

## Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger와 HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> transporter에 의한 흰쥐 타액선 선세포내 pH 조절

연세대학교 치과대학 소아치과학교실, 연세대학교 구강과학연구소\*

박동범 · 서정택\* · 손흥규 · 이종갑

### Abstract

#### MODULATION OF INTRACELLULAR pH BY Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> EXCHANGER AND HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> TRANSPORTER IN SALIVARY ACINAR CELLS

Dong-Bum Park, Jeong-Taeg Seo\*, Heung-Kyu Sohn, Jong Gap Lee

*Department of Pediatric Dentistry, Oral Science Research Center\*, Yonsei University*

Intracellular pH (pHi) plays an important role in the regulation of cellular processes by influencing the activity of various enzymes in cells. Therefore, almost every type of mammalian cell possesses an ability to regulate its pHi. One of the most prominent mechanisms in the regulation of pHi is Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger. This exchanger has been known to be activated when cells are stimulated by the binding of agonist to the muscarinic receptors. Therefore, the aims of this study were to compare the rates of H<sup>+</sup> extrusion through Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger before and during muscarinic stimulation and to investigate the possible existence of HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> transporter which is responsible for the continuous supply of HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> ion to saliva.

Acinar cells were isolated from the rat mandibular salivary glands and loaded with pH-sensitive fluoroprobe, 2',7'-bis(2-carboxyethyl)-5(6)-carboxyfluorescein(BCECF), for 30min at room temperature.

Cells were attached onto the coverglass in the perfusion chamber and the changes in pHi were measured on the inverted microscope using spectrofluorometer.

1. By switching the perfusate from HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-free to HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-buffered solution, pHi decreased by  $0.39 \pm 0.02$  pH units followed by a slow increase at an initial rate of  $0.04 \pm 0.007$  pH units/min. The rate of pHi increase was reduced to  $0.01 \pm 0.002$  pH units/min by the simultaneous addition of 1 mM amiloride and 100 $\mu$ M DIDS.
2. An addition and removal of NH<sub>4</sub><sup>+</sup> caused a decrease in pHi which was followed by an

increase in pHi. The increase of pHi was almost completely blocked by 1mM amiloride in HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-free perfusate which implied that the pHi increase was entirely dependent on the activation of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger in HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-free condition.

3. An addition of 10 $\mu$ M carbachol increased the initial rate of pHi recovery from 0.16  $\pm$  0.01 pH units/min to 0.28 $\pm$ 0.03pH units/min.
4. The initial rate of pHi decrease induced by 1mM amiloride was also increased by the exposure of the acinar cells to 10 $\mu$ M carbachol (0.06 $\pm$ 0.008pH unit/min) compared with that obtained before carbachol stimulation (0.03 $\pm$ 0.004pH unit/min).
5. The intracellular buffering capacity  $\beta$ <sub>i</sub> was 14.31 $\pm$ 1.82 at pHi 7.2-7.4 and  $\beta$ <sub>i</sub> increased as pHi decreased.
6. The rate of H<sup>+</sup> extrusion through Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger was greatly enhanced by the stimulation of the cells with 10 $\mu$ M carbachol and there was an alkaline shift in the activity of the exchanger.
7. An intrusion mechanism of HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> was identified in rat mandibular salivary acinar cells. Taken all together, I observed 3-fold increase in Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger by the stimulation of the acinar cells with 10 $\mu$ M carbachol at pH 7.25. In addition, I have found an additional mechanism for the regulation of pHi which transported HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> into the cells.

Key words : amiloride, cotransporter, DIDS, intracellular pH, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> BCECF, Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger, spectrofluorometer

## I. 서 론

타액선은 상피표면이 안쪽으로 함입되어 형성된 외분비기관으로서, 이곳에서 타액이 형성되어 구강내로 유리된다. 타액선은 타액을 형성하고 분비하는 선세포 그리고 결체조직, 혈관세포 및 신경세포들로 구성되어 있으나(Young and van Lennep<sup>20</sup>, 1978) 상피세포에서 유래한 선세포가 가장 많은 부분을 차지하고 있다. 선세포는 대개 원추형태의 모양을 갖는데 혈액과 접하는 부위인 기저막(basal membrane)은 넓고 타액선관과 접한 부위(apical membrane)는 좁고 뾰족하다.

타액선 선세포에서 형성되어 구강내로 유리되는 타액은 혈액으로부터 얻는 전해질과 물이 주성분이며 그외에 여러 가지 타액단백질과 효소, immunoglobulins, 성장인자(growth factors) 등을 포함하고 있다. 따라서 타액은 구강점막에 수분을 제공하여 마르지 않도록 함으로써 구강내 건강상태를 유지하는 가장 기본적인 역할 외에도 음식을

먹을 때와 말을 할 때 윤활작용을 하며 소화효소가 포함되어 있어 음식물의 소화를 돕는 역할을 할 뿐 아니라 항균, 항진균, 항바이러스 효과도 지니고 있다. 그러나 이 외에도 타액의 가장 중요한 역할 중의 하나는 구강내 pH를 적절하게 유지시켜 치아우식증 발생을 억제하는 것이라 할 수 있다.

치아 우식증은 궁극적으로 치아조직의 파괴를 야기시키는 감염성 질환으로서 세균, 음식물, 타액의 상호작용에 의해 유발되는데 세균 중에서도 *Streptococcus mutans*가 주 원인균이다.

*Streptococcus mutans*가 치아표면의 획득피막에 부착한 후 glucosyltransferase를 생성하면 이에 의해 자당(sucrose)으로부터 포도당 중합체인 비수용성 mutan과 수용성 dextran이 합성된다. Dextran은 주변 세균의 에너지원으로 이용되며 mutan은 치면에서 증식하는 세균과의 결합을 증가시킨다. 이렇게 하여 치면에 부착한 *Streptococcus mutans*가 여러 형태의 당으로부터 유기산을 형성함으로써 치대 내 pH를 5.5 이하로 감소시켜 치아의 탈회(demineral-

alization)를 야기한다. 결국 치아 우식증의 직접적인 원인은 치아 표면에서  $H^+$  이온 농도의 증가이며 따라서 치아 우식증 예방을 위해서는  $H^+$  이온의 발생을 효과적으로 억제하여야 한다. 이러한 맥락에서 타액 내에 고농도로 존재하는  $HCO_3^-$  이온은 치아표면에서 세균에 의해 생성되는  $H^+$ 에 대해 완충작용을 하여 치아우식증 예방에 매우 중요한 역할을 하지만 아직까지 이 이온의 타액선 선세포내로의 유입기전 및 세포 외 유출기전이 확실하게 밝혀져 있지 않다.

$HCO_3^-$  이온의 생성, 이동, 유출 과정은 타액선 선세포의 자극-분비 연결(stimulation-secretion coupling) 과정의 일환으로 파악해야 한다. 타액선 선세포에서의 타액 분비는 세포 표면에 존재하는 수용체에 효현제(agonist)가 결합함으로써 유발되는데, 포유동물의 경우 무스카린성 수용체,  $\alpha$ -아드레날린성 수용체,  $\beta$ -아드레날린성 수용체, substance P 수용체, VIP 수용체 등 다양한 수용체가 타액선 선세포 표면에 존재한다(Case 등<sup>51</sup>, 1986; Young 등<sup>52</sup>, 1987). 이들 수용체가 효현제와의 결합으로 활성화되면 세포질내  $Ca^{2+}$  이나 cAMP와 같은 세포내 전달물질의 농도가 증가되고 이로 인해 fluid나 단백질의 분비가 향진된다. 타액선 선세포에서 fluid 그리고  $HCO_3^-$  이온을 포함한 전해질의 분비는 주로 무스카린성 수용체 그리고  $\alpha$ -아드레날린성 수용체, substance P 수용체 자극으로 야기되는데 이들 수용체는 세포 내에서  $G_{\alpha}/G_{\beta\gamma}$ -protein, phospholipase C- $\beta$ 를 단계적으로 활성화시켜 세포막 구성성분인 phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate( $PIP_2$ )로부터 inositol 1,4,5-trisphosphate( $IP_3$ )를 형성하여 세포내  $Ca^{2+}$  농도를 증가시키는 일련의 세포내 신호전달체계를 거친다(Merritt과 Rink<sup>53</sup>, 1987; Berridge<sup>54</sup>, 1993).

구체적으로 타액선 선세포가 fluid를 유리하는 과정에는 세포막을 통한 이온과 물의 이동이 필요한데, 이에선 세포막에 있는 여러 가지 특수한 이동 단백질들(transporters)이 관여하고 있다(Turner<sup>50</sup>, 1993). 선세포가 타액을 생성하여 타액선관(salivary duct)으로 유리시키는데 가장 기본적인 장치는  $Na^+/K^+$  ATPase로서 이는  $Na^+$ 을 세포외부로 그리고  $K^+$ 을 세포내부로 이동시켜 줌으로써 세포 외에는  $Na^+$  농도를, 그리고 세포 내부에는  $K^+$  농

도를 높게 유지시키는 역할을 한다. 이와 같이 세포 외부의  $Na^+$  농도가 세포 내부의  $Na^+$  농도에 비하여 높게 유지되고  $K^+$  통로를 통한  $K^+$  유출로 세포 내부가 음으로 대전되면 세포 외부로부터 세포 내부 쪽으로  $Na^+$ 의 전기화학적 농도경사(electrochemical gradient)가 생기는데 이에 의해  $Na^+-K^+-2Cl^-$  cotransporter와  $Na^+/H^+$ ,  $Cl^-/HCO_3^-$  exchangers가 활성화되어 세포 내부에  $Cl^-$ 가 축적된다. 부교감신경 자극으로 세포 내  $Ca^{2+}$  농도가 증가하면 apical membrane에 있는  $Cl^-$  channel이 열리고 세포 내부에서 타액선관으로  $Cl^-$ 와 함께 많은 양의  $HCO_3^-$  이온도 타액선관 내로 유출되는 것이 밝혀져(Steward 등<sup>29</sup>, 1989; Lee와 Turner<sup>9</sup>, 1991),  $HCO_3^-$  이온 역시 타액선 선세포 내에 고농도로 축적되어 있음을 시사하고 있다.  $Cl^-$ 와  $HCO_3^-$  이온이 타액선관으로 유출되면  $Na^+$  이온이 세포 간극을 통해 타액선관 내 삼투압이 증가하면 혈액과 타액선 선세포 내부로부터 물이 이동함으로써 타액이 형성된다(Nauntofte<sup>15</sup>, 1992; Fig. 1). 즉 타액선 선세포내에 고농도로 축적되는  $Cl^-$ 와  $HCO_3^-$  이온이 부교감신경 자극시 유발되는 타액분비에 결정적인 역할을 한다.

