

Walker 256 종양에 있어서 C¹⁴-포도당 및 C¹⁴-젖산의 산화대사

Oxidative Metabolism of C¹⁴-Glucose and C¹⁴-Lactate in the Walker 256 Tumor

서울대학교 의과대학 생리학교실

具 鐵 會 · 李 相 敦

일반적으로 종양조직의 합수탄소 대사를 정상조직과 비교하면 현저한 차이점의 하나로서 젖산축적을 들 수 있다. 즉 유기성 환경하에서도 무기성 환경하에서와 같이 젖산 생산이 정상조직과는 달리 증가됨이 특징인 것이다. Greenstein¹⁾에 의하면 14종의 종양조직에서 유기성 환경하의 젖산 생산을 Warburg^{2,3,4,5)} 등의 방법으로 측정할 때 Q_{O_2} (μl of CO_2 /mg of dry weight)는 6~24이며, 그 중 10종의 값은 10 이상이고, 나머지 4종의 값도 6~9이라고 하였다. 한편 정상조직의 값은 모두 3 이하이며, 비교적 무기적 환경하에서 성장하는 태아조직에서도 평균 6이었다. 정상조직에서는 일반적으로 젖산이 에너지원으로 이용됨으로 동맥 젖산농도가 정맥 농도보다 항상 높은 값을 보이나 종양 조직에서는 관류 정맥 혈의 젖산 농도가 동맥 혈보다 높다는 점⁶⁾으로 미루어 보아 상당한 량의 젖산이 종양조직에서 생산됨을 볼 수 있었다. 이러한 현상은 조직학적 조건 즉 종양조직에는 일반적으로 혈관 분포가 적으며, 모세혈관도 다른 조직과 달리 길고 팽창되어 혈액 순환이 느리다는 점^{7,8)}으로 보아 순환 장애로 인한 산소 공급 결핍 때문에 초래되는 현상이라고 설명할 수 있으며, 생화학적으로도 다음 3가지 가능성을 지적할 수 있다.

첫째 다른 대사 경로는 정상인데도 불구하고 조직학적 조건에서 보듯이 종양조직은 무기성 환경하에 놓여 있으므로 무기성 해당이 촉진되어 이의 중산물인 3탄화합물이 젖산으로 환원되어 축적될 가능성과 둘째로 생산된 젖산이 TCA cycle과 같은 산화 경로가 억제되어 젖산 이용율이 저하됨으로 대사 반응의 노폐물로 축적될 가능성과, 셋째로 정상 무기성 해당 경로를 밟아 분해된 젖산이 아미노산 또는 지방산으로의 합성 또는 당원질로의 가역적 재합성 과정의 억제로 젖산축적

이 초래될 가능성이 있는 것이다. Lepage 등^{9,10)}의 실험에 의하면 다른 조직에 비하여 종양조직에서 무기성 대사율이 특별히 증가된 증거는 없고, 정상조직과 비등하였으므로 무기성 해당 경로는 큰 영향을 받지 않는다고 한다. 그러나 Busch 등의 실험에서는 C¹⁴-포도당을 주입한 후 종양조직에서 TCA cycle의 중간 대사 물질을 chromatography^{12,13)}로 분리하여 중간 대사 물질의 방사능을 측정할 때 다른 정상조직의 값에 비하여 현저히 저하되었고 권등¹⁴⁾이 관찰한 바와 같이 C¹⁴-6-포도당과 복수압조직균등액을 배양하였을 때 포도당의 C-6 탄소로 부터의 CO₂ 발생율이 무시할 정도의 소량에 불과하였다는 사실 등으로 미루어 젖산축적은 정상 해당 경로를 밟아 생산되는 젖산이 증가되어 초래된다고 보는 것 보다 도리어 젖산이 TCA cycle과 같은 기본적인 산화 분해과정이 억제됨으로 그 이용율이 저하되어 젖산 축적을 초래한다고 보는 것이 타당할 것이다. 한편 oxidative decarboxylation의 coenzyme인 vitamin B complex의 조직 농도가 종양조직에서 낮고¹⁵⁾ NAD 및 DPNH의 조직 농도가 간암에서 정상조직 농도값 100~600 μg /gm에 비하여 90~100 μg /gm에 불과함을 Weinhaus 등¹⁶⁾이 발견하였고, Potter 등^{17,18)} 호흡 효소인 cytochrom C 및 cytochrom oxidase 함량이 정상조직에 비하여 여러 종양조직에서 현저히 저하하였다는 사실로 보아 생체 조직의 기본적인 당대사의 산화 경로인 TCA cycle이 종양조직에서 억제됨은 의심할 바 없는 것이다.

따라서 성장율이 왕성한 종양조직에서는 실질 합성의 에너지의 공급을 TCA cycle과 같은 기본적인 경로 이외의 다른 산화 경로에 의존하게 될 것이므로 본 실험은 C¹⁴-1-포도당 및 C¹⁴-6-포도당을 이용하여 포

도당의 C-1 및 C-6 탄소의 호흡 CO₂로의 완전 산화 과정을 양적으로 측정하여 TCA cycle 이외의 hexose monophosphate pathway(HMP)와 같은 산화 경로가 종양조직의 에너지 대사에 관여하는 바를 구명함과 동시에 종양조직에서 측정된 젖산이 당의 무기성 대사의 중산물이며, 단순한 노폐물에 불과한지 또는 성장율이 왕성한 종양조직 대사에 관여하여 이용되는지의 여부를 구명하고자 젖산 각 탄소에 따로 C¹⁴으로 표시한 기질을 Walker 256 tumor 와 배양하여 젖산 각 탄소의 분해 과정을 개별적으로 분석함으로써 종양조직 대사과정에서 젖산이 관여하는 의의와 역할을 구명하고자 시도하였다.

