

# 스트레스에 의한 혈당변화가 타액선내 Clusterin 발현에 미치는 영향

경희대학교 치과대학 구강내과학교실

김 선 호 · 전 양 현 · 이 진 용 · 조 한 국 · 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

현대인들에게는 다양한 증상과 징후를 나타내는 스트레스성 질환이 증가되고 있는 추세에 있다. 스트레스란 신체의부로부터의 모든 요구에 대한 생체의 비특이적 반응으로 적응증후과정(general adaptation system: GAS)을 거치며<sup>1)</sup>, 신경내분비계의 생리적 반응과 정서적 반응을 나타낸다<sup>2)</sup>.

스트레스와 구강안면영역의 질환과의 관계에 대하여 전과 홍<sup>3)</sup>의 보고에 의하면, 구강건조증, 구취 및 여러 구강점막질환 및 두개하악장애 등의 다양한 증상이나 징후가 상호 연관성을 가지고 나타난다.

그 중 스트레스와 타액선과의 관계에 대해서는

Kleinhaus<sup>4)</sup>의 조사에 의하면 타액선의 기능저하로 구강건조증이 나타났다고 하였는데, 이러한 구강건조증은 구강 점막병소를 유발시키고 이상감각증을 야기시키며 구취를 발생시키기도 한다<sup>5)</sup>.

구취는 구강내에서 일어나는 부패작용이나 구강의 신체요인에 의하여 발생되어 사회생활에 장애요인이 되기도 할 뿐만 아니라, 신경성 질환을 일으키는 요인이 되기도 한다<sup>6)</sup>. 일반적으로 구취는 전신질환, 구강질환에 의한 구취, 생리적인 구취로 분류되는데, 전신질환으로 비인두장애, 호흡기장애, 소화기장애, 탈수, 당뇨병, 간질환, 신질환 등과 구강질환으로 치주염, 치아우식증, 치관주위염, 의치, 악성종양, 설태 등이 원인이 되며, 생리적 구취의 원인으로는 폐로 배출되는 약물, 음식물, 아침 구취, 공복시 구취, 월경 등을 들 수 있다.

구취의 발생은 타액내의 상피, 결합조직, 음식물잔사, 구강내 세균 등이 구강내 효소에 의해 분해됨으로써 methyl mercaptan(CH<sub>3</sub>SH), hydrogen sulphide(H<sub>2</sub>S) 그리고 dimethyl sulphide((CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>S) 등과 같은 휘발성 황화물이 생성되며<sup>7)</sup>, 구강탈락상피, 타액소체, 음식물잔사, 타액 및 혈액 등도 미생물의 부패 작용을 통해 휘발성 화합물인 methyl mercaptan 등으로 발생되기 때문이다<sup>8)</sup>. 이 과정은 모든 사람에게서 일어날 수 있지만 치은염, 치주염, 급성괴사성치은염같이

조직이 변성되는 질환에서 두드러지게 나타나며<sup>9)</sup>, cysteine이나 환원된 glutathione 및 peptone 같은 free thiol군을 지닌 물질 등에 의해서도 즉시 구취가 발생될 수 있다고 보고된 바 있다<sup>10)</sup>.

타액은 구강점막을 보호하고 윤활작용을 하며, 항균작용, 혈액 응고작용, 완충작용, 소화작용, 수분대사의 조절작용, 배설작용 및 용매작용 등 건강한 구강상태를 유지하는데 매우 중요한 역할을 한다<sup>11,12)</sup>.

타액분비는 타액선에 분포되어 있는 설인신경과 안면신경의 부교감신경과 상경신경절의 교감신경 등에 의해 조절되는데, 타액선에서 타액자체가 생성되지 않거나 타액의 분비기전에 이상이 생겼을 경우 타액분비 이상이 발생되며, 이로 인해 타액선의 가역적 또는 비가역적 기능장애 징후인 구강건조증<sup>13)</sup>이 나타날 수 있다. 이것은 임상적으로 구강내 위생 및 건강상태에 큰 영향을 미치게 되는데, 당뇨병과 같은 내분비계 이상이나 스트레스 등에 의하여 타액의 분비양과 성분 등이 변화되어 발생할 수도 있다.

특히 스트레스는 이하선, 악하선 및 설하선 등의 대타액선에도 큰 영향을 미쳐, 당뇨병 등의 질병시에 타액선에서 관찰되며 구강내에 유리됨으로써 Streptococcus를 응집시켜 치주질환이나 구취 등을 유발시키는 황단백질인 sulphide glycoprotein (SGP-2)을 분비시키기도 한다<sup>14)</sup>.

SGP-2는 보체조절, 생식, 지방수송, 신경변성, 내분비 및 발생과정 중 다양한 조직의 분화 등과 관련이 있는 것으로 알려져 있으며, 시험관에서 이 단백질에 의해 세포응집이 발생하기 때문에 Clusterin이라고도 하나<sup>15,16)</sup>, 이는 동물의 종, 기관 또는 조직에 따라 단백질의 기능 및 크기에서 차이를 보이기 때문에 아직까지 다양한 이름으로 불리어지고 있다<sup>17,18)</sup>. 최근 Clusterin의 다양한 생리학적 기능과 역할이 점차 밝혀지고는 있지만 아직까지 추측에 불과할 뿐이며, 이를 규명하기 위한 연구가 다방면으로 진행되고 있다<sup>19)</sup>.

스트레스는 비특이적 반응인 교감신경성 부신수질계와 뇌하수체성 부신피질계를 중계하여 나타나는 것인데<sup>20,21)</sup>, 교감신경성 부신수질계는 육체적 또는 정신적 노력과 정서적 자극에 의해

서 카테콜아민, 특히 에피네프린과 노어에피네프린을 유리시키며<sup>22,23)</sup>, 뇌하수체성 부신피질계는 고뇌, 분노, 우울 및 무절제 등에 의해서 콜티코스테로이드와 콜티솔<sup>24,25)</sup>을 분비시키게 된다.

그 결과 혈당, 총 콜레스테롤 및 락트산 탈수소효소 (lactate dehydrogenase: LDH), 알칼리성 인산화효소 (alkaline phosphatase: ALP), 글루탐 옥살아세트산 아미노기 전달효소 (glutamate-oxaloacetate transaminase: GOT), 글루탐피루브산 아미노기 전달효소 (glutamate-pyruvate transaminase: GPT) 등의 간장효소 농도가 증가하게 되므로, 이들의 혈중 농도 수치변화가 스트레스의 표시자로 쓰여지고 있다.

이에 저자는 전과 홍<sup>3)</sup>의 실험결과와 스트레스와 당뇨시 모든 타액선에서 Clusterin이 검출되었던 점을 중시하여, 스트레스와 당뇨의 공통점이 혈당의 증가라는데 착안하고 혈당이 Clusterin 발현에 어떠한 영향을 미치는지의 여부를 알아보고자 본 실험을 시행한 결과 유의성 있는 결과를 얻었기에 이를 보고하는 바이다.

## II. 실험재료 및 방법

### 1. 실험재료

실험동물은 생후 6주된 웅성백서 40마리를, 정상대조군과 스트레스 확인군에 각각 5마리, 실험대조군인 스트레스군과 실험군인 스트레스 부여 후 인슐린 투여군에 각각 15마리씩을 배정하여 실험하였다. 스트레스 부여군은 실험 전 기간 동안 3-5°C 냉수에 일일 2회 5분간 잠수시켜 한냉 스트레스를 부여하였다. 실험 후 즉일, 3일, 5일, 7일, 10일에 각각 혈액을 채취하여 혈당, LDH-LQ, Total Cholesterol, GOT, GPT, ALP 등의 수치 변화로 스트레스 유발을 확인한 후 희생시켜 좌우측 악하선 및 이하선을 절취하여 Clusterin mRNA에 대한 면역조직화학적 관찰과 면역전기영동법 관찰을 시행하였고, 실험군도 인슐린을 투여한 후 한냉 스트레스를 부여하여 동일 방법으로 관찰하였다.

## 2. 실험방법

실험동물을 에테르로 흡입마취시킨후 악하선과 이하선을 절취하여 mRNA검색(Northern blotting)을 위하여  $-70^{\circ}\text{C}$ 에서 보관하였으며, 조직조건을 관찰할 조직은 Bouin 용액에 1일간 고정시킨후 75% 에탄올에 보관하였다.

### (1) 혈청생화학검사 :

한냉 스트레스 부여 직후 혈액을 채취하여 시행하였으며, 혈청 생화학 검사를 위한 시약은 아산제약 주식회사의 혈청생화학검사 세트의 시약을 이용하여 다음과 같은 방법으로 하였다.

혈당은 혈청 0.02ml를 효소시액 3.0ml와 잘 혼합하여  $37^{\circ}\text{C}$ 에서 5분간 방치한 것과, 효소시액만으로 같은 조건을 부여한 것(시약 blank)을 40분 이내에 상호 대조하여 파장 550nm에서 흡광도를 측정하여 시행하였다.

