

Swelling-activated Cl⁻ Channels in Human Salivary Gland Acinar Cells

Gehoon Chung¹, Jaehyun Sim¹, Soung Min Kim², Jong-Ho Lee², Gae-Sig Chun³,
Se-Young Choi¹, and Kyungpyo Park¹

¹Department of Physiology, ²Department of Oral and Maxillofacial Surgery, School of Dentistry, Seoul National University and Dental Research Institute, Yeongeondong 28, Chongnoku, Seoul 110-749,

³Department of Oral Physiology, School of Dentistry, Dankook University, Cheonan 330-714, Korea

(received September 4, 2009 ; revised September 10, 2009 ; accepted September 14, 2009)

The role of Cl⁻ channels in regulatory volume decrease (RVD) in human salivary gland acinar cells was examined using a whole-cell patch clamp technique. Human tissues were obtained from healthy volunteers or from patients with oromaxillofacial tumors. During the measurements, K⁺-free solutions were employed to eliminate contamination of whole-cell conductance by K⁺ currents. When the cells were exposed to a 70% hypotonic solution, outward-rectifying currents, which were not observed in the resting state, were found to have significantly increased both in human labial and parotid gland acinar cells. The amplitudes of the currents were reduced in a low Cl⁻ bath solution. Furthermore, the addition of 100 μM 5-Nitro-2-(3-phenyl propylamino) benzoic acid (NPPB) or 100 μM 4,4'-diisothiocyanatostilbene -2,2'-disulphonic acid (DIDS), known to partially block Cl⁻ channels, significantly inhibited these currents. Its outward-rectifying current profile, shift in reversal potential in a low Cl⁻ bath solution and pharmacological properties suggest that this is a Ca²⁺-independent, volume activated Cl⁻ current. We conclude therefore that volume activated Cl⁻ channels play a putative role in RVD in human salivary gland acinar cells.

Key words : Cl⁻ channels, Regulatory volume decrease (RVD), Hypotonic, NPPB, DIDS

*Corresponding author: Kyungpyo Park, Department of Physiology, School of Dentistry, Seoul National University 28 Yeongeondong Chongnoku, Seoul, Korea 110-749. Tel.: +82-2-740-8658, Fax.: +82-2-762-5107, E-mail: kppark@snu.ac.kr

서론

상피세포를 포함한 많은 포유류 세포들은 세포의 환경 변화에 의해 세포볼륨의 변화가 초래되면 스스로 볼륨을 조절할 수 있는 능력을 갖고 있다. 예를 들면 아미노산들을 세포내로 흡수하거나 저장성 용액에 노출된 세포는 팽창하며, 팽창된 세포가 원래의 볼륨으로 돌아가기 위해 수축되는 현상을 Regulatory Volume Decrease (RVD) 라고 한다. 외분비선의 하나인 타액선의 경우, 타액 분비시 많은 양의 용액이 선강내로 빠져 나감으로서 세포의 볼륨변화가 빈번하게 일어날 것을 예측할 수 있지만, 이에 관여하는 이온 통로의 종류 및 역할은 아직도 명확하게 규명되어 있지 않다.

침샘, 누선(lacrimal gland) 그리고 타액선은 모두 외분비선(exocrine gland)의 일종이며, 이들은 흡수 및 분비 상피세포(absorbing and secreting epithelia)로 구성되어 있고 이들 모두에서 초기타액의 형성과정에서 볼륨조절이 빈번하게 일어난다. 타액분비는 무스카린 수용체(Nakahari et al., 1990) 및 퓨린 동작성 수용체 자극에 의해 유발된다(Kim et al., 2006). Foskett 과 Melvin (1989)은 Ca²⁺과 세포 볼륨과의 상관 관계를 보고하였고, Nakahari 등(1990)은 관류시킨 whole gland를 사용한 악하선 실험에서 아세틸콜린에 의해 Cl⁻ 유출과 관련된 세포의 수축이 일어난다고 하였다. RVD시에는 K⁺ 채널도 관여하는데, Moran과 Turner (1993)는 사람 타액선 도관 세포주를 이용한 실험에서 carbachol 자극에 의해 RVD가 관찰되며 이때 K⁺ 채널이 관여한다고 하였고, Park(1994)은 누선에서 RVD시 칼슘 의존성 K⁺ 채널이 활성화됨을 보고한 바 있다. 세포내 Ca²⁺이 RVD와 밀접한 관련이 있다는 보고도 있으나(McCarty and O'Neil, 1991; Montrose-Rafizadeh and Guggino,

