

## 마우스 악하선 세포의 분리 및 배양조건 확립

소준노 · 박호원 · 장선일 · 이금영 · 이원구

전북대학교 자연과학대학 생물학과

마우스의 악하선 세포를 배양하기 위하여 악하선 조직으로부터 세포를 분리하는 조건과 분리된 세포의 배양조건을 조사하였다. 세포분리에는 0.25% trypsin을 사용하였으며 배양액은 여러 농도의 fetal bovine serum(FBS) 또는 low protein serum replacement(LPSR)가 첨가된 Dulbecco's modified Eagle's medium(DME)이었다. 배양된 세포는 대부분 상피형 세포로 확인되었으며, 배양시 5-10%의 FBS를 첨가하였을 경우에 가장 높은 DNA 합성능을 보였으나 이보다 높은 농도의 FBS 첨가시에는 오히려 DNA 합성능이 저하되었다. 혈청 대체물인 LPSR 첨가에 의한 악하선 배양세포 증식의 증가는 첨가된 LPSR의 농도에 의존적이었다. 2% LPSR 첨가 배양액에서 악하선 세포를 배양하였을 때 population doubling time은 42.5 시간이었고 세포의 포화밀도는  $1.2 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup> 이었다. Dihydrotestosterone(DHT)은 악하선 배양세포의 DNA 합성에 관여하지 않거나, 관여한다면 DNA 합성을 억제하는 것으로 보였다. 이에 반해 thyroxine(T<sub>4</sub>)은 악하선 배양세포의 DNA 합성을 현저히 증가시켰다. T<sub>4</sub>와 DHT 모두다 배양세포의 단백질 합성능을 증가시켰다. 또한 이 호르몬들이 악하선 배양세포의 epidermal growth factor(EGF) 분비를 증가시킨 결과는 DHT와 T<sub>4</sub>는 악하선 세포의 EGF 생산 뿐만 아니라 EGF 분비의 조절에도 관련되어 있음을 시사한다. 본 실험에서 정해진 악하선 세포의 배양조건은 악하선 세포의 증식과 기능의 변조를 탐구하는데 유용하게 응용될 수 있을 것으로 생각된다.

**KEY WORDS:** Mouse submandibular gland cells, Culture, T<sub>4</sub>, Testosterone, EGF

마우스의 악하선(Submandibular gland)에는 세포성장인자를 비롯한 많은 종류의 생물고분자들이 존재하고 있으며, 성숙한 마우스의 악하선에 성적이형현상이 있고(Dunn 등, 1973; Takuma 등, 1977), 악하선 조직의 분화는 출생후 분화과정(postnatal development)을 거치며 이 분화과정에 몇가지 호르몬이 밀접하게 관련되어 있다고 알려져있다(Barka, 1980).

마우스 악하선의 성적이형현상의 원인을 규명하고자 수행된 많은 연구 결과, 수컷 마우스를 거세하면 악하선의 크기가 감소하고 선관(granular convoluted tubules, GCT) 세포가 왜소화되며, 이때 testosterone을 투여하면 정상상태로 회복된다는 것이 밝혀졌다. 또한 암컷 마우스에 testos-

terone을 투여하면 GCT 세포의 비대화와 세포분열이 유도될 뿐 아니라 단백질 등의 생물분자 합성능 역시 증가된다는 것이 보고된 바 있다. 이러한 보고들은 성숙한 마우스의 악하선에서 볼 수 있는 성적이형현상이 testosterone과 밀접하게 관련되어 있음을 시사하는 것이라 하겠다(Chretien, 1977).

마우스에서 선조관(striated duct, SD) 세포로부터 분화되어 나오는 GCT 세포가 악하선 조직 내에 출현하는 시기는 생후 20일 경이고(Gresik, 1980), 생후 2주된 마우스에 testosterone을 투여하여서도 GCT 세포의 조기출현을 유도하지 못하는데(Angeletti와 Angeletti, 1967; Kumegawa 등, 1977) 그 원인이 androgen 수용체의 부재에 있다는 보고가 있다(Dunn 등, 1973; Takuma 등, 1977). 또한 T<sub>4</sub>를 단독으로 투여하거나 T<sub>4</sub>와 testosterone을 함께 투여하면 GCT 세포의 조기출현

\*본 연구는 1989년도 문교부 학술연구 조성비로 이루어진 것임.

이 유도된다는 보고도 있다(Gresik과 Barka, 1980). 뿐만 아니라, GCT 세포내에 존재하는 생물분자들의 합성 및 분비량 역시  $T_4$ , testosterone 등의 영향을 받는다는 보고도 있다(Gresik 등, 1981; Walker 등, 1981; Hoath 등, 1983; 1984). 이러한 보고들을 감안할 때, GCT 세포의 분화와 기능 모두다  $T_4$ , testosterone 등의 호르몬에 의해 조절되고 있음을 알 수 있다.

이상에서 언급한 바와 같은 마우스 악하선 세포에 대한 호르몬의 조절 효과는 그 중요성에도 불구하고 *in vivo* 모델로부터 얻어진 것이어서 호르몬의 작용경로가 악하선에 직접적인 것인지, 이들 호르몬이 독립적으로 작용하는 것인지, 또는 생체내 다른 생물분자들과 병합적으로 작용하는 것인지 등에 대해서 아직 확실한 해답을 내릴 수 없다. 특히  $T_4$  또는 testosterone 등이 GCT 세포의 EGF 합성 및 분비 경로에 직접 작용하는 것인지 아니면 간접적인 경로를 거쳐 작용하는 것인지 역시 확실하지 않다. 이에 저자들은 마우스 악하선 세포의 배양 조건을 확립하고 마우스 악하선 세포의 DNA, 단백질 합성능, EGF 분비 등에 대한 DHT와  $T_4$ 의 직접적인 효과를 평가하여 지금까지 보고된 *in vivo* 실험결과와 비교하여 논의하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 실험동물

실험에 사용한 마우스는 C57BL/6N crj inbred strain인데, 통상적인 실험동물 사료(제일사료)를 섭식시키며 자연조건에 일치된 일조량 아래에서 외부자극을 최소화 하면서 전북대학교 자연대 생물학과에서 유지 번식시켰다.