LDH-LQ의 측정은 기질정색액 1.0ml를  $37^{\circ}\text{C}$ 에서 5분간 방치 후 혈청 0.05ml를 잘 혼합하여  $37^{\circ}\text{C}$ 에서 다시 10분간 방치한 후 회색반응 정지액 3.0ml를 잘 혼합한 것을, 혈청대신 증류수를 0.05ml를 혼합하여 동일한 과정을 거치게 한 시약 blank와 대조하여 60분 이내 570nm에서의 흡광도를 측정하여 시행하였다.

Total Cholesterol의 측정은 효소법을 이용하여 혈청 0.02ml에 3.0ml의 효소용액을 넣은 후 잘 혼합하여  $37^{\circ}\text{C}$ 에서 5분간 방치한 것과, 시약 blank로서 혈청 없이 효소 용액만을 넣고 같은 조건을 부여한 것을 상호 대조하여 60분 이내에 파장 500nm에서 흡광도를 측정 하였다.

GOT와 GPT의 측정은 Reitman-Frankel 법을 사용하여 시험관에 기질액 1.0ml를 넣고  $37^{\circ}\text{C}$ 에서 5분간 방치한 후 혈청 0.2ml를 넣고 잘 혼합하여  $37^{\circ}\text{C}$ 에서 GOT는 60분간, GPT는 30분간 방치한 후 정색시액 1.0 ml를 넣고 실온에서 20분간 방치하였고, 0.4N NaOH용액 10ml를 넣고 잘 혼합하여 실온에서 10분간 방치한 후 60분 이내에 505nm(490~530nm)에서 증류수를 대조로 흡광도를 측정하여 시행하였다.

ALP-S의 측정은 Kind-King법을 이용하여

기질완충액 2.0ml를 넣고  $37^{\circ}\text{C}$ 에서 5분간 방치한 후 혈청 0.05ml를 넣고  $37^{\circ}\text{C}$ 에서 정확히 15분 방치한 후 정색시액 2.0ml를 넣은 후 실온에서 10분이상 방치한 것을, 시약 blank 로서 혈청 대신 증류수 0.05ml를 넣은 것을 상호 대조하여 60분 이내에 파장 500nm 또는 570nm에서 흡광도를 측정하여 검량선에서 ALP치를 구하였다.

### (2) 면역조직화학 검색법 :

적출된 악하선과 이하선 조직을 bouin용액에 24시간 동안 고정된 후 통법에 의해 탈수, 투명 처리한 후 paraffin에 포매하였으며, 5~10 $\mu\text{m}$  정도 두께로 잘라서 L-lysine으로 처리된 슬라이드 위에 붙인 후 보관 상자에 담아 실온에서 보관하였다. 사용 직전에 슬라이드를 xylene에 5분간씩 3회 담구어 파라핀을 제거하였다. 100%, 95%, 80% 에탄올에 2분간씩 차례로 담가 다시 조직에 수분을 공급하였다.

위와 같이 처리된 파라핀 고정 절편을 3% 과산화수소수와 메탄올을 1:4로 혼합한 용액속에 담구어 약 20분간 서서히 진탕하여 세포내에 존재하는 peroxidase를 제거한 후 흐르는 물에 약 5분간 세척하였고 PBS(Phosphate buffered saline)에서 5분간 다시 세척하였다.

2% 염소혈청을 위와 같이 처리된 조직위에 떨구고 물에 적신 흡착지를 바닥에 깔아 건조를 방지한 150mm 조직배양접시에 넣어 30분간 실온에 방치한 후 염소혈청을 깨끗한 흡수지로 흡수해 내고 일차항체(1:1,000~2,000)를 조직위에 떨군 후 위와 동일한 방법으로 실온에서 2시간 방치하였다.

이어서 PBS를 조직위에 흘려서 일차항체를 씻어 내고, 다시 PBS가 들어 있는 coplin jar에 넣어 5분간 흔들며 세척하였으며, 이차항체(1:200~1:500)를 조직위에 떨구고 30분간 일차항체와 동일한 방법으로 처리 하였다.

그후 avidin-biotin-peroxidase complex(Vector Lab. USA)를 조직위에 떨구고 30분간 건조를 방지한 조직배양접시에 넣어 실온에 방치하였으며, PBS로 세척하였고, 과산화수소수와 DAB(3, 3'-diaminobenzidine)의 혼합용액을 조

직위에 떨구고 5~20분간 방치한 다음 흐르는 물에 5분간 세척하였다.

마지막으로 대조염색을 1분정도 시행하고 물로 세척한 후 80%, 95%, 100%에탄올로 탈수하고 xylene에 담구어 면역염색을 완성한 후 검경 용액을 사용하여 커버슬립을 덮어 영구슬라이드를 제작하였다.

Clusterin항체는, FOMC 단백질합성 과정과 double HPLC로 정제된 돼지의 Clusterin  $\alpha$ -subunit(NH<sub>2</sub>-GDRIDSLMENDRQQS-COOH-1765.9 amu, 134-148th aminoacid) 부위로 면역된 뉴질랜드 백토에서 추출하였다.  $\alpha$  (2.2mg) peptide을 Inject Super Carrier EDC system (Pierce Rockford H.)을 통해 음이온화된 BSA에 결합시켰다. 항원은 Freund's complete adjuvant로 에멀전화 한 후 뉴질랜드 백토의 배면에 피하 주사하여 일차 면역을 유도하였다. 백토에 2-3주간격으로 반복하여 면역접종 시켰고 면역혈청은 3차접종후 10일째에 주기적으로 채득하였다.

### (3) 면역전기영동검사 (mRNA 검색 ; Northern blotting) :

먼저 Total RNA Isolation은 Chomzinsky의 방법(1987)을 사용하였다. 적출된 조직에 solution D(4M Guanidium thiocyanate, 25mM Sodium citrate pH7.0, 0.5% Sarcosyl, 0.1M 2-mercaptoethanol) 500 $\mu$ l를 더하여 잘 섞은후 15분 동안 냉동상태를 유지하며 세포를 완전히 용해시켰다. 이를 다시 각각 Eppendorff tube에 옮겨 2M sodium acetate(pH4.0) / phenol(pH4.0) / CIAA를 0.1/1/0.2의 volume으로 더하여 잘 섞은 후 15분 동안 냉동상태에 방치하였고, 12,000rpm에서 20분 원심분리하여, 상층을 얻고 동량의 isopropanol을 더하여 -70°C에서 overnight하였다. 이를 다시 12,000rpm에서 20분 원심분리하고, 얻어진 pellet을 70% 에탄올로 세척한 후 건조시켰다.

그 후 분리되어 정량된 RNA sample을 5 $\mu$ g취하여 이를 denatured-formaldehyde gel(1% agarose, 1×MOPS, 0.6M formaldehyde)에 전기영동한후, EtBr(0.5 $\mu$ g/ml)로 염색하고, 수시간 탈색하여 겔내에 잔존하는 EtBr을 최대한 제거

했다. 탈색 겔을 10×SSC에서 나일론막으로 capillary transfer하고, 80°C에서 2시간 동안 고정하였다.

이어서 Clusterin sequence중 310base pair정도를 PCR을 수행하여 cloning한 뒤 이를 pBluescript KS(+)에 subcloning하여 T7 RNA polymerase와 <sup>32</sup>P-UTP를 이용하여 antisense cRNA를 합성하여 본 실험의 Northern blot analysis의 probe로 사용하였다.

마지막으로 미리 준비된 막에 hybridization solution(1.5×SSC, 50% deionized formamide, 0.5% non-fat dry milk, 1%SDS, 20mM sodium phosphate, pH6.9)을 더하여 55°C에서 2시간 prehybridization시킨 후, denaturation된 riboprobe(25ng/ml)를 더하여 같은 온도에서 12시간 hybridization하였다. 2×SSC, 0.1% SDS로 74°C를 유지하며 2시간 동안 충분히 세척하여 비특이적 결합을 최소화하였다. 세척이 끝난 뒤 막에 X-ray 필름을 넣어 -80°C에서 노출하였다.

## III. 실험성적

### 1. 정상대조군

#### (1) 혈액생화학적 소견

혈당(mg/dl)은 128.5, LDH-LQ(Wroblewski 단위)는 760, Total Cholesterol(mg/dl)은 121.5, GOT(Karmen단위)는 600, GPT(Karmen 단위)는 280, ALP-S(K-A단위)는 27이었다.

#### (2) 면역조직화학적 소견

백서의 악하선은 장액선과 점액선의 혼합선으로, 악하선의 장액선은 이하선조직과 같이 호염기성의 많은 과립과 기저부축에 위치한 핵을 갖는 둥근 모양의 세포로서, 여러개의 세포들이 소엽을 이루고 있었다. 이들은 결합조직 중격에 의하여 서로 결합되었으며, 세포사이에는 단층의 키가 작은 입방세포로 이루어진 개재관과 모세혈관들이 산재되어 있었고, 교원섬유가 주성분이 되는 소엽간 결합조직내에는 단층의 원주상피로 이루어진 선조관과 풍부한 소혈관이 분포

되어 있었다.

