

악하선 배양세포의 DNA 합성 및 Epidermal Growth Factor 분비에 관련된 Beta-adrenergic 조절에 관한 연구

이금영 · 소준노 · 정구보* · 박호원 · 류 훈 · 이송재

전북대학교 자연과학대학 생물학과, 충북대학교 의과대학 해부학교실*

마우스 악하선 배양세포의 DNA와 단백질 합성 및 epidermal growth factor(EGF) 분비에 미치는 isoproterenol(IPR)의 효과를 조사하였다. 마우스 악하선으로부터 분리되어 배양된 상피형세포의 DNA 및 단백질 합성은 IRP에 의해 농도 의존적으로 현저하게 감소하였다. 이와는 달리 IPR 처리 1시간 후에 IPR-처리 마우스로부터 얻은 혈청은 악하선 배양세포의 단백질 합성에는 별 영향을 미치지 못하였으나, DNA 합성은 현저하게 증가시켰다. IRP에 의한 악하선 세포의 DNA 합성능의 감소는 propranolol에 의해 차단되지 않았으나 ascorbate에 의해서는 회복되었다. 악하선 배양세포의 DNA 및 단백질 합성을 저해한 IRP의 처리에 의해 배양세포의 EGF 분비는 현저히 증가되었다. 이상과 같은 결과는 악하선 세포의 DNA 및 단백질 합성에 작용한 IRP의 효과는 beta-adrenoceptor의 흥분에 의한 것이라기 보다는 IRP로부터 유래된 free radical에 의한 세포독성에 기인함을 시사한다. 따라서 IRP의 생체내 투여에 의한 악하선의 비대화를 보고 한 기존의 결과는 IRP가 악하선에 직접 작용하여 유발된 것이 아닌 다른 경로를 통한 간접적인 효과로 판단될 수 있을 것이다.

KEY WORDS: Cultured cells, Isoproterenol, Ascorbate, EGF

마우스 악하선(submandibular gland, SG)의 조직학적 소견이 1926년에 최초로 보고된 이래 그 구조가 많은 연구에 의해 명확히 밝혀졌다(Pinkstaff, 1980). 마우스 악하선은 선포(acini, A), 윤관(intercalated duct, ID), 선관(granular convoluted tubules, GCT), 선조관(striated duct, SD) 등의 형태적으로 뚜렷이 구분되는 특징적인 부분으로 구성되어 있다. 특히 마우스 악하선은 다른 동물의 악하선이나 악하선 이외의 타액선에 비해 GCT 부분이 매우 잘 발달되어 있는 독특한 형태학적 소견을 보이고 있는 것으로 알려져 있다(Chretien, 1977).

최근까지 많은 연구자의 관심의 대상이 되고 있는 생물학적으로 매우 독특한 조직인 마우스의 악하선은 IPR을 투여하면 비대화되고(Brown-Grant, 1961; Selye 등, 1961), 특히 악하선 세포의 DNA 합성과 세포분열의 증가까지도 유도된다(Barka, 1965a, 1965b; Baserga와

Heffler, 1967; Kanamura와 Barka, 1975). 최근에 들어서 IPR에 의한 악하선 비대화과정을 분자적인 수준에서 이해하고자 하는 시도가 있었는데, 그 결과, IPR 투여에 의해 proto-oncogene의 하나인 c-fos가 조기에 발현되고 c-fos의 발현이 beta-adrenergic 수용체를 경유하여 일어난 것이라는 사실이 밝혀졌다(Kousvelari 등, 1988). 또한 c-fos의 발현과 세포증식은 직접적인 관련이 없다는 사실도 확인되었다(Yeh 등, 1988). 이는 마우스에서 IPR 투여로 야기되는 악하선 세포의 증식과 관련된 기작이 아직도 규명되지 않고 있음을 말해주는 것이라 하겠다.

마우스의 악하선을 대상으로 한 이러한 연구들은 in vivo 모델로 진행된 것이어서 악하선의 세포증식과 기능에 관련된 IPR의 역할을 파악하는데 한계가 있었다고 볼 수 있다. 또한 악하선에서 주로 생산되는 EGF의 분비에 IPR이 어떤 영향을 주는지에 대해서도 악하선 절편을 이용한 단편적인 보고가 있을 뿐이다(Roberts, 1977). 한편, 각종 세포의 기능이나 세포의 기능과 관련된 외부

*본 연구는 1989년도 한국학술진흥재단 학술연구 조성비로 이루어졌음.

자극의 작용경로를 탐색하는데 배양세포계를 모델로 한 실험들이 다양하게 이용되고 있음에도 불구하고(Dudek, 1984; Lieberman 등, 1987) 마우스의 악하선 세포를 배양하고 배양된 악하선 세포를 이용한 실험보고는 찾아보기 힘들며, 다만 rat의 경우에 몇 편의 보고가 있을 뿐이다(Kreider, 1970; Kanamura와 Barka, 1975).

본 연구의 목적은 배양된 악하선 세포를 이용하여 악하선 세포의 증식에 관련된 IPR의 역할과 그 작용경로의 직·간접 여부를 파악하고자 하는 것이며 아울러 악하선 세포의 EGF 분비에 미치는 IPR의 직접적인 효과를 조사하는 것이다.

