

Purinergic Receptors Play Roles in Secretion of Rat von Ebner Salivary Gland

Sang-Hee Kim, Young-Kyung Cho, Ki-Myung Chung, and Kyung-Nyun Kim*

Department of Physiology and Neuroscience, College of Dentistry and Research Institute of Oral Sciences, Kangnung National University, Kangnung, 210-702, Korea

(Received August 21, 2006 ; Accepted October 13, 2006)

The effects of adenosine triphosphate(ATP) on salivary glands have been recognized since 1982. The presence of purinergic receptors(P2Rs) that mediate the effects of ATP in various tissues, including parotid and submandibular salivary gland, has been supported by the cloning of receptor cDNAs and the expression of the receptor proteins. P2Rs have many subtypes, and the activation of these receptor subtypes increase intracellular Ca^{2+} , a key ion in the regulation of the secretion in the salivary gland. The apical pores of taste buds in circumvallate and foliate papillae are surrounded by the saliva from von Ebner salivary gland(vEG). Thus, it is important how the secretion of vEG is controlled. This study was designed to elucidate the roles of P2Rs on salivary secretion of vEG. Male Sprague-Dawley rats (about 200 g) were used for this experiment. vEG-rich tissues were obtained from dissecting 500-1,000 μ m thick posterior tongue slices under stereomicroscope view. P2Rs mRNA in vEG acinar cells were identified with RT-PCR. To observe the change in intracellular Ca^{2+} activity, we employed Ca^{2+} -ion specific fluorescence analysis with fura-2. Single acinar cells and cell clusters were isolated by a sequential trypsin/collagenase treatment and were loaded with 10 μ M fura -2 AM for 60 minutes at room temperature. Several agonists and antagonists were used to test a receptor specificity. RT-PCR revealed that the mRNAs of P2X₁, P2Y₁, P2Y₂ and P2Y₃ are expressed in vEG acinar cells. The intracellular calcium activity was increased

in response to 10 μ M ATP, a P2Rs agonist, and 2-MeSAMP, a P2Y₁ and P2Y₂R agonist. However, 300 μ M $\alpha\beta$ -MeATP, a P2X₁ and P2X₃R agonist, did not elicit the response. The responses elicited by 10 μ M ATP and UTP, a P2Y₂R agonists, were maintained when extracellular calcium was removed. 10 μ M suramin, a P2XR antagonist, and reactive blue 2, a P2YR antagonist, partially blocked ATP-induced response. However, when extracellular calciums were removed, suramin did not abolish the responses elicited by ATP. These results suggest that P2Rs play an important role in salivary secretion of vEG acinar cells and the effects of ATP on vEG salivary secretion may be mediated by P2X₁, P2Y₁, P2Y₂ and/or P2Y₃.

Keywords: von Ebner salivary gland, ATP, P2Rs, RT-PCR, Ca^{2+} imaging

서 론

타액은 외분비선인 타액선에서 생성되어 구강 내로 분비된다. 타액선에는 대타액선과 소타액선이 있으며, 이들 타액선에서 생성된 타액은 구강내로 분비되어 구강 및 치아 건강에 중요한 영향을 미치고 위장관계의 기능 및 점막의 성장과 발육에도 밀접한 연관을 맺고 있어서 구강 및 치아건강을 비롯한 전신적인 기능을 유지하는데 필수적이다(김과 친, 2005).

타액선에서 타액의 분비는 선포 세포 표면에 존재하는 다양한 수용기에 특이적 자극 약물들이 결합함으로써 유발되는데, 포유동물의 경우에 무스카린성 수용기, β -아드레날린성 수용기, α -아드레날린성 수용기, substance P 수

*Corresponding author: Kyung-Nyun Kim, D.D.S., M.S.D., Ph.D., Department of Physiology and Neuroscience, College of Dentistry, Kangnung National University, 123 Chibyun-dong, Kangnung, 210-702, Korea. Tel.: +82-33-640-2450; Fax.: +82-33-642-6410; E-mail: knkim@kangnung.ac.kr

용기, vasoactive intestinal peptide(VIP) 등이 알려져 있다. 이들 수용기의 활성화는 세포질 내 Ca^{2+} 이나 cAMP와 같은 세포 내 신호전달물질들의 농도를 증가시키며, 타액이나 단백질의 분비를 항진시킨다. 타액선 선포 세포에서 타액 분비는 주로 무스카린성 수용기, 퓨린 동작성 수용기, α -아드레날린성 수용기, 그리고 substance P 수용기 자극으로 야기되는데, 이들 수용기가 활성화되면 세포 내에서 G-protein과 phospholipase C(PLC)를 단계적으로 활성화시키며 PLC는 다시 phosphatidyl inositol-3, 4-diphosphate로부터 1, 4, 5-trisinositolphosphate(IP₃)와 diacylglycerol로 분해시키고 IP₃는 다시 세포 내 Ca^{2+} 농도를 증가시키는 것으로 알려져 있다(Sugiya와 Furuyama, 1989). 이외는 달리 타액속의 단백질 분비에는 β -아드레날린성 혹은 VIP 수용기 자극에 의한 G-protein과 adenylyl cyclase의 활성증가를 나타내며, 이는 다시 cAMP와 cAMP-dependent protein kinase(PKA)를 활성화시키고, 다시 PKA는 단백질 분비에 관여하는 세포 내 단백질을 인산화함으로써 타액 단백질을 분비한다(Quissell, 1993; Takuma와 Ichida, 1994).

