

## A role of Sodium Bicarbonate Cotransporter(NBC) in $\text{HCO}_3^-$ Formation in Human Salivary Gland Acinar Cells

Meehyun Jin, Na-Youn Koo, MeiHong Jin, Sung-Min Hwang and Kyungpyo Park

Department of Physiology, School of Dentistry, Seoul National University and Dental Research Institute, Yeongeong Dong 28, Chongno Ku, Seoul 110-749, Korea

(Received November 8, 2008 ; Revised December 9, 2008 ; Accepted December 10, 2008)

The sodium bicarbonate cotransporter (NBC) protein is functionally expressed in salivary glands. In this experiment, we examined the role of NBC in  $\text{HCO}_3^-$  formation in human parotid gland acinar cells. Intracellular pH (pHi) was measured in 2'-7'-bis(carboxyethyl)-5(6)-carboxyfluorescein (BCECF) -loaded cells. Acetazolamide (0.1 mM) and 4,4'-diisothio cyanatostilbene-2,2'-disulphonic acid (DIDS, 0.5 mM) were used as specific inhibitors of carbonic anhydrase and NBC, respectively. The degree of inhibition was assessed by measuring the pHi recovery rate ( $\Delta\text{pHi}/\text{min}$ ) after cell acidification using an ammonium prepulse technique. In control experiments,  $\Delta\text{pHi}/\text{min}$  was  $1.40 \pm 0.06$ . Treatment of cells with 0.5 mM DIDS or 0.1 mM acetazolamide significantly reduced  $\Delta\text{pHi}/\text{min}$  to  $1.14 \pm 0.14$  and  $0.74 \pm 0.15$ , respectively. Simultaneous application of DIDS and acetazolamide further reduced  $\Delta\text{pHi}/\text{min}$  to  $0.47 \pm 0.10$ . Therefore, DIDS and acetazolamide reduced  $\Delta\text{pHi}/\text{min}$  by 19 % and 47 %, respectively, while simultaneous application of both DIDS and acetazolamide caused a reduction in  $\Delta\text{pHi}/\text{min}$  of 67 %. These results suggest that in addition to carbonic anhydrase, NBC also partially contributes to  $\text{HCO}_3^-$  formation in human parotid gland acinar cells.

**Keywords:** sodium bicarbonate cotransporter (NBC), human parotid gland, pHi recovery, 4,4'-diisothio cyanatostilbene-2,2'-disulphonic acid (DIDS), acetazolamide

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

### 서 론

타액은 점막을 적셔 구강 내를 부드럽게 해주고, 외부의 자극으로부터 점막을 보호해주며, 미각을 느낄 수 있게 하고, 소화를 도우며, 구강내의 산도를 조절하는 등 다양한 기능을 한다. 이러한 여러 기능 중에서 세균에 의해 형성된 산을 완충시켜 구강내의 pH를 중성인 7.0 안팎으로 적절히 유지시켜주는 완충능은 타액의 가장 중요한 기능 중의 하나이다. 이러한 완충능력은 주로 설포세포에서 분비되는 중탄산이온( $\text{HCO}_3^-$ )에 의해 이루어진다. 이하선의 경우, 자극 시는 안정 시에 비해 타액내의 중탄산이온 농도가 60배 정도까지 증가하여 완충능을 극대화시킬 수 있다(Helm et al., 1982; Lee et al., 2005).