### 세포분리

생후 3-4주 된 수컷 마우스에 nembotal(30 mg/kg)을 복강 주사하여 마취시킨 후 악하선을 무균상태로 적출하여 멸균 phosphate buffered saline(PBS)으로 3회 세척한 다음 안과용 가위로

세절하였다. 세절된 조직절편( $1 \text{ mm}^3$ )을 trypsin 용액(0.25%, Gibco)내에서 회전시키며  $37^\circ\text{C}$ 에서 30분간 일차 처리한 후, 세포가 포함된 상층액을 얻고 잔여절편은 신선한 0.25% trypsin 용액으로 재처리하여 다시 세포부유 상층액을 얻었다. 획득된 세포부유액에 동량의 배양액을 첨가하여 100 g로 10분씩 3회 원심시켜 세포를 회수하고 이중-stainless mesh(pore size:  $100 \mu\text{m}$ ,  $140 \mu\text{m}$ )에 통과시켰다. Trypan blue exclusion 법(Freshney, 1987)으로 세포의 viability를 조사하였다.

### 세포배양

악하선 세포의 배양에 사용된 배양액은 DME(Gibco)였으며, 실험조건에 따라 다양한 농도의 FBS(Gibco), gentamycin( $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ ), fungizone( $0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) 등을 첨가하였다. 효소처리에 의해 얻어낸 분리세포를 15% FBS가 첨가된 상기 배양액에  $5 \times 10^5 \text{ cells}/\text{ml}$  밀도로 부유시킨 후 collagen(Type IV, Sigma)이 coating된 세포 배양 용기(Macklis 등, 1985)에 접종하여  $\text{CO}_2$  incubator( $5\% \text{ CO}_2$ - $95\% \text{ air}$ ,  $37^\circ\text{C}$ )에서 배양하였다. 세포 배양액에 첨가되는 FBS 대체물로 LPSR(Sigma)을 사용하기도 했다.

### 광학현미경 관찰

배양세포를 methanol로 고정하고 Giemsa 염색액으로 염색하여 관찰하고 촬영하거나, 배양 중인 세포를 위상차 도립현미경으로 관찰하며 촬영하였다.

### 전자현미경 관찰

배양세포의 미세구조 관찰을 위한 전자현미경 시료의 제작은 Moses와 Claycomb의 방법(1982)을 약간 변형시켜 사용하였다. 단층배양된 세포의 표면을 PBS로 세척하고 1% glutaraldehyde(0.1 M cacodylate buffer, pH 7.2)로 전고정한 다음 1%  $\text{OsO}_4$ (0.1 M cacodylate buffer, pH 7.2)로 후고정하였다. 고정된 시료는 ethanol 제(50-100%)로 탈수시켰다. 100% ethanol에 의한

최종 탈수는 2회 반복하였으며, 100% ethanol과 epoxy 수지(Epon 812, Polysciences) 혼합액을 1:1로 섞은 혼합액으로 실온에서 1시간 동안 배물시켰다. 그 후, 순수한 epoxy 수지 혼합액만으로 교환하고 37°C에서 12시간, 45°C에서 12시간, 60°C에서 24시간 동안 처리하여 epoxy 수지를 중합시켰다. 수지 중합 후 액체질소(-196°C)에 5분간 보존시킨 다음 꺼내어서 세포배양 용기와 세포가 배물되어 있는 epoxy 블럭을 분리시켰다. Ultramicrotome을 이용하여 80 nm 두께로 절편을 만들고, uranyl acetate와 lead citrate로 이중 염색하였다. 세포의 미세구조는 Hitachi H-600 전자현미경을 이용하여 조사하였다.

### FBS 농도에 따른 세포증식

배양 개시 2일 후, 단층배양세포의 표면을 1% FBS 함유 배양액으로 세척한 후 다양한 농도의 FBS가 첨가된 FBS-DME 배양액 1 ml로 교환하여 24시간 배양하고 DNA 합성능을 조사하였다.

### 혈청 대체물에 의한 세포증식

초대배양 중인 세포를 수거하여 혈청 무첨가 배양액에 부유시키고 원심하여 2회 세척하였다. 수거한 세포를 2% LPSR 함유 배양액에  $0.5 \times 10^5$  cells/ml 밀도로 부유시키고 세포부유액 1 ml을 12-well plate(4 cm<sup>2</sup>, Costa)의 각 well에 접종하였다. 세포 접종 12시간 후에 배양세포의 표면을 무첨가 배양액으로 세척하고 다양한 농도의 LPSR이 첨가된 배양액으로 교환하여 배양하면서 세포의 증식능을 조사하였다. 이때 배양액은 3일 간격으로 교환해 주었다. 세포기간의 경과에 따른 세포 수의 변화는 trypsin 처리로 각 well의 세포를 수거하고 hemocytometer를 이용하여 조사하였다. 이때 10% FBS 함유 배양액에 의한 세포증식의 변화도 같이 조사하였다.

### Hormone 처리

단층배양 2일 쯤의 세포표면을 5% FBS 함유 DME 배양액으로 세척한 후 1 ml의 상기 배양액으로 교환하고 적정한 농도로 희석한 DHT

(Sigma, ethanol 희석), T<sub>4</sub>(Sigma, 0.001 N NaOH 용액 희석) 등을 10  $\mu$ l 첨가하여 24시간 배양하였다. 배양 후 DNA 합성능 및 EGF 분비능의 변화를 조사하였다.

### DNA와 단백질 합성능 조사

세포내로 동화된 thymidine 또는 leucine양으로 측정된 DNA 합성능과 단백질 합성능은 각 조건에서 배양하면서 배양 종료 3-5시간 전에 <sup>3</sup>H-thymidine(1  $\mu$  Ci/ml, Sp. act. 50 Ci/mmol, ICN) 또는 배양 종료 12시간 전에 <sup>3</sup>H-leucine(5  $\mu$  Ci/ml, Sp. act. 50 Ci/mmol, ICN)을 첨가하여 배양 종료까지 pulse시켜 조사하였다(Freshney, 1987). 동위원소로 pulse시킨 후, PBS로 세척하고 10% Trichloroacetic acid(TCA)로 처리한 다음, 1% sodium dodecyl sulfate(SDS) 함유 0.3 N NaOH 용액을 첨가하고 30분간 세포단층을 용해시킨 후 이를 counting vial로 옮기고 cock-tail 용액(Insta-gel, Packard)을 첨가하여 liquid scintillation counter(Packard)로 방사능을 측정하였다.