타액선 선포 세포에 대한 퓨린 동작성 수용기의 역할은 Gallacher(1982)가 생쥐의 이하선 선포 세포에서 처음으로 보고하였는데, adenosine triphosphate(ATP)는 막전위, ^{86}Rb 유출, 그리고 아빌라세 분비 증가를 조절함을 관찰하여 보고하였고, Bumstock과 Kennedy(1985)는 세포외 뉴클레오티드에 대한 G-protein coupled(P2Y) 그리고 ligand-gated(P2X) 수용기의 아형을 제시하였다. 이들 수용기에 관한 연구는 이하선 또는 악하선, 그리고 타액선에서 기원된 세포주를 이용한 것이 대부분이었으나, Luo 등(1999)은 외분비선의 일종인 췌장의 도관에서 세포 외부의 뉴클레오티드가 기저쪽과 선강쪽 세포막에서 어떤 효과를 나타내는지 비교하여 보고한 바 있다. 세포외 ATP 자극에 의한 퓨린 동작성 수용기의 활성화는 세포 내 Ca^{2+} 활성도를 증가시킨다고 하였으며(Dehaye 등, 1999), McMillan 등(1987)은 ATP가 쥐의 이하선에서 세포 내 Ca^{2+} 저장고에 영향을 주며, 여기에는 P2Y 수용기가 관련되어 있다고 보고하였고 세포 외부 ATP가 P2X 수용기를 활성화시키고 비특이성 양이온 통로에 의해 Ca^{2+} 의 유입이 증가되는 것을 관찰하였다. 지금까지 다양한 세포와 조직에서 P2Rs에 대한 연구가 이뤄지고 있으며, 대타액선인 이하선 및 악하선 선포 세포와 도관 세포에서 퓨린 동작성 수용기의 발현에 대한 보고는 있으나 소타액선인 vEG 선포 세포에 존재하는 퓨린 동작성 수용기에 대해서는 잘 알려져 있지 않다. vEG는 혀의 성곽유두와 잇새유두에서 미각 세포의 미세 환경을 구성하는 타액을 분비한다. vEG에 대한 연구는 성곽유두와 잇새유두에 존재하는 peri-receptor 기구를 이해하는데 도움을 줄 뿐만 아니라, 장액성인 타액선의 흥분성 분비기구에 대한 이해에 도움을 줄 것으로 생각된다.

본 연구는 역전사 중합효소연쇄반응(Reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)을 이용하여 vEG 선포 세포에서 P2Rs의 아형들에 대한 mRNA의 존재 여부를 확인하고, 칼슘-특이이온 형광분석법을 통하여 vEG 선포 세포에서 어떠한 P2Rs가 생리적 기능을 가지는지 알아보려고 하였다.

재료 및 방법

실험동물

연구는 강릉대학교 치과대학 실험동물위원회의 승인을 얻었으며, 위원회의 감독을 받으며 수행되었다.

실험동물은 생후 60일령의 수컷 Sprague-Dawley계 흰쥐를 강릉대학교 동물실에서 실험동물용 고품 사료와 물을 자유롭게 공급하며 3일 이상 사육한 뒤 실험에 사용하였다.

선포 세포의 분리 및 RT-PCR을 위하여 실험동물을 전신마취 하에서 희생시킨 후 즉시 허를 절제하고, 절제한 허를 즉시 100% 산소가스로 포화시키고 얼음으로 냉각시킨 N-2-hydroxy-ethylpiperazine-N-2-ethane-sulfonic acid(HEPES) 완충-Tyrode 용액(140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 5 mM D-Glucose, 10 mM HEPES, and 5 mM Pyruvic acid, pH 7.4 with NaOH)에 보관하고, 혀 성곽유두와 잇새유두 주위 조직을 무게 500-1,000^oC의 박편을 제작하여 해부 현미경으로 관찰하며 vEG를 주위의 근육조직에서 분리하였다.

선포세포의 분리

얻어진 vEG 조직을 tissue culture dish(Falcon, 미국)에 옮겨 100% 산소가스로 포화시키고 얼음으로 냉각시킨 HEPES 완충 Tyrode 용액에 보관하였다. 김(2000)의 방법을 참고로 pH 7.4의 HEPES 완충 Tyrode 용액에 녹인 trypsin (0.4 mg/ml)으로 10분간, collagenase (60 U/ml)와 trypsin inhibitor (2 mg/ml) 혼합용액으로 20분간 37^oC에서 순차적으로 처리하여 단일 선포 세포 또는 선포 세포군을 얻었다. 얻어진 세포는 medium 199(Signa, 미국) 배양액에 넣어 5% 이산화탄소 배양기에서 37^oC에 보관하고 실험에 사용하였다.

RT-PCR 실험

얻어진 조직을 분쇄기(Wheaton, 미국)로 잘게 부쇄 Corezol total RNA preparation kit(코아 바이오 시스템, 한국)로 RNA를 추출하였다. 또한 악하선과 근육조직에서 같은 방법으로 대조 표본을 제작하였다.

추출한 RNA는 1 μ g을 역전사와 PCR을 동시에 수행하는 Accupower RT/PCR PreMix(Bioneer, 한국)와 함께 primer를 넣었다. Gene Amp PCR system 9700 (PE

Table 1. RT-PCR primers and reaction condition for purinergic receptors.

	Primer	Reaction condition	Expected size
P2X ₁	forward : TGGGTGGGTGTTTGTCTATG reverse : TGAAGTTGAAGCCTGGAGAC		392bp
P2X ₂	forward : TCCATCATCACCAAAGTCAA reverse : TTGGGGTAGTGGATGCTGTT		820bp
P2X ₃	forward : TTGAGGGTAGGGGATGTGGT reverse : GCTGATAATGGTGGGGATGA		500bp
P2X ₄	forward : GCTTATACAGTGTGAGCGTATGGAAGTAAAG reverse : TTTAATGTTTGGTCCYTAGGTCATTTCAACACAG	94°C/45s 45°C/45s 72°C/1min	269bp
P2X ₅	forward : TGAAGGGTGGTGTGATAGGA reverse : GTTGATGACTGTGGGGATGA		265bp
P2X ₆	forward : CTGTGGGATGTGGCTGACTT reverse : TCAAAGTCCCCTCCAGTCAT		558bp
P2X ₇	forward : TGAACGCCACCTCTGTA reverse : CCTCCAGTGCCAAAACCCAG		235bp
P2Y ₁	forward : TCAGGTAACAAGAGGTCTAGCAAGTC reverse : TTCTTGTGACCATGTTACAAACTGAG		240bp
P2Y ₂	forward : GCTTCAACGAGGACTTCAAGTATGTGC reverse : AGGTGAGGAAGGAGGATGCTGCAGTAG		300bp
P2Y ₃	forward : TCCTCTTCTCACCTGCATCAG reverse : GCTGTTTCATGCTGGCAAAG	94°C/45s 45°C/45s 72°C/1min	643bp
P2Y ₄	forward : ACCCTGGGATGCAACAGCCAC reverse : GGGTGATGTGGAAGGCAC		600bp
P2Y ₅	forward : TCCTCTTCTCACCCAGCATCAG reverse : GGGTGATGTGGAAGGCAC		300bp
P2Y ₆	forward : CGACCACATGAGCTCCTAC reverse : GTGAGCTTCTGGGTCTCTGTG		210bp

