

흰쥐 턱밑샘에서 fluoxetine 투여에 의한 침분비 및 muscarinic acetylcholine receptor M3 발현 감소

정보현, 임유선, 이희수, 유기연

강릉원주대학교 치과대학 해부학교실 및 구강과학연구소

접수: 2016년 11월 28일/ 수정접수: 2016년 12월 19일/ 게재 승인: 2016년 12월 20일/ 출간: 2016년 12월 31일

침분비저하, 구강건조증 및 침 성분의 변화를 포함한 비정상적인 침분비는 항우울제복용과 관련된 중요한 부작용이다. 선택적 세로토닌 재흡수 억제제(SSRI) 항우울제 또한 이러한 부작용을 가지고 있다. 하지만 SSRI에 의한 침분비저하 기전과 항콜린성 작용은 완전히 밝혀지지 않았다. 본 연구에서는 fluoxetine의 만성 투여 후 쥐의 침샘에서 침분비와 콜린성 신호 단백질 수치의 변화를 확인하였다. 동물은 정상군, 저농도경구투여군(20 mg/kg p.o.), 고농도경구투여군(40 mg/kg p.o.), 저농도복강투여군(20 mg/kg i.p.) 그리고 고농도복강투여군(40 mg/kg i.p.)으로 구분하였다. 4주 동안 fluoxetine 투여 후, 침을 수집하여 침분비량을 측정하였다. 후에 침샘 조직을 적출하여 muscarinic acetylcholine receptor M3 (mAChR M3)와 aquaporin5 (AQP5) 항체를 이용하여 단백질 정량을 하였다. 그 결과 복강투여군에서 침 분비량의 감소가 나타났지만, 경구투여군에서는 나타나지 않았다. 이 감소 패턴은 mAChR M3와 AQP5 단백질 수치에서도 유사하게 나타났다. 이러한 결과는 fluoxetine에 의한 침분비저하가 항콜린성 작용과 관련이 있음을 시사한다.

주제어: 항우울제, 선택적 세로토닌 재흡수 억제제, 플루옥세틴, 침분비저하, 무스카린성 아세틸콜린 수용체

서론

침은 침샘에 의해 생산되며, 침샘과 치은열구로부터 나오는 분비물로 구성된 복잡한 유동체이다¹⁾. 침의 90%는 큰 침샘들로부터 분비되고, 나머지 10%는 구강점막에 산재된 작은 침샘에 의하여 분비된다^{2,3)}. 침은 입안, 입 인두 및 상부 소화기의 방어 체계에 중요한 역할을 하며, 미각과 삼키기 위한

음식덩이 형성(물과 뮤신), 그리고 녹말(amylase)의 소화에 관여한다. 그 외에도 침은 구강을 청결히 하고, 음식을 용해·소화시키며, 치아 및 점막을 보호할 뿐만 아니라 구강의 산 성분을 중화시켜 치아우식증으로부터 치아를 보호한다^{4,5)}. 때문에 정상적인 침의 분비는 구강건강유지에 필수적이다.

침을 분비하는 턱밑샘, 혀밑샘, 귀밑샘 등은 일반적으로 자율신경계에 의해서 조절되는데, 부교감신경 및 교감신경의 신호전달에 의하여 각각 acetylcholine 및 norepinephrine을 신경전달물질로 이용하여 신경신호를 전달함으로써 침분

* 교신저자: 유기연

강릉원주대학교 치과대학 해부학교실 및 구강과학연구소
Tel: 82-33-640-2456, E-mail: kyyoo@gwnu.ac.kr

비를 조절한다. 이때, 교감신경지배는 α_2 및 β_2 adrenergic receptor와 연관되어 있으며, 부교감신경지배는 muscarinic receptor M3 (mAChR M3)와 연관되어 있다⁶⁾. 특히, 액체성 침분비는 부교감신경으로부터 분비되는 acetylcholine 및 침샘에 존재하는 mAChR M3에 의한 침샘파리세포의 활성화에 크게 의존하고 있는 것으로 알려져 있다⁶⁻⁸⁾. 이 수용체는 acetylcholine이 결합하면 하위신호들이 활성화되면서 결과적으로 파리세포 꼭대기 부위 (apical region)의 세포질 내 칼슘 레벨을 올리게 되고, 이 칼슘들은 다시 소포체나 침샘 내 도관 내강 침으로 분비된다 (Proctor and carpenter, 2014). 이때에 증가한 세포질 내 칼슘은 침샘 파리세포 내 수분 수송 통로 단백질인 aquaporin5 (AQP5)가 세포내막 (intracellular membrane)에서 꼭대기쪽막(apical membrane)으로 전위(translocation)하는데 중요한 역할을 하는 것으로 보고되었는데, 이러한 근거로 침분비에서의 부교감신호 전달 체계에 의한 침샘에서의 AQP5의 수분 배출 기전으로써 제시되었다^{9, 10)}.