타액선 상피세포가 중탄산이온을 원활하게 분비하기 위해서는, 세포내에서 중탄산이온이 끊임없이 만들어져야 하지만, 그 세포내 형성 기작은 명확히 알려져 있지 않다. 지금까지 알려진 가설은 혈액에서 확산에 의해 세포내로 유입된 이산화탄소( $\text{CO}_2$ )가 물( $\text{H}_2\text{O}$ )과 결합하여 탄산(carbonic acid)이 되고, 그 후 탄산이 탄산탈수소효소(carbonic anhydrase; CA)에 의해 수소이온( $\text{H}^+$ )과 중탄산이온으로 분해되면,  $\text{H}^+$ 는  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchange에 의해 세포내로 빠져나가고  $\text{HCO}_3^-$ 는 세포내에 축적된다는 것이다. 그리고 축적된 중탄산이온은 상피세포 자극 시 선강세포막에 위치하고 있는  $\text{Cl}^-$  통로를 통해 세포외로 유출된다(Park et al., 2001). 인간 이하선의 경우에도 설포세포 자극 시 중탄산이온을 선강으로 내보내어 타액의 완충능을 높여주고, 감소된 세포내 pH는 중탄산이온이 세포내에서 다시 형성됨에 따라 회복된다(Nauntofte, 1992).

Sodium bicarbonate cotransporter (NBC)는 신장에서 pH 조절에 관여하는 세포막 수송체로서, 1997년에 Romero 등에 의해 최초로 클로닝 되었다 (Romero et al., 1997).

NBC는 신장, 췌장, 뇌뿐만 아니라(Gross et al., 1996; Kwon et al., 2000; Abuladze et al., 1998; Bevensee et al., 2000) 최근에는 흰쥐 및 기니픽 타액선 설포세포에서도 기능적으로 발현된다는 것이 밝혀졌다(Park et al., 2002; Roussa et al., 1999). 이는 NBC가 기존에 알려진 CO<sub>2</sub>의 확산에 이은 탄산탈수소 효소에 의한 중탄산이온 형성과 함께, 인간 타액선 상피세포에서 세포내 중탄산이온의 공급원 역할을 할 가능성이 매우 높다는 것을 암시한다(Gresz et al., 2002). 하지만 이에 관한 연구는 아직 이루어진 바 없다.

따라서 본 연구에서는 타액의 완충능에 가장 중요한 역할을 하고 있는 중탄산이온이 인간 이하선 설포세포내에서 형성되는 기작에서, 지금까지 알려진 기존의 CO<sub>2</sub>의 확산에 의한 형성과 NBC를 통한 형성을 비교함으로써 NBC가 세포내 중탄산이온 형성에 기여하고 있는 정도를 비교 평가해 보고자 하였다.

## 실험재료 및 방법

### 재료

4,4'-diisothio cyanatostilbene-2,2'-disulphonic acid (DIDS), acetazolamide는 Sigma (St. Louis, MO, USA)의 제품이고, collagenase P는 Roche Molecular Biochemicals에서 구매하였으며, 2',7'-bis(carboxyethyl)-5(6)-carboxyfluorescein acetoxymethyl ester (BCECF/AM)는 Molecular Probes (Eugene, OR, USA)의 제품이다. HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>가 없는 정상 HEPES (HBS)의 조성은(mM) 140 NaCl, 5 KCl, 1 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub>, 10 glucose, 그리고 10 HEPES (pH 7.4 with NaOH)이다. 삼투질 농도는 약 300 mOsm 로 조정하였다. HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 함유용액 [HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-buffered solution (BBS)]은 정상 HEPES에서 25 mM NaCl을 같은 농도의 NaHCO<sub>3</sub>로 대체하였고, Na-free 용액은 정상 HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> buffer에서 NaCl을 NMDG-Cl (*N*-methyl -D-glucamine)로, NaHCO<sub>3</sub>를 choline-HCO<sub>3</sub>로 대체하였다. NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 함유용액은 20 mM Na를 같은 농도의 NH<sub>4</sub>로 대체하였으며, 이상의 모든 HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 완충 관류 용액들은 실험 전 5% CO<sub>2</sub>-95% O<sub>2</sub> 가스를 10분간 흘린 후 실험에 사용되었다.