Applied Biosystems, 미국)을 사용하여 42°C에서 60분, 95°C에서 5분으로 역전사 반응을 한 후, 94°C에서 45초, 45°C에서 45초, 72°C에서 1분의 과정을 40주기로 반복하였다. 이때 음성대조군으로 전세포 주위 근육을 사용하였다. 본 실험에 사용된 primer는 Table 1에 나열하였다.

얻어진 cDNA를 pH 8.3의 Tris-Acetate EDTA 완충용액 (Bioneer, 한국)에 0.1 µg/ml ethidium bromide(Bioneer, 한국)가 포함된 2% agarose gel(Bioneer, 한국)에 넣어 sub-cell GT(Bio-rad, 미국)와 PowerPac basic(Bio-rad, 미국)을 이용하여 50 mV로 50분간 전개하고, 자외선 조명으로 결과를 확인하였다.

세포 내 형광분석법을 이용한 Ca²⁺ 활성화 측정

분리된 선폴 세포로 분비자극물질로 유발된 세포 내 칼슘 이온의 농도 변화를 측정하였다. 칼슘의 농도에 반응하여 형광을 내는 fura-2 acetoxymethyl ester(fura-2 AM, Molecular Probe, 미국)를 이용하였다. 분리된 조직을 fura-2 AM을 10 µM 농도로 녹인 500 µl의 HEPES 완충 Tyrode 용액에 넣고 상온 (20-25°C)에서 분당 40회로 흔들면서 주입하였다. 60분 뒤 동일한 완충용액으로 3회 세척하고

다시 상온에서 교반 배양하여 세포내의 fura-2 AM이 fura-2로 전환되도록 하였다. Fura-2가 주입된 선폴 세포를 Cel-Tak(BD Biosciences, 미국)으로 노로한 실리콘과 cover glass를 이용하여 제작한 용적 200 µl의 용기에 옮겨 세포(군)가 배양 용기의 바닥에 부착되도록 하고 형광현미경(TE-2000, Nikon, 일본)을 사용하여 관찰하였다.

Fura-2의 형광을 유발시키기 위하여 Xenon 전구를 광원으로 한 빛을 파장 선택기(DG-4, Sutter, 미국)를 사용하여 340 nm와 380 nm가 60 Hz의 빈도로 교대로 비추도록 하였다. 이 자외선에 의하여 유발된 형광을 510 nm에서 모아 CCD camera(HQ, Roper, 일본)로 영상을 얻어 분석에 사용하였다.

퓨린 동작성 수용기 자극물질로 ATP(Sigma, 미국), αβ-methyleneadenosine 5-triphosphate(αβ-MeATP, Sigma, 미국), 2-methylthioadenosine triphosphate(2-MeSATP, Toeris, 미국) 그리고 uridine 5-triphosphate(UTP, Sigma, 미국)를 사용하였고, 길항제로는 suramin(Toeris, 미국)과 reactive blue 2(Sigma, 미국)를 사용하였다(Table 2). 얻어진 형광 영상은 MetaFluor(version 5.0, Universal Imaging Corporation, 미국)를 사용하여 분석하였다.

Table 2. Agonists and antagonists acting on purinergic receptors used in the present experiment.

	Drugs	Functions
Agonist	ATP	Universal
	$\alpha\beta$ -MeATP	P2X _{1/3}
	UTP	P2Y _{2/4/6}
	2-MeSATP	P2Y _{1/2/4/6}
Antagonist	Suramin	P2XRs
	Reactive blue2	P2YRs

시약

사용한 시약은 특별히 명시한 경우를 제외하고 미국 Sigma사의 분석용 등급 이상의 것을 사용하였다.

실험 결과

RT-PCR 실험

269 bp의 P2XRs RT-PCR product와 243 bp, 300 bp, 그리고 643 bp의 P2YRs RT-PCR product가 vEG의 선포 세포에서 검출되어, vEG 선포 세포에는 P2X₄, P2Y₁, P2Y₂, 그리고 P2Y₃의 mRNA가 존재하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 1). vEG 주변의 근육조직에서는 P2X₄, P2Y₁, 그리고 P2Y₂ RT-PCR product가 발견되었으며, 악하선에서는 vEG 선포 세포와 마찬가지로 P2X₄, P2Y₁, P2Y₂

및 P2Y₃ 수용기의 mRNA가 발현되는 것으로 확인되었다(Fig. 2).

세포 내 형광분석법을 이용한 Ca²⁺ 활성화 측정

RT-PCR 실험으로 확인된 P2 수용기에 대한 각각의 자극 약물과 길항제(Table 2)를 사용하여 vEG 선포 세포 내 Ca²⁺ 활성화도의 증가 여부를 확인하였다. 세포 내 Ca²⁺의 활성화도는 P2 수용기에 비특이적 자극 약물인 10 μ M 농도의 ATP에 의하여 현저히 증가하였으나(Fig. 3과 Fig. 4), P2X₁과 P2X₃ 수용기의 자극 약물인 300 μ M 농도의 $\alpha\beta$ -MeATP를 가한 경우에는 세포내 Ca²⁺ 활성화도의 증가는 전혀 나타나지 않았다(Fig. 4). ATP의 자극에 의해

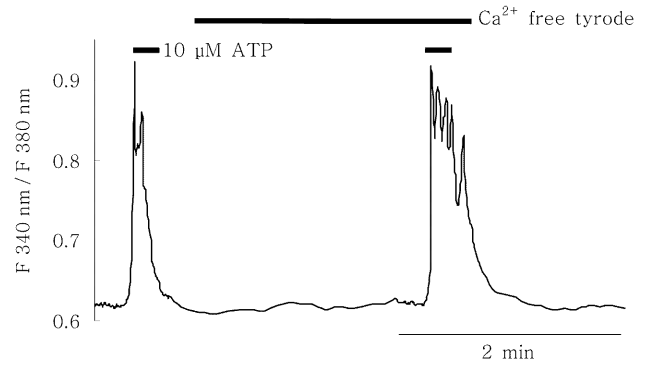


Fig. 3. The responses elicited by ATP, a P2R agonist. The responses were maintained when extracellular calcium was removed.



