

## 흰쥐 간장절편에 있어서 C<sup>14</sup>-pyruvate의 대사과정에 관한 실험

### Kinetics of Oxidative and Non Oxidative Metabolism of C<sup>14</sup>-labeled Pyruvate in Liver Slices of Normal Rats.

서울대학교 의과대학 생리학교실

<지도 남 기 용 교수>

이 응 섭

포도당이 호흡 CO<sub>2</sub>로 산화대사되는 과정에 관하여 C<sup>14</sup>-포도당을 이용하여 비교적 정확하게 산화대사율을 측정할 수 있다. 우리 교실에서는 C<sup>14</sup>-포도당의 단일주입 또는 계속주입법을 이용하여 일련의 실험성적을 얻은 바 있다. 즉 정상 생체에서 총 CO<sub>2</sub> 생산물의 약 20%의 CO<sub>2</sub>가 순환혈액 내 포도당에서 유래하였고<sup>1)</sup> 적출한 장기 특히 심장에서는 약 30%의 호흡 CO<sub>2</sub>가 관류혈액내의 C<sup>14</sup>-포도당에서 유래함을 보았다.<sup>2)</sup> 위에서 보는 바와 같이 혈액내 포도당이 정상 생체내 또는 각종 장기에서 에너지대사에 관여함이 20~30%에 불과하였다. 즉 나머지 대부분의 에너지는 포도당 이외의 다른 기질의 대사과정으로부터 유래된다. 그러나 이러한 실험성적은 흰쥐 간장절편에서 얻은 Chaikoff 등<sup>3)</sup>의 값과 큰 차이가 있다. 그들은 간장절편을 C<sup>14</sup>-포도당용매속에 장시간 배양하여 용매내의 C<sup>14</sup>-포도당을 호흡 CO<sub>2</sub>로 완전산화 시키는 간장교소계의 능력을 관찰하였는 바 완전산화되는 크기는 대략 70%<sup>4)</sup>이었다. 이 차이는 다음과 같은 이유로 오지않는가 한다. 간장의 장시간 배양에서는 에너지원으로서 단일기질인 용매 C<sup>14</sup>-포도당과 간장 교소계가 완전평형상태에 이른 다음에 C<sup>14</sup>-포도당의 "steady state" 대사과정을 관찰한 것으로, 일반교소계 반응에서 보는 바와 같이, 어떠한 농도 이상으로 용매 C<sup>14</sup>-포도당농도가 유지되었을 때에 간장 교소계로 인한 C<sup>14</sup>-포도당의 산화율은 일정한 값을 보이며 최대의 값을 보이게 되었던 것이다. 이에 반하여 정상 생체내에서와 같이 혈액관류실험<sup>1)</sup>에서 세포내 교소계는 여러 복잡한 기질계와 평형을 이루고 있기 때문에, 기질계와 교소계 사이에 경쟁(Competition)이 나타나는 결과로 혈액내 포도당이 산화과정에 관여하는 바가 단일기질인 C<sup>14</sup>-포도당만 배양할 때보다 적었다 하겠다. 즉 포도당의 산화대사과정에 관한 실험성적은 위에서 보는 바와 같

이 실험방법에 따라서 차이를 보이게 된다. 간장 뿐만 아니라 생체내 여러 조직의 교소계에 있어서 탄수화물 특히 포도당이 호흡 CO<sub>2</sub>로 완전히 산화되는 대사과정이 일반적으로 알려져 있는 Embden-Meyerhoff의 해당경로와 최종공통로로서 Krebs cycle의 중간대사과정을 밝히 반응이 이루어진다면 반드시 중간대사물질인 Pyruvate를 거쳐 반응이 진행하게 된다. 그러나 위에서 본 실험들은 C<sup>14</sup>-포도당이 호흡 CO<sub>2</sub>로 변화함에 있어서 종합적반응을 관찰한 것에 불과하며 중간대사경로에 관한 설명은 불가능하다. 여기 실리는 실험은 포도당의 Glycolysis 산물인 C<sup>14</sup>-Pyruvate를 이용하여 흰쥐간장 절편을 장시간 항온조내에서 배양할 때에 용매 C<sup>14</sup>-Pyruvate가 호흡 CO<sub>2</sub>로 산화되는 대사 반응과정을 측정함으로써 탄수화물의 중간 대사과정에 있어서 호흡 CO<sub>2</sub>로 완전산화되는 과정에 관한 경로에 관하여 고찰하였다.

### 실험 방법

**실험동물** : 32마리의 Sprague-Dawley 종 흰쥐의 간장을 8마리 씩의 4군으로 나누었다. 간장을 C<sup>14</sup>-Pyruvate 용매 속에서 배양하였는 바, 각 군 마다 그 농도가 상이하었다. 제 1군은 10, 제 2군은 20, 제 3군은 30, 제 4군은 40 mg/dl로 C<sup>14</sup>-Pyruvate가 들어 있는 인산염 완충액(Phosphate buffer) 속에서 배양하였다.

**C<sup>14</sup>-Pyruvate 용매** : Pyruvate-2-C<sup>14</sup> (New England Nuclear Corp.) 약 50  $\mu$ C에 non radioactive Na-Pyruvate를 넣고 50 ml로 희석하여 이 용액의 Pyruvate 농도를 20 mg/ml로 만들어 저장용 C<sup>14</sup>-Pyruvate 용액으로 하였다.

