

# 한냉적응이 Adenyl Cyclase Activity 에 미치는 영향

연세대학교 의과대학 생리학교실

강 복 순 · 이 상 호\* · 강 두 희

= Abstract =

## Adenyl Cyclase Activity in Cold-acclimatized Animals

Bok Soon Kang, M.D., Sang Ho Lee, M.D., D.M. Sc.,  
and Doo Hee Kang, M.D., Ph.D.

*Department of Physiology, Yonsei University College of Medicine*

The object of this research is aimed to determine the activity of adenyl cyclase in both skeletal muscle sarcolemma and fat cell ghost of epididymal adipose tissue isolated from rats exposed to cold for various length of time in an attempt to evaluate whether the tissue sensitivity to catecholamine is increased when rats are exposed to cold for long periods of time.

### Methods:

#### a) Animals:

Albino rats ranging in weight from 150 to 200 gm were used throughout this study. For experimental purposes, the rats are divided into two groups: experimental animals were placed in a cold room at 4°C, controls being kept at 25°C. At the end of 2, 4, 6, 12, and 16 weeks exposure to cold the rats were used to measure the adenyl cyclase activity.

#### b) Isolation of plasma membrane from skeletal muscle and adipose tissue:

The plasma membrane of skeletal muscle from hind limbs of rats are prepared by the method employed by Rosenthal et al. and fat cell ghost of epididymal adipose tissue of rats by the method employed by Rodbell.

#### c) Adenyl cyclase assay:

Adenyl cyclase activity were measured by the method employed by Marinetti et al. Briefly, plasma membrane was incubated with <sup>3</sup>H-ATP, various amount of noradrenaline and other incubation mixture at 37°C for 20 minutes. After stopping the enzyme reaction by immersion in boiling water, carrier 3', 5'-AMP was added to the system as a marker and 100 μl aliquots of incubation mixture were pipetted on 20×20 Whatman No. 3 MM filter paper for one dimensional chromatography. The cyclic AMP spots were cut off and placed in counting vials containing 10 ml of Bray's scintillation cocktail. Radioactivity was determined with a Packard Tri-Carb liquid scintillation counter. The enzyme activity is expressed as nanomoles of cyclic AMP produced per

\* 부산대학교 의과대학 생리학교실

이 연구는 1973년도 연세대학교 의과대학 교수연구비와 CMB grant (grant No. 72-238)에 의하여 이루어 졌음.

mg of membrane per hour.

#### Results:

1. Average adenyl cyclase activity in the plasma membrane of skeletal muscle before and after noradrenaline administration was significantly higher in the cold-exposed rats as compared to the control. Continuous exposure to cold produced an increased adenyl cyclase activity before and after noradrenaline administration. Adenyl cyclase activity reached peak levels at the 6 weeks exposure to cold and level of adenyl cyclase activity remained high.

Noradrenaline administration to the incubation medium induced a significant increase in adenyl cyclase activity and the degree of stimulation were proportional to the hormonal concentration. But the rate of increment in adenyl cyclase activity by noradrenaline was the same in both groups.

2. Adenyl cyclase activity in fat cell ghost between cold exposed and control rats showed no significant differences before and after noradrenaline administration.

In summary, it can be concluded that cold adaptation give rise an increased activity of adenyl cyclase in plasma membrane of skeletal muscle in rats.

## I. 서 론

실험동물을 한냉 환경에 노출시키면 여러가지 적응 현상이 나타나는데 그중에서도 calorogenic 반응중 nonshivering thermogenesis에 의한 열생산이 증가되는 것이 보고되었다<sup>(6,7,14,28)</sup> 또 이 nonshivering thermogenesis의 존재는 noradrenaline의 calorogenic action과 밀접한 관계가 있다는 것도 이미 여러 연구자들에 의하여 입증되었다<sup>(4,5,8-13,15,25)</sup>. 이런 한냉적응 형태는 한냉노출 정도에 따라서 다르게 나타나는데 실험동물을 한냉환경에 급격히 노출시키면 부신에서의 catecholamine 합성 및 유리가 증가되고 또 노로 배설되는 catecholamine의 양도 증가된다<sup>(15-17,24,31)</sup>. 그러나 실험동물을 한냉환경에 장기간 노출시켜 한냉적응이 일어난 상태에서는 노중에 배설되는 catecholamine의 양은 오히려 감소되고 조직에서 산소 소모량과 nonshivering thermogenesis에 의한 열생산이 증가되고 또 한냉적응된 동물의 정맥내로 noradrenaline을 관류하면 noradrenaline에 대한 조직의 민감도가 대조군에 비하여 현저히 증가되어 있음을 보고하였다<sup>(5,15)</sup>. 1965년 Michael 등<sup>(29)</sup>도 한냉적응된 토끼의 정맥내에 catecholamine을 관류한 결과 brown adipose tissue에서 산소 소모량과 열생산이 증가됨을 보고하였다. 1969년 Lutherer<sup>(20)</sup> 등은 갑상선 기능이 저하된 쥐를 한냉환경에 노출시켰을때 체온의 하강은 대조군에 비하여 현저히 빠르는데 반하여 노중에 배설되는 catecholamine의 양은 대조군에 비하여 의외로 높음을 보고

