

스트레스가 Streptozotocin 유도 당뇨백서의 타액선에 미치는 영향

경희대학교 치과대학 구강내과학 교실

김 홍 모 · 전 양 현 · 홍 정 표

목 차

- I. 서 론
- II. 실험재료 및 방법
- III. 실험성적
- IV. 총괄 및 고안
- V. 결 론
- 참고문헌
- 영문초록
- 사진부도

I. 서 론

타액은 건강한 구강상태를 유지하는데 매우 중요한 역할을 한다¹⁾. 이는 구강점막을 보호하고 윤활작용, 항균작용, 혈액 응고작용, 완충작용 그리고 소화작용 및 수분대사의 조절, 배설작용과 용매작용 등을 한다²⁾.

타액 분비는 타액선에 분포되어 있는 설인신경과 안면신경 등의 부교감신경과 교감신경 등의 신경활동에 의해 조절되는데, 타액선에서 타액자체가 생성되지 않거나 타액의 분비기전에 이상이 생겼을 경우 타액선 질환이 발생하게 되며, 이로 인해 타액선의 가역적 또는 비가역적 기능장애징후인 구강건조증³⁾이 나타날 수 있다. 이것은 임상적으로 구강내 위생 및 건강상태에 큰 영향을 미치게 되는데, 당뇨병과 같은 내분비

계 이상이나 스트레스 등에 의하여 타액의 분비율과 성분 등이 변화되어 발생될 수 있다.

당뇨병은 주로 생활수준이 높은 선진국에서 발생하는 성인병의 일종으로, 우리 나라에서도 날로 증가되어 치과 의사가 당뇨병 환자를 접하게 되는 기회는 점차 증가되고 있는데, 이는 구강영역에 많은 합병증을 유발시켜 치주질환을 악화시키거나 치주농양, 구강궤양을 만들고, 구강건조증을 유발시키기도 한다.⁴⁾

당뇨병과 구강조직 변화와의 관련성에 대해서는 많은 학자들이 연구보고 한 바 있는데, Glickman과 Shklar⁵⁾이 alloxan으로 당뇨병을 유발시킨 백서에서 치주조직의 변화를 보고한 바 있고, Bissada⁶⁾ Glickman⁷⁾, Ray와 Orban⁸⁾ 등이 치주조직의 염증반응에 대한 영향과 치은 손상시 치유속도에 관한 장애 등에 대하여 보고한 바 있다. 또한 타액선의 변화에 관하여도 Hu⁹⁾이 타액선의 무게변화에 대하여, Reuterving¹⁰⁾이 설포세포내 지방축적에 대하여, Campbell¹¹⁾과 Reuterving¹⁰⁾이 혈관의 변화에 대하여 연구보고 한 바 있다.

이와 같이 당뇨시의 생체조직 변화를 관찰하기 위해서는 실험적으로 동물에 당뇨를 유발시켜야 하는데, Ferner¹²⁾가 제시한 바에 의하면, 항고혈압제로써 사용되는 혈관이완제인 diazoxide나 뇌종양을 억제하기 위한 고농도의 corticosteroid가 당뇨병을 유발시킬 수 있고, 과

량의 theophylline, aspirin, isoniazid, nalidixic acid 등의 약물도 일시적인 고혈당증을 유발시킬 수 있으며, streptozotocin과 alloxan, rodenticide Vacor와 같은 약제는 영구적으로 당뇨병을 유발시킨다고 하였다.

이 중 streptozotocin(STZ)은 췌장의 인슐린 분비작용에 영향을 미치는 것이 아니라, 포도당에 의한 췌장의 인슐린 분비작용에 대해 영구적으로 역치를 증가시켜 주는 약물로서, Simon과 West¹³⁾는 백서에 1회 복강내 주사(45mg/kg of streptozotocin)로 당뇨병을 유발시킬 수 있었다고 보고한 바 있다.

신체외로부터의 모든 요구에 대한 생체의 비특이적 반응으로 정의되는 스트레스는 생체에 작용하여 놀람기(alarm), 저항기(resistance) 및 탈진기(exhaustion)를 거치게 되며¹⁴⁾, 생리적으로 자율신경계, 호르몬 또는 내분비계 및 면역계에 영향을 미치게 된다¹⁵⁾. 따라서 스트레스는 면역을 약화시키기도 하고¹⁶⁻¹⁸⁾, 구강내의 다양한 병소를 유발시키기도 한다¹⁹⁾.

심인성 요인의 하나인 스트레스에 대해서 Kleinhaus등²⁰⁾은 45명의 환자를 SCL-90R (symptom check list-90 revision) 설문지와 RLC(recent life changes) 설문지로 조사한 결과 모든 항목의 수치가 높게 나타난 환자에서 구강건조증이 나타났다고 보고한 바 있다.

동물과 식물 조직의 전자전달에 관여하는 철 단백질인 cytochrome²¹⁾은, 주로 소포체의 히드록시화반응에 관여하는데, 특히 간장 미소체의 20%를 차지하는 Cytochrome P450(CYP450)은 지방산, prostaglandin 및 steroid와 같은 내인성 물질의 대사에 관여할 뿐만 아니라, 약물이나 발암물질, 주변의 화학물질과 같은 다양한 외부 물질에 대한 일차 대사과정에도 산화제로써 관여한다²²⁾.

Cytochrome P450 IIE(CYPIIE)는 1982년에 Koop등²³⁾에 의해 순수 분리되었고 기질의 특이성과 유도 대사과정에 대해서도 이미 밝혀진바 있는데²⁴⁾ 이는 내인성 화합물과 acetone, ether, CCl₄, benzene, pyrazole 및 pyridine과 같은 외인성 화합물²⁵⁻²⁹⁾이나 nitrosamine³⁰⁻³²⁾과 같은 수용

성 발암물질의 대사과정에 중요한 역할을 하며, 특히 알콜 섭취 시에는 암 발생률을 높이고³³⁾ 간독성을 증가시키는 것³⁴⁾으로 알려져 있어, 질병의 원인이나 진행과정을 추적하는데 중요한 인자로 사용되고 있다³⁵⁾.

또한 전과 홍³⁶⁾의 연구에 의하면 알콜 투여시에서 뿐만 아니라 스트레스 단독 투여시에도 (guinea pig)의 간 조직에서 Cytochrome P450 IA1(CYPIA1), Cytochrome P450 IA2 (CYPIA2), 및 Cytochrome P450 IIB1 (CYPIIB1) 등이 실험 3주 후에 뚜렷이 발현되었다고 보고된 바 있고, 이등³⁷⁾도 알콜 또는 스트레스 투여시에 간 조직에서 뿐만 아니라 아삭선과 이삭선조직에서도 미약하나마 Cytochrome P450 IIE1(CYPIIE1)이 발현되었다고 보고한 바 있다.

