

에르릿히 복수종양의 C¹⁴-1-포도당 및 C¹⁴-6-포도당 대사에 관한 연구

서울대학교 의과대학 생리학교실

<지도 : 南基鏞 · 李相敦 교수>

權 昶 洛

Abstract=

Metabolism of C¹⁴-1-glucose and C¹⁴-6-glucose by the Ehrlich Ascites Tumor Tissue

Chang Rak Kwon, M.D.

Department of Physiology, College of Medicine, Seoul National University, Seoul, Korea

(Directed by: Prof. Kee Yong Nam, M.D. Assistant Prof. Sang Don Rhee, M.D.)

The metabolic patterns of C-1 and C-6-carbon atoms of glucose were observed in the tissue homogenates of the Ehrlich ascites tumor tissue which was incubated for 3 hours in the Dubnuff metabolic shaking incubator. C¹⁴-1-and C¹⁴-6-glucose were used as tracers. The glucose media in which tissue homogenate was incubated was kept at a concentration of 200mg% glucose of carrier and appropriate amount of C¹⁴-1-or C¹⁴-6-tracer. At the end of 3 hour incubation, respiratory CO₂ samples trapped by alkaline which is placed in the center well of incubation flask were analyzed for the total CO₂ production rates and their radioactivities. The tissue homogenate samples after incubation were analyzed for their concentrations of glucose, lactate, pyruvate and glycogen and calculations were made on the glucose consumption rate, pyruvate and lactate accumulation rates. The following results were obtained.

Data obtained in each group are as follows:

1. In the tissue homogenate, which was incubated with C¹⁴-1-glucose as a substrate, total CO₂ production rate averaged $19.0 \pm 5.0 \mu\text{M/hr/gm}$ and the mean specific activity of respiratory CO₂ was $840 \pm 296 \text{ cpm/mgC}$.

Relative specific activity (RSA) which means the fraction of CO₂ derived from medium C¹⁴-1-glucose to total CO₂ production rate was calculated by ratio of SA of respiratory CO₂ and medium C¹⁴-1-glucose. RSA was $14.3 \pm 5.0\%$. Accordingly actual CO₂ production rate from medium C¹⁴-1-glucose showed a mean value of $2.79 \pm 1.35 \mu\text{M/hr/gm}$, of which amount was equivalent to the mean value of total glucose consumption rate (RGDCO₂), namely, $5.1 \pm 1.3\%$.

Lactate and pyruvate appearance rates averaged 7.13 ± 1.26 and $0.21 \pm 0.02 \mu\text{M/hr/gm}$, respectively. Assuming that these 3 carbon compounds appeared in the medium were derived from glucose, calculations were made that relative glucose disappearance rate into lactate (RGDL) was $38.0 \pm 5.4\%$ and RGD_P was $1.23 \pm 0.03\%$. Therefore, about 43.3% of the total glucose consumed were accounted for by conversion into the respiratory CO₂, lactate and pyruvate.

2. In the second group, which was incubated with C¹⁴-6-glucose as a substrate, glucose consumption rate, lactate and pyruvate appearance rates showed almost the same order as the values of the C¹⁴-1-glucose substrate group. However, RSA was remarkably decreased showing a mean value of $1.02 \pm 0.13\%$. This fact means that the C-6 carbon of glucose take the minor part in the oxidative

metabolism of glucose.

The glycogen level in both substrate tissue homogenate showed less than 0.3% of tissue weight. These low value suggested that there was an inhibition of carbohydrate synthesis in the Ehrlich ascites tumor tissue.

3. The catabolic pathway of glucose in the tumor tissue were analyzed on the basis of Bloom's principle from the values of RSA. It was found that in the tumor tissue more than 90% of CO₂ derived from glucose were oxidized via the alternate pathway other than principal EMP-TCA cycle such as hexose monophosphate pathway (HMP).

From the data described above, it was assumed that in the Ehrlich tumor tissue anaerobic glycolysis proceeds normally although, the oxidation of products of anaerobic glycolysis via the TCA cycle is inhibited resulting in the accumulation of lactate and almost all of oxidative energy from glucose is released by oxidative pathway such as HMP.

서 론

정상조직과 종양조직과의 현저한 차이점의 하나로서 합수탄소 대사과정에 변조를 초래함은 주지의 사실이다. 즉 Warburg (Warburg, 1931; Warburg, 1956; Warburg et al., 1924; Warburg et al., 1926) 등이 오래 전에 종양조직에서 유기성 환경하에서 무기성 환경시와 같이 정상조직과 비교하여 젖산형성이 촉진됨을 발견한 이래 종양조직의 당대사에 관한 생화학적 분야에 대하여 주의를 환기하게 되었다. 종래에는 이러한 종양조직의 젖산축적을 조직학적 소견 즉 종양조직에는 일반적으로 혈관 분포가 적으며 모세관도 다른 조직과 달리 길고 팽창되어 혈액순환이 느리다는 점 (Algire et al., 1945; Tannenbaum, 1957)으로 보아 순환장애로 인한 산소 공급 결핍 때문에 유기성 대사과정이 억제되어 젖산축적이 다른 조직보다 증가한다고 설명하였다. 실지로 Goldblatt(1953) 등은 fibroblast의 조직배양에서 fibrosarcoma로의 이행이 저산소 환경(anoxic state)으로 인하여 촉진됨을 직접 관찰한 바 있다. 물론 조직배양시 악성종양으로의 변화는 여러 화학적 형태의 carcinogen과 저산소와의 관련성을 고려하여야 하겠으나 실지로 carcinogen의 종양 발생기전은 아직 확실히 구명된 바 없으므로 저산소 자체가 악성 종양의 원인 인자가 된다고 주장하게끔 되었다.

