

백혈병세포의 에너지대사*

The Energy Metabolism of Leukemic Leukocytes

서울대학교 의과대학 약리학교실

박 찬 응 · 정 명 희 · 김 명 석

서 문

더불어 다른 연구자들의 그것과도 비교, 검토해보기 위하여 본실험을 수행하였다.

실험방법 및 재료

백혈병 세포는 암연구 특히 암조직 세포의 대사활동을 연구하는데 있어서 많이 이용되고 있는 생화학적 모델의 하나가 되어 있다. 인체에 발생하는 여타의 종양 조직과 달리 백혈병 세포는 조건에 맞는 백혈병 환자만 선택된다면 말초혈액으로부터 순수한 세포를 손상없이 비교적 쉽게 채취할 수 있을 뿐 아니라 이들 세포의 계수 및 형태학적인 감별진단이 용이하고 임상 증상 및 치료에 따른 상태의 변화에 맞춰서 필요로 하는 세포를 언제든지 반복하여 얻을 수 있는 이점들이 있다.

백혈병 세포의 분리: 정상인과 만성 및 급성 lymphocytic leukemia 와 granulocytic leukemia 환자의 말초혈액을 heparin(20unit/ml)으로 처리한 주사기로 채취하고 즉시 등장성 gelatin 용액을 3:1 비율로 섞어 실온에서 30~45분간 방치하여 적혈구를 빨리 침강시켰다. 상층의 백혈구가 많이 존재하는 혈장부분만을 분리해내고 여기에 glucose 와 HCO_3^- 를 각각 2mg/ml, 1.5 mg/ml를 첨가한후 총백혈구 계수와 감별계수를 하여 대사를 측정실험에 공여하였다.

백혈병의 본태 내지는 병인을 규명코져 하는 임상적 그리고 세포형태학적인 면에서의 연구는 과거부터 많이 행해져 왔으며 이와 더불어 대사활동 특히 에너지대사에 관한 연구도 1911년 Grafe¹⁾가 백혈병 환자에서 채취한 백혈구의 호흡율을 처음으로 측정할 이래 많은 학자들의 연구 대상이 되어 왔으며 특히 Warburg 등에 의한 manometric technique 의 발전은 세포의 대사활동을 연구하는 데 있어서 공헌한 바가 지대하다.

호흡율(Q_{O_2}): 상기 조작으로 얻어진 백혈구-혈장 2ml를 Warburg manometer flask 에 넣고 Warburg 의 direct method 로 산소소모량을 측정하였다. 이때 incubation 은 37°C 에서 2시간 하였으며 30분 간격으로 manometer 눈금의 변화를 측정하였다.

한편 이처럼 백혈병 세포의 대사작용에 관한 연구역사가 비교적 오래되었고 보고된 업적 또한 많으나 그 결과에 있어서는 아직도 의견이 일치되지 않는 점들이 많은데 그 주요한 이유중의 하나로 보고자에 따른 연구방법상의 차이가 문제점으로 지적되고 있다.

호기성 해당물($Q_{A^{O_2}}$): 역시 백혈구-혈장 2ml를 manometer flask 에 넣고 같은 식으로 incubation 하였으며 이때 flask 의 center well 에는 H_2O 0.3ml를 넣고 5% CO_2/air 로 총만시킨후 manometry 하였다. 한편 이렇게하여 측정되는 manometer 눈금의 변화는 첫째, 해당작용에 의하여 생성되는 latic acid 및 기타 산물이 혈장에 첨가한 HCO_3^- 와 작용함으로써 유리되는 glycolytic CO_2 와 둘째 호흡에 의하여 소모 또는 유리되는 O_2 및 CO_2 등 원천이 다른 3가지 가스 분압의 대수화로 나타나는 것이므로 이것과 앞서 측정한 산소소모량 및 호흡계수(0.7~0.8)를 알면 호기성 해당율을 계산해 낼 수가 있다.

이러한 사실을 염두에 두고 저자들은 급성 및 만성 백혈병 환자의 말초혈액에서 채취한 임파구 및 과립구에서 manometry 법을 이용하여 호흡 및 호기성해당물과 염기성해당물등 탄수화물대사율을 측정함으로써 이들 각종 백혈병 세포들의 에너지대사의 일면을 관찰하고

* 본 연구는 1973년도 중앙암연구소 연구비 보조로 수행되었음.

