



정상 및 Alloxan 당뇨병 흰쥐의 뇌절편에 있어서 C¹⁴-초성포도당 및 포도당의 대사에 관한 실험적 연구

Metabolism of C¹⁴-labeled Pyruvate and Glucose by Brain Slices of Normal and Alloxan-Diabetic Rats

서울대학교 의과대학 해부학교실

장 신 요 · 장 가 용

서울대학교 의과대학 생리학교실

이 상 돈

1. 서 론

안정할 때에도 생체대뇌에서 끊임없이 뇌파를 검출할 수 있다는 사실로 보아 대뇌조직은 심장과 같이 생명을 유지하는 데에 있어서 끊임없는 일을 하고 있음을 알 수 있다. 따라서 대뇌조직은 외부로부터 계속적인 에너지원의 공급을 받아야 한다. 대뇌조직의 에너지원으로서 탄수화물 특히 포도당이 에너지대사 과정에 크게 관여함은 저혈당 개체에 있어서는 정상적인 대뇌활동을 할 수 없다는 임상적인 관찰 이외에 대뇌조직의 호흡상(respiratory quotient)이 1에 가까우며 다른 기질 보다 포도당의 동정맥 농도차가 크다는 점¹⁾으로 보아 쉽게 이해할 수 있다.

만약에 다른 조직과 달리 기질대사를 주로 탄수화물에 의존하고 있는 대뇌조직에서 당뇨병때 탄수화물대사에 있어서 insulin 결핍으로 인하여 다른 조직에서와 같이 현저한 영향을 받는다면²⁾ 당뇨병개체의 대뇌활동에도 현저한 영향을 미치게 될 것이다. 그러나 실제로 당뇨병성 혼수상태를 제외하고는 당뇨병개체의 대뇌활동은 정상개체의 그것과 별차이가 없다는 점으로 보아 에너지 대사과정에도 별 변동이 없음을 지적할 수 있다. 그러나 대뇌활동에 필요한 에너지공급에 있어서 탄수화물 혹은 포도당 이외의 다른 기질대사에 의거하는지 또는 insulin 결핍에 의한 영향을 받지 않고 정상 개체에서와 같이 탄수화물 대사과정에서 유리되는 에너지를 이용하는지의 여부는 현재까지 별로 아는 바 적다.

이 분야에 관하여 오래전부터 Himwich³⁾ 등은 정상개체의 대뇌조직에서 포도당대사에 insulin 이 관여하지 않음을 주장 하였고 Kety⁴⁾ 등은 당뇨병때의 대뇌조직의 산소호흡률이 정상값과 별 차이가 없다는 점등을 지적하여 산화에너지대사 과정에 별로 변동이 없음을 증명하였고 Mulder⁵⁾ 등은 당뇨병때에 비교적 ketone body 혈중 농

도가 높음에도 불구하고 대뇌조직에서 ketone body 이용율이 적다는 것을 지적 하였고 Haugaard⁶⁾ 등은 I¹³¹ 표시 insulin 이 혈뇌장벽(blood-brain barrier)을 통과하지 못한 다는 실험 보고등을 볼 수 있으나 모두 간접적이며 단편적인 지식을 줄 뿐이고 당뇨병때의 대뇌조직에 있어서의 당대사 혹은 에너지 대사과정의 변동 여부를 직접 관찰하지 못하였다. 본 실험은 당뇨병때에 insulin 결핍으로 인한 대뇌조직의 당대사과정을 검토하기 위하여 C¹⁴-포도당 및 포도당의 중간대사 산물인 C¹⁴-pyruvate 를 이용하여 이들 기질의 호흡 CO₂로의 완전산화과정을 양적으로 측정하여 insulin 이 대뇌조직의 당대사과정에 미치는 영향을 검토함과 동시에 당뇨병때에 대뇌조직의 에너지 대사과정을 분석하여 일련의 성적을 얻었으므로 이에 보고하는 바이다.

2. 실험 방법

(1) 실험동물

58 마리의 흰쥐 대뇌조직을 4 군으로 나누어 C¹⁴-pyruvate 배양 실험에는 제 1 군 및 제 2 군을 사용하였고 C¹⁴-포도당배양 실험에는 제 3 군 및 제 4 군을 사용하였다.

제 1 군은 C¹⁴-pyruvate 배양실험의 대조군으로 30 마리에서 얻은 정상대뇌조직을 이용 하였고 이는 다시 4 개소군으로 제분하여 대뇌조직을 C¹⁴-pyruvate 용매속에서 배양하였는 바, 각 소군마다 배양용액안의 C¹⁴-pyruvate 의 농도를 달리 하였다. 제 1 소군은 10, 제 2 소군은 20, 제 3 소군은 30, 제 4 소군은 40mg/dl 의 C¹⁴-pyruvate 농도를 유지하는 인산염완충액 (phosphate buffer)속에서 배양하고 각 소군에서 최대대사율(maximum metabolic rate)을 보이는 용매 C¹⁴-pyruvate 농도를 결정하여 제 2 군의 배양용매 C¹⁴-pyruvate 농도를 결정함과 동시에 이때 얻은 대사율을 C¹⁴-pyruvate 배양실험의 대조값으로 하였다. 제 2 군은 10 마리의 alloxan 으로 유발시킨 당뇨병 흰쥐의 대뇌조직을 20mg/dl 의 C¹⁴-pyruvate 농도를 갖인 인산염 완충액 속에서 배양하였

* 본 실험의 경비일부는 1962년도 서울대학교 대학원 연구비로 충당 되었음.

다. 제 3 군은 8 마리의 정상 흰쥐의 대뇌조직을 200mg/dl의 C¹⁴-포도당 농도를 유지하는 용매에 배양하여 이때 얻은 대사율을 C¹⁴-포도당 배양실험의 대조값으로 하였다. 제 4 군은 10 마리의 alloxan 유발당뇨병 흰쥐의 대뇌조직을 제 3 군과 같은 용매에서 배양하였다.

