

## 정상 및 Alloxan 당뇨병 흰쥐의 간 절편에 있어서

### $C^{14}$ 포도당의 산화대사에 관한 실험

#### Kinetic Study of Oxidative Metabolism of $C^{14}$ -labeled Glucose in Liver Slices of Normal and Alloxan Diabetic Rats

서울대학교 의과대학 생리학교실

<지도 남 기 용 교수>

이 응 섭

당뇨병 때에 생체내 대사과정의 변동을 초래함은 주지의 사실인바 이에 관한 연구는 표리포방법(tracer work)이 발견된 이후 알록산(alloxan) 당뇨병 동물을 이용하여 많은 실험성적을 보였다.<sup>1)</sup> “알록산” 당뇨병 동물에서 insulin 결핍이 여러 기질대사과정에 미치는 영향을 종합하려는 다음과 같다. 첫째로 insulin의 세포막 투과성에 미치는 영향을 보는데 포도당이 세포막을 투과할 때 세포막 표면에서 어떠한 교소반응을 거쳐 투과함은 일반적으로 알려져 있으며<sup>2)</sup> insulin이 이러한 반응계에 관여함은 Goldstein<sup>3),4),5)</sup> 등의 실험에서 보는 바와 같이 당뇨병 때에 혈중포도당의 소실을 및 포도당의 분포용적(glucose space)이 현저히 저하한다는 사실로 증명할 수 있다. 둘째로 포도당이 세포내 교소계에 들어가기 전에 포도당이 ATP와 작용하여 phosphorylation 되는 첫단계 반응인 hexokinase 작용에 insulin이 관여함은 Cori<sup>6)</sup>등에 의하여 오래 전에 소개되었고 특히 당뇨병 때에 fructohexokinase 반응은 영향을 받지 않는 사실로 보아 insulin은 specific하게 glucohexokinase 반응에만 작용함을 보였다.<sup>7)</sup> 셋째로 insulin이 hexokinase 반응 이외의 다른 반응계에서 탄수화물의 완전산화 과정에 영향을 준다는 사실은 insulin 결핍이 있을 때 호흡계수가 저하한다는 Soskin<sup>8)</sup>등의 실험에서 처음 추측되었으나 근래에 와서  $C^{14}$  표리포 단 탄수화물( $C^{14}$ -labeled carbohydrate)을 이용하여 호흡  $CO_2$ 로의 완전대사과정의 양적 측정(quantative measurement)이 가능하게 된 이후 당뇨병 때에  $C^{14}$ 포도당의 호흡  $CO_2$ 로의 완전산화대사 과정을 관찰한 많은 실험성적을 얻게 되었다. 즉 Stetten<sup>9)</sup>등은 흰쥐에서, Wick<sup>10)</sup>등은 토끼에서, Chaikoff<sup>11), 12)</sup>등은 개에서 각각  $C^{14}$ 포도당이 호흡  $CO_2$ 로의 산화대사과정을 관찰한바 당뇨병 개체에서 현저한 저하를 보였다. insulin 결핍이 있을 때 위와 같이 호흡  $CO_2$ 로의 완전산화대사 과정이 억제된 포도당의 혐기성 대사과정에서 hexokinase 반응의

억제작용에 기인하는 2차적 현상이라고 볼 수 있으나 Krebs<sup>13)</sup>등이 insulin이 포도당의 호기성 대사과정과 밀접한 관계가 있다는 사실에 처음 주의를 환기한 바와 같이 실제로 포도당의 중간대사 물질인 pyruvate, lactate 등의 표리포 단 물질을 이용한 실험에서도<sup>14), 15)</sup> 당뇨병이 있을 때 각종 조직절편에서 이들 중간대사 물질의 호흡  $CO_2$ 로의 호기성 대사과정에 현저한 저하를 보인다는 사실이 관찰되어 있다. 이로써 더하여 보면 탄수화물의 대사과정에서 insulin 작용점이 hexokinase 이외에 Krebs cycle의 어떤 단계의 교소계와 밀접한 관계가 있음을 지적할 수 있다. 이밖에 Stetten<sup>16), 17), 18)</sup>등은 당뇨병 동물의 각종 조직에서 lipogenesis가 저하함을 관찰하였고 Krahl<sup>19)</sup>은 흰쥐의 간절편을 이용하여 glycine-1- $C^{14}$ 의 간장단백질로의 합성과정을 검토한바 insulin이 glutathione 합성과정에 막대한 영향을 줄을 보았다. 이러한 실험성적은 insulin이 생체의 모든 조직에서 탄수화물대사 뿐만 아니라 지방대사 및 단백질대사 과정에 직접 혹은 간접으로 관여함을 보여주지만 insulin이 생체내 여러 복잡한 기질대사 과정에 있어서의 작용점 및 기전에 관하여는 아직 확실히 구명된 바가 없다. 위에서 말한 바와 같이 insulin이 영향을 주는 여러 반응계중에서도 특히 생체의 가장 중요한 energy 원으로 알려져 있는 포도당의 이용 또는 호흡  $CO_2$ 로의 완전 산화대사과정이 당뇨병이 있을 때 현저히 억제된다는 사실은 당뇨병개체의 에너지대사에 포도당 또는 탄수화물 이외의 다른 물질이 관여함을 지적할 수 있으며 이러한 insulin 결핍이 있을 때 나타나는 에너지 대사의 변화과정을 정확히 파악함으로써 당뇨병환자 치료에 기여하게 될 것이다. 그러나 이에 관한 여러 실험성적은 실험방법 또는 실험조건에 따라 구구하며 아직 통일된 양적 성적을 볼수 없다. 본실험은 정상 및 Alloxan 당뇨병 흰쥐의 간장절편을 이용하여 종래의 warburg manometric technique를 개량한 방법으로  $C^{14}$ 포

