

白鼠顎下腺 및 췌臟에 있어서 抗生劑가 Isoproterenol-stimulated DNA 合成에 미치는 影響

서울대학교 齒科大學 口腔解剖學敎室

(指導 劉 鍾 德 敎授)

韓 章 述

EFFECT OF ANTIBIOTICS ON ISOPROTERENOL-STIMULATED DNA SYNTHESIS IN THE SUBMAXILLARY GLAND AND PANCREAS OF MICE

Jang Sool Han, D.D.S.

Dept. of Oral Anatomy, College of Dentistry, Seoul National University.

<Director: Chong Duck Yoo, D.D.S., Ph.D.>

.....> Abstract <.....

Eighty male mice weighing approximately 20 grams were utilized in this study. Four groups were consisted of; 1) Isoproterenol alone, 2) Isoproterenol plus cycloheximide, 3) Isoproterenol plus puromycin, 4) Control.

The cycloheximide (0.03mg/g of body weight) and puromycin (50 μ g/g of body weight) were given 1 hour, or 2 hours, or 5 hours, or 8 hours, or 14 hours after isoproterenol (40mg/kg of body weight).

The animals were killed at 24 hours after antibiotics.

The present studies were undertaken to assess the effects of antibiotics treatment on the isoproterenol-stimulated DNA synthesis in mice submaxillary gland and pancreas.

The results were as follows;

- 1) The submaxillary gland weights showed a significant increase after isoproterenol alone, while the pancreas weights was not changed.
- 2) Following administration of the isoproterenol plus antibiotics, weights of submaxillary gland and pancreas were decreased compared with control.
- 3) Both cycloheximide and puromycin in the submaxillary gland are most effective in inhibiting isoproterenol-stimulated DNA synthesis when given 2 hours and 1 hour after the isoproterenol respectively.
- 4) The effect of antibiotics on the isoproterenol-stimulated DNA synthesis in the pancreas has no effect on the subsequent onset of DNA synthesis.

5) The results indicate that isoproterenol causes an early stimulation of protein synthesis in mouse salivary gland and that this stimulation is relevant to the subsequent onset of DNA synthesis.

I. 緒 論

Isoproterenol은 白鼠唾液腺의 DNA合成에 刺戟하고,^{1,2,3)} Cycloheximide와 Puromycin은 抗癌劑의 하나로서 蛋白 및 核酸의 合成을 抑制한다는 것은 이미 잘 알려진 事實이다.^{21,22)}

Isoproterenol을 白鼠에 注射하면, 注射後 24時間 以內에 唾液腺의 DNA 合成의 增加를 찾아온다고 하였고²⁾, 또 抗癌劑가 Isoproterenol-stimulated DNA 合成에 影響을 미친다고 하였다⁴⁾.

Isoproterenol은 DNA合成에 關係되는 Deoxythymidine kinase와 DNA Polymerase의 增加를 찾아온다고 하였고⁶⁾, Isoproterenol은 注射後 12~18時間에 Nuclear RNA 合成이 增加된다고 하였고⁶⁾, Isoproterenol을 長期間投與하면 顎下腺 및 心臟의 RNA含有量이 增加된다고 하였다⁷⁾.

Actinomycin D도 Isoproterenol-stimulated DNA 合成에 銳敏한 反應을 보인다고 하였다⁸⁾. 이 實驗은 抗癌劑⁹⁾或은 抗癌劑의 하나인 Cycloheximide 및 Puromycin이 白鼠顎下腺과 脾臟의 Isoproterenol-Stimulated DNA 合成에 어떠한 影響을 미치는가를 調査한 것이고, 其 結果를 여기에 報告하는 바이다.

II. 實驗材料 및 方法

1) 實驗動物 :

實驗動物은 體重 20g 內外의 雄性白鼠 80頭를 使用하였고, 80頭中 Isoproterenol+Cycloheximide 群에 20頭, Isoproterenol+Puromycin群에 20頭, Isoproterenol 單獨注射群에 20頭, 對照群에 20頭씩 各各 配定하였다.

各群의 20頭는 다시 Isoproterenol 注射後 抗癌劑의 投與時間(1時間, 2時間, 5時間, 8時間, 14時間)에 따라서 各各 4頭씩 配當하였다.