젖산 축적에 관한 실험은 처음 Warburg (Warburg, 1931; Warburg, 1956; Warburg et al., 1924) 등이 흰쥐의 종양조직의 균동액(homogenate) 및 절편(slices)을 이용하여 시도하였고 Cori(1925a, 1925b) 등은 생체내(in Vivo) 실험에서 종양조직을 관류하는 동정맥혈을 채혈하여 포도당 및 젖산 농도를 측정하여 동정맥혈의 농도차를 다른 조직의 값과 비교한 바 포도당의 소실률은 높고 젖산 농도는 일반 조직에서 정맥혈 농도가 낮고 젖산이 이용되는데 비해 종양조직에서는 도리어 정

맥혈 농도가 높고 상당한 량의 젖산이 형성됨을 보았다. 이러한 사실은 종래에는 조직학적 소견과 부합시켜 종양조직의 당 대사과정은 혈관 분포 결핍으로 무기성 해당 작용(glycolysis)이 촉진되고 Krebs Cycle을 통한 유기성 대사과정이 억제되어 젖산 축적이 초래된다고 보았으나 근래에 와서 동위원소가 이용되어 꼬리표 실험이 발달되고 효소 분리가 가능하게 된 이래 종양조직의 당 대사의 양상을 어느정도 확실히 구명할 수 있게 되었다.

Busch(1960) 등은 크로마토그래피 수법(Busch, 1953; Busch et al., 1952; Nyhan et al., 1957)을 이용하여 Waker 256 Carcinosarcoma를 발생시킨 흰쥐에 C¹⁴-포도당을 주입한 후 여러 중간 대사물질을 생체 여러 조직 및 종양조직에서 추출하여 방사능을 측정 비교한 바 종양조직에서 대부분의 주입한 C¹⁴-포도당의 방사능이 젖산으로 이행되고 Krebs cycle의 중간 대사물질에서 유래되는 aspartic acid 또는 glutamic acid와 같은 아미노산에는 소량의 방사능이 검출되는데 비하여 정상 다른 조직에서는 상당한 양의 방사능이 Krebs cycle의 중간 대사물질에서 검출되는 것으로 보아 종양조직의 당 대사과정은 무기성 해당경로는 정상조직과 별 차이가 없으나 해당경로의 종산물인 3 탄화합물이 호흡 CO₂로 완전 산화되는 Krebs cycle의 산화경로에서 억제가 되는 인상을 받게 되었다.

이러한 사실은 oxidative decarboxylation의 coenzyme인 Vitamin B complex의 조직 농도가 종양조직에서 낮고(Weinhouse, 1955) DPN 및 DPNH의 조직 농도도 hepatoma에 있어서 정상조직의 값 100~600 µg/gm에 비하여 종양조직에서 90~100 µg/gm에 불과함을(Jedeikin et al., 1955) Weinhouse가 발견하였고 Potter(1942, 1943) 등의 실험에서 호흡효소인 Cytochrome C 함량은 정상조직의 값 평균 21~371 µg/gm에 비하여 여러 종양조직의 함량은 9~20 µg/gm로 낮은 값을 보였고 cy-

tochrome oxidase 에서도 같은 현상을 보았다는 사실로 보아 생체 조직의 기본적인 당 대사의 산화경로인 Krebs cycle 에서 호흡효소 결핍으로 조직호흡에 영향을 받는다는 사실은 의심할 바가 없는 것이다. 따라서 성장률이 왕성한 종양조직에서는 합성 에너지의 공급을 Krebs cycle 과 같은 기본적인 경로 이외의 다른 산화 경로에 의존하게 될 것이므로 본 실험은 C¹⁴-1-포도당 및 C¹⁴-6-포도당을 이용하여 포도당의 C-1 및 C-6 탄소의 호흡 CO₂ 로의 완전 산화과정을 양적으로 측정하여 Krebs cycle 이외의 hexose monophosphate pathway (HMP) 와 같은 산화경로가 종양조직의 에너지 대사에 관여하는 바를 구명하고자 시도한 것이다.

실험 방법

실험재료 : 에르리트히(Ehrlich) 복수종양 생쥐의 복수종양 생쥐 요부 피부에 약 0.1 ml 주입한 후 일주일 내지 이주일 후 이식된 복수종양이 육안으로 직경 1 cm 이상 성장된 생쥐를 선택하여 사용하였다.

매 실험에서 에르리트히 복수종양을 이식한 생쥐 5마리 내지 10 마리로부터 종양조직을 적출하고 종양조직 중심부에 생긴 괴사조직을 제거한 후 정확히 중량을 측정하고 여러마리 생쥐에서 얻은 종양조직을 같이 혼합(pool)하여 200 mg%의 포도당 농도를 유지하는 Krebs-Ringer Phosphate (pH 7.4) 용액으로 20 ml의 조직 균등액을 만든 다음 10 ml씩 2등분하여 용기에 따로 넣고 한 반응관에는 C¹⁴-1-포도당 저장 용액 0.5 ml를 넣어 C¹⁴-1-포도당 배양실험에 사용하고 다른 반응관의 균등액에는 C¹⁴-6-포도당 저장 용액 0.5 ml를 첨가하여 C¹⁴-6-포도당 배양실험에 사용하였다. 각 반응관의 균등액내 종양조직의 중량은 0.7~2.5 gm였다.

C¹⁴-포도당배지 : C¹⁴-1-포도당 및 C¹⁴-6-포도당(New England Nuclear Corp.제)을 각기 100 μc씩 구입하여 이를 100 ml의 Krebs-Ringer-Phosphate 용액으로 희석하여 저장 용액으로 사용하였다. 따라서 저장 용액 1 ml에는 1 μc의 방사능이 있었다.

C¹⁴-1-포도당 배양 실험에서 조직 균등액내의 C¹⁴-포도당의 방사능 혹은 비방사능(specific activity, SA)은 저장 용액 0.5 ml 내의 총계수(total counts)를 균등액내 포도당 탄소농도로 제하여 환산한 바 5897 cpm/mgC 이었다. C¹⁴-6-포도당 배양 실험에서도 같은 방법으로 균등액내 포도당의 SA를 계산한 바 5506 cpm/mgC 이었다.

일반 실험 조작

매 실험에서 에르리트히 복수종양 생쥐 5~10 마리에서 채취한 종양조직을 Krebs-Ringer-Phosphate buffer 와

함께 glass homogenizer 로 20 ml의 균등액으로 만들고 10 ml씩 2등분하여 전술한 바와 같이 C¹⁴-1-포도당 배양실험 및 C¹⁴-6-포도당 배양실험에 사용하였다.