위에서 살펴본 바와 같이  $HCO_3^-$  이온은 타액 분비과정에 관여하여 타액 형성을 도와주고 타액내 pH를 높여주는 역할을 할 뿐 아니라 세포 내 pH의 유지, 조절에 직접적으로 작용한다. 타액선 선세포를 비롯한 생체를 구성하는 모든 세포의 기능은 여러 효소의 활성화에 의존하는 바가 크며 또 이 효소들은 대개 단백질로서 그 입체구조 및 활성은 용액의  $H^+$  농도에 많은 영향을 받는다. 따라서 세포 내에서 산-염기의 평형이 깨지면 그로인해 효소활성이 조화롭게 이루어지지 못하고 결국 세포에 치명적인 결과를 야기할 수 있게 된다. 그러므로 세포는  $H^+$  농도 또는 pH 변동을 방지할 수 있는 완충제(buffer)로서  $HCO_3^-$ 를 가지고 있는데  $HCO_3^-$ 는 세포 내에서 carbonic anhydrase에 의해 다음과 같은 과정을 거쳐 생성되는 것으로 알려져 있다.



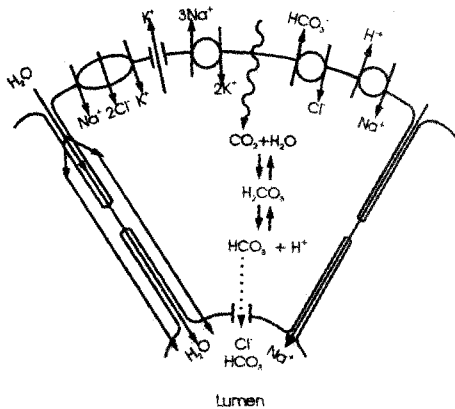


Fig. 1. Schematic model accounting for the process of electrolyte transport during secretion in salivary acinar cells.  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase maintains the inwardly directed driving force for  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  and  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  exchangers and  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - 2\text{Cl}^-$  cotransporter. Activation of these transporters causes  $\text{Cl}^-$  accumulation in the cells against its electrochemical gradient.  $\text{HCO}_3^-$  is produced by the action of carbonic anhydrase.  $\text{Cl}^-$  and  $\text{HCO}_3^-$  efflux into the lumen in response to muscarinic stimulation drives  $\text{Na}^+$  from the extracellular space into this compartment and water follows these electrolytes.

이 과정을 통해 생성되는  $\text{H}^+$ 는 세포막에 존재하는  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger에 의해 세포 외부로 유출되므로 세포 내에는  $\text{HCO}_3^-$  이온이 높은 농도로 축적된다. 사람의 타액선 선세포를 포함해 대부분 고등동물의 타액선 선세포에서는 위의 과정을 통한  $\text{HCO}_3^-$  생성과정 이외의 세포막 이동단백질을 통한  $\text{HCO}_3^-$  유입 과정은 밝혀진 바가 없다. 다만 최근에  $\text{HCO}_3^-$  이온을 다른 동물의 경우보다 훨씬 높은 농도(90-120 mM)로 유출시키는 양(sheep)의 이하선 선세포의 경우,  $\text{HCO}_3^-$ 를 세포 내로 유입시키는 이동단백질로서  $\text{Na}^+ - \text{HCO}_3^-$  cotransporter가 존재한다고 보고된 바 있다(Poronnik 등<sup>20</sup>, 1995). 그러나 비록 양의 타액선 선세포에서 유출되는  $\text{HCO}_3^-$  이온의 농도보다는 낮지만 사람을 비롯한 대부분 동물

의 경우에서도 carbonic anhydrase에 의한  $\text{HCO}_3^-$  이온의 생성과정 만으로는 타액 분비 자극시 고농도의  $\text{HCO}_3^-$  이온이 지속적으로 유출되는 것을 설명하기 어렵다. 특히 부교감신경 자극으로 타액분비가 향진될 때 세포 내 대사의 증가로 많은 양의  $\text{H}^+$  이온이 생성되고  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  exchangers를 통해  $\text{HCO}_3^-$  이온이 혈액으로 유출됨에도 불구하고 세포 내 pH가 감소하지 않고 오히려 증가하며(Okada 등<sup>17</sup>, 1991; Seo 등<sup>25</sup>, 1994) 타액내로  $\text{HCO}_3^-$  이온이 계속 유리되는 것은 세포 내로  $\text{HCO}_3^-$  이온을 유입시키는 또 다른 기전의 존재 가능성을 암시한다.

타액선 선세포 자극시 세포내 산생성 증가와  $\text{HCO}_3^-$  이온의 유리에도 불구하고 세포내 pH를 유지하여  $\text{HCO}_3^-$ 의 지속적인 유리를 도와주는 동시에 세포내 효소가 지속적으로 활성화되도록 하는데 필수적인 역할을 하는 세포막 이동단백질로서  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger가 있다.  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger는 세포내 항상성 조절 및 유지에 중요한 역할을 하는 세포막 단백질로서 거의 모든 고등동물의 세포에서 확인되었다.  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger는 세포내 pH 조절(Boron과 Boulpaep<sup>4</sup>, 1983; Sjaastad 등<sup>26</sup>, 1992), 세포용적조절(Grinstein과 Foskett<sup>8</sup>, 1990), 세포막을 통한  $\text{Na}^+$ 과  $\text{HCO}_3^-$  이온의 이동(Nauntofte<sup>15</sup>, 1992) 등에 관여한다고 알려져 있다. 고등동물의  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger는  $\text{Na}^+$  이온 한분자와  $\text{H}^+$  이온 한분자가 1:1로 교환되며 따라서 세포막 전위차의 변동을 초래하지 않는다.  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger는 세포내  $\text{H}^+$  이온의 농도가 증가하면 활성화 된다(Aronson 등<sup>11</sup>, 1982). 뿐만 아니라  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger는 여러 가지 외부자극에 의해서도 활성화되어 세포내 pH에 대한 감수성이 변한다(Moolenaar 등<sup>13</sup>, 1983; Grinstein과 Foskett<sup>8</sup>, 1990). 아직까지 정확한 세포내 기전은 알려져 있지 않으나 Protein kinase C(Grinstein 등<sup>7</sup>, 1985), cAMP(Borgese 등<sup>3</sup>, 1987), G-protein(Davis 등<sup>6</sup>, 1992),  $\text{Ca}^{2+}$  (Ober와 Pardee<sup>16</sup>, 1987) 등이 이 현상과 관련이 있을 것으로 생각되고 있다.

타액선 선세포에서도 타액분비를 유발하는 무스카린성 자극에 의해  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger가 활성화됨이 보고된 바 있다(Manganel과 Turner<sup>10</sup>, 1989; Okada 등<sup>17</sup>, 1991; Seo 등<sup>25</sup>, 1994). 타액선 선세포에서 무스카린성 자극이 세포내 어떤 과정을 거쳐

Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger를 활성화시키는지 아직까지도 정확히 밝혀져 있지 않으나 세포내 Ca<sup>2+</sup> 증가가 직접 Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger를 활성화시킨다는 보고(Manganel과 Turner<sup>11)</sup>, 1990)와 세포의 용적 감소가 관여한다는 보고(Okada 등<sup>17)</sup>, 1991) 그리고 여러 가지 요인이 복합적으로 관여한다는 보고 등이 있다(Seo 등<sup>20)</sup>, 1995). 타액선 선세포의 무스카린성 자극에 의해 Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger가 활성화될 때 실제로 어느정도로 활성화되는지 아직까지 보고되어 있지 않다. 타액선 선세포가 자극을 받으면 세포내 산 발생이 증가하기 때문에 단순히 세포내 pH 변화만 가지고는 Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger를 통한 실제 H<sup>+</sup> 이온의 이동 속도를 알 수 없다.

특히 세포내에는 H<sup>+</sup> 이온에 대한 완충능력을 가지고 있기 때문에 이 완충능을 알아내야만 Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger의 활성화 정도를 알 수 있다.

그러므로 본 연구의 목적은 첫째, 타액선 선세포내 pH 조절과 타액의 생성 및 유리에 필수적인 역할을 하는 Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger가 타액을 분비하는 동안 얼마나 활성화 되는지 살펴보고 둘째, 타액분비항진시 타액내 고농도로 축적되어 타액내 pH를 증가시켜줌으로써 치아우식증 예방과 구강청결에 큰 영향을 미치는 HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 이온의 새로운 세포내 유입경로의 존재유무를 확인하는 것이다.