배양에 쓰는 C<sup>14</sup>-Pyruvate 용매는 실험직전에 저장용 C<sup>14</sup>-Pyruvate 용액을 각각 0.5, 1, 1.5, 2 ml씩 따로 채취하고 인산염 완충액(Phosphate buffer, pH 7.4)으

로 희석하여 100 ml로 만들어 C<sup>14</sup>-Pyruvate 용매내의 Pyruvate 농도를 10, 20, 30, 40 mg/dl의 농도를 유지하게끔 하였다.

용매내의 C<sup>14</sup>-Pyruvate의 Specific activity(SA)는 저장용 C<sup>14</sup>-Pyruvate 용액 1 ml를 Van Slyke-Folch<sup>6)</sup> 방법으로 CO<sub>2</sub>로 산화시킨 다음 이를 BaCO<sub>3</sub>로 침전시켜 Geiger-Müller counter로 측정하였다.

**실험조작 :** 각 군에서 저출한 간장절편 약 2~3gm을 50 ml 주사기에 각종 농도의 C<sup>14</sup>-Pyruvate 용매 15 ml와 약 20 ml의 산소와 함께 밀폐하고 38°C를 유지하는 항온조내에서 매분 60회정도 좌우진탕을 가하면서 5시간 내지 6시간 동안 관찰하였다. 실험기간 중 용매내 C<sup>14</sup>-Pyruvate의 농도와 SA를 일정하게 유지하기 위하여 매 시간마다 배양용매와 산소를 새로운 것과 교체하였다. 이 때에 기존하고있던 용매 용액과 개스는 특수한 밀폐장치인 탄산가스 이동관<sup>4)</sup>에 옮겨 매 시간의 용매와 개스표본을 얻어 Pyruvate 및 lactate의 농도와 CO<sub>2</sub>생산물 및 CO<sub>2</sub>의 SA를 측정하였다.

**화학조작 :** Pyruvate 농도측정에는 Friedmann 및 Hagen의 방법<sup>7)</sup>, lactate 측정에는 Barker 및 Summerson의 방법<sup>8)</sup>을 사용하였고 탄산가스 이동관내에 alkaline carbonate sample로서 얻은 CO<sub>2</sub>는 BaCl<sub>2</sub>로 Whatman 여과지 (No. 542) 위에 BaCO<sub>3</sub>로 침전시켜 BaCO<sub>3</sub>의 무게를 측정하여 매 시간의 CO<sub>2</sub>생산물을 계산함과 동시에 이 표본을 이용하여 호흡 CO<sub>2</sub>의 SA를 Geiger-Müller counter로 측정하였다. 방사능측정은 모두 BaCO<sub>3</sub> 표본의 자가흡수(Selfabsorption)에 대한 교정을 하였다.

**계산방법 :** 매 시간의 Pyruvate의 소실율은 배양 전후의 농도차에 배양용매의 용적을 승한 값을 간장절편의 무게로 제하여  $\mu\text{M/hr/gm of tissue}$ 로 표시하였다.

lactate의 축적율도 Pyruvate 소실율 측정과 같은 방법으로 계산하였다. CO<sub>2</sub> 발생율은 탄산가스 이동관에서 매 시간에 발생한 탄산가스를 alkaline carbonate sample로서 얻고 이를 BaCO<sub>3</sub>로 침전시켜 무게를 측정하여 BaCO<sub>3</sub>의 분자량으로 제하여 단위무게의 조직의 CO<sub>2</sub> 발생량을  $\mu\text{M/hr/gm}$ 로 표시하였다.

용매 속에 있는 C<sup>14</sup>-Pyruvate로부터 유래하는 CO<sub>2</sub>발생율의 총 CO<sub>2</sub> 발생율에 대한 비율을 상대적 비 방사능(relative specific activity, RSA)이라 하였으며, 계산은 둘의 비 방사능의 비율로 하였다. 호흡 CO<sub>2</sub>로 산화된 용매에서 소실된 Pyruvate의 분율을 relative pyruvate disappearance to CO<sub>2</sub>(RPD<sub>CO<sub>2</sub></sub>)라 일컬었으며 다음과 같이 계산하였다.

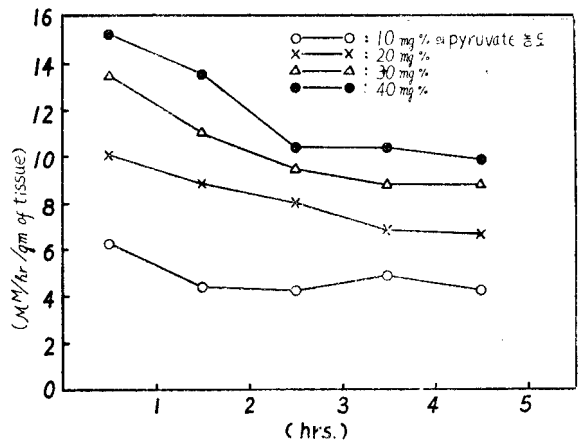
$$\text{R.P.D.}_{\text{CO}_2} = \frac{\text{CO}_2 \text{ 발생율} \times \text{RSA}}{\text{Pyruvate 소실율} \times 3}$$

lactate로 환원된 Pyruvate의 량과 용매용액에서 소실된 Pyruvate와의 분율을 relative pyruvate disappearance to lactate (RPD<sub>lactate</sub>)라 불렀으며, 여기에 측정된 lactate는 모두 용매 C<sup>14</sup>-pyruvate에서 기인되었다고 가정하여 lactate의 축적율 및 pyruvate의 소실율의 비율로 구하였다.