이에 저자는 소모성 질환으로 전신증상을 나타내며, 구강내에서도 다양한 증상을 나타내는 당뇨병시에 구강건조증이 나타나는 원인을 구명하고 스트레스가 타액선에 미치는 영향을 관찰해 보고자, 간조직과 타액선조직에서의 CYPIIE1 발현이 타액선의 조직학적 변화와 상호 관련성이 있는지 여부와 그 발현여부를 병리조직학적 방법과 면역학적 방법으로 비교 관찰한 결과 다소의 지견을 얻었기에 이를 보고하는 바이다.

II. 실험재료 및 방법

1. 실험시약

면역전기영동분석(immunoblot analysis)을 위해 본 실험에 사용된 시약들은 NIAAA (National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism)에서 제공된 것으로써, CYPIIE1에 대한 일차항체(anti-cytochrome IIE1 rabbit serum; Oxford Biomedical Research Inc.)와 이차항체(goat anti-rabbit IgG(H+L)-conjugated with horseradish peroxidase; HRP; Bio-Rad), Western blotting을 위한 단백질 분자량 표준 표식자(protein molecular weight standard marker; Gibco BRL), 흡착지(nitrocellulose membrane; Trans-Blot[®], 0.45 μ m; Bio-Rad),

bovin serum albumin(BSA; Sigma), 발색시약(4-chloro-1-naphthol) 등을 사용하였다. 그 외 면역전기영동분석법에 사용된 시약들은 Bio-Rad사(U.S.A.)의 제품을 사용하였다.

2. 실험동물 및 조직 처리

실험동물로는 생후 10주된 웅성 백서 63마리(체중 276g~330g; 평균 300g)를 대조군에 3마리와, 스트레스 부여군, 당뇨 유도군 그리고 당뇨 유도-스트레스 병용군에 각각 20마리씩 배정하였고, 당뇨군은 streptozotocin(STZ 40mg/Kg)을 꼬리정맥내 주사하여 당뇨를 유도하였으며, 스트레스 부여군은 0~3°C 냉수에 일일 2회씩 30초간 잠수시켜 한냉 스트레스를 부여하였다. 이들은 각 군별로 즉일, 1주, 2주, 3주, 4주에 4마리씩 희생시켜 각각 간조직과 이하선 조직을 적출하였으며 -70°C이하의 냉동고에 사용 전까지 보관하였다. 면역전기영동분석법을 위해 조직들을 상온에서 해동시켜 15mM EDTA와 10mM Tris buffer를 첨가하여 균질화 후 원심분리시켰으며 각 군의 단백질 상층액을 Lowry 방법으로 정량하였다.

병리조직학적 관찰을 위해서는 절취된 조직을 10% 중성 formalin에 고정시켰으며, 통법에 의해 4~6 μ m의 조직박편을 제작하여 H-E(hematoxyllin-eosin) 중염색을 실시한 후 광학현미경으로 검경하였다.

3. 면역전기영동분석법

각 군의 단백질 30 μ g을 β -mercapto-ethanol이 첨가된 전기영동 sample buffer와 함께 5분간 중탕한 후, 단백질 분자량 표준 표식자와 함께 Tall Mighty Small vertical slab gel unit(Model SE 280; Hoefer)를 사용하여 SDS-12.5% polyacrylamide gel상에서 Laemmli 방법으로 전기영동하였다. gel상에서 분리된 단백질들은 Semi-Dry Blotting unit(Model FB-SDB 2020; Fisher)에서 nitrocellulose membrane으로 전이시킨 후 nitrocellulose membrane을 실온에서 차

단 완충액인 1% BSA-TBS(Tris-buffered saline; 20mM Tris, 0.5M NaCl, pH7.5) blocking buffer에 1시간 정도 부란시켜 원하는 일차항체가 결합될 수 있도록 비특이적 결합을 차단하였다. 그 후 실온에서 CYP11E1에 대한 일차 항체가 1% BSA-TBS 용액에 1:500정도로 희석된 용액에서 3시간이상 부란시킨 후, 수세 완충액인 Tris-Tween 20 washing buffer (1mM Tris, 0.0005% Tween 20[v/v], 0.01% NaN₃; pH 8.0)로 각 5분씩 3차례에 걸쳐 수세하였다. 이를 다시 실온에서 HRP와 결합된 이차 항체(goat anti-rabbit IgG(H+L)-conjugated with HRP)를 1% BSA-TBS 용액에 1:500~1:1000으로 희석된 용액에서 1시간이상 부란시킨 다음 Tris-Tween 20 washing buffer로 각각 5~10분씩 7차례이상 강하게 수세하고, 최종적으로 결합된 CYP11E1에 대한 항체를 가시화하기 위하여 발색시약(4-chloro-1-naphthol)을 첨가한 후, nitro-cellulose membrane을 증류수로 세척하여 발색반응을 정지시키고, target protein을 관찰하였다.

III. 실험성적

1. 대조군

(1) 병리조직학적 소견

이하선조직은 장액선으로 호염기성의 많은 과립과 기저부측에 위치한 둥근 핵을 가진 추체형의 선포세포가 모여 둥근 모양의 선포를 만들며, 여러개의 선포들이 소엽을 이루고 이들이 결합조직 중격에 의하여 결합되어 이루어진 집합체로서, 선포사이에는 단층의 키가 작은 입방세포로 이루어진 개재관, 모세혈관들이 산재되어 있으며, 교원섬유가 주성분이되는 소엽간 결합조직내에는 단층의 원주상피로 이루어진 선조관과 풍부한 소혈관이 관찰되었다.

(2) 면역전기영동검사소견

간 조직은 대조군에서 CYP11E1이 소량 관찰되었다.

2. 실험군

가. 스트레스 부여군

(1) 병리조직학적 소견

즉일군과 실험 1, 2주 후에는 커다란 조직변화를 보이지는 않았지만 실험 3주 후 각 설포간의 거리가 이개되었으며, 설포세포가 다소 위축되고 크기가 불규칙해진 소견이 관찰되었고, 실험 4주 후까지도 지속되었다.

그러나 전군에 걸쳐 결합조직 증격이나 도관, 혈관 등의 조직변화는 관찰되지 않았다.

