

Study on the Changes in Distributions and Expressions of Aquaporin5 (AQP5) in Salivary Glands of Mice After Alcohol Ingestion

You Sun Lim and Ki-Yeon Yoo*

Department of Anatomy, College of Dentistry and Research Institute of Oral Science, Gangneung-Wonju National University

(received September 13, 2018; revised December 7, 2018; accepted December 11, 2018)

Alcohol intake is known to affect various organs in the human body, causing reduction of salivation in the oral cavity. Hypo-salivation effect of alcohol is a common feature, but the mechanism in salivary glands is still poorly studied. Therefore, in this study, the changes in salivary secretion and water channel protein (aquaporin5, AQP5) in salivary glands of mice were investigated after ethanol administration. Animals were divided in to 4 groups with the control, 4 g/kg ethanol, 8 g/kg ethanol and 16 g/kg ethanol administration groups. One hour after ethanol administration, saliva was collected from the oral cavity, and the animals were killed and parotid and submandibular glands were extracted to analyze the histopathology, AQP5 immunohistochemistry and AQP5 protein level. According to the results, the salivation rate decreased irrespective of the ethanol dose in mice, and viscosities increased with increase in ethanol dose. However, there were no pathological changes in parotid and submandibular glands due to ethanol administration. Expression of AQP5 in parotid and submandibular glands decreased with increase ethanol administration. These results indicate that the reduction of salivary secretion due to acute

alcohol intake is closely related to decrease of the water channel protein such as AQP5 in parotid glands and submandibular glands, rather than the damage of salivary glands.

Key words: Ethanol, Salivary gland, Hypo-salivation, AQP5

Introduction

알코올의 섭취는 간, 뇌, 생식소(gonad) 등과 같은 생체 내 여러 장기들에서 다양한 병태를 유발하는 것으로 보고되고 있다[1]. 음주 시 가장 먼저 알코올에 노출되는 신체 부위는 바로 구강점막으로 지속적인 알코올 섭취가 전신적 질환을 일으킬 뿐만 아니라, 구강점막 및 침샘의 형태적 변화에 의한 침 분비의 장애 유발 가능성이 지속적으로 제기되고 있다[2-6].

침(타액, saliva)은 구강 점막을 보호하고 구강 내 윤활 작용을 하며, 항균, 혈액 응고, 산에 대한 완충작용, 소화, 수분대사의 조절, 배설작용 및 용매작용 등 정상적인 구강 건강 및 기능의 유지에 매우 중요한 역할을 하므로[1] 침 분비량의 저하는 다발성 치아우식증 및 구강조직 질환 등 구강 건강상태에 직접적인 영향을 미칠 수 있다는 것은 잘 알려져 있다[7, 8].

분비된 침의 성분 중 90% 이상을 차지하고 있는 수분은 침샘 내 수분통로 단백질인 Aquaporins (AQPs)에 의해 이루어지며, 침샘의 샘파리세포(acinar cell)에는 AQPs family 중 AQP5가 주로 분포하고 있는 것으로 알려져 있다[9, 10]. 이전의 연구들에서 AQP5를 결손 시킨 형질전

*Correspondence to: Ki-Yeon Yoo, Department of Anatomy, College of Dentistry, Gangneung-Wonju National University, 7, Jukheon-gil, Gangneung, 25427, Republic of Korea
Tel: +82-33-640-2456
E-mail: kyyoo@gwnu.ac.kr
ORCID : 0000-0002-0575-275X

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

환 (transgenic) 생쥐의 귀밑샘과 혀밑샘에서 수분 투과성 감소를 규명하였고, 이를 통하여 AQP5가 샘파리세포 세포막에서 수분 투과성을 조절하는 주요 경로임을 제시하였다[10, 11].

알코올은 음주 후 수 분 내에 순환계에 진입하여 신체 곳곳에 빠르게 영향을 미치게 된다[12]. 알코올이 침샘에 미치는 영향에 관한 몇몇 연구들은 주로 알코올 중독(만성적 알코올 섭취)과 관련해서 이루어지고 있으며, 알코올의 장기간 섭취 시 외분비샘을 포함한 자율신경계가 지배하고 있는 기관들에서 형태/기능적 변화 유발에 대한 연구가 전부이다[13]. 아직까지 급성 알코올 섭취 및 알코올 섭취량에 따른 침샘에서의 침 분비 기전과 관계된 연구는 거의 없는 실정이며, 이전 연구에서는 알코올에 의한 침 분비 감소 원인은 침샘과 관련된 자율신경계 보다는 침샘의 분비세포 내에서의 세포생물학적 변화의 가능성이 높은 것으로 보고 하였다[14].

따라서, 본 연구에서는 사람의 1일 적정 알코올 섭취량 (기준용량, 40 g/60 kg)을 기준의 1배, 2배 및 4배까지의 용량을 생쥐에 적용하여 침 분비 변화를 측정하여 알코올 투여량과 침 분비 간의 상관관계를 확인하였고, 귀밑샘과 턱밑샘들을 적출하여 침 분비와 직접적으로 관련된 AQP5의 변화를 확인하고자 하였다.