2) 研究方法 :

Isoproterenol은 體重 kg當 40mg을 投與하고, Isoproterenol 注射後 1時間, 2時間, 5時間, 8時間 및 14時間 때마다 Cycloheximide는 體重 g當 0.03mg, Puromycin은 體重 g當 50 μ g을 各各 注射하였다. 그리고

모두 抗癌劑를 注射한後 24時間에 動物을 犠牲시켰다. 體重을 測定하고, Ether로 麻酔한 後 顎下腺과 脾臟을 떼어냈고, 또 이들의 重量을 測定한 後 組織을 冷凍시켰다.

여기서 얻은 數値의 統計的處理로는 算術平均(M), 標準偏差(S.D.), 有意性檢査(Student "T" Test) 및 百分比(%)를 各各 求하였다.

3) 核酸의 抽出方法 :

核酸의 抽出方法은 Volkin 및 Cohn(1954)¹⁹⁾의 方法에 依하였고, 冷凍된 新鮮組織을 T.C.A. 溶液에다 넣어 均質化한 後 이를 다시 10% T.C.A. 溶液과 混合하여 遠心分離하였다. 여기서 酸溶性획분은 뜨고, 남어지 沈澱된 것을 90% Ethanol, 98% Ethanol, Ethanol-Ether(3:1) 混液 및 Ether의 順位로 洗滌하였다. 그러면 Alcohol 可溶性획분은 뜨고, 남어지는 沈澱되는데 沈澱된 것을 다시 1 N NaOH로 37°C에서 20時間 遠心分離하고, Glacial Acetic Acid로 PH 4가 되도록 調整한다. 30時間 冷藏庫에 保管하였다가 遠心分離하고, 여기서 沈澱된 것을 5% T.C.A.로 90°C에서 15時間 遠心分離하여 DNA획분을 얻었다.

4) DNA획분의 Phosphorus定量 :

Fiske-Subbarow法(1925)²⁰⁾에 依하였고, DNA 분획 1 ml를 取하여 小型 kjeldahl用酸化管에 넣고, 5 N H₂SO₄ 1 ml를 加하여 130~160°C의 溫度를 維持하면서 酸化臺위에서 加熱, 內容液이 黑變하고, 白煙이 날때 까지 冷却시킨다. 6% H₂O₂ 1滴을 떨어뜨리고, 繼續 加熱하여 液內溶液이 透明無色할 때까지 濕性灰한 다음 少量의 蒸留水를 加하여 沸¹⁾ 溶液에서 10時間 加熱하였다. 이 內容液을 10ml Mess Cylinder에 定量的으로 옮기고, 2.5% Ammonium Molybdate溶液 1 ml 및 環元試藥(1, 2, 4-Aminonaphthosulfonic Acid Reagent) 0.1ml를 加하여 混合하고, 여기서 蒸留水를 넣어 10ml가 되도록 한 後10分 後에 Spectrophotometer(B & L Spectronic 20)를 使用하여 波長 660 m μ 에서 比色하여 測定하였다.

濃度計算은 다음 方法에 依하였다.

Concentration of unknown =

$$\frac{\text{Density of unknown} \times \text{Concentration of standard}}{\text{Density of standard}}$$

Table 1 Changes of the Mice Submaxillary Gland Weights Injected with Isoproterenol Alone and Isoproterenol plus Antibiotics (mg)

	Time of Administration of Antibiotics After Isoproterenol				
	1 hr	2 hrs	5 hrs	8 hrs	14 hrs
	Mean ± (S.D.)	Mean ± (S.D.)	Mean ± (S.D.)	Mean ± (S.D.)	Mean ± (S.D.)
Isoproterenol + Cycloheximide	51.3(3.4)	49.8(4.7)	52.4(7.4)	56.6(3.7)	53.4(7.0)
Isoproterenol + Puromycin	50.6(4.8)	48.7(3.6)	51.9(5.6)	54.7(4.1)	54.2(4.8)
Isoproterenol only	63.4(7.6)	70.6(5.3)	68.1(7.8)	64.8(3.7)	61.5(6.1)
Control	54.2(4.1)	58.3(6.2)	53.8(6.1)	60.1(5.8)	57.6(5.9)

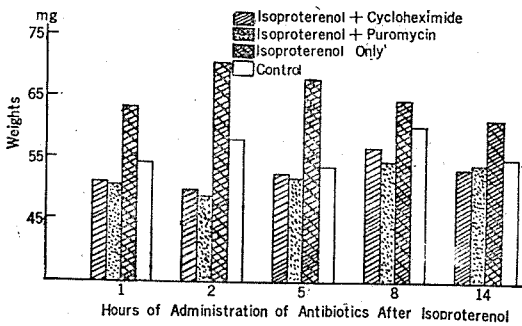


Fig. 1 Changes of the Mice Submaxillary Gland Weights Injected with Isoproterenol Alone and Isoproterenol plus Antibiotics.