Fig. 1. mRNAs of P2X₄, P2Y₁, P2Y₂, and P2Y₃ receptor were detected in vEG acinar cells(M : marker; arrow heads: expected size).

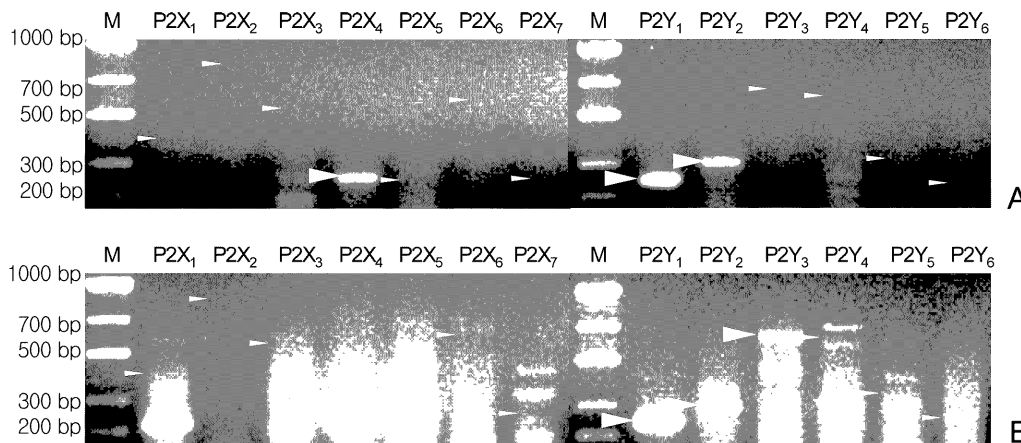


Fig. 2. P2 receptor mRNAs from muscle(A) and submandibular gland acinar cells(B)(M : marker; arrow heads : expected size).

유발된 반응은 HEPES 완충 Tyrode 용액에서 Ca^{2+} 을 제거한 경우에도 유지되었다(Fig. 3). $P2Y_1$ 과 $P2Y_2$ 수용기의 자극 약물인 2-MeSATP는 10 μ M의 농도에서 세포내 Ca^{2+} 활성도를 증가시켰고(Fig. 5), $P2Y_2$ 수용기의 자극 약물로 사용한 10 μ M UTP는 Ca^{2+} 을 제거한 HEPES 완충 Tyrode 용액에서 세포내 Ca^{2+} 활성도를 증가시켰다(Fig. 6). ATP로 유발되는 세포내 Ca^{2+} 증가 현상은 $P2X$ 수용기의 길항제인 suramin과 $P2Y$ 수용기의 길항제인 reactive blue 2에 의해 10 μ M의 농도에서 부분적으로 차단되었지만(Fig. 7과 Fig. 8), Ca^{2+} 이 제거된 HEPES 완

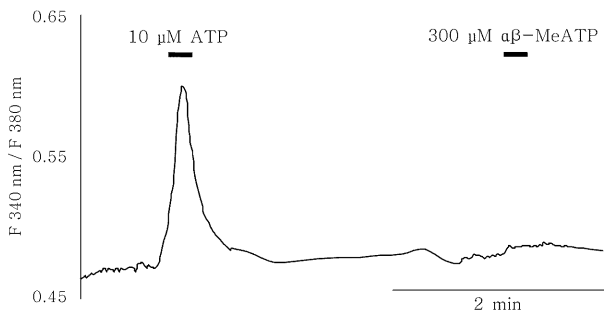


Fig. 4. The intracellular calcium activity was increased in response to 10 μ M ATP, a P2R agonist. However, 300 μ M $\alpha\beta$ -MeATP, a $P2X_1$ and $P2X_3$ agonist, did not elicit the response.

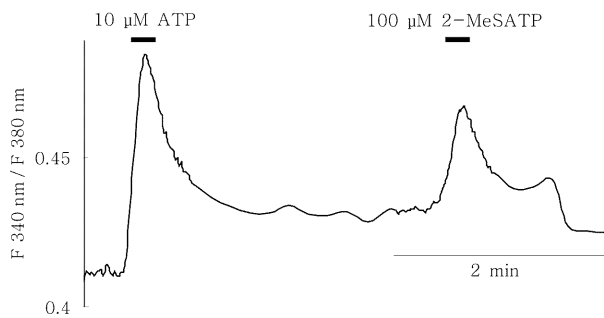


Fig. 5. 2-MeSATP, a $P2Y_1$ and $P2Y_2$ agonist, increased the intracellular calcium activity.

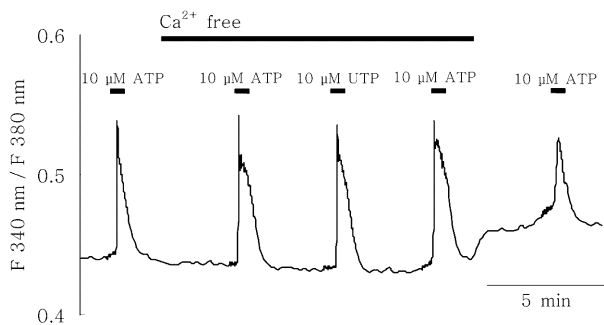


Fig. 6. UTP, a $P2Y_1$ R agonist, elicited increase of intracellular calcium activity in Ca^{2+} free bath solution.