실험 방법

실험재료 : 대퇴 내부 피하조직에 Walker 256 종양 조직을 이식한 흰쥐 30 마리를 이용하였다. Walker 256 종양조직 이식은 종양조직을 추출하여 생리적 식염수와 함께 유발에서 같아 1 : 3의 균등액으로 만들고 균등액 0.5 cc를 흰쥐 대퇴 내부 피하에 주입한 후 약 2 주일에 1~2 gm의 암조직을 계속적으로 얻었다.

매 실험에서 암조직을 이식한 흰쥐 5 마리를 이용하여 단두로 희생시킨 직후 암조직을 추출하고 주위 피사조직을 제거하여 생리적 식염수로 세척한 다음 정확히 암조직을 평량하였다. 5 마리에서 얻은 암조직은 같이 혼합(Pooling)하여 Krebs-Ringer-phosphate buffer 용액과 함께 glass homogenizer로 50 cc의 조직 균등액을 (tissue homogenate) 만들었다. 조직 균등액은 10 cc씩 5 등분하여 5 실험군으로 나누어 제 1 표와 같이 제 1 군은 C¹⁴-1-포도당, 제 2 군은 C¹⁴-6-포도당, 제 3 군은 C¹⁴-1-젖산, 제 4 군은 C¹⁴-2-젖산, 제 5 군은 C¹⁴-3-젖산을 기질로 하여 따로 배양하였다.

배양배지 : C¹⁴-1- 포도당 및 C¹⁴-6-포도당 (Tracer Lab 제) 각 100 μ c를 K-R-P 용액으로 희석하고 비방사선 포도당을 첨가하여 40 mg/cc의 포도당 농도를 유지하는 용액을 만들어 제 1 및 2 군의 저장 용액으로

사용하였다. C¹⁴-젖산 저장 용액은 50 μ c의 C¹⁴-1, C¹⁴-2 및 C¹⁴-3-젖산(New England Corp. 제)을 각각 50 cc의 K-R-P 용액으로 희석하고 비방사선 젖산을 첨가하여 10 mg/cc의 젖산 농도를 유지하는 용액을 만들어 제 3, 4 및 5 군의 저장용액으로 사용하였다.

매 실험에서 5 등분한 10 cc씩의 조직 균등액을 따로 배양용기에 넣고, 각 실험군에 해당하는 C¹⁴-기질의 저장용액 0.5 cc를 첨가하여 배양하였으므로 실지의 배양 배지내의 방사능은 0.5 μ c이며, C¹⁴-포도당 실험에서 포도당 농도는 200 mg%, [C¹⁴-젖산 배양 실험에서 젖산 농도는 50 mg%를 유지하게끔 하였다. 각 실험군에서 조직 균등액의 C¹⁴-기질의 방사능 또는 Specific activities(SA)는 배지기질의 탄소 1 mg 당 방사능으로 표시한 바 C¹⁴-1-포도당 실험군에서 5,897, C¹⁴-6- 포도당 실험군에서 5,506, C¹⁴-1- 젖산군에서 27,600, C¹⁴-2-젖산군에서 26,700, C¹⁴-3- 젖산군에서 20,600, c.p.m/mg of C으로 매실험에서 같은 값을 유지 하였다(제 1 표 참조).

일반 실험 조직 : 각군에서 조직 균등액 배양실험에 사용한 배양 용기는 밀면 직경 6 cm, 높이 8 cm의 Erlenmeyer flask를 이용하여 내부 밀면 중앙에 직경 1 cm, 높이 2 cm의 중심관을 설치한 초자 용기를 사용하였다. 배양 용기 중심관에는 호흡 CO₂를 채취하기 위하여 CO₂ free 2N NaOH를 1 cc 넣은 다음 산소와 함께 밀봉하고, Dubnuff metabolic shaking incubator로 38°C 항온조에서 좌우 진탕을 1분에 60 회 정도 가하면서 3 시간 동안 배양하였다.

화학적 정량 및 방사능 측정 : 균등액의 포도당 정량은 Somogyi¹⁹⁾ 및 Nelson²⁰⁾의 방법, 젖산 정량은 Barker 및 Summerson²¹⁾의 방법, 피루빈산 측정은 Friedman 및 Haugen²²⁾의 방법을 사용하였다. 총 CO₂ 생산을 측정에는 배양용기 중심관에 Na₂CO₃ 표본으로 흡수된 CO₂를 양적으로 BaCl₂와 작용시켜 Whatman No. 542 여과지 위에 BaCO₃ 표본으로 침전시켜 건조시킨 다음 정확히 중량을 평량하여 이를 균등액내 조직무게 배양시간 및 BaCO₃의 분자량으로 제하여 μ M/hr/gm로 표시하였

Table 1. S.A. of C¹⁴-labeled substrate and concentrations of glucose or lactate in incubation media of each group

group	Medium	Volume	Substrates	Concentration	S.A. of C ¹⁴ -substrate
1	K-R-P	10 cc	Glucose-1-C ¹⁴	200 mg%	5,897 cpm/mgC
2	"	"	Glucose-6-C ¹⁴	"	5,506 cpm/mgC
3	"	"	Lactate-1-C ¹⁴	50 mg%	27,600 cpm/mgC
4	"	"	Lactate-2-C ¹⁴	"	26,700 cpm/mgC
5	"	"	Lactate-3-C ¹⁴	"	20,600 cpm/mgC

고 CO₂ 내 방사능 측정은 BaCO₃ 표본을 직접 Geiger-Müller Counter 로 총계수를 측정한 다음 이를 BaCO₃ 내 탄소무게로 제하여 CO₂의 SA를 결정하였다. 이 실험에서 얻은 방사능 측정치는 모두 자기 흡수에 대한 교정을 하여 비교하였다.