제 2 군 및 제 4 군에서 사용한 alloxan 당뇨병 흰쥐는 약 50 mg/kg의 alloxan을 정맥내에 주입한 후 적어도 48 시간 이후의 혈당량을 관찰하여 혈당이 200 mg/dl 이상으로 지속적 상승이 있는 흰쥐의 대뇌조직을 사용하였다.

(2) 배양용매

C¹⁴-pyruvate 용매: pyruvate-2-C¹⁴(New England Nuclear Corp.) 약 100 μ c에 non-radioactive Na-pyruvate를 넣고 물 100 ml로 희석하여 이 용액의 pyruvate 농도를 20mg/ml로 만들어 저장용액으로 하였다.

제 1 군 및 제 2 군의 배양에 쓰는 C¹⁴-pyruvate 용매는 배양직전에 저장용 C¹⁴-pyruvate 용액을 각각 0.5, 1, 1.5, 2ml씩 따로 채취하고 인산염완충액(pH 7.4)으로 희석하여 100 ml로 만들어 C¹⁴-pyruvate 용매내의 pyruvate 농도를 10, 20, 30, 40 mg/dl의 농도로 유지하게끔하여 각 소군의 대뇌조직의 배양용액으로 하였다.

C¹⁴-포도당용매: Glucose-u-C¹⁴(New England Nuclear Corp.) 약 100 μ c에 non-radioactive glucose를 넣어 100ml로 희석하여 이 용액의 포도당 농도를 50mg/ml로 만들어 저장용 C¹⁴-포도당용액으로 사용하였다.

제 3 군 및 제 4 군에 대하여 매실험마다 저장용 C¹⁴-포도당용액을 4ml채취하여 이를 역시 인산염완충액으로 희석하여 100ml로 만들어 C¹⁴-포도당용매내의 포도당농도를 200mg/dl로 하여 배양용액으로 하였다.

C¹⁴-pyruvate 및 C¹⁴-포도당배양용매의 specific activity(SA)는 각각 저장용 용액 1ml를 Van Slyke-Folch 방법으로 CO₂로 완전산화시킨 다음 이를 BaCO₃로 침전시켜 Geiger-Müller counter로 측정하였다.

(3) 실험조작

각군에서 적출한 대뇌조직 절편 1~2g를 50cc 주사기에 저자들의 간장절편 배양실험과^{8,9,10} 같은 방법으로 배양하였다.

제 1 군 및 제 2 군에서는 배양용매로서 상술한 C¹⁴-pyruvate 용매를 사용하고 제 3 군 및 제 4 군에서는 C¹⁴-포도당용매를 사용하여 5시간동안 배양하는 도중에 용매내 기질의 농도와 SA를 일정하게 유지하기 위하여 매시간마다 새로운 용매 용액과 산소를 교체하여 줌으로서 실험 기간중 비교적 일정한 대뇌조직의 환경을 유지하고 저 노력 하였다. 용매교체때에 기존하고 있던 배양용매 및 캐스는 특수한 밀폐장치인 표본이동관⁸에 옮겨 매시간의 용매와 캐스표본을 얻어 각군에서 포도당, pyruvate 및 lactate의 농도와 CO₂ 생산율 및 호흡 CO₂의 SA를

측정하였다.

(4) 화학적 조작

포도당 측정에는 Somogyi¹¹ 및 Nelson¹²의 방법, pyruvate 측정에는 Friedmann 및 Haugen¹³의 방법, lactate 측정에는 Barker 및 Summerson¹⁴의 방법을 사용하였고 CO₂ 생산율은 이동관안에 장치한 CO₂ 흡수판안에서 Na₂CO₃로 흡수된 CO₂를 Whatman 여과지(No. 542)에 BaCO₃로 양적으로 침전 시키고 BaCO₃의 무게를 측정하여 매시간의 CO₂ 생산율을 계산함과 동시에 같은 BaCO₃ 표본을 직접 end-window Geiger-Müller counter로 방사능을 측정하여 호흡 CO₂의 SA를 결정하였다. 방사능 측정은 모두 BaCO₃의 자기흡수(self-absorption)에 대한 교정을 하여 관찰하였다.

(5) 계산방법

제 1 군 및 제 2 군에서 pyruvate의 소실율과 lactate의 측정율은 배양용매의 배양전후의 농도를 측정한 후 농도차에다 배양용매의 용적을 승하여 구하였다. 제 3 군 및 제 4 군에서 포도당소실율의 측정도 위와같이 구하고 μ M/hr/g로 표시하였다.

각군에 있어서 CO₂ 생산율은 매시간에 얻은 BaCO₃ 표본의 무게를 BaCO₃의 분자량으로 제하여 매시간의 호흡 CO₂ 생산율을 μ M/hr/g로 표시하였다.

배양용매안의 각 기질로부터 유래하는 CO₂ 발생율의 총 CO₂ 발생율에 대한 비율을 Relative Specific Activity (RSA)라 하고 이는 호흡 CO₂와 용매기질의 SA와의 비를 구하여 산출 하였다.

