

구속 스트레스에 대한 백서 타액선의 Apo Taq 발현

경희대학교 치의학전문대학원 안면통증·구강내과학교실¹, 경희대학교 구강생물학연구소²

조성국¹ · 강수경¹ · 어규식¹ · 전양현^{1,2} · 홍정표^{1,2}

본 연구에서는 백서에 구속 스트레스를 통하여 정서적인 스트레스를 가한 후, 이하선 조직의 형태학적 변화 양상을 광학 현미경으로 관찰하였으며, 타액선 조직에서 세포자멸사의 평가는 TUNEL assay에 양성을 보이는 세포 수를 측정하여, 각 군별 차이를 비교하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 백서 이하선에서 구속 스트레스를 가한 후, 5일부터 타액선 신포의 위축 및 농염이 관찰되었으며, 7일부터 세포자멸사 소견이 관찰되기 시작하였다.
2. In situ DNA end labelling assay를 통하여 TUNEL 염색을 시행한 결과, 타액선 장액신포에서 양성세포가 구속 스트레스에 대해 5일부터 통계학적으로 유의하게 증가하여 7일째에 가장 큰 지수를 보여 조직학적 소견과 일치하였다.

따라서 구속에 의한 스트레스 증가에 따라 생체 내 타액선조직에서 세포자멸사가 유도됨을 증명할 수 있었으며, 향후 유도 신호전달 기전에 관한 연구가 이루어져야 한다고 사료된다.

주제어: 구속 스트레스, 세포자멸사, 타액선

1. 서 론

현대는 인간의 평균수명이 현저하게 증가되고 있으나, 여러 가지 질환에 노출되어있고, 이로 인하여 구강병도 빈번히 발생하고 있는 추세이다.

따라서, 구강건조증, 구취 및 여러 구강점막질환과 안면통증 등 다양한 증상, 징후 및 질환들이 현대생활과 무관하지 않다는 전과 홍¹⁾의 보고와 같이, 치의학계에서는 증가하는 구강병의 원인을 규명하여, 질환의 발생을 막아주거나 지연시켜 건강한 구강상태가 유지될 수 있도록 하는 노력이 매우 중요한 과제로 제시되고 있다.

구강병은 많은 경우에 전신의 면역이 저하되는 상

태에서 자주 발생되는데, 면역저하는 전신질환 시에 나타날 수 있으며, 정서적 스트레스가 일반적이고 광범위한 중요원인으로 작용할 수 있다는 많은 연구보고가 있다.¹⁾

특히 구강은 면역 방어막을 이루어 뛰어난 면역력을 제공하고 있는 타액의 역할에 의하여 보호 받고 있으며, 당뇨 등의 전신질환이나 정서적 스트레스에 의해서 타액선이 손상을 받아 구강병이 호발할 수도 있다는 많은 연구결과가 보고되고 있다.^{1,9)}

현대사회에서 많은 사람들이 겪고 있는 스트레스는 정신·심리적 질환을 야기 시킬 뿐만 아니라 신체적으로도 많은 장애를 일으킨다. 특히 스트레스는 인체에 신경-내분비 체계의 변화를 야기 시키기도 하고, 물리적 변화도 유발시켜 조직에 많은 변화를 나타내기도 하고, 실제로 조직자체 내의 생화학적 변화도 일으켜 타액선의 해부학적 구조나 기능에도 변화도 초래한다는 연구보고도 발표되고 있다.^{3,4)}

이에 대해, Kleinhaus 등⁵⁾은 스트레스로 인해 타액선이 기능저하 되어 구강건조증이 나타난다고 하였고, Martin 등⁶⁾은 스트레스로 인한 구강건조증으로 구강점막병소가 유발되고 이상감각증을 야기하며 구취를

교신저자 : 홍정표

120-752, 서울시 동대문구 회기동 1번지
경희대학교 치과대학 안면통증·구강내과학교실
전화: (02)958-9358,
FAX: (02)968-2043,
E-mail: unicomfort@khu.ac.kr
원고접수일: 2013-10-21
심사완료일: 2013-11-15

발생시킨다고 보고하였는데, 스트레스는 이하선, 악하선 및 설하선 등의 대타액선에도 큰 영향을 미쳐 타액의 분비량과 성분에도 변화를 일으키며, 타액선에서 스트레스로 인하여 분비된 clusterin 단백질이 구강 내로 유리되어 Streptococcus를 응집시킴으로써 치주질환이나 구취 등을 유발하기도 한다³⁾고 하였다.

