

구속 스트레스가 백서 타액선 조직 내의 clusterin 변화에 미치는 영향

경희대학교 치의학전문대학원 안면통증·구강내과학교실¹, 경희대학교 구강생물학연구소²

이고운¹ · 강수경¹ · 전양현¹ · 홍정표^{1,2}

타액이 대부분의 구강 내 질환에 영향을 주는 것으로 알려져 있다. 반대로, 여러 전신적 조건이 타액의 흐름에 영향을 줄 수 있으며 이는 구강 건조증을 야기할 수 있는데, 특히 사회심리적 스트레스는 타액의 부족과 구강 건조증의 병인으로 큰 역할을 할 수 있다. 많은 연구에서 자율신경계 반응에 의한 스트레스의 타액선에의 거시적 효과에 중점을 두어왔다. 본 연구에서는 구속 스트레스 조건 하에서 백서(Rat) 이하선에서 clusterin의 변화를 관찰하였다.

연구를 위해, 10마리의 백서를 이용, 3그룹으로 구분하였다. 1) 그룹 1: 대조군으로 rat 2마리 2) 그룹 2: 실험대조군으로 2마리를 두어 2시간 동안 restraint cone을 사용하여 구속스트레스를 부여 3) 그룹 3: 실험군으로 6마리를 두어 매일 2시간씩 restraint cone을 사용하여 구속 스트레스를 부여 백서는 스트레스 부여 후 즉시(그룹 2) 희생하거나 24, 48, 72 시간 후 희생하여 이하선을 절취하였다. Western blotting과 면역조직화학검사를 시행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 백서의 이하선에서 clusterin이 약간 증가하였고 구속 스트레스 부여 직후 타액선관에서 명확하게 관찰되었다.
2. 백서의 이하선에서 clusterin은 구속 24시간, 48시간 후에 매우 감소되었으며, 타액선관에서도 소량 관찰되었다.
3. 백서의 이하선에서 clusterin은 구속 72시간 후 현저하게 증가되었으며, 역시 타액선관에 밀집하여 증가되었다.

주제어: 구속 스트레스, 타액선, Clusterin

I. 서 론

복잡한 현대사회 속에서 사람은 끊임없이 물리적 또는 심리적 자극을 받으면서 살아가며, 웰빙을 추구하는 사회적 욕구로 인하여 이러한 자극들에 의한 반응은 더욱 심화되고 있다. 따라서 스트레스라는 단어가 여러 분야에서 회자되게 되었고, 임상이 뿐만 아니라 일반인들에게도 관심이 증대되고 있다. 적당한 스트레스는 생리적으로 신체를 활성화 시키고 적절한 긴장감을 유지하게 하여 각종 자극에 적응하고 극복

하는 방법을 습득할 수 있게 하지만, 과도하거나 장기간 지속되는 스트레스는 인체에 다양한 반응을 야기하고 생체기능에 이상을 초래하여 여러 가지 질환이나 증상을 유발하게 된다.

스트레스와 구강안면영역의 질환과의 관계에 대한 전과 홍¹⁾의 보고에 의하면, 구강건조증, 구취 및 여러 구강점막질환과 두개하악장애 등 다양한 증상, 징후 및 질환이 상호 연관성을 가지고 나타난다.

스트레스와 타액선과의 관계에 대한 이전의 연구에서 Kleinhaus 등²⁾은 타액선의 기능저하로 구강건조증이 나타난다고 하였고, Malcom 등³⁾은 구강건조증으로 인해 구강 점막병소가 유발되며 이상감각증을 야기하고 구취를 발생시킨다고 보고하였다.

타액은 구강점막을 보호하고 윤활작용을 하며, 항균작용, 혈액 응고작용, 완충작용, 소화작용, 수분대사의 조절작용, 배설작용 및 용매작용 등 건강한 구강상태를 유지하는데 매우 중요한 역할을 한다⁴⁾.

타액분비는 타액선에 분포되어 있는 부교감신경인

교신저자: **홍정표**

서울시 동대문구 회기동 1번지

경희대학교 치과대학 안면통증·구강내과학교실

전화: 02-958-9358

Fax: 02-968-2043

E-mail: unicomfort@khu.ac.kr

원고접수일: 2012-05-07

심사완료일: 2012-05-31

설인신경의 소추체 신경과 안면신경의 고삭신경 그리고 상경신경절의 교감신경 등에 의해 조절된다. 타액 자체가 생성되지 않거나 타액의 분비기전에 이상이 생겼을 경우 타액선의 기능 장애 징후인 구강건조증⁵⁾이 그 증상으로 나타나게 되는데 이것은 임상적으로 구강 내 환경 및 건강상태에 큰 영향을 미치게 된다.

구강건조증은 타액선의 가역적 또는 비가역적 기능 장애로, 구강 내의 국소적 염증이나 타액선의 감염, 섬유증, 탈수 그리고 신경안정제, 항히스타민제, 항콜린제 및 항고혈압제 등의 약물복용, Sjögren 증후군과 같은 자가면역질환, 화학치료, 방사선치료 및 심인성 요인 등에 의해서 발생한다⁵⁾.

이 중에서 심인성 요인의 하나인 스트레스는 이하선, 악하선 및 설하선 등의 대타액선에도 큰 영향을 미쳐 타액의 분비량과 성분 등에 변화를 일으키기도 하며, 타액선에서 clusterin 단백질을 분비시켜 구강 내에 유리됨으로써 Streptococcus를 응집시켜 치주질환이나 구취 등을 유발하기도 한다⁶⁾.

Clusterin의 구조는 일반적으로 8개의 exon을 가지고 있으며, 그중 가장 큰 코드(exon V)는 α , β 사슬 양측에 있다⁷⁾. 인간의 clusterin 유전자는 8번 염색체에 위치한 단일 복제 유전자이며⁸⁾ short arm부위의 8p12-21에 위치한 것으로 보고되고 있고⁷⁾, 모든 종에서 genom당 하나의 clusterin 유전자가 존재하는 것으로 보고되고 있다⁹⁾.

Clusterin은 보체조절, 생식, 지방수송, 신경변성, 내분비 및 발생과정 중 다양한 조직의 분화에 관여할 뿐만 아니라 다양한 스트레스와 조직손상에 대해 보호하는 역할을 하는 것으로 추정된다¹⁰⁾.