1991; Negulescu et al., 1992; Speake et al., 1998), 이는 세포의 종류에 따라 차이를 보이고 타액선에서의 역할은 아직 불분명 하다(Foskett et al., 1994).

그중 Cl^- 채널은 등장성의 NaCl 이 풍부한 초기타액(primary saliva) 형성에 관여하는 매우 중요한 이온 통로이지만, 그 종류가 다양하여 과연 이중 어떤 Cl^- 채널이 주된 역할을 하는지 불확실하다. 외부비선 상피세포에서 현재까지 세포볼륨증가에 의해 활성화되는 후보 Cl^- 채널로는 ClC-2 , Volume Sensitive and Osmolyte Anion channels(VSOAC), 그리고 Ca^{2+} -activated Cl^- 채널 등이 거론되고 있다(Kotera and Brown, 1993; Strange et al., 1996). 볼륨조절에 관여하는 Cl^- 채널(Fatherazi et al., 1994; Arreola et al., 1996; Park et al., 1994; Park and Brown, 1995; Park et al., 2001; Majid et al., 2001)의 역할에 관해서는, 각각의 채널들이 독립적으로 활성화되는지 아니면, 이들 후보 Cl^- 채널이 상호 보완적으로 작용하여 RVD를 유발시키는지 아직 밝혀진바 없기 때문에 더 많은 연구를 필요로 한다. 본 연구의 목적은 사람 타액선 선포세포가 세포밖 삼투질 농도변화에 의해, volume activated Cl^- 채널이 활성화 되는지, 그리고 단일 활성화된다면, 이때 기록되는 Cl^- 채널의 전기, 약리학적 특성은 어떠한지 규명해 보고자 하였다.

실험 재료 및 방법

자원자로부터 생검 또는 중앙등으로 인해 외과적 처치로 타액선 적출이 시행된 환자로부터 타액선 조직을 얻어 1시간 이내에 세포 분리를 시행하였으며, 이 실험은 서울대학교 치과병원의 연구윤리심의 위원회의 승인하에 수행되었다(CRI06002). Trypsin, collagenase 그리고 trypsin inhibitor가 첨가된 Ca^{2+} -free HEPES 용액 (단위 (mM): 130 NaCl, 4.5 KCl, 1 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 10 HEPES, 10 HEPES-Na, 10 D-glucose; pH 7.4, giving an osmolarity of 290 mosmol/Kg. H_2O)에서 1시간동안 효소 처리 및 배양한 후 한 개 혹은 다발의 선포세포로 분리해 내었으며(Park et al., 2001), 이후 분리된 사람의 단일 타액선 선포세포에서 whole cell patch clamp 방법을(Hamil et al., 1981) 이용해 세포막의 이온 전류를 측정하였다. 정상 관류용액은 140 NaCl, 5 KCl, 1 MgCl_2 , 1 CaCl_2 , 5 HEPES, pH 7.4 (pH adjusted with NaOH), osmolarity; 290mosmol/Kg. H_2O 으로 구성되었으며, 순수한 Cl^- 전류만을 기록할때는 NMDG-Cl bath solution (140 NMDG-Cl, 2 MgCl_2 , 1.16 CaCl_2 , 5 HEPES, 1.34 EGTA, pH 7.4 adjusted with Tris base, osmolarity; 293mosmol/Kg. H_2O)을 사용하였다. 전류의 특성을 파악하기 위해 때로 낮은 농도의 Cl^- bath solution(14 mM)을 사용하였으며, 이 용액의 조성은 다음과 같다. 130 Sodium aspartate, 10 NaCl,