실험성적 분석방법 :

a) 포도당, 젖산 및 피루빈산의 소실율 및 생산율 : 각 군에서 실험적 후 각 기질의 농도를 측정하고 배양 전후의 농도차를 얻어 균중액용적을 승하고 배양시간 및 균중액내 조직 무게로 제하여 $\mu\text{M/hr/gm}$ 로 표시하였다.

b) Relative Specific Activity (RSA) : RSA는 각군에서 배양 기질에서 유래된 CO₂의 총 CO₂ 생산율에 대한 분율(fraction)을 의미하며 배지 C¹⁴-기질의 SA와 CO₂의 SA와의 비로서 산출하였다. 각군의 RSA값은 배양 기질의 탄소값 C¹⁴으로 표시된 탄소와 같은 비율로 산출되었다고 가정할 때의 값임으로 실지의 포도당의 RSA값은 제 1 및 2군의 RSA값으로부터 다음과 같이 산출하였다.

$$\text{RSA CO}_2 \text{ of glucose} = \text{RSA}_{c-6-c^{14}} + \frac{\text{RSA}_{c-1-c^{14}} - \text{RSA}_{c-6-c^{14}}}{6}$$

위 식은 포도당의 6탄소가 EMP-TCA cycle을 통하여 C-6탄소와 같이 동물산화를 하며, C-1탄소는 HMP 및 EMP-TCA cycle을 통하여 산화된다고 가정하였을 때의 RSA값인 것이다. 한편 실지로 젖산에서 유래된 CO₂의 총 CO₂ 생산율에 대한 분율(actual RSA_{co₂} of lactate)는 제 3, 4 및 5군 RSA값의 총화를 3으로 제하여 얻었다.

c. 소실된 배양 기질이 호흡 CO₂, 젖산 및 피루빈산으로 분해된 분율 : 제 1 및 2군의 포도당 배양실험에서 조직 배양후 소실된 포도당의 호흡 CO₂, 젖산 및 피루빈산으로 분해된 분율을 relative glucose disappearance rate into CO₂ (RGD_{co₂}) RGD_L 및 RGD_P라고 칭하고 다음과 같이 산출하였다.

$$\text{RGD}_{\text{CO}_2} = \frac{\text{total CO}_2 \text{ prod. rate} \times \text{RSA} \times 100}{\text{glucose disappearance rate} \times 6}$$

$$\text{RGD}_L = \frac{\text{lactate appearance rate} \times 100}{\text{glucose disappearance rate} \times 2}$$

$$\text{RGD}_P = \frac{\text{pyruvate appearance rate} \times 100}{\text{glucose disappearance rate} \times 2}$$

즉 포도당 분자는 6분자의 CO₂를 발생하므로 포도당에서 유래된 CO₂ 발생율은 6으로 제하여 포도당에서 산화된 CO₂량을 포도당 양으로 환산하고 포도당소실율과의 비로서 RGD_{co₂}를 산출하고 RGD_L 및 RGD_P

는 배양후 생산된 젖산 및 피루빈산은 모두 용매 포도당에서 기인되었다고 가정하며, RGD_{co₂}와 같은 개념으로 산출한 것이다.

d. 포도당 산화 경로 분석 : 일반 생체조직의 포도당 산화 과정은 embsden meyerhoff 및 tricarboxylic acid cycle(EMP-TCA) 경로에 의거한 기본적인 산화 경로와 포도당의 C-1 탄소가 우선적으로 호흡 CO₂로 산화되는 hexose monophosphate pathway (HMP)와 같은 경로를 통하여 이루어진다. C¹⁴-1-포도당 배양 실험에서 얻은 호흡 CO₂의 방사능은 종양조직의 당대사 과정에서 HMP 경로를 통하여 C-1 탄소가 산화된 C¹⁴O₂와 EMP 경로를 밟아 피루빈산 또는 젖산으로 분해된 3탄화합물의 C-3 탄소 즉 메틸기에 C¹⁴이 표기되어 TCA cycle을 통하여 산화된 C¹⁴O₂에 기인된 방사능의 총화이며, 만약에 TCA 경로를 통한 산화 과정에서 3탄화합물의 각 탄소가 동등 산화를 한다고 가정하면 C¹⁴-6-포도당 배양 실험에서 얻은 호흡 C¹⁴O₂의 방사능은 오로지 EMP-TCA 경로를 밟아 유래된 C¹⁴O₂에 기인된 것이라고 볼 수 있다. 따라서 전자 배양 실험에서 얻은 RSA값은 양 경로를 밟아 포도당에서 산화된 CO₂의 총 CO₂ 중 생산율에 대한 분율을 의미하며, 후자 실험에서 측정된 RSA값은 단순히 EMP-TCA 경로에 의거하여 유래된 CO₂의 총 CO₂ 생산율에 대한 분율을 의미하므로 양 실험의 RSA값의 비는 EMP-TCA 경로가 종양조직의 포도당의 총 CO₂ 생산에 관여하는 비율을 보이게 된다. 따라서 포도당에서 유래된 CO₂가 EMP-TCA 경로를 밟아 산화된 백분율은 단순히 RSA_{c¹⁴-6-g}/RSA_{c¹⁴-1-g}로 산출하였다.

실험 성적

Walker 256 종양조직을 C¹⁴-1-포도당 배지에 배양하였을 때 포도당의 C-1 탄소의 호흡 CO₂로의 산화 과정에 관한 실험 성적은 제 2 표에 종합하였다.

배지내 c¹⁴-1-포도당의 SA는 매실험에서 5897 cpm/mgC 및 200 mg%로 일정하게 유지하며, 3시간 배양하였을 때 호흡 CO₂의 SA는 평균 1,369±298 cpm/mgC의 값을 얻었다. 배지 c¹⁴-1-포도당 및 호흡 CO₂의 SA의 비로 RSA_{co₂}를 계산한다. 평균 23.1±51%이었고 총 CO₂ 생산율은 평균 10.2±21 $\mu\text{M/hr/gm}$ 이므로 배지 C¹⁴-1-포도당에서 유래된 CO₂ 생산율은 총 CO₂ 생산율의 23.1%(RSA값)인 2.32 $\mu\text{M/hr/gm}$ 을 계산하였다. 일반 C¹⁴-6-포도당 배양실험에서 얻은 실험 성적은 제 3 표에서 표시된 바와 같이 RSA_{co₂} 평균 2.6±0.6%로 총 CO₂ 생산율의 2.6%가 포도당의 C-6탄소에서 유래되는데 불과하였다.