한편, 우울증은 가장 흔한 정서장애의 한 형태로 많은 연구들에서 우울증이 noradrenaline, serotonin 그리고 dopamine 등과 같은 monoamine의 결핍에 의해 발생하는 것으로 보고, 중추신경계에 이들 신경전달물질 공급을 증가시키는 적절한 치료법을 연구하고 있다¹¹⁾. 정신질환 및 정서질환에는 항우울제, 항정신제 혹은 항불안제 등을 주로 사용되는데 일부 연구들은 이러한 약제들을 복용하고 있는 환자들의 구강건조증 호소를 보고하고 있다¹²⁾. 또한, 통계적으로 이러한 증상은 남성보다 여성에서 20% 가량 더 흔하며, 30~59세 연령대에서 보다 흔히 나타나는 것으로 알려져 있다^{13, 14)}.

항우울제들 중 일부는 침샘에 존재하는 adrenergic 그리고 cholinergic receptor에 친화력을 가지기 때문에 부작용으로써 cholinergic 자극에

의한 침분비 저하와 같은 분비기능 저해가 제시되었으며, 일부 항우울제의 경우 이러한 친화력이 없지만 모두 다 부작용으로써 메스꺼움 현기증, 졸림, 땀분비 및 떨림과 같은 증상이 보고되고 있다¹⁵⁾.

여러 종류의 항우울제 중 fluoxetine는 선택적 serotonin 재흡수 억제제(selective serotonin reuptake inhibitor, SSRI)로써 다른 신경전달물질의 재흡수는 억제하지 않는 것으로 알려져 있다¹⁶⁾. 이 약제가 비교적 안전하며 쉽게 처방되기는 하지만, 다른 SSRI와 마찬가지로 구토, 설사, 두통, 불면증 및 구강건조증과 같은 심각한 부작용이 보고되기도 하였다¹⁷⁾.

Fluoxetine의 부작용 중 구강건조증에 대한 임상적인 보고와 일부 침분비에 미치는 영향에 관한 실험적 정량 연구¹⁷⁾ 및 특정 단백질에 대한 면역조직화학적 연구가 진행되나 있지만¹⁸⁾, 부교감성 자극에 의한 침분비에 관련된 fluoxetine의 작용에 관한 분자생물학적 연구는 거의 되어 있지 않다. 따라서, 본 연구에서는 fluoxetine의 투여 용량 및 방법에 따른 침분비량 변화 및 침샘조직에서 acetylcholine 이 결합하여 신호가 시작되는 mAChR M3 및 이 신호에 영향을 받는 것으로 알려진 AQP5 단백질의 발현 변화를 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

실험동물

본 연구를 위해 6주령의 수컷 SD rat을 오리엔트 바이오(대한민국)에서 구매하여 이용하였다. 실험동물들은 12 시간 주기로 낮/밤을 유지하였으며, 물과 사료를 자유롭게 섭취할 수 있도록 하면서, 온도(22 °C)와 습도 (50%)가 유지되는 곳에서 사육하였다. 본 연구는 강릉원주대학교 동물실험윤리위원회(Institutional Animal Care and Use

Committee)의 승인 하에(Approval No.: GWNU-2016-14) 동물실험표준작업지침서를 준수하여 수행하였다.

실험동물은 용매만 투여한 정상군(control group) 그리고 fluoxetine을 투여한 저농도경구 투여군(20 mg/kg p.o. group), 고농도경구투여군(40 mg/kg p.o. group), 저농도복강투여군(20 mg/kg i.p. group) 그리고 고농도복강투여군(40 mg/kg i.p. group)으로 구분하여 각 실험군마다 7마리($n = 7$)씩 사용하였다.