제 1 군 및 제 2 군에 있어서 배양용매에서 소실된 C¹⁴-pyruvate가 호흡 CO₂ 또는 lactate로 변화된 분율을 각각 Relative Pyruvate Disappearance into CO₂(RPD CO₂) 및 Relative Pyruvate Disappearance into lactate (RPD lactate)라고 칭하고 다음과 같이 산출하였다.

$$RPD\ CO_2 = \frac{\text{총 } CO_2 \text{ 발생율} \times RSA}{\text{pyruvate 소실율} \times 3}$$

$$RPD\ lactate = \frac{\text{lactate 측정율}}{\text{pyruvate 소실율}}$$

즉 RPD CO₂는 1분자의 pyruvate가 CO₂와 H₂O로 완전 산화되면 3분자의 CO₂를 생산하기 때문에 용매 C¹⁴-pyruvate에서 기인된 CO₂ 발생율(총 CO₂ 발생율 × RSA)을 3으로 제하면 C¹⁴-pyruvate에서 기인된 호흡 CO₂ 발생을 위한 pyruvate의 소실량을 의미하며 이를 같은 시간내의 pyruvate 소실율로 제하면 호흡 CO₂로 소실된 pyruvate의 pyruvate 소실율에 대한 비율을 얻게 된다. RPD lactate는 실험기간중 측정된 lactate는 모두 용매 C¹⁴-pyruvate가 환원되어 발생한다고 가정하여 계산한 것이다.

제 3 군 및 제 4 군에 있어서 Relative Glucose Disappearance into CO₂(RGD CO₂)도 RPD CO₂와 같은 개념으로 다음과 같이 산출 하였다.

Table 1. Fate of C¹⁴-pyruvate disappeared from incubation medium.

Group	Sub-group	Med. Conc. of Pyr. (mg%)	No. of case	Pyr. Disapp. Rate (μM/hr/g)	Lactate Accum. Rate (μM/hr/g)	Total CO ₂ Prod. Rate (μM/hr/g)	RSA (%)	CO ₂ from Pyruvate (μM/hr/g)	Amount of Pyr. in- to CO ₂ (μM/hr/g)	RPD CO ₂ (%)	RPD lactate (%)
1	1	10	8	5.3±1.5	2.0±0.8	52.4±7.7	12.2±3.2	6.3±0.9	2.0±0.3	40.5±8.8	36.4±11.2
	2	20	10	10.7±1.9	5.8±1.2	49.7±10.7	19.5±2.6	9.9±1.2	3.3±0.4	37.3±6.9	55.1±16.9
	3	30	8	16.7±1.7	9.2±1.5	50.7±4.0	22.0±2.5	10.8±1.1	3.6±0.4	21.6±3.0	50.6±11.8
	4	40	4	20.2±1.8	5.9±0.4	59.3±1.8	19.0±2.2	11.2±1.6	3.7±0.5	18.4±1.2	29.5±2.5
2	Diabetes	20	10	12.2±1.2	5.1±1.0	63.4±7.3	14.5±4.1	9.0±2.5	3.0±0.8	26.0±7.2	42.1±9.5

$$RGD\ CO_2 = \frac{\text{총 } CO_2 \text{ 발생률} \times RSA}{\text{포도당 소실율} \times 6}$$

3. 실험 성적

(1) C¹⁴-Pyruvate 용매 배양실험

제1군의 각 소군에 있어서 정상 흰쥐의 대뇌질편을 50 ml 주사기에 서로 다른 농도의 C¹⁴-pyruvate 용매와 5시간 동안 배양할 때 각 소군에서 얻은 시간에 따르는 C¹⁴-pyruvate의 소실율, lactate의 축적율, 총 CO₂ 생산율 및 C¹⁴-pyruvate의 호흡 CO₂로의 완전산화율에 관한 실험성적은 제1도에서 보는 바와 같이 C¹⁴-pyruvate의 소실율, lactate의 축적율 및 총 CO₂ 생산율은 제1군의 각 소군에 있어서 첫시간에 모두 높은 값을 보이며 시간 경과에 따라 저하하여 3시간 이후에는 각 소군에 있어서 비교적 일정한 값을 보이며 평탄선(plateau)을 이르게 된다. 일방 용매 C¹⁴-pyruvate의 CO₂로의 산화율 또는 RSA는 시간에 따라 급격히 증가하며 3시간 이후에는 최대값을 보이며 평탄선을 이룬다. 이러한 평탄선 값을 기준으로 하여 배양용매 C¹⁴-pyruvate의 농도 변화에 따르는 각종 대사율을 보려는 다음과 같다.

첫째 C¹⁴-pyruvate의 소실율은 제1소군에서 평균 5.3 ± 1.5, 제2소군에서 10.7 ± 1.9, 제3소군에서 16.7 ± 1.7, 제4소군에서 20.2 ± 1.8 μM/hr/g의 값을 얻었다. 즉 pyruvate 소실율은 배양용매의 pyruvate 농도가 10mg 내지 40mg/dl의 범위 내에서는 용매 C¹⁴-pyruvate 농도 상승에 따라 증가하였다.

둘째로 각 소군에 있어서 lactate 축적율은 제1소군에서 2.0 ± 0.8, 제2소군에서 5.8 ± 1.2, 제3소군에서 9.2 ± 1.5, 제4소군에서 5.9 ± 0.4 μM/hr/g의 값을 얻었다. 즉 lactate 축적율은 제1도에서 보는 바와 같이 용매 C¹⁴-pyruvate 농도가 10mg/dl 이하에서는 농도의 함수로 증가하지만 20mg/dl 이상의 용매 C¹⁴-pyruvate 농도에서는 비교적 일정한 포화값을 보였다.

셋째로 총 CO₂ 생산율을 보려는 제1소군에서 52.4 ± 7.7, 제2소군에서 49.7 ± 10.7, 제3소군에서 50.7 ± 4.0, 제4소군에서 59.3 ± 1.8 μM/hr/g의 성적을 얻었고 용매 C¹⁴-

pyruvate 농도가 10mg/dl 이상에서는 호흡 CO₂ 생산율에는 비교적 변동이 없이 일정하였다.