각 배양실험에는 밀면 직경 6 cm, 높이 8 cm의 플라스크 내 밀면 중앙에 직경 1 cm, 높이 2 cm의 중심관을 설치한 반응기를 사용하였고 호흡 CO₂를 채취하기 위하여 반응기 중심관에 CO₂ free 2N NaOH 1 ml를 넣고 10 ml의 균등액을 중심관 주위에 넣고 다음 산소와 함께 밀봉한 다음 Dubnuff metabolic shaker 로 38°C 항온조에서 좌우 진탕을 1분에 60회 정도 가하면서 3시간동안 배양하였다.

배양 후 냉동기에 12시간 이상 방치하여 조직에서 유리된 CO₂ 흡수를 완전케 한 다음 반응기 중심관 내부에서 CO₂를 흡수한 Na₂CO₃ 시료를 주사기로 빼내어 총 CO₂ 생산물 및 호흡 CO₂의 방사능을 측정하였다. 한편 배양후 균등액 1 ml를 취하여 포도당 농도를 측정하여 포도당 흡수율을 계산하고 동시에 젖산 및 피루빈산을 정량하여 젖산 및 피루빈산의 생산물을 관찰하였다. 나머지 균등액은 30%의 KOH 용액으로 처리하여 당원질 농도를 정량하였다.

화학 조작 및 방사능 측정 : 균등액의 포도당 정량에는 Somogyi(1945)와 Nelson(1944)의 방법을 사용하고 젖산 정량에는 Barker 및 Summerson(1941), 피루빈산 정량에는 Friedmann 및 Haugen(1943)의 방법을 사용하였다. 당원질 농도 측정에는 Good, Kramer 및 Somogyi(1933)의 방법을 사용하였다.

총 CO₂ 생산물 측정에는 반응기 중심관에 Na₂CO₃로 채취된 CO₂ 시료를 BaCl₂로 정량적으로 Whatman filter paper (No. 542)에 BaCO₃로 침전시켜 BaCO₃의 중량을 측정하여 이를 BaCO₃의 분자량으로 제하여 CO₂ 생산물을 계산하고 BaCO₃ 표본을 그대로 이용하여 end window Geiger Müller Counter 로 방사능을 측정하여 호흡 CO₂의 SA를 계산하였다. 조직 균등액내 C¹⁴-1 및 C¹⁴-6 포도당의 SA측정은 각 저장 용액 1 ml에 비방사성 포도당을 소량 첨가하여 Vanslyke Folch 방법(1940)으로 CO₂로 분해한 다음 이를 BaCl₂로 침전시켜 총계수(total counts)를 end window Geiger Müller Counter 로 측정하고 각 반응기에 첨가한 저장 용액의 총계수를 환산하여 균등액내 포도당 탄소로 제하여 cpm/mgC으로 표시하였다. end window Geiger Müller Counter 로 측정된 값은 모두 자기흡수에 대한 교정을 하여 비교 관찰하였다.

계산방법 : 포도당 흡수율, 젖산 및 피루빈산 생산물은 배양 전후의 각 기질의 농도 차를 측정하고 이를 배양 균등액의 용적으로 승하고 다시 종양조직 무게와 배

양시간으로 제하여 $\mu\text{M/hr/gm}$ 로 표시하였다.

총 CO₂ 발생률(total CO₂ production rate)은 배양기 내의 중심관에 흡수시킨 Na₂CO₃ 표본을 BaCO₃로 침전시켜 이것의 무게를 측정하고 이를 BaCO₃의 분자량, 배양시간 및 조직 무게로 제하여 $\mu\text{M/hr/gm}$ 로 표시하였다.

호흡 CO₂의 relative specific activity (RSA)는 발생한 전 CO₂ 내에 있는 배지 동위원소 기질에서 유래된 CO₂의 분률(fraction)을 의미하며 배지 C¹⁴-포도당의 SA와 호흡 CO₂의 SA와의 비율로 산출하였다.

호흡 CO₂로의 비교 포도당 소실률(relative glucose disappearance rate into CO₂: RGDco₂)은 배지에서 균동액내 조직이 흡수한 C¹⁴-포도당의 호흡 CO₂로 완전 산화된 분률을 표시하며 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{RGDco}_2 = \frac{\text{total CO}_2 \text{ production rate} \times \text{RSAco}_2}{\text{glucose uptake rate} \times 6}$$

윗식의 분자는 배지내의 C¹⁴-포도당에서 유래하는 CO₂의 발생률을 보이며 1분자의 포도당이 CO₂로 완전 산화하면 6분자의 CO₂를 발생하므로 C¹⁴-포도당에서 기인된 CO₂의 발생률을 6으로 제하면 CO₂로 완전 산화된 포도당의 량을 계산할 수 있다. 이 값과 포도당 흡수율과의 비율을 구하면 배지에서 흡수된 C¹⁴-포도당이 CO₂로 완전 산화된 분률을 표시하게 된다.

실험 성적

에르릿히 복수 종양조직을 C¹⁴-1-포도당 배지에 배양하였을 때 포도당의 C-1-탄소의 호흡 CO₂로의 산화과정에 관한 실험성적은 제 1 표에 종합하였다.