현대사회를 살아가면서 모든 사람이 겪게 되는 스트레스는 정신·심리적 질환을 야기 시킬 뿐만 아니라 신체적으로도 많은 장애를 일으킨다. 스트레스는 인체에 신경-내분비적 변화를 야기하기도 하지만 물리적 변화도 유발하여 조직에 많은 변화를 나타내기도 하며, 실제로 스트레스 부여 시에 백서 이하선에서 미약하게나마 조직의 변화가 보고된 적도 있다¹¹⁾.

이에 저자는 스트레스 시에 나타나는 구강건조증이 신경성 장애뿐만 아니라 타액선 조직 내의 생화학적 변화도 야기 시킬 수 있을 것이라 생각하여, 타액선 조직이 파괴될 때 관여하는 clusterin을 관찰함으로써 타액선 조직의 변화 과정을 연구관찰하고자 하였으며, 그 결과 다소 의의 있는 결과를 얻었기에 이를 보고하는 바이다.

II. 실험재료 및 방법

1. 실험재료

본 실험에서는 Sprague-Dawley계의 생후 10주된 체중 250~300 g인 웅성백서를 사용하였으며, 사육실 조건은 자동온도장치에 의해 온도는 22~24℃, 습도는 60%를 유지하였고, 12시간 주기로 밤낮을 구별하였다. 10마리를 사용하여 대조군에 2마리, 실험대조군에 2마리 그리고 실험군에 6마리씩을 배정하였으며, 실험대조군은 2시간동안 restraint cone을 사용하여 구속스트레스를 부여하고 즉시 희생시켰고, 실험군은 매일 2시간씩 restraint cone을 사용하여 구속스트레스를 부여하였으며, 이들은 각 군별로 1일, 2일, 3일에 각각 2마리씩 희생시켰다. 그 후 이하선 조직을 절취하여 western blotting을 위하여 -70℃에서 보관하였으며, 면역조직화학적 소견을 관찰하기 위하여 각 군을 Bouin용액에 1일간 고정시킨 후, 4~6 μ m로 박편을 제작하였다.

2. 실험방법

1) 면역전기영동검사(Western blotting)

Western blotting은 BM Chemiluminescence Western Blotting Kit(Boehringer, Mannheim, Germany)의 방법대로 일차항체(goat polyclonal IgG, C-18, 1:5,000, Santa Cruz Technology; Santa Cruz, CA)와 이차항체(rabbit anti-goat IgG HRP, 1:2,000, Santa Cruz Technology; Santa Cruz, CA)를 사용하여 시행하였다.

2) 면역조직화학법

적출된 이하선 조직을 bouin용액에 24시간 동안 고정한 후 통법에 의해 탈수, 투명 처리한 후 paraffin에 포매하였으며, 4~6 μ m 정도 두께로 잘라서 L-lysine으로 처리된 슬라이드 위에 올려 슬라이드를 제작하였다.

면역조직화학분석방법은 anti-clusterin α -peptide antiserum을 사용하여 ABC(avidin-biotin-peroxidase complex)법으로 시행하였다. 간단히 요약하면, 슬라이드를 xylene에 담가 파라핀을 제거하고, 100%, 95%, 80% 에탄올에 각 5분씩 담가 다시 조직에 수분을 공급한 후, PBS(phosphate buffered saline)로 세척하였다. 위와 같이 처리된 슬라이드를 0.5% 과산화수

소수를 혼합한 메탄올에 담가 5분간 서서히 진탕하고 난 후, PBS(phosphate buffered saline)에서 5분간 다시 세척하였다.

위와 같이 처리한 슬라이드를 0.1% Triton X-100을 함유한 PBS에 10분간 담구고, 염소 혈청으로 희석시킨 일차항체(rabbit IgG anti-clusterin peptide)를 조직 위에 떨어뜨리고 4°C에서 24시간동안 방치하였다. 이어서 PBS에 조직을 세척하여 일차항체를 씻어내고, 이차항체(biotinylated goat anti-rabbit immunoglobulin)를 조직 위에 떨어뜨려 1시간 동안 처리한 후, 다시 흐르는 PBS에 슬라이드를 세척하였다.

그 후 avidin-biotin-peroxidase complex(ABC kit; Vector Lab., Burlingame, CA, USA)를 조직 위에 떨어뜨리고 1시간 동안 조직배양접시에 넣어 실온에 두었으며, PBS로 세척하였고, diaminobenzidine 용액(100 mM Tris, pH 7.4, 0.01% H₂O₂, 0.05% diaminobenzidine hydrochloride)으로 면역 염색을 완성하여 슬라이드를 제작하였다.

III. 실험 결과

1. 정상대조군

1) 면역전기영동검사조건

이하선 조직에서 clusterin이 중간정도로 발현되었다. (Fig. 1,2)

2) 면역조직화학적 조건

백서의 이하선은 장액선으로 호염기성의 많은 과립과 기저부층에 위치한 핵을 갖는 둥근 모양의 세포로서, 여러 개의 세포들이 소엽을 이루고 있었다. 이들은 결합조직 중격에 의하여 서로 결합되었으며, 선

포사이에는 단층의 키가 작은 입방세포로 이루어진 개재관과 모세혈관들이 산재되어 있었고, 교원섬유가 주성분이 되는 소엽간 결합조직 내에는 단층의 원주상피로 이루어진 선조관과 풍부한 소혈관이 관찰되었다.(Fig. 3,4,5,6,7)

면역조직화학적 조건에서 clusterin은 이하선의 개재관세포의 세포질에서 미약하게 나타났고, 선조관세포의 세포질에서는 중간 정도로 관찰되었으며, 선포세포의 세포질에서는 관찰되지 않았다.(Fig. 8)

2. 실험대조군

1) 면역전기영동검사조건

이하선 조직에서 clusterin이 정상대조군에 비해 약간 발현이 증가된 양상을 나타내었다.(Fig. 1,2)

2) 면역조직화학적 조건

구속스트레스를 가하고 난 즉시 희생한 실험대조군의 이하선은 정상대조군에 비해 clusterin이 전반적으로 미약하게 증가하였다. 개재관세포의 세포질에서 중간정도로 염색되었고, 선조관세포의 세포질에서는 농도가 진하게 관찰되었으며, 선포세포의 세포질에서도 부분적으로 매우 미약하게 염색된 양상이 관찰되었다.(Fig. 9)

