

에르릿히 복수 종양에 있어서 젖산 각 탄소 산화과정의 분해경로에 관한 연구

Catabolic Pathway of Oxidative Metabolism of Carbon Atoms of Lactate in Ehrlich Ascites Tumor

서울대학교 의과대학 생리학교실

<指導 南 基 鏞 教授>

文 一 淳 · 李 相 敦

정상 생체 조직의 당대사 과정에 관한 실험은 1930 년 이래 Embden¹⁾의 phosphoglyceric acid의 발견으로 천명된 포도당의 무기성(anaerobic) 대사와 Krebs²⁾등이 주장한 TCA cycle을 거치는 유기성 산화대사로 구분되어 많은 실험이 거듭됨으로써 현재와 같이 Embden meyerhoff pathmay (EMP) 및 tricarboxylic acid cycle (T-CA)과 같이 포도당의 해당경로에 관한 중간대사 과정이 확고히 체계화 되었다. Warburg, Lipman 및 Dickens³⁾ 등이 포도당의 산화과정에 있어서 6-phosphogluconate를 통한 다른 산화경로를 발견하였음에도 불구하고 생체에 있어서 포도당의 호흡 CO₂로의 완전 산화과정은 EMP-TCA 경로가 중심적인 역할을 한다고 믿어져 왔다. 그러나 근래에 Bloom⁴⁾등이 간장절편에서 C¹⁴-포도당 및 젖산을 이용하여 포도당의 산화경로를 검토한 결과 EMP-TCA 경로에 의거한 CO₂는 20% 내외에 불과하며 대부분의 CO₂는 다른 경로를 밟아 산출되었음이 밝혀진 이래 생체조직에 있어서 EMP-TCA 경로 이외의 hexose monophosphate pathway (HMP)와 같은 다른 당류산화경로에 대한 중요성을 주장하게 되었다. 림등⁵⁾의 실험성적에 의하면 대뇌조직에서 약 96%, 신장 조직에서 약 60%, 간조직에서 약 30%의 포도당에서 산화된 CO₂가 기본적인 EMP-TCA 경로를 밟아 산화되었음을 보았고 나머지 CO₂는 EMP-TCA 경로 이외의 HMP와 같은 다른 경로에 의거하였음을 밝혔다. 즉 정상조직에 있어서도 조직에 따라 당류 산화경로에 현저한 차이가 있음을 지적할 수 있다.

특히 성장율이 왕성한 종양조직에 있어서 가장 중요한 에너지원인 포도당의 산화경로를 보면 본 교실의 이등⁶⁾의 실험에서 밝힌 바와 같이 포도당에서 유리되는 CO₂의 90% 이상은 HMP와 같은 경로를 밟아서 산화되며 EMP-TCA 경로를 밟아 유리되는 CO₂는 극히 적은 점으로 보아 종양조직에서 당류 대사에 현저한 변조를 초래하였음은 의심할 바 없는 것이다. 종양조직의

합수탄소 대사 과정을 정상조직과 비교하면 현저한 차이점의 하나로서 젖산 축적을 들 수 있다. 즉 유기성 환경하에서도 무기성 환경하에서와 같이 젖산생산이 정상조직과는 달리 증가됨이 특징인 것이다. Greenstein¹⁰⁾에 의하면 14종의 종양조직에서 유기성 환경하의 젖산생산을 즉 QO₂ (μl of CO₂/mg of dry weight)는 6~24이며 그중 10종의 값은 10 이상이며 나머지 4종의 값도 6~9의 값을 보였다. 한편 정상 조직의 값은 모두 3 이하이며 태아조직(embryonic tissue)에서 평균 6의 값을 보였다. 생체내(in vivo)에서도 정상조직에서는 일반적으로 젖산이 에너지원으로 이용되므로 동맥농도가 정맥 농도보다 항상 높은 값을 보이나 종양조직에서는 관류 정맥혈의 젖산 농도가 동맥혈보다 높다는 점으로 미루어 상당한 량의 젖산이 종양조직에서 유리됨을 보았다.

종양조직에서 젖산 축적을 초래함에는 다음 세가지 가능성을 지적할 수 있다. 첫째 다른 대사 경로는 정상인데도 불구하고 무기성 해당이 촉진되어 이의 중산물인 삼탄화합물이 젖산으로 환원되어 축적될 가능성과 둘째로 생산된 젖산이 TCA cycle과 같은 산화반응이 억제되어 이용율이 저하되므로 대사반응의 노폐물로 축적될 가능성과 셋째로 정상 무기성 해당경로를 밟아 분해된 젖산이 지방산 또는 아미노산으로의 합성 또는 당원질로의 재합성 과정이 비가역적으로 진행되어 억제되므로 젖산 축적을 초래할 것이다. LePage^{12,13)}등의 실험에 의하면 다른 조직에 비하여 종양조직에서 무기성 당류 대사율이 특별히 증가된 증거는 없고 정상조직과 비등하였으므로 무기성 해당경로는 큰 영향을 받지 않는다고 한다. 그러나 Busch 등¹⁴⁾의 실험에서는 C¹⁴-포도당을 주입한 후 종양조직에서 TCA cycle의 중간대사물질을 크로마토그래프수법^{16,17)}으로 분리하여 중간대사물질의 방사능을 측정한 바 다른 조직의 값에 비하여 현저히 저하되었고, 이등⁶⁾이 관찰한 바와 같이 C¹⁴-6-

glucose와 중앙조직 균등액을 배양하였을 때 포도당의 C-6 탄소로부터의 CO₂ 생산율이 무시할 정도의 소량에 불과하였다는 사실등으로 미루어 정상 해당경로를 밟아 생산되는 젖산이 TCA cycle과 같은 산화 분해과정이 억제되므로 이용율이 저하되어 젖산 축적을 초래케 할 것이라고 예측하게 한다.