실험적으로 백서에 구속 스트레스를 가하여 정서적인 스트레스를 가한 후, 이하선의 변화를 여러 가지 단백질 표식자를 이용하여 관찰한 결과, 타액선 조직의 형태변화는 물론, clusterin과 caspase 3, 8, 9 등의 변화가 관찰되어, 타액선이 정서적 스트레스에 의하여 세포자멸사 된다고 추측하고 있으나, 이와 같은 기존의 학설을 보다 명확하게 구명하는 것은 구강병 연구에 무척 중요한 일이라고 생각한다.^{7,8)}

따라서 본 연구에서는 조직이 자멸사될 때 발현되는 Apo Taq를 타액선에서 관찰하여, 타액선조직이 정서적 스트레스에 의하여 세포자멸사 된다는 것을 확인함으로써, 스트레스로 인하여 발생하는 여러 가지 질환의 원인을 구명하려고 하였던 바, 다소 의미 있는 결과를 얻었기에 이를 보고하는 바이다.

II. 실험재료 및 방법

본 실험에서는 Sprague-Dawley계의 생후 10주된 체중 250~300g인 웅성백서를 사용하였으며, 12시간 주기로 밤낮을 구별하였다. 18마리를 사용하여 대조군에 2마리, 실험대조군에 2마리 그리고 실험군에 14마리씩을 배정하였으며, 실험대조군은 2시간동안 restraint cone을 사용하여 구속스트레스를 부여하

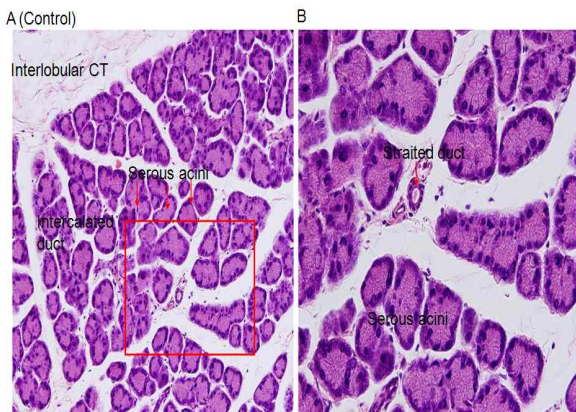


Fig 1. Representative section of normal parotid salivary gland appears packed with secretory serous acini. (A: x200, B: x400, H & E stain)

고 즉시 희생시켰고, 실험군은 매일 2시간씩 restraint cone을 사용하여 구속스트레스를 부여하였으며, 이들은 각 군별로 1일, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 7일에 각각 2마리씩 희생시켰다.

면역조직화학적 소견을 관찰하기 위하여 각 군을 Bouin용액에 1일간 고정시킨 후, 4~6 μ m로 박편을 제작하였다.

박절한 조직을 파라핀 제거 후, PBS로 세척하고 조직의 endogenous peroxidase를 불활성화 시키기 위해 3% H₂O₂에 실온에서 30분 동안 처리하였다. 그리고 TdT enzyme 을 슬라이드에 점적한 후 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 이를 PBS 용액에 3차례 세척하여 건조시킨 다음 Converter-POD solution (50 μ l)를 조직에 점적한 후 30분간 배양하였다. 이를 다시 PBS 용액으로 3회 세척한 후 DAB-subtraction solution (500 μ l)을 떨어 뜨려 5분간 반응 후 발색시켜 증류수로 세척한 후 봉입하였다. 위양성 반응을 배제하기 위해 Tdt 대신 PBS용액을 적용시킨 대조표본을 만들어 광학현미경을 통해 음성 반응을 확인하였다.