### 세포 준비 및 세포내 pH측정

이 실험은 서울대학교 치과병원의 연구윤리심의 위원회의 승인 하에 수행되었다 (CRI06002). 사람 이하선 조직은 환자 동의 하에 구강악안면 암이나 질환 등으로 인해 구강외과적 수술을 받은 환자의 적출물로부터 얻었다. 이후 적출된 조직은 10 mM sodium pyruvate, 0.02% trypsin inhibitor, 0.1% bovine serum albumin (BSA)가 첨가된 정상 HEPES 용액 내에서 가위를 이용해 잘게 부수었다. 그 후 collagenase를 첨가한 후 37°C에서

20분 간격으로 pipetting을 통하여 기계적인 분리를 시행하면서 1시간 동안 배양하였다 (Evans et al., 1999). 분리된 단일 설포세포들을 다시 2 uM 2'-7'-bis(carboxyethyl)-5(6)-carboxyfluorescein (BCECF)로 30분간 실온에서 loading시켰고, 정상 HEPES 용액으로 세척 후 실험에 사용되기 전까지 얼음 위에서 보관되었다. 세포내 pH 변화는 Photon Technology International system (South Brunswick, NJ, USA)을 이용해 측정되었다. BCECF의 형광은 미세형광측정법(microspectrofluorimetry)으로 측정하였는데, 440 nm와 490 nm의 파장을 이용하여 이들의 형광 비(ratio)를 측정하였다(Koo et al., 2006; Nguyen et al., 2004). 세포 내부를 산성화시키기 위해 20 mM NH<sub>4</sub>Cl로 약 1분간 관류시켰고, DIDS와 acetazolamide 등으로 전처리한 후 pH의 회복 속도를 관찰하였다. 실험 시 관류속도는 2 ml/min 정도로 하였으며, 실험의 전 과정 동안 정상 중탄산이온 완충용액(HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> buffer)은 안정 시 관류 용액으로 사용되었다.

### Ammonium prepulse technique

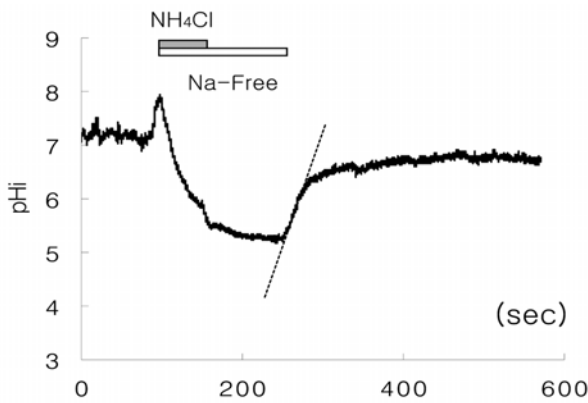
관류액을 정상 HEPES 용액에서 약 1분간 20 mM NH<sub>4</sub>Cl를 함유한 용액으로 바꾸어 주면 세포내의 pH (pHi)는 일시적인 상승 후 급격히 떨어지는데 이를 NH<sub>4</sub>Cl prepulse technique이라고 한다. 이후 Na-free용액으로 계속 관류시키면 낮은 pHi가 유지되고 어느 시점에서 정상 중탄산이온 완충용액으로 관류시키면 pHi는 빠른 시간 내 정상으로 회복 된다 (Li et al., 2006; Kim et al., 2003). 본 연구에서는 이러한 pHi 회복율을 기준으로 중탄산이온에 의한 pHi 완충능력을 평가하였다(Choi et al., 2006).

실험결과에 대한 통계처리는 'student t-test' 를 사용하였고, p-value가 0.05 미만인 경우, 통계적으로 유의성이 있는 것으로 판단하였음.