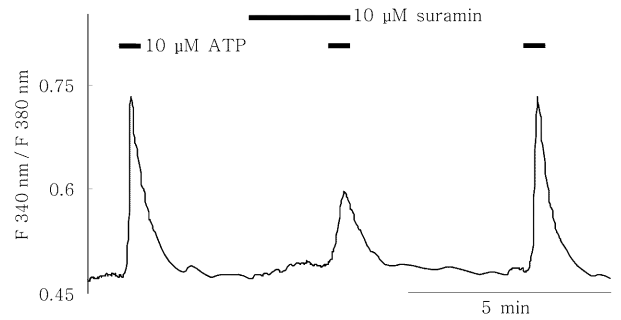


Fig. 7. Suramin, a $P2XR$ antagonist, partially blocked the Ca^{2+} activities evoked by ATP.

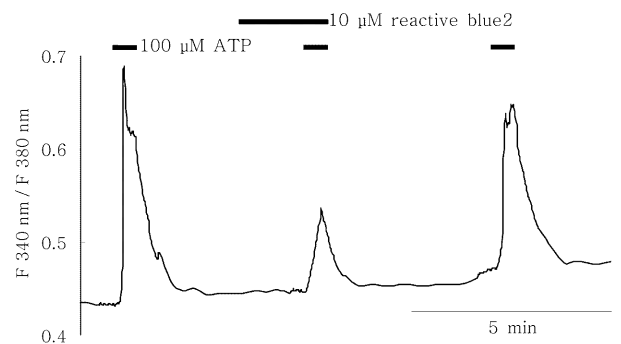


Fig. 8. Reactive blue 2, a $P2YR$ antagonist, partially blocked the Ca^{2+} activities evoked by ATP.

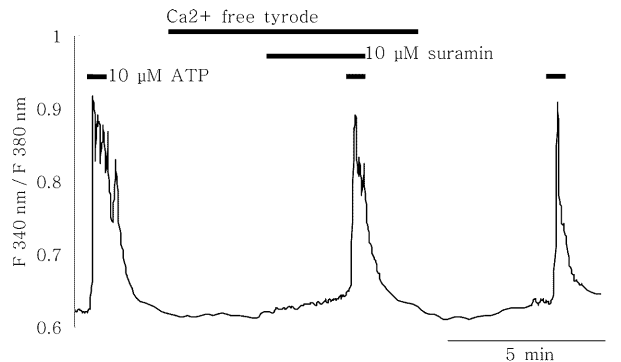


Fig. 9. When extracellular calcium had been removed, suramin did not abolish the responses elicited by ATP.

충 Tyrode 용액에서는 suramin에 의한 억제현상이 관찰되지 않았다(Fig. 9).

고찰

타액의 분비와 맛을 느끼는 감각은 모두 구강에서 일어나는 현상이며, 두 작용은 서로 밀접한 관계를 가지고 있다. 맛을 느끼기 위해서는 미각물질이 반드시 타액에

용해되어 미각세포에 작용하여야만 한다(Spielman, 1990; Lindemann, 1996). 맛을 느끼는 미각세포는 맛봉오리를 구성하고 있고 맛봉오리는 대부분 혀의 유두에 위치하고 있으며, 혀의 맛봉오리를 가지고 있는 유두는 버섯유두(fungiform papilla), 잎새유두(foliate papilla), 성곽유두(circumvallate papilla)가 있다. 버섯유두를 둘러싸고 있는 용액의 조성은 알려져 있지만, 잎새유두와 성곽유두를 둘러싸고 있는 용액의 정확한 조성은 단지 추측할 뿐이며 아마도 이 두 유두는 vEG에서 분비된 타액 속에 있을 것으로 생각된다(Spielman, 1990; Lindemann, 1996).

타액의 분비는 자율신경계에 의해 자극되는 과정이며, 아세틸콜린이나 에피네프린, substance P, VIP, 또는 뉴클레오티드를 신경전달물질로 사용한다. 각 신경전달물질은 adenylyl cyclase의 조절 단백질과 결합하는 세포막 수용기를 자극하며 세포 내 cAMP의 농도를 높이거나 세포 내 칼슘농도를 증가시켜 단백질 분비나 타액의 분비를 일으키는 이온의 이동을 유발한다(Putney, 1986).

P2Rs는 P2X와 P2Y 수용기로 분류된다. P2X 수용기는 ligand-gated ion channel 그룹으로, 막을 가로지르는 두 개의 소수성 서열을 가지고 있다. 이 소수성 서열은 세포막 단백질의 끝부분에 이르는 긴 세포 외부영역에 연결되어 있으며, 세포질 내부에 위치하고 있다. P2X 수용기가 ATP와 결합하면, 이온 침투성이 있는 동형 또는 이형의 다중결합을 이루는 구조를 형성한다(Fredholm 등, 1994). 지금까지 알려진 P2X 수용기의 자극 물질로는 ATP, α -MeATP, β -MeATP, 2-MeSATP, 그리고 BzATP가 있다(Buell 등, 1996; North, 1996; Evans 등, 1997). P2Y 수용기는 G protein-coupled 수용기이며 7개의 막단편으로 이루어 졌다. 이들 수용기는 PLC와 결합을 이루며, 이 수용기의 활성을 통하여 세포 내 칼슘 농도가 조절된다. 2-MeSATP, UTP, ATP는 P2Y 수용기에 효과적인 자극물질로 알려져 있으며 P2Y 수용기의 이형 중 P2Y₆ 수용기는 uridine 5-diphosphate(UDP)에 의해 선택적으로 활성을 나타낸다(Harden 등, 1997; Communi 등, 1997; Weisman 등, 1997). 결과적으로 P2Rs는 pyrimidine이나 purine nucleotide에 대한 수용기로 정의된다(Fredholm 등, 1994).