Materials and Methods

실험동물 (Experimental animals)

본 연구에서는 6주령의 수컷 ICR-mouse를 이용하였다. 각 실험군 마다 7마리 ($n=7$)씩 사용하였으며, 실험동물은 정상군 (control)과 ethanol을 4 g/kg, 8 g/kg 및 16 g/kg의 용량으로 섭취한 군으로 각각 나누었다.

알코올의 처리 (Ethanol treatment)

알코올의 처리는 용질로써 ethanol을 사용하였으며, ethanol을 희석하기 위한 용매로는 증류수를 사용하였다. ethanol의 처리는 WHO 권고 1일 알코올 섭취량인 40 g / 60 kg을 사람 용량에서 동물 용량으로 환산[15]하여 권고 섭취량을 생쥐에서 8 g/kg으로 정하였고 이것의 1/2 및 2배 용량을 적용하였다. 동물의 체중 (평균 25 g)을 고려하여 적용하였으며, feeding needle을 이용하여 0.1 g/ml 농도의 ethanol을 각 실험 군별로 각각 0.5 mL, 1 mL 그리고 2 mL를 위 내에 직접 투여하였다.

타액수집 (Saliva harvest)

타액의 분비량 (Salivation measure)

알코올 투여 1시간 후 침 분비 유도를 위해 pilocarpine (2 mg/kg, i.p)을 복강 내에 주사하였다. 5분 동안 생쥐의 구강 저에 고인 침을 마이크로 피펫을 이용하여 수집하였다.

타액의 점도도 (saliva viscosity)

수집된 침으로 균별로 100 μ l씩 45°의 기울기 유리에서 흘러서 도착지점 (20 cm)까지의 시간 (min)을 재어 점도도를 측정하였다.

조직 처리 (Tissue process)

본 연구에서 보다 정확한 결과를 얻기 위하여 실험동물의 조직은 동일한 조건 하에서 처리하였다. 조직학적 분석을 위하여 침 분비 측정이 끝난 후 즉시 실험동물의 흉곽을 개방하여 관류 고정 후 턱밑샘과 귀밑샘을 신속하게 적출하여 고정액에 6시간 고정한 뒤 통상적인 방법에 따라 파라핀 블록을 제작하였다. 제작된 블록은 절편화 하여 조직 염색에 이용하였다.

침샘조직 분석방법 (Tissue analysis)

Hematoxyline/eosin 염색

조직은 통상적인 탈파라핀 함수과정을 거쳐 염색에 이용하였다. 함수가 끝난 조직은 증류수에 10분간 세척하였다. 이 조직은 Harris hematoxylin 용액에 8분간 염색한 후에, 흐르는 물에 염료가 더 이상 나오지 않을 때까지 세척하고, 1% acid alcohol 용액에 10회가량 침적하였다. 다시 흐르는 물에 세척한 후 0.5% ammonia water에 10회가량 침적한 후 다시 흐르는 물에 세척 하였다. 세척이 끝난 조직은 eosine 용액에 1분간 염색한 다음 70%, 80%, 95% ethanol에 각각 1분씩 2분간 거치고 100% ethanol에 2분씩 2회 거친 후 xylen으로 옮겨 2분씩 3회 거쳐 canada balsam (Kato, Japan)으로 봉입하였다.

면역조직화학염색 (Immunohistochemistry)

조직은 통상적인 탈파라핀 및 함수과정을 거쳐 염색에 이용하였다. 함수가 끝난 조직은 pH 6.0 citrate buffer에서 microwave를 이용하여 15분간 항원 노출 (antigen retrieval)을 진행하였다. 이후 0.3% 과산화수소 (H_2O_2)가 들어있는 PBS 용액으로 30분간 처리한 후 10% normal goat serum이 들어있는 0.01 M PBS에 30분간 처리하였다. 처리가 끝난 조직은, Anti-goat aquaporin5 (AQP5, diluted 1:250, Santa crus

Bio. USA)에서 2일간 반응시켰다. 반응이 끝난 조직은 biotinylated goat anti-goat (diluted 1:250, Vector, USA)와 반응시킨 후 ABC complex (diluted 1:200, Vector, USA)에 차례로 반응시켰다. 반응이 끝난 조직은 0.05% 3, 3-diaminobenzidine (0.1 M Tris-HCl buffer, pH 7.2)에서 발색한 후 슬라이드에 도말 한 후 탈수 청명화 과정을 거쳐 Canada balsam (Kato, Japan)으로 봉입하였다.