Fluoxetine의 투여

Fluoxetine은 투여직전 실험동물의 체중을 측정하고 그에 비례하여 식염수 2 ml에 실험군별로 20 mg/kg 혹은 40 mg/kg의 fluoxetine을 녹여 녹여 각 실험군별로 경구투여 혹은 복강투여를 진행하였다. 투여기간은 매일 정해진 시간에 4주간 각 실험군별로 정해진 투여방법(경구 및 복강 투여)을 통하여 투여 하였다. Fluoxetine의 투여 용량의 결정은 20 mg/kg 투여 시 흰쥐에서 분비량 변화를 나타내었던 이전 논문을 참고하여 20mg/kg을 저농도로 하였으며, 그 배에 해당하는 40 mg/kg을 고농도로 설정하였다¹⁷⁾.

침 분비량 측정(Salivary flow rate)

4주간의 fluoxetine의 투여가 끝나는 날 마지막 투여 1시간 후 침 분비 유도를 위해 5 mg/kg pilocarpine을 복강투여 하였다. Pilocarpine 투여 1분 뒤부터 쥐의 입안 바닥에 고이는 침을 5분간 마이크로 피펫을 이용하여 수집하였다. 침의 분비량은 총 침의 무게(mg)를 수집시간(minute)으로 나누어 계산하였다.

단백질 정량(Western blot)

침의 수집이 끝난 동물은 목의 피부를 정중 절

개하여 턱밑샘을 신속히 적출하였다. 사람의 경우 귀밑샘과 턱밑샘의 파리세포 조성이 다르지만 흰쥐의 경우 모두 장액파리세포로 되어 있어 보다 적출이 용이한 턱밑샘을 이용하였다¹⁹⁾. 적출된 턱밑샘은 300 μ l 용해 완충액(lysis buffer; pH 7.5, containing 137 mM NaCl, 20mM Tris-HCl, 1% Tween 20, 10% glycerol, 1 mM Phenyl-Methyl-sulfonyl fluoride, and protease inhibitor cocktail)으로 30 분 동안 0°C에서 균질화(homogenization)시켰다. 각 표본을 Ultrasonicator를 이용하여 세포를 파괴시켜 원심분리(15,000 rpm, 4°C, 30분)하고, 상층액을 재차 원심분리하였다(15,000 rpm, 4°C, 30분). 5 분 동안 열판에서 가열한 후, 전기영동을 위해 단백질 농도를 Bio-rad dye-binding microassay (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)로 결정하고, 70 μ g의 단백질을 12% polyacrylamide gel 로 전기영동 시킨 후 단백질을 니트로셀룰로오스막에 옮겼다. 일차항체로 Anti-goat M3 AchR (Santa crus Bio. USA) 또는 Anti-goat AQP5 (Santa crus Bio. USA) 항체를 각각 1:500의 농도로 희석하여 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 이차항체는 일차항체에 따라 anti-goat antibody (R&D system, Minneapolis, MN, USA)를 각각 1:10,000으로 희석하여 실온에서 1시간 동안 함께 반응시켰다. 염색된 단백질을 ECL kit을 이용하여 발생하여 발현 여부를 확인하고, β -actin을 대조군으로 하여 각 단백질들의 변화를 비교하였다.

자료 분석 및 통계

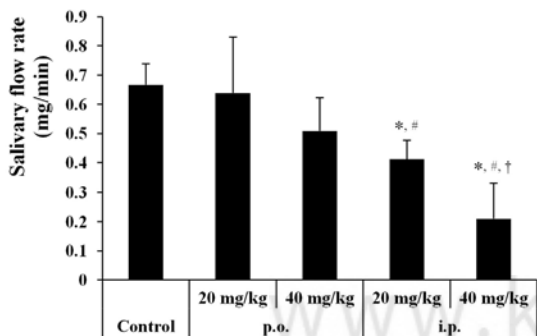
Fluoxetine의 투여에 의한 침분비량 변화 확인을 위해 분비된 침의 양을 측정하여 그 값을 평균 \pm 표준오차로 표기하였다. 또한 침분비와 관련된 단백질의 변화를 확인하기 위해 Western blot을 이용하여 단백질을 정량 한 후 획득한 밴드는 ImageJ (software: NIH, USA)를 이용하여 density를 측

정해 수치화 하였으며, 정상군에 대한 상대적인 값 (relative optical density, ROD)으로 보정하여 각 실험군 별로 이에 대한 평균±표준오차로 나타내었다. 각 실험군 간 값의 차이는 SPSS 프로그램을 이용하여 two-way ANOVA 및 Tukey test를 이용하여 분석하였다. p 값이 0.05 이하면 통계적으로 유의성이 있다고 판단하였다.