배지내 C¹⁴-1-포도당의 SA는 각 실험에서 모두 5,897 cpm/mgC 이었고 포도당 농도는 200 mg%을 유지하며 3시간 배양하였을 때 호흡 CO₂의 SA는 9회 실험에서 평균 840±296 (Mean±S.D.) cpm/mgC의 값을 얻었다. 배지 C¹⁴-1-포도당 및 호흡 CO₂의 SA와의 비율로 RSAco₂를 계산한 바 평균 14.3±5.0%이었고 총 CO₂ 생산물은 평균 19.0±5.5 $\mu\text{M/hr/gm}$ 이므로 배지 C¹⁴-1-포도당에서 유래된 CO₂ 생산물은 총 CO₂ 생산물의 14.3%인 평균 2.79±1.35 $\mu\text{M/hr/gm}$ 의 값을 보였다. 일방 종양조직으로 인한 포도당 흡수율은 평균 8.95±3.49 $\mu\text{M/hr/gm}$ 이었다. 흡수된 포도당이 호흡 CO₂로 완전 산화된 량은 1 Mole의 포도당이 CO₂로 완전 산화되면 6 Mole의 CO₂를 발생하므로 2.79 μM 의 CO₂를 발생하려면 0.465 μM 의 포도당이 호흡 CO₂로 완전 산화되는 셈이 된다. 따라서 흡수된 포도당이 호흡 CO₂로 완전 산화된 분률 또는 RGDco₂는 단위 시간의 포도당 흡수율과 CO₂로 완전 산화된 포도당량과의 비율로 구한 바 평균 5.1±1.3%의 값을 얻었다. 즉 흡수된 포도당의 대부분이 호흡 CO₂로의 산화과정 이외의 다른 대사 과정에 관여함을 보았다.

C¹⁴-6-포도당의 SA가 5,506 cpm/mgC 이고 포도당 농도는 200 mg%인 배지에 종양 조직을 배양하였을 때 8회 실험에서 얻은 성적은 제 2 표에 종합하였다.

호흡 CO₂의 SA는 평균 56±20 cpm/mgC으로 C¹⁴-1-포도당 배양실험의 값의 6.7%에 불과하며 RSA도 평균 1.02±0.13%로 총 CO₂ 생산물의 1% 내외가 포도당의 C-6-탄소에서 유래되는데 불과하였다.

Table 1. Metabolism of C¹⁴-1-glucose by ehrlich ascites tumors

No. of Exper	Wt. of Tissue	Wt. of BaCO ₃	Oxidative Metabolism								Glucose disappearance rate	RGDco ₂	Conc. of Glycogen
			Radioactivities of Respiratory CO ₂					total CO ₂ prod. rate	CO ₂ derived from C ¹⁴ -Glucose				
			cpm	C Factor	SA of	SA of	RSAco ₂						
					Medium	CO ₂							
g	mg			cpm/mgC	cpm/mgC	%	$\mu\text{M/hr/g}$	$\mu\text{M/hr/g}$	$\mu\text{M/hr/g}$	mg/hr/g	%	mg/g	
1	0.6950	15.1	868	1.62	5,897	1,529	25.9	21.9	5.66	15.27	2.75	6.2	0.647
2	1.9980	30.8	302	2.73	5,897	440	7.5	15.6	1.17	6.35	1.14	3.1	0.409
3	2.4910	26.0	584	2.36	5,897	868	14.7	10.6	1.56	4.89	0.68	5.3	0.356
4	1.4838	34.8	579	3.02	5,897	825	14.0	23.8	3.32	9.42	1.70	5.9	0.106
5	1.4838	32.7	582	2.84	5,897	831	14.2	22.4	3.18	13.64	2.46	3.9	0.114
6	1.9980	31.9	697	2.80	5,897	1,004	17.0	16.2	2.76	6.35	1.14	7.2	0.405
7	2.4910	29.9	339	2.66	5,897	496	8.4	12.2	1.02	4.95	0.89	3.5	0.374
8	1.4838	37.2	572	3.16	5,897	800	13.6	25.4	3.46	9.80	1.77	5.9	0.106
9	1.4838	33.6	538	2.91	5,897	766	13.0	23.0	2.99	9.85	1.77	5.1	0.110
Mean						840	14.3	19.0	2.79	8.95	1.61	5.1	0.292
S.D. (±)						296	5.0	5.5	1.35	3.49	0.67	1.3	0.182

Table 2. Metabolism of C¹⁴-6-Glucose by Ehrlich ascites tumors

No. of Exper	Wt. of tissue	Wt. of BaCO ₃	Oxidative metabolism							Glucose disappearance rate		RGD _{CO₂}	Conc. of Gly cogen
			Radioactivities of respiratory CO ₂				Total CO ₂ prod. rate	CO ₂ derived from C ¹⁴ -Glucose					
			cpm	C factor	SA of Medium	SA of CO ₂			RSA CO ₂	%	μm/hr/gm	μM/hr/g	μM/hr/g
	g	mg		mg	cpm/mgC	cpm/mgC	%	μm/hr/gm	μM/hr/g	μM/hr/g	mg/hr/g	%	mg/g
1	1.9980	23.8	37	2.22	5,506	57	1.04	12.1	0.13	6.06	1.09	0.35	0.405
2	2.5530	27.7	24	2.47	5,506	25	0.64	11.0	0.07	4.66	0.84	0.25	0.370
3	1.5178	31.6	44	2.77	5,506	63	1.15	21.2	0.24	9.22	1.66	0.44	0.119
4	1.5178	32.7	64	2.84	5,506	91	1.65	21.9	0.36	9.33	1.68	0.65	0.122
5	1.9980	28.4	18	2.51	5,506	26	0.47	14.4	0.07	6.28	1.13	0.18	0.409
6	2.5530	32.0	21	2.80	5,506	30	0.54	12.7	0.07	4.66	0.84	0.24	0.374
7	1.5178	33.4	53	2.91	5,506	75	1.35	22.4	0.32	9.25	1.67	0.54	0.122
8	1.5178	35.2	50	3.02	5,506	71	1.28	23.6	0.32	9.33	1.68	0.54	0.144
Mean					5,506	56	1.02	17.4	0.20	7.35	1.32	0.40	0.258
S.D. (±)							20	0.13	5.0	0.11	2.01	0.36	0.132

총 CO₂ 생산물 및 포도당 흡수율은 각각 평균 17.4 ± 5 μM/hr/gm 및 7.35 ± 2.01 μM/hr/gm 로 C¹⁴-1-포도당 배양실험의 값과 비등하였으나 RSA 값이 전자 실험값의 7.1%에 불과하므로 RGD_{CO₂}는 평균 0.4 ± 0.16%로 적은 값을 보였다. 즉 포도당의 C-6-탄소는 C-1-탄소에 비하여 산화 대사과정에 참여율이 무시할 정도로 적음을 지적할 수 있었다.