이전의 연구로 타액선에는 P2X₄와 P2X₇, 그리고 P2Y₁과 P2Y₂ 수용기가 존재하며, 이들 수용기의 활성은 세포 내 칼슘을 증가시킨다는 보고가 있었다. 또한 P2Rs는 칼슘 이온의 조절과 관련된 기작을 통해서 타액선 세포의 부피, 또는 이온이나 단백질의 분비를 조절하고, 세포독성과 관련된 분자에 대한 적응성을 증가시키는 작용이 있다고 알려졌다(Turner 등, 1999). Bo 등(1999)은 세포외부 ATP가 흰쥐 맛봉오리 세포에서 신경전달자나 신경조절자로서 기능을 하며, ATP가 P2X₄와 P2X₇ 수용기의 활성을 통하여 미각신경으로 미각신호를 전달한다고 하였고, Baryshnikov 등(2003)은 ATP가 P2Y 수용기의 활성에 의해서 생쥐 맛봉오리 세포에서 세포 내 칼슘을

조절한다고 보고하였다. 이와 같이 다양한 조직에서 세포외부 ATP를 이용한 P2 수용기에 대한 연구가 이루어 졌으나, vEG와 P2 수용기에 관한 연구는 아직 미흡한 실정이다.

본 연구의 RT-PCR 실험 결과 vEG 선포세포에 P2X₄, P2Y₁, P2Y₂, 그리고 P2Y₃ 수용기의 mRNA가 존재하고 있음을 확인하였다. 세포 내에 존재하는 P2 수용기의 mRNA 발현에 관한 이전의 연구에서는 췌장의 도관 세포에서 세 개의 P2XR (P2X₁, P2X₄, P2X₇)과 네 개의 P2YR (P2Y₁, P2Y₂, P2Y₅, P2Y₆) 수용기와 악하선에서 P2X₂, P2X₃, P2X₅, P2X₆, P2Y₆ 수용기의 존재가 알려졌다(Luo 등, 1999). 이하선 선포세포에서 P2X₄와 P2X₇ 수용기가 발견되었다는 보고가 있다(Tenneti 등, 1998). 본 연구는 Luo 등(1999)의 연구와 동일한 primer를 사용하였으나 이들 연구의 악하선에서 발견된 수용기(P2X₂, P2X₃, P2X₅, P2X₆, P2Y₆)와 본 실험의 악하선에서 발견된 P2 수용기(P2X₄, P2Y₁, P2Y₂, P2Y₃)가 다르게 나타났다. 이는 PCR 과정 중 annealing 온도나 쥐의 연령에 따른 차이로 생각된다. 한편, Park 등(1997)의 연구에서는 흰쥐의 악하선을 이용한 실험을 통해 P2Y₁ 수용기 mRNA의 존재를 확인하고 연령에 따라 P2Y₁ 수용기의 활성이 줄어들지만 mRNA 양은 줄어들지 않는다고 보고하였다. 또한 이전 연구에서 발견된 P2Y₆ 수용기는 포유동물에 존재하며, 본 연구에서 발견된 P2Y₃ 수용기는 조류의 뇌, 척수, 신장, 간에 존재하는 것으로 알려졌는데(Webb 등, 1996). Li 등(1998)은 조류의 P2Y₃ 수용기와 포유동물의 P2Y₆ 수용기가 기능적으로 상동성이 있는 것으로 보고 하였다. 본 실험의 악하선과 vEG의 RT-PCR 결과에서 나타난 P2Y₃ 수용기의 mRNA는 조류에 존재하는 것으로 알려진 P2Y₃ 수용기가 포유동물의 일부 조직에 존재하고 있음을 시사한다. Choi 등(2001)의 연구에 의하면 운동신경 말단에 저장된 synaptic ATP는 신경 자극을 통하여 acetylcholine과 함께 유리되며, acetylcholinesterase와 acetylcholine 수용기의 유전자 발현 조절에 관여하는 중요한 요소라고 보고하였고, P2Y₁ 수용기가 골격근에 존재한다고 하였다. 본 실험을 통해 흰쥐 혀의 vEG 주변 근육 조직에서 P2 수용기의 mRNA가 발견된 것은 P2 수용기가 근육 조직에도 존재한다고 생각할 수 있으며, RNA 추출을 위한 vEG 조직분리 시에 소량의 근육 조직이 포함될 수 있음을 생각해 볼 때 vEG의 RT-PCR 결과에서 나타난 P2 수용기의 mRNA가 근육 조직에서 유래된 것일 가능성을 배제할 수 없다. 그러나 vEG의 RT-PCR 결과와 악하선의 RT-PCR 결과가 비슷한 점과 근육만을 RT-PCR 했을 때 P2Y₃의 mRNA가 발견되지 않는 점으로 미루어보아 vEG 선포세포는 P2X₄, P2Y₁, P2Y₂ 및 P2Y₃를 발현하고 있는 것으로 추측된다.

RT-PCR 실험의 결과를 통해 나타난 P2X₄, P2Y₁, P2Y₂,

그리고 P2Y₃ 수용기의 vEG 선코 세포 내 기능적 활성화 여부를 확인하기 위하여 칼슘 특이이온형광분석법을 시행하였다. P2X₄ 수용기에만 특이적으로 작용하는 자극물질은 아직 밝혀진 바가 없기 때문에 P2X와 P2Y 수용기에 모두 작용하는 ATP와 P2X₄과 P2X₃ 수용기에 ATP보다 더 강력한 효력을 보이는 αβ-MeATP 및 P2X 수용기의 길항제인 suramin과 P2Y 수용기의 길항제인 reactive blue 2를 사용하여 P2X₄ 수용기의 작용을 유추하고자 하였다.

실험 결과 ATP가 세포 외부의 칼슘이 존재하거나 존재하지 않을 때 모두 세포 내 칼슘 활성도를 증가시킨 것으로 보아 vEG 선코 세포에서 ATP가 P2X와 P2Y 수용기에 작용하고 있음을 알 수 있었으며, αβ-MeATP의 자극으로 세포 내 칼슘 활성도 변화가 관찰되지 않은 것은 ATP에 의해 유발된 반응이 P2X₄과 P2X₃ 수용기에 의한 작용이 아님을 시사한다. 그리고 P2X 수용기에 대한 길항제인 suramin을 처리했을 때 ATP에 의해 유발된 반응이 억제되었으나, 이 억제 작용은 세포 외부 칼슘을 제거한 경우에는 나타나지 않았다. 이것은 suramin에 의해 P2X 수용기의 작용이 억제된 반면, P2Y 수용기의 작용으로 세포 내 칼슘 활성도가 증가한 것으로 생각된다. 그리고 P2Y 수용기의 길항제인 reactive blue 2가 ATP로 유발된 반응을 부분적으로 억제시킨 것은 reactive blue 2가 P2Y 수용기의 작용을 억제시켰지만, P2X 수용기의 작용은 억제시키지 못한 것으로 보인다. 이러한 반응의 양상과 RT-PCR 결과를 비교해 볼 때 ATP의 자극을 통해 P2X₄ 수용기가 작용하는 것으로 사료된다.