이리하여 본 실험에서는 중앙조직에서 축적된 젖산은 대사과정의 산산물이며 단순한 노폐물에 불과한지 또는 성장율이 왕성한 중앙조직의 대사에 관여하여 이용되는지의 여부를 구명하고자 젖산의 탄소를 C¹⁴-로 표시한 기질을 이용하여 에르릿히 복수 중앙조직과 배양하여 젖산 각 탄소의 분해과정을 개별적으로 분석함으로써 중앙조직 대사과정에서 젖산이 관여하는 의의와 역할을 구명하고자 시도하였다.

실험 방법

1. 실험재료

에르릿히 복수 중앙 생쥐의 복수를 생쥐 허리, 피부에 약 0.1 ml 주입한 후 1주 내지 2주에 이식된 복수중앙이 육안으로 직경 1 cm 이상으로 성장된 생쥐를 선택하여 사용하였다.

매 실험에서 생쥐 10 마리의 복수중앙 조직을 같이 혼합(pool)하여 사용하였다. 동물을 단두로 희생하여 중앙조직을 적출하고 중앙조직 중심부에 생긴 피사 조직은 제거하고 정확히 중량을 측정된 후에 10 마리 생쥐의 복수중앙 조직을 같이 혼합하여 Krebs-Ringer-phosphate buffer (K-R-P, pH 7.4) 용액을 첨가하여 glass homogenizer로 30 ml의 조직 균등액을 만들었다.

조직균등액은 이를 10 ml 씩 3 등분하여 3 실험군으로 하였던 바 C¹⁴-1 실험군은 C¹⁴-1-젖산, C¹⁴-2 실험군은 C¹⁴-2-젖산, C¹⁴-3 실험군은 C¹⁴-3-젖산을 기질로 하여 배양한 것이었다.

2. 배양 배지

C¹⁴-1-젖산, C¹⁴-2-젖산 및 C¹⁴-3-젖산(New England Nuclear Corp 제)을 각각 50 μC 씩 50 ml의 K-R-P 용액으로 희석하고, 비방사성 젖산염을 첨가하여 10 mg/ml의 젖산 농도를 유지하는 용액을 저장 용액으로 사용하였다. C¹⁴-젖산의 방사능 또는 specific activity (S.A.)는 저장 용액 1 ml를 취하여 Van Slyke-Folch¹⁸⁾ 방법

으로 총 CO₂로 산화시킨 후 이를 다시 BaCO₃로 침전시켜 Geiger-Müller counter로 방사능의 총계수(total counts)를 측정된 바 C¹⁴-1-젖산 저장 용액의 SA는 1.270×10⁵ cpm/ml였고, C¹⁴-2-젖산의 값은 1.270×10⁵ cpm/ml이고, C¹⁴-3-젖산 저장 용액의 값은 8.96×10⁴ cpm/ml이었다.

매 실험에서 3 등분한 조직 균등액을 따로 배양용기에 넣고 각 실험군에 C¹⁴-1-젖산 저장 용액, C¹⁴-2-젖산 저장 용액 및 C¹⁴-3-젖산 저장 용액을 각각 0.5 ml씩 첨가하여 배양하였으므로 각군의 배지내 젖산 농도 및 배지 젖산의 SA는 다음과 같았다(제 1 표 참조).

제 1 표에서 보는 바와 같이 K-R-P 용액으로 만든 중앙조직 균등액에 10 mg/ml의 C¹⁴-젖산 저장 용액 0.5 ml를 첨가하고 10 ml로 만들어 배양하였으므로 각군의 배양배지의 젖산 농도는 50 mg%이고 0.5 ml의 저장 용액내 방사능을 탄소 중량(5mg× $\frac{36}{90}$ =2mg)으로 제하여 배지내 젖산의 SA를 cpm/mg C으로 표시한바 제 1 군에서 배지 C¹⁴-1-젖산의 SA는 3.19×10⁴ cpm/mg C, 제 2 군에서 3.18×10⁴ cpm/mg C, 제 3 군에서 2.24×10⁴ cpm/mg C이었다.

2. 일반 실험 조작

각군에 있어서 균등액 배양 실험에 사용한 배양 용기는 밀면 직경 6 cm 높이 8 cm의 Erlenmeyer flask의 밀면 중앙에 직경 1 cm, 높이 2 cm의 중심관을 설치한 초차 용기이었다. 배양 용기 중심관에는 호흡 CO₂를 채취하기 위하여 CO₂ free 2 N NaOH를 1 ml 넣고 10 ml의 조직 균등액을 중심관 주위에 넣은 다음 산소와 함께 밀봉하고 Dubnuff metabolic shaking incubator로 38° C 항온조에서 좌우 진탕을 1분에 60 회 정도 가하면서 3 시간 동안 배양하였다.

배양 후 냉동기에 12 시간 이상 방치하여 조직에서 유리된 CO₂ 흡수를 완전케 하고 배양 용기 중심관 내에서 CO₂를 흡수한 Na₂CO₃ 표본을 분석하여 총 CO₂ 생산물 및 방사능을 측정하여 CO₂의 SA를 계산하고 균등액 2 ml를 취하여 젖산 및 초성포도산을 정량하여 젖산의 이용률 및 초성포도산의 생산률을 계산하였다.