이상과 같은 C¹⁴-1-포도당 및 C¹⁴-6-포도당 배양 실험에서 포도당의 C-1 및 C-6 탄소 가 호흡 CO₂ 로 완전 산화과정에 참여하는 실험성적을 토대로 하여 중앙조직에 있어서 포도당의 산화경로를 검토하면 다음과 같다.

일반적으로 생체조직에서 포도당의 산화경로는 첫째 Embden Meyerhoff pathway (EMP)의 무기성 대사과정을 걸쳐 이의 중간산물인 3탄화합물이 Tricarboxylic acid cycle (TCA)을 걸쳐 호흡 CO₂ 로 완전산화되는 경로(Krebs, 1943)와 둘째로 Lipman 및 Dichens (Racker, 1954) 등이 발견한 hexose monophosphate pathway (HMP)를 걸쳐 포도당이 6-phosphogluconate로 산화된 다음 포도당의 C-1 탄소가 CO₂ 로 산화되고 pentose-phosphate를 남기는 경로를 들 수 있다.

C¹⁴-1-포도당 배양실험에서 호흡 CO₂ 내의 방사능은 제 1도에서 보는 바와 같이 HMP 및 EMP-TCA 양 경로를 밟아 유래될 수 있으며 양 경로를 밟아 포도당으로부터 생산된 CO₂ 발생물은 총 CO₂ 생산물의 평균 14.3%(RSA)이었다. 일방 C¹⁴-6-포도당 배양 실험에서 호흡 CO₂ 내의 방사능은 포도당이 HMP 경로를 밟아 산화된 CO₂는 포함되지 않고 포도당이 EMP의 무기성 대사를 입고 포도당의 C¹⁴-6 탄소가 pyruvate의 methyl기에 이행한 다음 다시 TCA cycle을 걸쳐 C¹⁴O₂로 산

화된 부분만 관여하므로 이때 측정된 RSA의 평균값 1.02%는 EMP-TCA 경로만 밟아 포도당에서 유래된 CO₂의 생산물을 의미하므로 양 배양 실험에서 얻은 RSA의 평균값의 비율 7.1%는 곧 포도당에서 유래된 CO₂ 발생물에 대한 EMP-TCA Cycle을 통한 CO₂ 발생물의 분율을 보이게 된다. 이러한 계산은 물론 포도당이 EMP-TCA 경로를 밟아 산화할 때 각 탄소의 CO₂로의 분해는 동물 산화를 인는다고 가정하고 중간 대사과정에 있어서 recycling을 고려에 넣지 않고 산출한 결과이다.

중앙조직에서는 포도당의 산화과정에 있어서 대부분의 CO₂는 HMP 경로를 밟아 산화되고 기본적인 해당 경로인 EMP-TCA 경로를 밟은 산화대사가 다른 조직에 비해 현저히 억제됨을 보였다.

흡수된 포도당의 젖산 또는 피루빈산과 같은 중간 대사물질 형성을 관찰하기 위하여 배양 후 균등액내 젖산 및 피루빈산을 정량하여 양 기질의 발생물을 계산한 바 제 3표에서 보는 바와 같이 C¹⁴-1-포도당 배양 실험에서 젖산 발생물은 평균 7.13 ± 1.26 μM/hr/gm, C¹⁴-6-포도당 배양 실험에서 6.48 ± 1.53 μM/hr/gm로 상당한 량의 젖산이 축적 됨을 보였다. 만약에 축적된 젖산이 모두 배지 C¹⁴-포도당에서 기인되었다고 가정하면 1분자의 포도당은 2분자의 젖산을 생산하므로 젖산으로 분해된 포도당 량은 C¹⁴-1-포도당 실험에서 3.57 ± 0.63 μM/hr/gm이 된다. 중앙조직의 포도당 흡수율은 8.94 ± 3.49 μM/hr/gm이므로 흡수된 포도당이 젖산으로 분해한 분률(RGD_L)은 38.0 ± 5.4%를 산출하였다. 같은 방법으로 C¹⁴-6-포도당 배양 실험에서 계산한 RGD_L은 43.1 ± 7.5%이었다. 일방 양 실험에서 얻은 relative

Table 3. Conversion of C¹⁴-glucose into CO₂, lactate and pyruvate

Type of Exper	No. of Case	glucose uptake rate	Lactate			Pyruvate			RGD CO ₂	Total RGD
			appearance rate	glucose equivalent amt.	RGD _L	appearance rate	glucose equivalent amt.	RGD _P		
		μM/hr/gm	μM/hr/gm	μM/hr/gm	%	μM/hr/gm	μM/hr/gm	%	%	%
C ¹⁴ -1-glucose	9	8.95±3.49	7.13±1.26	3.57±0.63	38.0±5.4	0.21±0.02	0.11±0.01	1.23±0.03	5.10±1.30	43.3
C ¹⁴ -6-glucose	8	7.35±2.01	6.48±1.53	3.24±0.77	43.1±7.5	0.19±0.03	0.20±0.02	1.63±0.04	0.40±0.16	45.0

Values are; Mean ±S.D.

glucose disappearance rate into pyruvate (RGD_P), 즉 흡수된 포도당이 피루빈산으로 분해된 분율은 전자에서 1.23±0.03% 후자에서 1.63±0.04%에 불과하였다. 이러한 실험 성적은 중앙조직 당 대사과정에서 EMP의 무기성 대사 경로를 밟아 포도당이 쉽게 2분자의 피루빈산을 형성하지만 TCA cycle을 통한 산화가 억제됨으로 대부분의 피루빈산은 환원되어 젖산으로 축적되는 인상을 주었다.

이상의 실험 성적을 종합하면 C¹⁴-1-포도당 실험에서 흡수된 포도당의 43.3%, C¹⁴-6-포도당 실험에서 45.6%가 호흡 CO₂, 젖산 및 피루빈산으로 분해되었음을 설명할 수 있었으나 나머지 부분의 흡수된 포도당의 운명에 대해서는 구명할 수 없었다.