도당 용매와 같이 장시간 항온조에 incubate 함으로서 간장세포내 교소계와 용매 C<sup>14</sup> 포도당과 완전 평형상태에 이루게한 후 C<sup>14</sup> 포도당의 "steady state"대사과정을 본 것이다. 즉 용매 C<sup>14</sup> 포도당을 호흡 CO<sub>2</sub>로 산화시키는 간장교소계의 능력을 비교관찰함과 동시에 용매내 포도당의 소실율을 측정하여 Alloxan 당뇨병때와 비교 관찰하므로써 insulin 결핍이 있을때의 포도당의 세포막 투과성에 관하여 고찰하였다.

### 실험 방법

실험동물 : 39마리의 Sprague Dawley 중 흰쥐(체중 250~300gm)를 사용했다. 18마리는 정상대조군으로 11마리는 당뇨병군으로 사용했다. Alloxan 당뇨병은 40 mg/kg의 Alloxan을 정맥내에 주입한후 적어도 3일간 매일 혈당량을 관찰하여 혈당이 200mg/dl 이상으로 지속적 상승이 있는 흰쥐의 간장절편을 사용하였다. 간장적출 직후 취장을 적출하여 조직표본을 만들어 검사한 결과 Langerhan's island의 β-cell의 파괴율은 평균 70%이었다.

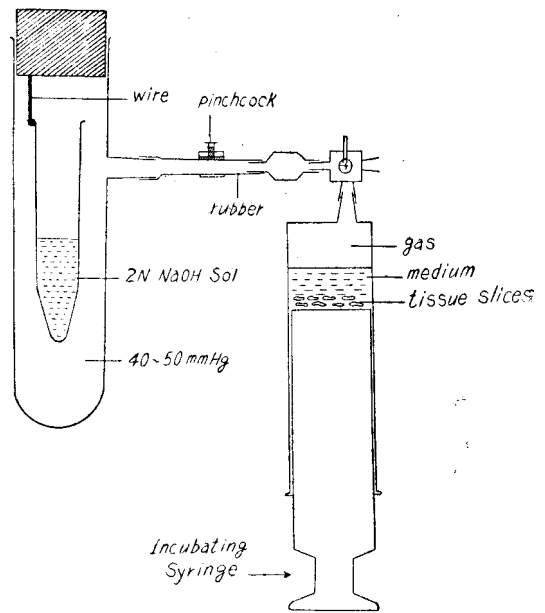
### 실험 조직

간장조직절편 약 1.5~2gm을 50cc 주사기내에 넣어 pH 7.4인 phosphate buffer<sup>21)</sup> 15cc 및 산소 15cc와 함께 38°C 항온조에 장치했다. 조직과 산소와의 사이의 가스교환을 돕기 위하여 1분에 60회 정도의 좌우진탕을 하면서 6시간 내지 8시간 동안 관찰하였다. 항온조 및 진탕기로서는 Warburg 장치(B. Braum)를 사용하였다 incubation 용매의 C<sup>14</sup> 포도당의 농도는 정상 간장절편 시험에서 정상 혈당량 100~200mg/dl의 phosphate buffer를 이용하고 당뇨병 실험에서는 모두 200mg/dl의 용액을 사용하였다. 주사기내의 용매 및 가스를 실험개시후 매시간마다 새로운 포도당용액 및 산소로 갈아줌으로서 실험기간중 incubation 용매내의 C<sup>14</sup> 포도당의 농도 및 specific activity를 비교적 일정하게 유지시켰다. 이리하여 간장절편과 접촉하여있던 용매와 가스 표본을 얻어서 조직절편에 의한 매시간의 포도당 소실율과 CO<sub>2</sub>의 발생을 및 SA를 측정하였다. 이것은 Chaikoff<sup>20)</sup> 법의 변법이다.

제1도에 보이는 표본 이동관(transfer assembly)을 사용하여 매시간의 표본을 채집하였다. 이것은 직경 4cm 길이 20cm의 유리관내에 약 3cc의 CO<sub>2</sub> free NaOH를 넣은 중심관(15cc 원침관)을 설치하고 고무마개로 밀폐한 후 관내를 미리 진공펌프로 약 100mmHg 정도의 음압으로 준비한 것이었다. 주사기내의 표본을 옮길때는 그림1에서와 같이 주사기를 항온조에서 꺼내어 수직으로 고정하여 조직절편을 밑으로 가라앉힌다. 다음 주사기밀대를 서서히 밀면 양방향을 통하여 가스 및 용액을

이동관내의 음압속으로 옮길수있다. 주사기내 간장절편에는 다시 새로운 C<sup>14</sup> 포도당용액과 산소를 공급하여서 실험을 계속했다. 표본을 이동관에 옮긴 다음에 새로이 항온조에 장치하기 까지에 약 1분내외의 시간이 걸렸다. 이때에 새로이 공급하는 용액은 미리 38°C로 가열하였으므로 용액교체로 g는 온도의 저하는 방지할 수 있었다. 이동관에 옮긴 용매 및 가스표본은 이동관내에서 외기와 접촉없이 적어도 2시간이상 진탕하므로써 이동관CO<sub>2</sub>를 중심관에 넣어둔 NaOH에 흡수시켜 매시간의 CO<sub>2</sub> 표본을 얻고 용매내의 포도당농도를 측정하여 간장조직절편이 소비한 포도당의 소실율을 계산하였다.