**실험 성적**

각 군의 간장 절편을 50 ml 주사기에 서로 다른 농도의 C<sup>14</sup>-pyruvate 용매와 5시간동안 배양할 때 각 군에서 얻은 시간에 따르는 C<sup>14</sup>-pyruvate의 소실율, lactate의 축적율, CO<sub>2</sub>생산물, 및 용매 C<sup>14</sup>-pyruvate가 호흡 CO<sub>2</sub>로 변화될 때의 산화율에 관한 실험성적을 제1 표에 종합하였다.

C<sup>14</sup>-pyruvate의 소실율은 그림 1에서 보는 바와같이 각 군에서 첫 시간에 모두 높은 값을 보이며 시간경과에 따라 저하하여 3시간 이후에는 비교적 일정한 값을 보이며 평탄선(plateau)을 이루게 된다. 그림 1의 평탄선값을 기준으로하여 용매 C<sup>14</sup>-Pyruvate 농도에 따르는 Pyruvate의 소실율은 10 mg/dl 농도 (제 1군)에서 평균 4.2  $\mu\text{M/hr/gm}$ , 20 mg/dl 농도 (제 2군)에서 7.1  $\mu\text{M/hr/gm}$ , 30 mg/dl 농도 (제 3군)에서 8.8  $\mu\text{M/hr/gm}$ , 40 mg/dl 농도 (제 4군)에서 10.0  $\mu\text{M/hr/gm}$ 의



[Fig. 1] Pyruvate disappearance rates-time curves. Pyruvate disappearance rates decrease during the first 3 hours of incubation and remains approximately constant showing steady values in every group. These steady values increase as the concentration of medium pyruvate is raised.

값을 보인다(제2 표).

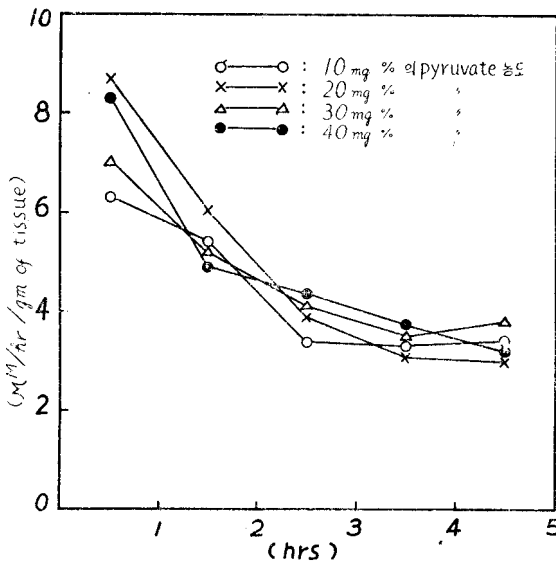
용매 C<sup>14</sup>-Pyruvate의 농도증가에 따르는 단위무게의 간절편의 C<sup>14</sup>-Pyruvate 소실율의 증가율은 저농도에서 현저하며 고농도에서는 비교적 완만하여 그림 5에서 보

[Table 1] Pyruvate disappearance rates, lactate accumulation rate, total CO<sub>2</sub> production rates and RSA of each group during the incubation period.

group	Pyr. conc. in media (mg/dl)	No of case	pyruvate disappearance rate (μM/hr/gm)					lactate appearance rate (μM/hr/gm)					R S A %					total CO <sub>2</sub> production rate (μM/hr/gm)				
			1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
			time in Hrs																			
1	10	8	6.19	4.59	4.25	3.99	4.56	5.16	4.49	3.32	3.51	3.27	2.72	4.42	6.53	6.75	7.93	34.60	28.70	25.80	32.10	22.50
2	20	8	10.07	9.14	8.15	6.93	6.53	8.75	6.10	3.70	3.45	3.14	4.52	7.44	9.63	11.53	11.78	31.58	28.60	26.84	22.35	20.60
3	30	8	13.58	11.63	9.28	8.80	8.64	7.05	5.29	4.22	3.66	4.07	3.99	9.43	12.55	14.55	14.85	30.84	30.10	25.00	24.55	23.93
4	40	8	15.11	13.76	10.19	10.18	9.64	8.34	5.15	4.57	4.75	3.16	5.04	10.64	13.25	15.80	15.22	25.25	30.14	28.70	27.74	23.26

[Table 2] Steady state metabolic data of each group for pyruvate disappearance, lactate accumulation and oxidation of pyruvate into respiratory CO<sub>2</sub>.

group	Pyruvate concent. in media (mg/dl)	No of case	pyruvate disapp. rate (μM/hr/gm) (SD)	lactate appear. rate (μM/hr/gm) (SD)	RSA % (SD)	total CO <sub>2</sub> product. rate (μM/hr/gm) (SD)	pyruvate equivalent disapp. into CO <sub>2</sub> (μM/hr/gm)	RPD <sub>CO<sub>2</sub></sub> %	RPD lactate %
1	10	8	4.2 (±1.07)	3.3 (±0.65)	7.1 (±0.79)	24.4 (±4.29)	0.58	13.8	78.6
2	20	9	7.1 (±1.17)	3.5 (±0.68)	9.4 (±2.66)	23.0 (±4.65)	0.72	10.1	49.3
3	30	8	8.8 (±1.74)	3.8 (±0.39)	14.2 (±2.31)	26.0 (±1.74)	1.23	14.0	43.2
4	40	8	10.0 (±2.67)	4.1 (±0.54)	14.7 (±1.72)	27.3 (±4.42)	1.34	13.4	41.0