단백질 정량 (Western blot)

실험동물의 침샘 조직을 300 ul 용해 완충액 (lysis buffer; pH 7.5, containing 137 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, 1% Tween 20, 10% glycerol, 1 mM phenylMethyl-sulfonyl fluoride, and protease inhibitor cocktail)으로 30분 동안 0°C에서 균질화 (homogenization) 시켰다. 각 표본을 Ultrasonicator를 이용하여 세포를 파괴시켜 원심분리 (15,000 rpm, 4°C, 30분)하고, 상층액을 재차 원심분리 하였다 (15,000 rpm, 4°C, 30분). 5분 동안 열판에서 가열한 후, 전기영동을 위해 단백질 농도를 Bio-rad dye-binding microassay (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)로 결정하고, 70 ug의 단백질을 12% polyacrylamid gel 로 전기영동 시킨 후 단백질을 니트로셀룰로오스막에 옮겼다. 일차 항체로 Anti-goat AQP5 (Santa crus Bio. USA) 항체를 이용하였다. 이차 항체는 일차 항체에 따라 anti-goat antibody (R&D system, Minneapolis, MN, USA)를 실온에서 1시간 동안 함께 반응시켰다. 염색된 단백질을 ECL kit을 이용하여 발생하여 발현 여부를 확인하고, β -actin을 대조군으로 하여 각 단백질들의 변화를 비교하였다.

자료분석 및 통계처리

Ethanol 처리 군에서 침 분비 감소를 확인하기 위하여 측정된 침의 분비량을 측정하였다. 또한, 침 분비 감소와 관련된 단백질 및 항산화 단백질 변화를 확인하기 위하여 western blot을 이용하여 단백질을 정량하였다. 정량된 밴드는 스캔 후 Image J (software: NIH, USA)를 이용하여 수치화하였다. 침 분비율은 분당 분비된 침의 양 (mg/min)의 평균으로, 단백질 정량 수치는 정상 실험군에 대한 상대적인 값의 평균으로 표시하였다. 각 실험군 간의 값의 차이는 SPSS 프로그램을 이용한 two-way ANOVA 및 Tukey test를 이용하여 통계학적으로 분석하였으며, 통계학적으로 p 값이 0.05 이하면 통계적으로 유의성이 있다고 판단하였다. 본 연구에 표시된 값은 평균치±표준오차 (standard error of measurement, SEM)으로 표시하였다.

Result

타액의 유속 및 점도

정상군에서 pilicapine에 자극된 침 분비는 분당 0.88 ± 0.13 mg/min의 분비가 관찰되었으며, 4 g/kg ethanol 군에서는 분비가 급격하게 감소하여 분당 0.54 ± 0.15 mg/min의 타액 분비가 관찰되었다. 8 g/kg 및 16 g/kg ethanol 군에서도 정상군과 비교하여 타액 분비가 유의성 있는 감소가 나타났으나, 4 g/kg ethanol 군에 비교하였을 때에 알코올의 투여 농도에 따른 유의성 있는 차이는 없었다 (Fig. 1A).

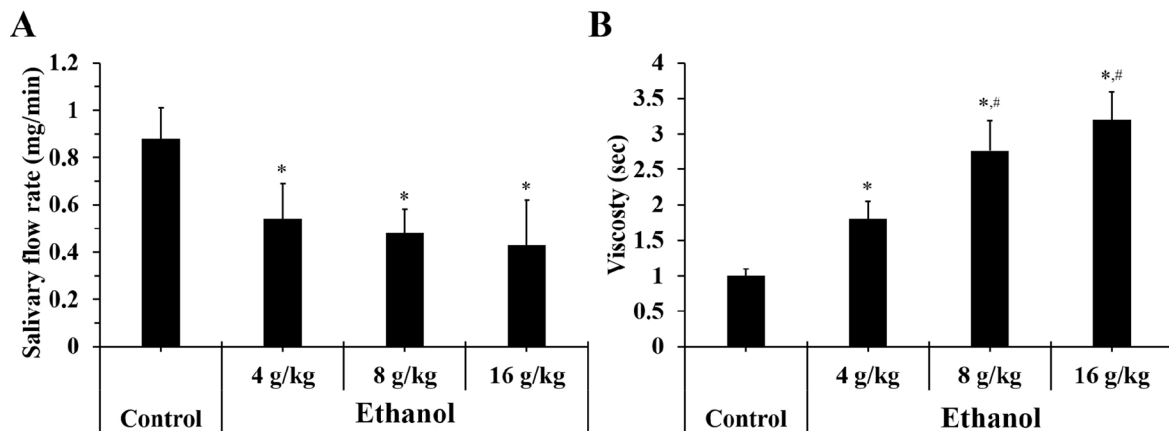


Fig 1. Evaluation of Salivary flow rates (mg/min) (A) and Salivary viscosity (sec) (B) in the control, 4 g/kg ethanol, 8 g/kg ethanol and 16 g/kg ethanol groups. Salivary flow rate and salivary viscosity is expressed as saliva weight (mg) per minute and the time taken to travel 20 cm, respectively ($n = 7$ per group; * $P < 0.05$, significantly different from the control group, # $P < 0.05$, significantly different from the pre-adjacent group). The bars indicate the means \pm SEM.