4. 화학 조작 및 방사능 측정

균등액의 젖산 정량에는 Barker 및 Summers¹⁹⁾의

Table 1. Concentration and specific activity of lactate in the incubation media

Group	Substrate	Medium	Volume	Conc. of lactate	SA of med. lactate
C ¹⁴ -1	C ¹⁴ -1-lactate	K-R-P	10 cc	50mg%	3.19×10 ⁴ cpm/mgC
C ¹⁴ -2	C ¹⁴ -2-lactate	K-R-P	10 cc	50mg%	3.18×10 ⁴ "
C ¹⁴ -3	C ¹⁴ -3-lactate	K-R-P	10 cc	50mg%	2.24×10 ⁴ "

방법, 초성포도산 정량에는 Friedmann 및 Haugen²⁰⁾의 방법을 사용하였다. 총 CO₂ 생산물 측정에는 배양 용기 중심관에 Na₂CO₃ 표본으로 흡수된 CO₂를 량적으로 BaCl₂와 작용시켜 Whatman No. 542 여지 위에 BaCO₃ 표본으로 침전시켜 건조시킨 다음 정확히 중량을 평량하여 이를 균등액내 조직, 무게, 배양 시간 및 BaCO₃의 분자량으로 제하여 $\mu\text{M/hr/gm}$ 로 표시하였고 CO₂내 방사능 측정은 BaCO₃ 표본을 직접 Geiger-Müller counter로 총계수를 측정한 다음 이를 BaCO₃ 내 탄소중량으로 제하여 호흡 CO₂의 SA를 결정하였다. 이 실험에서 얻은 방사능 측정치는 모두 자기흡수에 대한 교정을 가하여 비교 관찰하였다.

5. 계산방법

a. 젖산이용률 및 초성포도산 생산물 :

배양 전후의 조직 균등액내 젖산 및 초성포도산 농도를 정량하여 얻은 농도차에 배양균등액 용적을 승하고 조직 중량 및 배양 시간으로 제하여 $\mu\text{M/hr/gm}$ 로 표시하였다.

b. Relative Specific Activity (RSA)

총 CO₂ 생산물 및 호흡 CO₂의 SA 산출은 전술한 바와 같고 RSA는 호흡 CO₂ 및 배지 C¹⁴-젖산의 SA의 비율로 산출하였다. 각군의 RSA 값은 젖산의 각 탄소가 C¹⁴-표지 탄소가 같은 비율로 산화되었다고 가정할 때 젖산에서 유래된 CO₂ 생산물의 총 CO₂ 생산물에 대한 분률(fraction)을 의미한다.

c. 호흡 CO₂로의 비교 젖산 소실률

(Relative lactate disappearance rate into CO₂ : RLDco₂)

배지에서 소실된 C¹⁴-젖산의 호흡 CO₂로 완전 산화된 분률을 표시하며 다음과 같이 산출하였다.

$$\text{RLDco}_2 = \frac{\text{Total CO}_2 \text{ production rate} \times \text{RSA}}{\text{Lactate uptake rate} \times 3}$$

위식의 분자는 배지내 C¹⁴-젖산에서 유래된 CO₂ 발생률을 표시하며 1 분자의 젖산이 CO₂로 완전 산화되면 3 분자의 CO₂를 발생함으로 C¹⁴-젖산에서 유래된 CO₂ 발생률을 3으로 제하면 CO₂로 완전 산화된 젖산량을 산출하게 된다. 따라서 이 값과 젖산 흡수률과의 비율은 배지에서 흡수된 젖산의 호흡 CO₂로 완전 산화된 분률을 표시하게 된다.

d. 초성포도산으로의 비교 젖산 소실률

(Relative lactate disappearance rate into pyruvate: RLDpy)

초성포도산 발생이 모두 배지 C¹⁴-젖산에서 유래되었다고 가정하여 초성포도산 발생률과 젖산 흡수률과의 비율로 산출하였다. 이는 흡수된 젖산이 초성포도산으로 변화된 분률을 표시한다.

실험 성적

C¹⁴-1-젖산을 기질로 하여 복수 종양조직을 배양하였을 경우의 젖산의 분해 산화과정에 관한 성적을 제 2 표에 종합하였다.

C¹⁴-1-젖산의 SA는 모든 실험에서 3.19×10^4 cpm/mgC으로 일정하게 유지하고 젖산농도를 50 mg%로 유지하였을 때 젖산의 평균 흡수률은 $2.08 \mu\text{M/hr/gm}$ 이며 총 CO₂ 생산물은 $14.0 \mu\text{M/hr/gm}$ 였다. 이 경우에 호흡 CO₂의 SA는 평균 1.375×10^4 cpm/mgC의 값이었다. 따라서 배지 C¹⁴-1-젖산에서 산화된 CO₂의 총 CO₂ 생산물에 대한 분률 즉 RSA를 배지 C¹⁴-1-젖산 및 호흡 CO₂의 SA의 비율로 산출한 바 평균 43.1%의 값을 얻었다. C-1 실험군에서 산출한 RSA 값은 젖산의 C-1 탄소가 α 및 β 탄소가 같은 비율로 산화하였을 때의 값을 표시하므로 실제로 젖산의 C-1 탄소에서 유래된 CO₂의 RSA는 C¹⁴-1 실험군 RSA 값의 1/3이 된다. 즉 총 CO₂ 생산물의 14.4%가 된다.

