Alcohol ingestion reduced acetylcholine-binding protein in the submandibular gland of the rat

Bo Hyun Jung and Ki-Yeon Yoo*

Department of Anatomy, College of Dentistry and Research Institute of Oral Science, Gangneung-Wonju National University, Gangneung 25457, Republic of Korea

(Received Jul 21, 2017; Revised version received Sep 4, 2017; Accepted Sep 6, 2017)

ABSTRACT

Continuous alcohol ingestion may lead to various dental diseases because a hyposalivation. In this study, we investigated changes in pathology and choline acetyltransferase (ChAT, an enzyme for synthesis of acetylcholine) in the brain and acetylcholine-binding protein (AChBP, a protein responsible for modulation of synaptic transmission in cholinergic synapses) in the submandibular gland after alcohol ingestion. There was no change in neuronal death and expression of ChAT in superior salivary nucleus after alcohol ingestion. In the submandibular gland, expression of AChBP were significantly reduced after alcohol ingestion. Therefore, decrease of saliva secretion by alcohol ingestion is less related to damage of neurons in the superior salivary nucleus and decrease of acetylcholine synthesis or cholinergic neurotransmission.

KEY WORDS: Alcohol, Hyposalivation, Salivary neurotransmission, Submandibular gland

서론

침은 침샘에 의해 생산되며, 침샘과 잇몸고랑으로부터 나오는 분비물로 구성된 복잡한 유동체이다[1]. 침의 90%는 턱밑샘, 귀밑샘, 혀밑샘으로부터 분비되고, 나머지 10%는 구강점막에 산재된 작은 침샘에 의하여 분비된다[2,3]. 침은 입안, 입인두 및 상부 소화기의 방어체계에 중요한 역할을 하며[4], 미각과 삼키기 위한 bolus 형성(물과 뮤신), 또한 녹말(아밀라아제)과 지방(리파아제)의 소화와 관련한다[5]. 그 외에도 침은 구강을 청결히 하고, 음식을 용해·소화시키며, 치아 및 점막을 보호할 뿐만 아니라 구강의 산 성분을 중성화시켜 치아우식증으로부터 치아를 보호한다[3]. 이러한 이유로 침 분비의 감소는 구강건강의 저하와 관련이 있다.

방사선 치료, 약물의 부작용 및 알코올의 섭취 등은 침 분비 감소의 원인으로 지목되고 있다[6]. 이 중 알코올의 섭취는 인체의 다양한 장기에 영향을 미치게 되는데, 대표

적으로 간에서 지방간, 간염, 간 경변 등을 유발하는데[7], 침샘에서는 단백질 합성 속도를 저하시키는 것으로 알려져 있다[8].

침을 주로 분비하는 턱밑샘, 혀밑샘, 귀밑샘 등은 일반적으로 자율신경계에 의해서 조절되는데, 부교감신경 및 교감신경의 신호전달에 의하며 각각 아세틸콜린(acetylcholine) 및 노르에피네프린(norepinephrine)을 신경전달물질로 이용하여 신경신호를 전달함으로써 침 분비를 조절한다[9]. 이와 같은 신경전달물질들에 의해 해당 수용체들이 활성화되고 이로 인해 침샘 세포 내 Ca^{2+} 농도가 증가되면 침샘의 내강(lumen) 쪽 세포막의 Cl^- channel이 열리고 세포 밖 Na^+ 의 운동에 의해 전하 균형이 맞추어지면서 Na^+ 과 Cl^- 의 농도 증가에 의해 삼투압기울기(osmotic gradient)가 발생하게 되는데, 이 때 침의 대부분인 수분이 세포에서 내강 쪽으로 이동하게 되며, 이러한 현상은 수분의 이동 통로 단백질인 aquaporin5 (AQP5)를 통해 일어남으로써 침 분비량이 조절되게 된다[10]. 침 분비를 담당하는 부교감신경섬유의 신경세포체는 중추신경계의 위침분비핵(superior salivary nucleus, SSN), 아래침분비핵(inferior salivary nucleus, ISN), 고립로핵(nucleus tractus solitarius, Sol)에 위치하고 있다[11]. 이 중 턱밑샘을 지배하는 신경세포체는 주로 위침분비핵 중간부위에 분포되어 있다고 알려져 있다[12,13]. 또한, cholinergic synapse에서는 아세틸콜린의