3. 실험군

1) 면역전기영동검사조건

Clusterin은 백서의 이하선에서 구속 24시간, 48시간 후에 점차 감소하다가 구속 72시간 후 다시 현저히 증가하였다.(Fig. 1,2)

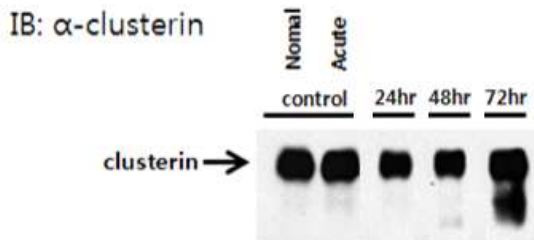


Fig. 1. Western immunoblotting analysis of rat parotid gland under restraint stress - low expose



Fig. 2. Western immunoblotting analysis of rat parotid gland under restraint stress - high expose

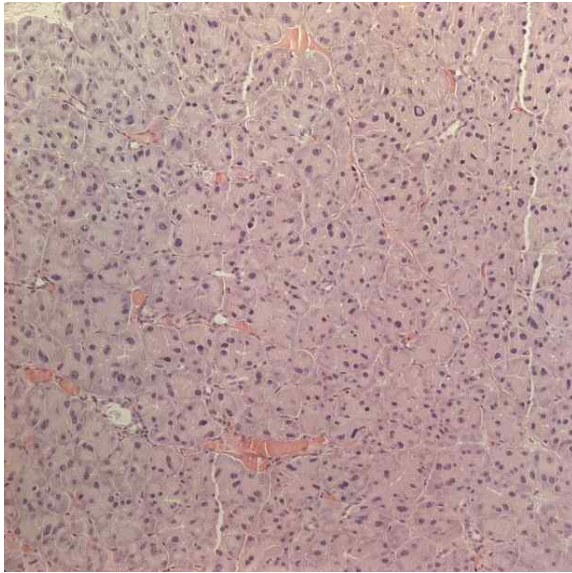


Fig. 3. Photomicroscopic picture of normal parotid gland under restraint stress- HE stain

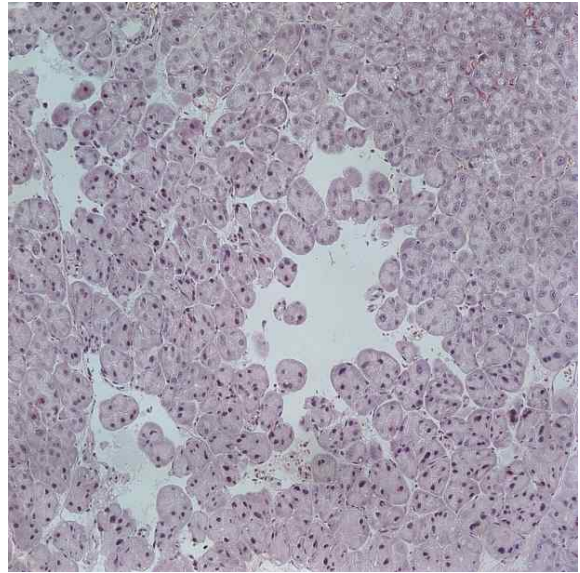


Fig. 5. Photomicroscopic picture of parotid gland under restraint stress 24 hours after experiment - HE stain

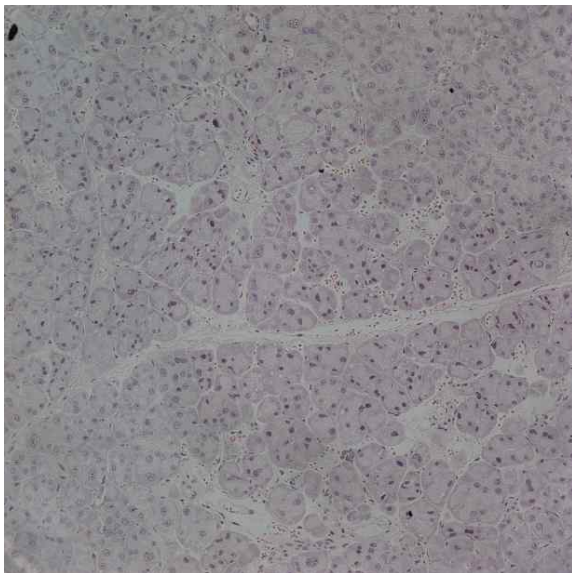


Fig. 4. Photomicroscopic picture of parotid gland under restraint stress immediately after application of the stress - HE stain

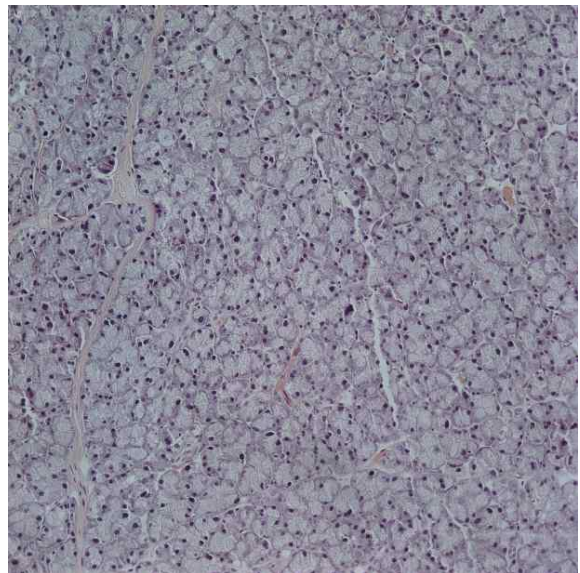


Fig. 6. Photomicroscopic picture of parotid gland under restraint stress 48 hours after experiment - HE stain

2) 면역조직화학적 소견

이하선에서 실험 24시간 후와 48시간 후에 정상대조군에 비해 세포질이 다소 과립상으로 변하며

clusterin이 현저히 감소하여 선조관세포 세포질에서만 중간정도의 염색이 관찰되었고, 그 후 실험 72시간 후에는 확연히 증가된 양상을 보이며 전반적으로 선