넷째로 용매 C¹⁴-pyruvate에서 기인된 호흡 CO₂의 총 CO₂ 생산율에 대한 분율 즉 RSA는 제1소군에서 12.2 ± 3.2, 제2소군에서 19.5 ± 2.6, 제3소군에서 22.0 ± 2.5, 제4소군에서 19.0 ± 2.2였으며 C¹⁴-pyruvate의 호흡 CO₂로의 완전산화 과정에 관한 교소계는 용매 C¹⁴-pyr-

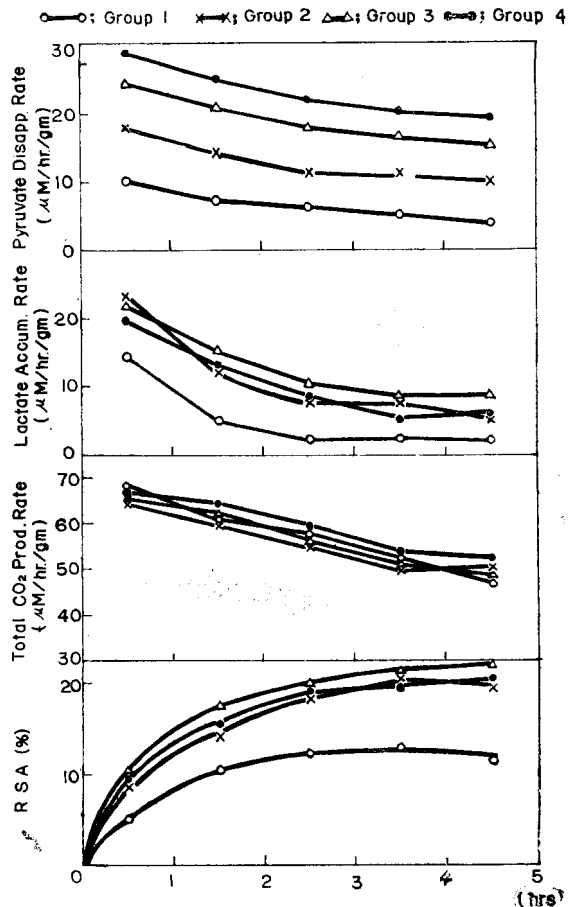


Fig. 1. Time course of metabolic rates; pyruvate disappearance, lactate accumulation, total CO₂ production rate and relative specific activity (RSA), as brain slices were incubated in the different concentration of C¹⁴-pyruvate medium.

uvate농도가 20mg/dl 이상에서는 포화되며 비교적 일정한 산화율을 보임을 지적할 수 있었다. 제1군의 각 소군에 있어서 제1도에서 보는 바와 같이 모든 대사율이 pyruvate의 소실율을 제외하고 C^{14} -pyruvate 농도가 20mg/dl 이상에서는 비교적 일정한 포화값을 보였으므로 제1군의 제2소군에서 얻은 값을 대조로 하여 alloxan 당뇨병 흰쥐의 대뇌조직을 20mg/dl의 pyruvate 농도를 갖인 배양용매에 배양하였을 때 얻은 실험성적(제2군)과 비교하며는 다음과 같다.

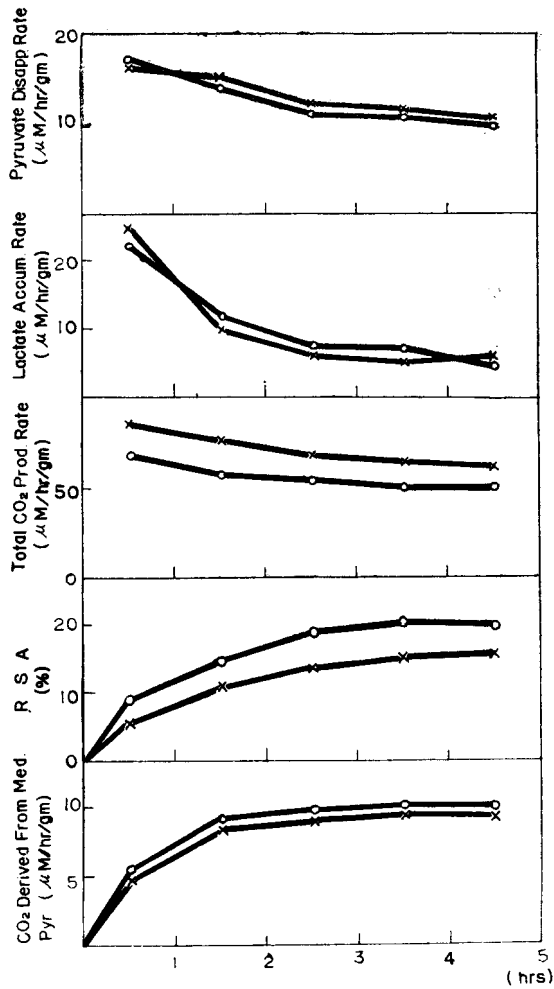


Fig. 2. Time course of various metabolic rates of normal and alloxan diabetic brain slices.

○—○ : control ×—× : diabetes

제2군에 있어서 시간에 따르는 여러 대사율의 변화 과정은 제1군에서 보는 바와 같고 모두 3시간 이후에 평탄값을 보이며 "Steady State" 대사과정을 보였다. 이러한 "Steady State" 대사과정에서 얻은 실험성적을 제1군의 제2소군에서 얻은 값과 비교 관찰한 결과 제2도 및 제1표에서 보는 바와 같이 용매 C^{14} -pyruvate의 소실율은 제1군에서 10.7 ± 1.9 , 제2군 즉 당뇨병대뇌 조직에서