III. 실험 결과

1) 정상대조군

정상 대조군의 이하선 조직은 장액선포와 관구조가 모여 소엽을 이루고 소엽은 섬유조직에 의해 분리되는 구조로 이루어졌으며, 선포간 경계는 명확하고 세포질은 분비과립이 관찰되었으며 타액선 결체조직 내

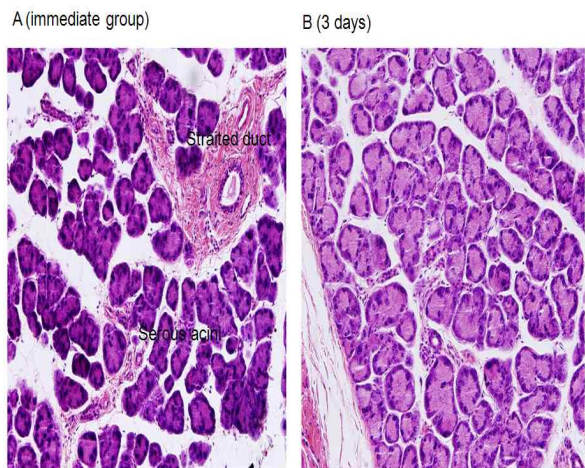


Fig 2. Representative section of microphotography reveal no significant change in parotid salivary gland (A: immediate group, x200, B: 3 days stress group, x400, H & E stain)

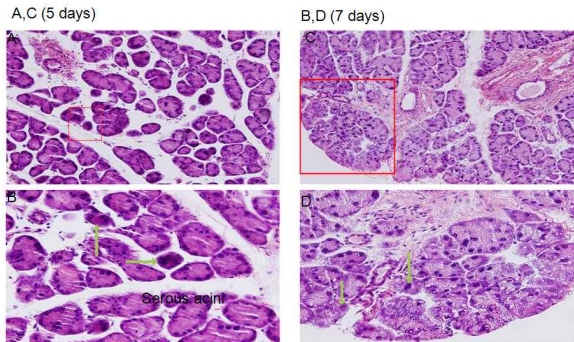


Fig 3. Representative section shows condensation of acinar cells (A: x200, B: x 400) and destruction or necrosis of acini (C: x200, D: x400, H & E stain) for 5 days (A,C), 7 days (B, D) under restraint stress.

에서는 선조관의 도관세포가 단층의 원주형으로 나타났으나 세포의 크기, 형태, 배열은 모두 규칙적 이었으며, 핵이나 세포질의 이상소견은 관찰되지 않았다.

2) 실험군

즉시군부터 4일군까지는 선포세포의 변화와 도관확장, 염증세포 침윤 등의 소견이 관찰되지 않았으나, 5일군부터는 타액선 도관부에서는 변화가 없었지만 변연부에서 주로 선포세포들의 크기가 감소되고, 위축되었으며 농염되고 불분명해진 핵을 보이는 세포들이 관찰되기 시작하였다. (그림3 A, C)

7일군에서부터 염증반응은 없었으나, 타액선 주변부의 선포세포에서 세포자멸사로 의심되는 세포막의 파괴, 세포질의 위축, 세포의 종창, 액의 염색질이 농축된 괴사세포를 관찰할 수 있었다. (그림3 B, D)

조직에서 세포자멸사의 평가는 TUNEL assay에 양성을 보이는 핵이 갈색으로 염색되는 세포 수를 측정하여 각 군별 차이를 비교하였다.

TUNEL assay에 양성인 세포측정은 각 군의 슬라이드에서 무작위 10부위를 선택하여 광학현미경 200배율에서 관찰되는 TUNEL assay에 양성인 세포수를 측정하였다.

구속 스트레스에 의한 타액선 사멸양상을 In situ DNA end labelling assay를 통하여 TUNEL 반응에 갈색으로 양성 반응을 나타내는 자멸세포는 대조군에서는 거의 나타나지 않았다. (Fig. 4 A)

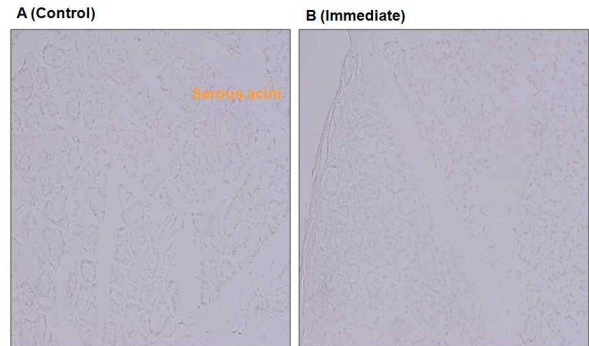


Fig 4. Representative section of TUNEL apoptosis staining in control and immediate group. There was no or positive cells in parotid salivary gland (A: control, x200, B: immediate stress group, x200)