결과

Fluoxetine 투여에 따른 침분비율

정상군에서의 분당 0.67 mg 정도의 침분비가 관찰되었다. Fluoxetine을 투여한 군들에서는 투여 방식 및 투여량에 따라 다른 결과가 나타났다. 우선 저농도경구투여군 및 고농도경구투여군에서는 각각 0.64 mg/min 및 0.51 mg/min의 분비율을 나타내었지만 통계적으로 유의성 있는 감소 보이지 않았다. 복강투여군들의 경우 저농도복강투여군에서 0.41 mg/min 및 고농도복강투여군에서 0.21 mg/min의 분비율을 나타내어 정상군 및 두 경구투여군에 비교하여 모두 통계적으로 유의성있는 침분비율 감소를 나타내었다. 또한 복강투여군 내에서는 고농도복강투여군에서 저농도복강투여군 보다 더 높은 침분비율 감소를 나타내어 fluoxetine의 농도에 의존적으로 침분비 감소가 있음을 확인할 수 있었다(Fig. 1).



Muscarinic acetylcholine receptor M3 (mAChR M3) 발현 변화

부교감신경말단에서 분비된 acetylcholine의 침샘 분비세포의 수용체인 mAChR M3의 발현이 fluoxetine의 투여에 의한 침분비 감소와 어떤 연관성을 가지는지 확인하기 위하여 턱밑샘에서 mAChR M3 단백질 변화를 확인하였다. mAChR M3 밴드는 75 kDa 에서 확인할 수 있었다. 각 밴드들에 대한 상대적인 광학 밀도(relative optical density, ROD)를 통해 정량화 한 결과, 정상군과 비교하여 경구투여군들에서는 fluoxetine의 투여 용량과 관계없이 유의성 있는 발현의 차이를 나타내지 않았다. 하지만, 복강투여군들에서는 모두 정상군 및 동일 용량의 경구투여군들 보다 통계적으로 유의성 있는 감소를 보였다. 복강내투여군에서는 fluoxetine의 저농도투여군 보다 고농도투여군에서 mAChR M3 발현의 현저한 감소가 확인되어, fluoxetine 용량이 증가함에 따라 mAChR M3의 발현은 더욱 감소하는 것을 확인하였다(Fig. 2).

Aquaporin5 (AQP5) 발현 변화

Fluoxetine의 투여에 의해 저하되는 침분비와 침샘 내에서의 수분 수송과의 연관성을 확인하기 위하여, 침샘 분비세포의 꼭대기쪽세포막(apical membrane)에서 침샘 도관의 내강쪽으로 수분을 수송하는 통로단백질인 AQP5에 대한 단백질 변화를 확인하였다. AQP5는 모든 실험군에서 35 kDa에 위치한 밴드를 나타내었다. 정상군 대비 상

Figure 1. Pilocarpine-induced salivary flow rate (mg/min) of 20 mg/kg p.o., 40 mg/kg p.o., 20 mg/kg i.p. and 40 mg/kg i.p. groups after fluoxetine administration for 4 weeks. (n = 7 per group; *P < 0.05, significantly different from the control group; #P < 0.05, significantly different from each 20 mg/kg group; †P < 0.05, significantly different from each p.o. group). The bars indicate the means ± SEM.

대적 광학 밀도로 정량화 한 결과 경구투여군 및 복강 투여군에서 모두 AQP5 단백질의 발현 감소가 관찰되었다. 경구투여군에서는 정상군 대비 저농도투여군 약 70%, 고농도투여군 약 60% 정도로 AQP5 발현의 감소가 관찰되었으나 투여 용량간의 유의성 있는 차이는 보이지 않았다. 복강투여군에서 역시 AQP5 발현의 저하가 관찰되었으며, 이 실험군들에서는 정상군 대비 저농도투여군 약 23%, 고농도투여군 약 11% 수준의 AQP5 발현이 관찰되어 현저한 발현 감소가 있음을 알 수 있었다. 또한 복강투여군들의 AQP5 발현 정도는 경구투여군의 동일 투여 용량보다 현저한 감소를 나타내었으며, 복강투여군 내에서도 투여 용량이 증가함에 따라 AQP5 발현의 감소는 더욱 증가하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3).

총괄 및 고언

구강건조증(xerostomia)는 환자에 의해 호소되는 입안의 건조감으로 정의된다. 구강건조증은 침 분비의 감소가 원인이지만, 정상적인 침 분비를 보이는 경우에도 나타날 수 있다.²⁰⁾ 사람에서 자극 침분비율 (stimulated salivary flow rate, SSFR)이 0.7 mL/min 이하인 경우 침분비 저하(hyposalivation)로 판단한다²¹⁾. 침분비 저하, 구강건조증 및 침 조성의 변화 등은 항우울제를 포함한 정신과치료제들의 사용과 관계된 중요한 부작용으로 알려져 있으나 이 부작용의 명확한 정확한 기전은 알려져 있지 않다^{14, 22, 23)}.