1 MgCl_2 , 1 CaCl_2 , 10 HEPES, 10 glucose, 15 mannitol, pH 7.4 (pH adjusted with NaOH). Pipette 용액의 성분은 K^+ 전류를 제거하고 Cl^- 만을 선택적으로 기록하기 위해 다음과 같은 용액이 사용되었다. 20 NaCl, 110 Sodium aspartate, 5 Na_2ATP , 5 BAPTA, 10 HEPES, 10 D-glucose; pH 7.2, Osmolarity; 303 ± 1.4 mosmol/Kg. H_2O (n=3). 5 mM BAPTA는 강한 Ca^{2+} 완충제로서 Ca^{2+} -activated Cl^- 채널을 억제시키는 역할을 한다. 한편 모든 저장성 용액의 경우는 NMDG-Cl bath solution에 증류수를 첨가하여 정상 관류용액에 비해 약 70%의 삼투질 농도가 되도록 하였다.

먼저 안정상태에서 세포막 이온 전류를 연속적으로 기록하면서 안정된 기록이 가능해 지면, 그 다음 단계로 저장성의 관류용액을 이용해 세포의 볼륨을 증가시키고, 이때 용적 변화에 의해 Cl^- 채널이 활성화 되는지, 그리고 이 활성화된 Cl^- 채널의 전기, 약리적 특성을 규명하였다. Whole cell current는 제진대(vibration free table) 상에 설치된 역조명 현미경(olympus, IMT-2, 일본) 시야에서 단일세포로부터 기록되었다. 기록용 전극은 microhematocrit 용 유리관(Chase,미국)을 이용하여 2단계 전극제조기(Narishige, PP-83,일본)로 저항이 2-5M Ω 이 되도록 제작하여 사용하였다.

기록용 전극을 patch clamp용 증폭기(Axon instrument, Axopatch 1-C, 미국)에 연결한 후 oscilloscope로 관찰하면서 동시에 PCM module(Medical System co., 미국)을 통하여 비디오 카세트 태입에 기록하여 분석에 사용하였다. 분석시는 pClamp(Axon instrument, version 6.1, 미국) software를 이용하였다. 계속적인 전류의 기록은 유지 전압을 -40 mV로 하고 순간적으로 +60 mV와 -60 mV로 변동시킨 지시 전압을 5sec 간격으로 주었다. 또한 볼륨에 의해 활성화되는 전류의 특성을 알아보기 위해 Pulse protocol은 -80 mV를 고정전압으로 하여 20 mV 간격으로 -100 mV에서부터 최대 +100 mV 까지 증가시켰으며 모든 실험은 상온에서 시행되었다.

결 과

초기 타액(primary saliva)을 생산해내는 사람 타액선 선포 세포를 저장성 용액에 노출시켰을 때, 타액분비와 가장 밀접한 관련을 갖고 있는 Cl^- 전류가 활성화 되는지 살펴보고, 또한 이 전류의 전기적 특성을 규명하였다. Fig. 1은 생검(biopsy)을 통해, 정상성인에서 분리한, 입술안쪽에 위치한 소타액선의 일종인 입술샘(labial gland)의 선포세포에서 연속적으로 기록한 whole cell current이다. 안정상태에서는 매우 작은 크기의 leak current 만이 관찰되지만, 70%의 저장성 용액에 노출시키면 이 전류는 서서히 활성화되다가 약 5분이 경과할 무렵, 외향성과 내향성 전류 모두 갑자기 활성화되면서 최대 약 1.4 nA 정도까지 증가되었다. 그리고 이때 외,내향성 전류가 가장 활성화