재료 및 방법

세포분리

생후 5-6주 된 C57BL/6N 수컷 마우스에 nembutal(30 mg/kg)을 복강 주사하여 마취시킨 후 악하선을 무균상태로 적출하여 멸균 phosphate buffered saline(PBS)으로 세척한 다음 안과용 가위로 세절하고 조직절편을 trypsin 용액(0.25%, Gibco)으로 37°C에서 30분간 일차 처리한 후, 세포가 포함된 상층액을 얻고 잔여절편은 신선한 trypsin 용액으로 재처리하여 다시 세포부유 상층액을 얻었다. 획득된 세포부유액에 동량의 배양액을 첨가하여 100 g로 10분씩 3회 원심시켜 분리된 세포를 회수하고 trypan blue exclusion 법(Freshney, 1987)으로 세포의 viability를 조사하였다.

세포배양

악하선 세포의 배양에 사용된 배양액은 10%의 fetal bovine serum(FBS, Gibco), gentamycin (20 µg/ml), fungizone(0.5 µg/ml) 등이 첨가된 Dulbecco's modified Eagle's medium(DME, Gibco)이었다. 효소처리에 의해 얻어낸 분리세포를 상기 배양액에 5×10^5 cells/ml 밀도로 부유시킨 후 collagen(type IV, Sigma)처리 세포배양 용기(Macklis 등, 1985)에 접종하여 CO₂ incubator(5% CO₂-95% air, 37°C)에서 배양하였다. 배양 개시 2일 후 또는 3일 후의 세포

를 실험에 이용하였다.

배양세포의 형태관찰

배양세포를 methanol로 고정하고 Giemsa 염색액으로 염색하여 관찰하고 촬영하거나, 배양 중인 세포를 위상차 독립현미경으로 관찰하며 촬영하였다. 배양세포의 미세구조 관찰을 위한 전자현미경시료의 제작은 Moses와 Claycomb의 방법(1982)을 약간 변형시켜 사용하였다. 단층배양된 세포의 표면을 PBS로 세척하고 1% glutaraldehyde(0.1 M cacodylate buffer, pH 7.2)로 전고정한 다음 1% OsO₄(0.1 M cacodylate buffer, pH 7.2)로 후고정하였다. 고정된 시료는 ethanol계(50-100%)로 탈수시켰다. 100% ethanol에 의한 최종 탈수는 2회 반복하였으며, 100% ethanol과 epoxy 수지(Epon 812, Polysciences) 혼합액을 1:1로 섞은 혼합액으로 실온에서 1시간 동안 매몰시켰다. 그 후, 순수한 epoxy 수지 혼합액만으로 교환하고 37°C에서 12시간, 45°C에서 12시간, 60°C에서 24시간 동안 처리하여 epoxy 수지를 중합시켰다. 수지 중합 후 액체질소(-196°C)에 5분간 보존시킨 다음 꺼내어서 세포배양 용기와 세포가 매몰되어 있는 epoxy 블럭을 분리시켰다. Ultramicrotome을 이용하여 80 nm 두께로 절편을 만들고, uranyl acetate와 lead citrate로 이중 염색하였다. 세포의 미세구조는 Hitachi H-600 전자현미경을 이용하여 조사하였다.

IPR을 처리한 마우스로부터의 혈청 채취

생후 6-8주된 수컷 마우스에 IPR(16 mg/100 g, body weight)을 복강내로 주사하였다(Barka, 1970b). 주사 1시간 후, 7시간 후, 24시간 후에 각각 심장채혈로 혈액을 얻어 4°C에 2시간 보관하고 원심분리하여 혈청을 얻었다. 정상 마우스 혈청 역시 IPR 주사만을 제외하고 같은 방법으로 얻었다. 배양세포에 대한 마우스 혈청처리는 IPR을 처리할 때와 같은 방법으로 시행하고, 혈청 첨가 배양 후 DNA 합성능 및 다백질 합성능을 조사하였다.

각종 약물 및 첨가물의 처리

단층배양 2-3일째의 세포를 사용하였다. 단층

배양세포의 표면을 5% FBS 함유 DME 배양액으로 세척한 후 1 ml의 상기 배양액으로 교환하고 적절한 농도로 희석한 약물 또는 첨가물을 10 μ l 첨가하여, 12시간 배양한 후 DNA 합성능과 단백질 합성능 및 EGF 분비능 등을 측정하였다. Beta-antagonist인 propranolol은 IPR 처리전 1시간 동안 처리하고 배양액으로 씻어냈다.

DNA 합성능 및 단백질 합성능 조사

세포내로 동화된 thymidine 또는 leucine 양으로 각각 측정된 DNA 합성능과 단백질 합성능은 각 조건에서 배양하면서 배양 종료 5시간 전에 ^3H -thymidine(1 uCi/ml, Sp. act. 50 Ci/mmol, ICN) 또는 배양 종료 12시간 전에 ^3H -leucine(5 uCi/ml, Sp. act. 50 Ci/mmol, ICN)을 첨가하여 배양 종료시까지 pulse시켜 조사하였다(Freshney, 1987). 동위원소로 pulse시킨 후, PBS로 세척하고 10% Trichloroacetic acid(TCA)로 처리한 다음, 1% sodium dodecyl sulfate(SDS) 함유 0.3 N NaOH 용액을 첨가하고 30분간 세포단층을 용해시킨 후 기를 counting vial로 옮기고 cock-tail 용액(Insta-gel, Packard)을 첨가하여 liquid scintillation counter(Packard)로 방사능을 측정하였다.