하였다.

이런 사실은 catecholamine에 대한 조직의 민감도가 저하되었기 때문이라고 하였다. 이러한 동물에 thyroxine이나 theophylline을 투여하고 한냉환경에 노출시키면 노중에 배설되는 catecholamine의 양은 감소되므로 이는 약물 투여가 catecholamine에 대한 조직의 민감도를 다시 증가시켰음을 시사한다고 하였다.

이상의 성적들을 미루어 한냉적응은 조직에서 ATP (adenosine triphosphate)를 3',5',-cyclic, AMP(3',5', cyclic adenosine monophosphate, c-AMP)로 전환시키고 phosphorylase를 활성화 시키는 효소인 adenyl cyclase의 조직 level을 증가시킬 가능성이 있으리라는데 착안하여 본 실험에 착수하였다.

## II. 실험재료 및 방법

### A. 실험동물

체중 150내지 200g 되는 수 흰쥐(Sprague Dawley)를 실험동물로 하였다.

실험은 실험군과 대조군의 두 군으로 나누어 시행하였는데, 실험군은 4°C로 조절된 냉동실에, 대조군은 25°C 내외의 실온에서 인공사료와 물로 일정기간 사육하여 실험에 사용하였다.

실험은 한냉노출후 부터 2주, 4주, 6주, 12주 및 16주 간격으로 실험군과 대조군 자기 10마리에 해당되는 흰쥐의 하지골격근과 epididymal adipose tissue를 절제하여. 이들에게 세포막을 분리하여 adenyl cyclase

의 activity를 측정하였다.

## B. 실험방법

### 1. 골격근에서 세포막의 분리

골격근에서 세포막의 분리는 Rosenthal 등의 방법에 준하였다<sup>27)</sup>. 즉 실험군과 대조군의 흰쥐를 마취없이 희생시킨 후 신속히 하지 골격근을 절제하여 근막과 지방을 제거한 후 35 g를 평량하여 0°C로 냉각된 50 mM CaCl<sub>2</sub> 용액 100 ml에 골격근을 담그어 Waring Blendor로 10초간 homogenization하고 이 homogenates를 cheesecloth를 통하여 여과한 후 여과액은 sorvall superspeed RC2-B Automatic Refrigerated Centrifuge (SS-34 Rotor, Ivan Sorvall Inc. Newtown, Connecticut)로 4°C에서 3,000×g로 5초간 원심분리 하고 이때 생긴 침전물은 80 ml의 KCl Buffer(45 mM KCl, 30 mM KHCO<sub>3</sub>, 2.5 mM DL-histidine monohydrochloride, pH 7.8)에 부유시켜 4°C에서 3,000×g로 5초간씩 3회 원심분리 하였다. 이때 생긴 상층액은 버리고 침전물에 다시 80 ml의 KCl Buffer를 가하여 37°C로 조절된 수조에서 30분간 incubation 하고, incubation된 용액을 얼음에 5분간 세워둔 후 분리된 상층액은 버리고 침전물은 320 ml의 KCl Buffer에 다시 부유시켜 다시 얼음에 세워 상층을 분리하였다. 이 조작을 4회 반복했다. 이때 골격근 세포내 성분이 파괴된 sarcolemma를 통하여 분리 제거되었다. 침전물은 320 ml의 재증유수에 부유시켜 얼음에 5분간 방치하여 세포막을 swelling시켜 세포내 성분이 완전히 빠져나오도록 하고, 상층액은 버리고 침전물은 2.5×10<sup>-7</sup>N의 NaOH 용액에 부유시켜 4°C에서 3,000×g로 15초간 원심분리하여 상층액은 버리고 이 조작을 한번 더 반복하여 sarcolemmal tubule을 분리하였다. 분리된 sarcolemmal tubule의 단백질 농도는 Lowry 씨 법에 준하여 측정하였다<sup>19)</sup>.