*Corresponding author: Ki-Yeon Yoo

Department of Anatomy, College of Dentistry, Gangneung-Wonju National University, 7, Jukheon-gil, Gangneung, 25457, Republic of Korea
Tel.: +82-33-640-2456
E-mail: kyyoo@gwnu.ac.kr

분비에 의해 acetylcholine-binding protein (AChBP)과 같은 단백질들의 분비가 유도되어 신호전달 조절에 관여 하는 것으로 알려져 있다[14]. 부교감신경은 주로 보호, 영양공급, 몸의 성장, 심리적 안정에 관한 기능을 조절에 관여하는데 알코올의 섭취는 이러한 부교감신경의 원활한 작용의 억제와 연관성이 있는 것으로 보고되어 있다.[15].

이와 같이 알코올의 섭취는 신경계에 작용하며, 침 분비의 감소를 유발하는 것으로 알려져 있지만, 알코올 섭취가 침 분비 신경신호에 미치는 영향은 밝혀져 있지 않다. 따라서 본 연구에서는 흰쥐에 알코올을 섭취시킨 후 침샘 및 침 분비 관련 신경에서 부교감신경전달물질인 아세틸콜린과 관계된 단백질의 변화를 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

실험동물 및 알코올의 투여

흰쥐(rat, *Rattus norvegicus*)는 오리엔트 바이오에서 구매하여 클린시스템에서 사육하여 이용하였으며, 본 연구를 위하여 8주령 250-280 g 가량의 수컷 흰쥐가 사용되었다. 실험동물들은 12시간 낮/밤 주기를 가지며 물과 사료가 자유급여 되고, 온도(22°C)와 습도(50%)가 유지되는 곳에서 사육되었다. 본 실험은 강릉원주대학교 윤리위원회(Institutional Animal Care and Use Committee)의 승인과 동 센터의 표준작업지침서에 따라 수행하였다.

흰쥐는 각 실험군 마다 7마리($n = 7$)씩 사용하였으며, 실험동물은 정상군(용매투여, Control-group), 알코올 투여군(EtOH-treated-group)으로 구분하였다. 알코올은 증류수에 3 g/kg의 용량으로 (0.375 g/ml 에탄올 2 ml) 희석하여 5일 동안 매일 정해진 시간에 경구 투여하고, 정상군은 증류수를 알코올 투여군과 동일한 양 만큼 투여하였으며, 희생 당일에는 희생 1시간 전에 투여하였다. 투여 방법은 알코올의 투여 1시간 이후 침의 분비가 감소된다는 보고를 참고하여 본 연구에 적용하였다[9].

조직처리

본 연구에서 보다 정확한 결과를 얻기 위하여 실험동물의 조직은 동일한 조건 하에서 처리하였다. 조직학적 분석을 위하여 마지막 알코올의 투여 후 1시간 후에 졸레틸(Zoletil50, Virbac Korea, Songpa, Seoul) 0.05 mg/kg을 대퇴부위에 근육주사하여 마취하였다. 실험동물의 흉곽을 개방하여 0.1 M phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4)로 관류세척 후 4% paraformaldehyde가 포함된 PBS (pH 7.4)로 관류 고정하였다. 관류고정이 끝난 실험동물의 머리뼈를 제거하고 뇌, 간 및 턱밑샘을 신속하게 적출하여 동일한 고정액에 6시간 후고정 하였으며, 채취한 조직 중

간과 침샘의 일부조직은 파라핀 절편 제작을 위하여 자동처리기(Leica, 독일)에서 탈수, 청명화 및 파라핀 침투과정을 거쳐 파라핀 블록화하여 5 μ m의 파라핀 절편을 제작하였다. 나머지 조직은 동결손상 방지를 위하여 30% sucrose에서 침강시켰다. 이후 뇌조직은 냉동박절기를 이용하여 10 μ m 또는 30 μ m의 두께로 절편제작을 하였으며, six-well을 이용하여 저장액에 염색 전까지 4°C에서 보관하였다.

