(calcareous corpuscles)이 많이 관찰되었는데, 이 석회과립의 기능에 대하여는 상세히 알려진 바는 없으나 숙주의 유해물질에 대한 충체의 방어물질 공급 및 유충 초기의 물질대사에 무기이온(Ca^{++} , Mg^{++} 등)의 공급처 역할을 한다는 보고가 있다(Smyth and McManus, 1989). 이 연구에서도 성충에 비해 유충의 실질조직에서 훨씬 많은 비세포성 석회과립이 관찰되었으며 s-스파르가눔에서 r-스파르가눔에 비해 다소 많은 석회과립이 관찰된 점으로 보아, 중간숙주의 조직환경이 중숙주 소화관의 서식환경 보다 충체에 부적합하며 정온동물보다 변온동물의 조직이 충체의 생활환경으로 더 부적합한 환경인 것으로 생각된다.

또한, 발육에 따라 동위효소 분획이 뚜렷한 차이가 있고 효소활성이 높은 MDH는 열에 대한 안정도가 아주 낮다고 생각된다. 유충에 비해 성충 조직에서 MDH의 최대 활성도가 높게 나타났다. 그러나 조직화학적 방법에 의한 정성분석적 분포로 볼 때 유충과 성충의 조직에서의 상대적 활성도의 차이는 없었으나, 정량분석에 의한 MDH의 활성도는 유충보다 성충에서 높게 나타난 것은 성충에서는 실질조직층에 발달된 기관(생식기관계)에서도 양성반응이 나타났을 뿐만아니라 정성분석에 의한 상대 활성치와 정량분석에 의한 절대 활성치와의 차이에서 온다고 생각된다. 또한 유충에 비해 기관이 형성되는 성충의 물질 대사가 활발히 수행된다고 추정할 수 있다.

이 실험결과로 볼 때 숙주의 종류, 기생장소 등이 기생충의 물질 대사에 영향을 주며 또한 기생충은 기생환경에 따라 동위효소들이 활성을 달리하므로써 환경에 적응한다는 사실을 추정할 수 있다.

REFERENCES

Barrett J (1984) The anaerobic end-products of helminths. *Parasitology* **88**: 179-198.
 Barry DH, Lionel EM (1968) Enzyme histochemistry of the adult liver fluke, *Fasciola hepatica*. *Exp Parasitol* **23**: 355-360.
 Bennet EM, Heath PA, Bryant C (1993) The effects of changes in the definitive host environment on the metabolism of *Hymenolepis diminuta* during growth and maturation. *Int J Parasitol* **23**(1): 57-68.
 Bryant C (1978) The regulation of respiratory metabolism in parasitic helminths. *Adv Parasitol* **16**: 311-331.
 Fukase T, Matsuda Y, Akihama S, Itagaki H (1984) Some hydrolyzing enzymes, especially