또한 즉시군에서 4일군까지 400배의 고배율 시야당 1% 이하에서 TUNEL 양성 세포가 나타났으나, (Fig. 4 B, Fig. 5A) 5일군부터 양성세포가 유의하게 증가하기 시작하여, (Fig. 5B) 스트레스 부여 7일 후에 가장 많이 발현되었고, 이런 양성세포는 세포자멸사로 의심되는 부위에서 주로 관찰되었다. (Fig. 5B, 5 C, 5 D, Fig. 6)

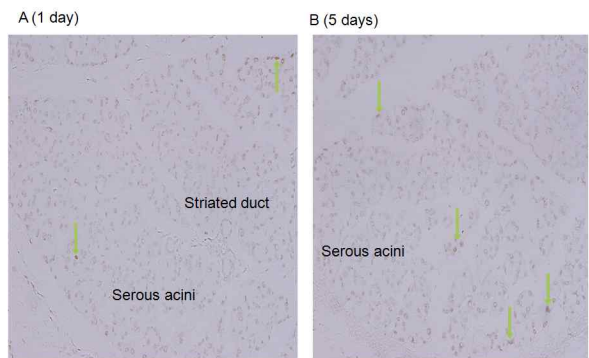


Fig 5. Representative section of TUNEL apoptosis staining in 1(A) and 5 (B) days stress group. There was increased TUNEL-positive cells from 5 days (x200)

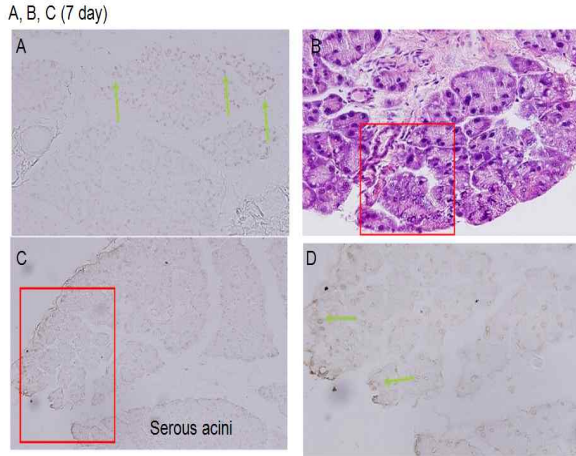


Fig 6. Representative section of TUNEL apoptosis staining in 7 days stress group. The number of TUNEL-positive cells peaked at 7 days in acinar destruction or necrosis site. (A & C: x200, B & D: x400)

실험에서 얻어진 측정치는 평균±표준오차로 표시하였으며, 통계학적 유의성은 Student's t-test를 실시하였고, 유의수준은 0.05로 정하였다.

IV. 총괄 및 고찰

현대사회는 매우 빠르고 다양하게 변화되어 이에 적응하기 위한 현대인들은 많은 스트레스를 감수하고 살고 있다. '스트레스'는 예기치 않은 환경에 처했을 때 나타나는 생체의 비특이적 반응으로, 생리적으로 자율신경계, 내분비계 및 면역계 등에 영향을 미치게 된다.¹⁾ 따라서 스트레스에 의하여 면역이 약화됨으로써 면역체계로부터 많은 보호를 받도 있는 구강 내에는 다양한 병소가 발생되기도 하는 것이다. 이러한 스트레스를 갑작스럽고 심하게 받게 되면, 정신기능에 장애를 일으켜 해리장애가 일어나기도 하고, 운동신경 기능에 장애를 일으키면 전환장애가, 자율신경이나 말초신경에 장애를 일으키면 심신장애가 초래되기도 한다.⁴⁾

스트레스의 인지과정은 신경내분비계의 조절로 인하여 생리적 반응과 정서적 반응으로 나타나게 된다.⁹⁾ 즉 인체의 스트레스 반응체계를 크게 둘로 나누면, Sympathetic adrenomedullary (SAM)계와 Hypothalamic-pituitary-adrenal(HPA)계로 나눌 수 있는데,¹⁰⁾ SAM계는 육체적 또는 정신적 노력과 정서

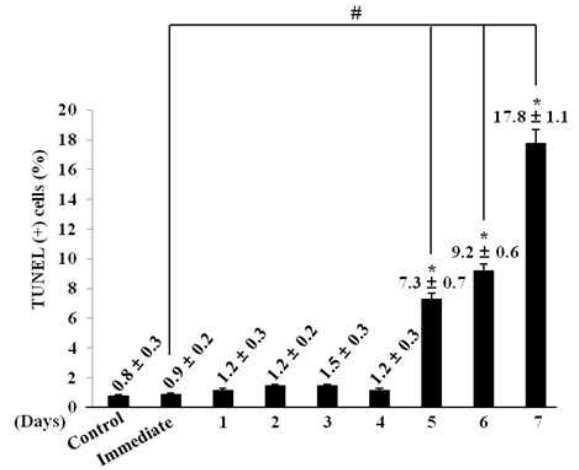


Fig 7. Apoptosis index by TUNEL assay under restraint stress*: statistically significant difference compared with control group, # : statistically significant difference compared with experimental group.