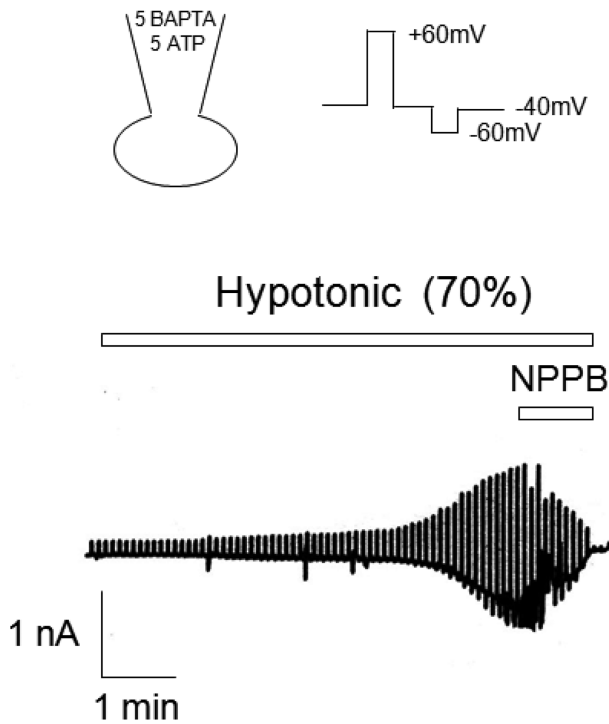


Fig. 1. A typical volume activated Cl⁻ currents from the dissociated single acinar cells in human labial glands. When the cell were exposed to 70% hypotonic solution, both inward and outward currents were slowly activated. The maximum current of 1.4 nA was observed 6 min after hypotonic solution, which was immediately blocked by 100 uM NPPB, a Cl⁻ channel blocker.

된 상태에서 Cl⁻ 통로 부분 억제제인 100 uM NPPB를 투여하면 저장성 용액내에서 이 전류는 유의하게 억제되었다. 이러한 사실은 저장성 용액에서 세포팽창에 의해 유발된 이 전류가 Cl⁻ 전류임을 말해준다.

Fig. 2는 사람 이하선 선포세포에서 기록한 전류로서, 타액선 종양으로 인해 이하선을 적출한 환자로부터 채취한 것이다. 사람 소타액선 선포세포막에서 기록한 것과 유사하게 저장성 용액에 노출시키면 Cl⁻ 전류가 활성화된다. 안정상태에서는 매우 작은 크기의 leak current 만이 관찰되지만(Fig. 2Aa), 70%의 저장성 용액에 노출시키면 Cl⁻ 전류가 서서히 활성화되기 시작한다. Fig. 2Ab는 약 6분이 경과했을때의 전류의 크기로서 안정시에 비해 조금 증가된 것을 볼 수 있으며, 이후 다시 약 3.5분이 경과했을 때 외향성과 내향성 전류가 모두 크게 활성화된다. Fig. 2B는 A에서 표시된 시점 a,b,c에서 지시전압을 주어 이때 기록된 전류의 형태를 보여주는데, 시간이 경과함에 따라 전류가 서서히 증가하는 것을 알 수 있으며, Fig. 2Bc는 전형적인 volume activated Cl⁻ current의 profile이다.