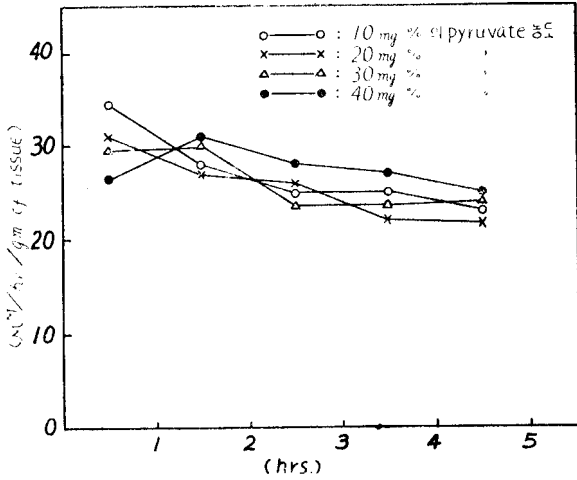
[Fig. 2] Lactate accumulation rates-time curves.

Lactate accumulation rate decreases initially and shows steady value after 3 hours of incubation period in each group. There are little changes in lactate accumulation between 4 groups.

는 바와 같이 30 mg/dl 이상의 Pyruvate 농도에서는 포화된 값을 보이며 일정하게 된다. 각 군에 있어서 lactate의 용매내축적율 또는 생산율은 Pyruvate 소실율에서와 같이 첫시간에는 모두 높고 시간경과에 따라 급격히 저하하여 3시간 이후에는 비교적 일정한 값을 보이게 된다. (그림2) 3시간후의 평탄값의 평균을 구하여 비교한 각 군의 lactate의 축적율은 제1군에서 3.3 μM/hr/gm, 제2군에서 3.5 μM/hr/gm, 제3군에서 3.8 μM/hr/gm, 제4군에서 4.1 μM/hr/gm을 보였다. (제2표) 그림 5에서 보는 바와 같이 lactate 축적율은 각 군에서 별 변동이 없으며 비교적 일정하다. 즉 Pyruvate로의 환원과정은 용매 pyruvate

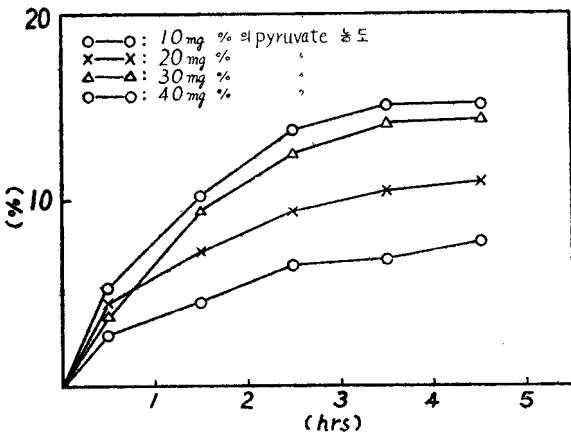


흰쥐 간장절편에 있어서 C-14 pyruvate의 대사과정에 관한 실험



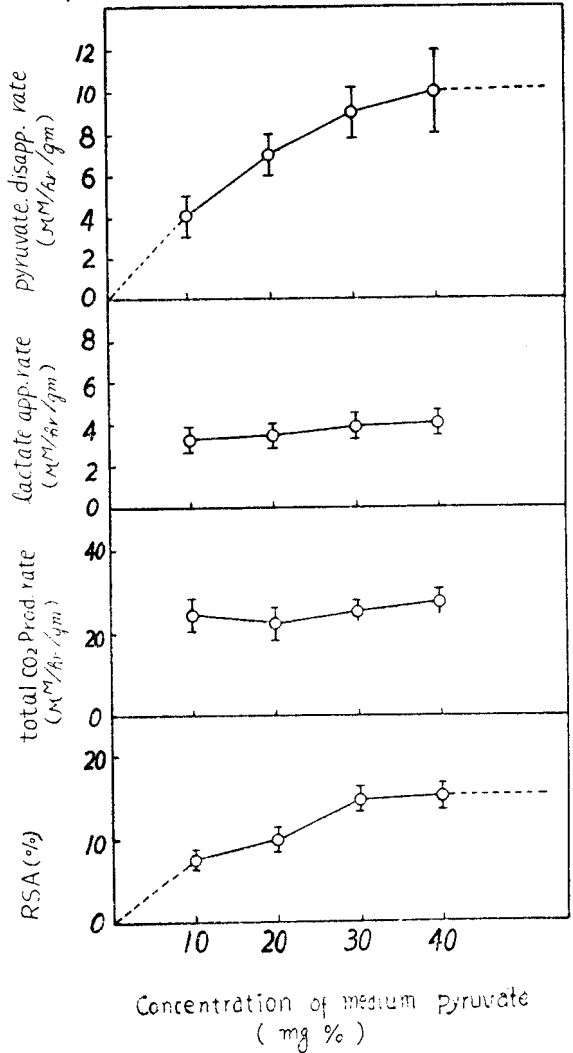
[Fig. 3] Total CO<sub>2</sub> production rates-time curves. Total CO<sub>2</sub> production rates in 4 groups show little changes during incubation period.