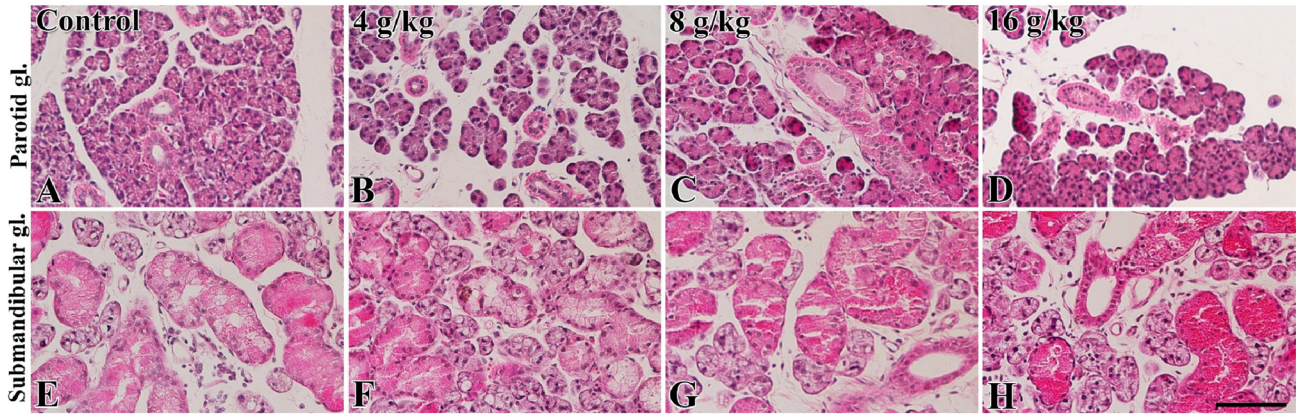


Fig 2. Hematoxylin & Eosin stain in the mouse parotid (A-D) and submandibular glands (E-H) in the control (A and E), 4 g/kg ethanol (B and F), 8 g/kg ethanol (C and G) and 16 g/kg ethanol (D and H) groups. Both salivary glands, administration of ethanol did not result in necrosis of gland cells, nor pathological findings such as fibrosis or fatty change. Scale Bar = 100 μ m.

타액의 점조도는 정상군과 비교하였을 때 모든 알코올 섭취 군에서 증가하는 경향을 보였으며, 섭취 알코올의 용량에 따라 증가하였다 (Fig. 1B).

Hematoxylin & Eosin staining (H&E staining)

정상군의 귀밑샘에서는 피라미드 형태의 분비세포 (secretory cells)로 이루어진 샘파리(acinus)와 샘파리 사이에 위치한 도관(ducts)이 (Fig. 2A) 그리고 턱밑샘에서는 장액샘세포와 점액샘세포로 구성된 두 가지 샘파리 및 그 사이의 도관들이 정상적인 형태를 띠고 있었다 (Fig. 2E). 알코올을 투여한 모든 실험군의 귀밑샘과 턱밑샘에서 침샘세포의 사멸(cell death), 섬유화(fibrosis) 또는 지방변성(apodiposis)과 같은 침샘 세포의 손상과 관련된 병리학적 소견은 관찰되지 않았다 (Fig 3B-3D, 3F-3H).

AQP5 면역조직화학 및 단백질 발현 변화

침의 분비량에 가장 큰 영향을 미치는 수분의 분비 통로인 AQP5가 알코올 섭취에 의하여 어떻게 변화하는지 확인하기 위해 AQP5 항체를 이용하여 귀밑샘과 턱밑샘에서 면역조직화학염색 및 단백질 정량을 수행하였다.

귀밑샘의 경우 AQP5 면역조직화학염색 결과, 정상군의 귀밑샘에서는 AQP5 면역반응이 대부분의 샘파리 내 장액 세포에서 관찰되었다. 특히 이러한 면역반응은 샘파리세포의 내강 쪽 부분인 세포질 및 꼭대기 쪽 세포막에서 발견되었으며 세포질보다 꼭대기 쪽 세포막에서 강하게 관찰되었다 (Fig 3A). AQP5 면역반응은 알코올 섭취 군에서도 관찰되었는데 정상군과 마찬가지로 샘파리세포의 꼭대기 쪽 세포막에서 주로 면역반응을 나타냈었으나, 알코올 투여군에