Cresyl violet (CV) 염색

알코올의 투여에 의하여 위침분비핵의 병리를 확인하기 위하여 신경세포의 니슬소체를 염색하는 cresyl violet 염색을 수행하였다. 뇌 조직 중 위침분비핵이 잘 나타나는 조직 절편을 골라 이용하였다.

Fluoro-Jade C 염색

알코올의 투여에 의하여 SSN(위침분비핵)의 신경세포체의 손상이 유발되는지 확인하기 위하여 뇌 조직 중 SSN이 잘 나타나는 조직 절편을 골라 이용하였다. 조직절편은 퇴행신경세포의 표지자인 Fluoro-Jade C (F-J C)를 이용하여 조직형광염색을 수행하였다[16]. 조직을 증류수로 5분간 3회 세척한 후 0.06% potassium permanganet 용액에 15분간 담갔다. 이후 증류수로 2분간 세척하고 0.1% acetic acid가 포함된 0.001% F-J C (Histochem, Jefferson, AR, USA) 용액에 30 분간 염색하였다. 염색된 조직은 1분씩 3회 증류수로 세척하여 50°C slide warmer에서 20분간 건조한 후 xylene에 담근 후 DPX (Sigma Aldrich, MO, USA) 로 봉입한 후 형광현미경(Ex:385 nm, Em:425 nm)으로 관찰하였다.

면역조직형광염색

뇌에서 아세틸콜린을 합성하는데 관여하는 효소인 choline acetyltransferase 및 침샘에서 아세틸콜린 신호 전달에 관여하는 단백질인 acetylcholine binding protein의 변화를 확인하기 위하여 각각의 항체를 이용하여 면역조직화학염색을 수행하였다. 동결절편화한 조직은 PBS에 3회 세척한 후 0.3% 과산화수소(H_2O_2)가 들어있는 PBS 용액으로 30분간 처리한 후 5% normal goat serum 및 5% normal rabbit serum이 들어있는 0.05 M PBS에 30분간 처리하였다. 처리가 끝난 뇌조직은 rabbit anti-choline acetyltransferase (ChAT) (diluted 1:500, SantaCruz, USA)에 턱밑샘 조직은 goat anti-acetylcholine binding protein (AChBP) (diluted 1:200, SantaCruz, USA) 용액(4°C)에서 2일간 반응시켰다. 이후 anti-ChAT 항체와 반응시킨 조직은 biotinylated goat anti-rabbit Ig G와 반응시켰으며, 반응이 끝난 후 streptavidin peroxidase 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 도말한 후 탈수 청명화 과정을 거쳐 canada balsam (Kato, Japan)으로 봉입하였다. Anti-AchBP 항체와 반응시킨 조직은 FITC conjugated rabbit anti-goat IgG와 반응시킨 후 1차 증류수로 세척하여 gel mount (Sigma Aldrich, MO, USA)를 이용하여 봉입하였다.

Westernblot

에탄올의 투여에 의한 뇌조직에서 ChAT 단백질 수준 및 턱밑샘에서 AchBP 단백질 수준의 차이를 확인하기 위하여 각 군의 실험동물들(n = 7)은 희생 즉시 조직을 적출하여 냉동 하였다. Westernblot을 위해 냉동조직을 균질화(homogenize)시킨 후 lysis buffer (1% Nonidet-40, 20 mM Tris-HCl [pH 7.4], 150 mM NaCl, 1 mM Ethylenediaminetetracetic acid [EDTA], 0.1% SDS 및 2 mM Phenylmethylsulfonyl