Table 2 Changes of the Mice Pancreas Weights Injected with Isoproterenol Alone and Isoproterenol plus Antibiotics (mg)

	Time of Administration of Antibiotics After Isoproterenol				
	1 hr	2 hrs	5 hrs	8 hrs	14 hrs
	Mean ± (S.D.)	Mean ± (S.D.)	Mean ± (S.D.)	Mean ± (S.D.)	Mean ± (S.D.)
Isoproterenol + Cycloheximide	219.8(18.3)	221.3(26.3)	218.6(18.7)	220.1(16.8)	221.1(18.1)
Isoproterenol + Puromycin	220.6(21.3)	218.9(19.8)	219.4(20.3)	218.8(24.7)	217.9(19.8)
Isoproterenol only	230.3(19.6)	238.8(23.6)	225.6(24.8)	231.6(21.2)	228.9(23.6)
Control	233.6(23.1)	236.7(27.1)	231.3(21.6)	229.8(23.4)	230.6(21.9)

고, Isoproterenol + Cycloheximide 와 Isoproterenol + Puromycin 은 全期間을 통하여 對照群보다 낮은 數値를 보였다.

3) 顎下腺에 있어서 抗生劑가 Isoproterenol-stimulated DNA 合成에 미치는 影響:

第3表 및 第3圖에서 보는 바와 같이 Isoproterenol 單獨注射時에는 DNA 合成이 對照群보다 增加하였고, 특히 注射後 2時間과 5時間에 있어서 가장 높았고, Isop-

Ⅲ. 實驗成績

1) Isoproterenol 및 Isoproterenol + 抗生劑가 顎下腺重量에 미치는 影響:

第1表 및 第1圖에서 보는 바와 같이 顎下腺重量은 Isoproterenol 單獨注射時에는 全期間을 통하여 對照群보다 增加하였고, Isoproterenol + Cycloheximide 및 Isoproterenol + Puromycin 에는 全期間을 통하여 對照群보다 낮은 數値를 보였다.

2) Isoproterenol 및 Isoproterenol + 抗生劑가 胰臟重量에 미치는 影響:

第2表 및 第2圖에서 보는 바와 같이 胰臟重量은 Isoproterenol 單獨注射時에는 對照群과 別로 差異가 없었

roterenol + Cycloheximide 는 Isoproterenol 注射後 2 時間에 있어서 가장 影響을 주었고, Isoproterenol + Puromycin 은 Isoproterenol 注射後 1 時間에 있어서 가장 影響을 주었다.

4) 胰臟에 있어서 抗生劑가 Isoproterenol-stimulated DNA 合成에 미치는 影響:

第3表 및 第4圖에서 보는 바와 같이 Isoproterenol 單獨注射時에는 DNA 合成에 影響을 주지 않았고, Isop-

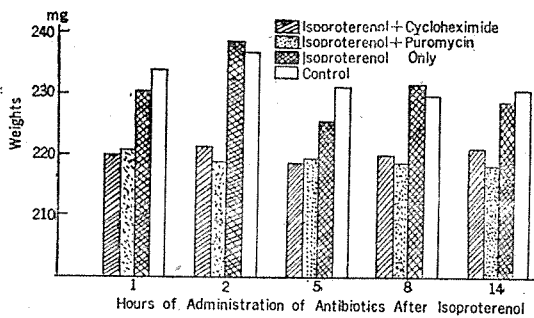


Fig. 2 Changes of the Mice Pancreas Weights Injected with Isoproterenol Alone and Isoproterenol plus Antibiotics.

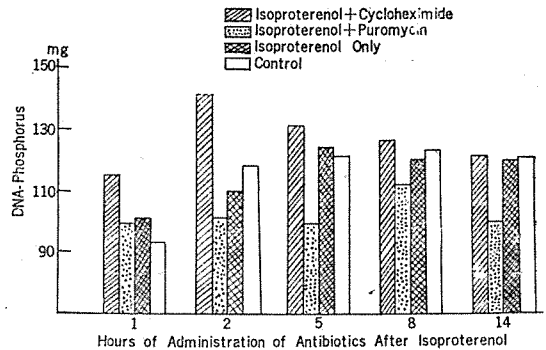


Fig. 3 Effect of Antibiotics on Isoproterenol-stimulated DNA Synthesis in the Mice Submaxillary Gland.

