

# Insulin 투여가 백서치수 및 치은의 Collagen 생합성에 미치는 영향

서울대학교 치과대학 치과약리학교실

김 관 식

## I. 서 론

치수는 고도로 분화된 결체조직으로 상아질을 형성하며 유지하는 기능을 가지고 있으며 세포외 기질로 산성점액다당류를 많이 함유하며 collagen은 비교적 적게 존재하고 있다.<sup>11, 12)</sup>

반면 치은은 collagen이 다량으로 존재하며 이들의 지지 및 탄력성유지기능은 연조직과 치아의 정상적인 관계를 유지하는데 중요한 역할을 하고 있다.<sup>13, 15)</sup>

이러한 collagen의 대사는 조직의 종류와 기능에 따라 각기 다르며 전신적인 영양상태, hormone, 염증등에 의한 조직손상과 같은 여러가지 요인에 의하여 영향을 받는 것으로 알려져있다.<sup>17)</sup>

Orlowski<sup>18, 19)</sup>, Orlowski와 Doyle<sup>20)</sup>, Page와 Ammons<sup>15)</sup>는 radioactive proline을 이용하여 실험한 결과 치수와 치은의 collagen 대사는 매우 활발하며 백서에 있어 collagen으로의 <sup>3</sup>H-proline편입율은 치은보다 치수에서 높으며 치수중에서 전치가 구치보다 높았다고 하였으며 이는 전치가 계속 성장하는 사실을 반영하는 것이라고 하였다.

Collagen대사에 영향을 미치는 hormone중 insulin은 생체의 여러가지 대사활동에 대해 광범위한 효과를 나타내는 것으로 밝혀지고 있으며 과거에는 collagen을 형성하는 조직에 대하여는 영향을 미치지 않는 것으로 생각되었으나<sup>19, 21)</sup> 많은 연구결과 여러종류의 결체조직에서 amino acid운반과 단백질합성을 증가시키는 작용을 가지고 있는 것으로 판명되었으며<sup>1, 5, 7, 8, 16, 20)</sup> 정확한 작용기전은 아직 밝혀지지 않고 있다. collagen을 구성하는 amino acid 중 hydroxyproline은 대부분 collagen에만 존재하며

\* Insulin, NPH (Eli Lilly and Company, Indianapolis, U. S. A)

\*\* L-(5-<sup>3</sup>H) proline aqueous solution (The Radiochemical centre, Amersham, England)

이는 proline으로부터 유래되므로 radioactive proline에서 편입된 radioactive hydroxyproline은 collagen의 생합성을 의미하는 것으로 여겨지고 있다.<sup>6, 19)</sup>

본실험에서는 <sup>3</sup>H-proline을 이용하여 insulin이 치수와 치은의 collagen대사에 미치는 영향을 관찰하여 그결과를 보고하는 바이다.

## II. 실험재료 및 방법

### (1) 실험동물 및 시료의 준비

140~160gm의 Sprague-Dawley계 자성백서를 실험군과 대조군으로 나누어 각각 12마리씩 사용하였으며 실험군은 6일간 insulin\* (0.3unit/150gm)을 근육주사한 후 <sup>3</sup>H-proline\*\* (0.7uCi/gm)을 복강내 주사하였다.

그후 각군의 백서중 6마리는 <sup>3</sup>H-proline 투여 24시간후에 희생시키고 나머지 6마리는 insulin을 계속 투여한 후 6일째 희생시켜 시간경과에 따른 변화를 보고자 하였다.

희생후 치수는 하악전치, 치은은 상하악 구치부의 협측부위에서 채취하여 생리식염수로 세척하고 습중량을 측정한 후 화학적으로 분석하였다.

### (2) 화학실험

채취한 시료는 6N HCl을 가하고 봉관하여 150°C에서 24시간동안 가수분해시킨 후 HCl을 증발시키고 증류수로 희석하여 thin-layer chromatography 방법을 이용하여 proline과 hydroxyproline을 분리 정량하였으며 분리된 amino acid를 모아 각각의 동위원소량을 측정하였다.

TLC용 1st run은 chlorform-methanol-17% ammonium hydroxyde(40 : 40 : 20, w/w/w)로 2nd run은 phenol-water(75 : 25, w/w)로 실시하였으며

ninhydrin은 n-butanol-acetic acid에 용해시켰으며 amino acid의 분리정량은 chromatogram scanner (Aloka Japan Radio Co)로, 동위원소량은 liquid scintillation counter (Nuclear Enterprise Co)를 사용하여 측정하였다.