적 자극에 의해서 카테콜아민, 특히 에피네프린과 노어에피네프린을 유리시키고,¹¹⁾ HPA계는 지속적인 스트레스로 인한 고뇌, 분노, 우울 및 무절제 등에 의해서 코르티코스테로이드와 코티솔을 분비시키게 된다.¹²⁾

본 실험은 정서적 스트레스의 영향을 관찰하기 위한 것으로, 정서적 스트레스의 실험적 모델인 구속 스트레스를 사용하였는데, 본 실험에서 사용한 스트레스 부여방법인 구속 스트레스는, 물리적 스트레스와 정신적 스트레스를 동시에 가하는 방법으로 잘 알려져 있다.¹³⁾ 반복되는 구속 스트레스는 HPA계의 활성화로 정신적 및 생리적 반응을 일으켜서 카테콜아민과 스트레스 호르몬인 글루코코티코이드를 분비시키게 되는데,¹⁸⁾ 이때 HPA계의 활성화는 실제적으로 면역에 관여하는 여러 세포들의 반응을 억제시킴으로써 면역반응을 현저하게 억제시키는 것이다.¹⁴⁾ 이에 대해 Calabrese 등¹⁵⁾은 스트레스, 별거 및 우울은 면역학적 기능을 취약하게 한다는 명백한 증거를 보고하였고, Kiecolt-Glaser 등¹⁶⁾은 일상적으로 일어나는 스트레스에 의해서도 면역기능의 저하가 초래된다고 보고하였으며, Ader, Cohen 등¹⁷⁾과 McEwen, Stellar 등¹⁸⁾도 반복되는 스트레스가 정신신체질환 및 불안증 같은 정신질환을 야기할 수 있는 위험인자로 작용한다고 보고한 바 있다.

전과 홍¹⁾의 연구에서 보고된 바와 같이, 스트레스는 이제 더 이상 형이상학적 차원이 아니라 구체적이고 가시적인 증상과 징후를 동반하며, 특히 정서적 스트레스(emotional stress) 시에 구강 내에서 다양하게 병소와 통증, 이상감각증 등을 나타낸다.

구체적으로 스트레스가 주원인인 병소로는 편평태선(lichen planus)과 아프타성 구내염(apthous stomatitis)이 있고,¹⁹⁾ 스트레스가 관여된 병소로는 다형홍반(erythema multiforme), 양성 점막유전포창(benign mucous membrane pemphigoid) 및 지도상설(geographic tongue)이 있으며,²⁰⁾ 스트레스가 소인인 병소로는 재발성 단순포진 구내염(recurrent herpes simplex stomatitis)과 급성 괴사성 궤양성 치은염(acute necrotizing ulcerative gingivitis) 등이 있다.²¹⁾ 또한 스트레스성 구강 징후로는 설통, 설작열감, 미각변화, 미각소실, 또는 미각이상 그리고 조직의 변화 없이 발생하는 통증이나 불편감 등이 있다.²²⁾

이와 같은 병소와 증상, 징후들은 스트레스에 의한 생리적 반응에 의하여 대부분 구강건조증을 동반하는 경우가 많은데, 이때 증상의 정도는 더욱 심화되므로 구강건조증은 임상적으로 매우 중요한 의미를 가진다.

구강 내 타액은 하루에 약 1~1.5리터 가량 분비되는데, 3쌍의 대타액선에서 분비된 타액과 구강점막, 입술, 연구개와 혀 등에 분포된 소타액선으로 부터 분비된 타액이 합쳐진 혼합타액으로 이루어져 있다.

타액은 구강 내에서 완충작용, 소화작용, 광화작용, 윤활 및 점탄성작용, 항균 및 항진균, 항바이러스작용 등 다양한 기능으로 구강 내 면역체계를 형성함으로써 구강 건강에 중요한 역할을 한다.