arginine amidase, in plerocercoids of *Spirometra erinacei* (Cestoda; Diphylobothriidae). *Jpn J Parasitol* **33**: 283-290.
 Fukase T, Matsuda Y, Akihama S, Itagaki H (1985) Purification and some properties of cysteine protease of *Spirometra erinacei* plerocercoid (cestoda; diphylobothriidae). *Jpn J Parasitol* **34**: 351-395.
 Hotta H, Chiba K, Hasegawa H (1978) Studies on the diphylobothriid cestodes in the Northern Japan. (1) Plerocercoids recovered from several species of fishes and their adult forms. *Dept of Medical Zoology Niigata Univ of Med* **4**: 357-368.
 Jakoby WB (1971) Methods in enzymology: enzyme purification and related techniques. Academic Press New York. **22**: p585-586.
 Kwak GH, Kim CH (1992) Enzyme-histochemical studies of LDH and SHD on developing *Spirometra erinacei*. *Korean J Zool* **35**: 362-371 (in Korean).
 Logan J, Ubilaker JE, Vrijenhoek RC (1977) Isozyme of L(+)-LDH in *Hymenolepis diminuta*. *Comp Biochem Physiol* **75B**: 51-53.
 Lojda Z, Gossary R, Schiebeler TH (1979) Enzyme histochemistry. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York: p59-87, p117-118.
 Moon TW, Hulbert WC, Mustafa W, Mettrick DF (1977) A study of lactate dehydrogenase and malate dehydrogenase in adult *Hymenolepis diminuta* (cestoda). *Comp Biochem Physiol* **56B**: 249-254.
 Pappas PW, Read CP (1975) Membrane transport in helminth parasites; a Review *Exp Parasitol* **37**: 469-530.
 Park YC, Ha DB (1980) Studies on the change of isozyme patterns of lactate and malate dehydrogenase during embryonic development of some amphibians. *Korean J Zool* **23**: 263-272.
 Peter WP, Schroeder LL (1979) *Hymenolepis microstoma*; lactate and malate dehydrogenases of the adult worm. *Exp Parasitol* **47**: 134-139.
 Rhaman R, Meisner H (1973) Respiratory studies with mitochondria from the rat tapeworm *Hymenolepis diminuta*. *Int Biochem J* **4**: 153-162.
 Smyth JD, McManus DP (1989) The biochemistry of cestodes. Cambridge Univ Press New York: p83-84.
 Walky M, Fairbain D (1973) L(+)-lactate dehydrogenase from *Hymenolepis diminuta* (Cestoda). *J Exp Zool* **183**: 365-374.

Watts SDM, Fairbairn D (1974) Anaerobic excretion of fermentation acids by

Hymenolepis diminuta during development in the definitive host. *J Parasitol* **60**: 621-625.

=Abstract=

Localization and characteristics of lactate and malate dehydrogenase in the sparganum and adult worm of *Spirometra erinacei*

Kee-Hoon KWAK, Eun-Woo CHEON, and Chang-Hwan KIM*

Department of Biology, College of Natural Sciences Gyeongsang National University, Chinju 660-701, Korea

This study investigated the enzyme histochemical localization and characteristics of lactate (LDH) and malate dehydrogenase (MDH) related with the oxidation-reduction metabolism in the sparganum and adult of *S. erinacei*. By enzyme histochemical assay, activity of LDH was strong in the tegument and subtegumental muscle layers of the adult and sparganum. Activity of MDH was strong in the tegument of the sparganum and subtegumental muscle layers of the adult. However it was weak in the tegument of the adult. By electrophoresis, 45 kDa band was major and common in LDH of adults and spargana. The 150 kDa molecule was the major and common band in MDH of adults and r-spargana (from experimentally infected rats). By isoelectrofocusing, isoelectric points (PI) of 4 MDH isozyme from adult worm were 6.0, 6.5, 6.7 and 7.1, respectively. PI 6.0 was the major band. The active range of pH for MDH was about pH 6-8 and the optimum pH was pH 7. The effective temperature on the MDH was about 30°C~50°C and the optimum temperature was about 40°C in spargana and adult worm. In the stability against heat, when MDH was heated at 85°C for 10 seconds, the activity was denatured perfectly. Maximum activity of MDH was 19.4 unit in the s-sparganum (from snakes), 24.5 unit in the r-sparganum (from rats) and 108.0 unit in the adult worm. The maximum activity was higher in adults than in spargana. The present result showed us that the nutrients absorbed through the tegument were transferred into inner tissues and were utilized as the source of metabolism. According to the habitat of the parasite, the isozymes of LDH and MDH are activated differently, and by this different activation the sparganum and adult can adapt themselves to parasitic circumstances.

Key words: malate dehydrogenase (EC. 1.1.1.37), lactate dehydrogenase (EC. 1.1.1.27), isoelectrofocusing, isozyme pattern, enzyme histochemistry

[Korean J. Parasitol., 34(1): 59-68, March 1996]

*Corresponding author