

백서 타액선 선포 세포의 배양

서울대학교 치과대학 구강내과·진단학 교실¹, 강릉대학교 치과대학 구강생화학 교실²

이 승 우¹·한 송²·고 홍 섭¹

목 차

- I. 서 론
- II. 연구대상 및 연구방법
- III. 결 과
- IV. 총괄 및 고찰
- V. 결 론
- 참고문헌
- 영문초록

I. 서 론

인체의 타액은 이하선, 악하선, 설하선 같은 주 타액선과 구강내에 넓게 분포하고 있는 여러 개의 작은 소 타액선으로부터 생성, 분비된다. 주 타액선은 분비물을 선외 분비관(extraglandular excretory duct)을 통해서 내보내는 반면, 소 타액선은 구강점막의 고유층이나 점막하층에 있으면서 분비물을 매우 짧은 분비관을 통해서 내보낸다. 일차 타액(primary saliva)은 선내 선포세포(acinar cell)에서 생성되어진 상태의 타액으로 이는 도관(duct system)의 세포들에 의하여 변형되어 최종 타액(final saliva)으로 구강 내에 분비되는데 일차 타액이나 최종 타액의 구성 성분은 각 타액선에 따라 특징적이며, 각 타액선의 분비세포나 도관세포의 성상에 따라 다르다¹⁾. 최종 타액은 시료의 채취가 용이하다는 점에서 분

비 생리를 연구하는데 주로 이용되어져 왔으며, 실험 동물의 경우에도 수술 술식을 거의 시행하지 않고 타액의 채취가 가능한 장점이 있다. 이와 같이 여러 *in vivo* 실험들을 통해서 타액 분비 생리에 관한 많은 사실들이 밝혀져 왔다. 그러나 살아있는 생물에서 분비물들이 어떻게 만들어지고 어떻게 모아지며 또 어떻게 조절되는가에 관련된 매우 복잡한 기전들은 아직까지 잘 알려져 있지 않다. 이러한 한계를 극복하기 위하여 1960년대 후반부터 micropuncture 술식^{2,3)} perfusion 술식^{4,5)} 또는 선의 절편(gland slices)⁶⁾을 사용하여 연구를 시행하여 왔으나, 이러한 방법들은 분비 기전의 복잡성 중 일부만을 해결했을 따름이고 영양소와 산소를 기질세포(parenchymal cell)에 충분히 공급할 수 없다는 점에서 한계를 가지고 있었다. 70년대 이후로는 세포내 소기관과 세포액을 사용한 연구^{7,8)}들이 타액선 대사 중 세포내에서 일어나는 동력학에 관한 중요한 지식들을 밝혀주었으나, 이 방법 또한 타액선 세포가 여러 가지 외적 자극에 반응하는 것을 보려면 완전한 기질세포를 필요로 한다는 점에서 제한점들을 가지고 있었다.

외분비 선포세포, 특히 타액선 선포세포는 일반적으로 *in vitro*에서 기르기가 힘들었다. 최초로 체장에서 완전한 세포를 분리한 것은⁹⁾ 중요한 발전의 하나이기는 했으나, 세포의 전반적인 완전성이나 외부 자극에 대한 반응성에 관한 결

* 본 연구는 한국과학재단 핵심전문 연구과제(과제번호 951-0703-030-2)의 지원에 의한 것임.

과는 기대 수준에 미치지 못하였다. 그 후 정제된 단백분해 효소와 hyaluronidase를 써서 좋은 결과를 얻었고¹⁰⁾, 이 방법은 곧 타액선 세포를 분리하는데 이용되었다^{11,12)}.