Fig. 3는 또 다른 이하선 선포세포에서 기록한 전류로서, 저장성 용액에서 이미 활성화된 전류의 특성을 규명해 보았다. 저장성 용액에서 활성화된 Cl⁻ 전류는 세포의 용액을 낮은 Cl⁻ 농도 관류액으로 대치시키면 전류의 크

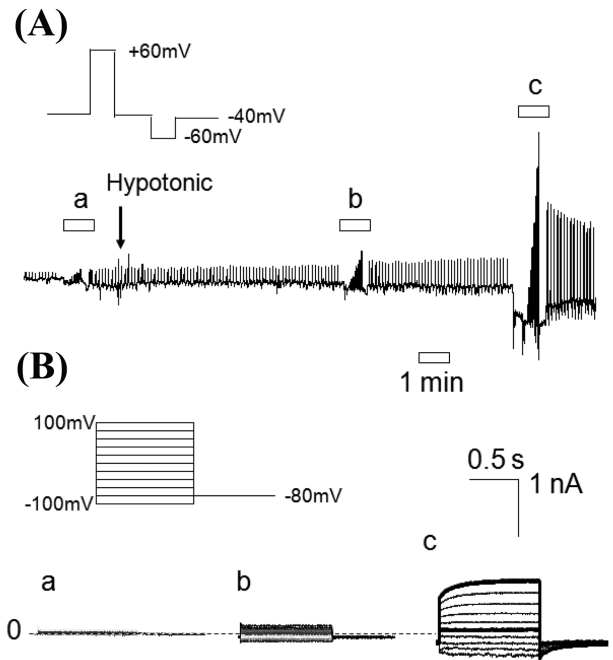


Fig. 2. A typical volume activated Cl⁻ currents from the dissociated single acinar cells in human parotid glands. (A) When the cells are exposed to 70% hypotonic solution, both the inward and outward currents were slowly activated. The maximum current was observed roughly 12 min after hypotonic solution. (B) The current profiles in Fig. 2Bc shows that it is a typical volume activated Cl⁻ currents.

기가 감소되고 다시 정상 Cl⁻ 용액으로 바꾸어주면 전류의 크기가 회복되는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 3A). 그리고 외,내향성 전류가 활성화된 상태에서 두 종류의 Cl⁻ 채널 억제제, 100 uM NPPB와 100 uM DIDS를 투여해 보았다. Fig. 3A에서 보는 바와 같이 NPPB와 DIDS는 모두 이 전류를 뚜렷이 억제하였고, washout시에는 회복되며 저장성 용액의 삼투질 농도를 70%에서 50%로 낮추어 주면 더욱 큰 외,내향성 전류가 발생하는 것으로 보아 이 전류가 세포용적 변화에 의해 활성화 되는 전류임을 다시 한번 확인시켜 주었다. Fig. 3의 B와 C는 안정상태(○), 저장성 용액에서 활성화된 전류(●)의 전류전압 곡선이다. Fig. 3C는 두 종류의 Cl⁻ 전류 억제제, NPPB와 DIDS가 외향 및 내향성 전류를 억제시키는 정도를 도표로 표시한 것이다. NPPB는 RVD시 활성화된 외향전류 및 내향전류를 각각 control에 비해 0.79 ± 0.04 (n=3) 및 0.74 ± 0.12 로 감소시켰다. DIDS 역시 외향전류를 0.78로 감소시켰으나, 내향전류에 대한 억제효과는 관찰되지 않았다.

이상의 결과는 사람 타액선 선포 세포막에도 volume activated Cl⁻ channel이 기능적으로 발현하고 있다는 것을 보여주었다. Cl⁻ 의 농도 변화에 따른 전압의 크기감소, 관류용액의 osmolarity를 낮추어주면 더 활성화되는 특성, 그리고 NPPB 및 DIDS에 의해 부분적으로 억제되는 약리학적 특성 등은 이 채널이 볼륨에 의해 활성화되는, 칼슘 비의존적이고 세포 볼륨에 의해 활성화되는 Cl⁻ 채널임을 말해준다.