(2) 면역전기영동검사소견

간 조직에서는 대조군에 비해 실험군 모두에서 CYP11E1이 다량 관찰되었으며, 이하선 조직에서는 관찰되지 않았다.

나. 당뇨 유도군

(1) 병리조직학적 소견

이하선의 설포세포는 당뇨유발 즉일부터 세포질이 매우 위축되어 크기가 크게 감소되었고 불규칙하였으며, 실험 1주 후에 이르러서는 설포세포간 거리가 심하게 이개되고 심하게 위축 변성되었으며, 실험 2주 후부터는 다소 회복되었으나 스트레스 부여군에 비해서는 설포세포가 여전히 위축된 양상을 관찰할 수 있었다.

결합조직 증격 결체조직의 교원질 다발은 실험 1주 후부터 점차 가늘어져 실험 4주 후에는 위약하였고, 주행방향도 불규칙하였으나, 도관이나 혈관의 변화는 관찰할 수 없었다.

(2) 면역전기영동검사소견

당뇨 유도군의 간 조직에서는 CYP11E1이 다량 관찰되었으나, 이하선 조직에서는 관찰되지 않았다.

다. 당뇨-스트레스 병용군

(1) 병리조직학적 소견

설포세포는 당뇨 유도군과 유사하게 변성되고 이개되었으며, 실험 1주 후에 설포간의 거리간격이 가장 현저하게 이개되었고, 실험 2주 후에 심하게 변성되었으며, 점차 회복되었다.

결합조직 증격 결체조직의 교원질 다발도 실험 1주 후부터 점차 가늘어져서 실험 4주 후에는 위약하였고, 주행방향도 불규칙하였으나, 도관이나 혈관의 변화는 관찰할 수 없었다.

(2) 면역전기영동검사소견

당뇨-스트레스 병용군의 간 조직에서 CYP11E1이 다량 관찰되었으나, 이하선 조직에서는 관찰되지 않았다.

IV. 총괄 및 고안

구강내 타액은 대타액선에서 분비된 타액과 구강점막, 입술, 경구개와 연구개, 혀 등에 분포된 소타액선으로 부터 분비된 타액이 합쳐진 혼합타액으로서, 하루에 분비되는 총량은 약 1~1.5리터라고 알려져 있다¹⁾.

타액은 구강내에서 완충작용, 소화작용, 광화작용, 윤활 및 점탄성(viscoelasticity)작용, 점막보호작용, 항진균작용, 항바이러스작용, 그리고 항균작용 등을 하는데, 타액 성분에 따라 그 기능이 다양하게 나타난다.

완충작용에 관여하는 성분으로는 carbonic anhydrase와 histatin 등이 있고, 소화작용에는 amylase와 mucin이 관여하며, cystatin, histatin, proline-rich protein, 그리고 statherin은 광화작용에 관여하고, mucin과 statherin은 윤활 및 점탄성 작용에 관여한다. 또한 amylase와 cystatin, mucin, proline-rich protein, 그리고 statherin은 점막을 보호하며 histatin은 항진균작용을 하고 cystatin과 mucin의 경우에는 항바이러스작용을, amylase, cystatin, histatin, mucin, 그리고 peroxidase 등은 항세균역할을 한다.

amylase는 496 amino acids로 구성된 단백질로서 5개의 disulfide bond를 가지고 있고, 이는 녹말을 분해시키며 viridans streptococci와 반응하고 hydrdoxyapatite와 결합하는데³⁸⁻⁴²⁾, 만약

disulfide bond가 끊어지면 구조적 안정이 파괴되고 생물학적 활성을 잃게 된다⁴³⁾.

또한 mucin은 윤활, 조직부착, 소화기능을 가지고 있고, 바이러스 뿐만 아니라 세균, 진균과도 작용하며⁴⁴⁾, statherin과 같은 작은 물질은 석회화^{45,46)}와 윤활작용⁴⁷⁾ 및 세균과의 작용⁴⁸⁾에 관계한다. 이와 같이 한 물질이 여러 기능을 나타내는 것은 특정 bioactive domain 때문일 수도 있고 전체 물질 자체 때문일 수도 있다.

타액은 여유기능(redundancy)을 가짐으로써 calcium phosphate salts의 침전을 저해할 수 있으며, statherin과 acidic proline-rich protein에 의해 histatin과 cystatin 같이 중등도의, mucin이나 amylase 같이 미약한 정도의 저해작용을 한다⁴⁰⁾. 그러므로 statherin의 농도가 낮은 사람은 높은 농도의 acidic proline-rich protein에 의해 보상이 가능하다.

mucin은 disulfide bond를 통하여 end-to-end oligomer를 형성할 수 있으며⁴⁹⁾, 이는 윤활 및 점탄성 성질을 수행하는데 필요하다. 또한 이는 다양한 구강내 조직에 부착하여 sIgA, lysozyme, cystatin과 같은 항균물질과 이형성 결합체(heterotypic complex)를 형성할 수 있는데^{44,50)}, 이러한 결합체는 주로 비공유성 이온결합에 의해 형성되며 타액-조직 접촉면에서 항균 물질의 농도를 증가시키기도 한다.

비수면 상태에서 특별한 자극 없이 분비되는 안정타액(resting saliva)은 악하선에서 약 70%, 이하선에서 약 20%, 소타액선에서 약 6%정도 분비되고 설하선에서 최소로 분비된다.

타액은 구강내에 가해지는 화학적, 기계적 자극과 저작활동에 의해 분비가 증가되기도 하며, 이와같은 자극이 직접 구강내에 작용하지 않더라도, 냄새, 음식에 대한 생각, 음식 만드는 소리 등의 조건반사에 의해서도 psychic flow가 증가되는데, 타액선 분비기전에 이상이 생기거나 타액선 질환이 발생할 경우에는 타액이 부적절하게 분비되어 구강상태를 불안정하게 한다.

구강건조증은 타액선의 가역적 또는 비가역적 기능 장애를 말하며³⁾, 이는 임상적으로 매우 중요한 의미를 가지고 있어, 구강내의 국소적 염증

이나 타액선의 감염, 섬유종, 탈수 또는 신경안정제, 항히스타민 및 항콜린제 등의 약물, Mikulicz씨 질환과 Sjögren 증후군과 같은 자가면역질환, 화학요법제, 방사선 조사, 심인성 요인 등에 의해서 발생된다⁵¹⁾.