염기성 해당물($Q_A^{N_2}$): 호기성 해당물을 측정할때와 같은 내용을 갖는 flask에서 단지 5% CO_2 /air를 95% N_2 /5% CO_2 로 대체하여 염기성 조건으로 만들어 준후 같은 방법으로 incubation 하였으며 이때 해당작용에 의하여 생성되는 lactic acid 및 기타 중간대사산이 HCO_3^- 와 작용하여 유리되는 CO_2 를 manometer 눈금의 변화에 의하여 측정하였다.

본 실험의 대상이 된 백혈병 환자는 말초혈액 백혈구의 감별계수시 한가지 종류의 세포가 90% 이상을 차지하며 총백혈구수가 5만 이상인 환자들이었으며, 측정된 대사율들은 세포수 100만개를 기준으로하여 이것들이 한시간 동안 소모 또는 유리하는 O_2 및 CO_2 양을 μ 로 표시하였다.

실험 성적

표 및 그림들에 표시되어 있는 바와 같이 lymphocyte 계통의 백혈병 세포들은 낮은 호기성 해당물($Q_A^{O_2}$: 0.21~0.25 μ l CO_2 /10⁶ cells/hr)과 그에 비해 비교적 높은 호흡율(QO_2 : 0.37~0.50 μ l O_2 /10⁶ cells/hr) 및 높은 염기성 해당물($Q_A^{N_2}$: 2.05~2.57 μ l CO_2 /10⁶ cells/hr)을 보이는 반면에 granulocyte 계통의 세포들은 높은 호기성 해당물(1.70~1.87)과 그에 비해 낮은 호흡율(0.39~0.45) 그리고 상당히 높은 염기성 해당물(3.17~3.89)을 나타내었다.

$Q_A^{O_2}/QO_2$ 는 lymphocyte 계통 세포(ALL, 0.49; CLL, 0.57)에서는 낮으나 granulocyte 계통 세포는 그보다 약 10배 높은 수치(AGL, 4.36; CGL, 4.16)를 나타내었다.

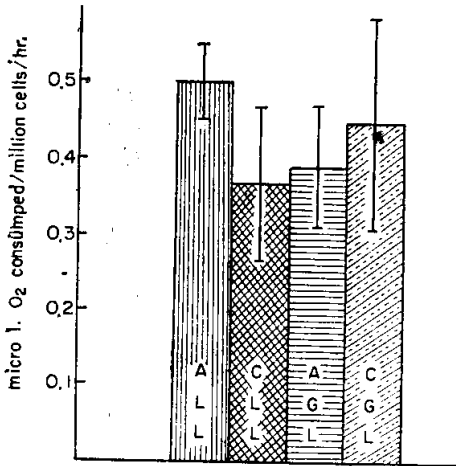


Fig. 1. Respiration of cells from acute and chronic lymphocytic leukemia, acute and chronic granulocytic leukemia.

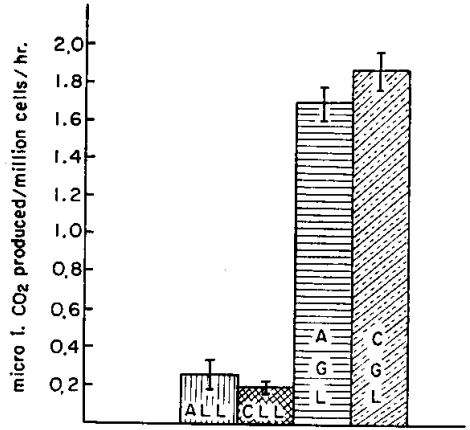


Fig. 2. Aerobic glycolysis of cells from acute and chronic lymphocytic leukemia, acute and chronic granulocytic leukemia.

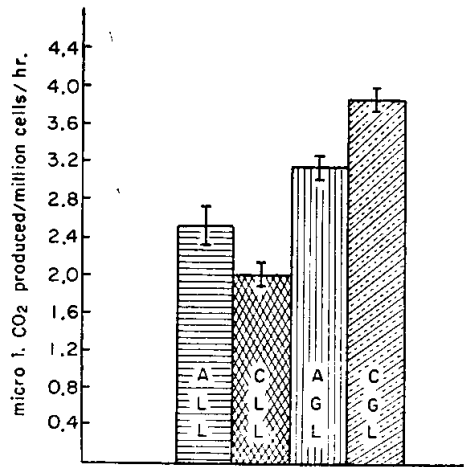


Fig. 3. Anaerobic glycolysis of cells from acute and chronic lymphocytic leukemia, acute and chronic granulocytic leukemia.