악하선의 점액선은 세포질이 주로 탄수화물을 함유하고 있어 잘 염색되지 않았으며, 기저부측에 매우 납작한 핵을 가지고 있었고 피라미드 모양이었다. 이들 역시 소엽으로 나누어져 있었으며, 소엽사이에는 중앙에 핵을 가진 키가 작은 호산성의 입방형세포가 둥글게 개재관을 형성하고 있었고, 원주형의 선조관과 다수의 혈관들도 분포되어 있었다.

면역조직화학적 소견에서 Clusterin mRNA는 악하선의 장액선 개재관세포 세포질에서 중등도로 염색되었으며, 선조관세포의 세포질에서는 미약한 염색상이 관찰되었으며, 점액선의 개재관세포 세포질에서 매우 농염되었고, 선포세포의 세포질에서는 매우 미약하게 관찰되었던 반면(Fig. 1, 2), 이하선의 장액선에서는 개재관세포에서 미약하게 담염되었을 뿐 조직 전반에 걸쳐 관찰되지 않았다(Fig. 3).

### (3) 면역전기영동검사소견

악하선과 이하선 조직은 공히 분자량이 47 KDa과 34KDa이며 disulfide linked heterodimer인 Clusterin mRNA가 거의 발현되지 않았다(Fig. 12, 13).

## 2. 실험대조군(스트레스 부여군)

### (1) 혈액생화학적 소견

즉일군, 3일군, 5일군, 7일군, 10일군에서 다음의 결과를 얻었다. 혈당(mg/dl)은 각각 141, 217, 154, 187, 148이었다. LDH-LQ(Wroblewski단위))는 680, 640, 840, 640, 600이었다. Total Cholesterol(mg/dl)은 각각 133, 173, 133, 139, 117이었다. GOT(Karmen단위)는 각각 720, 960, 720, 720, 720이었다. GPT(Karmen 단위)는 각각 360, 280, 280, 440, 320이었다. ALP-S(K-A단위)는 각각 24, 48, 24, 62, 30이었다.

### (2) 면역조직화학적 소견

악하선은 실험 3일후에 정상대조군에 비해 세포질이 다소 과립상으로 변하며 Clusterin

mRNA가 미약하게 증가되었고(Fig. 4), 실험 5일후에는 장액선 개재관세포 세포질에서 매우 농염되었으며, 선포세포 세포질 전반에 걸쳐 중등도의 염색상이 관찰되었다(Fig. 5). 또한 이하선의 장액선에서는 실험 3일후의 개재관세포에서 농염된 Clusterin mRNA가 관찰되었으며 선포세포의 세포질 내에서도 부분적으로 미약한 정도의 과립성 염색상을 관찰할 수 있었다(Fig. 6). 그러나 실험 5일후에는 개재관세포 세포질의 염색도가 다시 담염되어 정상대조군과 유사한 소견을 보였다(Fig. 7).

### (3) 면역전기영동검사소견

악하선의 실험 5일후와 이하선의 실험 3일후에 Clusterin mRNA가 뚜렷하게 표현되었으나, 나머지 기간에서는 Clusterin mRNA가 매우 미약하거나 음성적으로 관찰되었다(Fig. 12, 13).

## 3. 실험군(Insulin 투여후 스트레스 부여군)

### (1) 혈액생화학적 소견

즉일군, 3일군, 5일군, 7일군, 10일군에서 다음의 결과를 얻었다. 혈당(mg/dl)은 각각 127, 151, 178, 115.5, 165이었다. LDH-LQ(Wroblewski단위))는 각각 720, 760, 760, 800, 680이었다. T.C(mg/dl)는 각각 146, 120.5, 111.5, 103.5, 127.5이었다. GOT(Karmen단위)는 각각 780, 760, 640, 800, 940이었다. GPT(Karmen 단위)는 각각 240, 380, 260, 460, 440이었다. ALP-S(K-A단위)는 각각 30, 51, 43, 64, 62이었다.

### (2) 면역조직화학적 소견

Clusterin mRNA는 악하선의 장액선과 점액선, 이하선 모두에서 실험 전군에 걸쳐 정상대조군과 별차이 없이 개재관세포 세포질이 중등도의 염색소견을 보였을 뿐, 전반적으로 Clusterin mRNA염색에 음성적 반응을 보였다(Fig. 8, 9, 10, 11).

### (3) 면역전기영동검사소견

악하선과 이하선조직 모두에서 실험 전군에

결쳐 Clusterin mRNA가 뚜렷하게 표현되지 않았다.

#### IV. 총괄 및 고안

인간은 지속적으로 물리적 또는 심리적 자극을 받으면서 살아가며, 생활수준이 높아짐에 따라 이러한 자극들에 의한 반응은 더욱 심화되고 있다. 따라서 스트레스라는 단어가 여러 방면에서 사용되어지게 되었고, 더 이상 형이상학적 차원이 아니라 구체적이고 가시적인 증상과 징후를 동반한다는 사실을 깨닫게 됨에 따라 임상가 뿐만이 아니라 일반인들에게도 관심이 증대되고 있다. 그 결과 스트레스에 관한 연구도 눈부신 발전을 이루어 심리학적 접근 뿐 아니라 분자생물학적 접근으로도 활발히 진행중이다.

스트레스는 외부로부터의 모든 요구에 대한 생체의 비특이적 반응으로, 스트레스원은 어떤 경우에도 스트레스를 일으킬 수 있는 것으로 정의되는데<sup>26)</sup>, 일반적으로 스트레스를 받게되면 생체는 놀람기, 저항기 및 탈진기를 거치는 일반적인 적응증후과정(general adaptation system: GAS)을 보인다<sup>2)</sup>.

스트레스는 생리적으로 자율신경계, 호르몬 또는 내분비계 및 면역계 등에 영향을 미치게 되는데<sup>27)</sup>, 갑자기 닥친 심한 스트레스가 정신기능에 장애를 일으키면 해리장애가 일어나고, 운동신경기능에 장애를 일으키면 전환장애가, 자율신경이나 말초신경에 장애를 일으키면 심신장애가 초래된다<sup>28)</sup>.

현재 중추신경계에서 신경전달물질이라고 확실히되고 있는 물질들로는 스트레스 부여시 관찰되는 노어아드레날린과<sup>29)</sup> 부신피질자극 호르몬<sup>30)</sup>, 급성 스트레스와 만성 스트레스를 교대로 부여했을 때 증가되는 아드레날린<sup>31)</sup>, 구속 스트레스시에 증가되는 아세틸콜린<sup>32)</sup>, GABA(gamma aminobutyric acid)<sup>33)</sup>, 급성 스트레스시에 증가되는 substance P<sup>34)</sup>, 전기충격 스트레스시의 오피오이드<sup>35)</sup>, 한냉 스트레스시의 갑상선자극 호르몬<sup>36)</sup> 등이 보고된 바 있다.

스트레스의 인지과정은 신경내분비계의 조절

로 생리적 과정과 정서적 반응을 나타낸다<sup>2)</sup>. 즉 인체의 비특이적 반응은 교감신경성 부신수질계와 뇌하수체성 부신피질계가 중계하여 나타나는 것이다<sup>20,21)</sup>.

교감신경성 부신수질계는 육체적 또는 정신적 노력과 정서적 자극에 의해서 카테콜아민, 특히 에피네프린과 노어에피네프린을 유리시키며<sup>22,23)</sup>, 뇌하수체성 부신피질계는 고뇌, 분노, 우울 및 무질제 등에 의해서 콜티코스테로이드와 콜티솔<sup>24,25)</sup>을 분비시키게 된다.

일반적으로 심리적 스트레스에서는 혈장 노어에피네프린보다 에피네프린 분비량이 증가되고<sup>37,38)</sup>, 물리적 스트레스에서는 혈장 노어에피네프린이 더 증가된다고 보고되어 있으나<sup>39-41)</sup>, 이와 같지 않은 경우가 관찰되기도 한다<sup>42,43)</sup>.

또한 한냉 스트레스를 백서에게 부여시 혈장 노어에피네프린 수치가 증가되었고, 개의 경우에는 혈장 17-하이드록시콜티코이드와 노어에피네프린의 양이 증가되었으며, 백서의 뇨중 카테콜아민의 분비량도 변화되었다고<sup>42)</sup> 보고된 바 있다.

사람에서는 손을 냉수에 넣어 한냉 스트레스를 부여할 경우 혈중 베타엔돌핀, 콜티솔, 프로락틴, 성장호르몬 그리고 오피오이드작용에 변화가 나타났으며<sup>44)</sup>, 한냉 부여 초기에는 남자의 경우 혈압이 상승되었고 맥박은 늦어졌으며, 피부 온도는 남녀 모두에서 하강되었으나, 후기에는 여자에서 피부 온도가 현저히 저하되었고 남녀 모두에서 베타엔돌핀, 부신피질자극 호르몬, 콜티솔 및 성장호르몬이 상승되었으나 여자에서 더욱 현저하였는데<sup>45)</sup>, 한냉 환경하에서의 이와 같은 피부 온도변화는 혈장 노어에피네프린의 농도 상승과 깊은 관계가 있는 것으로 알려져 있다<sup>46)</sup>.