EGF의 radioimmunoassay

각 조건하에서 배양된 배양세포내 또는 배양여액내의 EGF 양은 방사면역측정법(radioimmunoassay; Savage 등, 1972; Byyny 등, 1972)을 이용하여 측정하였다. 배양여액내의 EGF 양을 측정하기 위해서 배양여액을 microcentrifuge(10,000 g)로 5분간 원심분리하여 상층액을 얻어 -70°C 에 보관하였으며, 세포내 잔류 EGF 양을 조사하기 위하여 세포표면을 PBS로 세척한 후 0.2 ml의 증류수를 첨가하고 freezing-thawing을 3회 실시한 다음 microcentrifuge로 5분간 원심분리하여 얻어진 상층액을 -70°C 에 보관하였다. 분리한 시료 또는 순수하게 정제된 EGF(Sigma) 표준용액 100 μ l, newborn calf serum(NCS, Gibco) 100 μ l를 첨가한 다음, 최종적으로 rabbit anti-mouse EGF antibody(1:1,000, Sigma) 100 μ l를 첨가한 후 실온에서

18-20시간 방치하여 항원-항체반응을 유도하였다. 방치 후 7% polyethylene glycol(MW. 6,000, PEG, Sigma)과 Goat anti-rabbit immunoglobulin antibody(1:20)가 1:5로 섞인 침강용액 1 ml를 첨가하고, 2,000 g로 15분간 4°C 에서 원심시켜 침전물내의 방사능을 측정하였다.

통계처리

자료의 표현은 평균 \pm 표준편차로 하고 유의성 검정은 Student's t-test에 의거하였으며 P-값 0.05 이하를 유의성의 한계로 하였다.

결 과

세포분리와 배양세포의 형태적 특징

Trypsin 처리에 의해 얻어진 악하선 세포의 분리수율은 5-6주 된 마우스당 $3-5 \times 10^6$ 세포 정도였으며, 세포의 viability는 80-90% 정도였다. 세포배양 용기 표면의 collagen 처리에 의해 얻어진 효과는 Fig. 1에서 볼 수 있듯이 collagen 무처리인 경우에 비해 상피형 세포증식을 활발하게 유도하는 것으로 평가되었다. 전자현미경을 이용하여 배양세포의 미세구조를 조사한 결과, 세포의 형태는 원형, 타원형, 간상형으로 구분할 수 있으며, 단핵세포는 물론 상당수의 이핵세포와 다핵세포도 관찰되었다(Fig. 2a). 세포의 표면에서는 가늘고 짧은 원형질돌기가 다수 관찰되었으며, 세포에 따라 그 모양은 차이가 있었다(Fig. 2b). 핵은 타원 또는 불규칙형이었으며 인은 대체로 3개 정도 관찰할 수 있었다. 세포내에서는 가늘고 긴 미토콘드리아가 많이 관찰되었으며 농과립을 함유한 공포도 일부 세포에서는 다수 관찰되었다(Fig. 2c). 또한 조면소포체(rough endoplasmic reticulum)도 공포 사이사이에서 관찰되었으며 자유리보솜, 글리코젠 과립 등도 세포 전반에 걸쳐 산재하여 있었다(Fig. 2c). 공포내 과립은 본 실험만으로는 무엇이라 말할 수 없으나 일부 과립이 결정체인 것으로 보아 세포의 산물이 아닌가 추측된다. 이상과 같은 형태적 특징으로 보아 배양된 세포는 상피형 세포라고 판단된다.

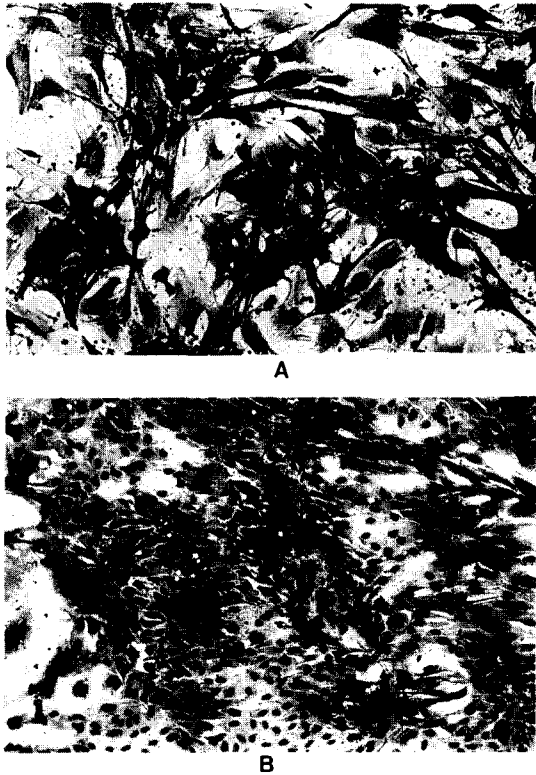


Fig. 1. Monolayer culture of mouse submandibular gland (SG) cells on collagen coated surface ($\times 100$). Giemsa stain, A: Epithelial cells are surrounded by elongated cells. B: Large focus of epithelial cells.

DNA 및 단백질 합성에 대한 IPR의 효과

악하선 배양세포에 IPR을 12시간 처리할 경우에 배양세포의 DNA 합성이 농도의존적으로 억제되었다(Fig. 3). 배양세포의 단백질 합성능 역시 IPR 처리에 의해 현저히 억제되었다(Fig. 4). 한편 $1 \times 10^{-4}M$ 의 IPR과 ascorbate를 동시에 처리하고 12시간 배양한 경우, IPR에 의해 감소된 악하선 세포의 DNA 합성능이 회복됨을 보여주고 있으며 특히 $1 \times 10^{-4}M$ 의 ascorbate를 처리했을 때 악하선 세포의 DNA 합성능은 대조군의 그것보다 21% 가량 증가하였다(Table 1). 또한 악하선 세포의 DNA 합성능의 감소를 유발시킨 IPR의 효과는 beta-수용체의 차단제인 propranolol에 의해서 차단되지 않았다(Table 2). IPR을 1시간 처리한 후 ascorbate와 propranolol을 첨가하는 경우 역시 IPR에 의한 DNA 합성능의 감소는 회

복되지 않았으며 이 효과가 IPR 처리 후의 배양액 교환과는 무관한 것으로 보아 악하선 세포의 DNA 합성능을 감소시킨 IPR의 효과는 IPR처리 초기에 유발되는 것으로 보인다(Table 2).