### III. 실험성적

(1) Insulin이 조직내 동위원소량에 미치는 영향  
실험군의 치수에서 조직mg당  $^3\text{H}$ -proline,  $^3\text{H}$ -hydroxyproline 및 total CPM은 전실험기간 동안 모두 대조군보다 증가되었음을 보였다. 치은의 경우 1일째 조직mg당 CPM은 모두 증가되었으며 6일

째  $^3\text{H}$ -proline의 CPM은 정상군에 비해 적었으나 total CPM은 차이가 없었다. (Tab. 1, 2)

(2) Insulin이  $^3\text{H}$ -proline의  $^3\text{H}$ -hydroxyproline 으로의 편입에 미치는 영향

치수와 치은 모두에서 조직 mg당  $^3\text{H}$ -hydroxyproline의 CPM은 전실험기간동안 대조군보다 높아 insulin투여가 편입을 증가시켰음을 보였다.

그러나  $^3\text{H}$ -hydroxyproline의 specific activity의 경우 1일째는 실험군이 대조군에 비해 낮게 나타났으며 6일째는 높은 결과를 보였다.

또한 specific activity의 시간경과에 따른 감소율이 실험군에서 작아지는 경향을 보였다. (Tab. 1 2),

Table 1. Radioactivity of  $^3\text{H}$ -proline and  $^3\text{H}$ -hydroxyproline in incisor pulp.

Group	Days after $^3\text{H}$ -proline inject.	Activity *			Specific activity **	
		Proline	OH-proline	total***	proline	OH-proline
Control	1st	247.8	32.2	280.0	159.9	189.5
	6th	120.8	15.7	136.5	175.0	34.9
Insulin	1st	515.0	58.0	573.0	130.1	126.1
	6th	149.5	16.8	166.3	48.9	37.4

\* CPM/mg wet weight of tissue

\*\* CPM/ $\mu\text{g}$  of amino acid

\*\*\* Sum of radioactivity of  $^3\text{H}$ -proline and  $^3\text{H}$ -hydroxyproline

Table 2. Radioactivity of  $^3\text{H}$ -proline and  $^3\text{H}$ -hydroxyproline in gingiva.

Group	Days after $^3\text{H}$ -proline inject.	Activity *			Specific activity **	
		Proline	OH-proline	total***	proline	OH-proline
Control	1st	550.4	110.1	660.5	81.3	42.3
	6th	294.1	70.2	364.3	44.6	13.2
Insulin	1st	655.2	121.3	776.5	70.7	12.7
	6th	255.4	108.7	364.1	30.7	14.3

\* CPM/mg wet weight of tissue

\*\* CPM/ $\mu\text{g}$  of amino acid

\*\*\* Sum of radioactivity of  $^3\text{H}$ -proline and  $^3\text{H}$ -hydroxyproline

#### IV. 고 찰

Insulin이 여러조직의 단백질대사에 미치는 영향에 대하여는 많은 연구결과가 보고 되었다.

Hjalmarson<sup>8)</sup> 등은 백서의 심장에서, Wool과 Krahl<sup>20)</sup> 은 횡격막에서 insulin이 amino acid의 운반을 촉진시킨다고 하였으며 Adolfsson등<sup>1)</sup> 과 Arvill과 Ahren<sup>2)</sup> 은 항문거근에서 amino acid의 운반과 단백질합성의 증가를 보고하였다.

또한 Eichhorn과 Sniffen<sup>9)</sup>, Mikkonen등<sup>10)</sup> 은 육아조직에 관한 실험에서 insulin에 의한 collagen합성 증가를 보았으며 Hahn등<sup>7)</sup>, Vaes와 Nichols<sup>16)</sup>, Wettenhall등<sup>19)</sup> 은 각기 골조직에서의 amino acid 운반과 기질로의 편입, collagen 합성이 insulin에 의해 촉진된다고 하였다.

본실험에서 치수와 치은의 조직mg당 total CPM이 실험기간동안 계속 증가된 결과를 나타냈으며 <sup>3</sup>H-hydroxyproline의 CPM도 증가되는 것으로 보아 다른 조직과 마찬가지로 insulin의 투여가 치수와 치은에서의 amino acid 운반 및 collagen 합성을 증가시킬 수 있었다.