고 호기성 조건에서 일어나는 해당작용에 대한 Pasteur effect는 granulocyte 계통의 세포가 lymphocyte 계통의 세포보다 훨씬 적게 받고 있다.

이상과 같은 백혈병 세포들의 대사활동은 같은 세포들일 경우에는 성숙도에 따라 그것이 급성형에서 많이 나타나는 blast form 이거나 만성형에서 많이 존재하는 mature form 이거나 간에 공통된 경향의 대사작용을 나타내었다.

대조군으로 사용한 백혈구는 질병이 없는 정상 성인 남자중 감별계수시 polymorphonuclear leukocyte가 60~70%, lymphocyte가 30~40%인 말초혈액에서 분

Table 1. Metabolic Quotients of Acute and Chronic Leukemias.

	QO ₂	QA ^{O₂}	QA ^{N₂}	Inhibition of glycolysis by air	QA ^{O₂} /QO ₂
A. L. L.	0.50±0.05	0.25±0.03	2.57±0.21	87.3%	0.49
C. L. L.	0.37±0.11	0.21±0.02	2.05±0.12	89.8%	0.57
A. G. L.	0.39±0.08	1.70±0.09	3.17±0.14	46.3%	4.36
C. G. L.	0.45±0.14	1.87±0.11	3.89±0.09	51.9%	4.16
Normal WBC	0.48±0.09	1.83±0.13	3.52±0.12	48.0%	3.81

QO₂: microliters of oxygen consumed per million cells per hour.

QA^{O₂}: microliters of carbon dioxide produced by acid interacting with bicarbonate per million cells per hour in aerobic atmosphere.

QA^{N₂}: microliters of carbon dioxide produced by acid interacting with bicarbonate per million cells per hour in anaerobic atmosphere.

Normal WBC: Differential count showed 60-70% of PMN, 30-40% of lymphocyte

리해낸 것이었으며 이들의 대사율은 granulocyte 계통의 백혈병 세포와 거의 같은 경향을 보였다.

고 찰

백혈병 세포의 에너지대사에 관한 연구 역사는 비교적 오래이어서 1910년대에 Grafe¹⁾가 만성 백혈병 세포의 호흡율을 측정 보고한 것이 최초이지만 이러한 백혈병 세포의 대사활동이 본격적으로 많은 사람의 관심의 대상이 된 것은 1920년대부터 Warburg²⁾ 등이 소위 "tumor-metabolism"의 특징을 보고하기 시작한 후이다. 즉 Warburg 등은 에너지대사에 있어서 종양세포는 정상세포와 근본적인 차이를 갖는 바, 종양세포에서는 glycolytic metabolism이 oxidative metabolism보다 훨씬 더 많이 일어나고 호기성 및 혐기성 해당물이 대단히 높으며 호기성 조건에서의 해당작용이 Pasteur effect를 잘 받지 않는다고 하였다.

그러나 정상조직중에서도 뇌, 망막, 태반 및 신장조직등은 어느정도 tumor metabolism의 특징과 비슷한 대사작용을 나타내어서 해당물이 다른 정상조직보다 높으며 또 성장속도가 빠른 태생기 세포나 성숙된 세포라 하더라도 손상을 입었거나 수명이 다된 세포이거나 또는 환경조건이 생리적이 못될 경우에는 다같이 해당물이 증가하는 것으로 알려져 있다. 따라서 Warburg 등의 소위 "tumor-metabolism"의 특징은 종양조직에만 국한된 것은 아닌 것으로 여겨지고 있다.