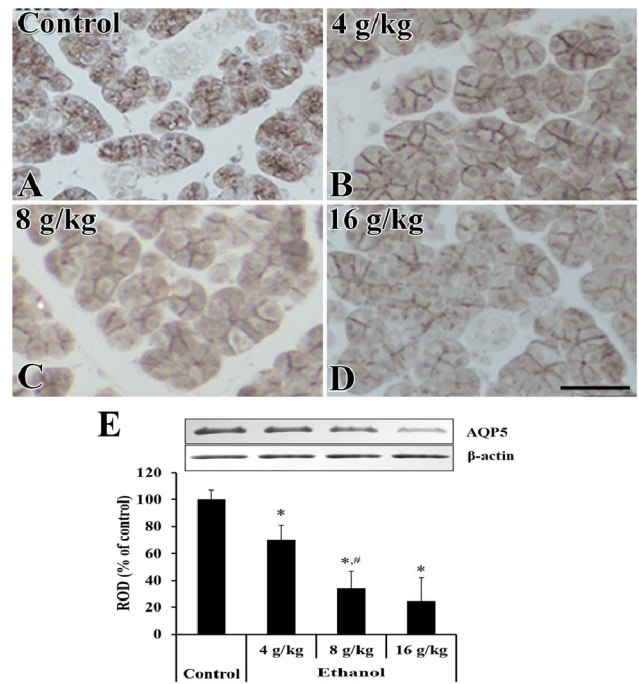


Fig 3. AQP5 immunoreactivity in the parotid glands of the control (A), 4 g/kg ethanol (B), 8 g/kg ethanol (C) and 16 g/kg ethanol (D) groups. In the control group, AQP5 immunoreactivity was found in cytoplasm and apical membrane of acinar cells. On the other hand, in ethanol-treated groups, AQP5 immunoreactivity was prominent in the apical membrane of acinar cells. Scale Bar = 50 μ m. E: AQP5 protein levels in the parotid gland of the control, 4g/kg ethanol, 8 g/kg ethanol and 16 g/kg ethanol groups. Relative optical density (ROD) as % values of immunoblot band is also represented ($n = 7$ per group; * $P < 0.05$, significantly different from the control group, # $P < 0.05$, significantly different from the pre-adjacent group). The bars indicate the means \pm SEM.

서 모두 세포질에서의 AQP5의 면역 반응성은 확연하게 감소하였다 (Fig. 3B-3D). 턱밑샘의 경우에도 귀밑샘과 마찬가지로

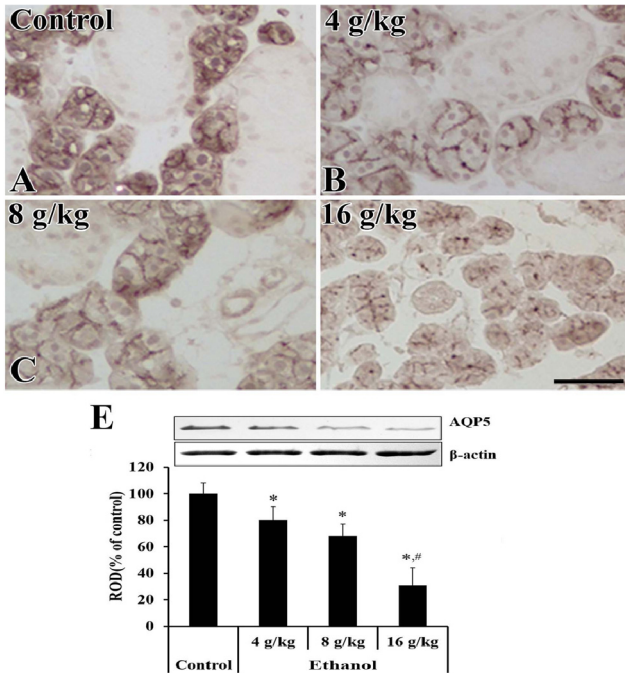


Fig 4. AQP5 immunoreactivity in the submandibular glands of the control (A), 4g/kg ethanol (B), 8 g/kg ethanol (C) and 16 g/kg ethanol (D) groups. In the control group, AQP5 immunoreactivity was found in cytoplasm and apical membrane of serous acinar cells but intensity was stronger in the apical membrane. However, in ethanol-treated groups, AQP5 immunoreactivity in cytoplasm was significantly decrease. Scale Bar = 50 μ m. E: AQP5 protein levels in the submandibular gland of the control, 4 g/kg ethanol, 8 g/kg ethanol and 16 g/kg ethanol groups. Relative optical density (ROD) as % values of immunoblot band is also represented ($n = 7$ per group; * $P < 0.05$, significantly different from the control group, ** $P < 0.05$, significantly different from the pre-adjacent group). The bars indicate the means \pm SEM.

가지로 정상군의 장액샘파리 내 장액세포의 세포질 및 꼭대기 쪽 세포막에서 AQP5 면역반응이 확인되었다 (Fig. 4A). 알코올 섭취 군에서도 AQP5 면역반응은 장액샘파리의 장액세포의 세포질에서 감소하는 경향을 보였으며, 실험 군간 면역반응의 차이를 보였다 (Fig. 4B-4D).

AQP5 단백질 발현량을 비교하기 위하여 Western blot을 통하여 AQP5 단백질을 정량한 결과에서는 귀밀샘에서 정상군과 비교하였을 때 4 g/kg ethanol 군 30.0%, 8 g/kg ethanol 군 66.1%, 16 g/kg ethanol 군 75.1%의 AQP5 발현이 감소하여 알코올 섭취 용량에 따른 AQP5 발현 감소가 확인되었다 (Fig. 3E). 턱밀샘의 경우에는 정상군 대비 4 g/kg ethanol 군 19.9%, 8 g/kg ethanol 군 32%, 16 g/kg ethanol 군 69.2%의 AQP5 발현 감소가 나타났다 (Fig. 4E). 턱밀샘의 경우 귀밀샘보다 알코올 섭취에 의한 AQP5 발현 감소의 폭은 작았지만, 알코올 섭취량에 비례하여 AQP5의 발현이 감소하였다.