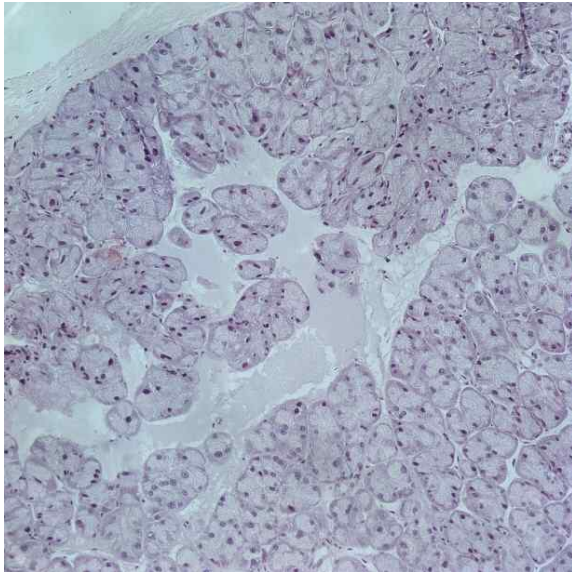


Fig. 7. Photomicroscopic picture of parotid gland under restraint stress 72 hours after experiment - HE stain

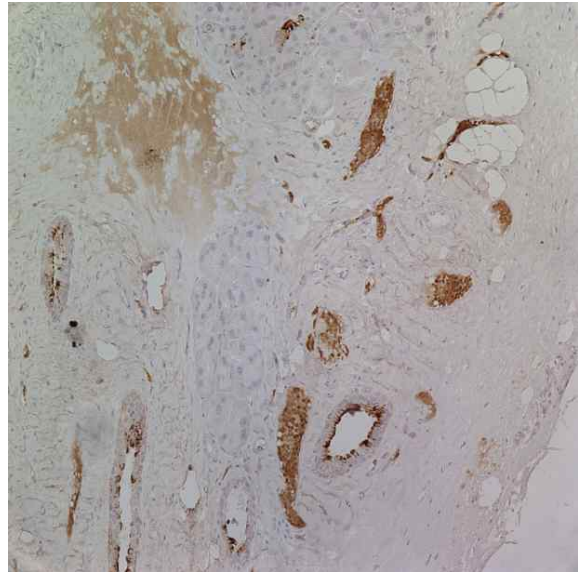


Fig. 9. Immunohistochemistry of clusterin in the parotid gland of rat under restraint stress immediately after application of the stress

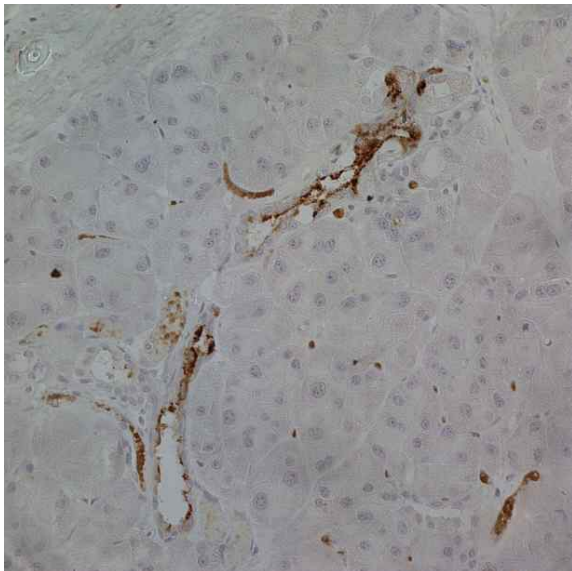


Fig. 8. Immunohistochemistry of clusterin in the parotid gland of normal control rat

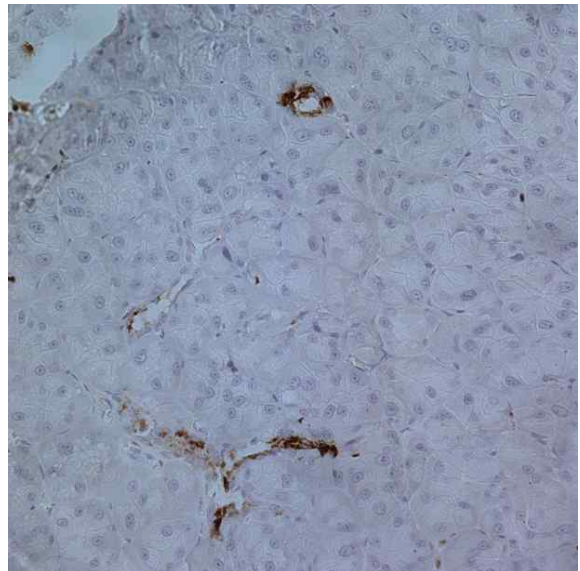


Fig. 10. Immunohistochemistry of clusterin in the parotid gland of rat under restraint stress 24 hours after experiment

포세포의 세포질에서는 매우 미약하게 염색되었으나, 개재관세포와 선조관세포 세포질 모두에서 농염된

양상을 나타내었다. 광학현미경상에서는 다소간의 선포간 이개현상이 관찰되었다.(Fig. 10,11,12)

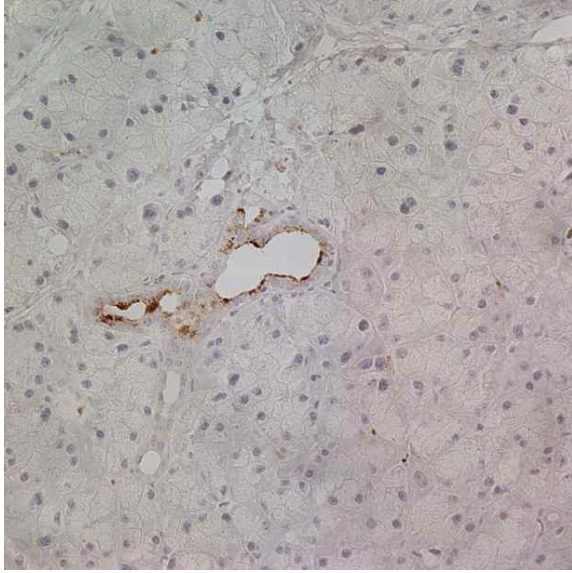


Fig. 11. Immunohistochemistry of clusterin in the parotid gland of rat under restraint stress 48 hours after experiment