이에 대해 Calabrese등<sup>47)</sup>은 스트레스, 별거 및 우울은 면역학적 기능을 취약하게 한다는 명백한 증거를 보고하였고, Kiecolt-Glaser등<sup>48)</sup>은 고독, 스트레스, 뇨중 콜티솔치 및 면역기능과의 상호관계에 대해서 언급하였으며, Kiecolt-Glaser 등<sup>49)</sup>은 일상적으로 일어나는 스트레스에 의해서도 면역기능의 저하가 초래된다고 보고한 바 있다.

이와같이 스트레스에 의한 교감신경성 부신수질계 및 뇌하수체성 부신피질계의 활성 결과 혈당, 혈청 콜레스테롤 및 간장효소 등의 농도가 증가하게 되므로, 이들의 혈중농도 수치 변화가 스트레스의 지표로 쓰여지고 있다<sup>50,51)</sup>.

스트레스는 혈당을 올릴 수 있는 여러 신경내분비적 반응을 활성화시킨다. 뇌하수체성 부신피질계가 활성화되면 당류 콜티코이드의 분비가 증가되고, 간에서 당신생이 증가되며, 당의 세포내 섭취가 감소된다. 스트레스에 의해 분비된 성장호르몬도 당의 세포내 섭취를 감소시킨다. 스트레스를 받은 경우 분비가 항진되는 베타 엔돌핀은 췌도 세포에서의 인슐린 분비를 억제하고 결과적으로 혈당을 증가시킨다. 이와 같이 스트레스는 여러 경로를 통해 혈당에 영향을 미칠 수 있으며, 스트레스에 의해 발생하는 일련의 대사 변화가 당 대사에 결함이 있는 당뇨병 환자에서는 혈당을 악화시킬 수 있는 인자로 작용할 것으로 사료된다. 또한 혈당이 증가되면 그 자체가 당에 대한 췌장의 대응능력을 더욱 저하시키는 이른바 당독성을 유발시켜 췌장의 인슐린 분비능을 더욱 감소시킬 가능성이 있다<sup>52)</sup>.

또한 스트레스에 의한 혈청 콜레스테롤치도 상승하게 되는데, 우선 교감신경계가 흥분하면 지방질 대사에 영향을 주게된다. 즉, 알파-1 수용체나 안지오텐신이 활성화되면 지단백리파제를 억제하여 중성지방치를 상승시키고, 고비중 지단백 콜레스테롤치를 감소시키며, 저비중 지단백 대사를 억제하여 콜레스테롤치를 상승시키기도 한다. 또한 과다분비된 콜티솔이 단백질 이화작용을 증가시켜 탄수화물과 지방을 증가시켜서 혈중 총 콜레스테롤 농도가 증가된다. 혈청 콜레스테롤치도 우울증, 적개심, 불안 등에 의해서도 그 정도에 비례하여 상승된다<sup>52)</sup>.

스트레스에 의해 신체내 장기들도 손상받거나 파괴되는데, 부신에서 콜티솔과 카테콜아민 분비가 증가되면 심박동수, 심율동, 혈압 등에 영향을 주어 순환기 질환이 발생되며<sup>52)</sup>, 간조직내 거대식세포 고갈에 의한 간조직 괴사<sup>53)</sup>, 간세포 핵산 DNA의 산화적 손상<sup>54)</sup> 및 간, 심장과 뇌에서의 마그네슘 대사 이상<sup>55)</sup> 등이 관찰되었다. 이와같은

조직 손상 시에 각 조직에 포함되어 있는 효소가 혈장으로 유출되므로, 혈장농도의 변화로 각 조직의 기능 및 스트레스의 유발 여부를 측정할 수 있다<sup>56-58)</sup>. 이 중 락트산 탈수소효소(lactate dehydrogenase: LDH), 알칼리성 인산화효소(alkaline phosphatase: ALP), 글루탐옥살아세트산 아미노기 전달효소(glutamate-oxaloacetate transaminase: GOT), 글루탐피루브산 아미노기 전달효소(glutamate-pyruvate transaminase: GPT) 등은 혈장 농도 변화로 간기능을 측정할 수 있는 간장효소로서, 심장과 근육세포 손상시에도 혈장으로 유출된다<sup>50,51)</sup>.

이에 저자는 스트레스시에 혈액내에서 변화를 보이는 LDH, GOT, GPT, glucose, ALP 등을 측정함으로써 실험동물이 스트레스에 영향을 받았는지를 확인하는 지표로 삼았던 바, 스트레스 부여군에서 LDH는 다소 감소, ALP는 감소내지 증가되었으나, 혈당과 TC, GOT, GPT는 증가되어 실험동물이 스트레스에 영향을 받았던 것으로 판정하였다.

구강안면영역은 치아, 치주조직, 혀, 악관절 및 타액선 등으로 이루어져 독특한 고유기능을 지니고 있으며, 스트레스에 의해 다양한 반응이 나타나는데, 특히 정동 스트레스에 대한 구강안면영역 질환의 종류는 매우 다양하다<sup>3)</sup>.

구체적으로 스트레스가 주원인인 병소로는 편평태선과 아프타구내염이 있으며<sup>59,60)</sup>, 스트레스가 관여된 병소로는 다형홍반, 양성점막유착포창 및 지도상설이 있고<sup>61,62)</sup>, 스트레스가 소인인 병소로는 재발성단순포진구내염과 급성괴사성 궤양성치은염이 있으며<sup>63,64)</sup>, 스트레스성 습관으로 인한 병소로는 못물기 등에 의한 외상, 흡연에 의한 백반증, 구강조직 깨물기 및 이같이와 이악물기가 있고<sup>65,66)</sup>, 스트레스성 구강 징후로는 설통과 설열감, 미각변화와 미각소실 또는 미각이상 그리고 조직에 변화가 없는 동통이나 불편감 등이 있다<sup>67,68)</sup>.

특히, 구강내 독특한 성분인 타액은 대타액선에서 분비된 타액과 구강점막, 입술, 경구개와 연구개, 혀 등에 분포된 소타액선으로 부터 분비된 타액이 합쳐진 혼합타액으로서, 하루에 분비되

는 총량은 약 1~1.5리터로 알려져 있다<sup>69)</sup>.

타액은 구강내에서 완충작용, 소화작용, 광화작용, 윤활 및 점탄성작용, 점막보호작용, 항진균작용, 항바이러스작용, 그리고 항균작용 등을 하는데, 타액 성분에 따라 그 기능이 다양하게 나타난다.

타액분비는 타액선에 분포되어 있는 설인신경과 안면신경 등의 부교감신경과 교감신경 등의 신경활동에 의해 조절되는데, 타액선에서 타액 자체가 생성되지 않거나 타액의 분비기전에 이상이 생겼을 경우 타액선 질환이 발생하게 되며, 이로 인해 타액선의 가역적 또는 비가역적 기능 장애징후인 구강건조증<sup>13)</sup>이 나타날 수 있다. 이것은 임상적으로 구강내 위생 및 건강상태에 큰 영향을 미치게 되는데, 당뇨병과 같은 내분비계 이상이나 스트레스 등에 의하여 타액의 분비율과 성분 등이 변화되어 발생할 수 있다.

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 말하며<sup>13)</sup>, 이는 임상적으로 매우 중요한 의미를 가지고 있어, 구강내의 국소적 염증이나 타액선의 감염, 섬유종, 탈수 또는 신경안정제, 항히스타민 및 항콜린제 등의 약물, Mikulicz씨 질환과 Sjögren 증후군과 같은 자가면역질환, 화학요법제, 방사선 조사, 심인성 요인 등에 의해서 발생된다<sup>70)</sup>.

타액선 기능이상은 타액선 도관의 물리적 폐쇄, 타액선 실질의 파괴, 그리고 분비기전의 약리학적 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.

이하선은 부교감신경에 의해 영향을 받으며, 자극에의해 타액을 분비하는 조직으로 전과 흥은 스트레스, 당뇨 단독부여시 악하선에서는 공히 실험 3일후에 본 실험에서 관찰한 Clusterin이 미약하게 발현되었다가 실험 5일후에 뚜렷하게 발현되었던 반면, 이하선에서는 공히 실험 3일후에 조기 발현되었던 이유는 이하선이 악하선에 비하여 외부 환경변화에 대해 예민하게 반응하였기 때문일 것이라고 보고한 바 있다<sup>14)</sup>.

이와 같이 혈당이 증가되는 상황에서 타액선의 분비가 임상적으로 감소된다는 것은 치과분야에서 간과할 수 없는 사실이라고 생각되며 이에 본 실험을 실시하게 되었다.

구취는 구강내에서 일어나는 부패작용이나 구강의 신체요인에 의하여 발생된다. 이러한 구취는 사회생활에 장애요인이 되기도 할 뿐만 아니라, 신경성 질환을 일으키는 요인이 되기도 한다<sup>6)</sup>.