P2Y₁ 수용기의 자극 물질인 2-MeSATP와 P2Y₂ 수용기의 자극 물질인 UTP가 세포 외부 칼슘이 제거된 용액에서 세포 내 칼슘 활성도를 증가시킨 것은 P2Y₁과 P2Y₂ 수용기가 vEG 선코 세포 내에서 기능적으로 작용한다는 것을 시사하고 있다. 칼슘 특이이온형광분석 실험에는 나타나지 않았지만, P2Y₃ 수용기에 대해 알려진 바에 의하면 조류에 존재하는 이 수용기는 UDP에 의해 활성화되며, suramin과 reactive blue 2에 의해서 그 활성이 억제된다는 보고가 있다(Webb 등, 1996). 타액선에서는 아직까지 P2Y₃ 수용기의 자극물질과 길항제에 대해서 알려진 바가 없으나, RT-PCR 실험 결과를 비추어 볼 때 P2Y₃가 vEG 타액분비에 관여할 가능성을 배제할 수 없다. 또한 칼슘 특이이온형광분석법을 통하여 RT-PCR 실험 결과 vEG 조직에서 나타난 P2X₄, P2Y₁, P2Y₂ 수용기의 mRNA는 근육 조직이 아닌 vEG 조직에서 유래된 것임을 알 수 있었다.

본 연구에서는 vEG 선코 세포에 P2X₄, P2Y₁, P2Y₂, 그리고 P2Y₃의 수용기의 mRNA가 발현하는 것을 확인하였으며, vEG 타액분비는 P2X₄, P2Y₁, P2Y₂ 수용기를 통하여 유도되는 것으로 사료되며, P2Y₃ 수용기도 관여할

수 있음을 시사한다.

본 연구를 바탕으로 소타액선에 존재하는 P2Rs가 vEG의 타액 분비와 단백질 분비에 어떠한 영향을 미치며, 성곽유두와 앞새유두의 미각 전달에 관여하는 장애성인 타액선의 흥분성 분비 기구를 이해하기 위한 연구가 더 이뤄져야 할 것으로 사료된다.

결론

vEG은 혀의 성곽유두와 앞새유두에서 미각세포의 미세 환경을 구성하는 타액을 분비한다. vEG에 대한 연구는 성곽유두와 앞새유두에 존재하는 peri-receptor 기구를 이해하는데 도움을 줄 뿐만 아니라, 장애성인 타액선의 흥분성 분비기구에 대한 이해에 도움을 줄 것으로 생각된다. 지금까지 다양한 세포와 조직에서 P2 수용기에 대한 연구가 이뤄지고 있으며, 이하선 및 악하선 선코세포와 도관세포에서 퓨린 동작성 수용기의 발현에 대한 보고는 있으나 vEG 선코세포에 존재하는 퓨린 동작성 수용기에 대해서는 잘 알려져 있지 않다. 본 연구는 vEG에서 퓨린 동작성 수용기의 존재를 확인하기 위하여 RT-PCR 실험을 실시하고, 세포내 Ca²⁺ 활성도를 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

첫째, RT-PCR 실험으로 vEG 선코세포에는 P2X₄, P2Y₁, P2Y₂, 그리고 P2Y₃의 mRNA가 존재하는 것을 확인하였다.

둘째, 세포 내 Ca²⁺의 활성도는 P2 수용기의 자극약물인 10 μM 농도의 ATP에 의하여 현저히 증가하였으나, P2X₄과 P2X₃ 수용기의 자극약물인 300 μM 농도의 αβ-MeATP를 가한 경우에는 세포내 Ca²⁺ 활성도의 증가는 전혀 나타나지 않았다. ATP의 자극에 의해 유발된 반응은 HEPES 완충 Tyrode 용액에서 Ca²⁺를 제거한 경우에도 유지되었다.

셋째, P2Y₁과 P2Y₂ 수용기의 자극약물인 2-MeSATP는 10 μM의 농도에서 세포내 Ca²⁺ 활성도를 증가시켰고, P2Y₂ 수용기의 자극약물로 사용한 10 μM UTP는 Ca²⁺를 제거한 HEPES 완충 Tyrode 용액에서 세포내 Ca²⁺ 활성도를 증가시켰다.

넷째, ATP로 유발되는 세포내 Ca²⁺ 증가 현상은 P2X 수용기의 길항제인 suramin과 P2Y 수용기의 길항제인 reactive blue 2에 의해 10 μM의 농도에서 부분적으로 차단되었지만, Ca²⁺이 제거된 HEPES 완충 Tyrode 용액에서는 suramin에 의한 억제현상이 관찰되지 않았다.

이상의 결과들로 미루어 보아 흰쥐 vEG의 선코세포에는 P2Rs의 아형인 P2X₄, P2Y₁, P2Y₂, 그리고 P2Y₃가 존재하며 기능적으로도 생리학적 활성을 지니고 있음을 시사하고 있다.

감사의 글

본 연구는 2003년도(KRF-2003-042-E00125)도 및 2004년도(KRF-2004-042-E00122) 한국학술진흥재단 협동 연구 지원에 의하여 연구되었음.