## II. 실험 재료 및 방법

### 1. 실험 재료

실험 동물로 체중 200-300g의 Sprague-Dawley 계 수컷 흰쥐를 사용하였다. Bovine serum albumin (BSA), modified Eagle's medium(MEM) amino acids, dimethyl sulfoxide(DMSO), amiloride, 4,4'-diisothiocyanato-stilbene-2,2'-disulphonic acid(DIDS), nigericin, carbachol, N-methyl-D-glucamine (NMDG), glutamine, collagenase(type IV) 등은 sigma에서 구입하였으며 2',7'-bis(2-carboxyethyl)-5(6)-carboxyfluorescein(BCECF)의 acetoxymethyl ester(BCECF/AM)는 Molecular Probe에서 구입하였다. Nigericin은 20mM stock으로 ethanol에 녹여 보관하였다.

흰쥐 악하선에서 acini를 분리하는데 사용하는 BSA를 포함하고 있는 HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-free 용액은 NaCl 130

mM, KCl 4.5mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.0mM, MgSO<sub>4</sub> 1.0 mM, HEPES-Na 10mM, D-glucose 10mM, glutamine 2mM, MEM amino acid(×1) 그리고 1% BSA를 포함하였다. HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>를 포함하고 있는 표준 용액은 NaCl 110mM, KCl 4.5mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.0 mM, MgSO<sub>4</sub> 1.0mM, CaCl<sub>2</sub> 1.5mM, HEPES-Na 5 mM, HEPES 5mM, NaHCO<sub>3</sub> 25mM, D-glucose 10 mM을 포함하였으며 HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>를 포함하지 않는 용액은 NaCl 127.5mM, KCl 4.5mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.0 mM, MgSO<sub>4</sub> 1.0mM, CaCl<sub>2</sub> 1.5mM, HEPES-Na 10 mM, HEPES 10mM, D-glucose 10mM을 포함하였다. Na<sup>+</sup>을 제거한 용액을 만들 때에는 Na<sup>+</sup> 대신에 세포막을 통과하지 못하는 이온인 NMDG<sup>+</sup>로 대체하여 사용하였으며 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>를 첨가할 때에는 동일한 농도의 Na<sup>+</sup>을 용액에서 제거하여 용액의 삼투압에 변동이 없도록 하였다.

### 2. 실험 방법

#### 가. 악하선의 acini 분리

200-300g의 Sprague-Dawley 계 수컷 흰쥐를 희생시킨 후 즉시 양쪽 악하선을 적출하여 산소로 포화시키고 미리 냉각시킨 BSA를 포함하고 있는 HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> free 용액에 넣고 가능한 한 빠른 시간 내에 결체조직, 임파선 및 악하선 표면에 붙어 있는 설하선(sublingual gland)을 제거하였다. 악하선을 잘게 썰어 미세절편을 만든 후 실리콘을 도포한 시험관(siliconized flask)에 넣었다. 60U/ml의 collagenase를 포함하고 있는 15ml의 용액을 이 시험관에 넣고 계속해서 100% 산소를 공급하면서 37°C로 유지하고 있는 shaking water bath 속에서 일정한 속도로 흔들며 주면서 1시간 동안 배양하였다. 이 기간 중에 2-3회 5ml pipette을 이용하여 조직절편의 분리를 기계적으로 도와주었다.

배양이 끝나면 조직절편을 collagenase를 포함하지 않은 용액으로 3회 씻어준 후 5ml pipette으로 조직절편을 다시 한번 분리하고 nylon mesh를 통과해 나온 세포들을 원심 분리하였다. 이 과정을 3회 반복하여 얻어진 세포들을 3ml의 용액에 넣고 계속해서 산소를 공급하였다. Fig. 2는 이 과정을 거쳐 얻은 흰쥐 악하선의 acini를 보여주는 사진이다.

#### 나. 세포 내 BCECF 측정

세포 내 pH를 측정하기 위하여 사용하는 염색

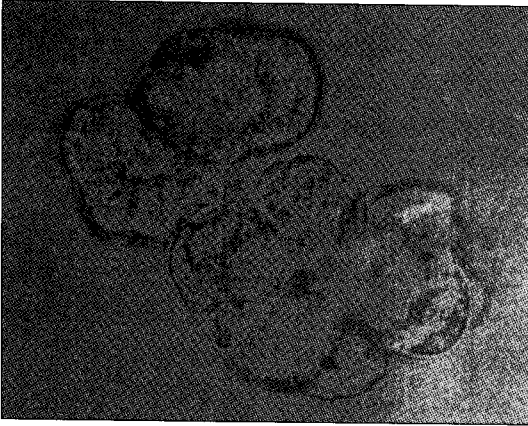


Fig. 2. A photograph of acini isolated from rat mandibular salivary gland.

물질인 BCECF/AM을 농도가 1mM이 되도록 DMSO에 녹여 stock solution을 만든 후 3ml의 세포를 포함하고 있는 용액에 최종 농도가 1M이 되도록 BCECF를 넣고 실온에서 30분 동안 산소를 제공하면서 기다렸다. BCECF의 세포 내 축적이 끝나면 100% O<sub>2</sub>로 포화시킨 BSA와 HCO<sub>3</sub>를 포함하지 않은 표준용액으로 두 번 원심 분리하여 세포를 씻고 얻어진 세포들을 3ml의 용액에 넣어 얼

음 속에서 보관하였다.

#### 다. 세포 내 pH의 측정

세포 내 pH를 측정하기 위하여 30~40μ의 세포를 포함한 용액을 perfusion chamber 내 glass coverslip 위에 올려 놓고 세포가 부착될 때까지 약 2~3분 기다렸다. 세포가 coverslip에 부착되면 spectrofluorometer와 연결된 현미경 위에 고정시키고 분당 2ml의 속도로 용액을 관류하면서 20~30분간 세포가 새로운 환경에 적응하도록 기다린 후 필요한 실험을 시작하였다. 실험 중 관류 용액 내에 100% O<sub>2</sub>를 계속해서 제공하고 관류액의 온도를 일정하게 유지하기 위하여 관류관 (perfusion line) 주위로 37°C의 물이 순환되도록 water jacket을 설치해 주었다. 관류관은 BCECF를 비롯한 소수성 (hydrophobic)인 약물이 결합되는 것을 방지하기 위하여 TFE 관을 사용하였다.

Spectrofluorometer를 이용하여 세포 내 pH를 측정할 때 (Fig. 3) Xenon lamp에서 나오는 빛의 excitation wavelength는 컴퓨터를 이용하여 490 nm와 440 nm가 반복되도록 해주고 emission wavelength는 526 nm가 되도록 하였다. 세포 내 pH는 이 두 파장의 비율(F<sub>490</sub>/F<sub>440</sub>)로부터 구하였다.

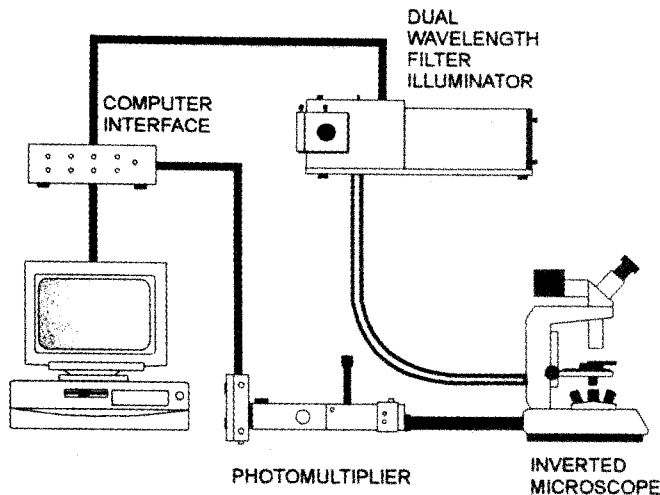


Fig. 3. Schematic diagram of the system for the measurement of pHi in the isolated acini. BCECF fluorescence from the acini was measured at 526 nm while the excitation wavelength was alternated between 490 and 440 nm. System management and data acquisition were controlled by a personal computer.

#### 라. pH calibration

세포 내 실제 pH 값은 high-K<sup>+</sup>/nigericin 기법을 사용하여 490nm와 440nm의 비율로부터 구하였다 (Thomas 등<sup>20</sup>, 1979). High-K<sup>+</sup>/nigericin 용액은 10 μM의 nigericin과 KCl 136mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1mM, MgSO<sub>4</sub> 1mM, CaCl<sub>2</sub> 0.5mM, HEPES 10mM, Na-HEPES 10mM, D-glucose 5mM을 포함한다. 위 용액을 1M HCl과 1M KOH를 사용하여 pH 6.6-7.8 범위 내에서 3-4가지 용액을 만든 후 단계적으로 관류하면서 F<sub>490</sub>/F<sub>440</sub> 값과 pH 값 사이의 관계식을 구하였다. 즉, 타액선 선세포 내 K<sup>+</sup> 및 Na<sup>+</sup> 농도와 같도록 high-K<sup>+</sup> 용액을 만들고 세포막에 K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger를 형성시키는 약물인 nigericin을 투여함으로써 세포 내부의 pH가 빠르게 세포 외부의 pH와 같아지도록 유도하였다. Nigericin은 관류관에 강하게 결합하여 잘 씻기지 않기 때문에 실험 중 천천히 유리되어 세포막에 K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger를 형성하여 잘못된 결과를 보일 수도 있기 때문에 calibration을 위한 관류관은 본 실험을 위한 관류관과 분리해서 사용하였다 (Richmond와 Vaughan-Jones<sup>21</sup>, 1993).

Fig. 4는 High-K<sup>+</sup>/nigericin 기법을 이용하여 F<sub>490</sub>/F<sub>440</sub> 값과 세포내 pH 값 사이의 관계식을 구한 결과로서 관류액의 pH를 단계적으로 변화시켜 줄

때 F<sub>490</sub>/F<sub>440</sub> 값이 따라서 빠르게 변화하는 것을 알 수 있으며 이때 얻은 F<sub>490</sub>/F<sub>440</sub> 값과 관류액의 pH 사이에서 1차 방정식을 유도하여 세포내 pH 값을 구한다.