Table 2. Metabolism of lactate-1-C¹⁴ by Ehrlich ascites tumor

Exp. No	Wt. of tissue	Lact. upt. rate	Pyruvate app. rate	Wt. of BaCO ₃	CMP	C-factor	S.A. of CO ₂	S.A. of medium	RSAco ₂	Total CO ₂ prod. R.	CO ₂ from C ¹⁴ -1-L	Equiv. amt. of lactate	RLD ₃	RLDpy
										$\mu\text{M/hr/g}$	$\mu\text{M/hr/g}$	mg	cpm/mgC	cpm/mgC
1	1,488	1.79	0.052	15.9	8,711	1.68	15,100	31,900	47.3	10.8	5.11	1.70	95.0	2.91
2	1,488	1.79	0.061	18.1	8,374	1.84	13,900	31,900	43.6	12.3	5.36	1.79	100.0	3.42
3	1,205	2.36	0.020	19.2	8,332	1.92	13,600	31,900	42.6	16.1	6.86	2.29	97.0	0.85
4	1,340	2.38	0.001	22.0	7,925	2.10	12,400	31,900	38.9	16.6	6.46	2.15	90.3	0.42
Mean		2.08	0.034				13,750	31,900	43.1	14.0	6.03	2.01	95.6	1.90

Table 3. Metabolism of lactate-2-C¹⁴ by Ehrlich ascites tumor

Exp. No.	Wt. of tissue	Lact. uptake rate	Pyruvate app. rate	Wt. of BaCO ₃	CPM	C-factor	S.A. of CO ₂	S.A. of medium	RSAco ₂	Total CO ₂ prod. R.	CO ₂ prod R. from C ¹⁴ -2-lactate	Lactate-equiv. alent	RLD ₃	RLDpy
	g	μM/hr/g	μM/hr/g	mg			cpm/mgC	cpm/mgC		%	μM/hr/g	μM/hr/g	μM/hr/g	%
1	1,488	1.62	0.052	18.1	191	1.84	318	31,750	1.00	12.3	0.12	0.040	2.47	3.26
2	1,488	2.09	0.101	19.2	189	1.92	310	31,750	0.98	13.1	0.13	0.043	2.06	4.84
3	1,340	2.47	0.001	25.1	708	2.30	1,062	31,750	3.34	19.1	0.64	0.213	8.62	0.41
4	1,340	2.36	0.004	25.5	741	2.33	1,110	31,750	3.50	19.3	0.67	0.223	9.45	1.62
Mean		2.14	0.040				700	31,750	2.20	15.9	0.35	0.117	5.47	2.54

젖산 각 탄소의 산화율이 C-1 탄소의 산화율과 같다고 가정하여 젖산에서 유래된 CO₂ 발생률을 환산하면 총 CO₂ 발생률의 43.1%인 6.03 μM/hr/gm 가 된다.

1분자의 젖산은 3분자의 CO₂를 발생하므로 젖산에서 유래된 CO₂ 발생량의 1/3의 값인 2.01 μM/hr/gm 가 호흡 CO₂로 산화된 젖산량이 된다. 따라서 흡수된 젖산이 호흡 CO₂로 완전 산화된 분율 즉 RLDco₂는 95.6%로 C-1 실험군에서는 거의 대부분의 흡수된 젖산이 호흡 CO₂로 완전 산화된 셈이 된다.

C-2 실험군 성적을 제 3 표에 종합하였다. 모든 실험에 있어서 배지 젖산의 농도를 50 mg%, SA 을 3.18 × 10⁴ cpm/mgC 로 유지한바 총 CO₂ 생산율은 평균 15.9 μM/hr/gm 로 C-1 실험군 값과 비등하였으나 호흡 CO₂의 SA 는 현저히 저하되어 평균 700 cpm/mgC 에 불과하고 RSA 값도 2.20%에 불과하였다. 여기에 젖산 각 탄소의 CO₂로의 산화율이 젖산의 C-2 탄소 즉 α 탄소의 산화율과 같다고 가정하면 젖산 α 탄소에서 기인된 CO₂는 총 CO₂ 생산율의 RSA 값의 1/3인 0.73%로 젖산의 C-2는 CO₂로의 산화과정에 관여하는 바가 적었다고 하겠다.

C-2 실험군에 있어서 배지에서 소실된 젖산이 호흡 CO₂로 산화된 분율 즉 RLDco₂는 평균 5.47%에 불과하였다. 이것은 나머지 대부분의 소실된 젖산이 CO₂ 이외의 다른 대사경로를 밟아 소실되었음을 가리킨다.

C-3 실험군에 있어서 C¹⁴-3-젖산의 SA 을 2.24 × 10⁴ cpm/mg C 으로 유지하고 C-1 및 C-2 실험군에서와 같은 젖산 농도를 유지한 실험성적 즉 β 탄소의 산화대사는 제 4 표에 보는 바와 같았다.

총 CO₂ 생산율은 평균 15.2 μM/hr/gm 로 C-1 및 C-2 실험군 값과 대동소이 하였으나 호흡 CO₂의 SA 는 평균 435 cpm/mgC 로 C-1 실험군의 값에 비하여 현저히 저하되었다. RSA 는 평균 1.95%로 C-2 군 값과 비등하였다. 따라서 RLD CO₂ 값도 5.00%로 C-2 군 값과 큰 차이를 볼 수 없었다.

젖산 각 탄소의 개별적인 산화 대사과정에 관한 실험성적을 토대로 하여 전체적인 젖산 대사를 분석하면 제 5 표에 종합한 바와 같다.

젖산 흡수율, 초성포도산 발생율 및 총 CO₂ 생산율은 각군에 있어서 비교적 일정하였고 각군의 평균값은 젖산 흡수율이 2.07 μM/hr/gm 및 총 CO₂ 생산율이 15.1 μM/hr/gm 을 보였다. 실험후 배지에 발생한 초성포도산으로 산화된 분율 (RLD py)은 평균 1.9%가 된다. 즉 젖산 ↔ 초성포도산 반응은 중앙조직에서 좌측으로 쉽게 진행되는 경향을 보여 주었다.