$12.2 \pm 1.2 \mu\text{M/hr/g}$ 이며 별차가 없었고 lactate 축적율은 제1군에서 5.8 ± 1.2 , 제2군에서 $5.1 \pm 1.0 \mu\text{M/hr/g}$ 이며 역시 큰 차를 보이지 않았다. 총 CO_2 생산율은 제1군에서 49.7 ± 10.7 , 제2군에서 63.4 ± 7.3 으로 오히려 당뇨병대뇌조직에서 높았으며 RSA는 제1군에서 19.5 ± 2.6 , 제2군에서 $14.5 \pm 4.1\%$ 로 당뇨병군에 있어서 약간의 저하를 보였다. C^{14} -pyruvate의 호흡 CO_2 로의 산화율(총 CO_2 생산율 \times RSA)은 제2군 즉 당뇨병군에 있어서 총 CO_2 생산율은 제1군보다 높고 RSA는 제1군보다 낮으므로 C^{14} -pyruvate의 호흡 CO_2 로의 산화율은 제1군과 별차가 없었다(제2도). 즉 제1군에서 3.3 ± 0.4 , 제2군에서 $3.0 \pm 0.8 \mu\text{M/hr/g}$ 의 호흡 CO_2 가 용매 C^{14} -pyruvate에서 발생하였다. 호흡 CO_2 로 완전산화된 pyruvate의 용매에서 소실된 pyruvate에 대한 분율 즉 RPD CO_2 는 제1군에서 32.3 ± 6.9 , 제2군에서 $26.0 \pm 7.2\%$ 이며 lactate에 대한 RPD lactate는 제1군에서 55.1 ± 16.9 , 제2군에서 $42.1 \pm 9.5\%$ 를 각각 산출하였다. 즉 제1군에서는 pyruvate소실율의 87.4, 제2군에서는 약 66.1% (RPD CO_2 + RPD lactate)가 호흡 CO_2 및 lactate로 산화 혹은 축적 되었음을 설명할 수 있었다.

이상 제1군 및 제2군의 C^{14} -pyruvate용매 배양실험에 있어서 성적을 종합하며는 정상 및 당뇨병대뇌조직의 포도당의 중간 대사물질인 pyruvate의 호흡 CO_2 로의 산화 과정은 용매 C^{14} -pyruvate에서 유리된 CO_2 생산율에 별차가 없다는 점으로 보아 대뇌조직의 산화과정에 관련된 교소계는 insulin의 영향을 받지 않음을 지적할 수 있었다.

(2) C^{14} -glucose용매 배양실험

제3군 및 제4군에 있어서 정상 및 alloxan당뇨병 흰쥐대뇌절편을 C^{14} -pyruvate용매 배양실험에서와 같은 방법으로 C^{14} -포도당용매에 배양할 때에도 3시간 이후에 비로서 일정한 대사율을 보이게 된다. 그러므로 C^{14} -포도당용매 배양실험에서는 C^{14} -pyruvate용매 배양실험에서와 같이 3시간 이후 대뇌절편과 용매 C^{14} -포도당이 평형이 되어 일정한 대사율을 보일 때의 실험성적을 취하여 제3군의 정상흰쥐의 대뇌조직절편 및 제4군의 alloxan 당뇨병흰쥐의 대뇌조직절편에 있어서의 C^{14} -포도당의 대사과정과 비교 관찰하였다. 8마리의 정상 흰쥐의 대뇌조직절편 및 10마리의 alloxan 당뇨병 흰쥐의 대뇌조직절편에서 C^{14} -포도당의 소실율 및 호흡 CO_2 로의 산화대사과정에 관한 실험성적은 제2표에 종합표시하였다.

용매에서 C^{14} -포도당의 소실율은 제3군에서 평균 $44.1 \pm 4.5 \mu\text{M/hr/g}$ 인데 비하여 제4군 즉 당뇨병대뇌에서는 현저히 저하 하여 평균 $20.0 \pm 10.5 \mu\text{M/hr/g}$ 의 값 즉 정상값의 1/2이하로 저하 하였다.

총 CO_2 생산율은 제3군에서 평균 $67.8 \pm 9.1 \mu\text{M/hr/g}$, 제4군에서 평균 $56.7 \pm 5.5 \mu\text{M/hr/g}$ 의 값을 얻었으며 당뇨병때의 총 CO_2 생산율의 저하율은 15%에 불과 하였

Table 2. Conversion of C¹⁴-glucose into respiratory CO₂.

Group	Med. Conc. of Glucose (mg%)	No. of Case	Glucose Dis-app. Rate (μM/hr/g)	Total CO ₂ Prod. Rate (μM/hr/g)	R S A (%)	CO ₂ Prod. Rate from Glucose (μM/hr/g)	Amt. of Glucose Dis-app. into CO ₂ (μM/hr/g)	RGD CO ₂ (%)
3	200	8	44.1±4.5	67.8±9.1	21.5±2.9	14.2±2.7	2.4±0.5	5.5±1.4
4	200	10	20.0±10.5	56.7±5.5	26.1±5.1	14.4±2.4	2.4±0.4	18.9±6.2

다.

RSA는 제3군에서 21.5±2.9, 제4군에서 26.1±5.1로 별차가 없었고 오히려 당뇨병군에서 약간 증가 하였다. 그럼으로 용매 C¹⁴-포도당으로 부터 유리하는 CO₂발생율은 제3군에서 총 CO₂생산물의 21.5±2.9%인 14.2±2.7 μM/hr/g이며 제4군에서 평균 14.4±2.4 μM/hr/g임을 각각 산출 하였다. 양군의 값이 거의 같다는 점으로 보아 C¹⁴-포도당의 산화대사과정에 있어서 대뇌조직의 교소계는 C¹⁴-pyruvate 용매 배양실험에서와 같이 insulin의 영향을 받지 않음을 지적할 수 있었다. 용매에서 소실된 C¹⁴-포도당이 호흡 CO₂로 완전산화된 분율 즉 RGD CO₂는 제3군에서 5.5±1.4, 제4군에서 18.9±6.2를 산출하였고 이러한 성적은 당뇨병대뇌조직의 에너지대사 과정에 있어서 포도당이 오히려 능률적으로 이용됨을 알 수 있다.