참고 문헌

- 김경년: Von Ebner 타액선 세포의 전기생리학적 특성에 관한 연구. 대한치과의사협회지, 38:378-384, 1998.
- 김경년, 천성우: 특수감각, 전국치과대학(원) 생리학 교수협의회 저: 치의학을 위한 생리학, pp 403-414, 대한나래출판사, 서울, 2005.
- Baryshnikov, S.G., Rogachevskaja, O.A. and Kolesnikov, S.S.: Calcium signaling mediated by P2Y receptors in mouse taste cells. *J Neurophysiol* 90:3283-3294, 2003.
- Bo, X., Alavi, A., Xiang, Z., Oglesby, I., Ford, A. and Burnstock, G.: Localization of ATP-gated P2X2 and P2X3 receptor immunoreactive nerves in rat taste buds. *Neuroreport* 10:1107-1111, 1999.
- Buell, G., Collo, G. and Rassendren, F.: P2X receptors: an emerging channel family. *Eur J Neurosci* 8:2221-2228, 1996.
- Choi, R.C., Man, M.L., Ling, K.K., Ip, N.Y., Simon, J., Barnard, E.A. and Tsim, K.W.: Expression of the P2Y1 nucleotide receptor in chick muscle: its functional role in the regulation of acetylcholinesterase and acetylcholine receptor. *J Neurosci* 21:9224-9234, 2001.
- Communi, D., Goyarts, C., Parmentier, M. and Boeynaems, J.M.: Cloning of a human purinergic P2Y receptor coupled to phospholipase C and adenylyl cyclase. *J Biol Chem* 272:31969-31973, 1997.
- Fredholm, B.B., Abbracchio, M.P., Burnstock, G., Daly, J.W., Harden, T.K., Jacobson, K.A., Leff, P. and Williams, M.: Nomenclature and classification of purinoceptors. *Pharmacol Rev* 46:143-156, 1994.
- Gurkan, S. and Bradley, R.M.: Autonomic control of von Ebner's lingual salivary glands and implications for taste sensation. *Brain Res* 419:287-293, 1987.
- Harden, T.K., Nicholas, R.A., Schachter, J.B., Lazarowski, E.R. and Boyer, J.: Pharmacological selectivities of molecularly defined subtypes of P2Y receptors. In: Turner, J.T., Weisman, G.A. and Fedan, J.S., eds.: The P2 nucleotide receptors, pp 109-134, Humana Press, Totowa, 1997.
- Dehaye, J.P., Moran, A. and Mario, M.: Purines, a new class of agonists in salivary glands. *Arch Oral Biol* 44:S39-S43, 1999.
- Lindemann, B.: Taste reception. *Physiol Rev* 76:719-766, 1996.
- Li, Q., Olesky, M., Palmer, R.K., Harden, T.K. and Nicholas, R.A.: Evidence that the P2Y₃ receptor is the avian homologue of the mammalian P2Y₆ receptor. *Mol Pharmacol* 54:541-546, 1998.
- Luo, X., Zheng, W., Yan, M., Lee, M.G. and Muallem, S.: Multiple functional P2X and P2Y receptors in the luminal and basolateral membranes of pancreatic duct cells. *Am J Physiol* 277:C205-C215, 1999.
- McMillian, M.K., Soltoff, S.P., Cantley, L.C. and Talamo, B.R.: Extracellular ATP elevates intracellular free calcium in rat parotid acinar cells. *Biochem Biophys Res Commun* 149:523-530, 1987.
- Nicholas, R.A., Watt, W.C., Lazarowski, E.R., Li, Q. and Harden, T.K.: Uridine nucleotide selectivity of three phospholipase C-activating P2 receptors: identification of a UDP-selective, a UTP-selective, and an ATP- and UTP-specific receptor. *Mol Pharmacol* 50:224-229, 1996.
- North, R.A. and Barnard, E.A.: Nucleotide receptors. *Curr Opin Neurobiol* 7:346-357, 1997.
- Park, M.K., Garrad, R.C., Weisman, G.A. and Turner, J.T.: Changes in P2Y1 nucleotide receptor activity during the development of rat salivary glands. *Am J Physiol* 272:C1388-1393, 1997.
- Putney, J.W.: Identification of cellular activation mechanisms associated with salivary secretion. *Ann Rev Physiol* 48:75-88, 1986.
- Quissell, D.: Stimulus-exocytosis coupling mechanism in salivary gland cells. In: Dobrosielski-Vergona K, ed.: *Biology of the Salivary Glands*, pp 181-200, CRC Press, Boca Raton, 1993.
- Rong, W., Burnstock, G. and Spyer, K.M.: P2X purinoceptor-mediated excitation of trigeminal lingual nerve terminals in an in vitro intra-arterially perfused rat tongue preparation. *J Physiol* 524:891-902, 2000.
- Spielman, A.I.: Interaction of saliva and taste. *J Dent Res* 69:838-843, 1990.
- Sugiya, H. and Furuyama, S.: The activation of Ca²⁺-mobilizing receptors in salivary gland. *Biomed Res* 10:111-121, 1989.
- Takuma, T. and Ichida, T.: Catalytic subunit of protein kinase A induces amylase release from streptolysin O-permeabilized parotid acini. *J Biol Chem* 269:22124-22128, 1994.
- Turner, J.T., Landon, L.A., Gibbons, S.J. and Talamo, B.R.: Salivary gland P2 nucleotide receptors. *Crit Rev Oral Biol Med* 10:210-224, 1999.
- Turner, J.T., Weisman, G.A., Landon, L.A., Park, M. and Camden, J.M.: Salivary gland nucleotide receptors: evidence for functional expression of both P2X and P2Y subtypes. *Eur J Morphol* 36 Suppl 1:170-175, 1998.
- Turner, R.J. and Sugiya, H.: Understanding salivary fluid and protein secretion. *Oral Diseases* 8:3-11, 2002.
- Webb, T.E., Henderson, D., King, B.F., Wang, S., Simon, J., Bateson, A.N., Burnstock, G. and Barnard, E.A.: A novel G protein-coupled P2 purinoceptor(P2Y₃) activated preferentially by nucleoside diphosphates. *Mol Pharmacol* 50:258-265, 1996.
- Weisman, G.A., Gonzalez, F.A., Erb, L., Garrad, R.C. and Turner, J.T.: The cloning and expression of G protein-coupled P2Y nucleotide receptors. In: Turner, J.T., Weisman, G.A. and Fedan, J.S., eds.: *The P2 nucleotide receptors*, pp 63-79, Humana Press, Totowa, 1997.