타액선 기능이상은 타액선 도관의 물리적 폐쇄, 타액선 실질의 파괴, 그리고 분비기전의 약리학적인 변화 등에 의해 나타난다.

도관의 폐쇄는 종종 도관내 내압을 증가시켜선포 세포를 위축시키고, 타액선 기능의 상실을 초래할 수 있는데, 타액선 도관의 폐쇄를 일으키는 일차적인 요소로는 타석의 형성과 외상을 들 수 있다. 이러한 상태는 폐쇄를 일으키는 조건을 제거하고 타액선 도관을 다시 회복시켜 줌으로써 치료할 수 있으나, 타액선의 실질이 파괴되는 자가면역질환, 방사선 치료, 혹은 감염 등은 영구적이거나 부분적으로 구강건조증을 야기시킨다.

당뇨병은 절대적 혹은 상대적 인슐린 결핍으로 지질 및 단백질대사에 이상을 초래하여 혈당을 상승시키는 질병으로 신경성 장애와 혈관성 장애에 의해 발병되는데⁴⁾, 이 질환에 이환되면 구강건조증이 나타나게 된다. 이에 대해 Shafer 등⁵²⁾은 당뇨병시에 타액이 상실되기 때문에 이차적으로 구강건조증이 나타난다고 보고한 반면, Gorlin과 Goldman⁵³⁾은 당뇨병에 의해 타액선에 지방축적과 지방변성이 일어나 타액분비가 감소되므로 발생된다고 보고한 바 있다. 또한 Hu등⁹⁾은 당뇨가 진행됨에 따라 악하선의 무게가 감소되었으며, 악하선에서 분비되는 상피성 장인자도 이에 의해 18~500배 가량이 감소되었다고 보고하면서 당뇨병시 타액선조직의 양과 질의 변화에 대해서도 언급한 바 있다.

당뇨병시 타액선조직의 기질적 변화에 대해서는 Cutler등⁵⁴⁾이 실험적으로 유발시킨 당뇨에서 이하선과 악하선세포가 위축되고 괴사되었으며, 그 부위는 결체조직으로 대체되었고, 자율신경계의 변성이 관찰되었다고 보고한 바 있다. 또한 Anderson과 Johnson⁵⁵⁾은 alloxan으로 백서에 당뇨를 유발시켰을 때 이하선에서 지방소적이 관찰되었다고 하였으며, 축적된 지방은 혈당치와 관계가 깊다고 보고하면서 당뇨로 인한 대사장애

애가 세포내 지방을 축적시킨다고 보고하였고, Morris등⁵⁶⁾도 STZ로 유발시킨 당뇨백서의 대타액선에서 선포간에 지방소적이 축적되었다고 하였으며, 이것은 STZ주사 후 점차 증가되어 2주 후에 최대에 달하였다가 점차 감소되어 소실되었다고 보고하였다.

본 실험의 당뇨유발군에서도 당뇨유발 즉일부 터 세포질이 매우 위축되고 불규칙해졌으며, 실험 1주 후에 이르러서는 선포세포간 거리가 심하게 이개되고 심하게 위축 변성되었으며, 실험 2주 후부터는 다소 회복되었으나, 스트레스 부여군에 비해서 선포세포가 위축되었던 것은 당뇨에 의한 타액선 변화로 생각되된다. 지방소적의 축적과 실험 2주 후에 점차 회복되는 상태를 확인하기 위해서는 향후 투사전자현미경이나 조직화학적 방법 등을 이용하여 이를 구명해야 할 것으로 생각된다.

당뇨병에 의한 선포의 조직의 변화로써 현저한 것은 혈관의 변화인데, Campbell¹¹⁾은 당뇨초기에 대부분의 혈관, 특히 모세혈관의 기저막이 비후되었다고 보고하였고, Murrah등⁵⁷⁾도 사망한 당뇨환자의 모세혈관을 관찰한 결과 동일한 결과를 보고한 바 있는데, 이에 대해 Reutering¹⁰⁾은 비후된 모세혈관의 기저막이 투과성과 여과성에 영향을 미쳐, 타액생성에 지장을 초래하여 당뇨의 정도와 기간이 타액선의 조직변화에 중요한 영향을 미친다고 하였다. 또한 Russel⁵⁸⁾은 당뇨병시 혈관강이 폐쇄되고 이로 인해 인접한 세포의 물질대사가 장애를 받게 된다고 하였고, Anderson등⁵⁹⁾은 이로 인하여 병적으로 증가된 치밀한 모세혈관을 보고한 바 있어, 당뇨병시의 혈관의 변화는 매우 중요한 변화라 하겠다.

본 실험에서 이하선의 결합조직 중격, 결체조직의 교원질 다발이 실험 1주 후부터 점차 가늘어져 실험 4주 후에는 위약해졌고, 주행방향도 불규칙하였던 것은 혈관변화 등의 여러 가지 원인이 있을 것으로 사료되나 이를 구명하기 위해서는 전자현미경을 사용한 면역조직학적 관찰이 요구되며, 도관이나 혈관의 변화도 향후 전자현미경을 사용한 관찰이 요구될 것으로 생각된다.

다.

구강건조증의 또 다른 원인으로 스트레스는 빼놓을 수 없는 요소로서⁶⁰⁻⁶³⁾, Kleinhauz등⁶⁴⁾이 인성검사의 검사치가 불안정하게 표현된 환자에게서 구강건조증이 많이 나타났다고 보고하였을 뿐 아니라, Fox와 Howell⁶⁵⁾은 구강건조증을 유발하는 Sjögren 증후군과 같은 자가면역질환도 사회생활에서 오는 스트레스가 원인이 된다고 보고한 바있다.

스트레스는 생리적으로 자율신경계, 내분비계 또는 면역계 등에 영향을 미치게 되는데¹⁵⁾, 갑자기 닥친 심한 스트레스가 정신기능에 장애를 일으키면 해리장애(dissociative disorders)가 일어나고, 운동신경기능에 장애를 일으키면 전환장애(conversion disorders)가 일어나며, 자율신경이나 말초신경에 장애를 일으키면 심신장애(psycosomatic disorders)를 초래하게 된다⁶⁶⁾.

본 실험에서 연구대상으로 삼은 타액선 기능장애에 의한 구강건조증도 이와 같은 자율신경계에 나타나는 심신장애의 하나이다.