fluoride [PMSF])로 얼음에서 1시간 동안 조직을 용해시켰다. 용해산물을 12,000 rpm에서 15분 동안 원심분리하여 상층액을 얻은 후 이를 이용하여 SDS Polyacrolamide gel electrophoresis (PAGE)를 시행하였다. 겔에서 분리된 단백질을 nitrocellulose 막으로 옮기고(30V, 16시간), 다시 5% 탈지분유 / tween 용액(TBST® 20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20)이 포함된 Tris-buffered saline으로 상온에서 1시간동안 반응 시켰다. 그 후 뇌조직은 rabbit anti-ChAT (diluted 1:1,000)로 턱밑샘 조직은 goat anti-AchBP (diluted 1:1,000)으로 4°C에서 16시간 반응 시켰다. 이후 ChAT를 1차 항체로 사용한 경우는 Horseradishperoxidase (HRP) conjugated goat anti-rabbit (Vector, CA, USA)를 AchBP를 일차항체로 사용한 경우는 HRP conjugated rabbit anti-goat (Vector, CA, USA)를 이차항체로 사용하여 상온에서 1시간 동안 반응 시켰다. TBST®로 수세하였다. 수세된 nitrocellulose 막은 밴드를 현상시키는

Fig. 1. Top: Schematic drawing of coronal sections of the rat brain based upon the atlas of Paxinos and Watson (2007). Red spot is the superior salivary nucleus. Cresyl violet (CV) staining (A and B) and Fluoro-Jade C florescence (C and D) in the superior salivary nucleus of the control- (A and C) and EtOH-treated- (B and D) groups. There was no found neuronal death in the superior salivary nucleus by ethanol administration.

Enhanced Chemiluminescent (ECL®, Amersham, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK)을 이용하여 현상하였다.

자료 분석 및 통계

염색된 조직 중 CV 염색 조직과 ChAT 면역조직 슬라이드는 CCD 카메라가 부착되어 있는 광학현미경(BX51; Olympus, Tokyo, Japan)을 이용하여 관찰하였으며, F-J C 및 AchBP 형광염색 조직은 공초점현미경(LSM510 META NLO; Carl Zeiss, Oberkochen, Germany)에서 관찰하였다.

Westernblot의 결과 band는 필름을 스캔하여 이용하였으며, 스캔한 이미지는 Scion Image software (Scion Corp., USA)를 이용하여 정량화하였다. 수치는 상대적 광학밀도 (relative optical density, ROD)를 이용하였으며, ROD값은 %로 표시하였다.

본 연구에 표시된 값은 평균치 $\pm$ 표준오차로 이루어 졌다. 각 실험군 간의 값의 차이는 SPSS 프로그램을 이용한 two-tailed student t-test를 이용하여 통계학적으로 분석하였으며, 통계학적으로 p 값이 0.05 이하면 통계적으로 유의하다고 판단하였다.

결 과

Cresyl violet (CV) & Fluore-Jade C (F-J C) staining

알코올 섭취에 의한 턱밑샘 침 분비 관련 신경 핵에서의 신경세포 사멸 여부를 확인하기 위해 SSN에서 CV 및

F-J C염색을 수행하였다. 생존세포 확인을 위해 CV 염색을 한 결과 정상군의 SSN에서는 다수의 CV 염색 세포들이 높은 밀도를 유지하고 있었다(Fig. 1A). 알코올 섭취군에서도 정상군과 유사한 밀도의 CV 염색 세포들을 확인할 수 있으며, 정상군과의 차이는 없었다(Fig. 1B). 알코올에 의한 신경 퇴행 확인하기 위해 SSN에서 F-J C 염색을 수행하였다. 정상군에서는 F-J C에 표지된 신경세포는 확인할 수 없었으며(Fig. 1C), 알코올 섭취군에서도 F-J C 표지 신경세포는 발견되지 않았다(Fig. 1D). 본 연구에서 5일간 3 g/kg/day의 알코올 섭취는 턱밑샘의 분비와 관련된 부교감신경핵인 SSN에서 신경세포 사멸을 유발하지 않았다.