젖산 각 탄소의 호흡 CO₂로의 산화과정에 관여하는 분율은 제 5 표에 표지한 바와 같이 C-1 군에서 젖산의 C-1 탄소에 C¹⁴를 표지하였을 때 총 CO₂ 생산율의 43.1% (RSA)가 젖산에서 되었으므로 만약에 젖산의 각 탄

Table 4. Metabolism of Lactate-3-C¹⁴ by Ehrlich ascites tumor

Exp. No.	Wt. of tissue	Lact. uptake rate	Pyruvate app. rate	Wt. of BaCO ₃	CPM	C-factor	S.A. of CO ₂	S.A. of medium	RSAco ₂	Total CO ₂ prod. R.	CO ₂ prod R. from C ¹⁴ -3-lactate	Lactate-equiv. alent	RLD ₃	RLDpy
	g	μM/hr/g	μM/hr/g	mg			cpm/mgC	cpm/mgC		%	μM/hr/g	μM/hr/g	μM/hr/g	%
1	1,488	1.49	0.076	17.2	249	1.77	438	22,400	1.96	11.7	0.23	0.077	5.16	5.10
2	1,488	1.97	0.092	18.2	250	1.85	418	22,400	1.87	12.4	0.23	0.077	3.91	4.66
3	1,340	2.41	0.005	24.5	294	2.27	446	22,400	1.99	18.5	0.36	0.120	4.98	0.21
4	1,340	2.14	0.004	24.1	288	2.24	438	22,400	1.96	18.3	0.36	0.120	5.61	0.19
Mean		2.00	0.044				435	22,400	1.95	1.52	0.30	0.10	5.90	2.54

Table 5. Over-all metabolism of lactate by Ehrlich ascites tumor

Group	Substrate	Lactate uptake rate	Pyruvate app. rate	Total CO ₂ prod. rate	R S A			CO ₂ derived from lactate	Lactate equivalent	RLDco ₂	RLDpy	RLD total
					over-all	each carbon	total					
		μM/hr/gm	μM/hr/gm	μM/hr/gm	%	%	%	μM/hr/gm	μM/hr/gm	%	%	%
C-1	C ¹⁴ -1-L	2.08	0.034	14.0	43.1	14.4	15.8	2.20	0.734	35.2	1.64	36.84
C-2	C ¹⁴ -2-L	2.14	0.040	16.0	2.21	0.74	15.8	2.52	0.840	39.2	1.87	41.07
C-3	C ¹⁴ -3-L	2.00	0.044	15.2	1.95	0.65	15.8	2.40	0.800	40.0	2.20	42.20
Mean		2.07	0.039	15.1	-	-	15.8	2.38	0.793	38.3	1.90	40.00

소가 C-1 탄소와 같은 비율로 산화를 하여 CO₂로 분해된다고 가정하면 C-1 탄소로부터 유래된 CO₂는 RSA 값의 1/3 인 14.4%가 된다. 같은 원리로 C-2 군에서 젖산의 C-2 탄소에서 유래된 CO₂는 총 CO₂ 생산율의 평균 0.74%가 되고 C-3 군에서 β 탄소에서 유래된 CO₂는 0.65%가 되므로 총체적으로 관찰하면 젖산에서 유래된 CO₂는 CO₂ 생산율의 평균 15.8% 즉 각 탄소의 RSA 값의 합계가 된다. 따라서 종양 조직에 있어서 젖산으로부터의 CO₂ 생산율은 총 CO₂ 생산율의 15.8%인 2.38 μM/hr/mg 을 산출할 수 있으며 이를 젖산량으로 환산하면 평균 0.793 μM/hr/gm 가 된다. 평균 젖산 흡수율과 CO₂로 산화된 젖산량과의 비율로 RLDco₂를 산출한바 평균 38.3%의 값을 얻었다. 이 실험에서는 흡수된 젖산의 38.3%가 호흡 CO₂로, 평균 1.9%가 초성포도산으로 분해되었음을 밝힐 수 있었으나 나머지 60%의 흡수된 젖산의 운명에 대하여는 설명할 수 없었다. 젖산의 α 및 β 탄소의 RSA 값이 C-1 탄소의 RSA 값에 비하여 무시할 정도로 적은 값을 보이지만 서로 비등한 점으로 보아 종양조직의 당류 대사과정에 있어서 해당으로 인하여 생산된 3 탄화합물은 oxidative decarboxylation 을 입어서 탄산기 탄소는 쉽게 호흡 CO₂로 산화할 수 있으나 나머지 2 탄화합물의 분해과정은 억제되어 TCA cycle 과 같은 산화경로를 밟지 못하고 지방산 또는 단백질로 합성되면서 종양조직 대사에 관여하여 증식을 초래하는 인상을 받았다.

고 찰

본 실험에서 얻은 성적은 각군의 배양 실험에서 배양 조직과 배지 젖산과 완전히 평형되어 항정상태(steady state)에서의 대사과정이 이루어졌다고 가정하고 분석한 것이다. 실지로 배양 초기에는 배지 C¹⁴-젖산과 조직 효소계와 평형상태에 도달하기 전에 조직내에 이미 존재하던 지방산성 젖산 또는 CO₂로 인하여 C¹⁴-젖산에서 유래된 C¹⁴O₂가 회색되어 배지 젖산 및 호흡 C¹⁴O₂의 SA 가 실지의 값보다 저하되고 시간경과에 따라 조직내

에 이미 존재하던 물질이 씻기어 나오면(washout) 배양 배지 C¹⁴-젖산과 평형되어 일정한 C¹⁴O₂의 발생율을 보이게 된다. 즉 항정상태 대사물을 보이기까지 정상조직에서 약 1~2 시간^{21, 22)}을 요하므로 본 실험에서 얻은 3 시간 후의 호흡 CO₂의 SA 값은 배양 초기의 회색 인자 때문에 실지의 값보다 낮은 값이 예상되지만 각군의 실험조건이 같으므로 이러한 인자로 인한 오차를 무시하고 비교 관찰하였다.