### EGF의 radioimmunoassay

배양세포내 EGF 양을 조사하기 위하여 세포의 표면을 PBS로 세척한 후 0.2 ml의 증류수를 첨가하고 freezing-thawing을 3회 실시한 다음 microcentrifuge로 5분간 원심분리하여 상층액을 취했다. 분리한 시료 또는 정제된 EGF(Sigma) 표준용액 100  $\mu$ l, newborn calf serum(NCS, Gibco) 100  $\mu$ l를 혼합하고, 희석된 <sup>125</sup>I-EGF(ICN) 100  $\mu$ l(8,000-10,000 cpm/tube)를 첨가한 다음, 최종적으로 rabbit anti-mouse EGF antibody(1:1,000, Sigma) 100  $\mu$ l를 첨가한 후 실온에서 18-20시간 방치하여 항원-항체 반응을 유도하였다(Savage 등, 1972; Byyny 등, 1972). 그 후 7% polyethylene glycol(MW. 6,000, PEG, Sigma)과 Goat anti-rabbit Ig antibody(1:20)가 1:5로 섞인 침강용액 1 ml을 첨가하고 2,000 g로 15분간 4°C에서 원심시켜 침전물내의 방사능을 측정하였다. 이때 사용된 Goat anti-

body의 생산은 일반적인 방식에 준하였다 (Johnstone과 Thorpe, 1987).

## 결 과

### 악하선 세포획득을 위한 효소처리 및 악하선 배양 세포의 형태적 특성

세포분리를 위한 효소처리 즉 trypsin 처리에 의한 세포분리법과 collagenase 처리법 간의 차이는 세포 충수를 제외하고는 거의 없었다. 즉 trypsin 처리에 의해 약 5배 가량 더 많은 분리세포가 얻어졌으며 세포의 viability는 두 방법 공히 90% 내외였다. 따라서 본 실험에서는 trypsin(0.25%) 분리법을 선택하여 사용하였다. Trypsin 처리에 의해 얻어진 악하선 세포의 분리 수율은 3주된 마우스당  $5-10 \times 10^6$  세포정도였으며 분리세포를 배양한 결과 상피형 세포의 증식이 활발함을 확인하였다. 상피형 세포의 확인은 광학현미경으로 관찰한 세포의 형태와 전자현미경을 이용한 세포

의 미세구조의 특징을 기초로 하였다. Fig. 1에서와 같이 상피형 세포의 특징적인 형태인 다각형의 세포가 관찰되었으며 세포의 핵상은 이핵 또는 다핵의 소견을 보였다. 전자현미경에 의한 세포의 미세구조는 Fig. 2와 같다. 세포의 형태는 원형 타원형 간상형으로 구분되며 세포의 표면에서 가늘고 짧은 원형질 돌기가 다수 관찰되었다. 아울러 가늘고 긴 미토콘드리아, 원섬유 다발, 미세섬유, 미세관 등이 관찰되었다.

### 악하선 세포의 증식에 미치는 FBS의 효과

배양액에 첨가된 FBS 농도에 따라 증식의 정도가 크게 차이를 보였다. 최고치를 보인 10% 첨가군과 비교하여 볼 때 5% 첨가군의 경우는 별 차이가 없었으나 1% 첨가군은 세포의 증식율이 40% 가량 낮았다. 특히 15% 첨가군에서는 18% 정도, 20% 첨가군에서는 35% 정도 세포증식율이 저하되었다(Table 1). 즉 악하선 세포의 배양액에 첨가되는 FBS의 적정농도는 5-10%이며 이보다 높은 농도의 FBS가 첨가될 때 오히려 세포

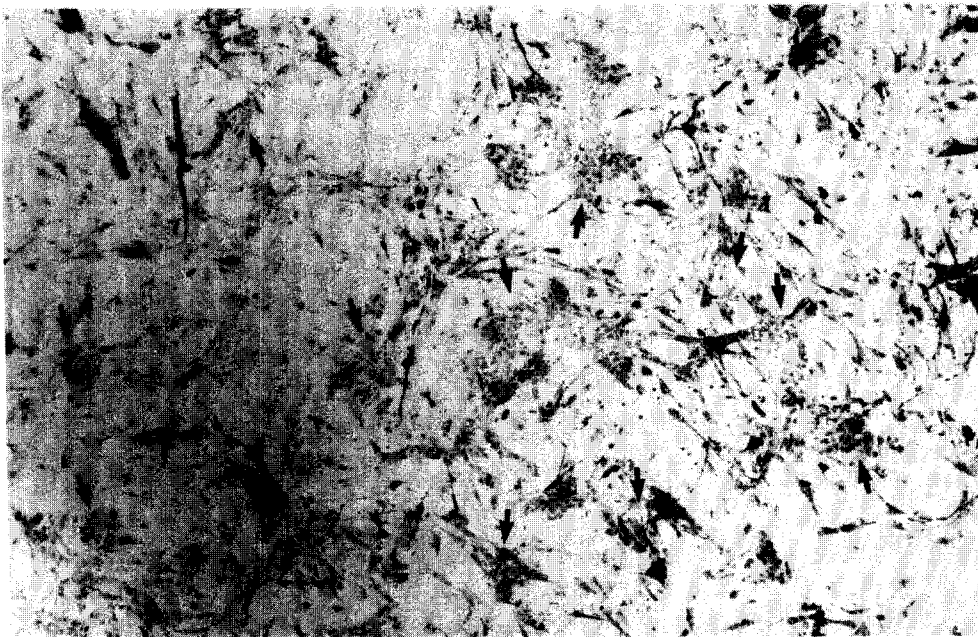


Fig. 1. Monolayer culture of mouse submandibular gland (SG) cells dispersed by trypsin treatment. Giemsa stain. ( $\times 40$ ). Arrows; focus of epitheloid cells.