타액 분비는 타액선에 분포되어 있는 설인신경과 안면신경 등의 부교감신경과 교감신경의 신경활동에 의해 조절되기 때문에 정서적 스트레스에 의하여 많은 영향을 받게 되며, 타액선에서 타액 자체가 생성되지 않거나 타액의 분비기전에 이상이 생겼을 경우 타액의 분비율과 성분 등이 변화될 수 있고, 타액선 질환이 발생하게 되며, 이로 인해 타액선의 가역적 또는 비가역적 기능장애인 구강건조증이 발생할 수 있다. 전과 홍¹⁾은 구강건조증이 임상적으로 구강 내 위생 및 건강상태에 큰 영향을 미치게 되는데, 우리 몸의 항상성을 유지시키는 중요한 체계인 신경계, 내분비계, 면역계에 영향을 미치는 스트레스 상황에서 발생할 수 있으므로, 스트레스와 구강건강 사이에는 매우 중요한 상관관계가 있다고 하였다.

이하선은 주로 부교감신경에 의해 영향을 받으며,

자극성 타액을 분비하는 타액선으로 전과 홍³⁾의 보고에 의하면, 악하선에서는 스트레스나 당노유발 시에 공히 실험 3일후에 세포자사로부터 세포를 보호하는 역할을 하는 clusterin이 미약하게 발현되었다가 실험 5일후에 뚜렷하게 발현되었던 반면, 이하선에서는 공히 실험 3일후에 조기 발현되었는데 그 이유는 이하선이 악하선에 비하여 외부 환경변화에 대해 예민하게 반응하였기 때문일 것이라고 보고한 바 있다.

타액선은 크게 선포와 도관세포로 구성되는데, 타액을 생성하는 선포세포는 스스로 분열 능력이 없어 도관의 선포측 끝세포에서 생성된다. 타액선은 위축되면 선포세포가 상실되는데 특히 점액선포보다 장액선포의 소실이 더 빠르고 광범위하게 진행된다.²³⁾

세포자멸사에 대한 연구는 최근에 활발하게 진행되고 있는데, 세포자멸사는 예정된 계획에 의하여 조절되어지는 세포의 사망이며, 이는 많은 성장조직에서 생리적으로 발생하기도 하며, 방사선, 자외선, 독소 등의 외적인 자극에 의해 발생하기도 한다.²⁴⁾ 1972년 처음으로 개념이 도입된 세포자멸사는 괴사와 감별되는 세포 사망의 한 형태로, 괴사의 경우 DNA 파괴 전에 세포막의 소실이 일어나며 세포의 부종, 핵파괴를 동반한 핵농축, 세포질의 호산성화가 특징인 반면, 세포자멸사는 DNA 파괴 후에도 세포막의 소실이 없으며 세포핵의 파열(nuclear blebbing), 염색체의 응결(internucleosomal fragmentation), 세포질의 응축(cell shrinkage), 세포자멸체 (apoptotic body) 형성 등의 특징적인 양상을 동반하여 형태학적으로 괴사와는 구별된다.^{25,26)}

세포자멸사와 괴사는 같은 조직에서 동시에 발생할 수 있으며, 이들의 구별은 여러 가지 방법으로 가능하다.²⁷⁾ 조직 내 세포자멸사의 검증방법으로는 전기영동법, 생체조직염색법, 고정조직염색법, 전자현미경을 이용한 방법 등이 있는데, 전기영동법은 저렴하고 신속한 장점이 있으나 정확성이 떨어지며, 생체조직염색법은 파라핀조직에서 염색이 불가능하고 저장성이 없으며, 전자현미경을 이용한 방법은 가장 정확하나 정량적 분석을 할 수 없다²⁸⁾는 한계를 가지고 있다. 본 실험에서는 파라핀 조직에서 검출이 가능하고 후향 및 정량적 검사가 가능하며 임상적용이 용이한 TUNEL 방법을 이용하였는데, 이 방법은 자멸사 세포에서 endonuclease의 활성화로 발생한 DNA 절단을 표식하는 방법이다.²⁹⁾ 본 연구에서 정상 타액선 조직의 DNA 분절화를 확인하기 위해 TUNEL 염색을 실시한 결과, 정상 이하선 조직에서는 거의 음성 반응을 보