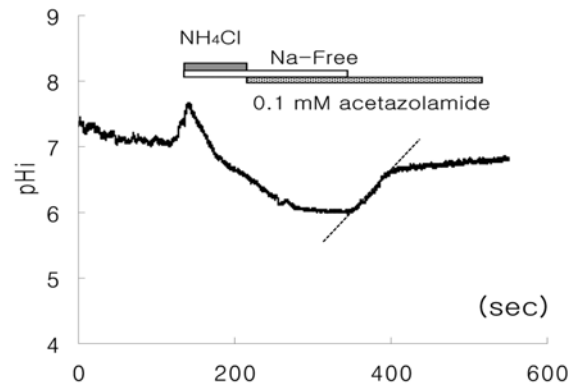
## 결 과

인간 이하선 설포세포에 ammonium prepulse를 가하여 세포 내부를 산성화 시킨 뒤, 자극 이전으로 pH가 회복되는 속도를 측정하여 이를 대조군으로 사용하였다. 약 1분간의 NH<sub>4</sub>Cl prepulse 자극으로 세포내의 pH는 일시적인 상승 후 급 하강하고, Na free용액에서는 낮은 pHi가 유지된다. 그 후 정상 중탄산이온 완충용액으로 관류시키면 pHi는 빠른 시간 내 정상으로 회복 된다 (Li et al., 2006; Kim et al., 2003, Choi et al., 2006). Fig. 1은 대조 실험으로서, NH<sub>4</sub>Cl prepulse 후 pHi 회복율(pHi recovery rate)은 1.40 ± 0.06 (ΔpHi/min, n=5) 로 측정되었다.

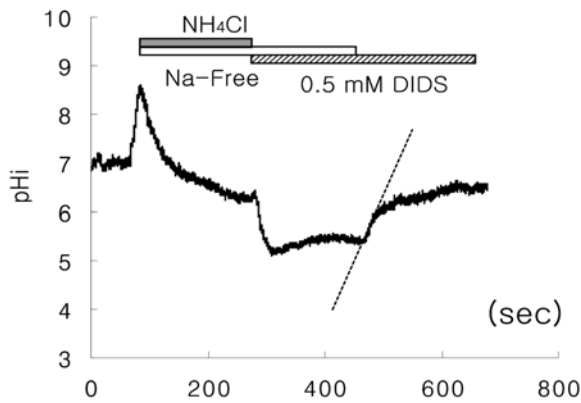
대조 실험 후 먼저 NBC가 pHi 회복에 기여하는 정도



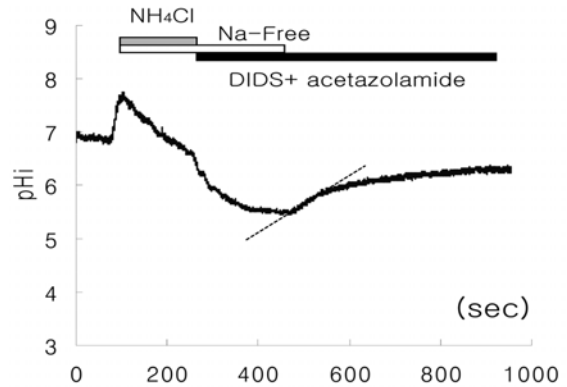
**Fig. 1.**  $\text{pH}_i$  recovery from the 2'-7'-bis(carboxyethyl)-5(6)-carboxyfluorescein (BCECF)-loaded human parotid gland acinar cells.  $\text{pH}_i$  recovery rate ( $\Delta \text{pH}/\text{min}$ ; indicated by dotted line) was measured from the acidified cells induced by  $\text{NH}_4\text{Cl}$  prepulse technique. Average  $\text{pH}_i$  recovery rate was  $1.40 \pm 0.06$  ( $n=5$ ).  $\text{pH}_i$  values on the vertical axis are normalized.



**Fig. 3.**  $\text{pH}_i$  recovery from the 2'-7'-bis(carboxyethyl)-5(6)-carboxyfluorescein (BCECF)-loaded human parotid gland acinar cells treated with 0.1 mM acetazolamide. Average  $\text{pH}_i$  recovery rate was  $0.74 \pm 0.15$  ( $n=6$ ).