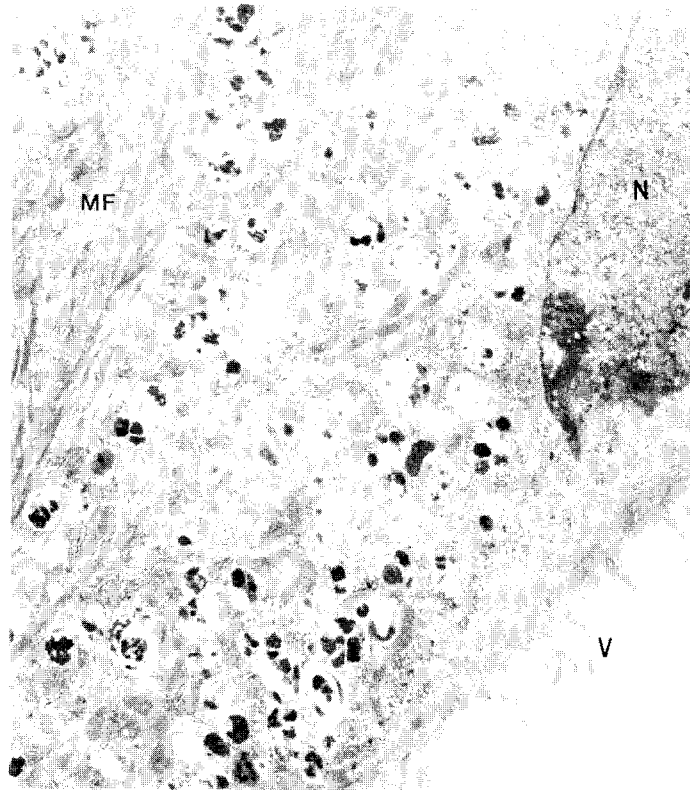


Fig. 2. Electron micrograph of thin section of fixed and Epon-embedded mouse SG cells in monolayer culture ( $\times 35,000$ ). N: nucleus, MF: microfillament, V: microvilli.

Table 1. Effect of fetal bovine serum (FBS) on DNA synthesis in cultured SG cells.

	Conc. of FBS (%)				
	1	5	10	15	20
cpm/well	5748.8	9376.5	9191.8	7574.0	5882.0
(mean $\pm$ SD)	$\pm 387.5$	$\pm 196.2$	$\pm 387.1$	$\pm 441.1$	$\pm 394.9$

Data represented are the mean  $\pm$  SD of the four experiments.

증식이 저하됨을 알 수 있었다.

#### 악하선 세포의 증식에 미치는 LPSR의 효과

다양한 농도의 LPSR 첨가에 의해 악하선 세포의 증식이 현저하게 증가됨을 알 수 있었다(Fig. 3). 10% FBS 함유 배양액의 경우와 비교하건대 0.5% LPSR 함유 배양액은 악하선 세포의 증식

을 비약하게 증가시키나 1% 또는 2% LPSR 함유 배양액은 10% FBS 함유 배양액과 거의 비슷한 정도로 악하선 세포의 증식을 증가시켰다. 다른 농도의 LPSR 함유 배양액과는 달리 1% LPSR 함유 배양액에서 배양되는 경우에서 배양 9일째 부터는 세포의 증식이 상당히 둔화되었다. 2% LPSR 함유 배양액에 의한 악하선 세포의 부

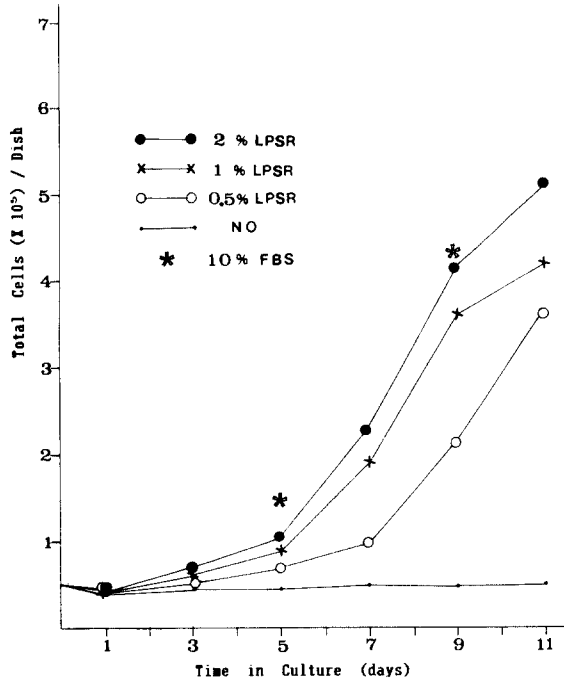


Fig. 3. Cell growth patterns of SG cells grown in varying LPSR concentrations. Cultures were initiated and sampled as described in Materials and Methods. Each point represents the average number of cells obtained.

착율(plating efficiency)은 70% 이상이었고 doubling time은 42.5시간이었으며 포화밀도(saturation density)는  $1.2 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup>로 측정되었다.

악하선 배양세포내 EGF의 양

악하선 세포를 10% FBS 함유 배양액에서 배양하는 경우, 배양 4일째에 약간 감소하는 경향을 보였으나 배양 6일째까지 세포내 EGF 양은 5 ng/10<sup>6</sup> cells 내외로 큰 변화가 없었다(Fig. 4). 이 결과는 배양된 세포가 EGF를 함유하고 있음과 아울러 배양세포에서 EGF 합성이 지속적으로 되고 있음을 시사하는 것이다.

악하선 세포의 DNA 및 단백질 합성과 EGF 분비에 대한 호르몬의 효과

DHT의 농도에 따른 DNA 합성율의 변화를 조사한 결과  $1 \times 10^{-7}$ M,  $1 \times 10^{-6}$ M DHT 처리에

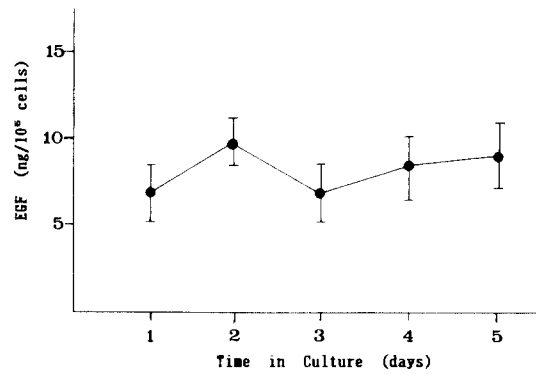


Fig. 4. Amounts of EGF in the cultured mouse SG cells. Each point represents the mean  $\pm$  SD of three experiments.