Table 2. Oxidative metabolism of C¹⁴-1-glucose (group 1)

No. of exper (Unit)	Weight of tissue (gm)	Weight of BaCO ₃ (mg)	Radioactivities of respiratory CO ₂			total CO ₂ prod. rate (μM/hr/gm)	CO ₂ derived from G-1-C ¹⁴ (μM/hr/gm)
			SA of C ¹⁴ -1-G (cpm/mg of C)	SA of resp. CO ₂ (cpm/mg of C)	RSA co ₂ (%)		
1	1.323	7.8	5,897	1,655	28.1	10.0	2.81
2	0.991	4.0	"	1,720	29.2	6.8	1.99
3	1.146	7.2	"	1,430	24.3	10.6	2.58
4	0.975	7.6	"	1,420	24.1	13.2	3.18
5	0.956	6.8	"	914	15.5	12.0	1.86
6	1.123	5.8	"	1,032	17.5	8.4	1.47
mean ± S.D.				1,369 298	23.1 5.1	10.2 2.1	2.32 0.6

Table 3. Oxidative metabolism of C¹⁴-6-glucose by walker 256 tumor (group 2)

No. of exper (Unit)	Weight of tissue (gm)	Weight of BaCO ₃ (mg)	Radioactivities of respiratory CO ₂			total CO ₂ prod. rate (μM/hr/gm)	CO ₂ derived from G-6-C ¹⁴ (μM/hr/gm)
			SA of C ¹⁴ -6-G (cpm/mg of C)	SA of resp. CO ₂ (cpm/mg of C)	RSA co ₂ (%)		
1	1.323	7.2	5,506	132	2.9	9.2	0.27
2	0.991	3.7	"	176	3.2	5.5	0.18
3	1.146	7.3	"	127	2.3	10.8	0.25
4	0.975	6.8	"	187	3.4	11.8	0.39
5	0.956	6.5	"	94	1.7	11.5	0.20
6	1.123	6.3	"	105	7.9	9.5	0.18
mean ± S.D.				137 33	2.6 0.6	9.7 2.1	0.25 0.07

총 CO₂ 생산율은 평균 9.7±21 μM/hr/gm 로 C¹⁴-1-포도당 배양 실험의 평균값과 비등하였으나, RSAco₂ 가 C¹⁴-1-포도당 실험의 값보다 현저히 저하 하였으므로 C-6 탄소의 CO₂ 생산율은 0.25±0.07 μM/hr/gm 로 C-1 탄소의 CO₂ 생산율에 비하여 현저히 저하되었다.

C¹⁴-1 및 C¹⁴-6-포도당 배양 실험에서 포도당 흡수율은 평균 14.3±2.9 μM/hr/gm 이며 흡수된 포도당이 젖산 피루빈산 및 호흡 CO₂로 분해된 분율 즉 포도당의 비교소실율값 (relative glucose disappearance rate: RGD)은 RGD_{Lactate}가 평균 48.9%, RGD_{Pyruvate}가 1.2% RGD_{co₂}는 0.7%로 흡수된 포도당의 50.8%(total RGD)가 젖산, 피루빈산 및 CO₂로 분해되었음을 보았으나, 호흡 CO₂로 완전산화된 포도당은 미량이며, 대부분의 흡수된 포도당은 젖산으로 분해되어 측정됨을 볼 수 있었다(제 4 표 참조).

C¹⁴-1-포도당 배양실험에서 호흡 CO₂ 내의 방사능은 전술한 바와 같이 HMP 및 EMP-TCA 양 경로를 밟아 유래되며, C¹⁴-6-포도당 배양 실험에서 호흡 CO₂ 내의 방사능은 포도당이 HMP 경로를 밟아 산화된 CO₂는 포함되지 않고, 포도당이 EMP-TCA 경로를 밟아 산화된 C¹⁴O₂만 관여 한다고 가정한 전술한 바

와 같이 양 배양 실험에서 얻은 RSA의 평균 값의 바울론 포도당에서 유래된 CO₂ 발생율에 대한 EMP-TCA 경로를 통한 CO₂ 발생율의 백분율을 산출한 바 11.3%의 값을 얻었다. 이러한 계산은 물론 포도당이 EMP-TCA 경로를 밟아 산화 할 때 각 탄소의 CO₂로의 분해는 동을 산화를 입는다고 가정하고 중간 대사 과정에 있어서 recycling을 고려에 넣지 않고 산출한 결과이다.

중양조직에서는 포도당의 산화 과정에 있어서 대부분의 CO₂는 HMP 경로를 밟아 산화되고 기본적인 해당 경로인 EMP-TCA 경로를 밟은 산화 대사가 현저히 억제됨을 보았다.

중양조직의 포도당의 산화 경로의 분율 산출은 상기한 바와 같이 포도당의 각 탄소가 동을 산화를 받는다고 가정하여 계산하였으므로 이러한 가정의 진부여함을 구명함과 동시에 중양조직 산화 과정에 젖산이 관여하는 바를 구명하기 위하여 젖산 각 탄소에 마르 C¹⁴를 표지한 C¹⁴-1-젖산, C¹⁴-2-젖산 및 C¹⁴-3-젖산을 이용하여 중양조직과 배양하였을 때 젖산 각 탄소에서 유래되는 C¹⁴O₂ 발생율을 측정하여 제 5 표에 종합하였다.