한편, IPR을 처리한 마우스로부터 얻은 혈청이 악하선 배양세포의 DNA 합성에 미치는 효과는 마우스에 IPR을 처리한 시간에 따라 다르게 나타났다. 즉 IPR 처리 1시간 후에 얻은 혈청은 악하선 세포의 DNA 합성을 현저히 증가시키나 IPR 처리시간이 길어지는 경우(7시간 또는 24시간)에는 대조군(정상 마우스 혈청)과 차이가 없었다(Fig. 5). 그러나 악하선 세포의 DNA 합성능을 증가시킨 IPR-처리 1시간 후의 혈청도 악하선 세포의 단백질 합성에는 영향을 주지 못했다(Fig. 6). 따라서 생체내에서 변화된 IPR 대사산물이 DNA 합성능을 증가시키거나, IPR과 생체내 분자가 상호작용하여 DNA 합성능을 증가시키는 것으로 추측할 수 있다.

EGF의 분비

배양액에 분비된 EGF의 양은 배양액 교환에 의해 크게 감소하나, 배양액 교환 2일째부터는 배양액 교환 전과 거의 같은 10 ng/ml 전후의 양으로 회복되었으며(Fig. 7), 세포내 EGF 양은 배양액 교환 후 1일에서 6일째까지 유의한 차이없이 거의 일정하여(Fig. 7), 악하선 배양세포가 EGF를 지속적으로 합성하여 분비하고 있음이 암시되었다. 악하선 배양세포의 EGF 분비에 미치는 IPR의 효과를 조사한 결과 악하선 배양세포의 DNA 및 단백질 합성능을 감소시킨 IPR의 처리는 의외로 배양세포들의 EGF 분비능을 증가시켰다(Fig. 8). $0.1 - 1 \times 10^{-5}M$ 농도의 IPR처리에 의해 EGF 분비능은 현저하게 증가되었으며 그 이상 농도의 처리에 의해서는 대조군의 그것과 차이가 없었다. IPR 처리에 의해 DNA 및 단백질 합성이 감소하고 EGF 분비능이 증가되는 이 현상은 IPR이 beta-수용체 흥분제(agonist)라는 점을 감안하여 볼 때 매우 흥미로운 결과라고 생각된다.

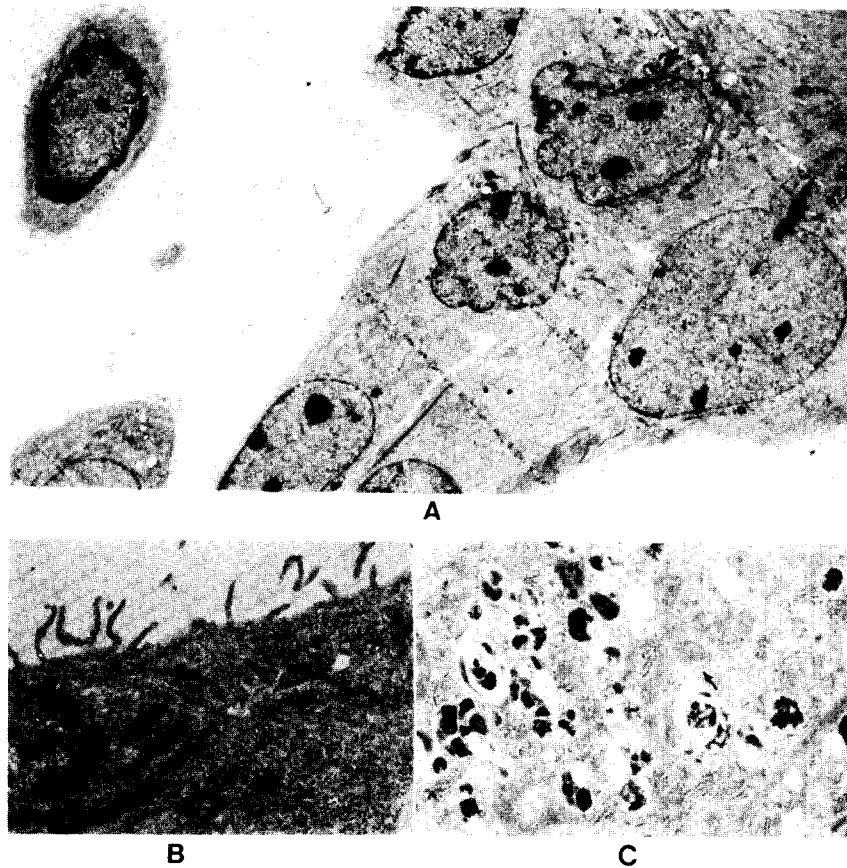


Fig. 2. Electron micrographs of thin section of fixed and Epon-embedded SG cells in monolayer culture (A: $\times 1,000$, B: $\times 6,000$, C: $\times 6,000$).