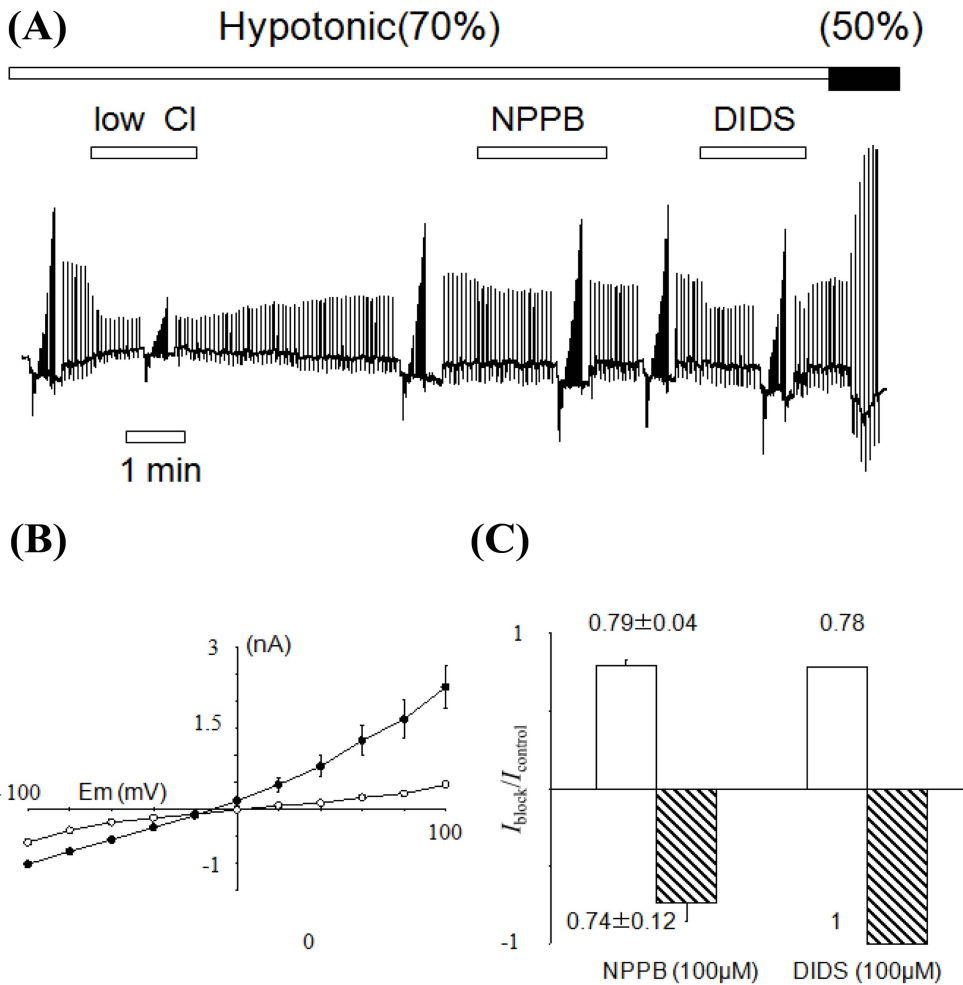


Fig. 3. Characteristics of volume activated Cl⁻ currents in human parotid gland acinar cells. (A) When the bath solution was changed to the low Cl⁻, the amplitudes of currents were significantly reduced. The activated currents were inhibited in the presence of 100 μM NPPB or 100 μM DIDS and they were further activated by the exposure to the more diluted solution, 50%. (B) Average I-V relationship of the currents(n = 3), in resting (○) and volume activated state(●). (C) A summarized result showing the inhibitory effect of NPPB(n=3) and 100 μM DIDS(n = 1). Open and scratched bar indicates the outward and inward current, respectively.