**Fig. 2.**  $\text{pH}_i$  recovery from the 2'-7'-bis(carboxyethyl)-5(6)-carboxyfluorescein (BCECF)-loaded human parotid gland acinar cells treated with 0.5 mM DIDS. Average  $\text{pH}_i$  recovery rate was  $1.14 \pm 0.14$  ( $n=5$ ).



**Fig. 4.**  $\text{pH}_i$  recovery from the 2'-7'-bis(carboxyethyl)-5(6)-carboxyfluorescein (BCECF)-loaded human parotid gland acinar cells treated with both 0.5 mM DIDS and 0.1 mM acetazolamide. Average  $\text{pH}_i$  recovery rate was  $0.47 \pm 0.10$  ( $n=4$ ).

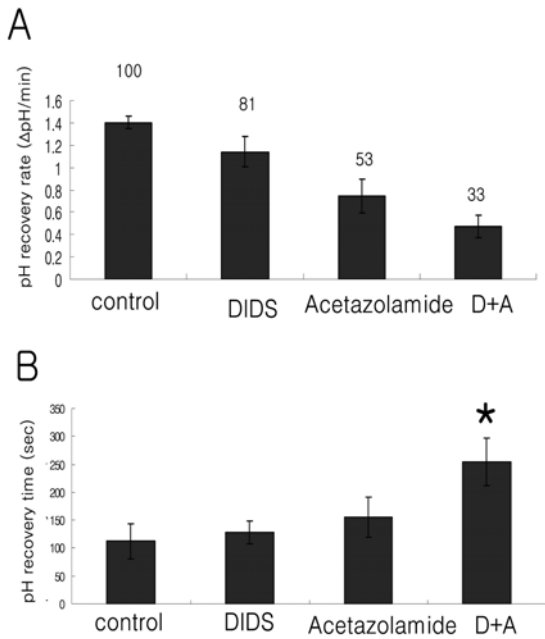
를 평가해 보았다(Fig. 2). DIDS는 음이온교환 억제제(anion exchanger inhibitor)이면서 NBC에 대한 특이억제제이다(Luo et al., 2001; Nakamoto et al., 2007). DIDS의 효과를 극대화하기 위해 본 실험에서는 관찰 시점 2분전부터 0.5 mM의 DIDS를 관류시켰으며, 실험 결과  $\text{pH}_i$  회복율은  $1.14 \pm 0.14$  ( $n=5$ )로서, 이는 대조군에 비해 81% 정도였다.

이번에는 탄산탈수효소가  $\text{pH}_i$  회복에 기여하는 정도를 평가해 보았다(Fig. 3). 본 실험에서는 0.1 mM acetazolamide가 사용되었는데, 이는 탄산탈수효소(carbonic anhydrase) 억제제로서 탄산이 수소이온과 중탄산이온으로 분해 되는 것을 막아준다(Beal, 1991; Novak et al., 1986). Acetazolamide도 DIDS와 마찬가지로 관찰 시점 2분전부터 관류시켰다. 이 실험에서는  $0.74 \pm 0.15$  ( $n=6$ )의  $\text{pH}_i$  회복율이 측정되어, 이는 대조군  $\text{pH}_i$  회복율의

53% 정도이다.

끝으로 DIDS와 acetazolamide를 동시에 처리해 보았다(Fig. 4). 이 경우  $\text{pH}_i$  회복율은  $0.47 \pm 0.10$  ( $n=4$ )로서, 두 시약을 동시에 처리한 경우 각각을 따로 처리한 실험에서보다 유의하게 더 낮은  $\text{pH}_i$  회복율을 보였다.