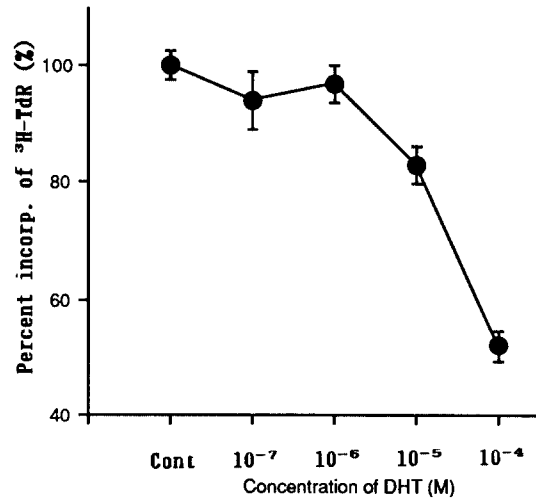
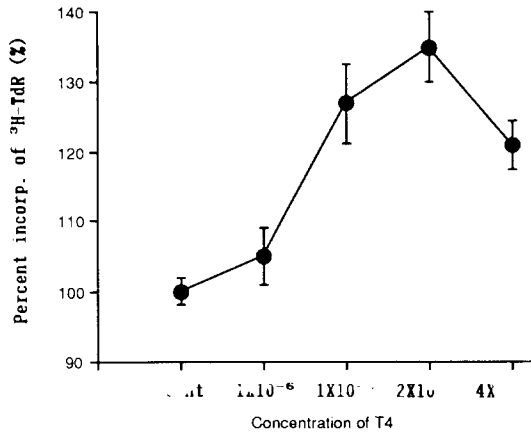


Fig. 5. Dose-response of DNA synthesis in cultured mouse SG cells to DHT added. SG cells were incubated for 24 hours in 5% FBS-DME with DHT in various doses. Each value represents the mean  $\pm$  SD of three experiments.

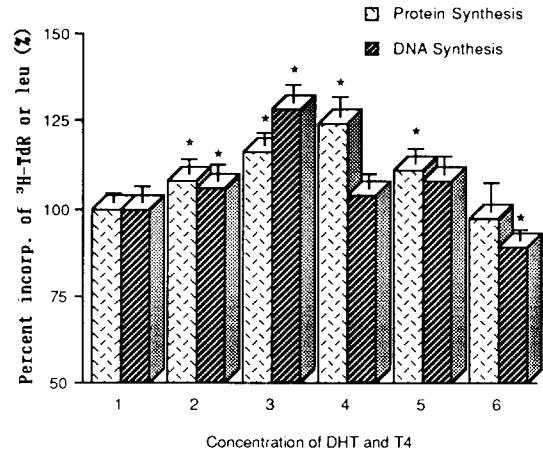
의해서는 DNA 합성율의 변화가 거의 없었으나, 10<sup>-5</sup>M 이상 농도의 DHT 처리에 의해서는 DNA 합성능이 현저히 억제되었다(Fig. 5; p < 0.05). 전반적으로 배양세포의 DNA 합성능의 감소는 DHT 농도에 의존하고 있음을 알 수 있었다. 이와는 달리 배양세포의 단백질 합성에 미치는 DHT의 효과는 저농도의 DHT 처리에 의해서 나타났다. 즉 DNA 합성을 현저히 저하시킨  $1 \times 10^{-5}$ M



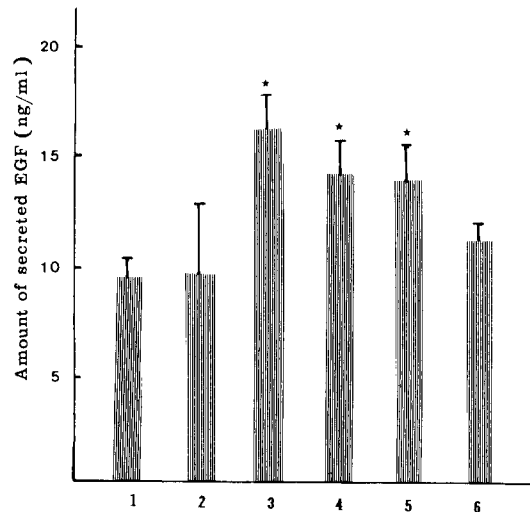
**Fig. 6.** DNA synthesis in cultured mouse SG cells exposed to T<sub>4</sub>. SG cells were incubated for 24 hours in 5% FBS-DME with T<sub>4</sub> in various doses. Each value represents the mean ± SD of three experiments.

농도의 DHT를 처리하였을 때 단백질 합성을 대조군에 비하여 유의한 변화가 없었으나, DNA 합성에 변화를 주지 못했던  $1 \times 10^{-6}$ M 농도의 DHT 처리에 의해 배양세포의 단백질 합성능이 유의하게 증가( $P < 0.01$ )함을 알 수 있었다 (Fig. 7).

악하선 배양세포의 DNA 합성능에 대한 T<sub>4</sub>의 효과는 DHT의 경우와 마찬가지로 처리농도에 의존적이었으나 그 효과는 정반대로  $1-2 \times 10^{-5}$ M 농도의 T<sub>4</sub> 처리에 의해 DNA 합성능이 25-35% 정도로 현저히 증가되었다 (Fig. 6;  $p < 0.005$ ).  $4 \times 10^{-5}$ M 농도의 T<sub>4</sub>를 처리한 경우는 대조군에 비해서는 DNA 합성능이 유의하게 증가되었으나 ( $P < 0.05$ )  $1-2 \times 10^{-5}$ M 처리군에 비해서는 그 효과가 더 크지 않음을 볼 수 있었다. 단백질 합성능에 미치는 T<sub>4</sub>의 효과 역시 배양세포의 단백질 합성능을 현저히 증가시켰다 (Fig. 7). DNA 합성능에 영향을 주지 못했던  $1 \times 10^{-6}$ M T<sub>4</sub> 처리에 의해 단백질 합성능은 대조군에 비해 10% 정도의 유의한 증가 ( $P < 0.05$ )가 있었으며,  $1 \times 10^{-5}$ M 처리에 의해서는 15% 정도의 증가가 있었다. T<sub>4</sub>와 DHT를 같이 처리하면 DNA 합성능은 대조군의 그것과 차이가 없었으나, 단백질 합성능은 25% 정도 현저히 증가되었고 특히 같은 농도의



**Fig. 7.** Effects of T<sub>4</sub> and/or DHT on protein and DNA synthesis in cultured mouse SG cells. SG cells were incubated for 24 hours in 5% FBS-DME with T<sub>4</sub> and/or DHT. Each value represents the mean ± SD of three experiments. ★:  $P < 0.05$ , 1: control, 2: T<sub>4</sub> ( $10^{-6}$ M), 3: T<sub>4</sub> ( $10^{-5}$ M), 4: T<sub>4</sub> ( $10^{-6}$ M) + DHT ( $10^{-6}$ M), 5: DHT ( $10^{-6}$ M), 6: DHT ( $10^{-5}$ M).