4. 고 찰

본 실험에서 사용한 방법은 저자^{8,9,10)} 등이 간 조직 절편을 이용한 실험에서 논의한 바와 같이 조직절편의 대사 과정을 관찰하는데 있어서 장시간 동안 일정한 용매 기질농도와 SA를 유지함으로써 "Steady State" 대사 과정을 이르게한 후 각 군에서 대사율을 측정 하였으므로 대뇌조직의 교소계로 인한 용매기질의 산화대사능력을 비교적 정확히 측정할 수 있었다.

Insulin이 생체 여러 조직에서 탄수화물 대사과정에 현저한 영향을 미친다는 사실은 많은 실험성적에서 볼 수 있고 이를 종합하며는 insulin이 탄수화물 대사과정에 관여하는 작용점은 다음 5단계로 나누어 고찰 할 수 있다.

첫째 Goldstein^{15,16,17)} 등이 주장 하듯이 insulin이 포도당의 세포막투과 반응에 일차적으로 작용하기 때문에 당뇨병때에 포도당의 이용율이 저하한다는 것이다. 이러한 사실은 저자들이 당뇨병계의 C¹⁴-포도당 대사과정을 측정할 실험¹⁸⁾에서도 본 바와 같이 C¹⁴-포도당의 분포용적(glucose space)이 E.C.F.용적과 비등 하다는 점으로 보아 생체내의 포도당이 세포막을 투과 못하고 대부분 세포외에 머무러 있다는 사실로서도 증명할 수 있다.

둘째로 Cori^{19,20)} 등이 처음 주장한 바와 같이 포도당

의 phosphorylation 작용에 insulin이 관여하며 특히 glucohexokinase 반응에 특이하게 작용 한다는 것이다. 이러한 사실은 Vilee²¹⁾ 등에 의하여 insulin이 hexokinase에 대한 adrenocortical hormone과 같은 hormone의 억제작용에 작용한다고 하였다.

셋째로 insulin이 포도당의 대사과정에 있어서 hexokinase 반응 이외의 호기성 산화과정에 관여한다는 사실을 처음 Krebs²²⁾ 등이 주의를 환기한 이래 실지로 포도당의 중간대사 물질인 pyruvate, lactate 등의 표식 물질을 이용한 실험^{23,24)}에서도 당뇨병이 있을 때 대뇌 이외의 각종 조직절편에서 이들 중간 대사물질의 호흡 CO₂로의 호기성 대사과정에 현저한 저하를 보인다는 사실이 관찰되어 있다.

넷째로 insulin이 탄수화물의 lipogenesis에 관여한다는 사실을 Stetten^{25,26,27)} 등이 주장 하였다.

다섯째로 대사과정에서 유리된 에너지의 high-energy phosphate bond로의 coupling반응인 oxidative phosphorylation에도 insulin이 관여 한다고 한다²⁸⁾.

이상과 같이 insulin이 탄수화물 대사과정에 있어서 여러 중간대사 과정에 영향을 주며 실지로 당뇨병때에 여러 조직에서 포도당의 이용율이 저하됨은 실험적으로나 임상적으로 흔히 경험하고 있다. 그러나 에너지원의 대부분을 포도당에 의존하고 있는 대뇌조직에서 당뇨병때에 즉 insulin 결핍시에 다른 조직에서와 같이 탄수화물 대사과정에 현저한 영향을 받는다는 항상 일하고 있는 대뇌조직의 에너지대사에 큰 변동이 생기며 기능적으로도 큰 영향을 미치게 될 것이다. 이러한 점을 구명하기 위하여 본 실험은 insulin이 대뇌조직의 탄수화물대사 과정에 미치는 영향을 3단계로 나누어 고찰 하였다.

첫째 단계로 C¹⁴-pyruvate를 이용하여 3탄화합물에서 호흡CO₂로의 완전 산화과정에 당뇨병때와 같은 insulin결핍이 미치는 영향을 검토한 결과 제1군 및 제2군의 실험 성적에서 보는 바와 같이 용매 C¹⁴-pyruvate의 소실율, 총 CO₂의 생산율 및 용매 C¹⁴-pyruvate에서 산화된 호흡 CO₂의 생산율이 정상대조 값과 별 차이가 없으므로 대뇌조직의 탄수화물 대사과정에 있어서 3탄화합물 이하의 산화대사과정은 insulin의 영향을 받지 않음을 증명할 수 있었다.

둘째 단계로 포도당에서 3탄화합물로 분해하는 해당경

로(glycolysis pathway)에 대한 insulin의 영향을 관찰하기 위하여 대뇌조직을 C¹⁴-포도당 용매에 배양한 결과 제3군 및 제4군의 실험성적에서 보는 바와 같이 총 CO₂생산율, RSA 및 C¹⁴-포도당에서 기인된 호흡 CO₂의 발생율이 정상대조 값과 대응소이한 점으로 보아 다른 조직에서와는 달리 대뇌조직에서는 해당경로에 있어 특히 hexokinase 반응에 insulin의 영향을 받지 않음을 지적할 수 있었다. 각 군에서의 실험성적을 종합하려는 위에서 논의한 바와 같이 당뇨병때에 대뇌세포안에 있어서 포도당의 산화대사과정 또는 에너지 대사과정에는 다른 조직과 달리 insulin의 영향을 받지 않으며 정상대 뇌조직에서와 같이 정상적으로 에너지를 포도당에 의존하고 있음을 증명할 수 있었다.

그러나 셋째단계로 용매포도당이 대뇌세포안으로 들어가는 투과과정을 제3군 및 제4군에서 얻은 포도당소실율을 비교하여 관찰 하였던 바 당뇨병 대뇌조직에서 정상대조값의 약 1/2로 저하 하였으므로 혈뇌장벽(blood-brain barrier)에 있어서 포도당의 대뇌조직의 세포막 투과반응에는 insulin이 다른 조직에서와 같이 영향을 미치는 인상을 주었다.