농도 10mg/dl 이상에서는 최대값을 보임을 지적할 수 있다. 총 CO<sub>2</sub> 발생율도 각 군에 있어서 시간에 따라서 서서히 저하하며(그림3) 3시간 이후에는 비교적 일정한 값을 보인다. 용매 Pyruvate 농도에 따르는 CO<sub>2</sub> 발생율은 제1군에서 24.4±4.3μM/hr/gm, 제2군에서 23.0±4.7μM/hr/gm, 제3군에서 26.0±1.7μM/hr/gm, 제4군에서 27.3±4.4μM/hr/gm을 보이며 lactate 축적율에서와 같이 이 실험에서 사용한 용매 C<sup>14</sup>-Pyruvate 농도 범위에서는 비교적 일정하였다.(그림5) RSA는 그림4에서 보는 바와 같이 첫시간에는 값이 작으며 각 군에서 시간경과에 따라 배양초기에는 급격히 증가하다가 서서히 증가율이 저하하여 3시간 후에는 RSA-시간 곡



[Fig. 4] RSA-time curves. RSA increases exponentially during the first 3 hours of incubation period and reaches plateau value in each group.

선의 기울기는 0에 도달하게 된다. 각 군에 있어서 3시간 이후에 평균값은 제1군에서 총CO<sub>2</sub> 발생율의 7.1±0.79%, 제2군에서 9.4±2.66%, 제3군에서 14.2±2.31%, 제4군에서 14.7±1.72%가 용매 C<sup>14</sup>-Pyruvate로부터 유리함을 보였다. 즉 용매 C<sup>14</sup>-Pyruvate 산화과정에서 유리된 호흡 C<sup>14</sup>O<sub>2</sub>의 발생율은 30mg/dl 이하의 용매 Pyruvate 농도에서는 농도증가에 따라 증가하지만 30



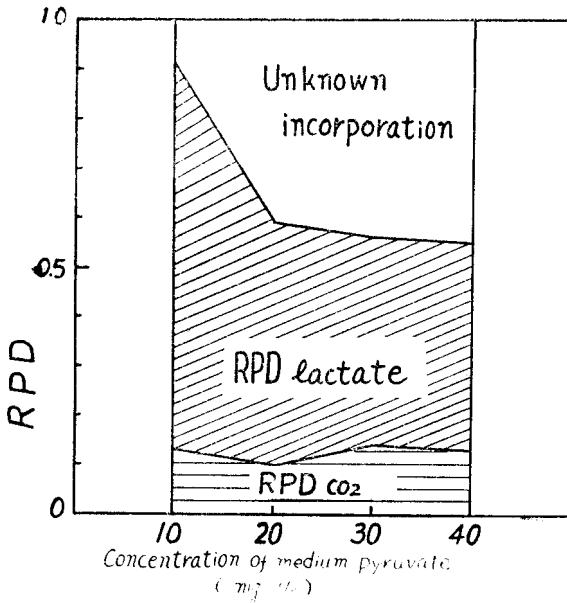
[Fig. 5] The relation between Concentration of medium pyruvate and pyruvate disappearance rate, lactate accumulation rate, total CO<sub>2</sub> production rate and RSA curves.

Pyruvate disappearance rates and RSA increase as concentration of medium pyruvate is raised and shows approximately constant values at concentrations greater than 30mg/dl. Little changes in lactate accumulation and total CO<sub>2</sub> production rate is seen in groups 4.

mg/dl 이상에서는 비교적 일정한 값을 보이며 포화된 값을 보이게 된다.

1mM의 Pyruvate가 호흡 CO<sub>2</sub>로 완전산화할 때 3mM의 CO<sub>2</sub>를 생산하므로 용매 Pyruvate에서 기인된 CO<sub>2</sub>발생율(RSA×total CO<sub>2</sub> Production rate)을 3으로 제하면 호흡CO<sub>2</sub>로 완전산화된 pyruvate의 소실율을 계산할 수 있다. 이렇게 계산한 호흡CO<sub>2</sub>로 소실된 pyruvate의 산화율은 제1군에서 0.58μM/hr/gm of tissue, 제2군에서 0.72μM/hr/gm of tissue, 제3군에서 1.23μM/hr/gm of tissue, 제4군에서 1.34μM/hr/gm of tissue의 값을 계산하였다. (제2표)

용매 C<sup>14</sup>-Pyruvate의 소실율도 위에서 본 바와 같이 호흡 CO<sub>2</sub>로 소실된 pyruvate의 산화율과 같이 용매 C<sup>14</sup>-pyruvate농도에 따라 변화하므로 호흡 CO<sub>2</sub>로 산화된 C<sup>14</sup>-Pyruvate의 용매에서 소실된 C<sup>14</sup>-Pyruvate에 대한 분율(fraction), 또는 CO<sub>2</sub>의 relative pyruvate disappearance(RPD<sub>CO<sub>2</sub></sub>)는 각 군에 있어서 별 변동이 없이 비교적 일정하였다. (그림6)



[Fig. 6] Fate of disappeared pyruvate from medium. About 90% of pyruvate disappeared from the incubation medium incorporated into lactate and respiratory CO<sub>2</sub> at the 10mg/dl of pyruvate concentration in medium. However, fractions of pyruvate disappeared into lactate and respiratory CO<sub>2</sub> decreases to about 60% at concentrations of pyruvate more than 20mg/dl.

용매에 축적된 lactate는 모두 용매의 C<sup>14</sup>-Pyruvate에서 기인되었다고 가정하여 lactate의 relative pyruvate disappearance (RPD<sub>lactate</sub>)의 평균값을 계산한 결과 제1군에서 78.6%, 제2군에서 49.3%, 제3군에서 43.2

%, 제4군에서 41.0%의 소실된 용매 C<sup>14</sup>-Pyruvate가 lactate로 환원되었음을 볼 수 있다. 이 성적들을 종합하여 보면 그림6에서 보는 바와 같이 간장절편에 의하여 소실된 용매 C<sup>14</sup>-pyruvate는 제1군에서 90%, 제2, 3, 4군에서는 약 50~60%가 호흡CO<sub>2</sub>와 lactate로 산화 및 환원되었음을 설명할 수 있다.