Fig. 5A는 대조군에서의  $\text{pH}_i$  회복율을 100으로 보았을 때, DIDS, acetazolamide 그리고 DIDS와 acetazolamide를 모두 처리하였을 때의  $\text{pH}_i$  회복율을 histogram으로 표시한 것으로서, 이들의  $\text{pH}_i$  회복율을 각각 81%, 53%, 33%로 나타냈다. 그림 5B는 대조군, DIDS, acetazolamide, 그리고 DIDS와 acetazolamide 동시 투여 군에서  $\text{NH}_4\text{Cl}$  prepulse 후 자극이전의 상태까지  $\text{pH}_i$ 가 회복되는데 걸리는 총 경과 시간을 나타낸 그래프이다. DIDS와 acetazolamide를 동시에 투여한 경우( $254 \text{ sec} \pm 42.4$ ) 어떠한 시약도 처리하지 않은 대조군의 경우( $112 \text{ sec} \pm 31.7$ )와 DIDS나 acetazolamide를 각각 단독으로 처리한 경우( $127 \text{ sec} \pm 20.4$ ,  $156 \text{ sec} \pm 36.3$ )보다  $\text{pH}_i$ 가 자



**Fig. 5.** (A) Histogram for pH<sub>i</sub> recovery rates in control, DID, acetazolamide and both DIDS & acetazolamide group (D+A). The numbers on the top of each bar indicate relative values under the assumption that control pH<sub>i</sub> recovery rate is 100. Each group was compared to control group by *student t-test*. (\*: p<0.05) (B) Total recovery time(sec) of pH<sub>i</sub> to reach the pre-stimulus value in 4 groups (n=3-5). There is a significant difference in total recovery time between the control and DIDS & acetazolamide group.

극 이전의 수준으로 회복되는데 유의하게 더 많은 시간이 걸렸다 (p<0.05 compared to control, *student t-test*).

## 고 찰

타액선 외에도 다양한 장기와 다양한 종에서 NBC의 역할에 관한 연구가 진행된 바 있다. 타액선에 관한 연구에서는 각각 동물 종과 타액선 타입에 따른 NBC의 존재와 역할에 대한 연구가 진행되어, 소와 양의 이하선, 기니픽과 마우스의 이하선과 악하선 선포세포에서의 NBC의 역할이 보고된 바 있다 (Li et al., 2006; Lee et al., 1993; Poronnik et al., 1995; Luo et al., 2001). 마우스 이하선에서는 DIDS와 Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange 억제제인 amiloride를 이용한 실험이 있었고, 이는 사람 이하선에서도 수행된 바 있다 (Park et al., 2002; Kim et al., 2003). 본 연구는 사람 이하선 선포세포에서의 pH 회복 기전을 밝혀본 것으로서 CO<sub>2</sub> 확산에 이은 탄산탈수효소의 역할과 NBC의 역할을 직접 수치적으로 비교해 본 첫 번째 실험이라는 점에서 의의를 찾아 볼 수 있다.

DIDS와 acetazolamide로 전처리한 후 NH<sub>4</sub>Cl prepulse를 준 경우, pH<sub>i</sub> 회복율은 대조군에 비해 모두 낮아졌다.

이는 DIDS와 acetazolamide가 모두 pH<sub>i</sub> 회복을 억제하는 효과가 있음을 의미한다. 즉, 인간 이하선 선포세포내에서 자극 후 중탄산이온 형성과정에는 CO<sub>2</sub> 확산과, NBC를 이용한 중탄산이온의 세포내 이동, 이 두 경로가 모두 기여한다는 것이다. 그러나 이 실험에서 NBC의 억제제인 DIDS에 의한 pH 회복율의 감소 보다 탄산탈수효소 억제제인 acetazolamide에 의한 pH 회복율의 감소가 더 컸으므로 선포세포 내로의 중탄산이온 유입에는 NBC 보다는, 기존에 알려져 왔던 것처럼 CO<sub>2</sub> 확산 및 탄산탈수효소에 의한 부분이 중탄산이온 형성에 더 큰 영향을 미치는 것을 확인 할 수 있었다. 즉 인간 이하선 선포세포의 중탄산이온 회복에서 NBC는 전체 pH 회복의 19% 정도를, CO<sub>2</sub> 확산과 탄산탈수효소는 47% 정도를 담당하고 있음을 알 수 있다. DIDS와 acetazolamide를 모두 처리하였을 때 pH<sub>i</sub> 회복율은 대조군에 비해 33% 수준이었다. DIDS와 acetazolamide를 동시 투여한 경우에도 일부 pH<sub>i</sub>의 회복이 관찰되는 사실은 CO<sub>2</sub> 확산과 NBC를 통한 중탄산이온의 회복이 인간 이하선 선포세포의 pH 회복 기전의 상당 부분을 담당하고 있는 것은 사실이나, 이 기전을 담당하는 또 다른 수송체(transporter)가 존재 하거나 다른 대사 작용(metabolism)이 있을 수 있음을 암시해 준다고 하겠다.