종양조직의 젖산 흡수율은 평균 2.07 μM/hr/gm 로 고등¹³⁾이 정상조직에서 측정된 값 즉 간장에서 12.8, 신장에서 17.8, 대뇌조직에서 22.7 μM/hr/gm 의 값의 1/5~1/10 에 불과하지만 종양조직에서 젖산이 어느 정도는 이용됨을 말한다. 일반적으로 알려진 종양조직내 젖산 축적은 젖산 분해가 전혀 불가능하므로 발생하는 현상이라기보다 이등⁶⁾의 실험 성적을 참작할 때 무기성 해당경로로 인한 젖산 축적물이 젖산 분해물보다 크므로 젖산 축적을 초래한다고 생각함이 타당할 것이다. 실지로 본 실험에서 보는 바와 같이 포도당이 없는 비교적 고농도의 젖산 기질에 종양조직을 배양하였을 때 정상조직보다 값은 낮지만 상당한 량의 젖산이 이용되었고 종양조직의 산화과정에 있어서도 총산화 에너지의 약 40%가 젖산에서 유래되었다는 점으로 보아 젖산이 종양조직에서 정상 조직에서와 같이 주요한 에너지원으로 작용함은 의심할 바 없다.

종양조직에서 젖산의 산화경로를 분석하기 위하여 젖산의 각 탄소에 따라 C¹⁴로 표지한 젖산 기질과 배양한 바 제 5 표에서 보는 바와 같이 젖산의 C-1 탄소 즉 탄산기 탄소에서 유래되는 CO₂ 발생률이 젖산의 C-2 및 C-3 탄소 즉 α 및 β 탄소의 값에 비하여 월등히 큰 값을 보였다.

이러한 차이는 젖산과 같은 3 탄화합물이 TCA cycle 의 중간 대사물질인 fumarate 또는 succinate 와 같은 4 탄화합물과의 가역적 반응이 일반 생체 조직에서 비교적 빨리 진행할 수 있다는 점²⁴⁾ 즉 C¹⁴-C-C+CO₂ ↔ C¹⁴-C-C-C → C¹⁴O₂+C-C-C 반응으로 젖산의 C-1 에 있던 C¹⁴가 교체되면서 가역적으로 분해되어 C¹⁴O₂

을 발생하고 비방사성 젖산을 유리하기 때문에 젖산의 C-1이 호흡 CO₂ 발생에 더 많이 관여할 기회를 갖게 될 가능성을 생각할 수 있으나 실제로 α 및 β 탄소의 CO₂ 발생률이 무시할 정도로 작은 점으로 볼 때 종양조직에서는 TCA cycle 을 밟는 산화경로가 현저히 억제되었음을 의미함으로 이상과 같이 TCA cycle 의 중간 대사물질들 가역적인 반응으로 젖산의 C-1 탄소의 CO₂ 발생률이 증가한다는 설명은 부적당하며 증가률이 극히 일부에 지나지 않을 것이다. 다음 가능성으로서는 제 1도에 도시한 바와 같이 젖산에서 산화된 pyruvate 는 다음 반응으로서 C-1 탄소가 우선 oxidative decarboxylation 을 입어 CO₂ 를 발생하고 나머지 non carboxyl 탄소로 구성된 acetyl CoA 는 대부분이 TCA cycle 을 통하지 않고 지방산 또는 아미노산으로 합성되어 조직증식의 대사과정에 관여한다고 설명할 수 있다.

α 및 β 탄소에서 CO₂ 발생률은 총 CO₂ 생산물의 0.74 및 0.65 % 로 서로 비등하였고 평균 약 0.7 % 에 불과하였다. 즉 non carboxyl 탄소에서 기인된 CO₂ 는 TCA cycle 을 밟아 유래되었다고 가정하면 TCA cycle 을 통하여 유리되는 산화 에너지는 젖산에서 유리되는 총 산화에너지의 4.4 % 이며 나머지 95 % 이상의 산화 에너지는 젖산 중간대사 과정에서 C-1 탄소가 oxidative decarboxylation 을 입을 때 유리됨을 가리킨다. 젖산의 C-1 탄소가 우선적으로 산화되고 나머지 2 탄화합물이 TCA cycle 을 통하여 계속 산화되지 않고 대부분이 다른 물질로 합성된다는 사실(Fig. 1 참조)은 C¹⁴- 초산염을 주입한 후 종양조직에서 TCA cycle 의 중간 대사물질

인 succinate 를 추출하여 방사능을 측정하여 정상조직 값과 비교한 바 종양조직에서 C¹⁴-의 생합성이 무시할 정도로 낮은 값을 보인다는 Busch 등^{25,26}의 실험성적으로 보아 2 탄화합물의 TCA cycle 을 통한 이용률이 억제된다고 하겠다.