였으나, 구속 스트레스 부여군의 시간 증가군에서 5일 후부터 유의한 양성 세포를 보여 타액선도 스트레스에 의해 자멸사가 관찰되는 것을 확인 할 수 있었다. 이러한 TUNEL 양성 반응을 보이는 기작은 DNA 의 3과 5 의 양쪽 말단에서 digoxigenin-DDUTP를 연결 시키기 위해 항체 anti-dioxigenin-peroxidase 와 반응하여 발색되어 나타나게 된 것이다.³⁰⁾

본 연구의 제한점은 연구에 사용된 TUNEL 방법이 위양성이 있다는 점인데, TUNEL 염색방법은 그 방법이 비교적 쉽고 조직의 배양을 하지 않고도 쉽게 측정 할 수 있다는 장점이 있으나, 자멸세포의 퇴행성 과정 및 재생 과정에서 모두 양성으로 나타나서 위양성이 많은 것으로 알려져 있다. 또한 TUNEL 지수가 조직의 퇴행성 변화 정도와 치유 능력을 일부 반영한다고 할 수 있으나 세포 각각의 기능적 변화를 모두 반영한다고는 할 수 없다. 따라서 이런 지표들과 함께 세포의 ROS 및 산화스트레스측정, 예를 들어 산화되어 변형된 DNA를 반영하는 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine(8-OHdG) 를 정량적 평가하는 것과 관련 신호 기전에 관한 추가적인 실험이 필요하다고 사료된다.

V. 결 론

본 연구는 백서에 구속스트레스를 가한 후, 이하선 조직의 형태학적 변화 양상을 광학 현미경으로 관찰하였으며, 타액선 조직에서 세포자멸사의 평가는 TUNEL assay에 양성을 보이는 세포 수를 측정하여, 각 군별 차이를 비교하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 백서 이하선에서 구속 스트레스를 가한 후, 5일부터 타액선 선포의 위축 및 농염이 관찰되었으며, 7일부터 세포자멸사 소견이 관찰되기 시작하였다.
2. In situ DNA end labelling assay를 통하여 TUNEL 염색을 시행한 결과, 타액선 장액선포에서 양성세포가 구속 스트레스에 대해 5일부터 통계학적으로 유의하게 증가하여 7일째에 가장 큰 지수를 보여 조직학적 소견과 일치하였다.

따라서 구속에 의한 스트레스 증가에 따라 생체 내 타액선조직에서 세포자멸사가 유도됨을 증명할 수 있었으며, 향후 유도 신호전달 기전에 관한 연구가 이루어져야 한다고 사료된다.

참 고 문 헌

1. 전양현, 홍정표. 스트레스와 구강질환. 대한신심스트레스학회지. 199;53(1):57-72.
2. 김홍모, 전양현, 홍정표. 스트레스가 streptozotocin 유도 당뇨백서의 타액선에 미치는 영향. 대한구강내과학회지. 1997;22(1):65-80.
3. 전양현, 홍정표. 스트레스가 streptozotocin 유도 당뇨백서 타액선의 clusterin(SGP-2) 변화에 미치는 영향에 관한 분자생물학적 연구. 대한신심스트레스학회지. 1997;5(2):13-32.
4. 김영준. 스트레스와 정신의학. 대한신심스트레스학회지. 1993;1(1):97-102.
5. Kleinhaus IEM, Baht R and Littner M. Ante-cedents of burning mouth syndrome - recent life event vs. psychopathologic aspects. J Dent Res. 1994;73:567-571.
6. Martin SG, Michael G, Jonathan A. Burket's oral medicine. 11th ed. 2008. BC Decker.
7. Kim JH, Kim JH, Jun HO, Yu YS, Min BH, Park KH, Kim KW. Protective effect of clusterin from oxidative stress-induced apoptosis in human retinal pigment epithelial cells. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2010;51(1):561- 566.
8. Daish TJ, Mills K, Kumar S. Drosophila caspase DRONC is required for specific developmental cell death pathways and stress-induced apoptosis. Dev Cell. 2004;7(6):909-915.
9. Shires GT. Important factors in the maintenance fo homeostasis in the surgical patient. Acta Chir Scand (Suppl). 1988;550: 29-35.
10. Cannon WB. The emergency function of the adrenal medulla in pain and the major emotions. Am J Physiology. 1914;33:356-372.
11. 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 Lincon. 1979. University of Nebraska Press.
12. 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.
13. 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.
14. Chrousos GP. The hypothalamic - pituitary - adrenal axis and immune- mediated inflammation. N Engl J Med. 1995;332:1351-1362.