### 2. Epididymal Adipose Tissue에서 Fat cell Ghost의 분리

Epididymal adipose tissue에서 fat cell ghost의 분리는 Rodbell 씨 등의 방법으로 하였다<sup>28)</sup>.

실험군과 대조군의 흰쥐에서 epididymal adipose tissue를 절제하고, 조직 1 gm 당 1% albumin buffer (124 mM NaCl, 4.0 mM KCl, 2.0 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.0 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2.5 mM Tris-HCl, 1% Bovine Albumin, pH 7.4) 3 ml와 10 mg의 collagenase를 가하여 37°C로 조절된 수조에서 1시간 동안 incubation하여 sorvall centrifuge(SS-34 Rotor)로

4°C에서 400×g로 1분간 원심분리한 후, 하층액은 버리고 상층에 부유된 지방세포를 1% albumin buffer에 다시 부유시켜 400×g로 1분간씩 3회 원심분리하여 지방세포를 얻었다. 분리된 지방세포는 5 ml의 lysing medium(2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM KHCO<sub>3</sub>, 2 mM Tris-HCl, 2.5 mM ATP, pH 7.4)에 부유시켜, 부유액이 든 시험관을 3초 간격으로 20회 상하로 흔들어 지방세포를 swelling시킨 후 sorvall centrifuge로 4°C에서 200×g로 1분간 원심분리하여 혼탁한 하층액을 모았다. 이 조각은 지방세포의 swelling이 더 이상 일어나지 않을 때까지 반복하였다. 이상에서 얻은 하층액을 4°C에서 900×g로 15분간 원심분리하여 상층액은 버리고 침전물은 1 mM KHCO<sub>3</sub>용액에 부유시켜 4°C에서 900×g로 15분간 원심분리 하여 fat cell ghost를 얻었다.

Fat cell ghost의 단백질 농도는 Lowry 씨 법으로 측정하였다<sup>19)</sup>.

### 3. Adenyl Cyclase Activity의 측정

Adenyl cyclase activity의 측정은 Marinetti 씨 법에 준하였다<sup>22)</sup>. 즉 150 μg의 단백질에 해당되는 골격근 세포막 또는 fat cell ghost에 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Theophylline, 10 mM NaF, 5 mM Caffeine, 25 mM Tris-HCl, 0.1% Bovine Albumin, 2.5 mM ATP와 25 μC의 <sup>3</sup>H-ATP(specific activity; 531 mC/mM)가 포함되어 있고, pH 7.4로 고정된 incubation medium을 가하여 37°C로 조절된 수조에서 20분간 incubation하였다. Incubation이 끝나면 이 용액에 70 μg의 3',5', cyclic-AMP(c-AMP)를 가한 후 끓는 물에 3분간 담그어 enzyme의 반응을 정지시키고, 얼음에 담그어 냉각시켰다. 이 용액 100 μl를 취하여 20×20의 Whatman No. 3MM filter paper에 옮기고 isopropyl alcohol: conc NH<sub>4</sub>OH: H<sub>2</sub>O를 7:2:1의 비율로 혼합한 용매에 담그어 c-AMP를 분리하여 ultraviolet lamp로 이 c-AMP spot를 찾아 잘라내어 이를 counting vial에 넣고 이 vial에 Bray 씨 용액<sup>1)</sup> 10 ml를 가하여 Packard Tri-Carb liquid scintillation spectrometer(Model 3320, Packard Instrument Co., Inc.)로 방사능을 측정하였다.

Adenyl cyclase의 activity는 단백질 1 mg 당 한시간 동안에 형성된 c-AMP를 nanomoles로 표시하였다.

동일한 실험을 실험군과 대조군의 골격근 세포막과 fat cell ghost에 10<sup>-7</sup>, 10<sup>-6</sup>, 10<sup>-5</sup> 및 10<sup>-4</sup> M의 noradrenaline을 첨가했을때 adenyl cyclase activity의 변화 양상을 관찰하였다.

III. 실험성적

A. Incubation 시간과 c-AMP 형성량과의 관계

골격근의 세포막에서 형성되는 c-AMP의 양과 incubation 시간과의 상호관계는 제 1도에 나타낸 바와 같다.