억제제 투여 후 자극 전 pH 회복까지 걸린 총 경과시간을 관찰한 실험에서, 대조군과 DIDS 및 acetazolamide 군 사이에 유의한 변화가 관찰되지 않았다. 이러한 사실은 본 실험에서 사용된 pH 회복율 측정방법이 더 신뢰성이 있으며, 총 경과시간을 이용한 평가는 적절한 평가 지수가 되지 못함을 말해준다. 그럼에도 불구하고 DIDS 군과 acetazolamide 군에서의 결과는 지금까지 우리가 잘 알지 못했던 탄산탈수효소의 작용시간을 DIDS와 비교해 볼 수 있다는 점에서 의미를 갖는다. 즉 CO<sub>2</sub> 확산에 이은 탄산탈수효소의 작용에 의한 HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 형성이 NBC를 통한 HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 세포내로의 수송 못지않게 빠른 시간 내에 이루어진다는 것이다. 이 실험 결과는 이하선 자극 시 안정 시에 비해 타액내의 중탄산이온 농도가 빠른 시간 내에 급격히 증가할 수 있는 것은 두 기전, 즉 CO<sub>2</sub> 확산에 이은 탄산탈수효소의 작용에 의한 HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 형성과 NBC를 통한 HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 세포내로의 이동이 거의 동시에 작용하므로써 가능하다는 것을 보여주었다는 점에서 흥미롭다.

## ACKNOWLEDGEMENTS

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(ODRCE) at Seoul National University.