#### 3. 실험자료의 분석

실험 결과 얻은 세포내 pH 값은 평균±표준오차로 표시하였으며 각 값 사이의 차이는 Student's t-test를 실시하여 p 값이 0.05 이하일 때를 통계적으로 유의한 차이로 판정하였다.

### III. 실험 결과

#### 1. HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>/CO<sub>2</sub> 투여에 의한 세포내 pH 변화

HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>가 포함되어 있지 않은 용액으로 세포를 관류하다가 25mM HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>를 포함하고 95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>가 지속적으로 공급되는 용액으로 바꾸어 관류하면 Fig. 5A에서 보는 바와같이 세포내 pH가 즉각적으로 0.39±0.02 pH unit 감소한다. 이는 세포막을 자유롭게 통과하는 CO<sub>2</sub>가 세포내로 들어가서 세포막에 존재하는 carbonic anhydrase에 의해 CO<sub>2</sub>+H<sub>2</sub>O→H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>→HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>+H<sup>+</sup>로 변화면서 H<sup>+</sup> 이온을 생성하기 때문이다. 이와 같이 세포내

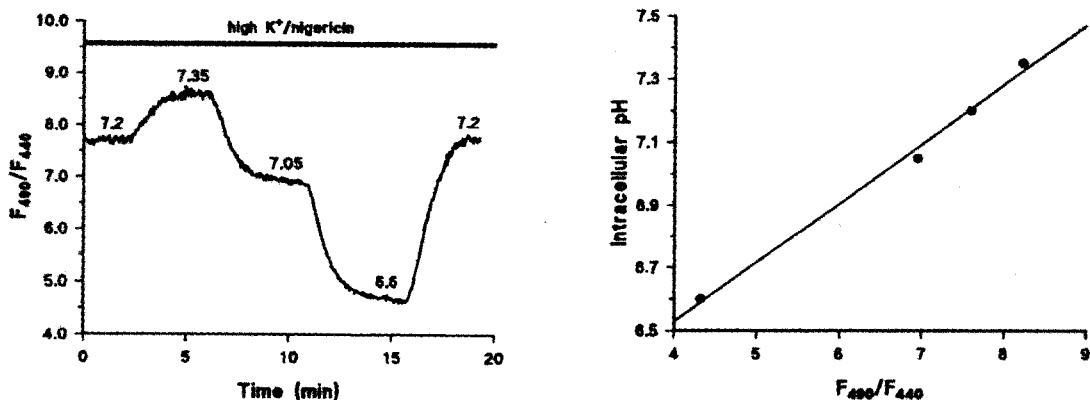


Fig. 4. Calibration of BCECF fluorescence as a function of intracellular pH (pHi). Acini were perfused with a high-K<sup>+</sup> solution containing 10 μM nigericin. Perfusate pH was stepped between the values shown (upper panel) and the intracellular pH plotted against the fluorescence ratio (lower panel).

pH가 감소하면 pH는 다시 천천히 증가하는데 흰 쥐 약하선의 경우에는  $\text{HCO}_3^-$ 가 존재하는 관류액에서 세포내 pH가  $\text{HCO}_3^-$ 가 포함되어 있지 않은 관류액에서의 세포내 pH보다 현저하게 낮아 세포내 pH 증가속도가  $0.04 \pm 0.007 \text{ pH unit/min}$ 이었다. 또한 세포내 pH를 증가시키는 기전 중에서 중요한 역할을 할 것으로 생각되는  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger와 혹시 있을지도 모르는 세포내로의  $\text{HCO}_3^-$  이동단백질을 봉쇄한 후 같은 실험을 한 경우 세포내 pH 증가속도가  $0.01 \pm 0.002 \text{ pH unit/min}$ 으로 감소하였으나(Fig. 5B) 세포내 pH를 조절하는 세포막 이동단백질의 조절기전을 연구하기에는 차이가 너무 작아서 pH 변화속도가 좀더 클 것으로 생각되는  $\text{NH}_4^+$  pulse 방법을 사용하기로 하였다.

## 2. $\text{NH}_4^+$ 투여에 의한 세포내 pH 변화

Fig. 6A에서 보는 바와 같이 관류액에  $\text{NH}_4^+$ 를 넣어 주었다가 제거하면 세포내 pH가 감소하지만 세포내 pH는 곧 다시 증가하는데 이때 pH 증가속도는  $0.16 \pm 0.01 \text{ pH unit/min}$ 으로서  $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$  투여 방법에 비해 증가속도가 컸다. 세포내 pH가 정상상태로 돌아온 후 다시  $\text{NH}_4^+$ 를 관류액에 첨가하였다가 제거하는데 이때  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger의 봉쇄제인 1mM amiloride를 투여하면 세포내 pH 증가

$0.01 \pm 0.001 \text{ pH unit/min}$ 으로 크게 감소하여 관류액에  $\text{HCO}_3^-$ 가 없는 상태에서는 세포내 pH 조절에  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger가 절대적인 역할을 함을 알 수 있다.

한편, 위와 같은 실험을 25mM  $\text{HCO}_3^-$ 가 함유되어 있는 용액을 관류하면서 행한 경우(Fig. 6B) 1 mM amiloride를 투여한 후 세포내 pH 증가속도가  $0.04 \pm 0.006 \text{ pH unit/min}$ 으로  $\text{HCO}_3^-$ 가 포함되지 않은 경우에 비해 빠르게 증가하여  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger 외에도  $\text{HCO}_3^-$ 를 세포내로 유입시키는 기전이 있을 것으로 생각된다.

## 3. 타액분비를 야기하는 carbachol이 $\text{Na}^+/\text{H}^+$ exchanger의 활성화에 미치는 영향

세포를  $\text{HCO}_3^-$ 가 포함되어 있지 않은 용액으로 관류하면서  $\text{NH}_4^+$ 를 넣었다가 제거하여 세포내 pH 변화를 관찰한 후 세포내 pH가  $\text{NH}_4^+$ 를 넣기 전 상태로 돌아왔을 때 무스카린성 수용체 자극약물인 carbachol(CCh) 10 $\mu\text{M}$ 을 투여하였다(Fig. 7). CCh 투여로 세포내 pH가 약간 감소하였다가 곧 증가하여 CCh 투여 전 pH 값보다  $0.09 \pm 0.01 \text{ pH unit}$  증가한 값을 유지하였다. CCh를 투여하고 5분 후에  $\text{NH}_4^+$ 를 투여하면 세포내 pH가 증가하였다가 감소하는데 이때 pH 감소속도가 CCh를 투여하지

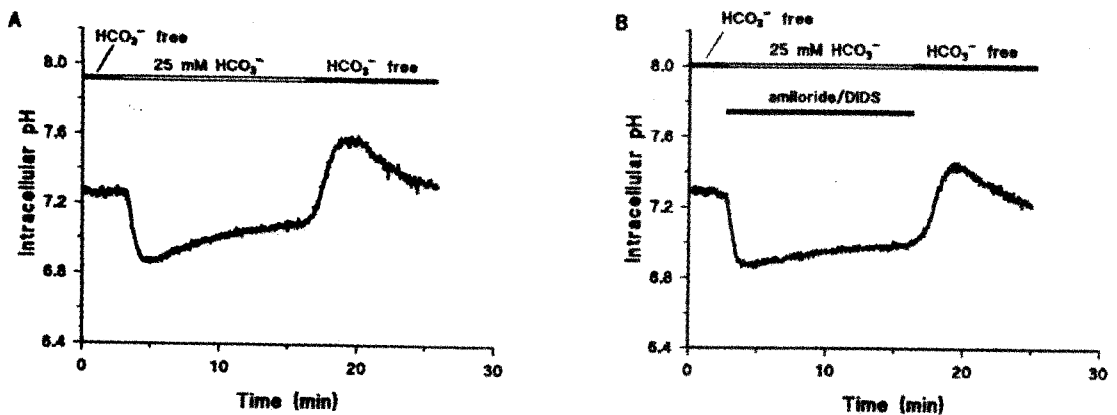


Fig. 5. Changes in  $\text{pH}_i$  by switching the perfusate from  $\text{HCO}_3^-$ -free to 25 mM  $\text{HCO}_3^-$ -buffered solution without (A) and with (B) the application of 1 mM amiloride and 100 $\mu\text{M}$  DIDS. The period of perfusion with 25 mM  $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$  solution is indicated by the solid bar at the top of each panel. Each panel is a single experiment and is representative of 4 experiments.



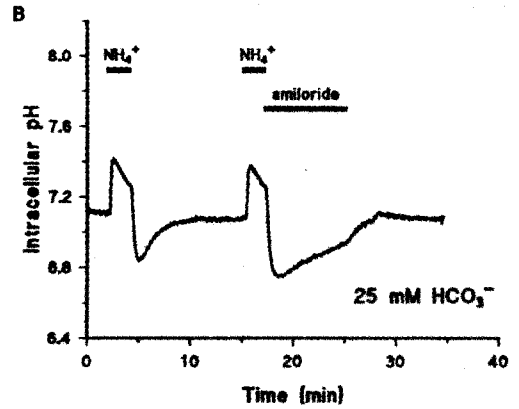
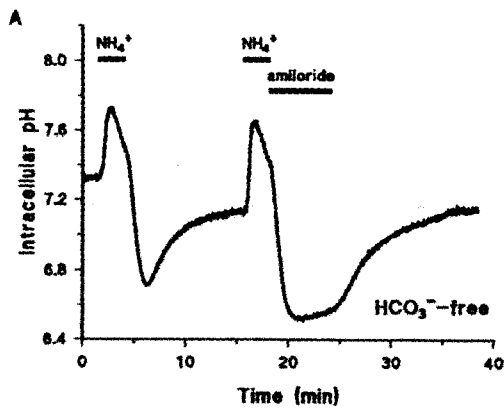


Fig. 6. Changes in pHi in response to 20 mM NH<sub>4</sub>Cl pulses: A, in HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-free solution and B, in 25 mM HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-buffered solution. Note the incomplete inhibition of the recovery from an acid loading by 1 mM amiloride shown in B.