화학적작 : 포도당 정양에는 Somogyi<sup>22)</sup> 및 Nelson<sup>23)</sup>의 방법을 사용하고 CO<sub>2</sub> 발생율은 이동관내 중심관에 흡수된 alkaline carbonate sample을 BaCl<sub>2</sub>로 Whatman 여과지(NO 542)에 BaCO<sub>3</sub>로 침전시켜 BaCO<sub>3</sub>의 무게



第1圖 CO<sub>2</sub> Transfer Assembly

를 측정하여 CO<sub>2</sub> 발생율을 계산하였다.

호흡 CO<sub>2</sub>의 specific activity 측정에는 BaCO<sub>3</sub> 표본을 직접 Geiger-Müller counter로 계측하였다. incubation 용액의 C<sup>14</sup> 포도당의 SA 측정에는 용액내 C<sup>14</sup> 포도당을 Van Slyke Folch 방법<sup>24)</sup>으로 모두 CO<sub>2</sub>로 완전 산화시킨 다음 이를 다시 BaCO<sub>3</sub>로 침전시켜 방사능을 Geiger-Müller counter로 계측하였다. Geiger-Müller counter로 계측한 값은 모두 selfabsorption에 대한 교정을 하여 비교 관찰하였다.

**계산 방법**

**포도당소실율** : incubation 전후의 포도당 농도를 측정하여 여기서 얻는 농도차에 incubation 용액의 용적을 승하고 이를 다시 조직의 무게로 제하여 mg 또는 μM/hr/gm of tissue 로 표시하였다.

**CO<sub>2</sub> 발생율** : 이동관 중심관에 흡수시킨 alkaline carbonate 포본을 BaCO<sub>3</sub>로 침전시켜 이 무제를 측정하고 이를 BaCO<sub>3</sub>의 분자량(197.3)으로 제하여 mM 또는 μM/hr/gm of tissue 로 표시하였다.

**Relative specific activity(RSA)** : 이것은 발생한 전 CO<sub>2</sub> 내에 있는 용매 C<sup>14</sup> 포도당에서 기인된 CO<sub>2</sub>의 분율을 표시한다. 호흡 CO<sub>2</sub>의 SA 및 incubation 용액 내의 C<sup>14</sup> 포도당의 SA 와의 비로 쉐된다.

**Relative glucose disappearance(RGD)** : 이는 Medium 내에서 소실된 C<sup>14</sup> 포도당의 호흡 CO<sub>2</sub>로 완전산화된 분율을 표시하며 다음과 같이 계산하여 얻었다.

$$RGD = \frac{CO_2 \text{ 발생율} \times RSA}{\text{포도당소실율} \times 6}$$

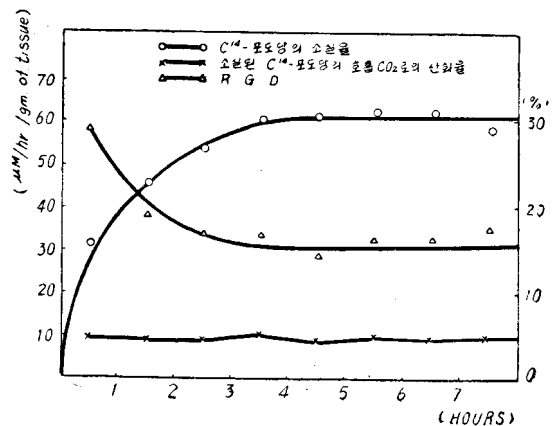
위식의 분자는 용매 C<sup>14</sup> 포도당에서 유래하는 CO<sub>2</sub>의 발생율을 보이며 1분자의 포도당이 CO<sub>2</sub>로 완전산화하면 6분자의 CO<sub>2</sub>를 발생하므로 C<sup>14</sup> 포도당에서 기인된 CO<sub>2</sub>의 발생율을 6으로 제하면 CO<sub>2</sub>로 완전산화된 포도당의 소모율을 계산할수 있다. 이 값과 포도당 소실율과의 비를 구하면 Medium에서 소실된 포도당이 CO<sub>2</sub>로 완전산화된 분율을 표시한다.

**실험 성적**

정상간장절편을 100~200 mg/dl의 농도를 가진 C<sup>14</sup> 포도당 용매에 incubate 할 때 시간에 따르는 C<sup>14</sup> 포도당의 소실율 및 소실된 용매 C<sup>14</sup> 포도당의 완전산화 과정에 관한 성적을 제 1 표에 종합하였다.