Table 4. Conversion of C¹⁴-glucose disappeared from incubation media into CO₂, lactate and pyruvate

Item	Unit	Mean values ± S.D from C ¹⁴ -1 and C ¹⁴ -6-glucose incubation exper.	
Glucose uptake rate	μ M/hr/gm	14.3 ± 2.9	
Lactate	Appearance rate	μ M/hr/gm	14.1 ± 3.4
	Glucose equiv. amt	μ M/hr/gm	7.1
	RGD lactate	%	48.9
Pyruvate	Appearance rate	μ M/hr/gm	0.33 ± 0.6
	Glucose equiv. amt	μ M/hr/gm	0.17
	RGD pyruvate	%	1.2
Resp. CO ₂	Total CO ₂ prod. rate	μ M/hr/gm	10.0 ± 2.1
	Atual RSA	%	6.0
	CO ₂ from glucose	μ M/hr/gm	0.6
	Glucose equiv. amt	μ M/hr/gm	0.1
	RGD CO ₂	%	0.70
Total RGD	%	50.8	
F(RSA _{C-6} -C ¹⁴ /RSA _{C-1} -C ¹⁴)	%	11.3	

젖산 배양 실험에서 용매 젖산 농도를 50mg%로 유지 하였는바 배양후 농도는 모두 50 mg% 이상으로 도리혀 젖산 축적을 보였다.

젖산 축적율은 C¹⁴-1-젖산 실험에서 0.217 ± 0.054, C¹⁴-2-젖산 실험에서 0.265 ± 0.062, C¹⁴-3-젖산 실험에서 0.252 ± 0.042 mg/hr/gm로 각각의 평균은 0.244 mg/hr/gm이었다. 즉 종양조직에서는 젖산의 이용을 보다 타기질로부터의 젖산 생산율이 커서 높은 젖산 농도에서도 젖산 축적을 초래하였다. 일반 피루빈산도 젖산 배양 실험 각 군에서 평균 0.045mg/hr/gm 축적되었다.

RSA는 C¹⁴-1-젖산 배양에서 평균 13.8 ± 2.3%, C¹⁴-2-젖산 배양에서 평균 3.78 ± 1.1%, C¹⁴-3-젖산 배양에서 7.97 ± 2.1%로 젖산의 C-1 탄소 즉 car-

boxyl 탄소가 CO₂로의 산화 과정에 기여함이 제일 크고, C-3 탄소 즉 methyl기 탄소, C-2의 순서로 저하하였다. 총 CO₂ 발생율은 C-1 군에서 10.0 ± 3.5, C-2 군에서 9.8 ± 3.8, C-3 군에서 10.7 ± 2.9 μM/hr/gm로 젖산 배양 각 군에서 비등하였으며, 이들 평균은 10.2 μM/hr/gm이었다. 따라서 젖산 각 탄소로부터의 CO₂ 발생율은 C-1 탄소에서 1.38, C-2 탄소에서 0.37, C-3 탄소에서 0.85 μM/hr/gm로 C-1 탄소에서 제일 크고, C-3, C-2의 순서로 저하하였다.

이상과 같이 젖산 배양 실험의 성적을 종합하면 젖산 축적을 초래한다는 점으로 보아 Walker 256 종양에서 젖산 생산이 이용을 보다 크지만 상당한 량의 젖산이 호흡 CO₂ 발생에 기여하며 특히 젖산의 C-1탄소에서 유래된 CO₂는 총 CO₂ 생산율의 13.8%를 차지함으로 종양조직에서는 쉽게 젖산의 oxidative decarboxylation이 일어 남을 지적할 수 있었다.

II 활

포도당 배양 실험에서 포도당 흡수율이 14.3 μM/hr/gm로써 정상조직의 간²³⁾ 또는 대뇌²³⁾와 같은 대사율이 높은 조직과 비등하였으나 흡수된 포도당의 약 50% (RGD D Lactate)은 젖산으로 분해되어 축적되었으나 호흡 CO₂로 완전 산화된 분율 즉 RGD co₂는 0.7%로 포도당 산화가 Walker 256 종양에서 현저히 억제됨을 보았다. 이는 권등²⁵⁾이 에르릿히 복수암에서 얻은 성적과 비슷하며 Busch 등¹¹⁾이 여러 종양조직에 C¹⁴-포도당을 주입한 후 종양 조직내의 TCA cycle의 중간대사 물질에서 기인되는 아미노산을 추출하여 C¹⁴의 방사능을 측정할 바 주시할 정도로 저하되었음을 발견하고 종양조직에서 공통적으로 TCA cycle과 같은 기본적인 당산화 경로가 억제된다고 주장한 바와 같다.

이상과 같이 당의 산화가 종양 조직에서 일반적으로 억제되고 특히 TCA cycle과 같은 산화 경로가 억제됨을 Busch 등의 실험에서 관찰할 수 있었으나, 억제되는 정도 또는 HMP와 같은 당의 다른 산화 경로에 대한 영향을 구명하기 위하여 C¹⁴-1-포도당 및 C¹⁴-6-포도당을 기질로 하여 동일 Walker 256 종양을 따

Table 5. Metabolism of each carbon labeled lactate by walker 256 tumor

Group	SA of medium (cpm/mgC)	SA of CO ₂ (cpm/mgC)	RSA CO ₂ (%)	Total CO ₂ production rate (μM/hr/gm)	CO ₂ prod. rate from lactate (μM/hr/gm)	Lactate accum. rate (mg/hr/gm)	Pyruvate accum. rate (mg/hr/gm)
3(L-1-C ¹⁴)	27,600	3,910 ± 899	13.8 ± 2.3	10.0 ± 3.5	1.38	0.217 ± 0.054	0.046 ± 0.004
4(L-2-C ¹⁴)	26,700	990 ± 270	3.78 ± 1.1	9.8 ± 3.8	0.37	0.265 ± 0.062	0.045 ± 0.02
5(L-3-C ¹⁴)	20,600	1,642 ± 530	7.97 ± 2.1	10.7 ± 2.9	0.85	0.252 ± 0.042	0.045 ± 0.018