Adenyl cyclase의 activity는 일정하더라도 incubation 시간에 따라 형성되는 c-AMP의 양은 다르게 나타났는데 incubation 5분 때에는 14 n moles/mg 단백질, 10분 때에는 34 n moles/mg 단백질, 15분 때에는 45 n moles/mg 단백질, 그리고 20분 때에는 58 n moles/mg 단백질로서 incubation 시간이 길어짐에 따라 c-AMP의 형성량은 직선적으로 증가하고 있으나 incubation 시간 30분대에 가서는 c-AMP 형성은 직선적이 아니고 saturation phenomenon을 보여 주었다. 따라서 본 실험에서는 incubation 시간을 20분으로 고정하였다.

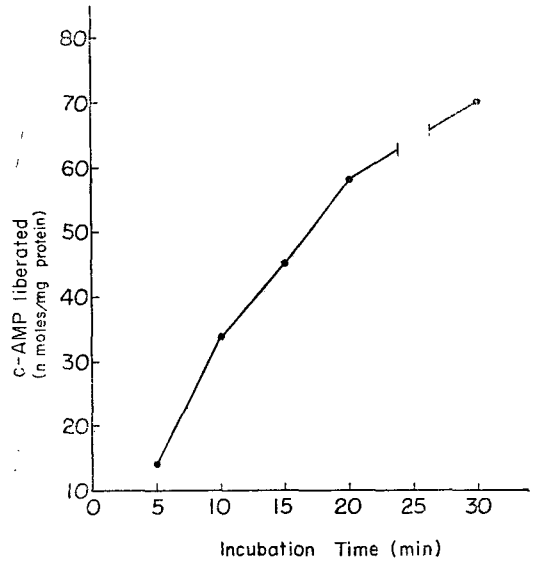


Fig. 1. Amount of c-AMP formed by varying incubation period of time.

B. 한냉자극이 골격근 세포막의 Adenyl Cyclase

Activity에 미치는 영향

한냉 적응된 흰쥐와 대조군 흰쥐의 골격근 세포막에서 noradrenaline 투여 전과 투여 후에 있어서 c-AMP 형

성량은 제 1 표에 나타낸 바와 같다.

한냉 노출 후 2주에 noradrenaline 투여전 c-AMP 형성량은 실험군이 40 n moles/mg 단백질/hr.이고 대

Table 1. Effect of different exposures of environmental temperatures on adenyl cyclase activity in skeletal muscle sarcolemma before and after noradrenaline administration.

한냉노출기간 (주)	군	Adenyl Cyclase Activity(n moles/mg protein/hr)				
		N · A 투 여 전	Noradrenaline 농도(Molarity)			
			10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-4</sup>
2	대 조 군	36±2.5	41±3.5	51±4.6	66±5.2	70±4.7
	실 험 군	40±3.1	48±4.0	59±5.1	75±3.6	78±2.5
	P	>0.1	>0.1	>0.1	>0.1	>0.1
4	대 조 군	51±1.2	62±2.6	75±3.7	95±4.4	96±0.7
	실 험 군	60±2.6	70±1.5	91±3.5	107±1.4	108±1.5
	P	<0.02	<0.02	<0.05	<0.05	<0.05
6	대 조 군	68±2.6	80±2.5	97±0.9	112±2.5	118±3.0
	실 험 군	77±1.0	94±1.1	117±2.5	130±3.5	140±2.5
	P	<0.01	<0.01	<0.01	<0.02	<0.05
12	대 조 군	64±2.0	77±4.4	96±4.2	119±7.6	120±1.4
	실 험 군	83±3.5	94±3.6	125±5.5	145±7.7	148±3.5
	P	<0.01	<0.02	<0.01	<0.05	<0.001
16	대 조 군	65±2.6	78±3.7	98±3.5	117±8.7	121±7.4
	실 험 군	84±5.0	97±2.0	124±4.5	150±8.0	145±6.5
	P	<0.01	<0.01	<0.01	<0.02	<0.05

P: 실험군과 대조군의 평균치 간의 P 값을 말함.  
NA: Noradrenaline

**Table 2. Effect of different exposures of environmental temperatures on adenylyl cyclase activity in fat cell ghosts before and after noradrenaline administration.**