C<sup>14</sup> 포도당의 소실율은 첫시간에 평균 33.1±3.7 μM/hr/gm 이고 다음에 서서히 증가하지만 4시간 이후에는 그림2에서 보는바와 같이 비교적 일정한 평탄선 (Plate-

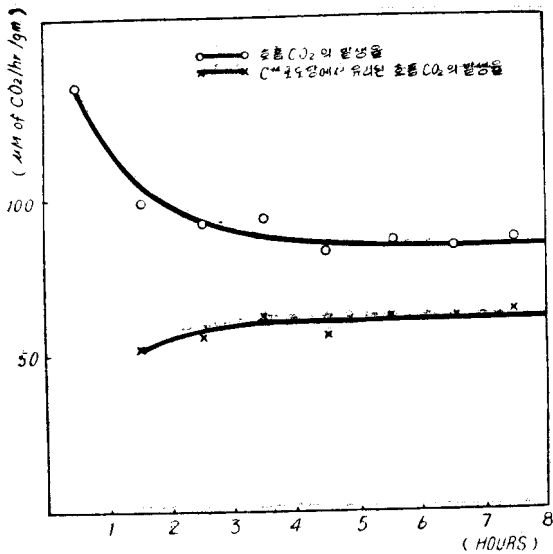
au)을 유지하였다. 정상간절편의 CO<sub>2</sub> 발생율은 그림3에서 보는바와 같이 첫시간에 평균 136.6±36.5 μM/hr/gm 의 큰 값으로부터 갑자기 저하하며 3시간 후에는 평탄선에 이르고 그후에는 큰 변동이 없었다. 용매 C<sup>14</sup> 포도당의 specific activity (SA)와 호흡 CO<sub>2</sub>의 비로부터 계산되는 relative specific activity (RSA)의 변동은 그림4에서 보는바와 같이 첫시간에 평균 42.7±9.1%의 최저값을 보이며 차차 증가하여 4시간후에는 최대값을 보이며 일정하게 된다. 그러나 용매 C<sup>14</sup> 포도당에서 기인된 CO<sub>2</sub>로의 산화율은 초기 CO<sub>2</sub> 발생율이 높으므로 RSA 가 초기에 낮음에도 불구하고 그림2에서 보는바와 같이 초기에는 불규칙하지만 4시간후에는 CO<sub>2</sub> 발생 및 RSA 에 변동이 없이 일정하기때문에 용매 C<sup>14</sup> 포도당의 호흡 CO<sub>2</sub>로의 산화율도 일정하게된다. 호흡 CO<sub>2</sub>로 완전산화된 용매 C<sup>14</sup> 포도당의 소모율은 초기에는 전술한바와 같이 C<sup>14</sup> 포도당의 소실율, 전 CO<sub>2</sub> 발생 및 RSA 가 일정하지 않으므로 C<sup>14</sup> 포도당의 호흡 CO<sub>2</sub>로의 완전산화대사율도 역시 불규칙 하였으나 4시간 이후에는 그림2에서 보는바와 같이 비교적 일정한값을 보였다 호흡 CO<sub>2</sub>로의 relative glucose disappearance(RGD)



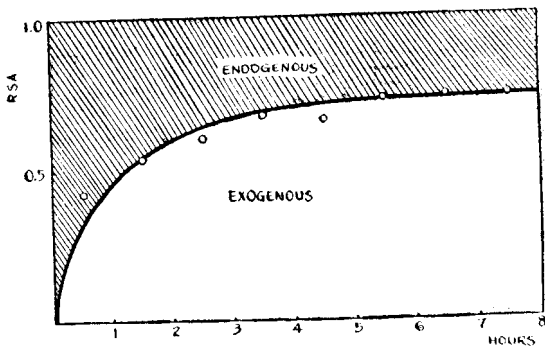
第2圖 C<sup>14</sup> 포도당의 소실율과 호흡 CO<sub>2</sub>로의 산화율

Table 1. Oxidative Metabolism of C<sup>14</sup>-glucose by the Normal Liver Slices

time of sampling (hr)	1	2	3	4	5	6	7	8
no. of case	12	18	18	18	18	12	12	12
glucose consumption late (μM/hr/gm)	33.1	45.5	53.3	60.7	61.4	62.1	62.8	58.3
S.D.	±3.7	±16.8	±17.3	±12.9	±12.2	±12.9	±12.0	±15.8
total CO <sub>2</sub> prod. rate (μM/hr/gm)	136.6	99.2	92.8	94.4	82.6	87.1	85.8	87.0
S.D.	±36.5	±33.3	±28.4	±24.0	±23.3	±25.9	±9.6	±24.3
RSA (%)	42.7	53.2	59.9	67.4	65.6	72.1	72.6	74.5
S.D.	±9.1	±10.8	±14.0	±8.0	±8.4	±11.9	±6.5	±6.2
CO <sub>2</sub> from C <sup>14</sup> -glucose (μM/hr/gm)	58.2	52.8	55.6	63.6	54.3	62.8	62.3	64.8
glucose disappered into CO <sub>2</sub> (μM/hr/gm)	9.7	8.8	9.3	10.6	9.1	10.5	10.4	10.8
% of glucose (%)	29.6	19.3	17.4	17.5	14.8	16.9	16.6	18.5



第3圖 호흡 CO<sub>2</sub> 발생율과 C<sup>14</sup> 포도당에서 유리된 호흡 CO<sub>2</sub>의 발생율



Exogenous : 용매 C<sup>14</sup> 포도당에서 유리된 호흡 CO<sub>2</sub>  
 Endogenous : 용매 C<sup>14</sup> 포도당 이외의 다른 기질에서 유리된 CO<sub>2</sub>

第4圖 RSA—시간곡선

도 역시 그림2에서와 같이 4시간 이후에 비로소 일정한 값을 보였다.