Discussion

술의 주성분인 ethanol은 섭취 시 신체에 다양한 조직에 영향을 미치며 이와 동시에 다양한 질병을 유발하게 된다[16]. 특히, ethanol은 구강 조직을 쉽고, 빠르게 투과하는 특성 때문에, 알코올 섭취 후 침에 포함된 ethanol 농도가 혈장보다 높아지는 것으로 알려져 있다[17, 18]. 이것은 침샘이 구강 내 부속기관으로써 알코올 섭취 시 쉽게 영향을 받을 수 있다는 것을 의미한다.

본 연구에서는 용량별 급성 알코올 섭취에 따라 침 분비 감소가 관찰되었으나, 투여 용량별 유의성 있는 침 분비 감소는 나타나지 않았다. 이전의 사람을 대상으로 한 연구들은 적당한 알코올의 섭취는 귀밀샘의 침 분비를 자극하지만[13], 다량의 알코올 섭취는 오히려 귀밀샘 침 분비를 억제한다고 보고하였다[19]. Dutta 등[20]은 사람에서 과량의 알코올 섭취에 의해 혈중알코올농도가 1.0%인 경우 귀밀샘 침 분비가 50%가량 감소한다고 하였으며, Martin 등[13] 및 Winsor 등[19]의 연구에서도 유사한 결과를 제시한 바 있다. 흰쥐를 이용한 연구들에서는 고농도의 급성 알코올 섭취가 침의 분비감소, 단백질합성 억제, 전해질의 불균형 등의 결과를 일으킨다고 보고된 바 있다[21-23]. 이전의 알코올 섭취 후의 침 분비 감소에 대한 연구가 알코올의 섭취 기간, 침 분비 자극 시점 및 방식이 다르기는 하지만 대부분 알코올의 섭취 이후 침 분비의 감소를 초래하였다. 본 연구에서는 4 ~ 16 g/kg ethanol을 적용하였으며 이전의 고농도 ethanol 투여 연구 결과와 동일한 결과를 보여 주었다. 본 연구에서 ethanol의 투여경로는 위 내 투여를 이용하였다. 동물 실험의 특성 상 위 내 ethanol을 직접 투여하는 방식이 사람에서 ethanol 섭취 시 구강점막으로도 ethanol이 흡수될 수 있는 상황을 재현하지 못한 점은 본 연구의 한계점이라고 할 수 있다. 하지만, WHO 1일 알코올 섭취 권장량 절반 가량의 ethanol을 위 내 투한 경우에도 침 분비가 감소하여 이전의 적당한 알코올 섭취가 침 분비를 자극한다는 연구결과와 배치되었으며[13], 이와 같은 결과는 적은 양의 ethanol을 1회 섭취하더라도 단시간 내 침 분비 감소가 유발될 수 있으므로 음주 시 특히 구강 관리에 주의를 기울일 필요가 있음을 시사한다.

침의 점조도의 경우 알코올 투여량 증가에 비례하여 증가하였다. 침의 점조도는 분비량과 밀접한 관련이 있으며, 일반적으로 침의 분비량이 감소와 침의 점조도 증

가는 높은 상관관계를 가지고 있는 것마므로 알려져 있다[24]. 본 연구결과에서 알코올 용량 증가 투여에 따른 침 점조도 증가는 알코올 투여량에 따른 침 분비 감소량과 다소 다른 패턴을 나타내었다. 이와 같은 결과는 알코올 섭취에 의한 점조도 증가는 단순히 침 성분 중 수분 감소에 의한 것이 아니라는 점을 나타낸다.

본 연구에서는 급성 알코올 투여에 따른 침 분비 저하 원인을 확인하기 위하여 귀밑샘 및 턱밑샘의 형태학적 변화 및 수분분비단백질 (AQP5)의 변화를 확인하였다. 이전의 장기간 알코올 섭취 연구에서는 침샘의 형태와 기능 자체에 영향을 미칠 수 있다는 보고가 있었으며, 이는 알코올의 섭취가 침샘의 위축, 단백질 구성의 감소 및 침 분비 감소의 원인임을 제시한 바 있다. 하지만, 본 연구에서 급성 알코올 투여에 따른 귀밑샘 및 턱밑샘에서의 병리 소견은 발견되지 않았다. 이와 같은 결과는 본 연구에서 제시한 알코올 농도의 급성 투여에 의한 침 분비 저하는 침샘의 손상과 연관성이 없다는 것을 의미한다.