### 고 찰

이 실험에서 사용한 배양방법은 저자들의 C<sup>14</sup>-포도당 실험<sup>4)5)</sup>에서 논의한 바와 같이 조직절편의 단일기질의 대사과정을 관찰함에 있어서 실험기간 중 일정한 기질의 농도와 SA를 유지함으로써 "steady state"대사과정을 어느정도 정확히 측정할 수 있는 것이라 하겠다.

간장 절편을 C<sup>14</sup>-pyruvate용매에 배양할 때 시간에 따르는 여러 대사율, 즉 C<sup>14</sup>-pyruvate의 소실율, lactate 축적율, CO<sub>2</sub> 발생율, 및 용매 C<sup>14</sup>-pyruvate에서 유리된 호흡 C<sup>14</sup>O<sub>2</sub>의 발생율은 그림 1, 2, 3, 4에서 보는 바와 같이 모두 배양초기에는 일정하지 못하고 변화하지만 3시간 이후에는 비로소 일정한 값을 보이며 용매 C<sup>14</sup>-pyruvate 및 간장절편과 평형상태에 이르게 된다. 배양 초기의 여러 대사율의 변화과정은 용매기질 및 간장교소계와 평형상태에 이르게까지 간장세포내에 이미 존재하던 여러 기질이 소모되어 셋기워 나가는 복잡한 간장교소계의 대사과정에 기인되며 완전히 간장교소계가 용매의 단일기질과 평형상태에 이르게 되면 일정한 steady state대사율을 보이게 된다. 그러므로 평형상태에 이른 뒤의 모든 대사율의 값은 간장교소계가 용매 단일기질을 이용할 수 있는 최대 능력을 표시하게 된다.

용매 C<sup>14</sup>-pyruvate의 소실율은 30mg/dl 이하의 농도에서는 농도증가에 따라 pyruvate소실율이 증가하고 그 이상의 농도에서는 변화없이 일정한 최대값을 보이는 사실은 일반교소반응의 특성을 나타낸다.<sup>9)</sup> 30mg/dl 이상의 pyruvate농도에 있어서 pyruvate의 소실율은 약 10μM/hr/gm이며 이 값은 포도당소실율의 최대값 50μM/hr/gm의 1/5에 불과하다. 이러한 사실은 이 실험에서 사용한 용매 C<sup>14</sup>-pyruvate의 농도가 정상 혈액 내 농도보다 높다는 점으로 보아 세포내교소계로 인한 pyruvate의 소실율이 포도당보다 낮다는 이유보다 도리어 세포막 투과과정의 교소반응에 있어서 포도당이 pyruvate보다 쉽게 통과할 수 있다는 인상을 주게 된다.

lactate의 축적율은 각 군에 있어서 상당히 높은 농도의 pyruvate용매에 배양하였으므로 pyruvate→lactate의 lactic dehydrogenase 반응은 일반 질량작용의 법칙에 의거하여 소실된 pyruvate는 대부분의 lactate로 축적됨을 보았으나 용매 pyruvate 농도증가에 따르는 lactate의 축적율은 pyruvate의 소실율과는 달리 그림5

에서 보는 바와 같이 각 군에 있어서 별 변동없이 일정한 측정율을 보였다. 이러한 사실은 간장 절편에 있어서 lactate dehydrogenase의 환원반응은 10mg/dl 이하의 용매 pyruvate농도에서 최대반응속도를 이루게 될 수 있다. 한편 농도증가에 따라 pyruvate의 소실율은 30mg/dl 이내의 pyruvate농도에서는 증가하므로 lactate dehydrogenase반응은 pyruvate를 중심으로한 생체내의 여러 대사반응, 즉 Krebs cycle을 통한 호흡 CO<sub>2</sub>로의 완전산화경로, 포도당 또는 glycogen으로의 합성과정, Acetyl-CoA를 통한 lipogenesis 또는 4탄소 화합물의 CO<sub>2</sub> fixation reaction 등보다 저농도에서 최대반응속도를 보이며 쉽게 이루어짐을 볼 수 있다. 실지로 제2표에서 보는 바와 같이 총 CO<sub>2</sub>발생율은 각 군에서 비교적 일정한 값을 보임에도 불구하고 용매 C<sup>14</sup>-pyruvate에서 유리된 CO<sub>2</sub>발생율은 농도증가에 따라 증가됨을 보았다.