위에서 보는바와 같이 간장절편을 같은 농도의 C<sup>14</sup> 포도당 용매에 장시간 incubate 할때 포도당의 소실율 및 C<sup>14</sup> 포도당의 산화대사 과정에 있어서 일정한 대사율을

보이기 까지는 (steady state metabolism) 적어도 3~4시간이 필요하였다. 이러한 현상은 alloxan 으로 유발시킨 당뇨병 흰쥐 간절편을 같은 방법으로 incubate 할때에도 3~4시간후에 비로소 일정한 대사율을 보이게 된다. 그러므로 본실험에서는 4시간 이후 간장절편과 용매 C<sup>14</sup> 포도당과 평형이되어 일정한 대사율을 보일때의 실험성적을 취하여 정상흰쥐 간장절편 alloxan 당뇨병 간장절편에 있어서 C<sup>14</sup> 포도당의 대사과정을 비교 관찰 하였다. 18마리의 정상흰쥐 간장절편 및 11마리의 alloxan 당뇨병 흰쥐 간장절편에서 C<sup>14</sup> 포도당의 소실율 및 호흡 CO<sub>2</sub>로의 산화대사과정에 관한 실험성적을 제2 표에 조합하였다.

용매에서 C<sup>14</sup> 포도당의 소실율은 alloxan 당뇨병 간장절편에서 현저히 저하하였으며 정상간절편이 평균 61.1/µM/hr/gm 인데 비하여 당뇨병 간절편에서는 평균 6.2 µM/hr/gm, 즉  $\frac{1}{10}$  로 저하하였다. incubation 초기에는 5에 있어서 도리어 간장절편에서 포도당이 incubation 용매로 유리되어 나와 용매 포도당 농도가 incubation 전 농도보다 증가되는 현상을 볼수있었다.

CO<sub>2</sub> 발생율은 정상값 평균 87.4 µM/hr/gm 에 비하여 당뇨병 간장절편에서는 평균 12.8 µM/hr/gm, 즉 정상값의 약15%에 불과하였다.

RSA 도 정상평균값 70.4%에 비하여 1.7%로 현저히 저하하였다. 그러므로 용매 C<sup>14</sup> 포도당으로 부터 유래하는 CO<sub>2</sub>의 발생율은 정상에서 평균 전 CO<sub>2</sub> 발생율의 70.4%인 61.5 µM/hr/gm 의 값을 보이며 당뇨병에서는 평균 0.22 µM/hr/gm 로 저하하였다 용매에서 소실된 C<sup>14</sup> 포도당이 호흡 CO<sub>2</sub> 로 완전산화된 분을 즉 relative glucose disappearance (RGD)는 정상간 절편에서 평균 16.9%이며 당뇨병에서는 0.65%로 현저한 저하를 보였다.

위에서 보는바와 같이 당뇨병때에 간장세포내 교소계에서 포도당의 이용 및 호흡 CO<sub>2</sub>로의 산화대사과정이 무시할정도로 저하 하였음은 포도당이 당뇨병때에 간장내 에너 지대사에 관여하는바가 극히 적음을 지적한다 하겠다.

### 고 찰

본실험에서 사용한 방법은 처음 Chaikoff<sup>(20)</sup> 등이 최

Table 2. Glucose Disappearance Rate and Conversion of Glucose into Respiratory CO<sub>2</sub>

	no. of case	glucose disappearance		RSA %	CO <sub>2</sub> prod. rate µM/hr/gm	CO <sub>2</sub> from C <sup>14</sup> -glucose µM/hr/gm	amt. of glucose oxidized to CO <sub>2</sub> µM/hr/gm	RGD %
		mg/hr/gm	µM/hr/gm					
control	18	11.0	61.1	70.4	87.4	61.5	10.3	16.9
diabetes	11	1.1	6.2	1.7	12.8	0.22	0.04	0.65

근 소개한 방법의 변법이다. 조직절편의 대사과정을 관찰하는데 있어서 실험기간중 일정한 기질의 농도 및 SA를 유지함으로써 각기질의 산화대사 과정의 양적 측정이 가능하게 되었다. 실험성적에서 보는데와 같이 incubation 초기에는 용매 C<sup>14</sup> 포도당의 소실율 및 RSA는 차차 증가하고 CO<sub>2</sub> 발생율은 저하하여 3~4시간 후에 비로소 일정한 "steady state" 대사율을 보이게 된다는 사실은 세포내 교소계에 의존하고 있는 여러 대사물질이 우선적으로 이용되어 이들 물질이 간장세포내 교소계에서 "wash out" 되는 과정에서 발생하는 현상이라고 볼 수 있다. 즉 간장교소계가 일정한 농도의 용매 C<sup>14</sup> 포도당과 평형이 되어 일정한 반응속도를 이루게 되는데 시간을 요하게 된다. 이러한 현상은 적출한 개심장에서 C<sup>14</sup> 포도당의 호흡 CO<sub>2</sub>로의 산화과정을 관찰한 실험<sup>25)</sup>에서도 볼 수 있으며 간장 및 심장과 같이 대사과정이 왕성한 조직에서 외부 C<sup>14</sup> 포도당과 평형을 이루는데 더 긴 시간을 요하게 된다. 그러므로 종래에 조직절편의 어떤 기질의 대사과정을 관찰하기 위하여 흔히 사용하였던 Warburg의 압력법은 용매 동위원소 기질과 조직교소계가 서로 평형에 이르기까지 의존하고 있는 여러 대사물질과 혼합되어 일어나는 복잡한 대사반응을 측정하게 되므로 조직교소계로 인한 어떤 기질의 대사능력에 관한 양적 측정이 불가능하였다. 그외 종래의 방법으로서 용매기질농도를 실험기간 중 일정하게 유지할 수 없으며 대사과정에서 측정된 중간대사 물질의 억제작용등을 제거할 수도 없었으나 본실험에서는 이러한 제난점을 어느정도 제거하여 간장조직 교소계로 인한 용매 C<sup>14</sup> 포도당의 산화대사 능력을 비교적 정확히 측정할 수 있었다고 믿는다. 물론 본실험에서도 장시간 C<sup>14</sup> 포도당의 대사과정을 생체 밖에서 관찰하는데 Blumenthal<sup>26)</sup> 등이 논의한바와 같이 세균의 감염으로 인한 측정값의 오류 등을 고려할 수 있으나 이점에 대하여는 무시하고 관찰하였다.