15. Calabrese JR, Kling MA and Gold PW. Alteration in immunocompetence during stress, bereavement and depression: Focus on neuroendocrine regulation. *Am J Psychiatry*. 1987;144(9):1123-1134.
16. Kiecolt-Glaser JK, Garner W, Speicher C, Penn GM, Holliday J and Glaser R. Psychosocial modifiers of immunocompetence in medical students. *Psychosomatic Medicine*. 1984;46(1): 7-14.
17. Ader R, Cohen N. Psychoneuroimmunology: conditioning and stress. *Annu Rev Psycho*, 1993; 44:53-85.
18. McEwen BS, Stellar E. Stress and the individual: mechanisms leading to disease. *Arch Intern Med*. 1993;153:2093-2101.
19. Macleod RI. Psychologic factors in oral lichen planus. *Br Dent J*, 1992;173 (3):88.
20. Redman RS, Vance FL, Gorlin RJ, Peagler FD and Meskin LH. Psychological component in the etiology of geographic tongue. *J Dent Res*. 1966;45:1403- 1408.
21. Bierman SM. A retrospective study of 375 patients with genital herpes simplex infections seen between 1973 and 1980. *Cutis*. 1983;31:548-565.
22. Browning S, Hislop S, Scully C and Shirlaw P. The association between burning mouth syndrome and psychosocial disorders. *Oral surg*. 1987; 64:171-174.
23. Stephens LC, Schultheiss TE, Pcie RE, Ang KKM, Peers LJ. Radiation apoptotis of serous acinar cells of salivary gland and lacrimal glands. *Cancer*. 1991;67: 1539.
24. Arends MJ, Wyllie AH. Apoptosis: mechanisms and roles in pathology. *Int Rev Exp Pathol* 1991;32:223-254.
25. Kerr JF, Gobe GC, Winterford CM, Harmon BV. Anatomical methods in cell death. *Methods Cell Biol*. 1995;46:1-27.
26. Wang B, Takeda H, Gao WM, Zhou XY, Odaka T, Ohyama H, et al. Induction of apoptosis by beta radiation from tritium compounds in mouse embryonic brain cells. *Health Phys*. 1999;77: 16-23.
27. Bonfoco E, Krainc D, Ankarcona M, Nicotera P, Lipton SA. Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995;92: 7162-7166.
28. Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol*. 1992;119: 493-501.
29. Morgan WF, Ager D, Chung HW, Ortiz T, Phillips JW, Winegar RA. The cytogenetic effects of restriction endonucleases following their introduction into cells by electroporation. *Prog Clin Biol Res*. 1990;340B:355-361.
30. Billing H, Furta I, Hsueh AJW. Estrogens inhibit and androgen enhance ovarian grnulomsa cell apoptosis. *Endocrinology*. 1993; 133:2204-2212.

Abstract

Apo Taq expression on salivary glands by the restraint stress in Rat

Sung-kuk Cho, D.M.D., M.S.D.¹, Soo-Kyung Kang, D.M.D. M.S.D., Ph.D.¹, Q-Schick Auh,
D.M.D.,M.S.D.,Ph.D.¹, Yang-Hyun Chun, D.M.D.,M.S.D.,Ph.D.^{1,2},
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*

On this study, we treated rats with restraint stress, and observed the changes with an optical microscope. Within the salivary gland tissue, we measured cell apoptosis cycle evaluation which show positive reaction on TUNEL assay, and compared within the groups.

For this study, 18 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) 14 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), 1, 2, 3, 4, 5, 6 and 7days after application of the stress and the both parotid glands were excised.

The conclusions follow.

1. 5 days after giving an confining stress to the parotid gland of Rats, we can observe the hypotropy and pus and inflammation of Rat parotid gland acinar cells, and after 7 days, we can see a cell apoptosis.
2. Through the In situ DNA end labeling assay and TUNEL dye, on serous glands, benign tumor cell increased with statistically significant result after 5 days from confining stress. And the index shows maximum value on 7th days, which is same result with histological opinion.

Therefore, our study shows that a cell apoptosis can be induced by restraint stress on salivary gland tissue, and we think more study should be accomplished about the cell signaling pathway in the future.

Key words : Apoptosis, Restraint stress, Salivary glands