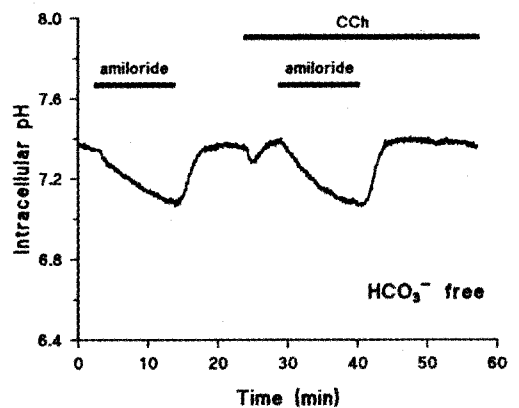
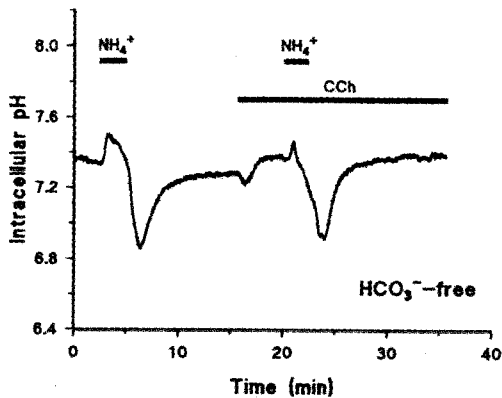


Fig. 7. Recovery from acid loading following a 2.5 min pulse of 20 mM NH<sub>4</sub>Cl under control condition and during carbachol stimulation.

Fig. 8. Activity of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger before and during carbachol stimulation. The rate of change of intracellular pH was examined when 1 mM amiloride was applied.

않은 상태에서 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>를 투여했을 때 보다 빨랐다 (0.15±0.02pH unit/min 과 0.07±0.01pH unit/min, p<0.05). 이는 CCh 투여로 인해 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup> co-transporter가 활성화되어 이 transporter를 타고 들어오는 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>의 유입속도가 증가되었기 때문일 것으로 생각된다. 관류액에서 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>를 제거하여 세포내 pH를 감소시키면 곧 세포내 pH가 증가하는데 이때 세포내 pH 증가속도는 0.28±0.03pH

unit/min으로서 CCh를 투여하지 않은 상태에서의 pH 증가속도와 비교할 때 증가속도가 증가하였음을 알 수 있다.

그러나 CCh를 투여했을 경우에는 세포내 H<sup>+</sup> 이온의 생성으로 인해 같은 속도로 세포내 pH가 증가하였다고 하더라도 실제 Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger의 활성화 정도는 CCh를 투여하지 않았을 때보다 CCh를 투여했을 때 더욱 클 것으로 예상할 수 있

다. 따라서 CCh를 투여하지 않았을 때와 투여했을 때  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger의 활성화 정도를 비교하기 위하여 amiloride를 투여한 후 세포내 pH 감소속도를 비교하였다. Fig. 8에서 보는 바와 같이 CCh를 투여하지 않은 상태에서의 amiloride에 의한 pH 감소속도는  $0.03 \pm 0.004 \text{ pH unit/min}$ 이었으며 CCh를 투여했을 때의 pH 감소속도는  $0.06 \pm 0.008 \text{ pH unit/min}$ 으로서 실제로  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger가 CCh를 투여했을 때 훨씬 활성화 정도가 큼을 확인할 수 있었으며 실제  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger의 활성화 속도는 각 pH 값에서  $\text{NH}_4^+$ 를 넣었다가 빼준 후 관찰되는 pH 증가속도와 amiloride의 투여로 인한 세포내 pH 감소속도의 합에 해당한다.

#### 4. $\text{H}^+$ 이온에 대한 세포내 완충능(buffering capacity)의 측정

$\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger의 활성화 정도는 정확하게 표시할 때 pH의 변화속도 보다는  $\text{H}^+$  이온의 이동속도로 표시해야 하며 이를 위해서는  $\text{H}^+$  이온에 대

한 세포내 완충능을 측정해야 한다. 세포내  $\text{H}^+$  이온에 대한 완충능  $\beta_i$ 는  $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ 의 투여와 제거로 인한 세포내 pH 변화값으로부터 계산할 수 있다 (Fig. 9).  $\text{HCO}_3^-$ 를 포함하지 않은 관류액에서  $\text{Na}^+$  이온을 제거하고 대신에 세포막을 통과하지 못하는 이온인 N-methyl-D-glucamine(NMDG)를 넣어 주어 세포내 pH를 낮추어 주고  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger를 봉쇄한 후  $\text{NH}_4^+\text{Cl}$ 을 40, 20, 10, 5, 2.5, 0 mM 순으로 투여한다. 이때 세포내  $\text{H}^+$  이온에 대한 완충능  $\beta_i$ 는 각 pH 값 변화의 중간값에서

$$\beta_i = \Delta[\text{NH}_4^+]_i / \Delta \text{pHi}$$

의 공식으로 구할 수 있으며 이때 얻은  $\beta_i$  값을 세포내 pH 변화속도에 곱하여  $\text{H}^+$  이온의 세포막을 통한 이동속도로 환산할 수 있다.

Fig. 10에서 보는 바와 같이  $\text{HCO}_3^-$ 를 포함하지 않은 관류액에서 완충능  $\beta_i$ 는 pH 값이 7.4일 때  $14.04 \pm 2.00$ , pH 값이 7.3일 때  $14.31 \pm 1.82$ , pH 값이 7.2

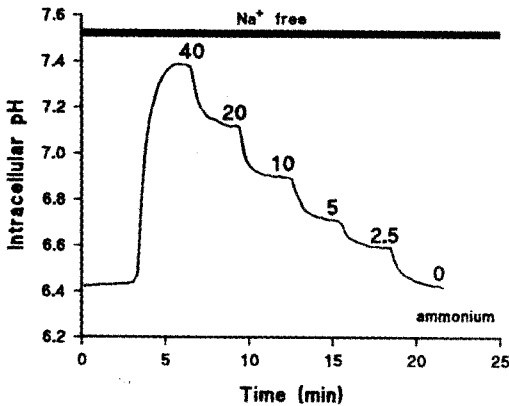


Fig. 9. Measurement of intracellular buffering capacity. Changes in  $\text{pHi}$  induced by step changes in  $\text{NH}_4^+\text{Cl}$  concentration during perfusion with a  $\text{Na}^+$ -free solution.

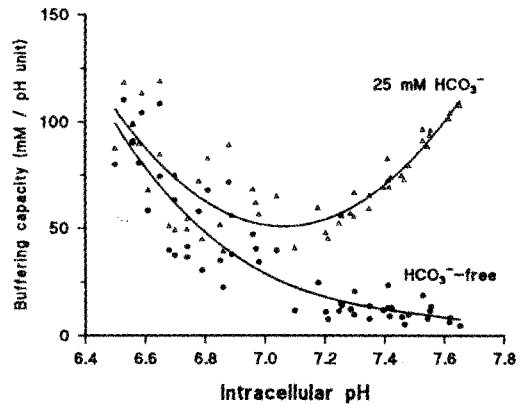


Fig. 10. Buffering capacity data ( $\beta_i$ ) calculated from  $\text{pHi}$  changes induced by  $\text{NH}_4^+\text{Cl}$  in  $\text{HCO}_3^-$ -free solution (closed circles). Buffering capacity values in 25 mM  $\text{HCO}_3^-$ -buffered solution were calculated using the following expression :  $\beta_i + 2.302X[\text{HCO}_3^-]$  where  $[\text{HCO}_3^-]$  represented the  $\text{HCO}_3^-$  concentration in cells. Data are fitted with third-order polynomial functions.

일 때  $16.78 \pm 3.77$ , 7.1일 때  $28.38 \pm 2.96$ , 7.0일 때  $37.41 \pm 2.63$ , 6.9일 때  $41.71 \pm 10.46$ , 6.8일 때  $52.09 \pm 11.12$ , 6.7일 때  $54.51 \pm 11.54$ , 6.6일 때,  $83.18 \pm 6.48$ 으로서 세포내 pH 값이 낮아질수록 완충능  $\beta$ 은 커진다.  $\text{HCO}_3^-$ 를 포함하고 있는 용액에서의 완충능  $\beta[\text{HCO}_3^-]$ 은

$$= \beta + 2.302 \times [\text{HCO}_3^-]$$

의 공식을 이용하여 얻는다. 이때  $[\text{HCO}_3^-]$ 는 세포내  $\text{HCO}_3^-$ 의 농도로서 세포외부에 첨가한 25mM  $\text{HCO}_3^-$ 을 Henderson-Hasselbach의 공식을 이용하여 얻는다.

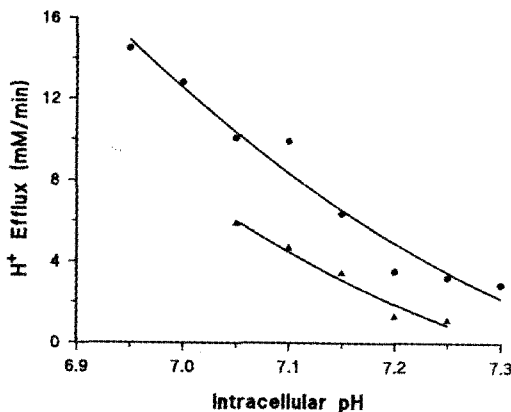


Fig. 11. Calculated  $\text{H}^+$  efflux plotted as a function of  $\text{pH}_i$  following acid loading with an  $\text{NH}_4\text{Cl}$  pulse before (closed triangle) and during (closed circle) carbanchol stimulation. Rates of recovery of  $\text{pH}_i$  were calculated at intervals of 0.05 pH units from the individual experiments shown in Fig. 7. The rates of  $\text{H}^+$  loading calculated from the experiments shown in Fig. 8 were added to the rate of recovery of  $\text{pH}_i$  to produce the rates of activation of  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger. The rates of activation of  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger were multiplied by the corresponding values of the intracellular buffering capacity.