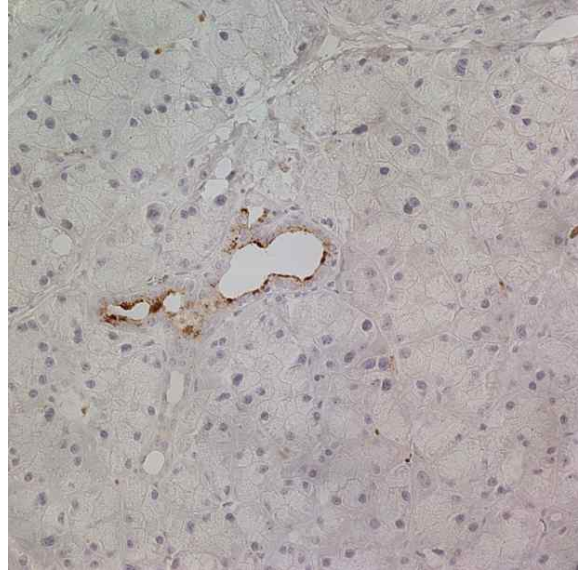


Fig. 12. Immunohistochemistry of clusterin in the parotid gland of rat under restraint stress 72 hours after experiment

IV. 총괄 및 고찰

스트레스는 적응하기 어려운 환경에 처할 때 나타나는 생체의 비특이적 반응으로 정의되며, 생리적으로 자율신경계, 내분비계 및 면역계 등에 영향을 미치게 된다¹⁾. 따라서 스트레스는 면역을 약화시키기도 하고, 구강 내의 다양한 병소를 유발하기도 한다. 또한 갑자기 닥친 심한 스트레스가 정신기능에 장애를 일으키면 해리장애가 일어나고, 운동신경기능에 장애를 일으키면 전환장애가, 자율신경이나 말초신경에 장애를 일으키면 심신장애가 초래된다¹²⁾.

중추신경계에서 신경전달물질로 작용하는 물질에는 스트레스 부여 시 관찰되는 노어아드레날린¹³⁾, 아드레날린¹⁴⁾, 아세틸콜린¹⁵⁾, GABA(gamma amino-butyric acid)¹⁶⁾, substance P¹⁷⁾, 부신피질자극 호르몬¹⁸⁾, 갑상선자극 호르몬¹⁹⁾ 등이 알려져 있다.

스트레스의 인지과정은 신경내분비계의 조절로 생리적 과정과 정서적 반응을 나타낸다²⁰⁾. 즉 인체의 스트레스 반응체계는 크게 Sympathetic adrenomedullary (SAM)계과 Hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA)계의 두 종류로 나뉜다²¹⁾.

Sympathetic adrenomedullary(SAM)계는 육체적 또는 정신적 노력과 정서적 자극에 의해서 카테콜아민, 특히 에피네프린과 노어에피네프린을 유리시키고²²⁾,

Hypothalamic-pituitary-adrenal(HPA)계는 지속적인 스트레스로 인한 고뇌, 분노, 우울 및 무절제 등에 의해서 코르티코스테로이드와 코티솔을 분비시키게 된다²³⁾.

구속 스트레스는 물리적 스트레스와 정신적 스트레스를 동시에 가하는 방법으로 잘 알려져 있다²⁴⁾. 반복되는 구속 스트레스는 HPA계의 활성화로 정신적 및 생리적 반응을 일으켜서 카테콜아민과 스트레스 호르몬인 글루코코르티코이드를 분비시키게 된다²⁴⁾. 한편, Ader, Cohen 등²⁵⁾과 McEwen, Stellar 등²⁶⁾은 반복되는 스트레스는 정신신체질환 및 불안증 같은 정신질환을 야기할 수 있는 위험인자로 작용한다고 보고하였다.

특히 HPA계의 활성화, 면역반응의 구성요소들이 코티솔에 의해서 실제적으로 억제됨으로써 면역반응을 현저히 억제한다²⁷⁾. 이에 대해 Calabrese 등²⁸⁾은 스트레스, 별거 및 우울은 면역학적 기능을 취약하게 한다는 명백한 증거를 보고하였고, Kiecolt-Glaser 등²⁹⁾은 일상적으로 일어나는 스트레스에 의해서도 면역기능의 저하가 초래된다고 보고한 바 있다.

스트레스와 구강 질환과의 관계는 홍과 전¹⁾의 연구에서 잘 나타나 있는데, 스트레스는 이제 더 이상 형이상학적 차원이 아니라 구체적이고 가시적인 증상과 징후를 동반하는데 특히 정동 스트레스(emotional

stress)시에는 구강 내에서도 다양하게 나타나는 것으로 알려져 있다.

구체적으로 스트레스가 주원인인 병소로는 편평태선(lichen planus)과 아프타성 구내염(apthous stomatitis)이 있고³⁰⁾, 스트레스가 관여된 병소로는 다형홍반(erythema multiforme), 양성 점막유천포창(benign mucous membrane pemphigoid) 및 지도상설(geographic tongue)이 있으며³¹⁾, 스트레스가 소인인 병소로는 재발성 단순포진 구내염(recurrent herpes simplex stomatitis)과 급성 괴사성 궤양성 치은염(acute necrotizing ulcerative gingivitis) 등이 있다³²⁾. 또한 스트레스성 구강 징후로는 설통, 설열감, 미각변화, 미각소실, 또는 미각이상 그리고 조직의 변화 없이 발생하는 통증이나 불편감 등이 있다³³⁾. 게다가 이와 같은 스트레스와 관련되어 나타나는 병소와 증상, 징후들은 구강건조증을 동반하는 경우가 많은데, 그럴 경우 그 증상의 정도는 더욱 심화되므로 구강건조증은 임상적으로 매우 중요한 의미를 가진다.

구강 내 타액은 3대 타액선에서 분비된 타액과 구강점막, 입술, 경구개와 연구개, 혀 등에 분포된 소타액선으로부터 분비된 타액이 합쳐진 혼합타액으로서, 하루에 분비되는 총량은 약 1~1.5리터로 알려져 있다.

타액은 구강 내에서 완충작용, 소화작용, 광화작용, 윤활 및 점탄성작용, 점막보호작용, 항균 및 항진균작용, 항바이러스작용 등 다양한 기능으로 구강 내 건강에 중요한 역할을 한다⁴⁾.