오래전 부터 당뇨병때에 대뇌조직에서 ketone body의 이용율이 증가하지 않는다⁵⁾는가 또는 포도당의 A-V 농도차 및 호흡율에 변화를 초래하지 않는다⁶⁾는 등 단편적인 지식을 얻을 수 있었으나 본 실험은 직접 C¹⁴-포도당 및 그 중간대사산물인 C¹⁴-pyruvate을 이용하여 이들의 대뇌조직으로 인한 대사과정을 계단적으로 검토한 결과 insulin이 대뇌조직의 포도당대사 과정에 있어서 관여하지 않음을 지적할 수 있었다.

5. 결 론

58마리의 흰쥐의 대뇌조직을 4군으로 나누어 C¹⁴-pyruvate 및 C¹⁴-포도당용매에 5시간 동안 배양할 때 매 시간마다 새로운 용매와 gas를 교체하면서 용매기질과 대뇌교소계와 평형상태를 이루게한 후 매시간마다 gas 및 용매표본을 얻어 용매기질의 소실율, 총 CO₂생산율, RSA 및 용매 C¹⁴-표식기질에서 유리된 CO₂의 발생율을 측정하여 alloxan으로 유발한 당뇨병 흰쥐의 대뇌조직 절편과 정상대조 대뇌조직에서 얻은 값을 비교 관찰하여 다음과 같은 성적을 얻었다.

(1) C¹⁴-pyruvate 용매배양실험

제1군 및 제2군을 C¹⁴-pyruvate용매 배양실험에 사용하였고 제1군에서는 정상대뇌조직 절편을, 제2군에서는 alloxan으로 유발한 당뇨병 흰쥐의 대뇌조직 절편을 각각 20mg/dl의 C¹⁴-pyruvate농도를 갖인 인산염 용매에 배양하였다.

제1군 및 제2군에 있어서 C¹⁴-pyruvate소실율은 평균 10.7±1.9, 및 12.2±1.2 μM/hr/g, lactate 축적율은

평균 5.8±1.2, 및 5.1±1.0 μM/hr/g로 별차이가 없었고 총 CO₂생산율은 제1군에서의 49.7±10.7 μM/hr/g에 비하여 제2군에서는 63.4±7.3 μM/hr/g으로 약간 높은 값을 보였으나 RSA는 반대로 제1군에서의 19.5±2.6에 비하여 제2군에서 약간 낮은 14.5±4.1의 값을 얻었으므로 결과적으로 용매 C¹⁴-pyruvate에서 기인된 호흡 CO₂의 발생율은 제1군에서 3.3±0.4, 제2군에서 3.0±0.8 μM/hr/g을 계산 하였으며 별 차가 없었다.

(2) C¹⁴-포도당 용매배양실험

제3군 및 제4군을 C¹⁴-포도당용매 배양실험에 사용하였고 제3군에서는 정상대조대뇌조직 절편을, 제4군에서는 alloxan 당뇨병 흰쥐의 대뇌조직 절편을 각각 200 mg/dl의 C¹⁴-포도당 용매에 배양 관찰하여 다음과 같은 성적을 얻었다.

포도당 소실율은 제3군에서 44.1±4.5, 제2군에서 20.0±10.5 μM/hr/g로 대조값의 약 1/2로 저하하였다. 총 CO₂ 생산율 및 RSA는 제3군 및 제4군에서 별 차이가 없었으므로 용매 C¹⁴-포도당에서 기인된 CO₂발생율은 제1군에서 14.2±2.7, 제2군에서 14.4±2.4 μM/hr/g을 각각 보였다.

이상과 같은 실험성적으로 보아 대뇌조직의 탄수화물 대사과정은 전단계에 있어서 insulin의 영향을 받지 않음을 지적 할 수 있으나 포도당의 대뇌세포막투과에는 다른 조직에서와 같이 insulin이 관여함을 알았다.

(본 연구에 지도와 편달을 아끼시지 않은 나세진 교수와 남기용 교수에게 감사한다.)

ABSTRACT

Metabolism of C¹⁴-labeled Pyruvate and Glucose by Brain Slices of Normal and Alloxan-Diabetic Rats.

Shin Yo Chang, M.D., Ka Yong Chang, M.D.
Department of Anatomy

Sang Don Rhee, M.D.
Department of Physiology

College of Medicine, Seoul National University

Brain slices of 58 normal and alloxan-diabetic rats were divided into 4 groups. Each group was incubated for a period of 5 hours with incubation mixture consisting of 15 c.c. of phosphate buffer to which were added C¹⁴-glucose or C¹⁴-pyruvate and 15 c.c. of oxygen. During 5 hours of incubation period, the incubation media and gas phase were replaced with fresh media and oxygen at hourly intervals. This procedure made it possible to obtain hourly samples

to determine the concentration of medium substrates and the amount and radioactivity of CO₂ produced by the brain slices during the experimental period. It also had the advantage of presenting the tissue with a substrate of essentially constant concentration and specific activity.

Data obtained from the C¹⁴-pyruvate incubation experiment, in the first and second group, and from the C¹⁴-glucose incubation experiment in the third and fourth group, were summarized as the follows.

1. In the C¹⁴-pyruvate incubation experiment, pyruvate disappearance rates were mean of 10.7 μM/hr/g in the first control group, and 12.2 μM/hr/g in the second alloxan-diabetic group. The lactate accumulation rates in both groups were mean of 5.8 and 5.1 μM/hr/g respectively.

Total CO₂ production rates in both groups were mean of 49.7 and 63.4 μM/hr/g respectively, showing a slightly higher value in the second group. However, since RSA, which represents the fraction of C¹⁴-O₂ derived from medium C¹⁴-pyruvate to total CO₂ production rate, was slightly higher in the control group than the diabetic-group, there were little differences in CO₂ production rates derived from medium C¹⁴-pyruvate of both groups.