II 활

일반 생체조직의 당 대사과정은 EMP-TCA 경로에 의거한 기본적인 산화 경로와 포도당의 C-1-탄소가 우선적으로 호흡 CO₂로 산화되는 HMP와 같은 경로를 통하여 이루어진다. EMP-TCA 경로에 의거한 포도당의 분해 과정은 첫 단계로 2분자의 3탄화합물 즉 피루빈산 또는 젖산으로 분해되고 이때 분해된 젖산의 C-1, C-2 및 C-3-탄소는 포도당의 C-3 및 C-4, C-2 및 C-5, C-1 및 C-6-탄소와 일치하므로 본 실험의 C¹⁴-1-포도당 배양 실험에서 얻은 호흡 CO₂의 방사능은 중앙 조직의 당 산화과정에서 HMP 경로를 통하여 C-1-탄소가 산화된 C¹⁴O₂와 EMP 경로를 밟아 피루빈산 또는 젖산으로 분해된 3탄화합물의 C-3-탄소 즉 메칠기에 C¹⁴이 표지되어 TCA cycle을 통하여 산화된 C¹⁴O₂에 기인된 방사능이라고 말할 수 있다. 만약에 TCA cycle을 통한 산화과정에서 3탄화합물의 각 탄소가 동등 산화를 한다고 가정하면 C¹⁴-6-포도당 배양실험에서 얻은 호흡 C¹⁴O₂의 방사능은 포도당의 C-6-탄소가 3탄화합물의 메칠기에 이행하여 EMP-TCA 경로를 밟아 유래된 C¹⁴O₂에 기인된 것이라고 말할 수 있다. 따라서 전자 실험에서 얻은 RSA 값은 양 경로를 밟아 포도당에서 산화된 CO₂

의 총 CO₂ 생산물에 대한 분율을 의미하며 후자 실험에서 측정된 RSA 값은 단순히 EMP-TCA 경로에 의거하여 유래된 CO₂의 총 CO₂ 생산물에 대한 분율을 의미하므로 양 실험의 RSA 값의 비율은 EMP-TCA 경로가 중앙조직의 포도당의 총 산화과정에 관여하는 비율을 보이게 된다. 이러한 계산은 처음 Bloom 등이 간 조직을 이용하여 시도하였고 포도당 대사에 있어서 가역적인 반응으로 인한 recycling 즉 C¹⁴-6-포도당 실험에서 C₁-C₂-C₃-C₄-C₅-C₆ ↔ C¹⁴₃-C₂-C₁+C₁-C₂-C₃ ↔ C¹⁴₁-C₂-C₃-C₄-C₅-C₆와 같은 반응을 걸쳐 포도당의 C-6-탄소가 C-1으로 표지되어 HMP 경로를 밟아 C¹⁴O₂로 산화될 가능성 또는 TCA cycle의 중간 대사물질이 aspartic acid 또는 glutamic acid와 같은 아미노산으로 amination되어 CO₂로 완전 산화되지 않고 TCA cycle에서 이탈되는 가능성을 고려해 놓지 않고 일방적 분해를 입는다는 가정하에 적용되는 계산에 불과하지만 중앙조직에서는 함수탄소의 합성이 현저히 저하된다는 사실(Bloom et al., 1953; Elliott et al., 1935; Elliott et al., 1937)이 증명되었고 실제로 본 실험에서 측정된 바와 같이 당원질의 조직농도가 양 실험에서 0.018% 및 0.013%에 불과한 점(제 1 및 2 표 참조)으로 보아 분해된 포도당의 재합성은 극히 적은 부분에 지나지 않는다고 생각할 수 있으며 Busch 등(1960)의 실험 성적에서 보는 바와 같이 C¹⁴-포도당을 중앙 발생 동물에 주입한 후 중앙 조직내의 TCA cycle의 중간 대사물질에서 기인되는 아미노산을 추출하여 방사능을 측정할 때 C¹⁴의 incorporation이 무시할 정도로 저하되었다는 점으로 보아 일단 TCA cycle에 들어간 중간 대사물질이 다른 기질로 변화되는 가능성이 극히 희소함을 지적할 수 있다. 따라서 Bloom 등(1953)의 계산 원리에서 여러 가정을 제거할 수 있으므로 중앙 조직에서는 비교적 정확한 포도당의 분해 과정을 분류할 수 있었다. 즉 EMP-TCA 경로를 밟아 산화된 포도당은 전 산화포도당의 7.2%에 불과하며 대부분의 포도당은 기본적인 해당경로 이외의 다른 경로 즉 HMP와 같은 경로를 통하여 산화됨을 보았다. 한편 다

른 정상조직의 포도당의 산화경로를 보면 립등(1964)이 측정 한 바와 같이 전산화 포도당의 96.8%가 대뇌 조직에서 약 59%가 신장 조직에서 약 31.8%가 간장 조직에서 EMP-TCA 경로를 밟아 산화되었음을 보았다. 즉 정상조직에 비하여 중앙조직에서는 EMP-TCA 경로를 밟은 해당 경로가 현저히 저하되고 대부분의 포도당이 HMP 와 같은 산화경로에 의거하여 분해됨을 지적할 수 있었다. 특히 에르릿히 복수 중앙조직에서 William 등 (1953)은 glucose-6-phosphate dehydrogenase 및 6-phosphogluconic acid dehydrogenase 와 같은 HMP 경로에 관여하는 효소의 존재를 직접 증명 한 것으로 보아 당 산화에 있어서 HMP 경로가 중앙 조직에서 주요한 대사 경로임은 의심될 바가 없는 것이다.