ChAT 면역조직화학염색 및 ChAT level

알코올 섭취에 의해 SSN에서 부교감 신경 전달물질인 acetylcholin의 변화를 간접적으로 확인하기 위하여 acetylcholin의 합성 효소인 ChAT에 대한 면역조직화학염색을 수행하였다(Fig. 2A and 2B). 정상군의 SSN에서는 ChAT 면역반응 신경세포들이 관찰되었으며, ChAT 면역반응성은 신경세포의 세포체와 신경돌기에서 확인할 수 있었다(Fig. 2A). 알코올 섭취군의 SSN에서도 ChAT 면역반응 신경세포들이 관찰되었으며, 면역반응성의 양상 및 분포의 뚜렷한 차이는 발견할 수 없었다(Fig. 2B).

침 분비 신경핵이 위치한 부분의 뇌조직을 이용하여 ChAT 항체로 westernblot을 수행하여 ChAT level을 확인하였다(Fig. 2C). 정상군에서는 67 kD에서 발현을 나타내었으며, 알코올 처리군에서도 동일한 크기의 발현이 관찰

Fig. 2. Choline acetyltransferase (ChAT) immunoreactivity in the superior salivary nucleus of the control- (A) and EtOH-treated- (B) groups. C: Western blot analysis of ChAT in the superior salivary nucleus of the control- and EtOH-treated-groups. 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). The bars indicate the means $\pm$ SEM.

Fig. 3. Acetylcholine Binding Protein (AchBP) immunofluorescence in the superior salivary nucleus of the control- (A) and EtOH-treated- (B) groups. C: Western blot analysis of AchBP in the superior salivary nucleus of the control- and EtOH-treated-groups. 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). The bars indicate the means $\pm$ SEM.

되었으므로 정상군과 알코올 투여군의 ChAT level 결과에서 유의성 있는 차이를 확인할 수 없었다.

AchBP 면역형광염색 과 AchBP level

알코올 섭취에 의해 말초신경에서 아세틸콜린이 분비됨 신경말단에서의 신호전달에 미치는 영향을 확인하기 위하여 턱밑샘에서 아세틸콜린에 결합하여 신호전달을 조절하는 단백질인 AchBP에 대한 면역형광염색을 수행 하였다. 정상군의 턱밑샘에서는 장액파리 주변에서 AchBP 면역형광 반응성을 확인할 수 있었다(Fig. 3A). 알코올 투여군의 턱밑샘에서도 AchBP 면역형광 반응성을 확인할 수 있었다(Fig. 3B). 정량적 비교를 하기위하여 AchBP에 대한 정량 결과 두 실험군 모두에서 26 kDa 위치에서 발현을 확인할 수 있었으나 정량 분석을 통해 알코올 섭취군에서 유의성 있는 감소를 확인할 수 있었다(Fig. 3C).

고 찰

실험적으로 3 g/kg의 알코올을 동물에게 섭취시킨 경우 현저한 침 분비의 감소가 나타나 알코올의 섭취가 침 분비 억제 인자로서의 작용이 밝혀졌다[9]. 침 분비는 신경계의 지배를 받고 있기 때문에 침 분비 억제는 우선적으로 침 분비 중추인 뇌의 침분비핵의 신경세포, 침 분비 신호를 전달하는 말초신경 그리고 침 분비 신경신호를 전달하는 신경말단과 침샘 파리세포 사이의 시냅스에서의 문

제점을 생각해 볼 수 있다. 따라서 본 연구에서는 알코올의 섭취에 의한 침 분비 저하에 대한 원인으로써 알코올 섭취 후 턱밑샘의 분비를 담당하는 위침분비핵에서의 신경세포 사멸여부, 위침분비핵에서 아세틸콜린을 합성하는 효소의 변화 그리고 cholinergic synapse에서 신호를 조절하는 AchBP의 변화를 확인하였다.