한냉 노출기간 (주)	군	Adenylyl Cyclase Activity(n moles/mg protein/hr.)				
		N A 투 여 전	Noradrenaline 농도(Molarity)			
			10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-4</sup>
2	대 조 군	1.0±0.3	3.6±0.5	9.6±1.6	15.3±1.5	19.1±1.0
	실 험 군	1.3±0.5	3.3±0.3	8.4±1.1	14.3±1.5	19.2±1.1
	P	>0.1	>0.1	>0.1	>0.1	>0.1
4	대 조 군	1.0±0.2	3.0±0.6	8.8±1.3	13.5±1.5	19.2±0.8
	실 험 군	1.2±0.4	3.0±0.4	9.9±0.9	15.3±2.3	18.5±1.3
	P	>0.1	>0.1	>0.1	>0.1	>0.1
6	대 조 군	1.2±0.4	3.3±0.7	9.0±1.3	15.3±1.7	18.3±0.6
	실 험 군	1.4±0.4	3.6±0.5	10.8±2.0	16.0±1.0	18.5±0.4
	P	>0.1	>0.1	>0.1	>0.1	>0.1
12	대 조 군	1.1±0.3	3.6±0.4	9.0±0.7	13.5±1.8	16.4±1.5
	실 험 군	1.2±0.1	3.0±0.9	9.6±0.8	15.0±2.5	17.5±1.5
	P	>0.1	>0.1	>0.1	>0.1	>0.1
16	대 조 군	1.1±0.2	4.2±1.0	10.2±2.9	13.5±1.6	15.0±1.2
	실 험 군	1.3±0.5	3.6±0.6	9.0±2.3	14.2±1.2	16.0±0.8
	P	>0.1	>0.1	>0.1	>0.1	>0.1

P: 실험군과 대조군의 평균치 간의 P 값을 말함  
NA: Noradrenaline

조군이 36 n moles/mg 단백질/hr.로 실험군이 대조군보다 약간 높은치를 보였으나 유의 있는 차이는 아니었다. 10<sup>-7</sup>, 10<sup>-6</sup>, 10<sup>-5</sup> 및 10<sup>-4</sup> M의 noradrenaline을 첨가하였을 때 c-AMP 형성량은 첨가하기전에 비하여 그 농도가 증가함에 따라 직선적으로 양군에서 공히 증가하였으나 양군 사이에는 유의 있는 차이가 없었다. 한냉 노출 기간을 연장하여 c-AMP 형성량을 측정한다 한냉 노출 후 4주에 와서는 noradrenaline 투여전 c-AMP의 양은 대조군이 51 n moles/mg 단백질/hr., 실험군은 60 n moles/mg 단백질/hr., 한냉노출 후 6주에는 noradrenaline 투여전 대조군이 68 n moles/mg 단백질/hr.이고 실험군이 77 n moles/mg 단백질/hr., 한냉 노출 12주에 noradrenaline 투여전 대조군은 64 n moles/mg 단백질/hr.이고 실험군은 83 n moles/mg 단백질/hr., 16주에 noradrenaline 투여전 대조군은 65 n moles/mg 단백질/hr., 실험군은 84 n moles/mg 단백질/hr.로서 장기간의 한냉 노출로 한냉 적응이 일어나므로서 c-AMP 형성량은 증가되는 것을 알 수 있었다. Noradrenaline 투여로 adenylyl cyclase activity의 활성화로 c-AMP 형성량은 양군에서 모두 동일한 율로 농도에 비례하여 증가하였는데 그 증가율은 10<sup>-6</sup>M과

10<sup>-5</sup>M에서 가장 높았다.

**C. 한냉 자극이 Fat Cell Ghost의 Adenylyl Cyclase Activity에 미치는 영향**

한냉 적응된 흰쥐의 epididymal adipose tissue의 fat cell ghost에서 noradrenaline 투여전과 투여후에 있어서 c-AMP 형성량은 제 2 표에 나타난 바와 같다. 이 표에서 보는 바와 같이 fat cell ghost에서 c-AMP 형성량은 실험군이나 대조군 사이에 차이를 볼 수 없었으며, 한냉 노출 기간을 연장 시키더라도 c-AMP 형성량의 증가는 볼 수 없었다. Noradrenaline을 투여 하므로서 c-AMP 형성량은 투여전에 비하여 농도에 비례하여 점차 증가하였으며 골격근 세포막에서와 마찬가지로 그 증가율은 10<sup>-6</sup> 및 10<sup>-5</sup>M의 noradrenaline 첨가시에 가장 높았다.