포도당 소실률을 보면 양 실험에서 평균 8.94 및 7.35 $\mu\text{M/hr/gm}$ 로 대사활동이 가장 활발한 간 또는 대뇌 조직의 값(Chang S.Y. et al., 1962; Chang S.Y. et al., 1963)의 10~20%에 불과하지만 전 개체의 평균 포도당 소모률(Pack, J.I. 1964)에 비하면 상당히 높은 값을 보였다. 즉 중앙 조직의 대사과정은 다른 조직에 비하여 비교적 활발한 편이며 상당한 량의 포도당이 이용됨을 보였다. 그러나 이용된 포도당은 대부분이 젖산으로 축적되고 에너지 대사에는 극히 일부가 관여하는데 불과하였다. 즉 C^{14} -1-포도당 배양 실험에서 RSA 가 평균 14.3%이고 C^{14} -6-포도당 실험에서 1.02%이었으므로 포도당 자체가 호흡 CO_2 로의 에너지 유리에 관한 비율은 다음과 같다. 전자 실험에서 RSA 가 14.3%임은 6개의 포도당탄소가 모두 C-1-탄소와 같이 EMP-TCA 또는 HMP 경로를 밟아 산화되었을 때의 값이고 실제로는 HMP 경로를 밟아 산화되는 탄소는 포도당의 C-1-탄소뿐이므로 EMP-TCA 경로를 밟아 산화된 분율을 $\frac{1}{6}$ 값의 $\frac{1}{6}$ 이 HMP 경로를 밟아 산화된 분율을 표시하게 되므로 평균 RSA 값은 $\frac{14.3-1.02}{6} + 1.02 = 3.2\%$ 의 값을 계산할 수 있다. 즉 총 CO_2 생산물의 3.2%가 포도당에서 기인된 CO_2 에 불과하며 간 및 대뇌 조직의 값의(Chang S.Y. et al., 1962; Chang S.Y. et al., 1963) 약 70%에 비하면 무시할 정도로 저율임을 볼 수 있었다. 즉 상당한량의 포도당이 이용되지만 호흡 CO_2 로의 산화과정은 현저히 억제가 되어 포도당이 관여하는 바 적고 대부분이 젖산으로 축적된다는 사실로 보아 중앙 조직의 당 대사과정에 있어서 무기성 해당 경로인 glycolysis 에는 영향을 받지 않으나 TCA cycl 과 같은 산화과정은 현저히 억제 가 되어 변조를 초래함을 지적할 수 있었으나 억제 기전에 대하여는 본 실험에서 구명할 수 없었다.

총 결

에르릿히 복수 중앙조직을 C^{14} -1-포도당 및 C^{14} -6-포

도당 배지와 함께 따로 균등액으로 만들어 38°C의 항온조에서 1분에 60회 정도의 좌우진탕을 가하면서 3시간 배양하였을 때 포도당 각 탄소의 호흡 CO_2 로의 산화과정 젖산 또는 피루빈산의 생산물 및 당원질로의 합성 과정을 측정하여 다음과 같은 성적을 얻었다.

1. C^{14} -포도당 배양실험에서 총 CO_2 생산물은 $19.0 \pm 5 \mu\text{M/hr/gm}$ 이며 호흡 CO_2 의 SA는 평균 $840 \pm 296 \text{ cpm/mgC}$ 이었다. 배지 C^{14} -1-포도당의 SA와 호흡 CO_2 의 SA와의 비율로 포도당의 C-1-탄소에서 유래된 CO_2 생산물의 총 CO_2 생산물에 대한 분률 즉 RSA를 계산한 바 평균 $14.3 \pm 5\%$ 이었다. 따라서 C^{14} -1-포도당으로부터 생산된 CO_2 발생률은 평균 $2.79 \pm 1.35 \mu\text{M/hr/gm}$ 이었다. 한편 포도당 흡수률은 평균 $8.94 \pm 3.49 \mu\text{M/hr/gm}$ 이었으며 이 중에서 호흡 CO_2 로 완전 산화된 분률 즉 RGDCO_2 는 평균 5.1 ± 1.3 이었다. 젖산 및 피루빈산 발생률은 각각 7.13 ± 1.26 및 $0.21 \pm 0.02 \mu\text{M/hr/gm}$ 의 값을 얻었고 이들 3 탄화합물이 모두 포도당의 분해산물이라고 가정하여 이용된 포도당이 젖산 및 피루빈산으로 분해된 분률 즉 RGDL 및 RGDP 의 값을 계산한 바 흡수된 포도당의 평균 $38.0 \pm 5.4\%$ 가 젖산으로 평균 1.23 $\pm 0.03\%$ 가 피루빈산으로 분해되었다.

C^{14} -1-포도당 배양 실험에서 흡수된 포도당의 약 43.3%가 호흡 CO_2 젖산 및 피루빈산으로 분해됨을 직접 관찰할 수 있었다.

2. C^{14} -6-포도당 배양실험의 성적을 보면 총 CO_2 생산물이 평균 $17.4 \pm 5.0 \mu\text{M/hr/gm}$ 로 전자 실험값과 비등하였으나 RSACO_2 는 현저히 저하되어 평균 $1.02 \pm 0.13\%$ 에 불과하였다. 따라서 배지 포도당에서 유래된 CO_2 발생률도 평균 $0.2 \pm 0.11 \mu\text{M/hr/gm}$ 로 총 CO_2 생산물에 비하여 무시할 정도의 적은 값을 보이므로 포도당의 C-6-탄소는 포도당 산화과정에 기여하는 바 적음을 지적할 수 있었다. 한편 포도당 흡수률, 젖산 및 피루빈산의 발생률은 C^{14} -1-포도당 실험치와 비등하였고 흡수된 포도당의 약 45%가 호흡 CO_2 , 젖산 및 피루빈산으로 분해됨을 계산하였다.

중앙조직내 당원질 농도는 양 실험에서 모두 0.03% 이내로 적은 조직농도를 보였으므로 포도당의 합성과정 이 활발치 못함을 볼 수 있었다.

3. 상기 양 실험에서 측정 한 RSA 값을 이용하여 Bloom 등의 계산원리를 적용하여 포도당의 산화과정에 있어서 대사경로를 분류한 바 중앙조직의 당 대사과정의 산화경로는 기본적인 분해경로인 EMP-TCA 경로를 밟지 않고 포도당에서 유래된 CO_2 는 90% 이상이 HMP와 같은 alternate pathway를 통하여 산화됨을 보였다.