**Fig. 8.** Effects of T<sub>4</sub> and/or DHT on EGF secretion in cultured mouse SG cells. SG cells were incubated for 24 hours in 5% FBS-DME with T<sub>4</sub> and/or DHT. At the termination of culture, the culture supernatants were collected and assayed by radioimmunoassay. Each value represents the mean ± SD of three experiments. ★:  $P < 0.05$ , 1: control, 2: T<sub>4</sub> ( $10^{-6}$ M), 3: T<sub>4</sub> ( $10^{-5}$ M), 4: T<sub>4</sub> ( $10^{-6}$ M) + DHT ( $10^{-6}$ M), 5: DHT ( $10^{-6}$ M), 6: DHT ( $10^{-5}$ M).

T<sub>4</sub>와 DHT를 각각 단독으로 처리한 경우에 비해 유의한 증가가 있어 단백질 합성에 T<sub>4</sub>와 DHT의 부가효과가 있음을 알 수 있었다(Fig. 7).

악하선 배양세포의 EGF 분비는  $1 \times 10^{-6}$ M DHT 처리에 의해 30% 정도의 유의한 증가가 있었고  $1 \times 10^{-5}$ M T<sub>4</sub> 처리에 의해서도 역시 50% 정도 유의하게 증가되었다(Fig. 8). 또한 T<sub>4</sub>( $1 \times 10^{-6}$ M)와 DHT( $1 \times 10^{-6}$ M)을 함께 처리한 경우에도 대조군에 비해서 EGF 분비가 유의하게 증가되어 악하선 배양세포의 EGF 분비가 호르몬에 의해 조절되고 있음을 확인할 수 있었다(Fig. 8).

## 고 찰

마우스의 악하선은 다른 동물의 악하선이나 악하선 이외의 타액선에 비해 GCT 부분이 매우 잘 발달되어 있어 전체 조직 세포의 70% 가량이 GCT 세포인 것으로 밝혀져 있다(Chretien, 1977). 따라서 본 실험에서 사용된 trypsin에 의한 세포 분리법으로 분리된 세포는 대부분 GCT 세포라고 볼 수 있다. 물론 본 실험 결과 배양된 세포의 어느 정도가 GCT 세포일 것인지는 명확히 밝히지 못하였지만, 마우스 악하선에 존재하는 EGF가 GCT 세포에 분포되어 있다는 보고들(Scwab 등, 1976; Turkington 등, 1971; Watson 등, 1985)과 배양 기간이 지속됨에도 세포내 포함된 EGF의 양이 크게 저하됨 없이 일정함을 보여주는 본 실험 결과를 감안하여 볼 때 본 실험 결과, 배양된 악하선 세포의 상당한 부분이 GCT 세포일 것으로 추측된다.

마우스 악하선 배양세포의 증식에 필요한 FBS 대체물로서 LPSR을 이용한 본 실험결과는 *in vitro* 조건하의 악하선세포의 증식이 LPSR의 농도-의존적으로 진행되었음을 보여 주고 있으며 10% FBS 첨가 시와 별다른 차이를 보이고 있지 않아 악하선 세포의 배양에 혈청무첨가 배양액의 개발이 상당히 쉽게 진행될 수 있으리라 판단된다. 특히 LPSR는 그 조성이 albumin, transfer-

rin, insulin, vitamine, growth factor, attachment factor 등으로 밝혀져 있는 것이어서 마우스 악하선 세포에 미치는 각종 약물 및 외부자극의 본성 또는 그 경로를 배양세포계를 이용하여 탐구하는 데 본 실험에서 사용된 배양조건이 유용하게 응용될 수 있으리라 판단된다.

마우스 악하선세포의 분화 및 기능향진 등에 여러가지 호르몬이 작용하며, 특히 T<sub>4</sub>와 testosterone의 작용이 주된 것으로 평가되고 있다(Dunn과 Wilson, 1975; Aloe와 Levi-Montalcini, 1980; Gresik 등, 1981). 출생후 2주경까지는 GCT 세포의 출현이 드물며 출생 후 3-4주경에 SD 세포로부터 GCT 세포가 급격히 분화되어 나온다고 알려져 있어(Gresik과 Barka, 1983) 이들 호르몬이 성숙 이전에는 SD 세포에 작용하여 GCT 세포로의 분화를 촉진하고 성숙 후에는 GCT 세포군에 작용하여 악하선의 성적이형현상을 보이게 하는 것으로 주장되고 있다. 마우스 악하선 조직내의 steroid 호르몬 수용체의 양 및 호르몬과의 친화력은 성에 따라 다르고(Wilson과 Goldstein, 1972; Verhoeven과 Wilson, 1976) 성숙정도에 따라 차이가 있어 출생 후 2주경 부터 6주 사이에 높은 친화력이 있는 많은 양의 steroid 호르몬 수용체가 존재하며 출생후 12주경 이후로는 감소한다고 알려져 있다(Dunn 등, 1973). 아울러 Takuma 등(1977)은 마우스 악하선의 steroid 호르몬 수용체가 DHT와 특이적으로 결합할 뿐이고 testosterone, estradiol, hydrocortisone 등에 대한 수용체는 없는 것으로 보고한 바 있어 DHT가 악하선세포에 직접 작용할 것으로 추측할 수도 있으나, DHT가 실제로 악하선세포에 직접 작용하는지 악하선세포의 증식 또는 기능과는 어떤 관련성이 있는지는 아직 확실하지 않다. 본 실험결과에서 저농도의 DHT( $10^{-6}$ M 이하)는 배양세포의 DNA 합성능에는 별 영향을 주지 않았으나 단백질 합성능은 증가시켰으며, 고농도에서는 DNA 합성능이 농도의존적으로 억제되고 있었다. 이는 Chretien(1977)이 자기방사법을 이용하여 얻은 결과를 보고한 내용 즉 정상 수컷 마우스와 지세한 수컷 마우스 간에 세포분열능의 차이는 없