알코올 섭취는 간 뿐 만 아니라 뇌손상을 유발할 수 있는 것으로 알려져 있다[17,18]. 10일 동안 매일 5 g/kg의 알코올을 마우스에 투여한 경우 대뇌피질과 치아이랑에서 신경세포 사멸이 확인된 바 있다[19]. 본 연구에서는 5일간 3 g/kg의 알코올을 섭취시킨 후 위침분비핵(SSN)에 위치하는 신경세포들의 손상여부를 확인한 결과 위침분비핵 내에서 알코올에 의한 신경세포 사멸은 나타나지 않았다. 이러한 결과는 침 분비 저하가 일어나는 알코올 섭취 조적을 적용한 본 연구에서의 침 분비 저하는 위침분비핵의 손상과 무관함을 의미한다.

일부 연구들에 의하면 만성적인 알코올 섭취는 전뇌부 기저에서 acetylcholine, choline acetyltransferase 및 acetylcholine esterase의 수준을 감소시키는 등 cholinergic system에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다[20-28]. 특히, choline acetyltransferase는 choline과 acetyl coenzyme A를 이용해 세포질에서 만들어져 신경말단으로 이동하여 cholinergic synaptic transmission을 담당하는 신경전달물질인 acetylcholine을 합성하는 효소이다[29]. 본 연구에서는 침 분비 부교감 신경 전달을 담당하는 신경전달물질인 acetylcholine의 합성에 알코올의 섭취가 미치는 영향을 확인하기 위하여

choline acetyltransferase의 변화를 확인하였다. 하지만, 이전의 연구들과는 달리 침 분비 부교감 신경의 신경세포체가 밀집한 위침분비핵에서 choline acetyltransferase 면역반응성 및 발현의 유의성 있는 변화는 없었다. 이러한 결과는 침 분비 부교감신경 신호전달에 필요한 신경전달물질을 합성하는 효소의 발현에 본 연구에서 설정한 수준의 알코올 섭취가 영향을 미치지 않는다는 것을 나타낸다.

한편, 본 연구에서는 부교감신경 말단인 턱밑샘에 위치한 cholinergic synapse에서의 signal transmission 조절에 관여하는 단백질인 acetylcholine-binding protein (AChBP)의 변화를 확인하였다. 이 단백질은 acetylcholine에 의해 synaptic cleft로 분비되는데 이때 AChBP의 증가에 의해 진행 중인 acetylcholine 반응을 감소 혹은 종료시킴으로써 cholinergic transmission을 조절 할 수 있는 것으로 보고되었다[30,31]. 정상 침샘 조직에서 AChBP 면역반응성은 샘 파리세포의 기저막 부분에서 발견되어 침샘조직에서도 AChBP의 존재를 확인할 수 있었다. 흥미롭게도 알코올 섭취 조직에서도 AChBP 면역반응성이 관찰되었으나 단백질 정량 결과 알코올 섭취군에서 AChBP 발현의 감소가 확인되었다. AChBP는 acetylcholine의 반응 종료에 중요한데 이러한 단백질이 알코올에 의하여 감소하였음에도 불구하고 부교감신경 지배에 의한 침 분비는 오히려 감소하였다. 이와 같은 결과는 알코올 섭취 이후 침 분비 감소가 부교감신경로에서의 신경전달에 큰 영향을 받지 않는다는 것을 보여준다.

본 연구에서 적용한 침 분비 감소 유발 알코올 섭취 방식은 침 분비 중추에서 알코올성 손상을 유발하지 않으며, acetylcholine 합성 체계의 변화가 없었을 뿐만 아니라 acetylcholine 작용 억제 단백질인 AChBP를 억제하였다. 이상의 결과를 종합해보면 본 연구에 적용한 알코올 섭취에 의한 침 분비 감소는 알코올에 의한 침 분비 부교감신경 신호 전달 체계 억제 보다는 침샘 파리세포에서의 침 분비 신호전달 조절과 밀접한 연관성을 가지고 있을 것으로 사료된다. 이와 같은 이유로 알코올 섭취 후 침 분비 감소에 대한 기전 규명으로써 침샘 파리세포에서의 침 분비 신호변화에 대한 연구의 필요성을 제안하는 바이다.