이러한 사실등을 감안하고 백혈병 세포의 에너지대사에 관한 연구 보고들을 고찰해보면, 초창기 연구자들에게서는 호기성 해당작용이 granulocyte 계통의 백혈병세포에서는 높은 율로 있으나 lymphocyte 계통 세포에서는 전혀 없거나 아주 낮은 율로 나타나는 점에서는 많

은 보고에서 일치하고 있으나^{3,4,5,6)}, 세포의 성숙도에 따른 대사율의 변화에 대해서는 보고자에 따라 의견의 일치를 보지 못하고 있다. 즉 어떤 보고⁷⁾에 의하면 성숙도가 낮은 blast form의 세포는 그것이 lymphocyte 계통이던 granulocyte 계통이던 간에 호기성 해당작용은 전혀 없으며, 따라서 호기성 상태에서 얻어지는 에너지는 순전히 oxidative metabolism의 결과라고 했고 blast form의 백혈병세포는 tumor-metabolism이 아닌 정상 태생기세포와 같은 metabolism을 영위한다고 했으며, 반대로 다른 보고⁸⁾에서는 세포의 성숙도가 낮을수록 호기성 해당율은 오히려 높다고 하였다.

또 정상백혈구와의 비교에 있어서도 백혈병세포의 대사율이 더 높다⁹⁾거나 또는 정상백혈구가 더 높다⁸⁾는 등의 의견의 일치를 보지 못하는 점들이 많은데 이것은 초기의 연구자들은 말초혈액에서 백혈병세포를 분리할때 원심분리를 하거나 세척을 하므로써 세포에 손상을 입혔거나 아니면 적절한 생리조건하에서 실험을 행하지 않았기 때문에 세포자체의 대사활동에 이상이 초래되었을 것으로 여겨지며 또 glucose 소모량만을 측정하므로써 해당율을 산출해내는 오류를 범했기 때문이라고 생각된다.

그러나 근래에 와서는 세포에 손상을 주지 않고 말초혈액으로부터 백혈병세포를 분리해내기 위하여 fibrinogen, dextran, isotonic gelatin, albumin 부유법¹⁰⁾을 이용하고 또 보다 in vivo와 유사한 조건에서 실험하기 위하여 인위적인 완충용액 대신 autologous plasma를 media로 하여 differential manometry 등의 방법으로 백혈병세포의 대사활동을 관찰한 결과, 보고자마다 대사율을 표시하는 기준이 달라서(dry weight, 세포수 또는 세포의 질소 함유량) 보고된 절대수치는 다르지만 백혈병세포가 갖는 대사활동의 특징적인 경향에 있어서

는 어느정도 공통되는 점을 발견할 수 있다^{11,12}.

저자들이 행한 본 실험에서도 손상을 주지 않고 세포를 분리해내기 위하여 등장성 gelatin 용액을 사용하였으며, 생체내에서의 상태와 보다 유사한 조건을 유지해 주기 위하여 환자 자신의 혈장을 incubation media로 사용하여 Warburg의 standard manometry를 하였는바, 그 결과를 다른 사람들의 보고와 비교해보면 측정된 대사율을 표시하는 단위가 다르기 때문에 절대수치를 갖고 논하기는 곤란하나 이들 각종 백혈병세포가 나타내는 대사활동의 특징에 있어서는 근래에 발표된 보고들^{11,12}과 일치되는 경향을 보인다. 즉 정상 및 granulocyte 계통의 백혈병세포는 높은 호기성 및 열기성 해당물을 그리고 lymphocyte 계통의 백혈병 세포는 낮은 호기성 해당물을 특징으로 하며 lymphocyte 계통 세포는 호기성 조건에서 필요로하는 에너지를 거의 전부 oxidative metabolism에 의하여 공급받는 것으로 보여지며 이와같은 대사활동의 특징은 같은 계통의 세포일 경우에는 성숙한 세포이거나, 미성숙 세포이거나 간에 같은 경향을 갖는 것으로 나타났다.

한편 본 실험에서 사용한 정상 백혈구의 60-70%가 granulocyte 계통 백혈구라는 점을 감안할때 정상백혈구의 대사활동이 granulocyte 계통 백혈병세포와 유사한 경향을 갖는다는 것은 일반적으로 백혈병세포의 대사가 같은 종류의 정상백혈구대사와 동일한 양상을 갖는 것이 아닌가 생각되며 또한 이와 더불어 lymphocyte 계통의 백혈병세포에서도 Warburg 등이 주장한 tumor-metabolism의 특징을 볼 수 없었으므로 미루어 신생물로서의 백혈병의 본태를 tumor-metabolism이라는 기준에서 설명하기는 곤란하다고 사료된다.