뿐만 아니라, 항정신성 의약품들의 anticholinergic 작용이 명확하지 않음에도 많은 연구들은 중추신경에 작용하는 제제들에 대한 침샘에 대한 약리작용을 보고하고 있다^{17, 23, 24)}. 일부 연구들

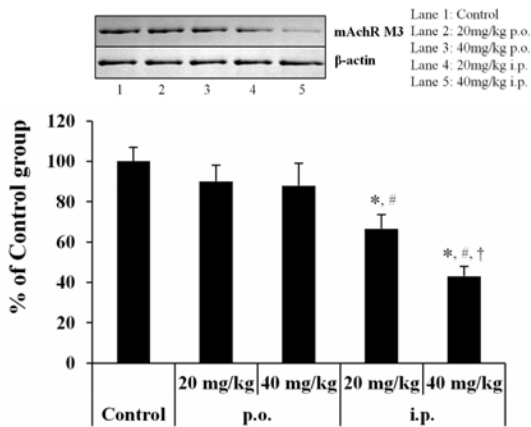


Figure 2. Western blot analysis for M3 AchR in the submandibular gland of 20 mg/kg p.o., 40 mg/kg p.o., 20 mg/kg i.p. and 40mg/kg i.p. groups after fluoxetine administration for 4 weeks. Relative optical density (ROD) is represented by percentage values of immunoblot band ($n = 7$ per group; $*P < 0.05$, significantly different from the control group; $^{\#}P < 0.05$, significantly different from each 20 mg/kg group; $^{\dagger}P < 0.05$, significantly different from each p.o. group). The bars indicate the means \pm SEM.

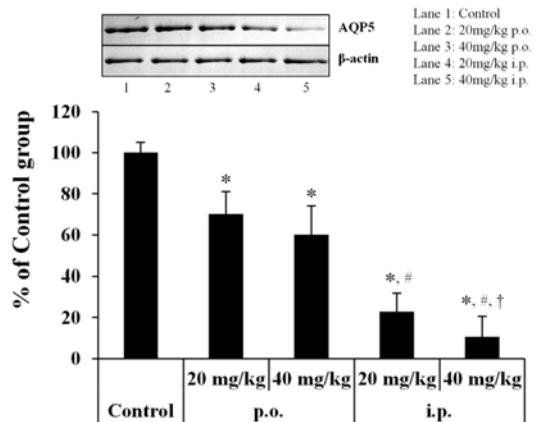


Figure 3. Western blot analysis for AQP5 in the submandibular gland of 20 mg/kg p.o., 40 mg/kg p.o., 20 mg/kg i.p. and 40 mg/kg i.p. groups after fluoxetine administration for 4 weeks. Relative optical density (ROD) is represented by percentage values of immunoblot band ($n = 7$ per group; $*P < 0.05$, significantly different from the control group; $^{\#}P < 0.05$, significantly different from each 20 mg/kg group; $^{\dagger}P < 0.05$, significantly different from each p.o. group). The bars indicate the means \pm SEM.

에서는 SSRI 계열의 항우울제들이 삼환계 항우울제와 비교하였을 때 anticholinergic 작용이 비교적 약하기 때문에 침 분비에 미치는 현저한 효과가 나타나지 않는다고 제안하였으나^{25, 26)}, 또 다른 연구들에서는 SSRI 항우울제에 의한 침분비 저하 또는 구강건조증 유발을 보고 하고 있어^{17, 18)} 서로 배치되는 결과를 보이고 있다. 또한, 이전의 흰쥐를 사용한 fluoxetine의 침분비 저하 연구에서 일반적으로 경구투여 처방이 많은 데 투여 방식을 복강투여로 한정하였으며, 투여 용량 또한 20 mg/kg으로 국한되어 있었다¹⁷⁾. 이러한 이유로 본 연구에서는 대표적인 SSRI인 fluoxetine의 투여 용량 별 투여 장기적인 처리 및 투여 방식이 침분비에 어떤 영향을 미치는지 확인하였다.