구취의 원인은 다양한데, 일반적으로 전신질환, 구강질환, 생리적 구취로 나뉘며 전신질환에는 비인두장애, 호흡기장애, 소화기장애, 탈수, 당뇨병, 간질환, 신질환 등이 있고, 구강질환에는 치주염, 치아우식증, 치관주위염, 의치, 악성종양, 설태 등이 있으며, 생리적 구취에는 폐로 배출되는 약물, 음식물에 의한 구취, 아침 구취, 공복시 구취, 월경시에 발생하는 구취 등이 있다. 이러한 구취가 심할 경우 커다란 사회적 징후를 나타내는데, 환자는 구취문제에 대해 매우 민감해지거나 심하면 사회적으로 고립되기도 한다<sup>71)</sup>.

구취에 대한 역학조사 결과는 매우 다양한데, Crohn등<sup>72)</sup>은 구강내 원인이 미약하게 작용한다고 주장한 반면, Prinz<sup>73)</sup>는 90%이상, Sulser등<sup>74)</sup>은 47%, Brening<sup>75)</sup>은 구취의 85%가 구강에서 기원한다고 보고하였다. 또한 치아우식, 치은염, 치주염이 구취의 발생과 강도를 증가시킨다<sup>75)</sup>는 보고가 있는 반면, 구취를 지닌 사람의 대다수가 치주조직이 건강했으며 설배면후방이 구취생성



의 주된 장소라고 주장하는 학자도 있어<sup>76)</sup> 구취의 원인에 대하여는 확실하게 밝혀진 정설은 없고 여러가지 주장만이 존재할 뿐이다.

최근에는 구강내의 효소가 타액중에 존재하는 상피, 결합조직, 음식물잔사, 구강내 세균 등을 단백질원으로 하여 분해하므로써 methyl mercaptan(CH<sub>3</sub>SH), hydrogen sulphide(H<sub>2</sub>S), 그리고 dimethyl sulphide((CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>S) 등과 같은 휘발성 황화물을 생성하는데<sup>7)</sup>, 특히 methyl mercaptan이 구취의 주성분이라고 보고되었다. 즉 내인성, 외인성 단백질성 물질, 즉 구강탈락상피, 타액소체, 음식물잔사, 타액 및 혈액 등에 대한 미생물의 부패작용을 통해 휘발성 황화합물이 발생하여 구취가 발생하는 것이다<sup>8)</sup>. 이 과정은 모든 사람에서 일어나지만 치은염, 치주염, 급성 괴사성치은염과 같이 조직이 변성되는 질환을 갖고있는 사람에서 두드러지게 나타난다<sup>9)</sup>. 또한 cysteine, 환원된 glutathione 및 peptone 같은 free thiol군을 지닌 물질 등은 구취를 가장 즉각적으로 발생시킨다고 보고된 바 있다<sup>10)</sup>.

구강내에서 세균들을 응집하여 치주질환을 유발시키며 구취를 발생시킬 수 있는 황단백질인 sulphide glycoprotein(SGP-2)은 보체조절, 생식, 지방수송, 신경변성, 내분비 및 발생과정중 다양한 조직의 분화 등과 관련이 있는 것으로 알려져 있으며, 시험관에서 세포를 응집시키기 때문에 Clusterin이라고 일컫기도 한다<sup>15,16)</sup>. Clusterin은 동물의 종, 기관 또는 조직에 따라 단백질의 기능 및 크기에서 차이를 보이기 때문에 아직까지 여러가지 이름으로 불리어지고 있으나<sup>17,18)</sup>, Clusterin의 다양한 생리학적 기능과 역할이 점차로 밝혀지고 있으며, 이를 규명하기 위한 다방면의 연구가 진행되고 있다<sup>19)</sup>. Clusterin(SGP-2)은 흰쥐의 Sertoli cell에서 합성, 분비되는 단백질로 분자량이 47KDa과 34KDa인 disulfide linked heterodimer이다<sup>77)</sup>. 또한 포유류의 여러 부위에서 다양한 양상으로 발견되어, 이름도 매우 다양하게 불리어지고 있다<sup>78,79)</sup>.

Clusterin, SGP-2, testosterone repressed prostate message 2 (TRPM-2), ADHC-9, apolipoprotein J(ApoJ), complement lysis inhibitor

(CLI), glycoprotein III(GpIII), glycoprotein 80(Gp80), serum protein 40,40(SP-40,40), TB16 등으로 불리우는 이 단백질들은 1992년 Clusterinrin workshop에서 이들 물질들을 Clusterin으로 통칭하게 되었다<sup>80)</sup>. Clusterin은 Grisword에 의해 배양된 백서 Sertoli cell에서 합성, 분비되는 모든 단백질을 two-dimensional gel electrophoresis를 통해 검출되었다. Reverse-phase high performance liquid chromatography를 사용하여 정제한 Clusterin은 아미노산 분석 방법으로 aspartyl derivatives(11.1%), glutamin(15.1%) 및 leucine(11.5%) 등이 높은 수준으로 존재하고 있음을 알아냈으며, 23.7% carbohydrate(1% fucose, 3.5% mannose, 4.1% galactose, 7.1% N-acetylglucoseamine 및 8.0% N-acetylneuroaminic acid)을 함유하고 있는 것으로 보고되었다<sup>81)</sup>.

Clusterin에 의한 세포응집능력은 단백질 구조에 의한 것으로 생각되는데, Clusterinrin과 세포간의 상호작용은 당화에 의한 것일 수도 있으며<sup>82)</sup>. 실제로 정액의 Clusterin에서 당화부분을 제거하면 세포응집력을 갖지 않는 혈장의 Clusterin과 같은 양상을 보여 세포응집능을 잃어버린다<sup>19)</sup>.

이에 저자는 본실험에서 스트레스시에 증가되는 Clusterin이 혈당을 낮춰주는 Insulin을 투여할 때 발현되지 않았던 상관관계를 보다 더 깊이 있게 추구해야 할 것이며, 타액선에서 발현된 Clusterin이 정액이나 혈장의 것과 구조적으로 어떠한 차이를 가지고 있는지를 밝혀야 할 것으로 생각된다.

세포의 생명현상은 그 생성, 분화, 퇴행성 변화를 거쳐 소멸에 이르기까지 생화학적, 분자생물학적 및 형태학적 변화를 동반하면서 이루어진다. 생체의 생명현상과정중 세포내에서 합성 또는 분비되는 물질의 기능을 밝히는 연구는 성장과 퇴행성 변화를 이해할 수 있는 중요한 정보를 제공한다. Saunders는 1966년 처음으로 세포죽음이 다세포 유기체의 발달에 있어서 normal morphogenetic events와 같이 programming 되어 있을 것이라고 제안하였다<sup>83)</sup>.

Clusterin은 바로 이러한 programmed cell death와 관계가 있는데, 성숙한 수컷의 쥐를 거세하면 프로스테이트 상피가 apoptosis에 의하여 퇴축되는데 이때 사멸하는 프로스테이트 상피로부터 20배가량 증가된 TRPM-2의 mRNA가 cloning되었으며, 이는 Clusterin과 동일한 것으로 확인되었다<sup>84)</sup>. 이러한 것에 대한 예로는 테스토스테론 차단에 의한 프로스테이트 퇴화, 신장내의 유체압력 증가에 의한 손상, 손가락 발생시 손가락 사이 조직의 퇴화 및 세포내 독성화합성분에 의한 조직손상 등이 포함된다<sup>85)</sup>. 이러한 소견은 apoptosis에 있어서 Clusterin이 어떤 역할을 할지 모른다는 것을 암시한다<sup>86)</sup>.

이에 저자는 세균이 개재되지 않은 상태에서 스트레스는 생체조직에 apoptosis를 유발시킬 가능성이 있다는 가정하에 본 실험을 실행하였던 바 스트레스 부여시 타액선 조직에서 Clusterin이 증가한 것을 발견하였다.

또한 구취에 대한 진보적 접근을 위한 노력의 일환으로 구강내 미생물을 응집시켜 구취를 발생시킬 수 있다고 생각되는 Clusterin이 분비되는 기전을 연구함에 있어, Clusterin이 streptozotocin (STZ) 유도 당뇨병과 한냉 스트레스시에 타액선에서 유의성있게 검출되었던 결과를 토대로 하여<sup>14)</sup>, Insulin 투여 후 스트레스 부여군에서 혈당치가 불규칙하기는 하였으나 다소 감소되어 Insulin에 의한 혈당의 억제효과가 나타났던 것으로 판단함에 따라 이 결과 Insulin 투여 후 스트레스부여시에 Clusterin이 발현되지 않았던 것은 Clusterin의 발현과정에서 혈당이 중요한 역할을 하는 것으로 생각된다.