요 약

급성 및 만성 lymphocytic leukemia와 granulocytic leukemia 환자의 말초혈액에서 얻어낸 lymphocyte 및 granulocyte 계통의 백혈병세포에서 호흡율(QO₂), 호기성 해당물(QA^{O₂}) 및 열기성 해당물(QA^{N₂})를 Warburg manometry 법으로 측정하였으며 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. lymphocyte 계통의 백혈병세포는 대단히 낮은 호기성 해당물과 QA^{O₂}/QO₂를 특징으로하며, 반대로 granulocyte 계통 세포는 높은 호기성 해당물과 QA^{O₂}/QO₂치를 보이고 호기성조건에서 일어나는 해당작용에 대한 Pasteur effect가 현저하지 못하다.
2. 열기성 해당물은 lymphocyte 및 granulocyte 계통 양세포들에서 다같이 높았다.

3. 정상백혈구의 대사활동은 같은 종류의 백혈병세포와 동일한 양상을 보인다.

4. 같은 계통의 세포일 경우에는 blast form 이거나 mature form 이거나 대사활동은 같은 양상을 보인다.

5. 신생물로서의 백혈병의 본태를 대사작용의 특징을 가지고 규정짓기는 곤란하다.

ABSTRACT

The Energy Metabolism of Leukemic Leukocytes.

C. W. Park, M. H., Chung, M. S. Kim

Dept. of Pharmacology, College of Medicine,
Seoul National University

The metabolism of the leukemic cells taken from peripheral blood of patients with acute and chronic lymphocytic leukemia and granulocytic leukemia was determined manometrically with the Warburg method.

Results can be summarized as follows.

1. Leukocytes taken from patients having acute and chronic lymphocytic leukemia are characterized by low aerobic glycolysis and low QA^{O₂}/QO₂ ratio. Leukemic lymphocytes do not exhibit the so-called "tumor-metabolism".
2. Granulocytic cells have high glycolytic rate and high QA^{O₂}/QO₂ ratio and show incomplete Pasteur effect.
3. Both leukemic lymphocytes and granulocytes have the capacity for high glycolytic rates under anaerobic conditions.
4. It seems that the metabolism of normal human leukocyte is qualitatively similar to that of leukemic counterparts.
5. It appears that both mature cells and blast forms have same metabolic characteristics.
6. It is considered that to make conclusions regarding the neoplastic nature of leukemia on the basis of their tumor-metabolism is improper.

REFERENCES

1. Grafe, E.: *Die Steigerung des Stoffwechsels bei chronischer Leukaemie und ihre Ursachen. Deutsches Arch. für klin. Med.* 102, 406, 1911-Kempner, W.: *Metabolism of leukemic blood cells. J. Clin. Invest.* 18, 291, 1939. 에서 인용

2. Warburg, O. : *Stoffwechsel der Tumoren. Springer, Berlin, 1926.*
3. Barron, E.S.G., Harrop, G.A. : *Studies on blood cell metabolism. Metabolism of leukocytes. J. Biol. Chem. 84, 89, 1929.*
4. Peschel, E. : *Stoffwechsel leukaemischer Lymphocyten. Klin. Wochschr. 9, 1061, 1930.*
5. Schlossmann, H. : *Über den Stoffwechsel von Lymphocyten. Bioch. Ztschr. 219, 463, 1930.*
6. Bossa, G. : *Sel metabolisma dei leucociti leucemici. Haematologica 18, 673, 1937-W.S. Beck, W.N. Valentine: The carbohydrate metabolism of leukocytes. Cancer Research 13, 309, 1953. 이어서 인용*
7. W. Kempner: *The nature of leukemic blood cells as determined by their metabolism. J. Clin. Invest. 18, 291, 1939*
8. Glover, E.C., Daland, G.A., Schmitz, H.L. : *The metabolism of normal and leukemic leukocytes. Arch. Int. Med. 46, 46, 1930.*
9. Soffer, L.J., Wintrobe, M.M. : *The metabolism of leukocytes from normal and leukemic blood. J. Clin. Invest. 11, 661, 1932.*
10. Skoog, W.A., Bech, W.S. : *Studies on the fibrinogen, dextran and phytohemagglutinin methods of isolating leukocyte. Blood 11, 436, 1956.*
11. Robert M. Bird, John A. Clements, Lillian M. Becker: *The metabolism of leukocytes taken from peripheral blood of leukemic patients. Cancer 4, 1009, 1951*
12. John Laszlo: *Energy metabolism of human leukemic lymphocytes and granulocytes. Blood. 30. 151, 1967.*