스트레스의 인지과정은 신경내분비계(neuro-endocrine system)의 조절로 생리 및 정서적 반응을 나타낸다. 즉, 인체의 비특이적 반응인 교감신경성 부신수질계(sympathetic adrenal-medullary system : SAM system)와 뇌하수체성 부신피질계(pituitary adrenal-cortical system : PAC system)를 중계하여 나타나는 것이다.

교감신경성 스트레스반응은 부신수질 추출물을 생체에 주사하였을 경우에도 동일하게 나타나며, 그 증상으로는 관상동맥 확장, 근육수축, 수의근의 혈관확장, 위장계의 혈관수축 등이 있다.

일반적으로 심리적 스트레스에서는 혈장 norepinephrine 보다는 epinephrine 분비량이 증가되고, 물리적 스트레스에서는 혈장 norepinephrine이 더 증가된다고 보고되어 있으나, 이와 같지 않은 경우도 관찰된다.

교감신경성 부신수질계는 육체적 또는 정신적 노력과 정서적 자극에 의해서 epinephrine, norepinephrine 및 catecholamines을 유리시키며

66), 뇌하수체성 부신피질계는 고뇌, 분노, 우울 및 무절제 등에 의해서 corticosteroid와 cortisol^{68,69)}을 분비시키게 되는데, 실험적으로도 한 냉 스트레스를 부여했을 때 백서에서는 혈장 norepinephrine 수치가 증가되었고 뇨중 catecholamine의 분비량도 변화되었으며⁷⁰⁾ 개의 경우에는 혈장 17-hydroxycorticoid와 norepinephrine의 양이 증가되었다⁷¹⁾는 보고들이 있다.

또한 Calabrese 등¹⁶⁾은 스트레스, 별거 및 우울증세가 면역학적 기능을 취약하게 한다는 명백한 증거가 있다고 보고하였고, Kiecolt-Glaser 등¹⁷⁾도 고독이나 스트레스가 뇨중 cortisol치 등의 면역기능에 미치는 영향에 대하여도 언급하였으며, Kiecolt-Glaser 등¹⁸⁾은 일상적으로 일어나는 스트레스에 의해서도 면역기능의 저하가 초래된다고 보고한 바 있어, 스트레스 시 나타나는 신체적 변화에 대해서도 많은 관심을 가지고 있다.

스트레스와 구강 질환과의 관계에 대하여 전과 홍³⁶⁾은 스트레스가 이제 더 이상 형이상학적 차원이 아니라 구체적이고 가시적인 증상과 징후를 동반한다고 하였는데, 특히 정동 스트레스(emotional stress)시 구강내에서도 다양한 변화가 나타난다.

구체적으로 스트레스가 주원인인 병소로는 편평태선과 아프타성 구내염이 있고⁷²⁾, 스트레스가 관여된 병소로는 다형홍반, 양성점막유천포창 및 지도상설이 있으며⁷³⁾, 스트레스가 소인인 병소로는 재발성 단순포진 구내염과 급성 괴사성 궤양성 치은염등이 있다⁷⁴⁾. 또한 스트레스성 습관때문에 나타나는 병소로는 못물기 등에 의한 외상, 흡연에 의한 백반증, 구강조직 깨물기, 이갈이나 이악물기가 있고⁷⁵⁾, 스트레스성 구강 징후로는 설통이나 설열감, 미각변화, 미각소실 또는 미각이상 그리고 조직의 변화없이 발생하는 동통이나 불편감 등이 있다⁶⁰⁻⁶⁴⁾. 더우기 스트레스와 관련되어 나타나는 병소와 증상, 징후들은 많은 경우에 있어 구강건조증을 동반하게 되는데, 이것이 동반될 경우 그 증상의 정도는 더욱 심화되며 임상적으로 매우 중요한 의미를 가지

게 된다.

본 실험에서 나타난 스트레스 부여군 실험 3주 후에 선포조직이 미약하게나마 변화를 보였던 것은 구체적인 원인은 알 수 없으나 스트레스가 신경학적으로나 생화학적으로 변화를 초래하여 이루어진 현상이 아닌가 생각된다.

동식물에 존재하며 전자전달에 관여하는 철단백질인 cytochrome은 유핵세포에 존재하여 사립체에서 ATP(adenosine triphosphate) 생성과 관련된 호흡사슬의 전자전달계에 관여하는 단백질로서, 산화-환원 운반체의 역할을 하고, 특히 소포체에서는 히드록시화반응에 관여한다. 포유동물의 전자전달계에는 7종류가 알려져 있는데, 이들은 α 흡수띠에 따라서 a, b, c로 분류하기도 한다.

간장 미소체 효소(hepatic microsomal enzyme)는 활면내형질세망(smooth surface endoplasmic reticulum)에 존재하면서 약물의 산화반응을 비롯하여 glucuronid 포합반응, 일부 가수분해반응 그리고 스테로이드 호르몬과 지질 대사에 관여하는데, 간장 미소체의 20%를 차지하고 450nm에서 최고의 흡광도를 나타내는 환원상태의 CYP450은 약물과 산소의 결합부위를 제공해 주기도 한다. 따라서 일반적으로 약물의 대사속도는 CYP450의 양 즉, CYP450과 약물의 결합능력 그리고 세포막을 통과하기 위한 약물의 지방용해도에 의해 영향을 받게되는 것이다.

CYP11E는 1982년에 Koop등²³⁾에 의해 순수 분리되었고, 기질의 특이성과 유도 대사과정 등이 이미 밝혀진 바 있는데²⁴⁾ 이 CYP450은 내인성 화합물과 acetone, ether, CCl₄, benzen, pyrazole 및 pyridine과 같은 외인성 화합물²⁵⁻²⁹⁾, 그리고 nitrosamine과 같은 수용성 발암물질의 대사과정에도 중요한 역할을 하며³⁰⁻³²⁾, acetaminophen(TylenolTM)이나^{76,77)} 특히 알콜 섭취시에는 암의 발생을 높이고³³⁾, 간독성을 증가시키는 것³⁴⁾으로 알려져 있어, 질병의 원인이나 진행과정을 추적하는데 매우 중요한 인식자로 사용되어지고 있다³⁵⁾.

또한 testosterone⁷⁸⁾이나, 항결핵 및 항나병제인 isoniazid⁷⁹⁾ 등의 투여나, 고지방 식이²²⁾, 기아

^{80,81)} 상태에서도 증가되며, 실험적으로 STZ로 유도된 당뇨 백서^{82,83)}에서도 증가된다는 보고가 있다. 뿐만 아니라 CYP450은 간독성을 증가시키는³⁴⁾ 만성적인 알콜섭취시에도 뇌에서 다량 검출되는 것⁸⁴⁾으로 보아 CYP450의 각 장기에 대한 영향과 그 효과에 대해서는 향후 많은 연구가 필요하리라 생각된다.