## V. 결 론

저자는 당뇨병과 스트레스시에 타액선에서 관찰되며 구취의 원인으로 알려진 황화합물의 일종인 Clusterin(Sulfide Glycoprotein:SGP-2)의 발현이 혈당의 변화와 상관관계가 있는지의 여부를 확인하고자 생후 6주된 체중 250-300g인 웅성백서 총 40마리를 사용하여 정상대조군 10마리, 실험대조군 15마리, 실험군 15마리를 배정

하여 실험대조군은 실험 전기간 동안 3-5℃ 냉수에 1일 2회 5분간 잠수시켜 한냉 스트레스를 주었고, 실험군은 Insulin을 근육주사후 실험군과 같은 방법으로 한냉 스트레스를 부여하였다.

각군 공히 실험 후 즉일, 3일, 5일, 7일, 10일에 각각 혈액을 채취하여 LDH, GOT, GPT, ALP, TC, Glucose 수치 변화로 스트레스 유발을 확인한 후 희생시켜 좌우측 악하선, 및 이하선을 절취하여 Clusterin에 대한 면역조직화학적 및 면역전기영동법으로 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 면역조직화학적 검사의 정상대조군에서 Clusterin은 악하선의 개재관세포에서 중등도로 반응되었고, 선조관세포의 세포질에서는 미약하게 반응되었으며, 악하선 점액선의 개재관세포 세포질은 강반응, 이하선의 개재관세포는 약반응, 선포세포에서도 음성반응을 보였다.
2. 면역조직화학적 검사에서 스트레스 부여군 실험 3일후에 악하선의 선포세포에서 Clusterin이 다소 증가되기 시작하여 실험 5일후에는 과립상의 염색체가 중등도의 양성반응을 보였으며, 이하선에서도 실험 3일후의 개재관세포에서 Clusterin이 강반응을 보였고, 선포세포 세포질 내에서도 부분적으로 미약하게 반응되었다.
3. 면역조직화학적 검사에서 Insulin 투여후 스트레스 부여군에서는 실험 전군에 걸쳐 정상대조군과 별다른 차이점을 발견할 수 없었다.
4. 면역전기영동법에서 스트레스 부여군 악하선에서는 실험 5일후에, 이하선에서는 실험 3일후에 Clusterin mRNA가 뚜렷하게 발현되었다.
5. 면역전기영동법에서 Insulin 투여후 스트레스 부여군에서는 악하선과 이하선 모두에서 전 실험군에 걸쳐 Clusterin mRNA가 뚜렷하게 발현되지 않았다.

## 참고문헌

1. Seley, H. : The general adaptation syndrome and

- the disease of adaptation. *J. Clin. Endocrinol.*, 6: 117, 1946.
2. Shires, G.T. : Important factors in the maintenance of homeostasis in the surgical patient. *Acta. Chir. Scand. (Suppl)*, 550:29-35, 1988.
  3. 전양현, 홍정표 : 스트레스와 구강질환. *대한신심스트레스학회지*, 3(1):57-72, 1995.
  4. Kleinhauz, I.E.M., Baht, R. and Littner, M. : Ante-cedents of Burning Mouth Syndrome-recent life event vs. psychopathologic aspects. *J. Dent. Res.*, 73:567-572, 1994.
  5. Malcom A.L., Vernon J.B., Martin S.G. : *Burket's oral medicine-Diagnosis And Treatment*, 9th edi, J.B.Lippincott Company, 1994.
  6. 김종배, 백대일, 문혁수, 마득상 : 플라보노이드와 동엽록소 및 페파민트를 배합한 추잉검의 구취억제에 관한 연구, *대한구강보건학회지*, 14(1), 1990.
  7. Mel R. : *Bad Breath:Research Perspectives*, 2nd edi, Ramot Publishing-Tel Aviv University, 1995.
  8. Massler, M., Emslie, R.D. and Bolden, T.E. : Fetor ex ore. *Oral Surg.*, 4:110, 1951.
  9. Spouge, J.D. : Halitosis. A review of its causes and treatment. *Dent. Pract.*, 14:307, 1964.
  10. 角田正健 : *日齒周誌*, 17(1), 233, 1975.
  11. 이승우 : *구강진단학*, 4판, 고문사, 서울, 1990.
  12. 이종훈, 김중수 : *구강생리학*, 3판, 군자출판사, 서울, 1989.
  13. 김기석 : *구강질환의 감별진단*, 4판, 지성출판사, 서울, 1991.
  14. 전양현, 홍정표 : 스트레스가 streptozotocin 유도 당뇨백서 타액선의 Clusterin(SGP-2) 변화에 미치는 영향에 관한 분자생물학적 연구, *대한신심스트레스학회지*, 5(2):13-32, 1997.
  15. Sally A.L. and Philip E.M. : Clusterin expression during programmed and teratogen-induced cell death in the postimplantation rat embryo. *Teratology*, 52:41-54, 1995.
  16. Fritz, I.B., Burdzy, K., Setchell, B. and Blaschuk, O. : Ram rete testis fluid contains a protein(Clusterin) which influences cell-cell interactions in vitro. *Biol Reprod.*, 28:1173-1188, 1983
  17. Aronow, B.J., Lumd, S.D. and Brown, T.L. : Apolipoprotein J expression at fluid-tissue interfaces: potential role in barrier cytoprotein. *Pror. Natl. Acad. Sci.*, 90:725-729, 1993.
  18. Michel, D., Chabot, J.G. and Moyses, E. : Possible functions of a new genetic marker in central nervous system: the sulfated glycoprotein-2. *Synapse*, II, 105-111, 1992.
  19. 정성윤, 민본홍 : 흰쥐 뇌장에서의 SGP-2의 발현, 1994.
  20. Cannon, W.B. : The emergency function of the adrenal medulla in pain and the major emotions. *Am. J. Physiology*, 33:356-372, 1914.
  21. Seley, H. : *Stress without distress*. J.B. Lippincott Comp., Philadelphia, 1974.
  22. Frankenhaeuser, M. : Psychoneuroendocrine approaches to the study of the emotion as related to stress and coping. In H.E. Howe & R. A. Dienstbier(eds.), *Nebraska symposium on motivation 1978*. Lincoln: University of Nebraska Press., 1979.
  23. Levi, L. : Stress and distress in response to psychosocial stimuli. *Acta. Med. Scand.(Supple)*, 1972.
  24. Frankenhaeuser, M., Lundberg, U. and Chesney, M. : *Women, work, and health. Stress and opportunities*. New York: Plenum Press, 1991.
  25. 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: Plenum, 1985.
  26. Selye, H. : Forty years of stress research: principal remaining problems and misconceptions. *Canad. Med. Ass. J.*, 115:53-56, 1976.
  27. Milsom, J.H. : A model of the eustress system for health/illness. *Behavioral Science*, 30:179-186, 1985.
  28. 김영준 : 스트레스와 정신의학. *대한신심스트레스학회지*, 1(1):97-102, 1993.
  29. Tanaka, M., Kohno, Y., Nakagawa, R., Ida, Y., Takeda, S. and Nagasaki, N. : Time-related differences in noradrenalin turnover in rat brain regions by stress. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 16:315-319, 1982.
  30. Guyton : *Textbook of medical physiology*. 8th ed., pp.848, Philadelphia, WB Saunders Co., 1991.
  31. Nukina, I., Glavin, G.B. and Labella, F.S. : Acute cold-resistant stress affects alpha 2-adrenoreceptors in specific brain regions of the rat. *Brain*