이러한 사실은 심장근육 절편을 이용한 Miller 및 Olson의 실험성적<sup>10)</sup>과 비등하다. 한편 호흡 CO<sub>2</sub>로의 완전산화과정에 있어서 다른 기질로 인한 CO<sub>2</sub>발생보다 Pyruvate를 통하여 반응이 쉽게 이루어짐을 지적할 수 있다. 용매 Pyruvate에서 기인된 CO<sub>2</sub>의 총 CO<sub>2</sub>발생율에 대한 분율은 개의 적출심장<sup>11)12)</sup> 또는 조직절편<sup>13)</sup>에서 측정된 값과 비등하였다. 그러나 저자등의 간장 절편을 이용하여 같은 방법으로 측정된 C<sup>14</sup>-포도당실험<sup>4)5)</sup>의 값에 비하여 현저히 저하하였음을 보았다. 만약에 포도당의 CO<sub>2</sub>로의 완전산화과정이 일반적으로 알려진 glycolysis 또는 Krebs cycle<sup>4)5)</sup>이 유일한 대사경로라고 가정하면 그의 중간대사물질인 Pyruvate로 인한 CO<sub>2</sub>의 발생율도 같은 조건하에서는 포도당의 CO<sub>2</sub>발생율과 비등하여야 할 것이다. 그러나 이 실험에서 얻은 실험성적의 현저한 저하는 다음 몇 가지 가능성을 지적할 수 있다. 첫째, lactate축적으로 인한 산도의 변화로 인한 간장교소계의 작용의 저하, 둘째, glycolysis 및 Krebs cycle 이외의 Hexose-monophosphate shunt와 같은 다른 산화경로, 셋째, 발생한 CO<sub>2</sub>가 용매 Pyruvate와 결합하여 glycogen 등으로의 합성,<sup>15)</sup> 넷째, 포도당 및 Pyruvate의 세포막 투과성의 차이, 다섯째, Pyruvate → lactate의 환원반응으로 인한 호흡 CO<sub>2</sub>로의 산화과정에서 DPN과 같은 호흡고소의 결핍으로 인한 CO<sub>2</sub>의 발생율의 저하등의 가능성을 지적할 수 있을 뿐이다. RPD를 보면 그림6에서 보는 바와 같이 저농도에서는 소실된 Pyruvate는 대부분이 lactate와 호흡 CO<sub>2</sub>로 소실되지만 고농도일수록 lactate 및 호흡 CO<sub>2</sub>의 RPD는 저하한다. 즉 고농도의 용매일수록 Pyruvate의 unknown incorporation이 증가된다.

## 총 괄

32마리의 Sprague Dawley종 흰쥐를 4 군으로 나누어 각 군의 간장절편은 50cc 주사기에 서로 다른 농도의 C<sup>14</sup>-Pyruvate용매와 5시간동안 38°C 항온조내에서 배양하는 도중에, 매 시간마다 새로운 C<sup>14</sup>-Pyruvate 용매와 교체하면서 간장절편으로 인한 용매 C<sup>14</sup>-Pyruvate의 대사과정을 관찰하여 다음과 같은 성적을 얻었다.

1) 배양시간의 경과에 따르는 각종 대사율의 변화과정은 다음과 같았다.

용매 C<sup>14</sup>-pyruvate의 소실율, lactate의 축적율, CO<sub>2</sub>발생율은 각 군에 있어서 배양초기에 높은 값을 보이며 차차 저하하여 3시간 후에는 일정한 값을 보였다. RSA 및 용매 C<sup>14</sup>-pyruvate에서 유리된 호흡 CO<sub>2</sub>의 발생율은 반대로 배양초기에 낮고 시간에 따라 급격히 증가하여 역시 3시간 후에는 최대값을 보이며 일정하게 되었다. 3시간 이후의 일정한 값을 기준으로 하여 각 군의 대사율을 서로 비교관찰하였다.

2) Pyruvate 소실율은 제1군에서 4.2, 제2군에서 7.1, 제3군에서 8.8, 제4군에서 10.0 μM/hr/gm의 값이었다. 즉 용매 Pyruvate의 농도증가에 따라 소실율도 증가하며 30mg/dl 이상의 농도에서는 비교적 일정한 값을 얻었다.

3) 각 군에 있어서 lactate의 축적율은 각각 3.3, 3.5, 3.8, 4.1 μM/hr/gm의 값을 보이었으며, 용매 C<sup>14</sup>-Pyruvate의 농도증가에 따라 별다른 변동이 없이 비교적 일정하였다.

4) CO<sub>2</sub>발생율은 각 군에 있어서 각각 24.4, 23.0, 26.0, 및 27.3 μM/hr/gm을 얻었으며 lactate 축적율에서와 같이 각 군의 변화를 볼 수 없었다.

5) RSA 및 용매 C<sup>14</sup>-Pyruvate에서 유리된 CO<sub>2</sub>발생율은 용매 C<sup>14</sup>-Pyruvate 농도증가에 따라 상승하며 30mg/dl 이상에서는 일정한 값을 보였다. 각 군의 RSA는 제1군에서 7.1, 제2군에서 9.4, 제3군에서 14.2, 제4군에서 14.7%의 값을 얻었다. 한편 C<sup>14</sup>-Pyruvate에서 기인된 CO<sub>2</sub>발생율은 각 군에서 각각 0.6, 0.7, 1.2, 1.3 μM/hr/gm의 값을 얻었다.

6) lactate의 RPD는 각 군에서 78.6, 49.3, 43.2, 및 41.0%이며 호흡 CO<sub>2</sub>의 RPD는 13.8, 10.1, 14.0, 13.4%의 값을 각 군에서 계산하였다. 즉 각 군에 있어서 소실된 용매 C<sup>14</sup>-Pyruvate의 92.4, 59.4, 57.2 및 54.4%가 호흡 CO<sub>2</sub> 및 lactate로 소실되었음을 보았다.

<이 연구에 있어서 간곡하신 지도 편달과 교열을 하여 주신 은사 남기용 교수, 이상돈 강사에게 깊은 감사부 드립니다.>

»Abstract«

## Kinetics of Oxidative and Non Oxidative Metabolism of C<sup>14</sup>-labeled Pyruvate in Liver Slices of Normal Rats.

Ung Sup Lee. M.D.

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

Liver slices of rats were incubated with C<sup>14</sup>-pyruvate incubation mixtures of different concentrations. Incubation was continued up to 5 hours. During the incubation period, liver slices were exposed to fresh media by hourly replacement of fresh incubation mixture. Hourly samples, obtained through the replacement of medium, were analyzed for pyruvate, lactate, CO<sub>2</sub> and specific activity (SA) of respiratory CO<sub>2</sub>.