실험성적에서 보는데와 같이 정상간절편에서 CO<sub>2</sub> 발생율은 incubation 초기에 급격히 저하하고 RSA는 반대로 증가하여 4시간 이후에 비로소 일정한 값을 보인다는 사실은 정상생체의 간장의 산화대사과정에 있어서 포도당 이외의 여러 다른 물질이 관여함을 지적할 수 있다. 또 간장절편이 외부 C<sup>14</sup> 포도당과 평형상태를 이룬 후에도 RSA는 70%내외의 최대값을 보이며 더이상 증가하지 못하는 간장교소계의 호흡CO<sub>2</sub>로의 산화과정에 있어서 C<sup>14</sup> 포도당이 관여하는 최대한계를 표시하며 나머지 30%의 CO<sub>2</sub> 발생은 외부 용매포도당 이외의 세포내에 존재하는 다른 기질에서 유래됨을 보였다. C<sup>14</sup> 포도당의 단일주입으로 정상개에서 측정된 RSA는 약 26%<sup>27)</sup> 내외이며 적출한 개심장에서 관류실험<sup>25)</sup>에서는 33%의 값을 보였다. 즉 정상개체 또는 적출한 심장에서 조직절

편을 단일기질인 C<sup>14</sup> 포도당용매에 incubate 할 때의 RSA보다 낮다는 사실은 전자에서 생체교소계는 포도당이외의 여러 에너지원과 서로 경쟁적으로 반응하기 때문에 실제로 포도당이 에너지 대사에 관여하는바 적지마는 후자에서는 단일 C<sup>14</sup> 포도당 용매에 incubate 하였으므로 조직교소계는 포도당과 반응할 기회가 많으므로 RSA도 증가된다. 이러한 사실은 incubate 초기에 RSA는 최저값을 이루는 현상으로도 추측할 수 있다.

용매 C<sup>14</sup> 포도당의 소실율은 incubation 초기에는 최저값을 보이며 시간경과에 따라 증가하여 일정하게 됨은 역시 위에서 말한 조직교소계와 용매 C<sup>14</sup> 포도당이 평형상태에 이루는데 요하는 "metabolic lag"을 생각할 수 있으나 포도당의 세포막 투과성을 고려할때 단순한 확산현상이 아니고 세포막표면에서 어떠한 반응을 거쳐서 투과한다는 사실<sup>28)</sup>로 미루어 보아 이러한 반응으로 인한 "penetration lag"로의 가능성도 생각할 수 있다.

당뇨병 간장절편을 incubation 할 때에 C<sup>14</sup> 포도당의 소실율 및 산화대사율이 정상간절편에서 얻은 값에 비하여 현저히 저하하였지마는 시간에 따르는 대사율의 변화과정은 같으므로 용매 C<sup>14</sup> 포도당과 간장조직 교소계와 평형상태에 이룬후 즉 4시간 후에 대사율의 측정값을 취하여 alloxan 당뇨병 때의 용매 C<sup>14</sup> 포도당의 산화대사 과정의 변동을 정상값과 비교할때 용매 C<sup>14</sup> 포도당의 소실율은  $\frac{1}{10}$ 로, CO<sub>2</sub> 발생율은  $\frac{1}{6}$ 로 각각 저하하였다. 포도당 소실율의 저하는 세포내 교소계에서 포도당이 용이 억제되든가 또는 glycogenolysis 등으로 세포내 포도당이 축적되어 세포내외의 농도차의 저하로 오는 단순한 확산현상은 아닌것 같다. Goldstein 및 Levine<sup>29) 3) 4) 5)</sup> 등이 논의한 바와 같이 포도당의 세포막 투과는 단순한 확산현상이 아니고 세포막표면에서 phosphorylation과 밀접한 관계가 있는 어떠한 교소반응을 거쳐서 통과하는 것이다. 특히 이 반응에 insulin이 관여하여 세포막 투과를 촉진하는 고로 당뇨병 때에 보는 포도당 이용율의 저하는 첫단계로 세포막 표면에서 일어나는 현상이라고 하겠다. CO<sub>2</sub> 발생율의 저하는 간장교소계에서 insulin이 여러 기질의 산화대사 과정의 최종공통로인의 Krebs cycle의 어떤 단계의 교소반응에 영향을 준다는 사실<sup>28) 29)</sup>로 보아 당뇨병 간장조직에서 각기질의 호흡 CO<sub>2</sub>로의 산화과정이 일반적으로 억제됨을 볼 수 있다. 제 2표에서 보는 바와 같이 CO<sub>2</sub> 발생율은 당뇨병 간장조직에서 정상값의  $\frac{1}{6}$ 로 저하하였지마는 일방 C<sup>14</sup> 포도당에서 기인된 CO<sub>2</sub>는 정상에서 CO<sub>2</sub> 발생율의 70%에 비하여 당뇨병 때에는 1.7%로 약  $\frac{1}{50}$ 로 저하하였다. 이러한 실험성적으로 볼때 당뇨병 때에 C<sup>14</sup> 포도당의 산화과정의 억제현상은 세포내교소계에서 포도당이 Krebs cycle에 들어가기 전단계 교소반응에서 1차적으로 억제를 받고 2차적으로 Krebs

cycle 과 같은 산화과정에서 억제작용을 받음을 생각할 수 있다. 종합적으로 고찰할때 당뇨병시 산화대사과정 혹은 에너지 대사 과정에 있어 무시할 정도로 포도당의 이용율이 저하함은 위에서 말한 바와 같이 제 1 단계로 포도당 세포막 투과성의 저하 제 2 단계로 세포내 교소계에서 hexokinase 반응계의 억제작용 제 3 단계로 Krebs cycle 과 같은 산화과정에 있어서의 억제작용 등을 들 수 있다.