로 배양하여 호흡 CO_2 의 방사능을 측정하여 당의 산화 경로를 분석한바 포도당에서 유래된 CO_2 의 11.3%가 기본적인 해당 경로인 EMP-TCA 경로를 밟아 산화되고 대부분의 CO_2 는 포도당의 C-1 탄소가 우선적으로 산화되는 HMP와 같은 경로를 밟아 산화됨을 밝혔다. 이는 에르릿히 복수압에서 측정된 권동¹⁴⁾의 값 7%에 비하여 약간 증가된 값을 보였으나, 같은 방법으로 정상조직에서 측정된 값 즉 대뇌조직에서 90%, 콩팥에서 60%, 간에서 30%의 포도당에서 유래된 CO_2 가 EMP-TCA 경로를 밟아 산화된다는 입동²⁵⁾의 실험성과 비교할 때 정상 조직에서 가장 낮은 값을 보이는 간조직의 값에도 미달함으로 종양 조직에서 공통적으로 TCA 경로에 관련된 교소계가 억제당함을 재확인 할 수 있었다. 이러한 현상은 HMP 경로가 종양 조직에서 일차적으로 촉진되는지 혹은 TCA 경로가 일차적으로 억제되는지의 여부는 본 실험에서 밝힐 수 없었으나 전체적인 당산화가 저하되었다는 점으로 보아 HMP 경로가 일차적으로 영향을 받는다고 보는것보다 기본적인 TCA 경로가 억제됨으로 실지로 HMP 경로는 영향을 받지 않더라도 HMP 경로를 밟아 산화되는 비율이 증가한다고 봄이 타당할 것이다.

젖산 배양 실험에서 상당히 높은 젖산 농도에 배양하고 매지에 포도당이 없는데도 불구하고 Walker 256 종양에서는 도리히 모든 실험에서 젖산 축적을 초래하였다는 사실은 종양조직에서 젖산이 포도당 이외의 다른 내인성 기질(endogenous substrate)에서 산출됨을 의미한다. 문동²⁶⁾은 에르릿히 복수압에서 본실험과 같은 조건에서 실험한바 고농도의 젖산 용매에서 상당한 양의 젖산이 흡수되었는데 비하여 Walker 256 종양에서 도리어 축적되었다는 사실은 에르릿히 복수압 보다 Walker 256 종양에서 젖산 생산율이 왕성함을 지적할 수 있었다.

종양조직에서 축적된 젖산이 단순한 노폐 물질인지 또는 종양조직 대사과정에 이용되는지의 여부를 관찰하기 위하여 C^{14} 를 젖산 각 탄소에 따로 표지한 C^{14} -젖산을 이용하여 젖산 각 탄소의 산화율을 개별적으로 관찰한바 실험 성적에서 보는 바와 같이 젖산의 C-1 탄소 즉 탄산기 탄소에서 유래되는 CO_2 발생율이 젖산의 C-2 및 C-3 탄소의 값에 비하여 월등히 큰 값을 보였다. 이러한 차이는 첫째 젖산과 같은 3 탄화합물이 TCA cycle의 중간 대사 물질인 fumarate 또는 succinate와 같은 4 탄화합물과의 가역적 반응이 일반 생체조직에서 비교적 빨리 진행할 수 있다는 점²⁷⁾을 고려할 때 젖산이 CO_2 fixation으로 4 탄화합물이 되고 다시 가역적으로 3 탄화합물과 CO_2 로 분해할 때 젖산 C-1

에 있던 C^{14} -이 교체되면서 $C^{14}O_2$ 를 젖산 C-1에 있던 C^{14} 이 교체되면서 $C^{14}O_2$ 를 발생할 가능성을 들 수 있고 둘째로 젖산이 피루빈산으로 산화된 후 C-1 탄소의 탄산기는 Oxidative decarboxylation을 입어 CO_2 를 발생하지만 나머지 C-2 및 C-3 탄소를 구성된 acetyl-CO-A은 TCA cycle을 통하여 산화가 억제되기 때문에 젖산의 C-1 탄소의 CO_2 로의 산화가 C-2 및 C-3 보다 크다고 설명할 수 있었다. 일방 C-2 및 C-3 탄소의 CO_2 발생율은 전기한 바와 같이 C-1 값 보다 적으나, C-3 탄소를 부터의 CO_2 발생율이 항상 C-2 탄소 값보다 약 2배 가량 큰 값을 보였다. 이러한 사실은

포도당이 무기성 분해로 젖산으로 분되면 포도당과 C-1 및 C-6 탄소 젖산의 C-3 탄소 즉 methyl기를 형성하기 때문에 반대로 젖산의 C-3 탄소가 가역적인 반응으로 포도당으로 합성되며, 포도당의 C-1 혹은 C-6 탄소를 되어, C-1 탄소를 형성한 젖산의 C^{14} 이 HMP 경로를 밟아 산화될 가능성을 고려할 때 젖산의 C-2 탄소 보다 C-3 탄소에서 높은 CO_2 발생율을 보이기 됨을 설명 할 수 있었다.

전기 포도당의 산화 경로 분율을 C^{14} -1-포도당 및 C^{14} -6-포도당을 이용하여 산출하는데 포도당의 각 탄소가 C^{14} 으로 표지된 탄소가 같이 동등산화를 입고, 가역적인 recycling이 없다고 가정하였을 때의 계산임으로 이러한 가정(assumption)이 젖산 배양 실험에서 보는 바와 같이 각 탄소의 산화율이 일정치 않으므로 모순점이 많지만 젖산의 C-2 탄소의 CO_2 발생율이 제일 적다는 점 또는 C-3 탄소의 CO_2 발생율이 C-2보다 크다는 점은 젖산의 C-3 탄소가 전기한 recycling으로 포도당의 C-1 탄소를 합성이 되어 HMP를 통하여 더 많은 CO_2 를 초래할 수 있는 가능성을 고려할 때 본실험에서 산출한 산화 경로의 분율은 실지의 값보다 더 큰 값을 보이게 된다. 즉 EMP-TCA 경로를 밟아 산화된 CO_2 의 포도당으로부터 산화된 총 CO_2 발생율에 대한 비율 11.3%은 실지의 값보다 클 가능성이 있으므로 종양조직에서 TCA cycle이 현저히 억제됨을 재강조할 수 있는 것이다.