그 후 1979년에 Quissell과 Redman¹³⁾에 의해 백서의 악하선으로부터 이전의 방법들에 의해 분리된 세포들보다 모든 면에서 형태학적이거나 기능적으로 정상에 가까운 설포세포가 분리되었다. 이러한 세포 배양을 위해 최근 McKeehan등¹⁴⁾에 의해 타액 설포세포를 유지(maintenance)를 하기 위한 조건이 제시되었는데 (1) 배양액의 일반적인 요소(배양액, 무기질, pH 등), (2) 기체, (3) 호르몬, (4) 세포외 기질(extracellular matrix), (5) 분비 자극 등이 그것이다. 이 중에서 배양액의 일반적인 요소는 1981년에 Ham¹⁵⁾에 의하여 표준화되었고, 필요한 호르몬으로는 epidermal growth factor(EGF), insulin, thyroxine, adrenocorticoids를 들 수 있다¹⁶⁻²¹⁾. 세포외 기질은 세포가 부착하여 배지와 세포 자신들로부터 생성된 수많은 분자 요소들을 상호 교환하면서 성장과 분화를 할 수 있는 장소를 제공함으로써 세포의 생존을 촉진하며, collagen, fibronectin, proteoglycan과 laminin과 같은 세포외 기질 물질들은 세포의 성장과 분화에 있어 매우 중요한 의미를 갖는다는 사실 또한 많은 연구들을 통해 논술되어 왔다. 그 외 교감신경 자극이나 부교감신경 자극이 타액선 특히 설포세포의 성장과 분화에 있어서 매우 중요하다는 사실도 밝혀졌다²²⁻²⁴⁾.

현재 외국에서 진행되고 있는 연구들은 여러 가지 요소들 중에서 특히 산소의 양에 관한 것과 어떻게 하면 설포세포를 일차배양(primary culture)뿐만 아니라 계대배양(subculture)을 통하여 전파해 나갈 수 있는가에 초점이 맞춰져 있다. 특히 여러 가지 세포외 기질의 구성 성분들을 조합해서 배양 용기에 coating시킴으로써 계대배양을 가능하도록 하려는 시도들이 이루어지고 있다.

우리는 본 연구를 통하여 타액선 설포세포 배양에 유리한 배양 조건과 다양한 성장인자의 영향을 조사하고자 한다. 이러한 실험을 통해서 제시된 결과들은 향후 타액선 설포세포 배양술식을 타

액선 질환 또는 노화에 따른 타액선이나 타액의 변화에 대한 연구에 적용할 시 중요한 의미를 가질 것이다.

II. 연구 대상 및 방법

타액선 설포세포 분리

생후 6주된 Sprague-Dawley 웅성백서를 Ketamine (50mg/kg) 마취하에 이하선, 악하선, 설하선을 적출하여, DMEM(Dulbeccos modified Eagles media, Ca²⁺, Mg²⁺ free)으로 씻은 후 수술용 칼과 가위를 사용하여 작은 절편을 만들었다. 절편들을 Spinner flask에 넣고, Ca²⁺, Mg²⁺ free PBS(phosphate buffered saline)으로 2번 씻은 후, 7.6mg/ml EDTA를 포함한 PBS에 다시 부유시키고, 95% O₂ - 5% CO₂ 기체를 불어 넣은 다음 뚜껑을 덮고, 37°C에서 magnetic stirrer 나 shaking water bath를 사용하여 15분간 흔들어 주었다. 이때 대부분의 주위 결합조직은 떨어져 나가고 설포세포들이 약하게 결합되어 있게 된다. 이 상태의 조직을 다시 F12 media로 2번 씻은 후 collagenase(1mg/ml)-hyaluronidase (300unit/ml)로 37°C에서 45분간 digestion시켰다. 그 후 세포들을 F12 media로 다시 씻은 다음, 크게 응집된 세포들을 걸러내기 위해 세포 현탁액을 500 μm pore size filter에 통과시켰다. 이때 오염된 세포들(fibroblasts, myoepithelial cells, duct cells, blood cells 등)을 골라내기 위해 세포 현탁액을 30% fetal bovine serum를 포함하고 있는 F12 media 위에 살며시 올려 놓아 중력에 의하여 세포를 가라앉게 한 후 상층부 media의 75%를 제거하였다.