이등⁶⁾은 종양 조직 당류 대사경로에 관한 실험에 있어서 산화과정은 90 % 이상이 HMP 와 같은 포도당의 C-1 탄소가 우선적으로 CO₂로 산화되는 경로를 밟아 분해되고 기본적인 당류 대사경로인 EMP-TCA cycle 을 통한 경로는 현저히 억제됨을 밝혔다. 젖산의 C-1, C-2 및 C-3 탄소는 포도당의 C-3 및 C-4 탄소, C-2 및 C-5 탄소 및 C-1 및 C-6 탄소에 해당하므로 젖산→포도당의 가역적인 합성 반응이 진행된다고 가정하면 C-3 실험군에서 젖산이 포도당으로 합성이 되면 포도당의 C-1 및 C-6 탄소에 표시되고 포도당의 C-1 탄소는 이등⁶⁾의 실험성적으로 보아 쉽게 HMP 경로를 밟아 CO₂로 산화될 수 있으므로 C-3 실험군의 RSA 값은 증가될 가능성을 예상하겠으나 실제로 C-2 실험군 값과 별로 차이가 없고 낮은 값을 보이는 것은 종양조직에서는 젖산→포도당→당원질과 같은 탄수화물 합성과 정도 현저히 억제되는 때문이라고 하겠다.

이상 논의한 바와 같이 종양조직에 있어서 젖산의 대사경로를 종합하여 고찰하면 제 1도에 표시한 바와 같이 정상적으로 젖산의 C-1 탄소는 쉽게 oxidative decarboxylation 을 입어 CO₂를 발생하지만 나머지 2 탄화합물의 산화는 현저히 억제되고 다른 기질로 변화하여 조직증식에 따르는 합성과정에 관여하는 것 같이 추측되나 이 실험에서 완전히 밝힐 수는 없었다.

결 론

에르리트히 복수 종양의 조직 균등액을 C¹⁴-1-젖산, C¹⁴-2-젖산 및 C¹⁴-3-젖산 배지에 배양하여 젖산 각 탄소의 호흡 탄산가스로의 산화과정을 개별적으로 측정하고 종양조직에 있어서 젖산의 대사경로를 분석하여 다음과 같은 성적을 얻었다.

1. 젖산 흡수률은 평균 2.07 μM/hr/gm, 초성포도당 발생률은 0.039 μM/hr/gm, 총탄산가스 생산물은 15.1 μM/hr/gm 로 비교적 일정한 값을 보였다.

2. 젖산 각 탄소의 호흡 탄산가스로의 산화과정을 보면 C-1 실험군에서 총 탄산가스 생산물의 평균 43.1 % 가 젖산에서 유래되었고 C-2 실험군에서 평균 2.21 %, C-3 실험군에서 평균 1.95 % 의 값을 보였다. 이상의 RSA 값은 젖산의 각 탄소가 동물 산화를 한다고 가정하였을 때의 값이므로 젖산 각 탄소의 호흡 탄산가스 산화된 분율을 자군의 RSA 값을 3으로 제하여 산출한

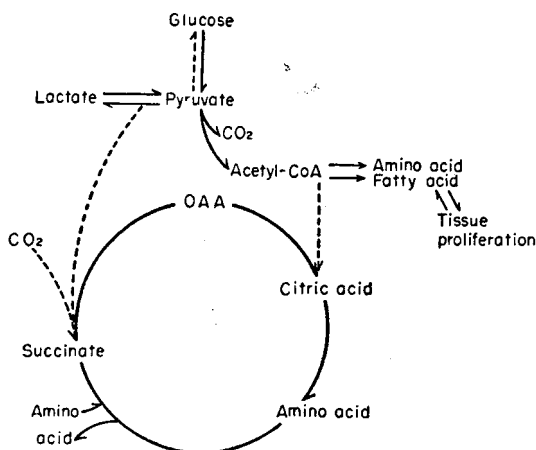


Fig. 1. Catabolic pathway of lactate in the Ehrlich ascites tumor.

— actual catabolic oxidative pathway
 inhibited pathway

바 젖산의 C-1 탄소 즉 탄산기 탄소에서 유래된 탄산가스는 총 탄산가스 생산물의 14.4%이며 α 탄소에서 0.74%, β 탄소에서 0.65%의 값을 얻었다. 따라서 젖산 각 탄소에서 유래되는 탄산가스 발생물의 합계는 총 탄산가스 생산물의 15.8%임을 산출하였다. 즉 종양조직에서 유리되는 산화에너지의 15.8%는 젖산이 관여한 셈이 되므로 젖산이 종양조직에서 주요한 에너지원의 하나임을 지적할 수 있었다.

3. 흡수된 젖산이 호흡 탄산가스 및 초성포도산으로 분해된 분률 즉 RLD_{CO₂} 및 RLD_{py}를 산출학 바 흡수된 젖산의 평균 38.3%가 호흡 탄산가스로, 평균 1.9%가 초성포도산으로 분해되었음을 산출하였다.

ABSTRACT

Catabolic Pathway of Oxidative Metabolism of Carbon Atoms of Lactate in Ehrlich Ascites Tumor

Ill Soon Moon, M.D. and Sang Don Rhee, M.D.

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

(Director: Prof. Kee Yong Nam, M.D.)

Metabolic pathway of carbon atoms of lactate in the Ehrlich ascites tumor tissue homogenate was observed in mice by means of labeled lactate. Tumor tissue homogenates were incubated in medium containing either one of C¹⁴-1, C¹⁴-2, or C¹⁴-3-lactate. Lactate concentration in incubation medium was maintained at 50 mg%. At the end of incubation period, gas sample and incubation medium were analyzed for total CO₂ production rate, radio-activities of respiratory CO₂ produced, lactate uptake rate and pyruvate appearance rate. The following results were obtained.

1. Mean value of lactate uptake rate was 2.07 μ M/hr/gm and pyruvate appearance rate was 0.039 μ M/hr/gm. The mean value of total CO₂ production rate was 15.1 μ M/hr/gm. These values showed no difference regardless of the shift of labeling position of lactate carbon atom.