고찰 및 결론

타액선 선포세포를 저장성 용액에 노출시키면, 세포가 팽창되고 뒤이어 자발적인 세포 볼륨의 감소(RVD)가 관찰된다(Park et al., 2002). 이러한 RVD는 세포내 칼슘의 농도가 증가되고 이는 세포내 칼슘저장고로부터 칼슘이 세포질내로 유리되고 또한 세포밖의 칼슘이 세포내로 유입된 결과이다. 세포내 칼슘농도 증가는 시간적으로 항상 RVD보다 선행해서 관찰되기 때문에 세포내 칼슘은 RVD 시 매우 중요한 역할을 함을 알 수 있다(Park et al., 2002). 실제로 강한 Ca²⁺ 완충제인 BAPTA로 전처리하면 RVD가 관찰되지 않는다. 타액선 및 누선에서는 세포 팽창에 의해 세포내 칼슘의 농도가 증가되면 칼슘 의존성의 Ca²⁺-activated K⁺ 및 Cl⁻ 채널이 활성화되고 fluid가 빠져 나감으로서 세포볼륨이 감소할 수 있다(Kotera & Brown, 1993; Park et al, 1994; Speake et al 1998). 하지만 모순되게도

fura-2로 loading 시킨 누선에서는 hypotonic stress시, 세포내 칼슘농도 증가가 관찰되지 않았다(Elliott, 1994; Speake et al 1998). 이는 세포내 칼슘농도 증가가 국소적으로 발생했고 세포질전체로 퍼져나가지 못했기 때문이라고 해석할 수 있지만, 칼슘 의존성 채널이 아닌 또 다른 채널이 RVD에 관여할 가능성이 있음을 시사해 준다. 실제로 세포내 칼슘의 농도는 일과성으로서 오래 지속되지 못한다. 본 실험은 사람 타액선에서 RVD시 칼슘 비의존성 채널이 존재하며 또한 활성화된다는 것을 최초로 보여주었다. 본 실험에서 기록된 전류가 칼슘 비의존성 Volume activated Cl⁻ current 라는 증거는 아래와 같다. 첫째로 본 실험에서는 whole cell recording 시 K⁺ 전류에 의한 오염을 방지하기 위해, Pipette 용액의 성분은 K⁺ 이 없는 Cl⁻ 만을 선택적으로 기록하기 위한 용액이 사용되었다. 또한 세포밖 관류액의 Cl⁻ 농도를 낮추게 되면 전류의 크기가 감소하고, 역전전압의 양방향으로의 이동이 관찰되어 이 전류가

Cl⁻ 농도에 의한 것임을 보여준다. 둘째로 NPPB와 DIDS는 부분적인 Cl⁻ 전류 억제제임이 잘 알려져 있는데, 이 두 약물은 모두 유의하게 세포 볼륨 변화에 의해 야기된 Cl⁻ 전류를 감소시켰고 그중 NPPB의 억제 효과는 소타액선인 labial glands에서 더 뚜렷이 관찰되었다. 뿐만 아니라 이 전류는 세포의 팽창 정도와 비례해서 증가되었다. 즉 세포밖의 삼투질 농도를 70%에서 50%로 낮추어 주면 더욱 큰 외내향성 전류가 발생되는 것으로 보아(Fig. 3A) 이 전류가 세포볼륨 변화에 의해 활성화되는 전류임을 다시 한번 확인시켜 주었다. 이상의 결과는 사람 타액선 세포 세포막에도 volume activated Cl⁻ 채널이 존재하며 기능을 발휘한다는 것을 보여주었고, 앞으로 이 Cl⁻ 채널의 볼륨조절과 관계된 세포내 신호 전환 기전 및 생리학적 기능에 관해 계속적인 연구가 필요할 것으로 보인다.

감사의 글

This work was supported by the Korea Science & Engineering Foundation (KOSEF) grant funded by Korea government(R13-2008-008-01001-0) through the Oromaxillofacial Dysfunction Research Center for the Elderly at Seoul National University.