강력한 환원제로 열과 공기에 약하고, 산성에서 보호되는 비타민 C(ascorbic acid)는 비타민 E, beta-carotene 등과 더불어 산화를 방지하고⁸⁵⁾ CYP450 대사에도 중요한 역할을 하며, 특히 결핍시에는 Cytochrome b₅와 Cytochrome c 환원제(EC 1.6.99.3)에 영향을 미치며^{86,87)}, 기질의 수산화와 탈메틸화에도 영향을 미친다^{88,89)}.

더우기 본 실험의 대상으로 삼았던 타액선 세포의 표면에는 alpha, beta-adrenergic, muscarinic-cholinergic, substance P, vasoactive intestinal peptide hormone, 그리고 ATP 수용체 뿐만 아니라 ascorbate가 고도로 농축되어 있어서 pyrimidines, intracellular calcium, catecholamines, 그리고 타액선 분비에 관여하는 기타 여러 종류의 신경전달물질등의 대사에 관여한다고 알려져 있다⁹⁰⁾.

이에 저자는 구강건조증을 야기시키는 타액선의 기능장애시에 비타민 C에 의해 영향을 받는 CYP450의 변화를 타액선 조직에서 구명하려 하였으며, 또한 1995년 전과 홍³⁶⁾의 연구에서 알콜 투여시에서 뿐만 아니라 스트레스 부여시에도 guinea pig의 간 조직에서 Cytochrome P450 IA1(CYP1A1), Cytochrome P450 IA2(CYP1A2), 및 Cytochrome P450 IIB1(CYP1B1) 등이 뚜렷이 발현되었던 결과를 바탕으로 스트레스 부여시에 타액선 조직에서의 CYP450이 구강건조증과 상호 관련성이 있는지의 여부를 관찰해 보려 하였다. 그러나 본 실험에서는 타액선 조직에서는 관찰되지 않았으나 대조군으로 사용하였던 간 조직내에서 당뇨군, 스트레스 부여군, 그리고 당뇨-스트레스 병용군 모두에서 CYP1B1이 다량 검출되었던 것으로 보아 스트레스에 의해 간 조직에서는 CYP1B1을 필요로하는 대사작용, 즉 화학적 반응이 왕성하게 일어나, 타액선에서

는 미약한 것이라고 생각되며, 이를 구명하기 위해서는 향후 Cytochrome P450 IA1(CYP1A1), Cytochrome P450 IA2 (CYP1A2), 및 Cytochrome P450 IIB1 (CYP1B1) 등 CYP450의 다양한 동족형체로 타액선에 대한 계속적인 확인이 요구될 것으로 사료되며, 면역전기영동법 이외에도 면역형광검사법 등의 새로운 관찰법으로 다양하게 관찰하는 것이 중요하리라 생각된다.

V. 결 론

저자는 당뇨와 스트레스가 타액선 조직에 미치는 영향을 관찰하고자 알콜대사시 유도되며, 발암전구물질을 활성화시킨다고 알려진 Cytochrome P450 IIE1(CYP1IIE1)을 이용하였으며, 생후 10주된 웅성 백서 63마리를 대조군 3마리, 당뇨 유도군, 스트레스 부여군 그리고 당뇨-스트레스 병용군을 각각 20마리씩으로 배정하여 실험하였다.

당뇨 유도군은 Streptozotocin(40mg/kg)을 꼬리정맥내 주사하였고, 스트레스 부여군은 한냉 스트레스를 일일 2회 30초간 0~3°C 냉수에서 매일 잠수시켜 부여하였으며, 당뇨-스트레스 병용군은 당뇨 유도군에 한냉 스트레스를 일일 2회 30초간 0~3°C 냉수에서 매일 잠수시켜 부여하였다.

실험동물은 각군 공히 4마리씩 실험 즉일, 1주, 2주, 3주, 4주에 각각 희생시켜 이하선 조직과 간 조직을 적출하여 즉시 -70°C에 냉동보관 후 면역전기영동법으로 검색하였으며, Hematoxylin-Eosin 중염색을 실시하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 당뇨 유도군에서 이하선의 선포세포는 실험 1주 후에 심한 조직변화를 보였고, 시일이 경과됨에 따라 점차 회복되었다.
2. 당뇨 유도군에서 이하선의 결체직 중격조직은 실험 1주 후에 위약하고 불규칙해지기 시작하여 시일이 경과됨에 따라 점차 심화되었다.
3. 스트레스 부여군에서 이하선은 실험 3주 후에 선포세포가 다소 이개되었으나, 조직학적으로