2. In the C¹⁴-glucose incubation experiment, C¹⁴-glucose disappearance rates decreased about one half of the control in the diabetic group, showing a mean of 44.1 μM/hr/g in the third control group and 20.0 μM/hr/g in the fourth alloxan-diabetic group.

Since there were not significant differences in total CO₂ production rates and values in RSA, C¹⁴-O₂ production rates derived from medium C¹⁴-glucose have been found to be almost the same value in both groups.

From the data described above, insulin cannot have an influence on all the steps of carbohydrate metabolism in the brain tissue. However there is evidence that insulin exhibits the effect on membrane transport of glucose as found in the other tissues.

REFERENCES

- 1) Gibbs, E.L., Lennox, W.G., Nims, L.F. and Gibbs, F.A.: *J. Biol. Chem.*, 144 : 35, 1942.
- 2) Staidie, W.C.: *Current Concepts of the Action of Insulin.*, *Physiol. Rev.*, 34 : 25, 1954.
- 3) Himwich, H.E. and Nahum, L.H.: *The Respira-*

tory Quotient of the Brain., *Am. J. Physiol.*, 101 : 446, 1932.

- 4) Kety, S.S.: *Meth. Med. Res.*, 1 : 204, 1948.
- 5) Mulder, A.G. and Crandall, L.A.: *Am. J. Physiol.*, 137 : 436, 1942.
- 6) Haugaard, N., Vaughn, M., Haugaard, E.S. and Studie, W.C.: *Studies of Radioactive Injected Labeled Insulin.*, *J. Biol. Chem.*, 208 : 549, 1954.
- 7) Van Slyke, D.D. and Folch, J.: *Manometric Carbon Determination.*, *J. Biol. Chem.*, 136 : 509, 1940.
- 8) 이응섭 : 정상 및 Alloxan 당뇨병 흰쥐의 간장절편에 있어서 C¹⁴-포도당의 산화대사에 관한 실험., 서울의대 잡지, 2 : 289, 1961.
- 9) Chang, S., Rhee, S. and Lee, U.: *Effects of Concentration and of Medium Glucose on Glucose Disappearance and Oxidative Metabolism by Liver Slices of Rats.*, *Seoul J. Med.*, 3 : 1, 1962.
- 10) 이응섭 : 흰쥐 간장절편에 있어서 C¹⁴-Pyruvate의 대사과정에 관한 실험., 서울 의대 잡지 3 : 349, 1962.
- 11) Somogyi, N.: *A New Reagent for Determination of Sugar.*, *J. Biol. Chem.*, 160 : 61, 1945.
- 12) Nelson, N.: *A Photometric Adaptation of the Somogyi Method for the Determination of Glucose.*, *J. Biol. Chem.*, 153 : 375, 1944.
- 13) 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.
- 14) Barker, S.B. and Summerson, W.H.: *Colorimetric Determination of Lactic Acid in Biological Material.*, *J. Biol. Chem.*, 138 : 535, 1941.
- 15) Goldstein, M.S., Henry, W.L., Huddleston, B. and Levine, R.: *Action of Insulin on Transfer of Sugars across Cell Barrier, Common Chemical Configuration of Substances Response to Action of the Hormone.*, *Am. J. Physiol.*, 173 : 207, 1953.
- 16) Levine, R., Goldstein, M.S., Huddleston, B. and Klein, S.P.: *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.
- 17) Goldstein, M.S., Mullick, V., Huddleston, B. and Levine, R.: *Action of Muscular Work on Transfer of Sugars across Cell Barrier, Comparison with Action of Insulin.*, *Am. J. Physiol.*, 173 : 212, 1953.
- 18) 김응진, 이상돈, 이응섭 : 한국인 당뇨병의 임상 및 실험적 연구, 제4권 당뇨병에 있어서의 C¹⁴-포도당대

- 사., 대한내과학회잡지, 5 : 517, 1962.
- 19) Cori, C.F. and G.T. Cori: *J. Biol. Chem.*, 124 : 554, 1938.
- 20) Price, W.H., Cori, C.F. and Colowick, S.P.: *Effect of Anterior Pituitary Extract and of Insulin on Hexokinase Reaction.*, *J. Biol. Chem.*, 160 : 633, 1945.
- 21) Villet, C.A., White, V.K. and Hastings, A.B.: *Metabolism of C¹⁴-labelled Glucose and Pyruvate by Rat Diaphragm Muscle in Vitro.*, *J. Biol. Chem.*, 195 : 287, 1952,
- 22) Krebs, H.A. and Eggeleston, P.: *Effect of Insulin on Oxidations in Isolated Muscle Tissue.*, *Biochem. J.*, 32 : 913, 1938.
- 23) Pearson, O.H., C.K. Hsieh, C.H. Dutoit and A.B. Hasting: *Metabolism of Cardiac Muscle, Utilization of C¹⁴-labelled Pyruvate and Acetate in Diabetic Rat Heart and Diaphragm.*, *Am. J. Physiol.*, 158 : 261, 1949.
- 24) Villet, C. and A.B. Hasting: *The Utilization in Vitro of C¹⁴-labelled Acetate and Pyruvate by Diaphragm muscle of Rat.*, *J. Biol. Chem.*, 181 : 131, 1949.
- 25) Stetten, D. Jr. and G.E. Boxer: *J. Biol. Chem.*, 156 : 271, 1944.
- 26) Stetten, D. Jr. and B. Klein: *J. Biol. Chem.*, 159 : 593, 1945.
- 27) Stetten, D. Jr. and B. Klein: *Studies in Carbohydrate Metabolism.*, *J. Biol. Chem.*, 162 : 377, 1946.
- 28) Stadie, W.C., Haugaard, N., Marsh, J.B. and Hills, A.G.: *The Chemical Combination of Insulin with Muscle of Normal Rat.*, *Am. J. M. Sc.*, 218 : 265, 1949.
-