타액 분비는 타액선에 분포되어 있는 설인신경과 안면신경 등의 부교감신경과 교감신경 등의 신경활동에 의해 조절되는데, 타액선 타액 자체가 생성되지 않거나 타액의 분비기전에 이상이 생겼을 경우 타액선 질환이 발생하게 되며, 이로 인해 타액선의 가역적 또는 비가역적 기능장애 징후인 구강건조증이 나타날 수 있다⁵⁾. 이것은 임상적으로 구강내 위생 및 건강상태에 큰 영향을 미치게 되는데, 내분비계 이상이나 스트레스 등에 의하여 타액의 분비율과 성분 등이 변화되어 발생할 수 있다.

이하선은 부교감신경에 의해 영향을 받으며, 자극에 의해 타액을 분비하는 조직으로 전과 홍⁶⁾은 스트레스나 당뇨병발 시 이하선에서는 공히 실험 3일후에 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 보고하였다.

Clusterin(SGP-2)은 백서의 고환에 존재하는 Sertoli cell에서 처음으로 발견된 단백질로서³⁴⁾, 분자량이 75-80 KDa이고 heterodimer 형태로 존재하는 glycoprotein이다³⁵⁾. 시험관에서 세포를 응집시키기 때문에 clusterin으로 명명되었으나³⁶⁾, 동물의 종이나 기관 또는 조직에 따라 단백질의 기능 및 크기에서 차이를 보이기 때문에 아직까지 여러 가지 이름으로 불리지고 있다. Clusterin, SGP-2, serum protein 40,40(SP-40,40), pADHC-9, testosterone repressed prostate message2(TRPM-2), complement lysis inhibitor(CLI), T64, glycoprotein III(GpIII), apolipoprotein j(ApoJ) 등으로 불리는 단백질들을 1992년 Clusterin workshop에서 clusterin으로 통칭하게 되었다³⁷⁾.

Clusterin은 지질운송, 정자발생, 보체조절, 내분비 및 발생과정 중 다양한 조직의 분화와 관련이 있는 것으로 알려져 있으며, 또한 스트레스와 조직손상에 대해 보호하는 역할을 하는 것으로 추정된다¹⁰⁾.

혈액 내의 clusterin은 대부분 clusterin-apoAII complex의 형태로 결합되어 있으며, 이 복합체는 지질단백질 간의 콜레스테롤에스터 전이를 일으킨다^{38,43)}. high density lipoprotein(HDL)의 기능에 근거해 볼 때, clusterin은 세포 간의 지질 운송 역할을 할 뿐만 아니라, 세포막의 안정, 재형성과 치유 등 세포완전성을 유지하는 데 중요한 역할을 할 것으로 추측된다³⁹⁾.

인체에서 처음으로 clusterin(SP-40,40)이 확인된 것은 막사구체신염 환자의 사구체에 존재하는 면역침착물에서 보체 말단 성분과 유사한 형태였으며⁴⁰⁾, 초기 C5B-6 복합체에 결합 후 중화되어 세포의 보체매개성 용해를 억제한다고 보고된 바 있다⁴¹⁾. Murphy 등⁴⁰⁾은 clusterin의 α사슬이 인간 C7, C8과 C9의 소수성 결합분절에 결합하고, Wilson 등⁴²⁾은 합성된 인간 IgG, Fc, Fab 부위에 결합한다고 보고하였다. 또한 Jordan-Starck 등³⁹⁾은 면역성 사구체의 손상이 일어날 경우, clusterin이 고갈될 때 많은 손상이 일어난 것으로 보아, clusterin이 보체에 의한 손상을 보호하는 작용을 한다고 주장하였다.

생식과의 관계에 대한 연구에서는 clusterin이 인체 내 정액에 매우 많은 양이 존재한다는 사실이 밝혀졌으며⁴¹⁾, 고환과 부고환에 있는 spermatid와 spermatozoa의 형질막에서도 관찰되었고, 특히 쥐의 배측 전립선의 clusterin mRNA 수준은 거세 후 급격히 증가

하며 testosterone 투여 후 억제되는 것을 볼 때, apoptosis와의 관계를 암시하였다⁴⁴⁾. 지금까지 연구된 바, clusterin은 여성생식관에서 보체매개성 면역용해로부터 정자를 보호하고, 정자의 수정 능력을 개선시키거나, spermatozoa의 발생과 성숙에 관련되는 것으로 추측된다⁴⁵⁾.

특히 clusterin은 apoptosis와도 관계가 있는데, 성숙한 수컷의 쥐를 거세하면 전립선 상피가 apoptosis에 의하여 퇴축되는데 이때 사멸하는 전립선 상피로부터 20배가량 증가된 TRPM-2의 mRNA가 cloning 되었으며, 이는 clusterin과 동일한 것으로 확인되었다⁴⁶⁾. 이러한 예에는 testosterone 차단에 의한 전립선 퇴화, 신장 내의 유체압력 증가에 의한 손상, 손가락 발생 시 손가락 사이 조직의 퇴화 등이 포함된다⁴²⁻⁴⁵⁾. 최근에는 산화 스트레스에 의한 심근세포의 자사를 억제하여 세포를 보호한다는 견해가 제기된 반면⁴⁷⁾, 뇌에 나타나는 nuclear clusterin은 뇌손상과 신경변성 시 apoptosis의 전구 역할을 하는 것으로 밝혀져⁴⁸⁾ clusterin은 apoptosis와 관련하여 서로 상반되는 두 가지 역할을 하는 것으로 보인다.

이에 저자는 세균이 관련되지 않은 상태에서 스트레스는 생체조직에 apoptosis를 유발시킬 가능성이 있다는 가정 하에 본 실험을 실행하였던 바 스트레스 부여 시 타액선 조직에서 clusterin이 증가한 것을 발견하였다. 따라서 스트레스 상황에서 타액선 조직의 손상과 퇴화에 clusterin이 중요한 지표로 작용할 수 있을 것으로 생각된다.

V. 결 론

구강 내에 발생하는 질환의 대부분이 타액의 영향을 받는다는 사실과 타액분비에 영향을 주는 진신적인 요소 중에서도 스트레스가 중요하다는 것은 이미 잘 알려져 있으나, 스트레스가 타액선에 미치는 영향에 관해서는 자율신경에 의한 거시적 반응에 대하여만 알려져 있고 세포수준의 미시적 변화에 대한 연구는 미흡한 실정이다. 이에 본 연구에서는 구속 스트레스 조건하에서 세포자사와 간접적으로 관련이 있다고 알려진 clusterin과 관련하여 백서의 이하선과 이하선이 어떠한 변화를 보이는지 관찰하고자 하였다. 실험재료로는 생후 10주된 체중 250~300 g인 웅성백서 10마리를 사용하였으며, 정상대조군 2마리, 실험대조군 2마리, 실험군 6마리를 배정하였고, 실험대조군과 실험군은 매일 2시간씩 restraint cone을 사용하여

구속스트레스를 부여하였다.