총 괄

Walker 256 종양조직을 C^{14} -1-포도당, C^{14} -6-포도당, C^{14} -1-젖산, C^{14} -2-젖산, C^{14} -3-젖산을 기질로 하는 배지와 함께 따로 균등액으로 만들어 38° C의 항온조에서 진탕을 하면서 3시간 배양하였을 때 C^{14} 으로 표지된 포도당 및 젖산 각 탄소의 호흡 CO_2 로의 산화과정, 젖산 및 피루빈산의 생산율을 측정함과 동

시에 산화경로를 분석한바 다음과 같은 성적을 얻었다.

1. C¹⁴-포도당 배양 실험에서 총 CO₂ 생산율은 10.0 ± 21 μM/hr/gm 이며, 포도당의 C-1 탄소로 부터의 CO₂ 발생율은 총 CO₂ 생산율의 평균 23.1%임에 비하여 C-6 탄소의 산화율은 2.6%에 불과 하였다.

2. C¹⁴-포도당 배양 실험에서 포도당 흡수율은 평균 14.3 ± 2.9 μM/hr/gm 이며 이 중에서 호흡 CO₂로 완전 산화된 분율 즉 RGD co₂은 0.7%로 중앙조직에서 포도당 산화 대사가 현저히 억제됨을 보았다.

젖산 및 피루빈산의 발생율은 각각 14.1 ± 3.4 및 0.33 ± 0.6 μM/hr/gm 의 값을 얻었고 이들 3 탄화합물이 모두 포도당의 분해산물이라고 가정하여 이용된 포도당이 젖산 및 피루빈산으로 분해된 분율 즉 RGD_L 및 RGD_P의 값을 계산한 바 흡수된 포도당의 평균 48.9%가 젖산으로 1.2%가 피루빈산으로 분해되었다.

3. C¹⁴-1 포도당 및 C¹⁴-6-포도당 배양 실험에서 얻은 RSA 값의 비로 포도당의 산화 과정에 있어서 대사 경로를 분류한 바 당 산화의 기본적인 분해 경로인 EMP-TCA 경로를 밟아 산화된 CO₂ 발생은 포도당에서 유래된 총 CO₂ 발생의 11.3%에 불과하며, 대부분이 포도당의 C-1 탄소가 우선적으로 산화되는 HMP와 같은 산화 경로를 밟아 분해됨을 밝혔다.

4. C¹⁴-젖산 배양 실험에서 총 CO₂ 생산율은 평균 10.2 μM/hr/gm 로 C¹⁴-포도당 배양 실험에서 얻은 값과 비등하였으나, 젖산은 각 실험에서 도리어 축적되었고 평균 0.244 mg/hr/gm 의 축적율을 보였다. 일방 피루빈산의 축적율은 평균 0.045mg/hr/gm이었다.

젖산 각 탄소의 호흡 CO₂로의 산화 과정을 개별적으로 측정한 바 젖산의 C-1 탄소의 CO₂ 발생은 총 CO₂ 생산율의 13.8 ± 2.3%, C-2 탄소의 값은 3.78 ± 1.1%, C-3 탄소의 값은 7.97 ± 2.1% C-3 탄소의 값은 7.97 ± 2.1%이었다. 즉 젖산의 탄산기 탄소의 산화율이 제일 크고, C-3, C-2의 순서로 산화가 억제됨을 보였다.

이상의 실험 성적을 종합하면 Walker 256 종양에서 포도당 흡수 및 젖산 축적율이 큰데도 불구하고 호흡 CO₂로의 산화 과정은 현저히 억제되었다는 점으로 보아 무기성 해당은 정상적으로 이루어지고 TCA 경로와 같은 유기성대사 경로가 억제됨은 의심할 바 없으나 HMP와 같은 산화 경로는 영향을 받지 않으므로 대부분의 CO₂은 이 경로를 밟아 산화된다고 볼 수 있었다.

ABSTRACT

Oxidative Metabolism of C¹⁴-Glucose and C¹⁴-Lactate in the Walker 256 Tumor

Chul Hwai Koo, M.D. and Sang Don Lee, M.D.

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

Tissue homogenates of Walker 256 tumor were incubated separately in medium containing C¹⁴-1-glucose, C¹⁴-6-glucose, C¹⁴-1-lactate, C¹⁴-2-lactate, and C-3-lactate in order to observe the oxidative metabolism of each carbon of substrates which labelled by C¹⁴. Glucose and lactate media, in which tissue homogenates were incubated, were kept at a concentration of 200mg% and 50mg%, respectively. At the end of 3 hours incubation, respiratory CO₂ samples trapped by alkaline which was placed in the center well of the incubation flask were analyzed for total CO₂ production rates and their radioactivities. The tissue homogenate samples after incubation were analyzed for their concentrations of glucose, lactate and pyruvate. Calculations were made on the glucose consumption rate and accumulation rates of lactate and pyruvate. The following results were obtained.

1. In the tissue homogenate, which was incubated with C¹⁴-glucose as a substrate, total CO₂ production rate averaged 10.0 ± 2.1 μM/hr/gm and CO₂ productions from C-1 and C-6 carbon of glucose were means of 23.1 and 2.6% respectively.

2. Glucose uptake rate in the C¹⁴-glucose incubation experiment was mean of 14.3 ± 2.9 μM/hr/gm. The fraction of glucose oxidized into CO₂ to total glucose uptaken (RGD co₂) was only 0.7%. On the other hand, lactate and pyruvate accumulation rates averaged 14.1 ± 3.4 and 0.33 ± 0.6 μM/hr/gm, respectively. Assuming that these 3 carbon compounds appeared in the medium were derived from glucose, the relative glucose disappearance rate into lactate(RGD_L) was 48.9% and RGD_P was 1.2%. Therefore, about 50.8% of total glucose uptaken were accounted for by conversion into respiratory CO₂, lactate and pyruvate.

3. The oxidative pathway of glucose in the tumor tissue was analyzed from the values of relative specific activities which were obtained in the C¹⁴-1 and C¹⁴-6

-glucose incubation experiments. It was found that 11.3% of CO₂ derived from glucos were via the principal EMP-TCA cycle and the remainder were via the alternate pathway such as HMP.