Table 3 Effect of Antibiotics on Isoproterenol-stimulated DNA Synthesis in the Submaxillary Gland and Pancreas of Mice (DNA-Phosphorus Content $\times 10^{-3}$ mg)

		Time of Administration of Antibiotics after Isoproterenol									
		1 hr		2 hrs		5 hrs		8 hrs		14 hrs	
		Mean \pm (S.D.)	% of Control	Mean \pm (S.D.)	% of Control	Mean \pm (S.D.)	% of Control	Mean \pm (S.D.)	% of Control	Mean \pm (S.D.)	% of Control
Submaxillary gland	Isoproterenol + Cycloheximide	101.1(5.6)	102.0	119.1(8.9)	118.2	124.9(8.8)	125.8	120.2(10.2)	107.2	119.8(9.3)	120.2
	Isoproterenol + Puromycin	93.1(4.1)	94.9	118.9(6.3)	118.0	121.2(9.2)	122.1	123.3(11.6)	109.6	120.7(7.9)	122.2
	Isoproterenol Alone	115.4(7.6)	103.5	141.3(5.8)	130.3	131.1(10.3)	132.1	125.6(9.7)	112.6	121.1(8.3)	121.4
	Control	98.1(5.3)	100	100.7(7.2)	100	99.2(8.3)	100	112.1(10.2)	100	99.6(10.1)	100
Pancreas	Isoproterenol + Cycloheximide	74.3(3.9)	84.4	79.4(3.8)	85.2	83.9(6.9)	87.9	89.7(8.6)	95.7	94.2(9.1)	101.9
	Isoproterenol + Puromycin	76.2(4.8)	86.4	78.1(2.3)	83.8	81.9(7.2)	85.8	85.3(9.0)	90.9	88.6(7.3)	95.8
	Isoproterenol Alone	93.4(8.3)	95.6	95.6(4.7)	102.6	97.7(5.8)	102.4	91.2(8.6)	97.3	89.8(6.9)	97.1
	Control	88.1(7.1)	100	93.1(4.2)	100	95.4(7.3)	100	93.7(9.2)	100	92.4(8.7)	100

* EACH POINT REPRESENTS THE MEAN (STANDARD DEVIATION) OF FOUR MICE.

Mean: $\times 10^{-3}$ mg/100mg of dry delipidated tissue.

Standard deviation: $\times 10^{-3}$

roterenol+Cycloheximide와 Isoproterenol+Puromycin은 全期間을 통하여 Isoproterenol 單獨注射, 對照群보다 낮은 數值이고, 모두 Isoproterenol 注射後 1時間이 가장 낮은 數值이고, 其以後부터는 DNA 合成이 漸次的으로 增加하였다.

IV. 總括 및 考察

Isoproterenol이 唾液腺의 重量, 肥大, DNA 合成의 刺戟에 關한 研究는 많으나, 抗生劑가 腺細胞의 Isopro-

terenol-stimulated DNA 合成에 미치는 影響에 關한 報告는 極히 드물다.

本實驗의 結果를 要約하면, Isoproterenol 單獨注射時에는 顎下腺의 重量은 增加하나, 腺臟에는 變動이 없었고, 顎下腺에 있어서 Isoproterenol+Cycloheximide는 Isoproterenol 注射後 2時間에 있어서 DNA 合成에 抑制的作用이 甚하였고, Isoproterenol+Puromycin은 Isoproterenol 注射後 1時間에 있어서 DNA 合成의 抑制的作用이 뚜렷하였다.

腺臟에 있어서 Isoproterenol+Cycloheximide와 Is-

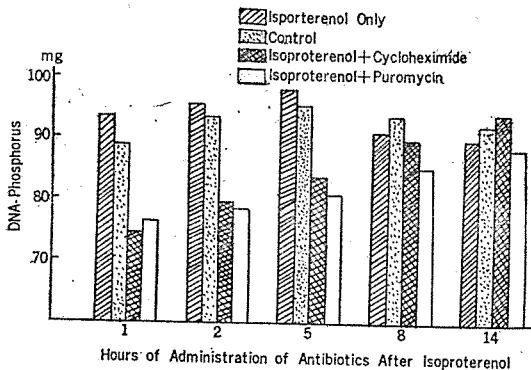


Fig. 4 Effect of Antibiotics on Isoproterenol-stimulated DNA Synthesis in the Mice Pancreas.

oproterenol+Puromycin은 Isoproterenol 單獨注射, 對照群보다 낮은 數值이고, 兩者 모두 Isoproterenol注射後 1時間이 가장 낮은 數值이고, 其以後부터는 DNA合成이 漸次的으로 增加함을 보았다.