본 연구에서 4주간에 걸쳐 투여용량 및 투여 방식을 달리하여 fluoxetine을 투여하였다. 투여 방식에 따라서는 복강투여군들 모두에서 침분비 감소가 일어났으며, 경구투여군에서는 유의성있는 감소가 발견되지 않았다. Fluoxetine에 대한 동물실험의 용량과 사람의 투약 용량을 절대적으로 비교하기는 어렵지만 사람에서 처방되는 용량보다 고농도인 20 mg/kg 및 40 mg/kg 으로 경구투여 한 경우 유의성 있는 침분비 감소가 나타나지 않았으나, 복강투여군들에서는 20 mg/kg 이상으로 투여한 경우 침분비 감소가 나타나, 이전의 연구결과와 동일한 결과를 나타내었다¹⁷⁾. 뿐만 아니라, 본 연구에서는 복강투여의 경우 fluoxetine의 투여농도가 높아짐에 따라 침분비 감소가 더 심각하게 일어나는 것을 확인하였다. 이러한 결과는 fluoxetine의 투여량과 침분비 감소량간의 비례적 상관관계가 있음을 시사한다.

SSRI 항우울제를 중 fluoxetine 및 venlafaxine의 경우 부작용으로써 침샘 주변의 미세혈액순환(microcirculation)에 미치는 영향에 대한 분자생물학적 연구에서 fluoxetine 및 venlafaxine의 장

기간의 투여는 침분비의 저하가 유발되었으며, 그 원인으로 fluoxetine의 작용으로 인하여 말초 모세혈관에 존재하는 5-hydroxytryptamine (5-HT) receptor에 serotonin의 결합 증가로 인하여 침샘에 혈류가 변화하게 되고 그에 따라 침 분비의 질과 조성 변화에 대한 가능성을 제시하였다¹⁷⁾. 본 연구에서는 fluoxetine의 cholinergic 신호에 초점을 맞추어, acetylcholine이 처음 침샘 파리세포에 신호를 전달하는 mAChR M3 및 이와 관련되어 수분의 분비를 조절하는 AQP5에 대한 발현 변화를 확인하였다. mAChR M3의 단백질 발현은 정상군과 비교하였을 때 fluoxetine 복강군에서 감소하였으며, 투여 용량에 따라 감소폭이 커져 침분비 감소경향과 유사한 결과를 나타내었다. 많은 연구들은 침샘 파리세포에서 acetylcholine에 의한 mAChR M3의 활성화를 통한 세포질 내 칼슘 상승 신호전달체계에 대하여 침분비 기전으로써 가치를 제시하고 있으며, mAChR M3에 의하여 매개되는 신호체계가 세포내막에 존재하고 있는 AQP5의 꼭대기막 부분으로의 전위에 매우 중요한 역할을 하는 것으로 주장하고 있다^{9, 10)}. 본 연구에서 fluoxetine에 의한 mAChR M3의 발현 감소는 이러한 신호의 위축과 연관 가능성을 제시 하고 있다.

AQP5는 파리세포에서 수분의 투과성을 조절하는데 중요한 단백질로 알려져 있는데, 이 단백질이 결핍된 *Aqp5*^{-/-} mice의 경우 침샘 파리세포에서 수분 투과도가 65~77% 가량 감소하였다²⁷⁾. 본 연구에서는 cholinergic 신호에 의한 칼슘 상승에 의해 영향을 받는 AQP5의 감소 경향을 확인할 수 있었다. 흥미로운 점은 경구투여군에서 유의성 있는 침분비 및 mAChR M3의 감소와 무관하게 AQP5 발현 감소가 나타났다. AQP5는 꼭대기막에 전위되었을 때 비로서 수분 수송기능을 하기 때문에^{26, 27)} 발현 변화가 절대적으로 침분비 변화로 이어진다고 하긴 어렵지만, 본 연구결과는 fluoxetine

의 투여에 민감하게 발현이 조절되고 있는 것을 보여준다. 경구투여군에서 AQP5의 감소에도 침분비에 영향을 미치지 않은 것은 acetylcholine에 의한 cholinergic 신호가 AQP5의 수분수송 작용에 중요하다는 이전의 연구에^{27,28)} 근거하였을 때 mAChR M3 수준이 정상과 유사하기 때문에 AQP5의 절대적인 양이 적더라도 cholinergic 신호에 의한 칼슘 농도유지에 의해 꼭대기막으로 전위되는 AQP5가 정상적임을 짐작할 수 있다. 이러한 결과는 fluoxetine 투여 후 acetylcholine에 의한 cholinergic 신호작용과 AQP5 사이의 연관성을 다시 한번 드러낸다.