**IV. 고 찰**

실험동물을 한냉 환경에 노출하는 경우 체온을 정상으로 유지하기 위하여 여러가지 적응 현상이 오는데 이중 catecholamine이 중요한 역할을 한다는 것은 여

러 연구자들에 의하여 이미 입증되었다<sup>4,5,8-13,15,20</sup>). 즉 실험동물이 한냉 환경에 노출되면 한냉노출 초기에는 shivering thermogenesis 에 의하여 열생산을 증가시키고<sup>7</sup>), 한냉 환경에 장기간 노출되어 한냉 적응현상이 일어나게 되면 shivering thermogenesis 에 더하여 소위 nonshivering thermogenesis 에 의한 열생산이 이루어지므로서 체온이 유지된다는 것이 보고되었다.<sup>6,28</sup>) 이와 같은 nonshivering thermogenesis 에 의한 열생산에는 noradrenaline 의 calorogenic action 과 밀접한 관계가 있음이 실험적으로 입증되었다.<sup>5,8,10,13</sup>) Noradrenaline 의 calorogenic action 의 크기는 한냉 적응의 정도에 많이 좌우된다고 한다<sup>9,13,15,18</sup>). 그런데 실험동물을 한냉 환경에 급격히 노출하였을 때는 부신에서 catecholamine 의 합성과 유리가 증가되고 노르 배설되는 catecholamine 의 양도 많으나<sup>5,15-17,24,31</sup>), 만일 한냉 적응이 형성된 동물에서는 노중으로 배설되는 catecholamine 의 양은 감소되고<sup>15</sup>) 반면에 조직에서의 산소 소비량과 nonshivering thermogenesis 에 의한 열생산량은 증가된다고 한다<sup>5,15</sup>). 또 한냉 적응이 일어난 동물의 정맥내에 noradrenaline 을 관류하면 noradrenaline 에 대한 조직의 민감도가 높아진다는 사실도 보고되었다<sup>5,15,23</sup>).

Catecholamine 은 ATP 를 c-AMP 로 전환시키는 효소인 adenyl cyclase 의 활성도를 활성화시켜 조직에서 c-AMP 의 형성량을 증가시키는 작용이 있다<sup>30</sup>). 그러므로 adenyl cyclase 의 activity 가 catecholamine 으로 촉매되어 c-AMP 의 조직 level 에서의 증가는 한냉 자극을 방어하고 체온을 유지하는데 일련의 연관성이 있으리라는 보고도 있다<sup>20</sup>). 이러한 사실을 입증하는 실험이 Maickel<sup>21</sup>등과 Smith 등<sup>29</sup>)에 의하여 보고되었는데 이들은 한냉 노출시의 체온 조절의 일부는 thyroid hormone 과 catecholamine 의 상호작용으로 이루어진다고 하였다. 갑상선 기능이 저하된 동물에서는 조직내 adenyl cyclase 의 양이 떨어지고 따라서 이때는 catecholamine 분비가 정상으로 이루어지더라도 c-AMP 의 형성이 감소될 것이라고 추측하였다. 이러한 경우 동물에서는 한냉 자극의 방어기전이 결핍 될 것이고 또한 조직내 adenyl cyclase 의 감소는 catecholamine 에 대한 조직의 민감도를 억제하리라고 추측하였다<sup>23</sup>).

본 실험에서 흰쥐를 4°C 의 냉동실에 2주, 4주, 6주, 12주 및 16주간 노출시켜 한냉 자극의 정도를 달리하여 한냉 적응을 일으킨 후 흰쥐의 하지 골격근의 세포막과 fat cell ghost 에서 adenyl cyclase 의 activity

를 측정 한 바 한냉 적응이 일어난 상태에서는 adenyl cyclase 의 activity 가 대조군에 비하여 높은 것을 알 수 있었다.

한냉 노출 후 2주의 경우, 실험군이 대조군에 비하여 noradrenaline 투여전이나 투여후에 있어서 adenyl cyclase 의 activity 가 높았으나 유의 있는 차이는 아니었다. 그러나 한냉 노출 후 4주에는 2주의 것에 비하여 adenyl cyclase 의 activity 는 noradrenaline 투여전이나 투여후에 있어서 높은치를 보였으며 이러한 증가는 한냉 노출기간을 6주, 12주 그리고 16주로 연장하므로써 4주의 것에 비하여 adenyl cyclase 의 activity 가 증가되고 있음을 알 수 있었다. 그러나 한냉 노출 6주에 adenyl cyclase 의 activity 는 최고치를 나타내고, 12주나 16주로 한냉 노출 기간을 연장하더라도 adenyl cyclase 의 activity 는 6주의 것과 별 차이가 없었다.