李(1969)¹¹⁾는 Isoproterenol 은 白鼠顎下腺의 重量의 增加, 腺細胞의 肥大 및 增殖을 惹어오르고, 腺細胞의 反應은 強陽性이고, 齒周組織에 分布되는 血管은 擴張되고, 齒槽骨의 吸收를 惹起한다고 하였고,

丁外 2人 (1972)¹⁰⁾은 Isoproterenol을 長期間 白鼠에 投與하면 唾液腺이 增大되는 데, 顎下腺은 顯著하고, 耳下腺은 거의 變動이 없다고 하였고, 또 唾液腺內의 Amylase 活性度는 Isoproterenol 投與後 2時間에 가장 顯著히 增加하고, 顎下腺內의 Ca量은 Isoproterenol注射後 2時間에 가장 顯著히 減少되고, 耳下腺內의 Mg量도 Isoproterenol 投與로 增加된다고 하였다. Sasaki (1969)⁹⁾外 2人은 Cycloheximide 와 Puromycin 은 唾液腺의 Isoproterenol-stimulated DNA 合成에 抑制의 影響을 준다고 하였고,

Baserga(1967)⁸⁾外 1人은 Actinomycin D 는 Isoproterenol-stimulated DNA 合成에 銳敏한 反應을 나타낸다고 하였고,

Barka (1969)⁵⁾外 1人은 Isoproterenol 이 白鼠顎下腺의 Peptide Hydrolase Activity에 어떤 影響을 주는가를 實驗하였는 데, 其結果 Isoproterenol 注射後 4時間에 있어서 Enzyme Activity가 增加한다고 하였다.

Barka(1965)²⁾는 Isoproterenol은 白鼠唾液腺의 DNA 合成에 刺戟하여, DNA 合成이 增加한다고 하였고,

Barka(1968)⁶⁾는 Isoproterenol 은 Deoxythymidine Kinase 와 DNA Polymerase 의 增加를 惹어오게 한다고 하였고,

Mayfield(1968)⁷⁾外 3人은 Isoproterenol을 長期間投與하면 顎下腺 및 心臟의 RNA 含有量이 增加된다고 하

였다.

Cycloheximide나 Puromycin 은 어떤 時期에 있어서 Isoproterenol-stimulated DNA 合成에 甚한 抑制의 影響을 줄수있고, Isoproterenol 注射後 1時間과 2時間이 가장 甚하고, 顎下腺은 脾臟보다 더욱 뚜렷하게 反應하는 것 같다.

V. 結 論

體重 20g 內外의 雄性白鼠 80 頭를 使用하였고, 80 頭中 Isoproterenol+Cycloheximide群에 20頭, Isoproterenol+Puromycin群에 20頭, Isoproterenol單獨注射群에 20頭, 對照群에 20頭씩 配定하였고, 各群의 20頭는 다시 Isoproterenol 注射後 抗生劑의 投與時間(1時間, 2時間, 5時間, 8時間, 14時間)에 따라서 各各 4頭씩 配定하였다. Isoproterenol은 體重 kg當 40mg을 投與하고, Isoproterenol 注射後 Cycloheximide는 體重 g當 0.03mg, Puromycin은 體重 g當 50 μ g을 各各 注射하였고, 抗生劑를 注射한 後 24時間에 動物을 犧牲시켰고 顎下腺과 脾臟을 떼어냈다.

本實驗은 白鼠顎下腺 및 脾臟에 있어서 抗生劑가 Isoproterenol-stimulated DNA 合成에 어떠한 影響을 미치는 가를 調査한 것으로서 其 結果는 다음과 같다.

1. Isoproterenol 單獨注射時에 있어서 顎下腺의 重量은 增加하였고, 脾臟重量은 變動이 없었다. Isoproterenol과 抗生劑를 同時에 投與한 例는 顎下腺 및 脾臟의 重量이 모두 對照群보다 낮았다.

2. 顎下腺에 있어서 Isoproterenol + Cycloheximide 는 Isoproterenol 注射後 2時間에, Isoproterenol+Puromycin은 注射後 1時間에 있어서 各各 DNA 合成의 抑制의 現像이 더욱 뚜렷하였다.

3. 脾臟은 抗生劑가 Isoproterenol-stimulated DNA 合成에 큰 刺戟의인 影響을 주지 못하는 것 같다.