결론

본 연구에서 fluoxetine의 장기간 복강투여는 침분비의 감소 및 cholinergic 신호 단백질인 mAChR M3 그리고 이 신호체계의 영향을 받는 수분통로인 AQP5의 발현을 감소시키는 결과를 보여주었다. 이러한 결과가 직접적으로 cholinergic 신호의 억제 혹은 AQP5의 꼭대기막으로의 전위 억제에 직접적인 증거는 될 수 없지만, 적어도 관련 신호 체계에 해당하는 단백질의 발현을 저해하고 있기 때문에 fluoxetine의 투여가 cholinergic 신호체계와 밀접한 연관성을 가지고 침분비를 조절하는 것으로 사료된다. 또한, 경구투여에 의한 fluoxetine의 투여가 침분비에 영향을 미치지 못하는 못하였지만 AQP5 발현에 영향을 직접 미치는 것으로 미루어 경구투여의 경우에도 40 mg/kg 이상의 고용량 투여에서의 침분비 및 관련 기전의 추가적인 연구가 필요하다.

참고문헌

1. Pedersen AM, Bardow A, Jensen SB and Nauntofte B: Saliva and gastrointestinal functions of taste, mastication, swallowing and digestion. *Oral Dis* 8(3):117-129, 2002.
2. Humphrey SP and Williamson RT: A review of saliva: normal composition, flow, and function. *J Prosthet Dent* 85(2):162-169, 2001.
3. Cassolato SF and Turnbull RS: Xerostomia: clinical aspects and treatment. *Gerodontology* 20(2):64-77, 2003.
4. Garrett JR, Ekström J and Anderson LC. Glandular mechanisms of salivary secretion. Basel ; New York: Karger; 1998.
5. Zelles T, Purushotham KR, Macauley SP, Oxford GE and Humphreys-Beher MG: Saliva and growth factors: the fountain of youth resides in us all. *J Dent Res* 74(12):1826-1832, 1995.
6. Baum BJ: Neurotransmitter control of secretion. *J Dent Res* 66 Spec No:628-632, 1987.
7. Nakamura T, Matsui M, Uchida K, Futatsugi A, Kusakawa S, Matsumoto N, Nakamura K, Manabe T, Taketo MM and Mikoshiba K: M(3) muscarinic acetylcholine receptor plays a critical role in parasympathetic control of salivation in mice. *J Physiol* 558(Pt 2):561-575, 2004.
8. Proctor GB and Carpenter GH: Regulation of salivary gland function by autonomic nerves. *Auton Neurosci* 133(1):3-18, 2007.
9. Ishikawa Y, Eguchi T, Skowronski MT and Ishida H: Acetylcholine acts on M3 muscarinic receptors and induces the translocation of aquaporin5 water channel via cytosolic Ca²⁺ elevation in rat parotid glands. *Biochem Biophys Res Commun* 245(3):835-840, 1998.
10. Ishikawa Y, Iida H and Ishida H: The muscarinic acetylcholine receptor-stimulated increase in aquaporin-5 levels in the apical plasma membrane in rat parotid acinar cells is coupled with activation of nitric oxide/cGMP signal transduction. *Mol Pharmacol* 61(6):1423-1434, 2002.
11. Glassman AH, Carino JS and Roose SP: Adverse effects of tricyclic antidepressants: focus on the el-