용매에서 소실된 포도당이 호흡 CO<sub>2</sub>로의 산화율을 보며는 정상간절편에서 소실된 C<sup>14</sup> 포도당의 16.9%가 완전산화과정에 관여하였다. 이러한 값은 정상개<sup>28)</sup> 및 적출한 심장<sup>25)</sup>에서 측정된 값과 비슷하다. 그러나 간장 절편 실험에서는 RSA 가 70%이며 전술한 생체실험에서 RSA 는 30% 내외였으므로 간장절편을 이용한 in vitro 실험에서는 포도당 대사과정에 있어서 더 엄기성으로 진행됨을 지적할 수 있다.

### 총      괄

Alloxan 으로 당뇨병을 유발시킨 11마리의 Sprague Dawley 종 흰쥐의 간장절편을 C<sup>14</sup> 포도당-용매 및 산소와 함께 항온조에 7~8시간 incubate 하면서 C<sup>14</sup> 포도당의 산화대사과정을 보았다. 실험기간중에 매시간마다 C<sup>14</sup> 포도당과 산소를 교체하여 줌으로서 용매 C<sup>14</sup>포도당의 농도 및 SA 를 일정하게 유지하였다. 얻은 성적은 다음과 같았다.

1. 용매 C<sup>14</sup> 포도당과 간장교소계가 평형상태를 이루어서 대사과정이 평탄화하기까지 3~4시간이 필요했다.
2. 포도당의 소실율은 시간경과에 따라 차차 증가하며 4시간 후에는 최고값을 보이고 그후는 평탄선을 유지했다. 4시간 이후의 평균값을 취하여 정상 및 당뇨병 때의 포도당 소실율을 비교한바 당뇨병 때에는 정상값의  $\frac{1}{10}$ 로 저하하였다.
3. CO<sub>2</sub> 발생율은 실험초기에 최대값을 보이며 시간경과에 따라 급격히 저하하여 4시간 이후에 비로소 평탄화하였다. 당뇨병 때에는 정상값의  $\frac{1}{6}$ 로 CO<sub>2</sub> 발생율이 저하하였다.
4. 용매 C<sup>14</sup> 포도당에서 유래하는 CO<sub>2</sub>의 발생율은 정상간절편에서 61.5μM/hr/gm 이며 당뇨병에서 0.22 μM/hr/gm 이었다.

relative specific activity 는 정상값 70.4%에 대하여 당뇨병 간장절편에서 1.7%로 현저한 저하를 보였다.

5. 소실된 C<sup>14</sup> 포도당이 호흡 CO<sub>2</sub>로 산화되는 크기 즉 relative glucose disappearance 는 정상값 16.9%이며 당뇨병에서 0.65%로, 역시 현저한 저하를 보였다.

6. 당뇨병 때에 간장절편으로 인한 C<sup>14</sup> 포도당의 산화대사과정의 억제현상을 고찰하고 본실험에서 이용한 방법의 타당성을 고찰하였다.

본연구에 있어서 간곡하신 지도편달과 교열을 하여 주신 은사 님기용 교수, 이상돈 강사에게 깊은 감사로 드립니다.

### Abstract

## Kinetic Study of Oxidative Metabolism of C<sup>14</sup>-labeled Glucose in Liver Slices of Normal and Alloxan Diabetic Rats

Ung Sup Lee, M.D.

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

Liver slices of 18 normal and 12 alloxan diabetic rats (Sprague-Dawley) were incubated with incubation mixture consisting of 15 cc of phosphate buffer to which were added C<sup>14</sup>-labeled glucose and 15 cc of oxygen. Incubation was continued up to 7 or 8 hours. During the long incubation period the incubation media and gas phases were replaced with fresh media and oxygen at hourly intervals. This procedure made it possible to obtain hourly samples to determine the amount and specific activity of CO<sub>2</sub> produced by the liver slices during the experimental period. It also had the advantage of presenting the tissue with a substrate of essentially constant concentration and specific activity of medium glucose. Data were summarized as the following.

- 1) Glucose disappearance from medium glucose rose during the first 4 hours and remained approximately constant, thereafter showing maximum values of 61.1 μM/hr/gm in the alloxan diabetic liver. Glucose disappearance rate decreased to one tenth of normal value in the alloxan diabetic liver slices.

- 2) Total CO<sub>2</sub> production rate was initially high, then fell rapidly and, after 3~4 hours it showed a steady values during the period of experiment. These steady values were taken for comparison between control and alloxan diabetic rats. In the diabetic cases total CO<sub>2</sub> production rate was about one sixth of normal control.