2. Respiratory C¹⁴O₂ yield from C¹⁴-1-lactate incubation medium was 14.4% of the total CO₂ production rate and this proportion was larger than that of from C¹⁴-2 and C¹⁴-3-lactate media. C¹⁴O₂ yield from C¹⁴-2 and C¹⁴-3-lactate media were 0.74 and 0.65% of the

total CO₂ production rate, respectively. This shows that carboxyl carbon of lactate contributes a larger proportion in producing respiratory CO₂ than α and β carbons of lactate.

3. The fraction of disappeared lactate from incubation medium into respiratory CO₂ was expressed as relative lactate disappearance rate into CO₂ (RLD_{CO₂}) and was averaged 38.3%. Relative lactate disappearance rate into pyruvate (RLD_{py}) was 1.9%. Therefore, about 40% of disappeared lactate were accounted for by the conversion into respiratory CO₂ and pyruvate.

It is concluded that in the catabolic pathway of lactate in ascites tumor tissue CO₂ was easily produced from carboxyl carbon of lactate by oxidative decarboxylation as in the normal tissue, and further oxidation of 2 carbon unit via the TCA cycle was remarkably inhibited. On the other hand, from the fact there are little differences in C¹⁴O₂ yield between C¹⁴-2 and C¹⁴-3-lactate medium group, it is reasonable to assume that carbohydrate synthesis was also inhibited in the ascites tumor tissue. Possible explanations for these effects were briefly discussed.

REFERENCES

- 1) Krebs, H.: *Advance in Enzymol.*, 3:191, 1943.
- 2) Krebs, H.A. In, Greenberg, D.M.: *Chemical pathway of metabolism. New York, Acad. Press. 1954, Vol. 1, p 109.*
- 3) Racker, E.: *Advance in Enzymol.*, 15:141, 1954.
- 4) Bloom, B., Stetten, M.R. and Stetten, D.: *Evaluation of catabolic pathways of glucose in mammalian system. J. Biol. Chem.*, 204:681, 1954.
- 5) 林淳朝: 토끼 각 조직에 있어서 C¹⁴-포도당의 산화 대사 경로에 관한 실험. 서울의대잡지, 5:187, 1964.
- 6) 李華錫: 고온 및 한냉 환경이 흰쥐 C¹⁴-포도당대사에 미치는 영향. 서울의대잡지, 6:75, 1965.
- 7) Warburg, O.: *On the origin of cancer cells. Science*, 123:309-314, 1956.
- 8) Warburg, O., Posener, K. and Negelein, E.: *Über den stoffwechsel der Carcinomzelle. Biochem. Z.* 152:309-344, 1924.
- 9) Warburg, O., Wind, F. and Negelein, E.: *Über den Stoffwechsel von Tumoren im Körper. Klin. Wochschr.*, 5:829-832, 1926.

- 10) Greenstein, J.P.: "Biochemistry of Cancer". New York, Academic Press, 1954.
- 11) Cori, C. F. and Cori, G. T.: *The carbohydrate metabolism of tumors. II. Changes in the sugar, lactic acid and CO₂-combining power of blood passing through a tumor.* J. Biol. Chem., 65: 397-405, 1925.
- 12) LePage, G.A.: *Glycolysis in tumor homogenates.* J. Biol. Chem., 176:1009-1020, 1948.
- 13) LePage, G.A.: *A comparison of tumors and normal tissues with respect to factors affecting the rate of anaerobic glycolysis.* Cancer Research, 10:77-88, 1950.
- 14) Busch, H., Fujiwara, E. and Keer, L. M.: *Metabolic patterns for glucose-1-C¹⁴ in tissues of tumor-bearing rats.* Cancer Research, 20:50-57, 1960.
- 15) Busch, H.: *Studies on the metabolism of acetate-1-C¹⁴ in tissues of tumor-bearing rats.* Cancer Research, 13:789-794, 1953.
- 16) Busch, H., Hurlbert, R.B. and Potter, V.R.: *Anion exchange chromatography of acids of the citric acid cycle.* J. Biol. Chem., 196:717-727, 1952.
- 17) Nyhan, W.L. and Busch, H.: *Metabolic patterns for L-glutamate-U-C¹⁴ in slices of tumors and other tissues.* Cancer Research, 16:227-234, 1957.
- 18) Van Slyke, D.O. and Folch, J.: *Manometric carbonedetermination.* J. Biol. Chem. 136:509, 1940.
- 19) Barker, S.B. and Summerson, W.H.: *Colorimetric determination of lactic acid in biological material.* J. Biol. Chem., 138:535, 1941.
- 20) 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.
- 21) Cecil, L.A., Gainer, H. and Chaikoff, I.L.: *Method for kinetic study of in vitro conversion of C¹⁴-labeled substrate to CO₂.* J. Appl. Physiol., 15:949, 1960.
- 22) Lee, Ung Sup: *Kinetics of Oxidative and non Oxidative Metabolism of C¹⁴-labeled pyruvate in liver slices of normal rats.* Seoul J. Med., 3: 349, 1962.
- 23) 高澤容: 가토 각 조직의 C¹⁴-젖산 산화과정에 관한 실험, 대한산부인과학회지, 8:339, 1965.
- 24) 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.
- 25) Busch, H. and Baltrush, H.A.: *Rates of Metabolism of acetate-1-C¹⁴ in vivo.* Cancer Research, 14:448-455, 1954.
- 26) Busch, H. and Potter, V.R.: *Studies on tissue metabolism by means of in vivo metabolic blocking techniques. II. Metabolism of acetate-1-C¹⁴ in malonate-treated rats.* Cancer Research, 13: 168-173, 1953.