으나 거세한 수컷 마우스에서 GCT 세포들의 크기가 감소되고 또한 단백질과 RNA 합성이 현저히 감소된다는 내용과 일치하는 것으로 평가된다. DHT가 악하선 배양세포의 세포분열과는 무관하거나 세포분열을 억제하고 있음을 보여주는 본 실험결과를 감안하여 볼 때 testosterone 투여로 마우스 악하선 발달이 유도된다는 기존의 보고들은 마우스에 투여된 testosterone이 악하선 세포의 분열에 직접 작용해 서가 아닌 간접적인 경로를 거쳐 나타난 것으로 해석되어야 할 것으로 생각된다. 그러나 악하선 배양세포의 단백질 합성능을 증가시키는데 DHT의 효과가 있음을 보여주는 결과는 적어도 악하선 세포의 단백질 합성능과 관련되어서는 in vivo에서도 DHT가 직접 악하선 세포에 작용할 것으로 추정하게 하며, 악하선 세포의 세포분열과 단백질 합성에 미치는 DHT의 영향은 DHT가 서로 다른 경로를 통하여 관여한 것으로 추측된다.

DHT의 경우와는 달리  $T_4$  처리에 의해 악하선 세포의 DNA 합성 및 단백질 합성이 증가된 결과는 성숙 전 마우스에 대한  $T_4$ 의 투여에 의해 악하선의 SD 세포 및 GCT 세포의 분열과 조숙한 분화가 유도된다는 in vivo 결과와 잘 부합되는 것으로 생체에 투여된  $T_4$ 는 DHT와는 달리 악하선 세포에 직접 작용하는 것으로 보여지며, Walker 등(1981)이 시사하는 바와 같이 DHT와는 다른 경로로 악하선 세포의 분열 및 기능조절에  $T_4$ 는 독자적인 작용을 하고 있는 것으로 판단된다.

마우스 악하선에서 생산되는 EGF의 분비에 관련된 조절과정에 대해서도 in vivo 모델을 이용한 간접적인 증거 또는 악하선 조직편을 이용한 실험에서 얻은 극히 단편적인 증거가 있을 뿐이고 (Roberts, 1977; Barka 등, 1978) testosterone 및  $T_4$  투여에 의한 마우스 악하선내 EGF 양의 증가 즉 새로운 EGF 합성이 유도된다는 많은 보고들만이 있을 뿐이다 (Roberts, 1974; Barthe 등, 1974; Walker 등, 1981; Wilson 등, 1982). 따라서 악하선 배양세포에 대한 DHT 및  $T_4$ 의 처리에 의해 EGF의 분비량이 증가되고 있음을 보인 본 실험결과는 기존의 보고들과 직접 비교하여 평가

되기는 어렵다. 그러나 마우스에서 호르몬 처리가 악하선 조직내에 새로운 EGF 합성을 유도한다는 많은 보고들과 본 실험결과를 감안하여 보면 DHT 및  $T_4$  등의 호르몬이 악하선의 EGF 생산 뿐만 아니라 분비에도 관여하며, EGF 분비의 조절기능을 담당하고 있는 것으로 생각된다. 호르몬이 악하선 배양세포의 EGF 분비를 증가시킨 본 실험결과는 본 실험방법의 악하선 배양세포가 악하선세포의 EGF 분비 경로 및 분비 조절과정을 규명하는 데 유용하게 쓰일 수 있는 실험모델이 될 수 있음을 보여주는 것으로 생각된다.

## 인용문헌

- Aloe, L. and R. Levi-Montalcini, 1980. Comparative studies on testosterone and L-thyroxine effects on the synthesis of nerve growth factor in mouse submaxillary salivary glands. *Exp. Cell Res.* **125**: 15-22.
- Angeletti, P. U. and R. Angeletti, 1967. Androgen-dependent esterase activity in the mouse submaxillary gland. *Biochem. Biophys. Acta.* **136**: 187-189.
- Barka, T., 1980. Biologically active polypeptides in submandibular glands. *J. Histochem. Cytochem.* **28**: 836-859.
- Barka, T., E. W. Gresik, and H. van der Noen, 1978. Stimulation of secretion of epidermal growth factor and amylase by cycloctidine. *Cell. Tiss. Res.* **186**: 269-278.
- Barthe, O. L., L. P. Bullock, I. Mowszowicz, C. W. Bardin, and D. N. Orth, 1974. Submaxillary gland epidermal growth factor: A sensitive index of biological androgen activity. *Endocrinol.* **95**: 1019-1025.
- Byyny, R. L., D. N. Orth, and S. Cohen, 1972. Radioimmunoassay of epidermal growth factor. *Endocrinol.* **90**: 1261-1266.
- Chretien, M., 1977. Action of testosterone on the differentiation and secretory activity of a target organ: The submandibular gland of the mouse. *Int. Rev. Cytol.* **50**: 333-396.
- Dunn, J. F., J. L. Goldstein, and J. D. Wilson, 1973. Development of increased cytoplasmic binding of androgen in the submandibular gland of the mouse with testicular feminization. *J. Biol. Chem.* **248**: 7819-7825.
- Dunn, J. F. and J. D. Wilson, 1975. Developmental study of androgen responsiveness in the submandibu-