- Biochem Biophys Res Commun. 180:91-97. 1991.
48. Gibbons, R.J. and Hay, D.I. : Human Salivary Acidic Proline-rich Proteins and Statherin Promote the Attachment of *Actinomyces viscosus* LY7 to Apatite surfaces. *Infect Immun.* 55: 439-445. 1988.
 49. Strous, G.J. and Dekker, J. : Mucin-type Glycoproteins, *CRC Rev Biochem Mol Biol* 27:7-92. 1992.
 50. Biesbrock, L.A., Reddy, M.S. and Levine, M.J. : Interaction of a Salivary Mucin-Secretory Immunoglobulin A Complex with Mucosal Pathogens. *Infect Immun.* 59:3492-3497. 1991.
 51. 김기석 : 구강질환의 감별진단, 4판, 지성출판사, 서울, 1991, pp62.
 52. Shafer, W.G., Hine, M.K., Levy, B.M. : A textbook of oral pathology. 4th ed., W.B. Saunders Co., 1983.
 53. Gorlin, R.J., Goldman, H.M. : Diseases of salivary gland in Thomas. *Oral Pathology.* Vol.2, 6th ed., St. Louis, 1970, The C.V. Mosby Co.
 54. Culter, L.S., Pinney, H.E., Christian, C., Russotto, S.P. : Ultrastructural studies of the rat submandibular gland in streptozotocin induced diabetes mellitus. *Virchow Arch A. Pathol. Anat. and Histol.*, 382:301, 1979.
 55. Anderson, L.C., Johnson, D.A. : Effects of alloxan diabetes on rat parotid gland and saliva. *Comp. Biochem. Physiol.*, 70B:725, 1981.
 56. Morris, P.A., Prout, R.E., Protor, G.B., Garrett, J.R., Anderson, L.C. : Lipid analysis of the major salivary glands in streptozotocin-diabetic rats and the effects of insulin treatment. *Oral Biol.*, 37:489, 1992.
 57. Murrach, V.A., Crosson, J.T., Sauk, J.J. : Parotid gland basement membrane variation in diabetes mellitus. *J. Oral Pathol.*, 14:236, 1985.
 58. Russel, B.G. : Gingival changes in diabetes mellitus. I. vascular changes. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, 86:161, 1966.
 59. Anderson, L.C., Garrett, J.R., Suleiman, A.H., Chan, K.M. : Secretory edema in diabetic submandibular glands during parasympathetic nerve stimulation : relationship to microvascular abnormalities in streptozotocin-treated rats. *Comp. Biochem. Physiol. A.*, 103(A):145, 1992.
 60. Browning, S., Hislop, S., Scully, C., and Shirlaw, P. : The association between burning mouth syndrome and psychosocial disorders. *Oral Surg. Oral Path. Oral Med.*, 64:171-174, 1987.
 61. Hampf, G., Vikkula, J., Ylipaavalniemi, P., and Aalberg, V. : Psychiatric disorders in orofacial dysaesthesia. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 16:402-407, 1987.
 62. Lamb, A.B., Lamey, P.-J., and Reeve, P.E. : Burning mouth syndrome : Psychological aspects. *Br. Dent. J.* 165:256-260, 1988.
 63. van der Ploeg, H.M., van der Wal, N., Eijkman, M.A.J., and van der Waal, L. : Psychological aspects of patients with burning mouth syndrome. *Oral Surg. Oral Path. Oral Med.*, 63:664-668, 1987.
 64. Kleinhaus, I.E.M., Baht, R., and Littner, M. : Antecedents of Burning Mouth Syndrome - recent life event vs. psychopathologic aspects. *J. Dent. Res.* 73:567-572, 1994.
 65. Fox, R., Howell, F. : Oral problems in patients with Sjögren's syndrome. *Scand. J. Rheumatol. Suppl.*, 61:194-200, 1986.
 66. 김영준 : 스트레스와 정신의학. *대한신심스트레스학회지*, 1(1):97-102, 1993.
 67. Lundberg, U. : Human psychology in Scandinavia : II Psychoneuroendocrinology - human stress and coping processes. *Scand. J. Psych.*, 25:214-226, 1984.
 68. Frankenhaeuser, M. and Lundberg, U. : Sympathetic-adrenal and pituitary-adrenal response to challenge. In P. Pichot, P. Berner, R. Wolf & K. Thau(Eds., *Psychiatry*, Vol. 2, London, 1985. Plenum, pp.699-704.
 69. Levine, S., Coe, C. and Wiener, S.G. : Psychoneuroendocrinology of stress : A psychobiological perspective. In *Psychoendocrinology*. Academic Press, 1989, pp.341-377.
 70. 김형석, 안재성 : 한냉스트레스하에서의 흰쥐 뇌중 Catecholamine의 분비량 변화에 관한연구. *대한신심스트레스학회지*, 1:17-26, 1993.
 71. Sadowski, J., Kurkus, J. and Chwalbinska, J. : Plasma hormone and renal function change in unrestrained dogs exposed to cold. *Am. J. Physiol.*, 228 : 376, 1975.
 72. Macleod, R.I. : Psychologic factors in oral lichen planus. *Br. Dent. J.*, 173(3):88, 1992.
 73. Waldron, C.A. : Psoriasiform lesions of the oral mucosa. *Oral Surg.*, 37:872-888, 1974. Wysocki, G.P., Daley, T.D. : Benign migratory glossitis in patients with juvenile diabetes. *Oral Surg.*, 63:68-70, 1987.

74. Longo, D. and Koehn, K. : Psychosocial factors and recurrent genital herpes : A review of prediction and psychiatric treatment studies. *Int's Psychi. Med.*, 23:99-117, 1993.
75. Pingitore, G., Chrobak, V. and Petrie, J. : The social and psychologic factors of bruxism. *J. Prosthet. Dent.*, 65:443-6, 1991.
76. Morgan, E., Koop, D., and Coon, M. : Comparison of rabbit liver Cytochrome P450 isozymes in formation of a reactive metabolite of acetaminophen. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 112:8-13, 1983.
77. Raucy, J., Lasker, J., Lieber, C. and Black, M. : Acetaminophen activation by human liver Cytochrome P450 IIE1 & P450 IA2. *Arch. Biochem. Biophys.* 271:270-283, 1989.
78. Pan, J., Hong, J.Y., and Yang, C.S. : Post-transcriptional regulation of mouse renal Cytochrome P450 2E1 by testosterone. *Arch. Biochem. Biophys.* 299:110-115, 1992.
79. Park, K.S., Sohn, D.H. and Song, B.J. : Translational activation of ethanol-inducible Cytochrome P450(Cyp2E1) by isoniazid. *Europ. J. Pharma.* 248:7-14, 1993.
80. Hong, J.Y., Pan, J., Gonzalez, J.F., Gelboin, H.V. and Yang, C.S. : The induction of specific form of Cytochrome P450(P-450j) by fasting. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 142:1077-1083, 1987.
81. Tu, Y.Y., and Yang, C.S. : High-affinity nitrosamine dealkylase system in rat liver microsomes and its induction by fasting. *Cancer Res.* 43:623-629, 1983.
82. Past, M.R. and Cook, D.E. : Effect of diabetes on rat liver Cytochrome P450, Evidence for a unique diabetes-dependent rat liver Cytochrome P450. *Biochem. Pharmacol.* 31:3329-3334, 1982.
83. Peng, R., Tennant, P., Lorr, N.A. and Yang, C.S. : Alteration of microsomal monooxygenase system & carcinogenic metabolism by streptozotocin-induced diabetes in rats. *Carcinogenesis (Lond)*. 4:703-708, 1983.
84. Anadatheerthavarada, H.K., Shankar, S.K., Song, B.J., Bramre, S., Boyd, M.R. and Ravindranath, V. : Induction of brain Cytochrome P450 IIE1 by chronic ethanol treatment. *Brain Res.* 601:279-285, 1992.
85. Frei, B. : Reactive oxygen species and antioxidant vitamins : mechanisms of action. *Am. J. Med. Sep.* 26. 97(3A):5S-13S, 1994.
86. Leber, H., Degkwitz, E. and Staudinger, H. : Studies on the effect of ascorbic acid on the activity and biosynthesis of mixed function oxygenases, as well as the concentration of hemoproteins in the micro some fraction of guinea pig. Hoppe-Seyler's *Z. Physiol. Chem.*, 350:439, 1969.
87. Degkwitz, E. and Kim, K.S. : Comparative studies on the influence of L-ascorbate, D-avabino-ascorbate and 5-oxo-D-gluconate on the amounts of cytochromes P450 and b5 in liver microsomes of guinea pig. Hoppe-Seyler's *Z. Physiol. Chem.*, 354:555, 1973.
88. Kato, R., Takanaka, A., and Ohshima, T. : Effect of Vitamin C deficiency on the metabolism of drug and NADPH-linked electron transport system in liver microsome. *Jap. J. Pharmac.* 19:25, 1969.
89. Zannoni, V.G., Flynn, E.J., and Lynch, M. : Ascorbic acid and drug metabolism. *Biochem. Pharmac.* 21:1377, 1972.
90. Enwonwu, C.O. : Ascorbate status and xerostomia. *Med. Hypotheses, Sep.* 39(1):53-57, 1992.