Thirty two Sprague-Dawley rats were divided into 4 groups of 8 each. Different concentrations of pyruvate incubation medium were used for each group. Group 1 was incubated with pyruvate solution of 10 mg/dl, group 2 with 20mg/dl, group 3 with 30mg/dl and group 4 with 40mg/dl pyruvate solution.

The following results were obtained.

1) Pyruvate disappearance rate, lactate accumulation rate and total CO<sub>2</sub> production rate decreased during the initial 3 hours of incubation period and remained approximately constant. Relative specific activity (RSA) and CO<sub>2</sub> produced from the medium C<sup>14</sup>-pyruvate increased exponentially during the early 3 hours and reached to plateau values. These steady or plateau values were used as the reference to compare the metabolic rates between each group.

2) Pyruvate disappearance rates were 4.2 μM/hr/gm of tissue in group 1, 7.1 for group 2, 8.8 for group 3 and 10 for group 4. Thus pyruvate disappearance rates increased below 30mg/dl of pyruvate concentration as the concentration of pyruvate in the incubation medium increased and remained approximately constant at concentration of greater than 30mg/dl.

3) Lactate accumulation rates for each group were 3.3 μM/hr/gm of tissue, 3.5, 3.8 and 4.1 respectively. There were little changes in lactate accumulation rates despite the change in concentration of medium pyruvate.

4) Total CO<sub>2</sub> production rates for each group were 24.4 μM/hr/gm of tissue, 23.0, 26.0 and 27.3, respectively. These rates also showed little changes as shown in the lactate accumulation rate. RSA and CO<sub>2</sub> production rates derived from medium C<sup>14</sup>-pyruvate increased at concentration of medium pyruvate below than 30mg/dl and remained approximately constant at the concentration of C<sup>14</sup>-pyruvate greater than 30mg/dl. The percentage of CO<sub>2</sub> derived from medium C<sup>14</sup>-pyruvate to total CO<sub>2</sub> production or RSA for each group were 7.1, 9.4, 14.2 and 14.7%, respectively, while CO<sub>2</sub> production rates derived from medium C<sup>14</sup>-pyruvate were 0.6 μM/hr/gm of tissue, 0.7, 1.2 and 1.3, respectively.

5) Fractions of pyruvate disappeared into respiratory CO<sub>2</sub> to total pyruvate disappearance, which is referred to RPD<sub>CO<sub>2</sub></sub>, were 13.8, 10.1, 14.0 and 13.4%, respectively, for each group and RPD<sub>lactate</sub> for each group were 78.6, 49.3, 43.2 and 41.0%. Therefore, average of 92.4% of total pyruvate disappeared from the medium in the group 1, 59.4% in the group 2, 57.2% in group 3 and 54.4% in group 4 were found to be accounted for by the conversion of respiratory CO<sub>2</sub> and lactate accumulation.

## References

- 1) Pack, J.I.: *Metabolism of C<sup>14</sup>-glucose in the intact dog*. *Seoul. J. med.* 1 : 301, 1960.
- 2) Rhee, S.D., J.I. Pack and K.Y. Nam.: *Metabolism of C<sup>14</sup>-glucose by isolated dog heart*. *New. Med. J (in Korea)*. 3 : 299, 1960.
- 3) 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.
- 4) Lee, U.S.: *Kinetic study of oxidative metabolism of C<sup>14</sup>-labeled glucose in liver slices of normal and alloxan diabetic rats*. *Seoul. J. Med.* 3 : 289, 1961.
- 5) Chang, S.Y., S.D. Rhee and U.S. Lee.: *Effects of the Concentration of medium glucose on glucose disappearance and oxidative metabolism by liver slices of rats*. *Seoul. J. Med.* 3 : 1, 1962.
- 6) Van Slyke, D.D. and Folch, J.: *Manometric carbon determination*. *J. Biol. Chem.* 136 : 509, 1940.
- 7) Friedmann, T.E. and Haugen, G.E.: *Pyruvic acid, II. The determination of keto acid in blood and urine*.

- J. Biol. Chem.* 147 : 415, 1943.
- 8) Barker, S.B. and Summerson, W.H.: *Colorimetric determination of lactic acid in biological material.* *J. Biol. Chem.* 138 : 535, 1941.
- 9) Nielands, J.B. and P.K. Stumpf: *Outline of enzyme chemistry.* p. 174, 1958.
- 10) Miller, O.N and Olson, R.E.: *Metabolism of cardiac muscle. IV. Utilization of pyruvate and D,L-lactate by duck heart.* *J. Biol. Chem.* 199 : 457, 1952.
- 11) Cavert, H.M., and Johnson, J.A.: *Metabolism of isotopic lactate by the isolated dog heart.* *Am. J. Physiol.* 184 : 575, 1956.
- 12) Cavert, H.M., R. Ruth., and Lifson, N.: *Metabolism of pyruvate-2-C<sup>14</sup> to CO<sub>2</sub> and glycogen by isolated perfused skeletal and cardiac muscle.* 20th international physiological congress. *Abstracts of communications.* p. 163, 1956.
- 13) Wollenberger, A.: *Metabolic action of the cardiac glycosides.* *Arch. Exper. Path. u. Pharm.* 219 : 400, 1953.
- 14) Krebs, H.A. and Johnson, W.A.: *Enzymologia.* 4 : 148, 1937.
- 15) Lorber, V., Hemingway, A., and Nier, A.O.: *Assimilation of carbon dioxide by the isolated mammalian heart.* *J. Biol. Chem.* 151 : 647, 1943.