### 5. $\text{Na}^+/\text{H}^+$ exchanger를 통한 $\text{H}^+$ 이온의 유출속도

$\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger를 통한  $\text{H}^+$  이온의 유출속도는  $\text{NH}_4^+$  투여와 제거로 얻은 세포내 pH의 증가속도와 amiloride의 투여로 얻은 세포내 pH의 감소속도의 합 그리고 세포내  $\text{H}^+$  이온에 대한 완충능을 이용하여 계산하였다.  $\text{H}^+$  이온의 유출속도는 CCh 투여 전에는 pH 7.25일 때 1.12, 7.2일 때 1.3, 7.15일 때, 3.42, 7.1일 때 4.65, 7.05일 때 5.85이었으며, CCh 투여시에는 pH 7.25일 때 3.21, 7.2일 때 3.52, 7.15일 때, 6.36, 7.1일 때 9.9, 7.05일 때 10.07, 7.0일 때 12.08, 6.95일 때 14.5이었다 (Fig. 11).

### 6. 세포막 단백질을 통한 $\text{HCO}_3^-$ 이온의 유입

흰쥐 악하선 선세포에서 carbonic anhydrase의 작용으로 인한  $\text{HCO}_3^-$  생성과정 이외에  $\text{HCO}_3^-$ 를 유입시키는 또다른 과정이 있는지를 확인하기 위하여  $\text{NH}_4^+$  pulse 방법과 amiloride를 이용하여 세포내 pH를 최대 감소시킨 후에  $\text{HCO}_3^-$ 를 포함하지 않은 용액으로 세포를 관류하다가  $\text{HCO}_3^-$ 를 첨가하여 세포내 pH가 증가하는지 살펴보았다(Fig. 12). 세포내 pH를 감소시키면 carbonic anhydrase에 의한  $\text{HCO}_3^-$ 와  $\text{H}^+$  이온의 생성이 현저히 줄어들기 때문에  $\text{HCO}_3^-$ 첨가시 나타나는 세포내 pH 감소가 줄어들고 그림 5에서와 같은  $\text{HCO}_3^-$ 포함 용액과  $\text{HCO}_3^-$ 불포함 용액간의 세포내 pH 격차도 없었으므로 세

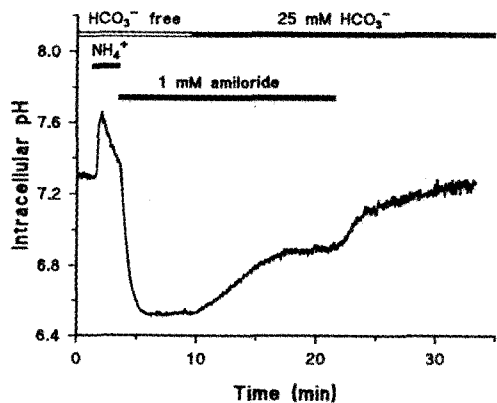


Fig. 12. Influx of  $\text{HCO}_3^-$  through a transporter in mandibular acinar cells.

포막을 통한  $\text{HCO}_3^-$  이온의 유입여부를 확인할 수 있다.

$\text{HCO}_3^-$ 가 포함되어 있지 않은 용액으로 세포를 관류하다가  $\text{NH}_4^+$ 를 첨가한 후 제거하는 동시에 1 mM amiloride를 첨가하면 세포내 pH가  $6.61 \pm 0.04$  pH unit으로 감소를 하였다. 세포내 pH가 안정화된 후 1mM amiloride를 첨가한  $\text{HCO}_3^-$ 포함 용액으로 관류하면 세포내 pH가  $0.08 \pm 0.01$  pH unit/min의 속도로 증가하여 pH  $6.93 \pm 0.05$  unit에서 평형상태에 도달한다. 이때 관류액에서 amiloride를 제거하면 실험전 상태로 pH가 환원된다. 따라서 본 실험을 통해 흰쥐 타액선 전세포에도  $\text{HCO}_3^-$ 를 유입시키는 별도의 기전이 있음을 발견하였다.

#### IV. 고 찰

거의 모든 고등동물의 세포는 세포내 pH를 조절할 수 있는 능력을 가지고 있다. 세포내 pH 조절은 세포가 살아가기 위하여 그리고 자기의 고유한 기능을 수행하기 위하여 필수적으로 이루어져야 하는 과정이다. 따라서 세포가 어떤 방법으로 세포내 pH를 조절하는지, 세포내 pH를 조절하는데 관여하는 이동단백질들은 어떤 것들이 있으며 이들은 또 어떻게 조절되는지 그리고 세포내 pH를 어떻게 정확하게 측정할 것인지 하는 것들이 오래 전부터 관심의 대상이 되어 왔다.

세포내 pH를 측정하기 위하여 여러 가지 방법이 소개되었다. pH를 측정할 수 있는 미세전극을 세포내에 삽입하여 세포내 pH를 측정하는 방법(Saito 등<sup>20</sup>, 1988), 핵자기공명(nuclear magnetic resonance, NMR)을 사용하는 방법(Moon과 Richards<sup>10</sup>, 1973), 동위원소를 표시시킨 약산성 물질을 사용하는 방법(Pirani 등<sup>19</sup>, 1987) 그리고 세포내로 pH에 민감하게 반응하는 형광물질을 넣고 spectrofluorometer를 이용하여 측정하는 방법(Rink 등<sup>22</sup>, 1982; Tsien<sup>29</sup>, 1989) 등이 있다. 특히 이들 방법 중에서 형광물질을 사용하는 방법이 가장 보편적으로 사용되고 있는데 이는 단 한 개의 세포에서도 정확하게 pH를 측정할 수 있고 세포내 pH 변화를 연속적으로 빠르게 측정할 수 있는 장점이 있기 때문이다. 따라서 본 학위논문의 실험을 진행하는 전 과정에서 세포내 pH를 측정하기 위

하여 흰쥐 악하선을 분리하여 pH 변화에 민감하게 반응하는 형광물질인 BCECF/AM을 사용하여 세포내에 BCECF가 축적되도록 하였다.

타액선 전세포의 세포내 pH는 7.2-7.4를 유지하고 있으며(Steward 등<sup>27</sup>, 1989; Okada 등<sup>17</sup>, 1991; Seo 등<sup>26</sup>, 1994) 이는 세포내  $\text{H}^+$  이온의 생성 및 세포내로의  $\text{H}^+$  유입과 세포막  $\text{H}^+$  이동단백질을 통한  $\text{H}^+$  이온의 유출이 평형을 이룬 지점이다. 타액선 전세포에서 세포내 pH에 관여하는 기전으로는 세포막을 통해 세포내로 확산되어 들어온  $\text{CO}_2$ 가 carbonic anhydrase에 의해  $\text{H}^+$  이온과  $\text{HCO}_3^-$ 이온이 생성되는 과정, 세포내에서 대사산물로서  $\text{H}^+$  이온이 생성되는 과정,  $\text{HCO}_3^-$  이온이 apical membrane을 통해 빠져 나가는 과정, 세포막의  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger에 의해  $\text{H}^+$  이온이 유출되는 과정, 세포막의  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  exchanger에 의해  $\text{HCO}_3^-$  이온의 유출되는 과정 등을 들 수 있다.

이 중에서 실제로 세포내 pH를 올려주는 역할을 하는 과정은  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger로서 특히 세포가 자극되어 타액분비가 항진될 때 급격히 증가하는  $\text{H}^+$  이온의 생성 및  $\text{HCO}_3^-$  이온의 세포외 유출에 대하여 세포내 pH를 유지하기 위하여  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger가 얼마나 활성화되어야 하는지 알아보았다.

$\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger의 활성도를 알아보기 위하여 우선 세포내 pH를 인위적으로 낮추어 주어야 하는데 세포내 pH를 인위적으로 감소시키는 방법으로 세포내로  $\text{H}^+$  이온을 직접 주입하는 방법이 있으나 세포막에 손상을 줄 가능성이 매우 크므로 간접적으로 세포내 pH를 감소시키는 방법을 사용하였다. 세포내 pH를 세포막 손상없이 감소시키는 방법으로 1) 세포를  $\text{HCO}_3^-$ 가 포함되어 있지 않고 100% 산소를 제공하여준 용액으로 관류시키다가 25 mM의  $\text{HCO}_3^-$ 를 포함하며 95%  $\text{O}_2$ / 5%  $\text{CO}_2$ 를 제공하여준 용액으로 관류시키는 방법, 2) 관류액에  $\text{NH}_4^+$ 과 같은 이온을 첨가하여 세포내 pH를 증가시킨 후  $\text{NH}_4^+$  이온을 제거하여 세포내 pH를 감소시키는 방법, 3)  $\text{CH}_3\text{COO}^-$ 와 같은 이온을 첨가하여 세포내 pH를 감소시키는 방법 등을 사용할 수 있다. 이 중 가장 세포에 손상을 주지않으면서 세포내 pH를 감소시킬 수 있는 방법은  $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$ 를 제공하는 방법이다.