- ABSTRACT -

The Effect of Salivary Gland of Streptozotocin Induced Diabetic Rats by Stress

Hung-Mo Kim, D.M.D., M.S.D., Yang-Hyun Chun, D.M.D., M.S.D.,
Jung-Pyo Hong, D.M.D., M.S.D., Ph.D.

Dept. of Oral Diagnosis & Oral Medicine, College of Dentistry, Graduate School, Kyung Hee University.

Cytochrome P450 is an oxidase involved in oxidation of alcohol and is known to be an activator of carcinogen.

The present study was performed to analyze the effect of diabetes and cold stress on the expression of Cytochrome P450 IIE1(CYP1IIE1) in the liver and salivary glands in rats by an immunoblot analysis.

Sixty three were divided into 4 groups; 1) 20 rats belonging to group I were allowed diabetes(40mg/kg. I.V.) 2) 20 rats of group II were bathed in cold water for 30 seconds twice a day 3) 20 rats comprising group III were received diabetes and cold stress as described above 4) 3 rats of group IV were selected as a control.

The rats were sacrificed at the end of the same day 1, 2, 3, 4weeks experimet. The liver and parotid glands were removed and stored at -70°C until use. The stored organs were homogenized for 10 seconds and the supernatants were obtained by centrifugation. The proteins of the supernatants were separated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and subjected to Western blotting. The blotted membranes were incubated with polyclonal antibodies to CYP1IIE1.

And specimens were observed with light microscope also under the Hematoxillin-Eosin staining.

The obtained results were as follows :

1. In diabetes group, acini had changed to degeneration severly 1week after experiment, but repaired gradually in lapse of time.
2. In diabetes group, septal connective tissues had changed to degeneration little by little from 1week after experiment, and progressed severely in lapse of time.
3. In stress group, acini had not changed remarkably, but slightly separated each other 3weeks after experiment.
4. In diabetes and stress group, histological feature had changed remarkably compare with in the group of diabetes only.
5. In all experimental group, CYP1IIE1 had expressed remarkably in the liver tissues, but not in the parotid gland tissues.
6. In diabetes and stress group, CYP1IIE1 had expressed remarkably compare with in the group of diabetes only.

EXPLANATION OF FIGURES

- Fig. 1. Photograph shows immunoblot analysis of Cytochrome P450 IIE1 (CYP1IIE1) in the rat liver. (ST: standard marker, NP: normal parotid gland, NL: normal liver, SP: stress parotid gland, SL: stress liver, DP: diabetes mellitus parotid gland, DL: diabetes mellitus liver, SDP: stress-diabetes mellitus parotid gland, SDL: stress-diabetes mellitus liver)
- Fig. 2. Photograph shows parotid gland which has not been changed in the group of immediated after experiment. (H-E stain, X100, stress group)
- Fig. 3. Photograph shows acini which are atrophic changed and separated slightly in the group of 3weeks after experiment. (H-E stain, X100, stress group)
- Fig. 4. Photograph shows acini which are atrophic changed and separated severely in the group of 1week after experiment. (H-E stain, X100, diabetes group)
- Fig. 5. Photograph shows septal connective tissues which are atrophic changed severely in the group of 4weeks after experiment. (H-E stain, X100, diabetes group)
- Fig. 6. Photograph shows acini which are atrophic changed and separated severely in the group of 1week after experiment. (H-E stain, X100, diabetes and stress group)
- Fig. 7. Photograph shows acini which are destructed multiple and severely in the group of 2weeks after experiment. (H-E stain, X100, diabetes and stress group)

논문사진부도 ①

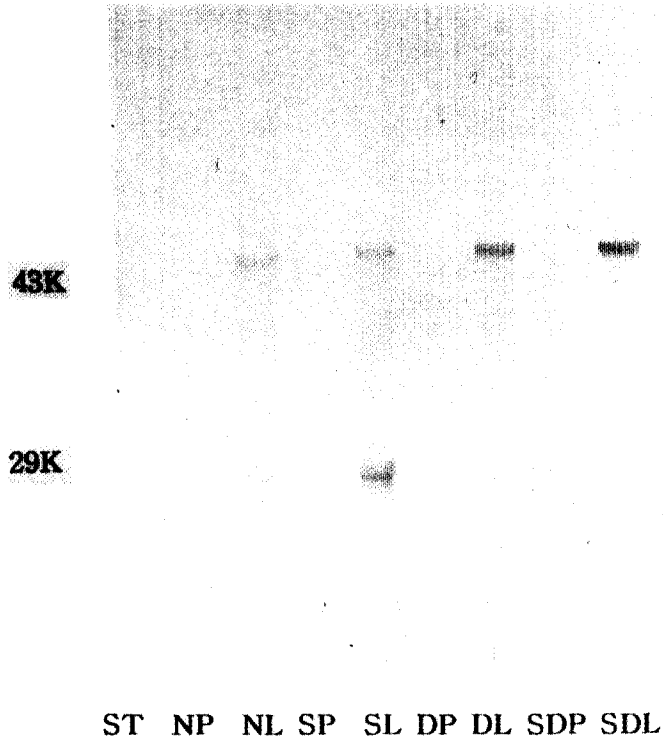


Fig. 1.

ST : Standard Marker
N : Normal Group
S : Stress Group
D : Diabetes Mellitus(DM) Group
SD : Stress-DM Group
L : Liver
P : Parotid Gland

논문사진부도 ②