- lar gland of mouse. *Endocrinol.* **96**: 1571-1578.
- Freshney, R. I., 1987. Culture of animal cells: A manual of basic technique (2nd ed.). Alan R. Liss, Inc., New York, pp. 227-256.
- Gresik, E. W., 1980. Postnatal developmental changes in submandibular glands of rat and mice. *J. Histochem. Cytochem.* **28**: 860-870.
- Gresik, E. W. and T. Barka, 1980., Precocious development of granular convoluted tubules in the mouse submandibular gland induced by thyroxine or by thyroxine and testosterone. *Am. J. Anat.* **159**: 177-185.
- Gresik, E. W. and T. Barka, 1983. Epidermal growth factor, renin, and protease in hormonally responsive duct cells of the mouse sublingual gland. *Anat. Rec.* **205**: 169-175.
- Gresik, E. W., I. Schenkein, H. van der Noen, and T. Barka, 1981. Hormonal regulation of epidermal growth factor and protease in the submandibular gland of the adult mouse. *Endocrinol.* **109**: 924-929.
- Hoath, S. B., J. Lakshmanan, S. M. Scott, and D. A. Fisher, 1983. Effect of thyroid hormones on epidermal growth factor concentration in neonatal mouse skin. *Endocrinol.* **112**: 308-314.
- Hoath, S. B., J. Lakshmanan, and D. A. Fisher, 1984. Thyroid hormone effect on skin and hepatic epidermal growth factor concentrations in neonatal and adult mice. *Biol. Neonate* **45**: 49-52.
- Johnstone, A. and R. Thorpe, 1987. Immunocytochemistry in practice (2nd ed.). Blackwell Sci. Public., London, pp. 30-34.
- Kumegawa, M., T. Takuma, and Y. Tagaki, 1977. Precocious induction of secretory granules by hormones in convoluted tubules of mouse submandibular glands. *Am. J. Anat.* **149**: 111-114.
- Macklis, J. D., R. L. Sidman, and H. D. Shine, 1985. Cross-linked collagen surface for cell culture that is suitable, uniform, and optically superior to conventional surfaces. *In Vitro, Cell. Dev. Biol.* **21**: 189-194.
- Moses, R. L. and W. C. Claycomb, 1982. Ultrastructure of terminally differentiated adult rat cardiac muscle cells in culture. *Am. J. Anat.* **164**: 113-131.
- Roberts, M. L., 1974. Testosterone-induced accumulation of epidermal growth factor in the submandibular salivary glands of mice, assessed by radioimmunoassay. *Biochem. Pharmacol.* **23**: 3305-3308.
- Roberts, M. L., 1977. The in vitro secretion of epidermal growth factor by mouse submandibular salivary gland. *Naunyn-Schmied. Arch. Pharmacol.* **296**: 301-305.
- Savage, C. A., T. Inagami, and S. Cohen, 1972. The primary structure of epidermal growth factor. *J. Biol. Chem.* **247**: 7612-7621.
- Scwab, M. E., K. Stokel, and T. Thoenen, 1976. Immunocytochemical localization of nerve growth factor, NGF, in the submandibular gland of adult mice by light and electron microscopy. *Cell Tiss. Res.* **169**: 289-299.
- Takuma, T., T. Nakamura, K. Hosoi, and M. Kumegawa, 1977. Binding protein for 5  $\alpha$  -dihydrotestosterone in mouse submandibular gland. *Biochem. Biophys. Acta*, **496**: 175-181.
- Turkington, R. W., J. L. Males, and S. Cohen, 1971. Synthesis and storage of epithelial-epidermal growth factor in submandibular gland. *Cancer Res.* **31**: 252-256.
- Verhoeven, G. and J. D. Wilson, 1976. Cytosol androgen binding in submandibular gland and kidney of the normal mouse and the mouse with testicular feminization. *Endocrinol.* **99**: 79-92.
- Walker, P., M. E. Weichsel, S. B. Hoath, R. E. Poland, and D. A. Fisher, 1981. Effect of thyroxine, testosterone, and corticosterone on nerve growth factor (NGF) and epidermal growth factor (EGF) concentrations in adult female mouse submaxillary glands: Dissociation of NGF and EGF responses. *Endocrinol.* **109**: 582-587.
- Watson, A. Y., K. A. Jacqueline, K. Siminisky, J. E. Mole, and R. A. Murphy, 1985. Cellular and subcellular colocalization of nerve growth factor and epidermal growth factor in mouse submandibular glands. *Anat. Rec.* **213**: 365-376.
- Wilson, J. D. and J. L. Goldstein, 1972. Evidence for increased cytoplasmic androgen binding in submandibular gland of the mouse with testicular feminization. *J. Biol. Chem.* **247**: 7342-7348.
- Wilson, C. M., R. C. Reynolds, and P. E. Ward, 1982. Comparison of genetic and endocrine control of renin and kallikrein in mouse submandibular gland. *Life Sci.* **31**: 1613-1618.

(Accepted February 18, 1991)

---

**Mouse Submandibular Gland Cells: Isolation and Establishment of Culture Condition *in vitro***

June-No So, Ho Won Park, Seon Il Jang, Geum Yeong Lee, and Won Koo Lee (Department of Biology, College of Natural Science, Chon-buk National University, Chonju 560-756, Korea)

The purpose of this research was to establish the culture condition for dissociated submandibular gland (SG) cells. After trypsin digestion of SG from 3-4 weeks old mice, dissociated cells were cultured in 10% fetal bovine serum-Dulbecco's modified Eagle's medium (FBS-DME) or 0.5-2% low protein serum replacement-DME (LPSR-DME) on plastic surface to form monolayer. The effects of FBS, LPSR and hormones on the growth and function of cultured SG cells were examined. SG cells dissociated by enzyme were successfully cultured and were characterized as epithelial-like cells by light and electron microscope. The maximal DNA synthesis of cultured SG cells was achieved by DME containing 5-10% FBS. The same results were obtained when the effects of LPSR on cell proliferation were examined up to a LPSR concentration of 2%. SG cells cultured in 2% LPSR-DME expressed a population doubling time of 42.5 hrs and a saturation density of  $1.2 \times 10^5$  cell/cm<sup>2</sup>. Dihydrotestosterone (DHT) in medium did not influence on the DNA synthesis of the cultured SG cells, but stimulated protein synthesis of the SG cells. Thyroxine (T<sub>4</sub>) stimulated protein synthesis of the SG cells markedly in a dose-dependent fashion. EGF secretion by the cultured SG cells increased significantly by DHT and/or T<sub>4</sub> treatment. This finding indicated that secretion of EGF by the SG cells was under the control of the hormones such as androgen and thyroid hormones. It seems to be that the culture condition described here can be used as a useful tool for further research on the SG cells.