종합적으로 중앙조직에서 당 대사는 포도당 흡수률 및 젖산 축적률이 큰데도 불구하고 호흡 CO_2 로의 산화

과정은 현저히 억제되어 총 산화 에너지의 3.2%가 포도당이 관여하는데 불과한 점으로 보아 무기성 해당 경로인 glycolysis는 정상적으로 이루어지나 TCA cycle과 같은 유기성 대사경로가 억제되는 인상을 받았다.

REFERENCES

- Algire, G.H., and Chalkley, H.W.: *Vascular reactions of normal and malignant tissues in vivo*. *J. Natl. Cancer Inst.* 6:73-86, 1945.
- Barker, S. B. and Summerson, W. H.: *Colorimetric determination of lactic acid in biological material*. *J. Biol. Chem.* 138:535, 1941.
- Bloom, B., Stetten, M.R., and Stetten, D.: *Evaluation of catabolic pathways of glucose in mammalian system*. *J. Biol. Chem.* 204:681, 1953.
- Busch, H., Hurlbert, R. B., and Potter, V. R.: *Anion exchange chromatography of the citric acid cycle*. *J. Biol. Chem.* 717-727, 1952.
- Busch, H.: *Studies on the metabolism of Acetate-1-C¹⁴ in tissues of tumor-bearing rats*. *Cancer Research* 13:789-794, 1953.
- Busch, H., Fujiwara, E., and Keer, L.M.: *Metabolic patterns for glucose-1-C¹⁴ in tissues of tumor-bearing rats*. *Cancer Research* 20:50-57, 1960.
- Chang, S.Y., Chang, K.Y. and Rhee, S.D.: *Effects of the concentration of medium glucose on glucose disappearance and oxidative metabolism by liver slices of rats*. 1962.
- Chang, S.Y., Chang, K.Y. and Rhee, S.D.: 정상 및 Alloxan 당뇨병 흰쥐의 뇌절편에 있어서 C¹⁴-초성 포도당 및 포도당의 대사에 관한 실험적 연구 1963.
- Cori, C.F., and Cori, G.T.: *The carbohydrate metabolism of tumors. I. The free sugar, lactic acid and glycogen contents of malignant tumors*. *J. Biol. Chem.* 64:11-22, 1925a.
- Cori, C.F., and Cori, G.T.: *The carbohydrate metabolism of tumors. II. Changes in the sugar, lactic acid and CO₂-combining power of blood passing through a tumor*. *J. Biol. Chem.* 65:397-405, 1925b.
- Elliott, K.A.C., Benoy, M. P., and Baker, Z.: *The metabolism of lactic and pyruvic acids in normal and tumor tissues. II. Rat kidney and transplantable tumors*. *Biochem. J.* 28:1937-1950, 1935.
- Elliott, K.A.C., and Grieg, M.E.: *The metabolism of lactic acid and pyruvic acid in normal and tumor tissues. IV. The formation of succinate*. *Biochem. J.* 31:1021-1032, 1937.
- Friedemann, T.E., and Haugen, G.E.: *Pyruvic acid. II. The determination of keto acid in blood and urine*. *J. Biol. Chem.* 147:415, 1943.
- Goldblatt, H., and Cameron, G.: *Induced malignancy in cells from rat myocardium subjected to intermittent anaerobiosis during long propagation in vitro*. *J. Exptl. Med.* 97:525-552, 1953.
- Good, C. A., Kramer, H., and Somogyi M.: *The determination of glycogen*. *J. Biol. Chem.* 100:485, 1933.
- Jedeikin, L.A., and Weinhouse, S.: *Metabolism of neoplastic tissue. VI. Assay of oxidized and reduced diphosphopyridine nucleotide in normal and neoplastic tissues*. *J. Biol. Chem.* 213:271-280, 1955.
- Krebs, H.: *Advance in Enzymol.* 3:191, 1943.
- Lim, S.C.: 토끼 각 조직에 있어서 C¹⁴-포도당의 산화 대사 경로의 비교에 관한 실험 1964.
- Nelson, Norton.: *A photometric adaption of the Somogyi method for the determination of glucose*. *J. Biol. Chem.* 153:375, 1944.
- Nyhan, W.L., and Busch, H.: *Metabolic patterns for L-glutamate-U-C¹⁴ in slices of tumors and other tissues*. *Cancer Research* 16:227-234, 1957.
- Pack, J.I.: 정상건의 C¹⁴-포도당 대사 1961.
- Potter, V.R., and Dubois, K.P.: *Biocatalysis in cancer tissue. I. Cytochrome C*. *Cancer Research* 2:290-293, 1942.
- Pottor, V.R., Schneider, W.C.: *Biocatalysts in cancer tissue. III. Succinic dehydrogenase and cytochrome oxidase*. *Cancer Research* 3:353-357, 1943.
- Racker, E.: *Advance in Enzymol.* 15:141, 1954.
- Somogyi, N.: *A new reagent for the determination of sugars*. *J. Biol. Chem.* 160:61, 1945.
- Tannenbaum, A.: *The cancer investigator, an evaluation*. *Cancer Research* 17:547-550, 1957.
- Van Slyke, D.D., and Folch, J.: *Manometric carbon*

- determination. *J. Biol. Chem.* 136:509, 1940.
- Warburg, O., Posener, K., and Negelein, E.: *Über den Stoffwechsel der Carcinomzelle.* *Biochem. Z.* 152:309-344, 1924.
- Warburg, O., Wind, F., and Negelein, E.: *Über den Stoffwechsel von Tumoren im Körper.* *Klin. Wochschr.* 5:829-832, 1926.
- Warburg, O.: "Metabolism of Tumors." *New York, Smith, 1931.*
- Warburg, O.: *On the origin of cancer cells.* *Science* 123:309-314, 1956.
- Weinhouse, S.: *Oxidative metabolism of neoplastic tissues.* *Advances in Cancer Research* 3:269-325, 1955.
- Williams-Ashman, H.G.: *Studies on the Ehrlich ascites tumor. II. Oxidation of hexose phosphates.* *Cancer Research* 13:721-725, 1953.