이들은 각 군별로 즉일(실험대조군), 1일, 2일, 3일에 각각 2마리씩 희생한 후 이하선 조직을 절취하여 clusterin 단백질을 검색을 위하여 Western blotting과 면역조직화학검사를 시행 한 바 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 백서의 이하선에서 clusterin은 구속 2시간 후 다소 증가되었으며, 타액선관에서 명확하게 관찰되었다.
2. 백서의 이하선에서 clusterin은 구속 24시간, 48시간 후에 매우 감소되었으며, 타액선관에서도 담염되었다.
3. 백서의 이하선에서 clusterin은 구속 72시간 후 현저하게 증가되었으며, 역시 타액선관에 밀집하여 증가되었다.

이상의 결과로 세포가 자사 될 때 세포를 보호하는 것으로 알려진 clusterin이 24시간, 48시간에 감소되었다가 72시간에 다시 증가된 것은, 구속에 의한 스트레스가 시간적인 차이에 따라, 또는 구속이 반복됨에 따라 세포보호에 대한 반응이 변화를 보여 스트레스로 인한 타액선 조직변화로 인한 타액분비의 변화를 예측할 수 있었다. 향후 추가적으로 실험기간을 연장하여 세포의 구조적 변화의 유무, 혹은 변화양상을 관찰해야 할 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. Yang-Hyun Chun, Jung-Pyo Hong. Stress and Oral Diseases. Korean J Stress Res 1995;3(1):57-72.
2. Eli I, Kleinhauz M, Baht R, Littner M. Antecedents of burning mouth syndrome (glossodynia)-recent life events vs. psychopathologic aspects. J Dent Res 1994;73(2):567-571
3. Martin SG, Michael G, Jonathan A. Burket's oral medicine. 11th ed. BC Decker, 2008
4. Seung-Woo Lee. Oral Diagnosis. 4th ed. Komoonsa, Seoul, 1990
5. Ki-Suk Kim. Differential Diagnosis of Oral Disease. 4th ed. Jisung, Seoul, 1991
6. 전양현, 홍정표. 스트레스가 streptozotocin-유도 당뇨병에서 타액선의 clusterin(SGP-2) 변화에 미치는 영향에 관한 분자생물학적 연구. 대한신심스트레스학회지 1997;5(2):13-32
7. Fritz IB, Murphy B. Clusterin Insights into a multifunctional protein. Trends Endocrinol Metab 1993;4(2):41-45

8. Jenne DE, Tschopp J. Molecular structure and functional characterization of a human complement cytotoxic inhibitor found in blood and seminal plasma: Identity to sulfated glycoprotein 2, a constituent of rat testis fluid. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86(18):7123-7127
9. Jenne DE, Tschopp J. Clusterin: the intriguing guises of a widely expressed glycoprotein. *Trends Biochem Sci* 1992;17(4):154-159
10. Rosenberg ME, Silksen J. Clusterin: Physiologic and pathophysiologic considerations. *Int J Biochem Cell Biol* 1995;27(7):633-645
11. Heung-Mo Kim, Yang-Hyun Chun, Jung-Pyo Hong. The Effect of Salivary Gland of Streptozotocin Diabetic Rats By Stress. *Korean J Oral Med* 1997; 22(1):65-80
12. Young-June Kim. Stress and Psychiatry. *Korean J Stress Res* 1993;1(1):97-102
13. Tanaka M, Kohno Y, Nakagawa R, Ida Y, Takeda S, Nagasaki N. Time-related differences in noradrenalin turnover in rat brain regions by stress. *Pharmacol Biochem Behav* 1982;16(2):315-319
14. Nukina I, Glavin GB, Labella FS. Acute cold-resistant stress affects alpha 2-adrenoreceptors in specific brain regions of the rat. *Brain Res* 1987;401(1):30-33
15. Finkelstein Y, Koffler B, Rabey JM, Gilad GM. Dynamics of cholinergic synaptic mechanisms in rat hippocampus after stress. *Brain Res* 1985;343(2): 314-319
16. Yoneda Y, Kanmori K, Ida S, Kuriyama K. Stress-induced alteration in metabolism of gamma-aminobutyric acid in rat brain. *J Neurochem* 1983; 40(2):350-356
17. Dudar JD. The effect of septal nucleus stimulation on the release of acetylcholin from the rabbit hippocampus. *Brain Res* 1975;83:123-133
18. Guyton. *Textbook of medical physiology*. 8th ed. pp.848, Philadelphia, WB Saunders Co, 1991
19. Arancibia S, Tapia-Arancibia L, Assenmacher I, Astier H. Direct evidence of short-term cold-induced TRH release in the median eminence of unanesthetized rats. *Neuroendocrinology* 1983;37(3): 225-228
20. Shires GT. Important factors in the maintenance of homeostasis in the surgical patient. *Acta Chir Scand Suppl* 1989;550:29-33
21. Cannon WB. The emergency function of the adrenal medulla in pain and the major emotions. *Am J Physiology* 1914;33:356-372
22. Frankenhaeuser M. Psychoneuroendocrine approaches to the study of the emotion as related to stress and coping. *Nebr Sympo Motiv* 1978;26:123-161
23. Frankenhaeuser M, 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
24. Chrousos GP. Stressor, stress and neuroendocrinology intergration of the adaptive response: The 1997 Hans Selye Memorial Lecture. *Ann NY Acad Sci* 1998;851: 311-335
25. Ader R, Cohen N. Psychoneuroimmunology: conditioning and stress. *Annu Rev Psycho* 1993;44:53-85
26. McEwen BS, Stellar E. Stress and the individual: mechanisms leading to disease. *Arch Intern Med* 1993;153(18):2093-2101
27. Chrousos GP. The hypothalamic - pituitary - adrenal axis and immune-mediated inflammation. *N Engl J Med* 1995;332(20):1351-1362
28. Calabrese JR, Kling MA, Gold PW. Alteration in immunocompetence during stress, bereavement and depression: Focus on neuroendocrine regulation. *Am J Psychiatry* 1987;144(9):1123-1134
29. Kiecolt-Glaser JK, Garner W, Speicher C, Penn GM, Holliday J, Glaser R. Psychosocial modifiers of immunocompetence in medical students. *Psychosom Med* 1984;46(1):7-14
30. Macleod RL. Psychological factors in oral lichen planus. *Br Dent J* 1992;173(3):88
31. Redman RS, Vance FL, Gorlin RJ, Peagler FD, Meskin LH. Psychological component in the etiology of geographic tongue. *J Dent Res* 1966;45(5): 1403-1408
32. Bierman SM. A retrospective study of 375 patients with genital herpes simplex infections seen between 1973 and 1980. *Cutis* 1983;31(5):548-565
33. Browning S, Hislop S, Scully C, Shirlaw P. The association between burning mouth syndrome and psychosocial disorders. *Oral surg Oral Med Oral Pathol* 1987;64(2):171-174
34. Blaschuk O, Burdzy K, Fritz IB. Purification and characterization of a cell-aggregating factor (clusterin), the major glycoprotein in ram rete testis fluid. *J Biol Chem* 1983;258(12):7714-7720
35. Jones SE, Jomary C. Clusterin. *Int J Biochem Cell Biol* 2002;34(5):427-431
36. Little SA, Mirkes PE. Clusterin expression during programmed and teratogen-induced cell death in the postimplantation rat embryo. *Teratology* 1995;52(1):