Conflict of Interest

The authors declare that they have no competing interests.

ORCID

Bo Hyun Jung 0000-0002-2283-6066

Ki-Yeon Yoo 0000-0002-0575-275X

References

1. Pedersen AM, Bardow A, Jensen SB, Nauntofte B. Saliva and gastrointestinal functions of taste, mastication, swallowing and digestion. *Oral Dis* 2002;8:117-129. doi: 10.1034/j.1601-0825.2002.02851.x.
2. Humphrey SP, Williamson RT. A review of saliva: normal composition, flow, and function. *J Prosthet Dent* 2001;85:162-169. doi: 10.1067/mpr.2001.113778.
3. Cassolato SF, Turnbull RS. Xerostomia: clinical aspects and treatment. *Gerodontology* 2003;20:64-77. doi: 10.1111/j.1741-2358.2003.00064.x.
4. Zelles T, Purushotham KR, Macauley SP, Oxford GE, Humphreys-Beher MG. Saliva and growth factors: the fountain of youth resides in us all. *J Dent Res* 1995;74:1826-1832. doi: 10.1177/00220345950740120301.
5. Nauntofte B, Jensen JL. Salivary secretion. In: Yamada T, editor. *Textbook of Gastroenterology*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia; 2002. p. 119-145.
6. Field EA, Longman LP, Bucknall R, Kaye SB, Higham SM, Edgar WM. The establishment of a xerostomia clinic: a prospective study. *Br J Oral Maxillofac Surg* 1997;35:96-103. doi: 10.1016/S0266-4356(97)90683-5.
7. Chae HB. Alcoholic Liver Disease. *Korean J Gastroenterol* 2009;53:275-282. doi: 10.4166/kjg.2009.53.5.275.
8. 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.
9. 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/alcal/agp040.
10. Korea Association of Anatomy. Salivary gland. In: Antonio Nanci, editor. *Ten cate's oral histology*. Seoul: DaehanNarae; 2014. p. 261-263.
11. Karlin A. The acetylcholine-binding protein: 'What's in a name?'. *Pharmacogenomics J* 2001;1:221-223. doi: 10.1038/sj.tpj.6500056.
12. Han EH, Ryu YG, Lee MS. Localization of Nerves Innervating Submandibular Gland in the Rat Brain Stem Using Cholera Toxin B Subunit. *Korean J Anat* 1998;31:45-51. doi: 10.11637/kjpa.1998.11.1.11.
13. Han EH, Song CH, Ryu YG, Lee JI, Lee MS. Localization of Nerves Innervating Lacrimal, Submandibular and Sublingual Gland in the Rat Brain Stem Using Cholera Toxin B Subunit. *Korean J Anat* 1999;32:425-435.
14. Smit AB, Syed NI, Schaap D, van Minnen J, Klumperman J, Kits KS, Lodder H, van der Schors RC, van Elk