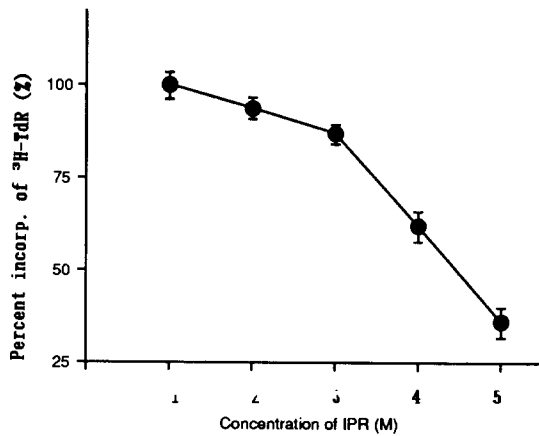


Fig. 3. Effects of IPR on DNA synthesis in cultured mouse SG cells. SG cells were incubated for 12 hours in 10% FBS-DME with IPR in various doses. Each value represents the mean \pm SD of three experiments.

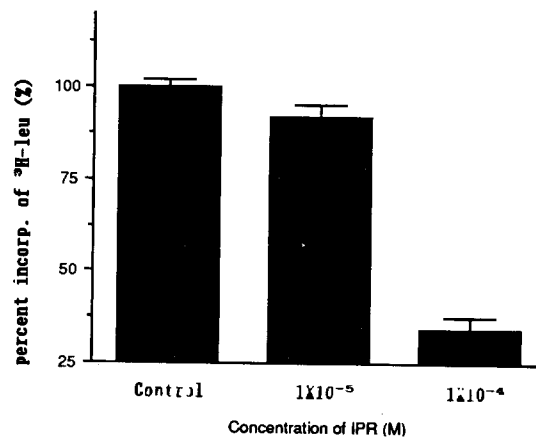


Fig. 4. Effect of IPR on protein synthesis in cultured mouse SG cells. SG cells were incubated for 12 hours in 10% FBS-DME with IPR. Each value represents the mean \pm SD of at least four experiments.

고찰

IPR은 beta-수용체에 작용하는 약물로서 쥐 (rat)와 마우스의 악하선조직 세포의 DNA 합성

Table 1. Effect of isoproterenol in combination with ascorbate on the DNA synthesis of cultured mouse submandibular gland cells.

Chemical treatment	% ³ H-TdR incorporated mean ± SD
Control	100 ± 3.5
Isoproterenol (1 × 10 ⁻⁴)	35.5 ± 3.5*
Isoproterenol (1 × 10 ⁻⁴) + Ascorbate (1 × 10 ⁻⁴ M)	121.0 ± 5.7*
Isoproterenol (1 × 10 ⁻⁴) + Ascorbate (1 × 10 ⁻³ M)	104.1 ± 2.5

Incubation time is 12 hours.

*P < 0.05 compared to control.

Each value represents the mean ± SD of two experiments.

능을 현저히 증가시킨다(Barka, 1965a; 1965b; Baserga, 1967; Yamashina와 Barka, 1972). 생

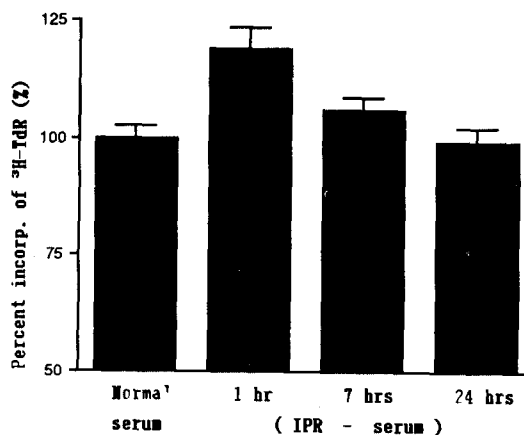


Fig. 5. Effect of serum from IPR treated mouse (IPR-serum) on DNA synthesis in cultured mouse SG cells. Serum was collected from mice at 1, 7, and 24 hours after the injection of the IPR, respectively. SG cells were incubated for 12 hours in FBS-free DME with IPR-serum or normal serum. Each value represents the mean ± SD of three experiments.

Table 2. Effect of isoproterenol in combination with propranolol and/or ascorbate on the DNA synthesis of cultured mouse submandibular gland cells.

		% ³ H-TdR incorporated (mean ± SD)
Isoproterenol (1 × 10 ⁻⁴ M)	Control	34.8 ± 2.5
	Ascorbate (1 × 10 ⁻⁴ M)	43.9 ± 3.1
	1 hr treatment	
	Propranolol (5 × 10 ⁻⁴ M)	40.2 ± 2.8
	Ascorbate + Propranolol	43.3 ± 4.3
12 hr treatment	Control	32.8 ± 5.0
	Ascorbate (1 × 10 ⁻⁴ M)	52.4 ± 2.5
	Propranolol (5 × 10 ⁻⁴ M)	37.5 ± 2.7
	Ascorbate + Propranolol	48.4 ± 5.5

The SG cells were treated with propranolol for 1 hour and then washed with fresh medium. After IPR treatment (1 or 12 hr), ascorbate was added. Each value represents the mean ± SD of two experiments.

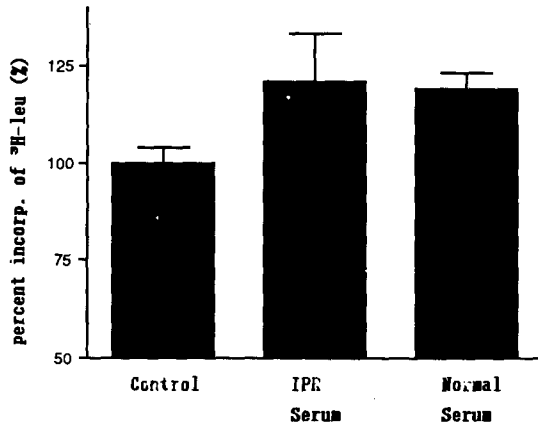


Fig. 6. Effect of serum from IPR treated mouse (IPR-serum) on protein synthesis in cultured mouse SG cells. SG cells were incubated for 12 hours in FBS-free DME with normal serum or IPR-serum (collected at 1 hour after the injection of the IPR). Each value represents the mean \pm SD of three experiments.