타액선 설포세포 배양

위에서 언급한 방법을 이용하여 분리한 설포세포들을 10% FBS를 함유한 F12를 배양액으로 사용해서 배양접시에 plating한 후, dexamethasone (10ng/ml), insulin (5ng/ml), transferrin (5ng/ml), selenous acid (5ng/ml), reduced glutathione

(5ng/ml), isoproterenol (1 μ M), putrescine (1mM), epidermal growth factor (10ng/ml) 등 다양한 성장인자를 첨가하면서 배양한 후 이를 결핍시켰을 때와 배양 상태를 비교하였다. 이때 배양조건으로는 37°C 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 또, 배양접시에 Matrigel (Collaborative Research, USA)를 coating 시켰을 때와 그렇지 않을 때를 비교해 보았다.

III. 결 과

생후 6주된 백서의 이하선, 악하선, 설하선을 적출하여 DMEM(Dulbeccos modified Eagles media, Ca²⁺, Mg²⁺ free)으로 씻은 후 수술용 칼과 가위를 사용하여 작은 절편을 만들었는데, 이때 mincing을 최대한 작게 하는 것이 중요한 사항이었다. 절편들을 Ca²⁺, Mg²⁺ free PBS(phosphate buffered saline)로 2번 씻은 후, 7.6mg/ml EDTA를 포함한 PBS에 재부유 시키고 95% O₂ - 5% CO₂ 기체를 붙여 넣은 다음 뚜껑을 덮고, 37°C에서 배양하였다. 이 때 배양 조건을 85% O₂ - 15% CO₂ 조성으로 변경해 보았으나, 95% O₂ - 5% CO₂ 조건이 배양에는 더 좋은 것으로 나타났다. 이 상태에서 세포를 관찰해 본 결과 대부분의 주위 결합조직은 떨어져 나가고 선포 세포들이 약하게 결합되어 있었다. 이 조직을 다시 digestion시켰는데, 이때 효소들이 세포에 많은 영향을 미칠 것이라고 추측하여 효소의 농도

를 변화시켰다. Collagenase는 1mg/ml의 경우에서 좋은 배양조건을 제공하였으며, hyaluronidase는 300unit/ml의 경우가 좋은 것으로 나타났다. 이때 digestion시간을 변화시켜 보았지만 유의성 있는 결과는 얻을 수 없었다. 세포들을 F12 media로 다시 씻은 후, 세포 현탁액을 500 μ m pore size filter에 통과시켜서 크게 응집된 세포들을 걸러냈었는데, 매번 이 단계에서 많은 세포 손실이 있었다. Fibroblasts, myoepithelial cells, duct cells, blood cell 등과 같은 세포들을 골라내기 위해서 세포 현탁액을 30% fetal bovine serum을 함유한 F12 media 위에 살며시 올려 놓아 중력에 의하여 세포를 가라앉게 한 후, 상층 media의 75%를 제거하였다. 표 1은 배양조건과 세포처리 과정에서의 영향을 나타낸 것이다.

이 세포들을 배양 접시에서 10% FBS를 함유한 F12를 배양액으로 사용해서 plating한 후, dexamethasone (10ng/ml), insulin (5ng/ml), transferrin (5ng/ml), selenous acid (5ng/ml), reduced glutathione (5ng/ml), isoproterenol (1 μ M), putrescine (1mM), epidermal growth factor (10ng/ml) 등의 성장인자를 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 이때 성장인자의 영향을 살펴보기 위하여 각 요소를 결핍시켜 보았다. 개개 인자 모두 첨가했을 경우가 결핍시에 비해 좋은 배양 조건을 제공하여 주었으며, 악하선과 이하선의 경우에 그 효과가 뚜렷

Table 1. Effects of culture conditions on rat salivary gland acinar cells

	O ₂ concentration		CO ₂ concentration		collagenase		hyaluronidase		Matrigel	
	95%	85%	5%	15%	1 mg/ml	2 mg/ml	150 unit/ml	300 unit/ml	without	with
SM	++	+	++	+	++	+	+	++	+	+++
SL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PA	+++	+	+++	+	+++	++	++	+++	+	+++