- derly. *Adv Biochem Psychopharmacol* 39:391-398, 1984.
12. Thomson WM, Chalmers JM, Spencer AJ and Slade GD: Medication and dry mouth: findings from a cohort study of older people. *J Public Health Dent* 60(1):12-20, 2000.
 13. Bogetto F, Maina G, Ferro G, Carbone M and Gandolfo S: Psychiatric comorbidity in patients with burning mouth syndrome. *Psychosom Med* 60(3):378-385, 1998.
 14. Scully C: Drug effects on salivary glands: dry mouth. *Oral Dis* 9(4):165-176, 2003.
 15. Horst WD and Preskorn SH: Mechanisms of action and clinical characteristics of three atypical antidepressants: venlafaxine, nefazodone, bupropion. *J Affect Disord* 51(3):237-254, 1998.
 16. Goldstein BJ and Goodnick PJ: Selective serotonin reuptake inhibitors in the treatment of affective disorders--III. Tolerability, safety and pharmacoeconomics. *J Psychopharmacol* 12(3 Suppl B):S55-87, 1998.
 17. da Silva S, de Azevedo LR, de Lima AA, Ignacio SA, Machado MA, ZacliKevis MV and Gregio AM: Effects of fluoxetine and venlafaxine and pilocarpine on rat parotid glands. *Med Chem* 5(5):483-490, 2009.
 18. Mattioli TM, Silva S, Gregio AM, Machado MA, Lima AA and Alanis LR: The effects of antidepressants and pilocarpine on rat parotid glands: an immunohistochemical study. *Clinics (Sao Paulo)* 66(9):1605-1610, 2011.
 19. Amano O, Mizobe K, Bando Y, Sakiyama K: Anatomy and Histology of Rodent and Human Major Salivary Glands. *Acta histochemica et cytochemica* 45(5):241-250, 2012.
 20. Guggenheimer J and Moore PA: Xerostomia: etiology, recognition and treatment. *J Am Dent Assoc* 134(1):61-69; quiz 118-119, 2003.
 21. Tenovuo J: Salivary parameters of relevance for assessing caries activity in individuals and populations. *Community Dent Oral Epidemiol* 25(1):82-86, 1997.
 22. Ferguson MM: Pilocarpine and other cholinergic drugs in the management of salivary gland dysfunction. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 75(2):186-191, 1993.
 23. Zacliffe MV, D'Agulham AC, Bertassoni LE, Machado MA, de Lima AA, Gregio AM and Azevedo-Alanis LR: Effects of benzodiazepine and pilocarpine on rat parotid glands: histomorphometric and sialometric study. *Med Chem* 5(1):74-78, 2009.
 24. de Almeida Pdel V, Gregio AM, Brancher JA, Ignacio SA, Machado MA, de Lima AA and Azevedo LR: Effects of antidepressants and benzodiazepines on stimulated salivary flow rate and biochemistry composition of the saliva. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 106(1):58-65, 2008.
 25. Hunter KD and Wilson WS: The effects of antidepressant drugs on salivary flow and content of sodium and potassium ions in human parotid saliva. *Arch Oral Biol* 40(11):983-989, 1995.
 26. Siepmann M, Grossmann J, Muck-Weymann M and Kirch W: Effects of sertraline on autonomic and cognitive functions in healthy volunteers. *Psychopharmacology (Berl)* 168(3):293-298, 2003.
 27. Krane CM, Melvin JE, Nguyen HV, Richardson L, Towne JE, Doetschman T and Menon AG: Salivary acinar cells from aquaporin 5-deficient mice have decreased membrane water permeability and altered cell volume regulation. *J Biol Chem* 276(26):23413-23420, 2001.
 28. Matsuzaki T, Susa T, Shimizu K, Sawai N, Suzuki T, Aoki T, Yokoo S and Takata K: Function of the membrane water channel aquaporin-5 in the salivary gland. *Acta Histochem Cytochem* 45(5):251-259, 2012.

ABSTRACT**Reduction of salivation and muscarinic acetylcholine receptor M3 expression in the submandibular gland of the rat by chronic fluoxetine administration**

Bo Hyun Jung, You Sun Lim, Hee Su Lee, Ki-Yeon Yoo

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

Abnormal salivation including hyposalivation, xerostomia, and changes in saliva composition is important side effect related to taking antidepressants. Selective serotonin re-uptake inhibitor (SSRI) antidepressants have also these side effects. However, hyposalivation mechanism and anticholinergic action by SSRIs is not fully understood. In this study, we have examined changes in salivation and cholinergic signal proteins levels in the salivary gland of the rat after chronic fluoxetine administration. Animals were divided into 5 groups with the control, lowdose p.o. (20 mg/kg p.o.), highdose p.o. (40 mg/kg p.o.), lowdose i.p. (20 mg/kg i.p.) and highdose i.p. (40 mg/kg i.p.) groups. After fluoxetine administration for 4 weeks, saliva collection began to determine the salivary flow rate. Next, salivary glands were removed, the salivary tissues processed for Western blot analysis (for muscarinic acetylcholine receptor M3 (mAChR M3) and aquaporin5 (AQP5)). The salivary flow rate was decreased with fluoxetine dose in the i.p. groups, but not in the p.o. groups. This decreasing pattern was similar to mAChR M3 and AQP5 protein level. These findings suggest that the hyposalivation by fluoxetine may be related to anticholinergic action.

Keywords: Antidepressant, SSRI, Fluoxetine, Hyposalivation, Muscarinic acetylcholine receptor