4. In the C¹⁴-lactate incubation experiments, total CO₂ production rate was mean of 10.2 μM/hr/gm which showed same order in value obtained in the C¹⁴-glucose incubation. Lactate was accumulated to about 0.244 mg/hr/gm from endogenous source in every run of experiments. The pyruvate accumulation rate was mean of 0.045 mg/hr/gm.

Respiratory C¹⁴ O₂ yield from C-1 carbon of lactate was 13.8-2.3% of total CO₂ production rate and this proportion was larger than those from C-2or C-3 carbon of lactate whose values showed 3.78—1.1 and 7.97—2.1, respectively. It shows that carboxyl carbon of lactate contributes a larger proportion in producing respiratory CO₂ than 2 and 3 carbons of lactate.

From the data described above, it was assumed that anaerobic glycolysis proceeds normally, resulting in the accumulation of lactate in the Walker 256 tumor but further oxidation via the TCA cycle was remarkably inhibited and almost all of oxidative energy from glucose was released by alternate pathway such as HMP.

REFERENCES

- 1) Greestain, J. P.: "Biochemistry of Cancer" New York Academic Press, 1954.
- 2) Warburg, O.: "Metabolism of Tumors" New York, Smith, 1931.
- 3) Warburg, O.: "On the origin of cancer cells. Science 128 : 309, 1956.
- 4) Warburg, O., Pasener, K., and Negelein, E.: "Über den Stoffwechsel der Carcinomzelle. Biochim. Z., 152 : 309, 1924.
- 5) Busch, H.: "Biochemistry of cancer cell" Acad, press, New York. London, pp313, 1962
- 6) Warburg, O., Wind, F., and Negelein, E.: "Über den Stoffwechsel von Tomoren im Korper. Klin. Wochschr. 5 : 829, 1926.
- 7) Algire, G. H., and Chalkley, H. W.: "Vascular reactions of normal and malignant tissues in vivo. I. Vascular reactions of mice to wounds and normal and neoplastic transplants. J. Natl. Cancer Inst. 6 : 73, 1945.
- 8) Tannenbaum, A.: "The cancer investigator, an evaluation. Cancer Research, 17 : 547, 1957.
- 9) Lepage, G. A.: "Glycolysis in tumor homogenates. J. Biol. Chem., 176 : 1009, 1948,
- 10) Lepage, G.A.: "A comparison of tumors and normal tissues with respect to factors affecting the rate of anaerobic glycolysis. Cancer Research, 10 : 77, 1950.
- 11) Busch, H., Fujiwara, E., and Keer, L.M.: "Metabolic patterns for glucose-1-C¹⁴ in tissues of tumor-bearing rats. Cancer Research, 20 : 50, 1960.
- 12) Busch, H., Hurlber., R. B., and Potter, V. R.: "Anion exchange chromatography of acids of the citric acid cycle. J. Biol. Chem., 196-717, 1952.
- 13) Nyhan, W. L., and Busch, H.: "Metabolic patterns for L-gluconate-U-C¹⁴ in slices of tumors and other tissues. Cancer Research 16 : 227, 1957.
- 14) Kwon C.R.: "Metabolism of C¹⁴-1-glucose and C¹⁴-6-glucose by the Ehrlich Ascites Tumor Tissue Korean Journal of Physiology, 1 : 33, 1967.
- 15) Weinhouse, S.: "Oxidative metabolism of neoplastic tissues. Advances in Cancer Research, 3 : 269, 1955.
- 16) Jedeikin, L.A., and Weinhouse, S.: "Metabolism of neoplastic tissues: VI. Assay of oxidized and reduced diphosphopyridine nucleotide in normal and neoplastic tissues. J. Biol. Chem., 213 : 271, 1955.
- 17) Dubois, K.P., and Potter, V.R.: "Biocatalysis in cancer tissues. I. Cytochrome C. Cancer Research, 2 : 290, 1942.
- 18) Schneider, W. C., and Potter, V.R.: "Biocatalysis in cancer tissue, III. Succinic dehydrogenase and cytochrom oxidase. Cancer Research 3 : 353, 1943
- 19) Somogyi, M.: "A new reagent for the determination of sugars. J. Biol. Chem., 160 : 61, 1945.
- 20) Nelson, Norton: "A photometric adaption of the Somogyi method for the determination of glucose. J. Biol. Biol. Chem., 153 : 375, 1944.
- 21) Barker, S.B., and Summerson, W.H.: "Colorimetric determination of lactic acid in biological material. J. Biol. Chem., 138 : 535, 1941.
- 22) Friedeman, T.E., and Haugen, G.H.: "The determination of keto acid in blood and urine. J. Biol. Chem., 147 : 415, 1943.
- 23) Chang, S.Y., Rhee, S.D., and Rhee, U.S.: "Effects

- of the concentration of medium glucose on glucose disappearance and oxidative metabolism *The Seoul Journal of Medicine*, 3 : 1, 1962
- 24) Chang, S.Y., Chang, K.Y., and Rhee, S.D.: Metabolism of C¹⁴-labeled pyruvate and glucose by brainslices of normal and alloxan diabetic rats. *The Seoul Journal of Medicine*, 4 : 1, 1963.
- 25) Lim, S.C.: The glucose catabolic pathways in the various tissues of the rabbits. *The Seoul Journal of Medicine*, 5 : 241, 1964.
- 26) Moon, I.S., and Rhee, S.D.: Catabolic pathway of oxidative metabolism of carbon atoms of lactate in the Ehrlich Ascites Tumor. *The Seoul Journal of Medicine*, 7 : 93, 1966.
- 27) Topper, Y. J., and Hasting, A. B.: A study of the chemical origins of glycogen by use of C¹⁴-labeled carbon dioxide, acetate, and pyruvate. *J. Biol. Chem.*, 179 : 1255, 1949.
-