SM : submandibular gland

SL : sublingual gland

PA : parotid gland

+: 12hrs 미만 배양

++: 12hrs 이상 - 24hrs 미만 배양

+++ : 24hrs 이상 배양

Table 2. Effects of growth factors on culture of rat salivary gland acinar cells

	dexamethasone		insulin		transferrin		selenous acid	
	without	with	without	with	without	with	without	with
SM	+	++	+	++	+	++	+	+
SL	+	+	+	+	+	+	+	+
PA	+	+++	+	+++	+	+++	+	++
	reduced glutathion		isoproterenol		putrescine		EGF	
	without	with	without	with	without	with	without	with
SM	+	++	+	++	+	+	+	++
SL	+	+	+	+	+	+	+	+
PA	+	+++	+	+++	+	++	+	+++

SM : submandibular gland

SL : sublingual gland

PA : parotid gland

+ : 12hrs 미만 배양

++ : 12hrs 이상 - 24hrs 미만 배양

+++ : 24hrs 이상 배양

하였다. 그리고 가장 중요한 인자라고 할 수 있는 Matrigel은 세포의 성장요인은 아니지만 생명을 유지하기 위해 고착할 수 있도록 도와주는 역할을 하는 성분으로 실험 결과, 첨가시 세포배양의 유지에 매우 유리한 조건을 제공하여 주는 것으로 나타났다 (표 1). 그러나 모든 경우에 있어서 배양을 36시간 이상 유지하기가 어려웠고, 계대배양을 할 수 있는 조건을 확립하기는 힘들었다. 표 2은 기존의 배양시간을 연장시킬 수 있는 여러 성장인자의 영향을 나타내 본 것이다.

IV. 총괄 및 고찰

타액선 세포 배양법은 1970년대부터 개발되기 시작하여 현재까지 연구되고 있으나 아직도 세포 배양액의 구성 성분, fetal bovine serum의 양, 배양 온도, 배양기 내의 산소의 양 같은 배양 조건은 약간의 조절을 필요로 한다^{13,25-27}. 또한 아직까지도 타액선 세포의 계대배양은 성공하지 못하였고 여러 가지 세포외 기질(extracellular matrix)의 여러 구성 성분을 다양한 비례로 섞어서, 배양 접시에 coating한 후 세포 배양을 하여

계대배양을 시도하려는 노력이 이루어지고 있다^{27,28}. 본 연구에서는 Matrigel을 배양 접시에 coating시키고 배양을 한 결과, 12시간을 유지하기 힘들던 선포세포를 24시간 이상 배양할 수 있었다. 기존의 연구에서는 rat tail collagen을 사용하였으나²⁹, 본 연구에서 수행해 본 결과 효과가 없는 것으로 나타났다. 백서의 선택에서 연령이 적은 개체를 선택하였는데, 이는 노화에 의하여 타액선마다 특징적 변화가 있기 때문에 비선포세포(non-acinar cells)의 함량이 제일 적은 개체를 취하기 위함이었다. collagenase, hyaluronidase같은 단백분해 효소는 세포의 수용체를 파괴할 수도 있기 때문에 노출에 유의하여야 하므로, 본 연구에서는 몇 가지 조건외의 시간과 농도를 사용하여 보았다. O₂와 CO₂의 농도는 이전의 연구^{25,26}에서 추천한 95% O₂와 5% CO₂ 상태를 사용하였으며 O₂의 농도를 85%로 낮춘 결과 배양 상태가 좋지 못하였다.

Dexamethasone, insulin, transferrin, selenous acid, reduced glutathione, epidermal growth factor, putrescine은 성장인자로 작용하여 세포 생명 유지에 중요한 역할을 하므로 Oliver의 방

법을^{27,28)} 응용하여 실험한 결과, 개개 성장인자들을 추가하였을 때, 보다 유리한 배양조건이 되었다. 일반적으로 악하선 선포세포나 설하선 선포세포보다 이하선 선포세포의 배양상태가 좋았는데, 이는 이하선 세포가 다른 타액선 세포들보다 채취 단계에서 fibroblast, blood cell 등과 같은 비선포세포로부터 순수 분리가 쉽기 때문으로 생각된다. 계대배양에서는 좋은 결과를 얻을 수 없었지만 본 논문에서 제안한 여러 결과들은 타액선 선포세포 배양 조건에 대한 기본적인 지식을 제공해 주어 향후 이러한 연구 방법을 이용한 타액 및 타액선 연구에 필수적인 자료가 될 것이다.