한냉적응현상은 한냉 노출 4주간이면 이루어진다고 한다<sup>13</sup>). 그러므로 본 실험에서 adenyl cyclase 의 activity 가 한냉 노출 6주까지는 점차 증가하다가 6주 이상을 한냉에 노출하더라도 더 이상 증가되지 않은 것은 한냉적응이 이루어지기까지는 조직에서 adenyl cyclase 의 activity 가 점차 증가되고 일단 한냉적응이 이루어지면 더 이상 증가되지 않음을 시사하여 주고 있다고 본다. 따라서 장기간의 한냉 노출로 한냉 적응이 이루어지는 경우 적응현상의 하나로 골격근 세포막에서 adenyl cyclase 의 activity 가 증가된다는 사실을 본 실험을 통하여 알 수 있었다.

골격근 세포막과는 달리 white fat tissue 인 epididymal adipose tissue 의 fat cell ghost 에서는 한냉 자극으로 adenyl cyclase activity 는 증가되지 않았다. 그러나 brown fat tissue 에서 한냉 자극이 adenyl cyclase 의 activity 를 증가시키는지 여부를 실험하는 것은 흥미있는 사실이나 brown fat tissue 는 그양이 워낙 적어서 fat cell ghost 를 분리하기가 곤란하여 본 실험에서 측정하지는 못하였으나 한번 시도해 볼만한 문제라고 생각되는 바이다.

## V. 결 론

체중 150내지 200 g 되는 흰쥐를 대조군은 25°C 의 실험실에 실험군은 4°C 의 냉동실에 노출하여, 한냉 노출 후 2주, 4주, 6주, 12주 및 16주에 하지골격근의 세포막과 epididymal adipose tissue 의 fat cell ghost 에서 adenyl cyclase 의 activity 를 측정하여 다음과

같은 결과를 얻었다.

1. 골격근 세포막에서 adenylyl cyclase 의 activity 는 실험군이 대조군에 비하여 noradrenaline 투여전이나 투여후에 있어서 한냉 노출 전기간을 통하여 높은치를 보였는데 한냉 노출 2주의 것만 제외하고 양군간에는 의의 있는 차이를 보여 주었다. Adenylyl cyclase 의 activity 는 한냉 노출 기간을 연장 하므로써 점차 증가하여 한냉 노출 6주에 최고치를 보이고 12주나 16주의 것은 6주와 별차이가 없었다.

Noradrenaline 투여로 인한 adenylyl cyclase activity 의 증가는 실험군이나 대조군 모두 동일한 율로 증가하였다.

2. Fat cell ghost 에서는 실험군이나 대조군 사이에서 adenylyl cyclase activity 의 차이는 관찰할 수 없었다.

이상의 성적을 미루어 장기간의 한냉 노출로 한냉적응이 이루어지는 경우 골격근 세포막에서 adenylyl cyclase 의 activity 가 증가된다는 것을 알 수 있었다.