한편, 침 분비량에 가장 중요한 것은 수분의 양인데 침 분비 시 수분은 수분통로 단백질을 통하여 샘파리 세포에서 도관으로 분비된다는 가설이 가장 유력한 것으로 알려져 있다. 생쥐의 경우 침샘에 AQP1, AQP4, AQP5 및 AQP8의 존재가 확인되었다. AQP5의 knock-out mice의 경우 야생형과 비교하여 60%가량의 자극 침 분비 저하 및 점조도 증가가 있었으나 AQP1, AQP4 및 AQP8 knock-out mice에서는 침 분비량 변화가 없다는 연구를 통하여 AQP5가 침샘에서 수분 분비 및 점조도 조절에 중요한 단백질임이 밝혀졌다[10]. AQP5는 아세틸콜린에 대한 반응으로 세포질 내 소포에서 세포막으로 이동하여 작용하게 된다[25,26]. 본 연구결과 귀밑샘과 턱밑샘에서 모두 AQP5의 발현이 알코올의 섭취에 의하여 감소하였다. 정상적인 AQP5의 분포는 두 침샘 모두에서 세포질 그리고 장액샘 파리내의 장액샘 꼭대기 쪽 세포막에서 되었으며, 이와 같은 결과는 이전의 흰쥐[27], 양[28] 및 사람[29] 등의 침샘조직에서 AQP5 면역조직화학염색 결과와 일치한다. 귀밑샘과 턱밑샘 모두 AQP5 면역반응은 알코올 섭취량에 따라 점점 감소하였는데, 정확한 단백질의 양적 변화의 확인을 위한 AQP5 정량결과 4 g/kg ethanol 군에서 AQP5 발현의 감소가 나타났으며 그 이상 농도의 알코올 섭취 군에서도 모두 AQP5 발현이 감소하는 경향을 나타냈다. 알코올의 용량에 비례한 AQP5 단

백질의 발현 감소는 나타나지 않았지만 모든 실험 군에서 정상 군과 비교하였을 때 AQP5 단백질이 감소하였으며, 이와 같은 현상은 두 침샘 모두 장액샘파리의 세포에서 나타났는데, 노화 시 침의 분비 저하 원인으로 AQP5 발현의 감소가 지목된 이전 연구 결과를 고려하였을 때 [30] 본 연구에서 ethanol의 섭취에 의한 침 분비량 저하 또한 ethanol 섭취에 의한 AQP5 발현 저하와 밀접한 연관성이 있음을 의미한다.

이상을 종합해 보면 알코올 농도에 따른 침샘에서의 침 분비 감소는 수분이동 통로의 주 역할을 하는 AQP5의 감소와도 깊은 연관성이 있는 것으로 사료된다. 본 연구는 침 분비에 있어서 알코올의 섭취 시 수분 배출 관련 단백질의 발현 수준의 연구였기 때문에 보다 정확한 기전의 확인을 위해서는 알코올의 섭취에 따른 AQP5 상위 세포 신호체계에 대한 연구를 제안하는 바이다.

References

1. Brooks PJ. DDNA damage, DNA repair, and alcohol toxicity-a review. *Alcohol Clin Exp Res.* 1997;21:1073-1082.
2. Carrard VC, Filho MS, Rados PV, Chaves AC, Lauxen Ida S. Quantification of silver-staining nucleolar organizer region in epithelial cells of mice after exposure to, or intake of, alcohol. *Alcohol.* 2004;34:233-238.
3. Prestifilippo JP, Fernández-Solari J, Medina V, Rettori V, Elverdin JC. Role of the endocannabinoid system in ethanol-induced inhibition of salivary secretion. *Alcohol Alcohol.* 2009;44:443-448. doi: 10.1093/alcalc/agg040.
4. Scott J, Burns J, Flower EA. Histological analysis of parotid and submandibular glands in chronic alcohol abuse: a necropsy study. *J Clin Pathol.* 1988;41:837-840.
5. Simanowski UA, Homann N, Knühl M, Arce L, Waldherr R, Conradt C, Bosch FX, Seitz HK. Increased rectal cell proliferation following alcohol abuse. *Gut.* 2001;49:418-422.
6. WHO. Global status report on alcohol, 1st ed. Geneva. Marketing and Dissemination. World Health Organization. 2004.
7. Featherstone JD. The science and practice of caries prevention. *J. Am. Dent. Assoc.* 2000; 131:887-899. doi:10.14219/jada.archive.2000.030.7
8. Vissink A, Mitchell JB, Baum BJ, Limesand KH, Jensen SB, Fox PC, Elting LS, Langendijk JA, Coppes RP, Reyland ME. Clinical management of salivary gland hypofunction and xerostomia in head-and-neck cancer patients: successes and barriers. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2010;78:983-991 doi: 10.1016/j.ijrobp.2010.06.052.
9. Jimi T, Waka yama Y, Murahashi M, Shibuya S, Inoue M, Hara H, Matsuzaki Y, Uemura N. Aquaporin 4: Lack of mRNA