V. 결 론

백서 타액선 선포세포 배양에서 높은 O₂ 농도는 필수적이며, Matrigel은 세포의 생명을 유지하기 위한 고착을 도와주어 중요한 역할을 하였다. 또, dexamethasone, insulin, transferrin, selenous acid, reduced glutathione, epidermal growth factor, isoproterenol, putrescine과 같은 성장인자는 타액선 선포세포 배양에 유리한 조건을 부여하였다.

참 고 문 헌

- Schneyer, L.H., Young, J.A., and Schneyer, C.A. : Salivary secretion of electrolytes. *Physiological Reviews*, 52:720-777, 1972.
- Martinez, J.R., Holzgreve, H., and Frick, A. : Micropuncture study of submaxillary glands of adult rats. *Pfluegers Arch.*, 290(2):124-133, 1966.
- Young, J.A. and Schogel, E. : Micropuncture investigation of sodium and potassium excretion in rat submaxillary saliva. *Pfluegers Arch.*, 291(1):85-98, 1966.
- Nielsen, S.P. and Peterson, O.H. : Transport of calcium in the perfused submandibular gland of the cat. *J. Physiol.*, 223(3):685-697, 1972.
- Martinez, J.R. and Cassity, N. : Effects of ouabain and furosemide on saliva secretion induced by sympathomimetic agents in isolated, perfused rat submandibular glands. *Experientia*, 40(6):557-559, 1984.
- Martinez, J.R., Martinez, A.M., and Cooper, C. : cGMP stimulates active K⁺ uptake in rat submandibular slices. *Experientia*, 39(4):362-364, 1983.
- Robinovitch, M.R., Smuckler, E.A., and Sreebny, L.M. : Protein synthesis in a cell-free system derived from the rat parotid gland. *J. Biol. Chem.*, 244(19):5361-5367, 1969.
- Castle, J.D., Jamieson, J.D., and Palade, G.E. : Secretion granules of the rabbit parotid gland, Isolation, subfractionation, and characterization of the membrane and content subfractions. *J. Cell Biol.*, 64(1):182-210, 1975.
- Amsterdam, A. and Jamieson, J.D. : Structural and functional characterization of isolated pancreatic exocrine cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 69(10):3028-3032, 1972.
- Amsterdam, A. and Jamieson, J.D. : Studies on dispersed pancreatic exocrine cells. I. Dissociation technique and morphologic characteristics of separated cells. *J. Cell Biol.*, 63(3):1037-1056, 1974.
- Kanamura, S. and Barka, T. : Short term culture of dissociated rat submandibular gland cells. *Lab. Invest.*, 32(3):366-372, 1975.
- Mangos, J.A., McSherry, N.R., Butcher, F., Irwin, K., and Barber, T. : Dispersed rat parotid acinar cells. I. Morphological and functional characterization. *Am. J. Physiol.*, 299(3), 553-559, 1975.
- Quissell, D.O. and Redman, R.S. : Functional characteristics of dispersed rat submandibular cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 76(6):2789-2793, 1979.
- McKeehan, W.L., Barnes, D., Rewid, L., Stanbridge, E., Murakami, H., and Sato, G.H. : Frontiers in mammalian cell culture. *In Vitro Cell Dev. Biol.* 26(1):9-23, 1990.
- Ham, R.G. : Survival and growth requirements of nontransformed cells. *Handbook Exp. Pharmacol.*, 57:13-23, 1981.
- Jones, R.O. : The *in vitro* effect of epithelial growth factor on rat organ tissues. *Exp. Cell Res.*, 43(3):645-656, 1966.