- R, Sorgedragar B, Brejc K, Sixma TK, Geraerts WP. A glia-derived acetylcholine-binding protein that modulates synaptic transmission. *Nature* 2001;411:261-268. doi: 10.1038/35077000.
15. Alderazi Y, Brett F. Alcohol and the nervous system. *Current Diagnostic Pathology* 2007;13:203-209. doi: 10.1136/jnnp.2004.045708.
16. Candelario-Jalil E, Alvarez D, Merino N, León OS. Delayed treatment with nimesulide reduces measures of oxidative stress following global ischemic brain injury in gerbils. *Neurosci Res* 2003;47:245-253. doi: 10.1016/S0168-0102(03)00184-6.
17. Harper C, Matsumoto I. Ethanol and brain damage. *Curr Opin Pharmacol* 2005;5:73-78. doi: 10.1016/j.coph.2004.06.011.
18. Pfefferbaum A. Alcoholism damages the brain, but does moderate alcohol use? *Lancet Neurol* 2004;3:143-144. doi: 10.1016/S1474-4422(04)00676-3.
19. Qin L, Crews FT. NADPH oxidase and reactive oxygen species contribute to alcohol-induced microglial activation and neurodegeneration. *J Neuroinflammation* 2012; 9:5. doi: 10.1186/1742-2094-9-5.
20. Jamal M, Ameno K, Miki T, Wang W, Kumihashi M, Isse T, Kawamoto T, Kitagawa K, Nakayama K, Ijiri I, Kinoshita H. Cholinergic alterations following alcohol exposure in the frontal cortex of Aldh2-deficient mice models. *Brain Res* 2009;1295:37-43. doi: 10.1016/j.brainres.2009.07.099.
21. Arendt T. Impairment in memory function and neurodegenerative changes in the cholinergic basal forebrain system induced by chronic intake of ethanol. *J Neural Transm Suppl* 1994;44:173-187. doi: 10.1007/978-3-7091-9350-1_13.
22. Arendt T, Henning D, Gray JA, Marchbanks R. Loss of neurons in the rat basal forebrain cholinergic projection system after prolonged intake of ethanol. *Brain Res Bull* 1988;21:563-569. doi: 10.1016/0361-9230(88)90193-1.
23. Arendt T, Brückner MK, Krell T, Pagliusi S, Kruska L, Heumann R. Degeneration of rat cholinergic basal forebrain neurons and reactive changes in nerve growth factor expression after chronic neurotoxic injury—II. Reactive expression of the nerve growth factor gene in astrocytes. *Neuroscience* 1995;65:647-659. doi: 10.1016/0306-4522(94)00523-8.
24. Costa LG, Guizzetti M. Muscarinic cholinergic receptor signal transduction as a potential target for the developmental neurotoxicity of ethanol. *Biochem Pharmacol* 1999;57:721-726. doi: 10.1016/S0006-2952(98)00278-0.
25. Floyd EA, Young-Seigler AC, Ford BD, Reasor JD, Moore EL, Townsel JG, Rucker HK. Chronic ethanol ingestion produces cholinergic hypofunction in rat brain. *Alcohol* 1997;14:93-98. doi: 10.1016/S0741-8329(97)86147-2.
26. Kentroti S, Vernadakis A. Ethanol neurotoxicity in culture: selective loss of cholinergic neurons. *J Neurosci Res* 1996;44:577-585. doi: 10.1002/(SICI)1097-4547(19960615)44:6<577::AID-JNR8>3.0.CO;2-8.
27. McKinney M, Jacksonville MC. Brain cholinergic vulnerability: relevance to behavior and disease. *Biochem Pharmacol* 2005;70:1115-1124. doi: 10.1016/j.bcp.2005.05.019.
28. Olton DS. The use of animal models to evaluate the effects of neurotoxins on cognitive processes. *Neurobehav Toxicol Teratol* 1983;5:635-640.
29. Arvidsson U, Riedl M, Elde R, Meister B. Vesicular acetylcholine transporter (VACHT) protein: a novel and unique marker for cholinergic neurons in the central and peripheral nervous systems. *J Comp Neurol* 1997;378: 454-467. doi: 10.1002/(SICI)1096-9861(19970224)378:4<454::AID-CNE2>3.0.CO;2-1.
30. Smit AB, Syed NI, Schaap D, van Minnen J, Klumperman J, Kits KS, Lodder H, van der Schors RC, van Elk R, Sorgedragar B, Brejc K, Sixma TK, Geraerts WP. A glia-derived acetylcholine-binding protein that modulates synaptic transmission. *Nature* 2001;411:261-268. doi: 10.1038/35077000.
31. Banks G, Kemenes I, Schofield M, O'Shea M, Korneev SA. Acetylcholine binding protein of mollusks is unlikely to act as a regulator of cholinergic neurotransmission at neurite-neurite synaptic sites in vivo. *FASEB J* 2009; 23:3030-3036. doi: 10.1096/fj.08-117135.