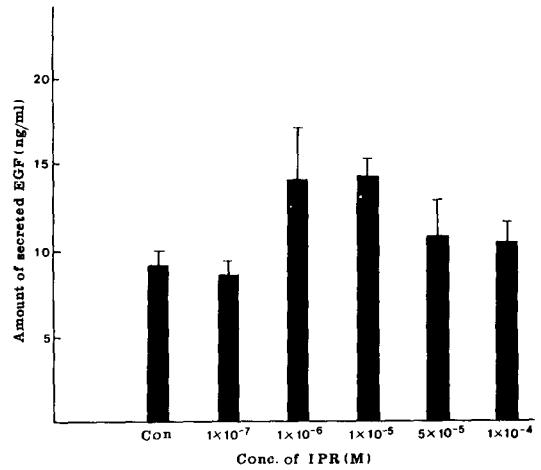


Fig. 8. Effect of IPR on EGF secretion in cultured mouse SG cells. After the treatment of IPR for 30 min, the SG cells were washed and incubated in 10% FBS-DME for 24 hours. The culture supernatants were collected and assayed by radioimmunoassay for secreted EGF. Each value represents the mean \pm SD of three experiments.

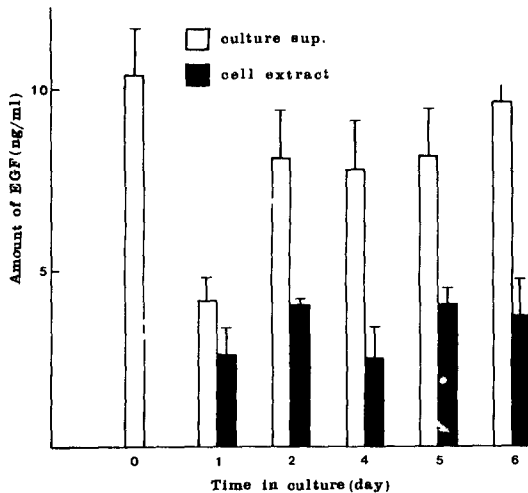


Fig. 7. Synthesis and secretion of EGF from cultured mouse SG cells as a function of culture day. Each value represents the mean \pm SD of three experiments.

체 내에서 세포증식을 유도할 때 (induced cell proliferation) 유용한 실험모델로 평가되는 IPR 투여에 의한 이 현상의 자세한 과정은 아직 자세히 밝혀져 있지 않다. IPR의 생체투여는 DNA 합성 뿐 아니라 RNA 합성 역시 증가시키며 이러한 증가는 actinomycin D에 의해 저해된다고 보고되어 있다 (Barka, 1966; 1970a). Kreider (1970)는 쥐 (rat) 악하선 세포를 배양하고 이 배양세포에 IPR을 처리하였을 때 DNA 합성의 증가가 있었

음을 보고하고, 자신의 결과가 *in vivo* 실험결과와 일치하는 것으로 평가하여 IPR이 악하선 세포 DNA 합성의 증가에 직접 작용한다고 주장하였다. Kanamura와 Barka (1975) 역시 쥐 (rat)의 악하선 세포를 단기간 배양하고 IPR을 처리하여 여러 가지 형태적인 변화를 관찰할 수 있었으나 DNA 합성의 증가에 관한 증거는 얻지 못하였다. 이들은 자신들의 실험결과 즉 IPR에 의해 DNA 합성이 증가되지 않음은 아마도 세포분리 과정 중의 조작이 세포막 표면의 수용체에 손상을 주었기 때문일 것으로 해석하고 IPR을 생체에 투여할 때 관찰되는 DNA 합성의 증가는 IPR이 악하선에 직접 작용하여 나타난 것으로 추측했다. 그러나 IPR이 악하선 배양세포의 DNA 합성능을 현저히 감소시킨 본 실험결과는 Kreider (1970), Kanamura와 Barka (1975) 등의 결과와는 전혀 부합되지 않음을 보여주고 있다. 이는 단순히 실험에 사용한 재료가 쥐 (rat)와 마우스로 각각 다르기 때문인 것으로 생각할 수도 있으나 IPR이 쥐 (rat)와 마우스에 투여되었을 때 동등하게 악하선 비대 및 악하선 세포의 분열과 DNA 합성의 증가가 유도된다는 점 (Brown-Grant, 1961; Selye 등, 1961)을 고려한다면 타당치 못한 것으로 생각된다. 한

편 본 실험결과가 보여주듯이 IPR을 처리한 마우스로부터 얻은 혈청을 첨가한 경우에서 정상 마우스의 혈청을 첨가한 경우에 비해 현저한 DNA 합성의 증가가 있었다는 사실은 생체내 투여된 IPR이 직접 악하선 세포에 작용하는 것이 아니라 간접적으로 작용하는 것임을 시사한다. 이러한 간접적인 효과가 IPR의 투여에 의해 생체내 다른 생물분자가 유도되어 나타난 것인지에 대해서는 현재로서는 불분명하고 계속 추구해야 할 문제로 생각된다. 생체내에 투여된 IPR이 catechol-O-methyl transferase(COMT)에 의해 methylation되어 methyl isoproterenol(methyl IPR)로 바뀌게 되며 COMT의 저해제인 pyrogallol을 IPR과 함께 투여하면 IPR 투여에 의한 악하선 세포의 분열의 증가가 억제된다는 결과에 의거하여 Barka(1970b)는 IPR의 methylation이 IPR에 의한 세포분열 증가의 한 과정일 것으로 주장한 바 있어, 본 실험 결과인 IPR 처리 혈청에 의한 DNA 합성의 증가현상 역시 IPR 처리 혈청내의 IPR 중간 대사산물이 작용하여 나타난 것으로 해석할 수도 있으리라 생각된다.