Insulin에 의한 amino acid의 운반촉진에 대해 Wettenhell<sup>19)</sup> 등은 당대사촉진작용으로 ATP의 형성이 증가됨으로써 이같은 효과가 나타날 수 있다고 하였으나 Adolfsson등<sup>1)</sup>, Hahn등<sup>7)</sup>, Levine<sup>9)</sup>, Wool과 Krahl<sup>20)</sup> 은 당대사촉진과 무관하다고 하였으며 또한 Sanders와 Riggs<sup>16)</sup> 는 이러한 작용은 생체내에서 growth hormone, epinephrine, glucagon등 다른 hormone의 작용과 복합되어 나타난다고 하였다.

단백질합성촉진작용에 대해 Levine<sup>9)</sup> 은 insulin의 DNA-mRNA ribosome complex 활성화에 의한다고 하였으며 Hahn등<sup>7)</sup> 은 puromycin으로 단백질합성을 억제시키면 amino acid 운반촉진이 나타나지 않은 것으로 보아 이들은 서로 종속적인 관계를 가지고 있다고 보고하였다.

반면 Arvill과 Ahrén<sup>2)</sup>, Bessman<sup>3)</sup>, Levine<sup>9)</sup> 은 insulin의 단백질합성촉진과 amino acid 운반증가는 서로 관련성이 없다는 상반된 보고를 하였으며 Wool<sup>21)</sup> 은 단백질합성과 amino acid 운반에 대한 insulin의 작용은 독립적인 것이나 생체내에서 동시에 나타나 통합된 효과를 보인다고 하였다.

본실험에서 <sup>3</sup>H-proline 주사후 1일째 실험군의 <sup>3</sup>H-hydroxyproline의 specific activity는 조직내

collagen의 생합성이 증가되었음에도 대조군보다 낮은 결과를 보였다.

Eichhorn과 Sniffen,<sup>9)</sup> Orlowski<sup>12)</sup>, Page와 Ammons<sup>15)</sup> 는 <sup>3</sup>H-hydroxyproline의 specific activity는 <sup>3</sup>H-proline이 collagen으로 편입증가함에 따라 항상 증가되는 것은 아니며 기존하고 있는 collagen과 관련지어 생각하여야만 된다고 하였으며 specific activity의 변화는 생체내에서 collagen의 합성과 파괴가 동시에 나타나며 또한 지속적인 대사과정임을 고려할 때 본실험의 specific activity의 감소는 collagen의 합성이 감소된 것이 아니고 조직mg당 편입된 <sup>3</sup>H-hydroxyproline의 증가에 비추어 볼 때 새로이 합성되는 collagen으로 <sup>3</sup>H-proline의 편입은 증가되었으나 <sup>3</sup>H-proline 주사전에 투여된 insulin에 의한 collagen 생합성촉진으로 기존하는 collagen이 증가되어 나타난 결과로 사료된다.

6일째의 specific activity의 증가는 collagen 대사에 대한 insulin의 작용이 파괴보다는 생합성을 촉진하여 새로 합성되는 collagen으로의 <sup>3</sup>H-proline의 편입증가가 계속되어 나타나는 것으로 보이며 따라서 시간경과에 따른 <sup>3</sup>H-hydroxyproline의 specific activity 감소율을 억제시킨 것으로 사료된다.

#### V. 결 론

Insulin 투여가 백서치수 및 치은의 collagen대사에 미치는 영향을 보기위하여 실험기간 동안 계속 insulin을 투여하면서 <sup>3</sup>H-proline을 이용하여 실험일정에 따라 실험동물을 희생시켜 <sup>3</sup>H-hydroxyproline으로의 편입과 시간경과에 따른 변화를 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 치수와 치은으로의 <sup>3</sup>H-proline 운반은 insulin 투여에 의하여 증가되었다.

2. Insulin 투여는 <sup>3</sup>H-proline의 <sup>3</sup>H-hydroxyproline으로의 편입을 치수와 치은에서 모두 증가시켰다.

#### -REFERENCES-

1. Adolfsson, S., Arvill, A. & Ahrén, K.: Stimulation by insulin of accumulation and incorporation into protein of L-[<sup>3</sup>H] proline in the intact levator ani muscle from the rat. *Biochim. Biophys. Acta* 135;