이 방법은 세포에 손상을 주지 않고 가장 생리적인 상태로 세포내 pH를 낮추어주는 장점이 있으나 본 실험에서 사용한 흰쥐 악하선 선세포의 경우  $\text{HCO}_3^-$ 를 포함한 관류액을 사용했을 때 세포내 pH가  $\text{HCO}_3^-$ 를 포함하지 않은 관류액을 사용했을 때 측정된 세포내 pH 보다 낮아서 실제로 세포내 pH를 감소시킨 후  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger의 활성도를 연구하기에 적합하지 않다. 따라서 세포내 pH를 좀 더 많이 감소시킬 수 있고  $\text{HCO}_3^-$ 가 포함되어 있지 않은 용액에서도 실험이 가능한  $\text{NH}_4^+$  pulse 기법을 사용하여 세포내 pH를 감소시켰다.

세포외부에  $\text{NH}_4\text{Cl}$ 을 투여하면 용액내에서  $\text{NH}_4^+$ 와  $\text{Cl}^-$ 로 해리되고  $\text{NH}_4^+$ 는  $\text{NH}_4^+$  형태와  $\text{NH}_3$  형태로 존재하게 되는데  $\text{NH}_3$ 가 세포막을 자유롭게 통과할 수 있으므로 세포내로 유입되어 일부는 세포내의  $\text{H}^+$  이온과 결합하여  $\text{NH}_4^+$ 가 생성된다. 이러한 일련의 과정을 통해 세포내 유리 수소이온농도가 감소하므로 세포내 pH가 빠르게 증가한다. 세포내 pH가 증가한 후 시간이 경과함에 따라 세포내 pH가 점차 감소하는데 이는  $\text{NH}_4^+$  이온이  $\text{Na}^+/\text{K}^+-2\text{Cl}^-$  cotransporter를 타고 세포내로 들어오기 때문인 것으로 생각하고 있다 (Paulais와 Turner<sup>18)</sup>, 1992). 적절한 시간이 경과한 후 관류액으로부터  $\text{NH}_4^+$ 를 제거하면 이번에는 세포내 있는  $\text{NH}_4^+$ 가 세포막을 통해 빠져 나오고  $\text{NH}_4^+$  이온은 계속해서  $\text{NH}_3 + \text{H}^+$ 로 분리됨으로써 세포내 pH가 감소하게 된다.

$\text{NH}_4^+$ 의 첨가 및 제거로 세포내 pH가 감소된 후 세포내 pH가 즉시 증가하기 시작하여 원래의 상태로 되돌아 오는데 이러한 과정이  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger를 봉쇄하는 약물인 amiloride에 의해 억압되는 것을 확인함으로써  $\text{HCO}_3^-$ 가 포함되어 있지 않은 용액을 관류한 경우에는 세포내 pH 증가가 거의 전적으로  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger의 활성화 때문임을 알 수 있다. 그러나 관류액에  $\text{HCO}_3^-$ 가 포함되어 있는 경우에는 amiloride를 사용하여  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger를 봉쇄한 후에도 세포내 pH가 서서히 증가하는 경향을 보임으로써 이제까지 보고된 바 없는  $\text{HCO}_3^-$  이온의 유입과 연관된 세포내 pH를 증가시키는 기전이 있을 것으로 여겨진다. 이는 Fig. 12에서 다시 확실하게 관찰할 수 있었는데 세포내 pH가 낮아져 있는 상태에서  $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$ 를 관

류액에 넣어주면 amiloride로  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger를 봉쇄한 상태에서도 pH가 증가하여  $\text{HCO}_3^-$  이온을 유입시키는 기전이 존재함을 보여주었다. 특히 세포내 pH가 낮은 경우에는  $\text{HCO}_3^-$ 가 포함되어 있지 않은 용액에서  $\text{HCO}_3^-$ 가 포함되어 있는 용액으로 바꾸어 주어도 세포내 pH 감소가 거의 나타나지 않았는데 이는 세포내  $\text{H}^+$  농도가 매우 높은 상태에서는 carbonic anhydrase에 의해  $\text{CO}_2$ 와  $\text{H}_2\text{O}$ 로부터  $\text{HCO}_3^-$ 와  $\text{H}^+$ 를 생성하는 방향으로 반응이 잘 일어나지 않기 때문인 것으로 생각된다.

실제로 세포내 pH가 변할 때  $\text{CO}_2$ 로부터  $\text{HCO}_3^-$ 와  $\text{H}^+$ 가 얼마나 생성될 것인지를 다음과 같이 Henderson-Hasselbalch 공식을 이용하여 계산할 수 있는데

$$\text{pHi} = \text{pKa} + \log([\text{HCO}_3^-]/0.0301\text{PCO}_2)$$

이때 pKa 값은 6.10, 5%  $\text{CO}_2$ 를 공급할 때  $\text{PCO}_2$ 는 약 35 mmHg 그리고  $\text{CO}_2$ 로부터  $\text{HCO}_3^-$ 와  $\text{H}^+$ 가 1:1로 생성되므로  $[\text{HCO}_3^-]$ 는  $[\text{H}^+]$ 와 같다. 따라서 세포내 pH가 7.3일 때 생성되는  $\text{H}^+$  이온의 농도는 16.7mM이며 세포내  $\text{HCO}_3^-$ 가 존재할 때 완충능  $\beta$  1이 52.7이므로 세포내 pH 감소량이 약 0.32pH unit이다. 그러나 세포내 pH가 6.6으로 감소했을 때 세포내 pH 감소량을 계산해 보면  $\beta$  1이 90.8일 때 pH 감소량이 0.037pH unit으로서 pH 7.3 상태에서 관찰할 수 있는 pH 감소량의 약 1/9일 것으로 계산되며 이는 본인이 실험을 통해 확인한 pH 변화량과 거의 일치한다.

타액선에서 타액분비를 유발하는 부교감신경을 자극하면 부교감신경 전달물질인 acetylcholine이 신경말단에서 유리되어 선세포 세포막에 있는 무스카린성 수용체와 결합하면  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger가 활성화되어 세포내 pH가 증가하는 것으로 알려져 있다(Okada 등<sup>17)</sup>, 1991). 이는 세포 자극으로 축적되는  $\text{H}^+$  이온을 효과적으로 세포밖으로 배출시킴으로써 세포내 pH가 너무 낮게 떨어지는 것을 막아 주므로써 세포내 모든 단백질이 정상적으로 기능을 유지하도록 하기 위함이다. 뿐만 아니라  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger의 활성화는  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  exchanger의 활성화와 함께 세포내로  $\text{Na}^+$ 과  $\text{Cl}^-$  이온을 유입시키므로써 지속적으로 타액이 유리되도록 해준

다. 그러나 이와 같은 자극으로  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger가 어느 정도 활성화되는지는 아직까지 정확히 보고되지 않았다. 따라서  $\text{NH}_4^+$  pulse 방법을 사용하여 무스카린성 수용체가 자극되었을 때와 자극되지 않았을 때  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger의 활성화 정도를 비교하였다.

타액선 선세포가 무스카린성 자극을 받아 타액 분비가 항진되어 있는 동안  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger가 얼마나 활성화가 되는지 알아보기 위하여 선세포를 carbachol로 자극하기 전, 그리고 carbachol로 자극 중에  $\text{NH}_4^+$ 를 첨가하였다가 제거하여 세포내 pH를 낮추어 주고 세포내 pH 증가 속도를 비교하였다. 이미  $\text{HCO}_3^-$ 가 포함되지 않은 용액을 관류하는 경우에는 세포내 pH를 올려주는 기전이  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger밖에 없다는 것을 확인 하였으므로 pH 증가속도는  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger의 활성화 속도를 간접적으로 보여준다. 그러나  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger의 활성화 정도를 좀 더 정확하게 표현하기 위해서는 pH 변화속도 보다는  $\text{H}^+$  이온의 유출속도를 알아야 하는데 이를 정확히 알기 위해서는 세포내  $\text{H}^+$  이온에 대한 완충능을 알아야 한다. 흰쥐 악하선 내부의 완충능은 pH 7.2-7.4 범위에서  $14.31 \pm 1.82$  정도이고 세포내 pH가 감소하면 증가하는 경향을 보여 다른 세포들과 비슷한 경향을 보였다. 따라서 선세포를 carbachol로 자극했을 때와 하기 전의 세포내 pH 증가속도, amiloride를 이용하여 선세포를 carbachol로 자극했을 때와 하기 전의  $\text{H}^+$  생성 및 유입속도, 그리고 세포내 완충능 등을 고려하여 선세포를 carbachol로 자극했을 때와 자극시키기 전의  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger 활성도를 비교하여 carbachol 자극으로  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger가 pH 7.25에서 3 배 정도 활성화되는 것을 알 수 있었다.

## V. 결 론

타액선 선세포는 혈액으로부터 전해질과 물을 유입하여 도관으로 이동시키므로써 타액을 형성하는 외분비 기관이다. 타액의 형성과정에는 많은 이동 단백질과 효소들이 관여하며 따라서 세포내 pH가 적절히 유지되어야만 한다. 다른 모든 고등동물의 세포와 마찬가지로 타액선 선세포의 세포내 pH 조절에 중요한 역할을 하는 장치로  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  ex-

changer가 있는데 이 exchanger는 무스카린성 수용체의 자극으로 타액 분비가 항진될 때 활성화되는 것으로 알려져 있다. 따라서 본 연구의 첫 번째 목적은 무스카린성 수용체 자극으로  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger가 얼마나 활성화되는지 알아보는 것이며 두 번째로  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger 외에도 세포내 pH 조절에 관여하고 타액내  $\text{HCO}_3^-$  이온농도를 높여 치아우식증 예방에 관여할 것으로 생각되는  $\text{HCO}_3^-$  cotransporter의 유무를 확인하는 것이다.