한편, Persoon-Rothert 등(1989)은 COMT나 monoamine oxidase(MAO)에 의하여 생산되는 IPR-대사산물인 metanephrine, dihydroxymandelic acid, vanillylmandelic acid 등은 세포에 독성이 없지만, 과량의 IPR에 의하여 COMT와 MAO가 포화되거나 이 효소가 없는 경우에는 IPR이 산화되어 quinone으로 되며 결과적으로 세포에 심한 독성을 보이는 O_2^- , H_2O_2 등이 형성된다는 점을 지적하고 IPR이 배양 중인 심장세포에 세포독성을 보인다는 자신들의 실험결과를 free radical이 매개되어 나타난 것으로 주장하였다. 본 실험성적 중, IPR이 악하선 배양세포의 DNA 합성을 농도의존적으로 감소시킨 점, 이러한 IPR의 효과가 propranolol에 의해서는 차단되지 않는 점, antioxidant인 ascorbate에 의해서 IPR에 의한 DNA 합성능의 감소가 회복된 점 등은 배양악하선 세포에 작용한 IPR의 효과는 beta 수용체를 경유하여 나타난 것이라기 보다는 IPR의 산화에 의해서 형성된 free radical에 의한 세포독성의 결과일 것으로 추측된다.

현재까지도 혈액 내에 존재하는 EGF가 어느

조직에 그 기원을 두고 있는지에 대해서는 확실치 않으며 그 정확한 생리적 기능이 무엇인지에 대해서도 불분명하다(Grueters 등, 1985; Savage 등, 1986). 일부의 연구자는 혈액내 EGF는 악하선에서 생산된 것으로 악하선에서 만들어진 후 구강 및 소화기의 상피세포에 의해 재흡수되어 혈액 내로 운반된 것이라고 주장하고 있으나 확실한 증거는 아직 발견되지 않았다(Murphy 등, 1980; O'Dell 등, 1987). 아울러 과연 악하선 내에서 만들어지고 있는 EGF가 GCT 세포로부터 어떤 조절을 받아 분비되는지에 대해서도 불분명하며, EGF가 분비되는 데 관여하는 조절과정에 대한 직접적인 증거 역시 충분치 못하다(O'Dell 등, 1987). 배양 악하선 세포에 IPR을 처리했을 때 EGF의 분비가 증가됨은 beta-수용체 흥분제가 EGF의 분비를 증가시킨다는 Roberts(1977)의 악하선 조직절편을 이용한 실험결과와도 잘 일치하는 것이며, 악하선 배양세포가 EGF 분비에 관련된 약물효과를 조사하는 데 적당한 실험모델이 되는 것으로 생각된다. 아울러 IPR에 의한 악하선 배양세포 증식의 저해효과와 악하선 배양세포 EGF 분비량의 증가효과는 서로 다른 경로를 거쳐 이루어진 것으로 생각되며 이는 beta-수용체 차단제(antagonist)에 의한 차단효과가 검증되어야 더욱 확실해질 수 있지만 일단 EGF 분비는 IPR이 악하선 배양세포의 beta-수용체에 직접 작용하여 나타난 결과로 추측된다.

본 실험결과들은 이상에서 논의된 바와 같이 정리될 수 있으나 다음과 같은 중요한 의문이 제기된다. 즉 (1) 악하선 배양세포의 IPR에 대한 반응성은 homogeneous한가. 다시 말하면 GCT 세포의 반응만으로 설명될 수 있는가. (2) 악하선 세포의 DNA 합성능 증가에 관련된 IPR-처리 혈청내 요인의 본성은 무엇인가. (3) IPR 처리에 의한 EGF 분비조절의 분자 수준의 조절기전은 무엇인가. 악하선 세포의 생물학적 특성을 이해함에 있어 이러한 궁극적인 의문은 또 다른 일련의 실험들이 진행되어야 풀릴 수 있을 것이라 생각된다.