4. 이런 事實로 보아 Isoproterenol 은 白鼠唾液腺의 蛋白合成의 初期에 刺戟하는 것 같고, 其 結果로 이 刺戟이 DNA 合成에 影響을 미치는 것 같다.

(器具를 使用할 수 있도록 協助하여 주신 生化學教室 鄭泰英博士와 技術的面을 도와준 崔根培先生에게 深謝한다)

REFERENCES;

- 1) Barka, T.: Induced Cell Proliferation. The Effect of Isoproterenol. Exp. Cell Res. 37 : 662, 1965.

- 2) Barka, T. : Stimulation of DNA Synthesis by Isoproterenol in the Salivary Gland. *Exp. Cell Res.* 39 : 355, 1965.
- 3) Baserga, R. : Inhibition of Stimulation of DNA Synthesis by Isoproterenol in Submandibular Glands of Mice. *Life Sci.* 5 : 2033, 1966.
- 4) Sasaki, T., Litwack, G. and Baserga, R. : Protein Synthesis in the Early Prereplicative Phase of Isoproterenol-stimulated Synthesis of Submandibular Gland. *Lab. Invest.* 20 : 377, 1969.
- 5) Barka, T. : Stimulation of Protein and Ribonucleic Acid Synthesis in Rat Submaxillary Gland by Isoproterenol. *Lab. Invest.* 18 : 38, 1968.
- 7) Mayfield, E.D., Ghidoni, J.J., Bresnick, E. and Stanton, H.C. : The Effect of Isoproterenol on Pyrimidine Biosynthesis in the Salivary Gland and Heart of Rats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 129 : 91, 1928.
- 8) Baserga, R. and Heffler, S. : Stimulation of DNA Synthesis by Isoproterenol and Its Inhibition by Actinomycin D. *Exp. Cell Res.* 46 : 571, 1967.
- 9) Kim, M.K. and Han, S.S. : Effect of 5-Fluorouracil on Exocrine Glands. I. Gland Weights in Mice Receiving Synthetic Polynucleotides. *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.* 139 : 1246, 1972.
- 10) Cheong, D.K., Park, N. H. and Lee, S. S. : Effect of Isoproterenol on the Rat Salivary Gland Function. *J. Korean Dent. Asso.* 10 : 575, 1972.
- 11) 李正浩 : Isoproterenol 이 白鼠 顎下腺 및 齒周組織에 미치는 影響.
대한치과보철학회지 9 : 47, 1969.
- 12) Schneyer, C. A. : Salivary Gland Changes After Isoproterenol Induced Enlargement. *Amer. J. Physiol.* 203 : 232, 1962.
- 13) Selye, H., Veilleux, R. and Cantin, M. : Excessive Stimulation of Salivary Gland Growth by Isoproterenol. *Science* 133 : 44, 1961.
- 14) Bernard, S.M. : Changes in the Periodontium Following Isoproterenol Administration. *J. Periodon.* 38 : 105, 1967.
- 15) Dreisbach, R.H. : Effect of Isoproterenol on Ca, Protein and Electrolyte of Rat Submaxillary Gland. *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.* 126 : 279, 1967.
- 16) Wilk, A.L. and King, C.T. G. : The Effect of Isoproterenol-Induced Salivary Gland Hypertrophy and Diet on the Chemistry of Rat Saliva. *J. Dent. Res.* 44 : 1374, 1965.
- 17) 生化學實際 : 大韓生化學會發行, 1970.
- 18) 李根培 外 6人 : 生化學, 博愛出版社, 1973.
- 19) Volkin, E. and Cohn, W.E. : Method of Biochemical Analysis. 1 : 290, Interscience Publ. Inc., New York, 1954.
- 20) Fiske, C.H. and Subbarow, Y. : The Colorimetric Determination of Phosphorus. *J. Biol. Chem.* 66 : 357, 1925.
- 21) Hill, M.F. : Actions of Cycloheximide on the Submandibular Glands in Normal and Castrate Mice. *Europ. J. Pharmacol.* 1 : 434, 1967.
- 22) Darken, M.A. : Puromycin Inhibition of Protein Synthesis. *Pharmacol. Rev.* 16 : 223, 1964.
- 23) 荒谷眞平外 : 齒學生化學. 第4版. 醫齒藥出版, 1971
- 24) 赤松茂 : 生化學. 共立出版, 1970.
- 25) 李基寧 外 3人 : 生化學. 文運堂, 1967.