- Res., 401:30-33, 1987.
32. Finkelstein, Y., Koffler, B., Rabey, J.M. and Gilad, G.M. : Dynamics of cholinergic sympathetic mechanisms in Rat Hippocampus after stress. *Brain Res.*, 343:314-319, 1985.
  33. Yoneda, Y., Kanmori, K., Ida, S. and Kuriyama, Y. : Stress-induced alteration in metabolism of r-aminobutyric acid in rat brain. *J. Neurochem.* 20: 350, 1983.
  34. Dudar, J.D. : The effect of septal nucleus stimulation on the release of acetylcholin from the rabbit hippocampus. *Brain Res.*, 83:123-133, 1975.
  35. Rossier, J., Guillemin, R. and Bloom, F. : Foot shock induced stress decrease leu-enkephalin immunoreactivity in rat hypothalamus. *Eur. J. Pharmacol.*, 48:465-466, 1978.
  36. Arancibia, S., Tapia-Arancibia, L., Assenmacher, I. and Astier, H. : Direct evidence of short-term cold-induced TRH release in the median eminence of unanesthetized rats. *Neuroendocrinology* 37:225-228, 1983.
  37. Eliasson, K., Hjerndahl, P. and Kahan, T. : Circulatory and sympatho adrenalresponses to stress in broderline and established hypertension. *J. Hypertens.*, 1:131, 1983.
  38. LeBlanc, J., Cote, J., Jobin, M. and Labrie, A. : Plasma catecholamines and cardiovascular responses to cold and mental cativity. *J. Appl. Physiol.*, 47:1207, 1979.
  39. Johnson, D.G. : Plasma norepinephrine responses of man in cold water. *J. Appl. Physiol.*, 43:216, 1977.
  40. Kopin, I.J., Lake, R.C. and Ziegler, M. : Plasma levels of norepinephrine. *Ann. Intern. Med.*, 88:671, 1978.
  41. Palmer, G.J., Ziegler, M.G. and Lake, C.R. : Response of norepinephrine and blood pressure to stress increases with age. *J. Gerontol.* 33:482, 1978.
  42. 김형석, 안재성 : 한냉 스트레스하에서의 흰쥐 뇌 중 Catecholamine의 분비량 변화에 관한연구. *대한신심스트레스학회지*, 1:17-26, 1993.
  43. 민병일, 한승호, 윤상협, 조영욱, 김창주, 정순동 : 치수자극에 의하여 유발된 혈압 상승 및 혈중 카테콜아민 농도의 변화에 대한 전침 자극의 영향. *대한신심스트레스학회지*, 2(1):55-62, 1994.
  44. Bullinger, M., Naber, D., Pickar, D., Cohen, R.M., Kaln, N.H. and Pert, A. : Endocrine effects of the cold pressor test: Relationships to subjective pain appraisal and coping. *Psychiatry Res.*, 12:227, 1984.
  45. Gerra, G., Volpi, R., Delsignore R., Maninetti, L., Caccavari, R., Vourna, S., Maestri, D., Chiodeva, P., Vgolotti, G. and Coiro, V. : Sex-related responses of beta-endocrine, ACTH, GH and PRL to cold exposure in humans. *Acta. Endocrinol. (Copenh.)*, 126:1, 1992.
  46. Graham, T.E., Sathasivam, P. and MacNaughton, K.W. : Influence of cold, exercise and caffeine on catecholamines and metabolism in men. *J. Appl. Pysiol.*, 70:5, 1991.
  47. Calabrese, J.R., Kling, M.A. and Gold, P.W. : Alteration in immunocompetence during stress, bereavement ang depression : Focus on neuro-endocrine regulation. *Am. J. Psychiatry*, 144(9) :1123-1134, 1987.
  48. Kiecolt-Glaser, J.K., Garner, W., Speicher, C., Ricker, D., George, J., Missick, G. and Glaser, R. : Urinary cortisol levels cellular immunocompetency and Loneliness in Psychiatric Inpatients. *Psychosomatic Medicine*, 46(1):15-30, 1984a.
  49. Kiecolt-Glaser, J.K., Garner, W., Speicher, C., Penn, G.M., Holliday, J. and Glaser, R. : Psychosocial modifiers of immunocompetence in medical students. *Psychosomatic Medicine*, 46(1):7-14, 1984b.
  50. 조태순, 이선미, 염제호, 유은주, 임승욱, 장병수, 김영만, 유영효, 박명환 : 흰쥐에서 구속스트레스에 대한 우르소테옥시콜린산의 항스트레스 효과, 약학회지, 39(5):548-553, 1995.
  51. 박인, 김양일, 이선미, 조태순 : 구속 스트레스를 가한 흰쥐에서 Cholate류의 항스트레스작용에 관한 연구, 4:162-166, 1996.
  52. 대한신심스트레스학회편 : 스트레스 과학의 이해, 신평출판사, 서울, 1997.
  53. Sekamova S.M.:Morphology & pathogenetic problems of crush syndrome, *Arkh Patol*, 49(2):3-12, 1982.
  54. Adachi S., Kawamura K., Takemoto K. : Oxidative damage of nuclear DNA in the liver of rats exposed to psychological stress, *Cancer Res*,

- 53(18):4153-4155, 1993.
55. Iakushev V.S., Ruzhov A.A., Mironova E.V. : Change in the concentraion of nonesterified fatty acids and magnesium in emotional stress, *Fiziol Zh SSSR Im IM Sechenova*, 75(8):1146-1150, 1989.
  56. Salvatore F., Sacchetti L., Castaldo G. : Multi-variate discriminant analysis of biochemical parameters for differentiation of clinically confounding liver diseases, *Clin. Chim. Acta.*, 257(1):41-58, 1997.
  57. Drent M., Cobben N. A., Henderson R.F., Wouter E.F., van Diejen-Visser M. : Usefulness of lactate dehydrogenase as indicators of lung damage or inflammation. *Eur. Respir. J.* 9(8): 1736-1742, 1996.
  58. Jones R.G., Grant P.J., Brown D., Stickland M., Wiles P.G. : Arise in the plasma activities of hepatic enzymes is not a common. *Diabet. Med.* 5(3):253-255, 1988.
  59. Macleod, R.I. : Psychologic factors in oral lichen planus. *Br. Dent. J.*, 173(3):88, 1992.
  60. Lowenthal, U. and Pisanti, S. : Oral lichen planus according to the modern medical model. *J. Oral Med.*, 39:224-226, 1984.
  61. Redman, R.S., Vance, F.L., Gorlin, R.J., Peagler, F.D. and Meskin, L.H. : Psychological component in the etiology of geographic tongue. *J. Dent. Res.*, 45:1403-1408, 1966.
  62. Waldron, C.A. : Psoriasisform lesions of the oral mucosa. *Oral Surg.*, 37:872-888, 1974.
  63. Bierman, S.M. : A retrospective study of 375 patients with genital herpes simplex infections seen between 1973 and 1980. *Cutis.*, 31:548-565, 1983.
  64. Cogen, R.B., Stevens, A.W. Jr. and Cohen-Cole, S.A. : Stressed whites especially prone to "trench mouth" study finds. *Med. News JAMA.*, 249: 157-158, 1983.
  65. Shapiro, S. and Shanon, J. : Bruxism as an emotional reactive disturbance. *Ariz. Dent. J.*, 12:13-18, 1966.
  66. Vernallis, F.F. : Teeth-grinding; some relationships to anxiety, hostility and hyperactivity. *J. Clin. Psychol.*, 11:389-391, 1955.
  67. Browning, S., Hislop, S. Scully, C. and Shirlaw, P. : The association between burning mouth syndrome and psychosocial disorders. *Oral Surg.*, 64:171-174, 1987. .
  68. Lamb, A.B., Lamey, P.J. and Reeve, P.E. : Burning mouth syndrome: Psychological aspects. *Oral Surg.*, 56:521-536, 1983.
  69. Scannapieco, F.A., Bergey, E.J., Reddy, M.S. and Levine, M.J. : Characterization of the Salivary  $\alpha$ -Amylase Binding to *Streptococcus sanguis*. *Infect Immun.* 57:2853-2863. 1989.
  70. 김기석 : 구강질환의 감별진단, 4판, 지성출판사, 서울, 1991.
  71. Gayford, J.J. and Haskell, R. : Clinical oral medicine, 2nd ed, Bristol John Wright & Sons LTD., 1979.
  72. Crohn, B. B. and Drosd, R. : Origin of mouth odors-Halitosis. *N.Y. J. Dent.*, 12:192, 1942.
  73. Prinz, H. : Offensive breath, its cause and prevention. *Dent. Cosmos*, 72:700, 1930.
  74. Sulser, G.F., Brening, K.H., and Fosdick, L.S. : Some conditions that affect the odor concentration of the breath. *J. Dent. Res.*, 18:355, 1939.
  75. Brening, R.H., Sulser, G.F., and Fosdick, L.S. : The determination of halitosis by use of the osmoscope and the cryoscopic method. *J. Dent. Res.*, 18:127, 1939.
  76. Bosy, A., Kulkani, G.V., Rosenberg, M. and McCulloch, C.A.G. : Relationship of oral malodor to periodontitis: Evidence of independence in discrete subpopulation. *J. of Periodontol.*, Jan., 37-46, 1994.
  77. Ray, H.G. and Orban, B. : The gingival structures in diabetes mellitus. *J. Periodontol.*, 21:98, 1950.
  78. Hu, Y., Nakagawa, Y., Purushotham, K.R. and HumphreysBeher, M.G. : Functional changes in salivary glands of autoimmune disease-prone NOD mice. *Am. J. Physiol.*, 263:E607, 1992.
  79. Reuterving, C.O., Hagg, E., Henriksson, R. and Holm, J. : Salivary glands in longterm alloxan-diabetic rats. A quantative light and electron-microscopic study. *Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. Sect. A.*, 95:131, 1987.
  80. Fritz, I.B. and Murphy, B. : Insight into a Multifunctional Protein. *T.E.M.*, 4(2):41-45, 1993.

- 
81. Grisword, M.D., Roberts, K. and Bishop, P. : Purification and Characterization of a Sulfated Glycoprotein Secreted by Sertoli Cells. *Biochemistry*, 25:7265-7270, 1986.
  82. Palmer, D.J. and Christie, D.L. : The primary structure of glycoprotein-III from bovine adrenal medullary chromaffin granules: sequence similarity with human serum protein-40,40 and rat Sertoli cell glycoprotein-2. *J. Biol. Chem.*, 265: 6617-6623, 1990.
  83. Saunders, J.W. : Death in embryonic system, *Science*, 154, 604-612, 1966.
  84. Leger, J. G., Montnetit, M.L. and Tenniswood, M.P. : Characterization and cloning of androgen-repressed mRNAs from rat ventral prostate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 147, 196-203, 1987.
  85. Bandyk, M.G., Sawczuk, I.S. and Olsson, C.A., : Characterization of the products of a gene expressed during androgen-programmed cell death and their potential use as a marker of urogenital injury. *J. Urol.*, Vol. 143, 407-413, 1990.
  86. French, L., Tschopp, J. and Schifferli, J. : Clusterin in renal tissue: Preferential localization within the terminal complement complex and immunoglobulin deposits within glomeruli. *Clin. Exp. Immunol.*, 88:389-393, 1992.