## 참고 문헌

- Abuladze N, Lee I, Newman D, Hwang J, Boorer K, Pushkin A, Kurtz I. Molecular cloning, chromosomal localization, tissue distribution, and functional expression of the human pancreatic sodium bicarbonate cotransporter. *J Biol Chem.* 1998;273:17689-95.
- Beal AM. The effect of carbonic anhydrase inhibitors on secretion by the parotid and mandibular glands of red kangaroos, *Macropus rufus*. *J Comp Physiol.* 1991;161:611-9.
- Bevensee MO, Schmitt BM, Choi I, Romero MF, Boron WF. An electrogenic Na<sup>+</sup>-HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> cotransporter (NBC) with a novel COOH terminus, cloned from rat brain. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2000;278:C1200-11.
- Choi SY, Li J, Jo SH, Lee SJ, Oh SB, Kim JS, Lee JH, Park K. Desipramine inhibits Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange in human submandibular cells. *J Dent Res.* 2006;85:839-43.
- Evans RL, Bell SM, Schultheis PJ, Shull GE, Melvin JE. Targeted disruption of the Nhel gene prevents muscarinic agonist-induced up-regulation of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange in mouse parotid acinar cells. *J Biol Chem.* 1999;274:29025-30.
- Gresz V, Kwon TH, Vorum H, Zelles T, Kurtz I, Steward MC, Aalkjaer C, Nielsen S. Immunolocalization of electroneutral Na<sup>+</sup>-HCO cotransporters in human and rat salivary glands. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2002;283:G473-80.
- Gross E, Hopfer U. Activity and stoichiometry of Na<sup>+</sup>:HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> cotransport in immortalized renal proximal tubule cells. *J Membr Biol* 1996;152:245-52.
- Helm JF, Dodds WJ, Hogan WJ, Soergel KH, Egide MS, Wood CM. Acid neutralizing capacity of human saliva. *Gastroenterology.* 1982;83:69-74.
- Kim YB, Yang BH, Zhang GP, Oh SB, Kim JS, Park K. Expression of Na<sup>+</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> cotransporter and its role in pH regulation in mouse parotid acinar cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;304:593-8.
- Koo NY, Li J, Hwang SM, Choi SY, Lee SJ, Oh SB, Kim JS, Lee JH, Park K. Molecular cloning and functional expression of a sodium bicarbonate cotransporter from guinea-pig parotid glands. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;342:1114-22.
- Kwon TH, Pushkin A, Abuladze N, Nielsen S, Kurtz I. Immunoelectron microscopic localization of NBC3 sodium-bicarbonate cotransporter in rat kidney. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2000;278:F327-36.
- Lee JE, Nam JH, Kim SJ. Muscarinic activation of Na<sup>+</sup>-dependent ion transporters and modulation by bicarbonate in rat submandibular gland acinus. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2005;288:G822-31.
- Lee SI, Turner RJ. Secretagogue-induced 86Rb<sup>+</sup> efflux from bovine parotid is HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-dependent. *Am J Physiol.* 1993;264:R162-8.
- Li J, Koo NY, Cho IH, Kwon TH, Choi SY, Lee SJ, Oh SB, Kim JS, Park K. Expression of the Na<sup>+</sup>-HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> cotransporter and its role in pH regulation in guinea pig salivary glands. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2006;291:G1031-40.
- Luo X, Choi JY, Ko SBH, Pushkin A, Kurtz I, Ahn W, Lee MG, Muallem S. HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> salvage mechanisms in the submandibular gland acinar and duct cells. *J Biol Chem.* 2001;276:9808-16.
- Nakamoto T, Srivastava A, Romanenko VG, Ovitt CE, Perez-Cornejo P, Arreola J, Begenisich T, Melvin JE. Functional and molecular characterization of the fluid secretion mechanism in human parotid acinar cells. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2007;292:R2380-90.
- Nauntofte B. Regulation of electrolyte and fluid secretion in salivary acinar cells. *Am Physiol Gastrointest Liver Physiol* 1992;263:G823-37.
- Nguyen HV, Stuart-Tilley A, Alper SL, Melvin JE. Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> exchange is acetazolamide sensitive and activated by a muscarinic receptor-induced [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> increase in salivary acinar cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2004;286:G312-20.
- Novak I, Young JA. Two independent anion transport systems in rabbit mandibular salivary glands. *Pflugers Arch.* 1986;407:649-56.
- Park K, Hurley PT, Roussa E, Cooper GJ, Smith CP, Thevenod F, Steward MC, Case RM. Expression of a sodium bicarbonate cotransporter in human parotid salivary glands. *Arch Oral Biol.* 2002;47:1-9.
- Park KR, Chang HS, Richardson LA, LEE YI, Choi J, Melvin JE. Characterization of ion transporter proteins expressed in rat parotid acinar cell line, Par-C10. *International Journal of oral biology.* 2001;26:57-62.
- Poronnik P, Schumann SY, Cook DI. HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-dependent ACh-activated Na<sup>+</sup> influx in sheep parotid secretory endpieces. *Pflugers Arch.* 1995;429:852-8.
- Romero MF, Hediger MA, Boulpaep EL, Boron WF. Expression cloning and characterization of a renal electrogenic Na<sup>+</sup>/HCO cotransporter. *Nature.* 1997;387:409-13.
- Roussa E, Romero MF, Schmitt BM, Boron WF, Alper SL, Thevenod F. Immunolocalization of anion exchanger AE2 and Na<sup>+</sup>-HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> cotransporter in rat parotid and submandibular glands. *Am J Physiol.* 1999;277:G1288-96.