### REFERENCES

- 1) Bray, G.A.: *A simple efficient liquid scintillation for counting aqueous solutions in a liquid scintillation counter. Anal. Biochem.* 1:279, 1960.
- 2) Birnbaumer, L., Pohl, S.C. and Rodbell, M.: *Adenylyl cyclase in fat cells. I. Properties and the effects of adrenocorticotropin and fluoride. J. Biol. Chem.* 244:3468, 1969.
- 3) Brodie, B.B., Davies, J.I., Hynie, S., Krishna, G. and Weiss, B.: *Interrelationships of catecholamines with other endocrine systems. Pharmacol. Rev.* 18:273, 1966.
- 4) Cottle, W.H.: *Calorigenic response of cold-adapted rabbits to adrenaline and to noradrenaline. Can. J. Biochem. Physiol.* 41:1334, 1963.
- 5) Depocas, F.: *The calorigenic response of cold-acclimated white rats to infused noradrenaline. Can. J. Biochem. Physiol.* 38:107, 1960.
- 6) Hart, J.S., Heroux, O. and Depocas, F.: *Cold acclimation and the electromyogram of unanesthetized rats. J. Appl. Physiol.* 9:404, 1966.
- 7) Hart, J.S., and Jansky, L.: *Thermogenesis due to exercise and cold in warm-and cold-acclimated rats. Can. J. Biochem. Physiol.* 41:629, 1963.
- 8) Heroux, O.: *Metabolic adjustment to low temperature in New Zealand white rabbits. Can. J. Physiol. Pharmacol.* 45:451, 1967.
- 9) Hemingway, A., Price, W.M. and Stuart, D.: *The calorigenic action of catecholamines in warm acclimated and cold acclimated nonshivering cats. Intern. J. Neuropharmacol.* 3:495, 1964.
- 10) Hsieh, A.C.L. and Carlson, L.D.: *Role of adrenaline and noradrenaline in the control of chemical regulation of heat production. Am. J. Physiol.* 190:243, 1957.
- 11) Hsieh, A.C.L.: *Circulatory and metabolic effects of noradrenaline in cold-adapted rats. Fed. Proc.* 25:1205, 1966.
- 12) Hsieh, A.C.L., Carlson, L.D. and Gray, G.: *Role of sympathetic nervous system in the control of chemical regulation of heat production. Am. J. Physiol.* 190:247, 1957.
- 13) Jansky, L., Bartunkova, R. and Zeishorger, E.: *Acclimation of the white rats to cold: Noradrenaline thermogenesis. Physiol. Bohemoslov.* 16:366, 1967.
- 14) Krog, H., Monson, M. and Irving, L.: *Influence of cold upon the metabolism and body temperature of wild rats, albino rats and albino rats conditioned to cold. J. Appl. Physiol.* 7:349, 1954.
- 15) Leblanc, J.D., Robinson, D., Sharman, D.F. and Tousignant, P.: *Catecholamines and short-term adaptation to cold in mice. Am. J. Physiol.* 213:1419, 1967.
- 16) Leblanc, J.A. and Nadeau, G.: *Urinary excretion of adrenaline and noradrenaline in normal and cold-adapted animals. Can. J. Biochem.* 39:215, 1961.
- 17) Leduc, J.: *Catecholamine production and release in exposure and acclimation to cold. Acta Physiol. Scand., Suppl.* 183:1, 1961.
- 18) Lin, Y.C. and Stukio, P.D.: *Effect of environmental temperature on the catecholamines of chickens. Am. J. Physiol.* 214:237, 1968.
- 19) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.: *Protein measurement with folin*

- phenol reagent. J. Biol. Chem. 193:265, 1951.*
- 20) Lutherer, L.O., Fregrey, M.J. and Anton, A.H.: *An interrelationship between theophylline and catecholamines in the hypothyroid rat acutely exposed to cold. Fed. Proc. 28:1238, 1969.*
- 21) Maickel, R.P., Matussek, N., Stern, D.N. and Brodie, B.S.: *The sympathetic nervous system as a homeostatic mechanism. I. Absolute need for sympathetic nervous function in body temperature maintenance of cold-exposed rats. J. Pharmacol. Exp. Ther. 157:103, 1967.*
- 22) Marinetti, G.V., Ray, T.K. and Tomasi, V.: *Glucagon and epinephrine stimulation of adenyl cyclase in isolated rat liver plasma membranes. Biochem. Biophys. Res. Comm. 36:185, 1969.*
- 23) Michael, J.R.D. and Hull, D.: *The production of heat by fat. Sci. Amer. 213:62, 1965.*
- 24) Moore, K.E., Calvert, D.N. and Brody, T.M.: *Tissue catecholamine content of cold-acclimated rats. Proc. Soc. Exp. Biol. (N.Y.), 106:816, 1961.*
- 25) Pohl, H. and Hart, J S.: *Thermoregulation and cold acclimation in a hibernator, Citellus tade-cemlineatus. J. Appl. Physiol. 20:398, 1965.*
- 26) Rodbell, M., Birnbaumer, L. and Pohl, S.L.: *Adenyl cyclase in fat cells. III. Stimulation by secretin and the effects of trypsin on the receptors for lipolytic hormones. J. Biol. Chem. 245:718, 1970.*
- 27) Rosenthal, S.L., Edelman, P.M. and Schwartz, I.L.: *A method for the preparation of skeletal muscle sarcolemma. Biochim. Biophys. Acta. 190:512, 1965.*
- 28) Sellers, E.A., Scott, J W. and Thomas, N.: *Electrical activity of skeletal muscle of normal and acclimated rats on exposure to cold. Am. J. Physiol. 177:372, 1954.*
- 29) Smith, R.E. and Hoijer, D.J.: *Metabolism and cellular function in cold acclimation. Physiol. Rev. 42:60, 1962.*
- 30) Sutherland, E.W. and Rall, T.W.: *The relation of adenosine-3',5'-phosphate and phosphorylase to the actions of catecholamines and other hormones. Pharmacol. Rev. 12:265, 1960.*
- 31) von Euler, U.S.: *Exposure to cold and catecholamines, Fed. Proc., 19, Suppl. No 5:79, 1960.*