## Clusterin(SGP-2) in the Salivary Glands of Insulin Injected Rats under Stress

Seon-Ho Kim, D.M.D., M.S.D., Ph.D., Yang-Hyun Chun, D.M.D., M.S.D., Ph.D.,  
Jin-Yong Lee, D.M.D., M.S.D., Ph.D., Han-Guk Cho, D.M.D., M.S.D., Ph.D.,  
Jung-Pyo Hong, D.M.D., M.S.D., Ph.D.

*Dept. of Oral Medicine, College of Dentistry, Kyung Hee University*

In general, the major causative factor of halitosis is thought to be a sulfated compounds. Clusterin, a sulfated glycoprotein-2(SGP-2), is frequently found in diabetic conditions and cold stress conditions. The same result is serum glucose level to diabetic and cold stress conditions that founded Clusterin. Therefore, this study was performed to examine Clusterin in the salivary glands under stress conditions before insulin injection I.M.

Fourty rats were divided into 3 groups ; 1)10 rats of group I were selected as a control 2)15 rats belonging to group II were bathed in cold water for 30 seconds twice a day 3)15 rats in group III received cold stress and injected I.M. with insulin. The rats were sacrificed at day 0, 3, 5, 7, and 10 of the experiment and the submandibular glands and parotid glands were removed. RNAs were purified from the salivary glands and the transcription of Clusterin in the glands was measured by Northern blot analysis. The specimens of the salivary glands were subjected to Hematoxyllin-Eosin stainings and examined under the light microscope.

The obtained results were as follows:

1. With immunohistochemistic method, in normal control group, Clusterin was moderately stained in the intercalated ductal cell of the submandibular glands, mild stained in the striated ductal cell of the submandibular glands, heavily stained on the cytoplasm of the intercalated ductal cell in the mucous submandibular glands and slightly stained in the intercalated ductal cell of the parotid gland, expressed negatively in the acina cell.
2. With immunohistochemistic method, Clusterin slightly increased in the acina cell of the submandibular glands under stress condition at 3 days after experiment, moderately stained at 5 days after experiment so revealed positive response. And heavily in the intercalated ductal cell and mildly in the acina cellular cytoplasm of the parotid glands under stress condition at 3 days after experiment.
3. With immunohistochemistic method, no remarkable differences are found between the normal control group and stress conditioned group that insulin administration was performed before.
4. In the stressor-giving group, Clusterin mRNA was prominently expressed in submandibular gland after 5days after experiment, in parotid gland after 3days after experiment, performed in immunoelectrophoresis method.
5. In the insulin-injection and stressor-giving group, Clusterin mRNA was not observed in all experimental submandibular and parotid gland, performed in immunoelectrophoresis method.

---

## EXPLANATION OF FIGURES

- Fig. 1 : Serous gland, normal.
- Fig. 2 : Mucous gland, normal.
- Fig. 3 : Parotid gland, normal.
- Fig. 4 : Submandibular gland, 3 days after under cold stress.
- Fig. 5 : Submandibular gland, 5 days after under cold stress.
- Fig. 6 : Parotid gland, 3 days after under cold stress.
- Fig. 7 : Parotid gland, 5 days after under cold stress.
- Fig. 8 : Submandibular gland, 3 days after under cold stress with insulin.
- Fig. 9 : Submandibular gland, 5 days after under cold stress with insulin.
- Fig. 10 : Parotid gland, 3 days after under cold stress with insulin.
- Fig. 11 : Parotid gland, 5 days after under cold stress with insulin.
- Fig. 12 : Northern immunoblotting analysis of rat submandibular gland under cold stress.
- Fig. 13 : Northern immunoblotting analysis of rat parotid gland under cold stress.
- Fig. 14 : Northern immunoblotting analysis of rat submandibular gland under cold stress with insulin.



논문사진부도 ①

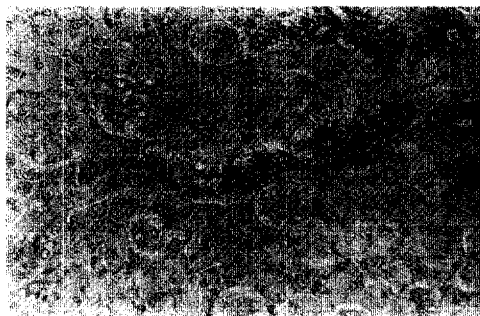


Fig. 1.

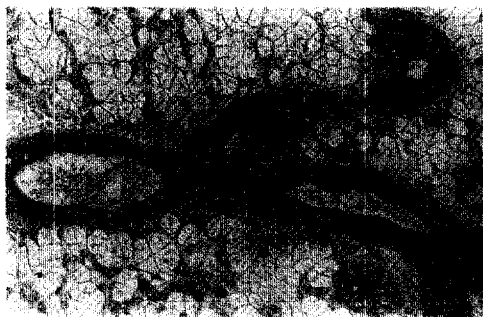


Fig. 2.

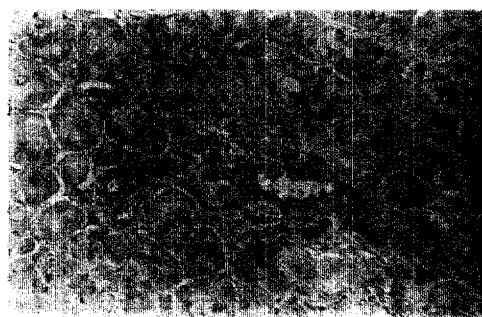


Fig. 3.

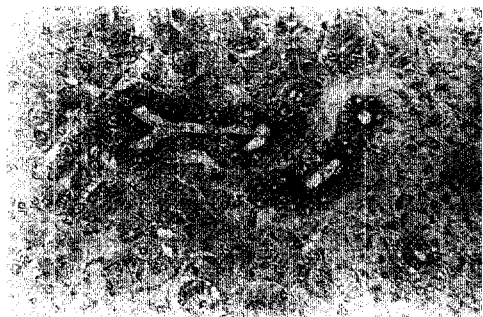


Fig. 4.



Fig. 5.



Fig. 6.



Fig. 7.

논문사진부도 ②

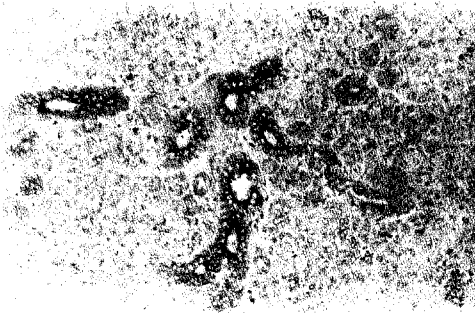


Fig. 8.

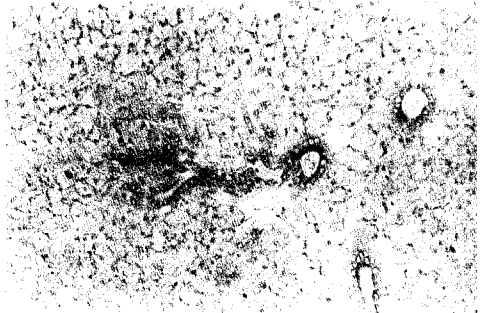


Fig. 9.

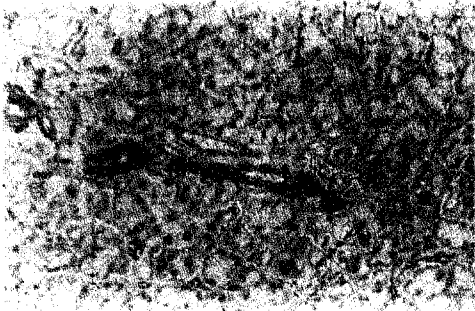


Fig. 10.



Fig. 11.

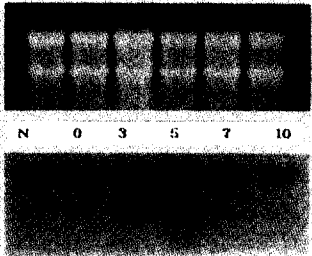


Fig. 12.

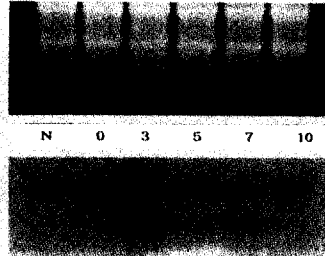


Fig. 13.



N 0 3 5 7 10



Fig. 14.