- 41-54
37. Fritz IB, Murphy B. Clusterin Insights into a multifunctional protein. *Trends Endocrinol Metab* 1993;4(2):41-45
 38. Burkey BF, deSilva HV, Harmony JA. Intracellular processing of apolipoprotein J precursor to the mature heterodimer. *J Lipid Res* 1991;32(6):1039-1048
 39. Jordan-Starck TC, Witte DP, Aronow BJ, Harmony JA. Apolipoprotein J: a membrane policeman? *Curr Opin Lipidol* 1992;3(2):75-85
 40. Murphy BF, Kirszbaum L, Walker ID, d'Apice AJ. SP-40,40, a newly identified normal human serum protein found in the SC5b-9 complex of complement and in the immune deposits of glomerulonephritis. *J Clin Invest* 1988;81(6):1858-1864
 41. Kirszbaum L, Sharpe JA, Murphy B, d'Apice AJ, Classon B, Hudson P, Walker ID. Molecular cloning and characterization of the novel, human complement-associated protein, SP-40,40: a link between the complement and reproductive systems. *EMBO J* 1989;8(3):711-718
 42. Willson MR, Easterbrook-Smith SB. Clusterin binds by a multivalent mechanism to the Fc and Fab regions of IgG. *Biochem Biophys Acta* 1992;1159(3):319-326
 43. Ehnholm C, Bozas SE, Tenkanen H, Kirszbaum L, Metso J, Murphy B, Walker ID. The apolipoprotein A-I binding protein of placenta and the SP-40,40 protein of human blood are different proteins which both bind to apolipoprotein A-I. *Biochim Biophys Acta* 1991;1086(3):225-260
 44. Sylvester SR, Morales C, Oko R, Griswold MD. Localization of sulfated glycoprotein-2(clusterin) on spermatozoa and in the reproductive tract of the male rat. *Biol Reprod* 1991;45(1):195-207
 45. Purrello M, Bettuzzi S, Di Pietro C, Mirabile E, Di Blasi M, Rimini R, Grzeschik KH, Ingletti C, Corti A, Sichel G. The gene for SF-40,40, human homolog of rat sulfated glycoprotein 2, rat clusterin, and rat testosterone-repressed prostate message 2, maps to chromosome 8. *Genomics* 1991;10(1):151-156
 46. Léger JG, Montpetit ML, Tenniswood MP. Characterization and cloning of androgen-repressed mRNAs from rat ventral prostate. *Biochem Biophys Res Commun* 1987;147(1):196-203
 47. Jun HO, Kim DH, Lee SW, Lee HS, Seo JH, Kim JH, Kim JH, Yu YS, Min BH, Kim KW. Clusterin protects H9c2 cardiomyocytes from oxidative stress-induced apoptosis via Akt/GSK-3 β signaling pathway. *Exp Mol Med* 2011;43(1):53-61
 48. Kim N, Choi WS. Proapoptotic role of nuclear clusterin in brain. *Anat Cell Biol* 2011;44(3):169-175

ABSTRACT

The Effect of Repeated Restraint Stress on Clusterin Change of the Rat Salivary Glands

Ko-Woon Lee, D.M.D.¹, Soo-Kyung Kang, D.M.D.,M.S.D.,Ph.D.¹,
Yang-Hyun Chun, D.M.D.,M.S.D.,Ph.D.¹, Jung-Pyo Hong, D.M.D.,M.S.D.,Ph.D.^{1,2}

Department of Orofacial Pain and Oral Medicine, School of Dentistry, Kyung Hee University¹
Institute of Oral biology, School of Dentistry, Kyung Hee University²

It has been known that saliva may affect the most of oral diseases. On the contrary, several systemic conditions may affect salivary flow and cause oral dryness and psychosocial stress especially may a crucial role in the etiology of hyposalivation and oral dryness. Many studies have focused on macroscopic effects of the stress on the salivary glands by autonomic response, but on the other hand it has hardly been reported on cellular microscopic effects of the stress on the salivary glands. Therefore, this study was performed to examine clusterin, a antiapoptotic and cytoprotective protein, in the parotid glands under restraint stress condition.

For this study, 10 rats were divided into 3 groups; 1) 2 rats of group I were selected as a normal control. 2) 2 rats of group II, as a experimental control were placed in the restraint cone for 2 hours 3) 6 rats of group III were placed in the restraint cone for 2 hours once a day. The rats were sacrificed immediately(group II, as a experimental control), 24, 48, and 72 hours after application of the stress and the parotid glands were excised. Western blotting and immunohistochemistry were performed.

The finding were as follows:

1. In parotid glands, clusterin was mildly increased and clearly expressed in the ductal cell under restraint stress immediately after application of the stress.
2. In parotid glands, clusterin was significantly decreased and slightly stained in the ductal cell under restraint stress 24 and 48 hours after experiment.
3. In parotid glands, clusterin was prominently increased again and densely stained in the ductal cell under restraint stress 72 hours after experiment.

Key words: Restraint stress, Salivary glands, Clusterin