참고문헌

- Arreola J, Park, K, Melvin JE, Begenisich T. Three distinct chloride channels control anion movements in rat parotid acinar cells. *J Physiol*. 1996; 490(2): 351-362.
- Elliott AC. Effects of cell swelling on intracellular calcium in isolated rat lacrimal acinar cells. *J Physiol*. 1994; 477: 9P.
- Fatherazi S, Izutsu KT, Wellner RB, Belton CM. Hypotonically activated chloride current in HSG cells. *J Membr Biol*. 1994; 142(2):181-193.
- Foskett JK, Melvin JE. Activation of salivary secretion : coupling of [Ca²⁺]_i and cell volume. *Science*. 1989; 244:1582-1585.
- Foskett JK, Wong MMM, Sue-A-Quan G, Robertson MA. Isosmotic modulation of cell volume and intracellular ion activities during stimulation of single exocrine cells. *J Exp Zool*. 1994; 268,104-110.
- Kotera T, Brown PD. Calcium-dependent chloride current activated by hyposmotic stress in rat lacrimal acinar cells. *J Membr Biol*. 1993; 134(1):67-74.
- Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ. Improved patch clamp techniques for high resolution current recording from cells and cell free membrane patches. *Pfuegers Arch*. 1981; 391:85-100.
- Kim SH, Cho YK, Chung KM, Kim KN. Purinergic Receptors Play Roles in Secretion of Rat von Ebner Salivary Gland. *Int J Oral Biol*. 2006; 31(4):.141-148.
- Majid A, Brown PD, Best L, Park K. Expression of volume sensitive Cl⁻ channels and ClC-3 in acinar cells isolated from the rat lacrimal gland and submandibular salivary gland. *J Physiol*. 2001; 534: 409-421..
- McCarty NA, ONeil RG. Calcium dependent control of volume regulation in renal proximal tubule cells: I. Swelling-activated entry and Ca²⁺ release. *J Membr Biol*. 1991; 123, 149-160.
- Montrose-Rafizadeh C, Guggino WB. Role of intracellular calcium in volume regulation by rabbit medullary thick ascending limb cells. *Am J Physiol*. 1991; 260: F402-409.
- Moran A, Turner RJ. Secretagogue-induced RVD in HSY cells is due to K⁺ channels activated by Ca²⁺ and protein kinase C. *Am J Physiol*. 1993; 265(5 Pt 1):C1405-11.
- Nakahari T, Murakami M, Yoshida H, Miyamoto M, Sohma Y, Imai Y. Decrease in rat submandibular acinar cell volume during Ach stimulation. *Am J Physiol*. 1990; 258:G878-G886.
- Negulescu PA, Munck B, Machen TE. Volume-sensitive Ca influx and release from intracellular pools in gastric parietal cells. *Am J Physiol*. 1992; 263: C584-C589.
- Park K, Beck JS, Douglas IJ, Brown PD. Ca²⁺-activated K⁺ channels are involved in regulatory volume decrease in acinar cells isolated from the rat lacrimal gland. *J Membr Biol*. 1994; 141:193-201.
- Park K. Swelling-induced activation of K⁺ channels is mediated by Ca²⁺ influx in rat lacrimal acinar cells. *J Oral Biol*. 1994; 18(1): 55-62,1994.
- Park K, Brown PD. Intracellular pH modulates the activity of chloride channels in isolated lacrimal gland acinar cells. *Am J Physiol* 1995; 268: C647-C650.
- Park K, Case RM, Brown PD. Identification & regulation of K⁺ & Cl⁻ channels in human parotid acinar cells. *Arch Oral Biol*. 2001; 46(9):801-810.
- Park K, Lee S, Elliott AC, Kim JS, Lee JH. Swelling-induced Ca²⁺ release from intracellular calcium stores in rat submandibular gland acinar cells. *J Membr Biol*. 2002;186 (3):165-176.
- Speake T, Douglas IJ, Brown PD. The role of calcium in the volume regulation of rat lacrimal acinar cells. *J Memb Biol* 1998; 164: 283-291.
- Strange K, Emma F, Jackson PS. Cellular and molecular physiology of volume sensitive anion channels. *Am J Physiol*. 1996; 270:C711-C730.