흰쥐 수컷의 악하선에서 선세포를 분리하여 세포내 pH를 측정하는데 사용하는 형광물질인 2',7'-bis(2-carboxyethyl)-5(6)-carboxyfluorescein (BCECF)를 세포내 축적시킨 후 악하선 선세포를 perfusion chamber에 넣고 현미경 상에서 세포내 pH 변화를 spectrofluorometer를 사용하여 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1.  $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$  투여로 세포내 pH가  $0.39 \pm 0.02$  pH unit 감소한 후  $0.04 \pm 0.007$  pH unit/min의 속도로 증가하였으며  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger 봉쇄제인 1mM amiloride와  $\text{HCO}_3^-$  transporter 봉쇄제인 200  $\mu\text{M}$  4,4'-diisothiocyanato-stilbene-2,2'-disulphonic acid (DIDS)를 투여한 경우 세포내 pH 증가가 억제되어 pH 증가속도가  $0.01 \pm 0.002$  pH unit/min이었다.
2. 관류액에  $\text{NH}_4^+$  이온의 첨가와 제거로 세포내 pH가 감소하였는데  $\text{HCO}_3^-$ 가 포함되지 않은 용액을 관류했을 경우 1 mM amiloride에 의해 pH 증가가 거의 완벽하게 봉쇄되어 세포내 pH 증가가 전적으로  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger에 의함을 알 수 있었다.
3. 10  $\mu\text{M}$  carbachol 투여로 세포내 pH 증가속도가  $0.16 \pm 0.01$  pH unit/min에서  $0.28 \pm 0.03$  pH unit/min으로 빨라졌다.
4. 10  $\mu\text{M}$  carbachol을 투여한 경우 1mM amiloride의 첨가로 세포내 pH 감소속도가  $0.06 \pm 0.008$  pH unit/min으로서 이는 carbachol 투여 전의  $0.03 \pm 0.004$  pH unit/min 보다 빨랐다.
5. 세포내  $\text{H}^+$  이온에 대한 완충능 (buffering capacity)  $\beta_1$ 은 세포내 pH가 7.2-7.4 일 때  $14.31 \pm 1.82$ 이었으며 세포내 pH가 낮아질수록  $\beta_1$  값이 증가하였다.

6. 10  $\mu$ M carbachol 투여로  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger를 통한  $\text{H}^+$  이온의 유출속도가 carbachol 투여 전 보다 크게 증가하여  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger의 활성도가 carbachol 투여로 alkaline shift되었음을 확인하였다.
7. 흰쥐 악하선 선세포에서 세포내 pH를 조절하는 장치로  $\text{HCO}_3^-$ 를 유입시키는 이동단백질이 있음을 확인하였다.  
이상의 실험결과로 미루어 보아 흰쥐 타액선 선세포에서 세포내 pH를 유지하는데 가장 중요한 역할을 하는  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger가 무스카린성 수용체의 자극으로 타액분비가 향진될 때 그 활성이 크게 증가하여 세포내 pH가 7.25에서 3배 가량 활성도가 커짐을 알 수 있었다. 또한 세포내 pH 조절에도 관여하며 타액내 pH를 유지시키는 데에도 중요한 역할을 하는  $\text{HCO}_3^-$  이온을 세포내로 유입시키는 이동단백질이 있음을 확인하였으나 이 이동단백질이 세포내 어떤 기전에 의해 조절되는지는 앞으로 계속 연구해야할 과제로 생각한다.

### 참고 문헌

1. Aronson, PS, Nee, J and Suhm, MA(1982) Modifier role of internal  $\text{H}^+$  in activating  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger in renal microvillus membrane vesicles, *Nature* 299, 161-163
2. Berridge, MJ (1993) Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature* 361, 315-325
3. Borgese, F, Garcia-Romeu, F and Motais, R (1987) Control of cell volume and ion transport by b-adrenergic catecholamines in erythrocytes of rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *J Physiol* 382, 123-144
4. Boron, WF and Boulpaep, EL(1983) Intracellular pH regulation in the renal proximal tubule of the salamander. *Na-H exchange*. *J Gen Physiol* 81, 29-52
5. Case, RM, Ansah, T-A, Dho, S, Howorth, AJ and Argent, BE(1986) Second messenger interactions in pancreas and salivary glands. *Biomedical Res* 7, Suppl 2, 95-103
6. Davis, BA, Hogan, EM and Boron, WF (1992) Role of G proteins in stimulation of  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchange by cell shrinkage. *Am J Physiol* 262, C533-C536
7. Grinstein, S, Cohen, S, Goetz, JD and Gelfand, EW (1985) Characterization of the activation of  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchange in lymphocytes by phorbol esters: change in cytoplasmic pH dependence of the antiport. *Proc Natl Acad Sci USA* 82, 1429-1433
8. Grinstein, S and Foskett, JK(1990) Ionic mechanisms of cell volume regulation in leukocytes. *Ann Rev Physiol* 52, 399-414
9. Lee, SI and Turner, RJ(1991) Mechanism of secretagogue-induced  $\text{HCO}_3^-$  and  $\text{Cl}^-$  loss from rat parotid acini. *Am J Physiol* 261, G111-G118
10. Manganel, M and Turner, RJ (1989) Agonist-induced activation of  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchange in rat parotid acinar cells. *J Membr Biol* 111, 191-198
11. Manganel, M and Turner, RJ (1990) Agonist-induced activation of  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchange in rat parotid acinar cells is dependent on calcium but not on protein kinase C *J Biol Chem* 265, 4284-4289
12. Merritt, JE and Rink, TJ (1987) Regulation of cytosolic free calcium in fura-2-loaded rat parotid acinar cells. *J Biol Chem* 262, 17362-17369
13. Moolenaar, WH, Tsien, RY, van der Saag, PT and de Laat, SW (1983)  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchange and cytoplasmic pH in the action of growth factors in human fibroblasts. *Nature* 304, 645-648
14. Moon, RB and Richards, JH(1973) Determination of intracellular pH by  $^{31}\text{P}$  magnetic resonance. *J Biol Chem* 248, 7276-7278
15. Nauntofte, B (1992) Regulation of electrolyte and fluid secretion in salivary acinar cells. *Am J Physiol* 263, G823-G837
16. Ober, SS and Pardee, AB (1987) Both protein kinase C and calcium mediate activation of the  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter in Chinese hamster embryo fibroblasts. *J Cell Physiol* 132, 311-317
17. Okada, M, Saito, Y, Sawada, E and Nishiyama,

- A (1991) Microfluorimetric imaging study of the mechanism of activation of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiport by muscarinic agonist in rat mandibular acinar cells, *Pflugers Arch* 419, 338-348
18. Paulais, M and Turner, RJ (1992) b-adrenergic upregulation of the Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl cotransporter in rat parotid acinar cells, *J Clin Invest* 89, 1142-1147
  19. Pirani, D, Evans, LAR, Cook, DI and Young, JA (1987) Intracellular pH in the rat mandibular salivary gland: the role of Na-H and Cl HCO<sub>3</sub> antiports in secretion, *Pflugers Arch* 408, 178-184
  20. Poronnik, P, Schmann, SY, and Cook, DI (1995) HCO<sub>3</sub>-dependent ACh-activated Na<sup>+</sup>-influx in sheep parotid secretory endpieces, *Pflugers Arch* 439, 852-858
  21. Richmond, P and Vaughan-Jones, RD (1993) K<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchange in isolated carotid body type-I cells of the neonatal rat is caused by nigericin contamination, *J Physiol* 467, 277P
  22. Rink, TJ, Tsien, RY and Pozzan, T (1982) Cytoplasmic pH and free Mg<sup>2+</sup> in lymphocytes, *J Cell Biol* 95, 189-196
  23. Saito, Y, Ozawa, T, Suzuki, S and Nishiyama, A (1988) Intracellular pH regulation in the mouse lacrimal gland acinar cells, *J Membr Biol* 101, 73-81
  24. Seo, JT, Larcombe-McDouall, JB, Case, RM and Steward, MC (1995) Modulation of Na-H exchange by altered cell volume in perfused rat mandibular salivary gland, *J Physiol* 487, 185-195
  25. Seo, JT, Steward, MC, Larcombe-McDouall, JB, Cook, LJ and Case, RM (1994) Continuous fluorometric measurement of intracellular pH and Ca<sup>2+</sup> in perfused salivary gland and pancreas, *Pflugers Arch* 426, 75-82
  26. Sjaastad, MD, Wenzl, E and Machen, TE (1992) pHi dependence of Na-H exchange and H delivery in IEC-6 cells, *Am J Physiol* 262, C164-C170
  27. Steward, MC, Seo, Y and Case, RM (1989) Intracellular pH during secretion in the perfused rabbit mandibular salivary gland measured by 31P NMR spectroscopy, *Pflugers Arch* 414, 200-207
  28. Thomas, JA, Buchsbaum, RN, Zimniak, A and Racker, E (1979) Intracellular pH measurements in Ehrlich ascites tumor cells utilizing spectroscopic probes generated in situ, *Biochemistry* 18, 2210-2218
  29. Tsien, RY (1989) Fluorescent indicators of ion concentrations. In: Taylor DL, Wang YL (eds) *Fluorescence microscopy of living cells in culture. Part B Quantitative fluorescence microscopy - imaging and spectroscopy. Methods in Cell Biology*, volume 30, Academic Press, San Diego, pp 127-156
  30. Turner, RJ (1993) Mechanisms of fluid secretion by salivary glands, *Ann New York Aca Sci* 694, 24-35.
  31. Young, JA, Cook, DI, van Lennep, EW and Roberts, M (1987) Secretion by the major salivary glands. In: Johnson LR, Christensen J, Jackson M, Jacobson E, Walsh J (eds) *Physiology of the gastrointestinal tract*, 2nd edn, chapter 25, Raven Press, New York, pp 773-815
  32. Young, JA and van Lennep, EW (1978) *The morphology of salivary glands*, Academic Press, London, New York