- expression in the rat regenerating muscle fiber under denervation. *Neurosci Lett* 2000;291:93-96.
10. Ma T, Song Y, Gillespie A, Carlson EJ, Epstein CJ, Verkman AS. Defective secretion of saliva in transgenic mice lacking aquaporin-5 water channels. *J Biol Chem* 1999;274:20071-20074.
 11. Krane CM, Melvin JE, Nguyen HV, Richardson I, Towne JE, Doetschman T, Menon AG. : Salivary acinar cells from aquaporin 5-deficient mice have decreased membrane water permeability and altered cell volume regulation. *J Biol Chem* 2001;276: 23413-23420. doi: 10.1074/jbc.M008760200.
 12. Goldstein DB. *Pharmacology of Alcohol*. New York, NY, Oxford University, 1983.
 13. Martin S, Pangborn RM. Human parotid secretion in response to ethyl alcohol *J Dent Res* 1971;50: 485-490. doi:10.1177/00220345710500026201.
 14. Jung B, Yoo K. Alcohol ingestion reduced acetylcholine-binding protein in the submandibular gland of the rat. *Oral Biol Res* 2017; 41: 107-113. doi :10.21851/obr.41.3.201709.107.
 15. Reagan-Shaw S, Nihal M, Ahmad N. Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB journal*. 2008;22:659-661. doi:10.1096/fj.07-9574lsf.
 16. Nevo I, Hamon M. Neurotransmitter and neuromodulatory mechanisms involved in alcohol abuse and alcoholism. *Neurochem Int*. 1995;26:305-336.
 17. Waszkiewicz N, Szajda SD, Jankowska A, Waszkiewicz M, Kepka A, Konarzewska B, Szulc A, Snarska J, Zwierz K. Catabolism of salivary glycoconjugates in acute ethanol intoxication. *Med Sci Monit*. 2009;15:413-417. doi:10.1093/jat/19.3.169.
 18. Jones AW. Measuring ethanol in saliva with the QED enzymatic test device: comparison of results with blood- and breath-alcohol concentrations. *J Anal Toxicol*, 1995;19: 169-174.
 19. Winsor AL, Strongin EJ. The effect of alcohol on the rate of parotid secretion *J Exp Psychol* 1933;167:589-597. doi:10.1037/h0070098.
 20. Dutta SK, Parasher V, Smalls U. Evidence for marked suppression of parotid saliva secretion and altered composition following a single dose of ethanol ingestion in man [abstract] *Gastroenterol* 1984;86:1065.
 21. Scott J, Berry MR, Woods K. Effects of acute ethanol administration on stimulated parotid secretion in the rat *Alcohol Clin Exp Res*. 1989;13:560-563. doi:10.1111/j.1530-0277.1989.tb00378.
 22. Proctor GB, Shori DK, Preedy VR. Protein synthesis in the major salivary glands of the rat and the effects of re-feeding and acute ethanol injection *Arch Oral Biol*. 1993;38:971-978. doi:10.1016/0003-9969(93)90110-8.
 23. Shori DK, Proctor GB, Teare J, Preedy VR. Indices of protein synthesis and RNA translating activities in the major salivary glands of rat and comparison to synthetic rates in liver *Biochem Soc Trans* 1994;22:82. doi:10.1042/bst022182s.
 24. Kim S. *Contemporary preventive dentistry*. Seoul: Daehannarae; 2011. p. 205-207.
 25. Hosoi K. Physiological role of aquaporin-5 in salivary glands. *Pflüg arch-Euro[ean journal of physiology]*. 2015;468: 519-539. doi:org/10.1007/s00424-015-1749-6.
 26. Cho G, Bragiel A, Wang D, Pieczonka T, Skowronski M, Shono M, Nielsen S, Ishikawa Y. Activation of muscarinic receptors in rat parotid acinar cells induces AQP5 trafficking to nuclei and apical plasma membrane. *Biochimica et biophysica Acta. General subjects* 2015;1850:784-793. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2015.01.009.
 27. Maier H, Bom IA, Veith S, Adler D, Seitz HK. The Effect of Chronic Ethanol Consumption on Salivary Gland Morphology and Function in the rat. *Alcoholism. Clin. Exp. Res*. 1986;10:425-427.
 28. Raina S, Preston GM, Guggino WB, Agre P. Molecular cloning and characterization of an aquaporin cDNA from salivary, lacrimal, and respiratory tissues. *J Biol Chem*. 1995; 270:1908-12. doi:10.1074/jbc.270.4.1908.
 29. Wang D, Yuan Z, Inoue N, Cho G, Shono M, Ishikawa Y. Abnormal subcellular localization of AQP5 and downregulated AQP5 protein in parotid glands of streptozotocin-induced diabetic rats. *Biochim Biophys Acta*. 201;1810:543-554.
 30. Inoue N, Iida H, Yuan Z, Ishikawa Y, Ishida H. Age-related decreases in the response of aquaporin-5 to acetylcholine in rat parotid glands. *J Dent Res*. 2003 ;82:476-480.