17. Deschodt-Lanckman, M., Robberecht, P., Camus, J., Baya, C., and Christophe, J. : Hormonal and dietary adaptation of rat pancreatic hydrolases before and after weaning. *Am. J. Physiol.*, 266(1):39-44, 1974.
18. Sasaki, R., Mura, M., Takeuchi, T., Furihata, C., Matushima, T., and Sugimura, T. : Premature induction of amylase in pancreas and parotid gland of growing rats by dexamethasone. *Biochim. Biophys. Acta*, 428(3):619-626, 1976.
19. Kumergawa, M., Yajima, T., Maeda, N., Takuma, T., Minamide, C., and Machino, M. : Synergistic effects of diet, thyroxine, and glucocorticoid hormones on amylase activity in parotid glands of growing rats. *Arch. Oral Biol.*, 26(7):631-633, 1981.
20. Dembinski, A., Gregory, H., Konturek, S.J., and Polanski, M. : Trophic action of epidermal growth factor on the pancreas and gastroduodenal mucosa. *J. Physiol.*, 325:35-42, 1982.
21. Logsdon, C.D. and Williams, J.A. : Pancreatic acini in short-term culture: regulation by EGF, carbachol, insulin and corticosterone. *Am. J. Physiol.*, 244(6):G675-G682, 1983.
22. Schneyer, C.A. and Hall, H.D. : Autonomic regulation of changes in rat parotid amylase during postnatal development. *Am. J. Physiol.*, 223(1):172-175, 1972.
23. Srinivasan, R., Chang, W.W.L., and Van der Noen, H. : The effect of isoproterenol on the postnatal differentiation and growth of the rat submandibular gland. *Anat. Rec.*, 177(2):243-253, 1973.
24. Srinivasan, R. and Chang, W.W.L. : Effect of neonatal sympathectomy on the postnatal differentiation of the submandibular gland of the rat. *Cell Tissue Res.*, 180(1):99-109, 1977.
25. Oliver, C. : Culture of parotid acinar cells in *Biology of the Salivary Glands* Dobrosielski-Vergona, K. ed. 1993, CRC Press, Boca Ration, Florida, pp 307-317.
26. Redman, R.C. and Quissel, D.Q. : Isolation and maintenance of submandibular gland cells in *Biology of the Salivary Glands* Dobrosielski-Vergona, K. ed. 1993, CRC Press, Boca Ration, Florida, pp 285-306.
27. Oliver, C., Walters, J.F., Tolbert, C.L. and Kleinman, H.K. : Growth of exocrine acinar cells on a reconstituted basemembrane gel. *In Vitro Cell Dev. Biol.*, 23(7):465-473, 1987.
28. Oliver, C., Walters, J.F., Tolbert, C.L., and Kleinman, H.K. : Culture of parotid acinar cells on a reconstituted basement membrane substratum. *J. Dent. Res.*, 66(2):594-595, 1987.
29. Quissell, D.O., Redman, R.S., and Mark, M.R. : Short-term primary culture of acinar-intercalated duct complexes from rat submandibular glands. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 22(8): 469-480, 1986.

- ABSTRACT -

Culture of Rat Salivary Acinar Cells

Sung-Woo Lee, D.D.S., M.S.D., Ph.D.¹, Song Han, D.D.S., Ph.D.²,
Hong-Seop Kho, D.D.S., M.S.D., Ph.D.¹

¹*Dept. of Oral Medicine & Oral Diagnosis,
College of Dentistry, Seoul National University*

²*Dept. of Oral Biochemistry, College of Dentistry, Kangnung National University*

We investigated the culture condition and effects of various growth factors on the culture of salivary gland acinar cells. Male, Sprague-Dawley rats (about 6 weeks old) were sacrificed and their submandibular, sublingual, and parotid glands were used as specimens. High oxygen level more than 90% and coating of Matrigel on culture dish were important factors to help increase the survival time of acinar cells. Proper concentration of enzymes such as collagenase and hyaluronidase during isolation steps was also important. Addition of various growth factors such as dexamethasone, insulin, transferrin, selenous acid, reduced glutathione, epidermal growth factor, isoproterenol, and putrescine in culture medium helped to increase lifetime of cultured salivary acinar cells.

Key words : salivary acinar cells, culture