- 3) The rate of CO<sub>2</sub> production derived from medium C<sup>14</sup>-glucose, which is calculated by multiplying total CO<sub>2</sub> production rate with relative specific activity (RSA), was 61.5 μM/hr/gm in the control and 0.22 uM/hr/gm in the diabetic liver slices.

- 4) Fractions of glucose disappeared into respiratory CO<sub>2</sub>, which is named relative glucose disappearance, were calculated and found to be 16.9% in the control and 0.65% in the diabetic liver slices.

## REFERENCES

- 1) Stadie, W.C.: *Current concepts of the action of insulin. Physiol. Rev.*, 34:52, 1954.
- 2) Rosenberg, T. and W. Wilbrant.: *Enzymatic processes in cell membrane penetration. Int. Rev. Cytol.*, 1: 65, 1952.
- 3) Goldstein, M.S., W.L. Henry, B. Huddleston and R. Levine: *Action of insulin on transfer of sugars across cell barrier common chemical configuration of substances responsive to action of the hormone. Am. J. Physiol.*, 173:207, 1953.
- 4) Levine, G., M.S. Goldstein, B. Huddleston and S.P. Klein: *Action of insulin on the permeability of cell to free hexose, as studied by its effect on the distribution of galactose. Am. J. Physiol.*, 163: 70, 1950.
- 5) Goldstein, M.S., V. Mullick, B. Huddleston and R. Levine: *Action of muscular work on transfer of sugars across cell barrier: comparison with action of insulin. Am. J. Physiol.* 173:212, 1953.
- 6) Cori, C.F. and G.T. Cori: *J. Biol. Chem.* 124:554 1938.
- 7) Slein, M.W., G.T. Cori, and C.F. Cori: *A comparative study of hexokinase from yeast and animal tissues. J. Biol. Chem.*, 186:763, 1950.
- 8) Soskin, S. and R. Levine: *Carbohydrate metabolism, Chicago Univ. Chicago Press, 1952.*
- 9) Stetten, D., Jr., I.D. Welt, D.J. Ingle and E.H. Morley: *Rates of glucose production and oxidation in normal and diabetic rats. J. Biol. Chem.*, 192: 817, 1951.
- 10) Wick, A.N., Drury, R.W. Bancroft and E.M. Mackay: *Action of insulin on the extrahepatic tissues. J. Biol. Chem.*, 188:241, 1951.
- 11) Feller, D.D., E.H. Strisower and I.L. Chaikoff: *Turnover and oxidation of body glucose in normal and alloxan-diabetic rats. J. Biol. Chem.*, 187:571, 1950.
- 12) Feller, D.D., I.L. Chaikoff, E. H. Strisower and G.L. Searle: *Glucose utilization in the diabetic dog, studied with C<sup>14</sup>-glucose. J. Biol. Chem.*, 188:865, 1951.
- 13) Krebs, H.A. and P. Eggleston: *The effect of insulin on oxidations in isolated muscle tissue. Biochem. J.*, 32:913, 1938.
- 14) Pearson, O.H., C.K. Hsieh, C.H. Dutoit and A.B. Hasting: *Am. J. Physiol.*, 158:261, 1949.
- 15) Villee, C. and A.B. Hasting: *The utilization in vitro of C<sup>14</sup>-label-ed acetate and pyruvate by diaphragm muscle of rat. J. Biol. Chem.*, 181:131, 1949.
- 16) Stetten, D. Jr. and G.E. Boxer: *J. Biol. Chem.*, 156:271, 1944.
- 17) Stetten, D. Fr. and B. Klein: *J. Biol. Chem.*, 159:593, 1945.
- 18) Stetten, D. Jr. and B. Klein: *Studies in carbohydrate metabolism J. Biol. Chem.*, 162:377, 1946.
- 19) Krahl, M.E.: *Incorporation of C<sup>14</sup>-amino acids into glutathione and protein fractions of normal and diabetic rat tissue. J. Biol. Chem.*, 200:99, 1953.
- 20) Cecil, L.A., H. Gainer and I.L. Chaikoff: *Method for kinetic study of in vitro conversion of a C<sup>14</sup>-labeled substrate to CO<sub>2</sub>. J. Appl. Physiol.*, 15:949, 1960.
- 21) Potter, V.R.: *Method in medical research, Chicago: Yr. Bk. Pub. Vol. 1., p. 299. 1948.*
- 22) Somogyi, N.: *A new reagent for the determination of sugar. J. Biol. Chem.*, 160:61, 1945.
- 23) Nelson, N.: *A photometric adaption of the Somogyi method for the determination of glucose. J. Biol. Chem.*, 153:375, 1944.
- 24) Van Slyke, D.D., J. Folch.: *Manometric carbon determination. J. Biol. Chem.*, 136:509, 1940.
- 25) Rhee, Sang Don, J.I. Pack, K.Y. Nam: *Metabolism of <sup>14</sup>C-glucose by isolated dog heart. New. Med. J. (in Korea)*, 3:299, 1960.
- 26) Blumenthal, H. J., H. Koffler and E. C. Heath: *Biochemistry of filamentous fungi. J. Cell. & Comp. Physiol.*, 50:471, 1957.
- 27) Pack, Jae Il *Metabolism of C<sup>14</sup>-glucose in the intact dog. Seoul. J. Med.*, 1:301, 1961.
- 28) Shorr, E. and S.B. Barker: *In vitro action of insulin on minced avian and mammalian muscle. Biochem. J.*, 33:1798, 1939.
- 29) Stare, E.J. and C.A. Baumann: *The effect of insulin on muscle respiration. J. Biol. Chem.*, 133:453, 1940.