- 76-78, 1967.
2. Arvill, A. & Ahrén, K.: Effect of insulin on the intact levator ani muscle of the rat. *Acta Endocrinol.* 56:295-307, 1967.
  3. Bessman, S.P.: A molecular basis for the mechanism of insulin action. *Am. J. Med.* 40:740-749, 1966.
  4. Brenner, M., Niederwieser, A. & Pataki, G.: Amino acids and derivatives, in *Thin-layer chromatography* ed. by Egon Stahl. p. 730, George Allen & Unwin, 1973.
  5. Eichhorn, J.H. & Sniffen, R.C.: Influence of cortisol and insulin on in vitro incorporation of amino acid into protein of granulation tissue. *Endocrinol.* 75:341-351, 1964.
  6. Finnerman, G.A.M., Downing, S. & Rosenberg, L.E.: Regulation of collagen synthesis by perturbation of proline transport. *Biochim. Biophys. Acta* 135:1008-1015, 1967.
  7. Hahn, T.J., Downing, S.J. & Phang, J.M.: Insulin effect on amino acid transport in bone. *Biochim. Biophys. Acta* 184:675-677, 1969.
  8. Hjalmarson, A., Isaksson, D. & Ahrén, K.: Effect of growth hormone and insulin on amino acid transport in perfused rat heart. *Am. J. Physiol.* 217:1795-1802, 1969.
  9. Levine, R.: The action of insulin at the cell membrane. *Am. J. Med.* 40:691-694, 1966.
  10. Mikkonen, L., Lampiaho, K. & Kulonen, E.: Effect of thyroid hormone, somatotrophin, insulin and corticoids on the synthesis of collagen in granulation tissue both in vivo and in vitro. *Acta Endocrinol.* 51: 23-31, 1966.
  11. Orłowski, W.A.: Analysis of collagen, glycoprotein and acid mucopolysaccharide in bovine and porcine dental pulp. *Archs oral Biol.* 19:255-258, 1974.
  12. Orłowski, W.A.: The incorporation of  $^3\text{H}$ -proline into collagen of periodontium of rat. *J. Periodontal Res.* 11:96-100, 1976.
  13. Orłowski, W.A. & Doyle, J.L.: Collagen metabolism in the pulp of rat teeth. *Archs oral Biol.* 21:391-392, 1976.
  14. Orłowski, W.A.: The turnover of collagen in dental pulp of rat incisors. *J. Dent. Res.* 56:437-440, 1977.
  15. Page, R.C. & Ammons, W.F.: Collagen turnover in gingiva and other mature connective tissues of the marmoset *Saguinus oedipus*. *Archs oral Biol.* 19:651-658, 1974.
  16. Sanders, R.B. & Riggs, T.R.: Modification by insulin of the distribution of two model amino acids in the rat. *Endocrinol.* 80: 29-37, 1967.
  17. Seltzer, S. & Bendon, I.B.: Dental pulp, p. 70-74, J.B. Lippincott co. 1975.
  18. Vaes, G.M. & Nichols, G.Jr.: Metabolism of glycine- $1\text{-C}^{14}$  by bone in vitro. *Endocrinol.* 70:890-901, 1962.
  19. Wettenhall, R.E.H., Schwartz, P.L. & Borstein, J.: Action of insulin and growth hormone on collagen and chondroitin sulfate synthesis in bone organ culture. *Diabetes* 18:280-284, 1969.
  20. Wool, I.G. & Krahl, M.E.: Incorporation of  $^{14}\text{C}$ -amino acids into protein of isolated diaphragm. *Am. J. Physiol.* 196:961-964, 1959.
  21. Wool, I.G.: Relation of effects of insulin on amino acid transport and on protein synthesis. *Fed. Proc.* 24:1060-1070, 1965.

# EFFECT OF INSULIN ADMINISTRATION ON THE COLLAGEN BIOSYNTHESIS IN INCISOR PULP AND GINGIVA OF RAT.

Gwan-Shik Kim, D.D.S., M.S.

*Department of Dental Pharmacology, College of Dentistry, S.N.U.*

## —Abstract —

The effect of insulin on the collagen metabolism in dental pulp and gingiva was studied using Sprague-Dawley rat and  $^3\text{H}$ -labeled proline. The rats were administered insulin for all experimental periods and  $^3\text{H}$ -proline was injected intraperitoneally and then sacrificed according to predetermined schedule.

Lower incisor pulp and gingiva were removed immediately and hydrolysed with acid. After digestion, proline and hydroxyproline were separated and analysed quantitatively employing thin-layer chromatography and radioactivity of each amino acid was counted by liquid scintillation counter.

The label incorporated into lower incisor pulp and gingiva and radioactivity of  $^3\text{H}$ -hydroxyproline were increased in insulin administered group. And disappearance rate of  $^3\text{H}$ -hydroxyproline was decreased. Those results indicated that amino acid, i.e. proline transport and collagen biosynthesis were increased in dental pulp and gingiva by insulin administration.