인용문헌

- Barka, T., 1965a. Induced cell proliferation: The effect of isoproterenol. *Exp. Cell Res.* **37**: 662-679.
- Barka, T., 1965b. Stimulation of DNA synthesis by isoproterenol in the salivary gland. *Exp. Cell Res.* **39**: 355-364.
- Barka, T., 1966. Stimulation of RNA synthesis in the salivary gland by isoproterenol. *Exp. Cell Res.* **41**: 573-579.
- Barka, T., 1970a. Effect of isoproterenol on ribonuclease of salivary glands. *Exp. Cell Res.* **61**: 290-294.
- Barka, T., 1970b. Further studies on the stimulation of deoxyribonucleic acid synthesis in the submandibular gland by isoproterenol. *Lab. Invest.* **22**: 73-80.
- Baserga, R. and S. Heffler, 1967. Stimulation of DNA synthesis by isoproterenol and its inhibition by actinomycin D. *Exp. Cell Res.* **46**: 571-580.
- Brown-Grant, K., 1961. Enlargement of salivary gland in mice treated with isopropylnoradrenaline. *Nature* **191**: 1076-1078.
- Byyny, R. L., D. N. Orth, and S. Cohen, 1972. Radioimmunoassay of epidermal growth factor. *Endocrinol.* **90**: 1261-1266.
- Chretien, M., 1977. Action of testosterone on the differentiation and secretory activity of a target organ: The submandibular gland of the mouse. *Int. Rev. Cytol.* **50**: 333-396.
- Dudek, R. W., 1984. Release of newly synthesized hormone from the pancreatic beta cell. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **176**: 1-7.
- Freshney, R. I., 1987. Culture of animal cells: A manual of basic technique (2nd ed.). Alan R. Liss, Inc., New York, pp. 227-256.
- Grueters, A., J. Alm, J. Lakshmanan, and D. A. Fisher, 1985. Epidermal growth factor in mouse milk during early lactation: Lack of dependency on submandibular glands. *Pediatr. Res.* **19**: 853-856.
- Kanamura, S. and T. Barka, 1975. Short term culture of dissociated rat submandibular gland cells. *Lab. Invest.* **32**: 366-372.
- Kousvelari, E., J. M. Louis, L. H. Huang, and T. Curran, 1988. Regulation of proto-oncogene in rat parotid acinar cells in vitro after stimulation of β -adrenergic receptor. *Exp. Cell Res.* **179**: 194-203.
- Kreider, J. W., 1970. Stimulation of DNA synthesis of rat salivary gland cells in monolayer cultures by isoproterenol. *Cancer Res.* **30**: 980-983.
- Lieberman, M., S. D. Hauschka, Z. W. Hall, B. R. Eisenberg, R. Horn, J. V. Walsh, R. W. Tsien, A. W. Jones, J. L. Walker, M. Poenie, F. Fay, F. Fabiato, and C. C. Ashley, 1987. Isolated muscle cells as a physiological model. *Am. J. Physiol.* **253**: C349-C363.
- Macklis, J. D., R. L. Sidman, and H. D. Shine, 1985. Cross-linked collagen surface for cell culture that is suitable, uniform, and optically superior to conventional surfaces. *In Vitro, Cell. Dev. Biol.* **21**: 189-194.
- Moses, R. L. and W. C. Claycomb, 1982. Ultrastructure of terminally differentiated adult rat cardiac muscle cells in culture. *Am. J. Anat.* **164**: 113-131.
- Murphy, R. A., A. Y. Watson, J. Metz, and W. G. Forsmann, 1980. The mouse submandibular gland: An exocrine organ for growth factors. *J. Histochem. Cytochem.* **28**: 890-902.
- O'Dell, N. L., M. Sharaway, M. C. Richardson, and C. B. Pennington, 1987. Regeneration of submandibular gland autografts in sympathectomized rats. *Anat. Rec.* **218**: 373-379.
- Persoon-Rotherth, M., E. J. M. van der Valk-Kokshoorn, J. M. Egas-Kenniphaas, I. Mauve, and A. van der Laarse, 1989. Isoproterenol induced cytotoxicity in neonatal rat heart cell culture is mediated by free radical formation. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **21**: 1285-1291.
- Pinkstaff, C. A., 1980. The cytology of salivary glands. *Int. Rev. Cytol.* **63**: 141-261.
- Roberts, M. L., 1977. The in vitro secretion of epidermal growth factor by mouse submandibular salivary gland. *Naunyn-Schmied. Arch. Pharmacol.* **296**: 301-305.
- Savage, C. A., T. Inagami, and S. Cohen, 1972. The primary structure of epidermal growth factor. *J. Biol. Chem.* **247**: 7612-7621.
- Savage, P. A., V. K. Chatterjee, H. Gregory, and S. R. Bloom, 1986. Epidermal growth factor in blood. *Regul. Peptides* **16**: 199-206.
- Seley, H., R. Velleux, and M. Cantin (1961). Excessive stimulation of salivary gland growth by isoproterenol. *Science* **133**: 44-45.
- Yamashima, S. and T. Barka, 1972. Localization of peroxidase activity in the developing submandibular gland of normal and isoproterenol-induced rats. *J. Histochem. Cytochem.* **20**: 855-872.
- Yeh, C. K., J. M. Louis, and E. E. Kousvelari, 1988. β -adrenergic regulation of c-fos gene expression in an epithelial cell line. *FEBS Letters* **240**: 118-122.

(Accepted February 18, 1991)

Beta-adrenergic Regulation of the DNA Synthesis and Epidermal Growth Factor Secretion in Cultured Submandibular Gland Cells

Geum Yeong Lee, June-No So, Goo Bo Jeong,* Ho Won Park, Hoon Ryu, and Song Jae Lee (Department of Biology, College of Natural Science; Chon-buk National University, Chonju, 560-756, Korea; *Department of Anatomy, College of Medicine, Chong-buk National University, Chongju, 360-763, Korea)

The major aim of this research was to investigate the responses of cultured mouse submandibular gland (SG) cells to isoproterenol (IPR). After trypsin digestion of SG from mice, dissociated cells were cultured in 10% fetal bovine serum-Dulbecco's modified Eagle's medium (FBS-DME) on collagen coated surface to form monolayer. Two or three days after initiation of culture, medium was changed and the effects of IPR on cell growth and function were examined. The effects of IPR in combination with propranolol and/or ascorbate on DNA and protein synthesis of the cultured cells were evaluated by measuring the incorporation of tritiated thymidine or tritiated leucine into the cells. The effects of IPR on epidermal growth factor (EGF) secretion by the cultured cells were also examined by measuring EGF level using radioimmunoassay.

The results are as follows;

- 1) SG cells dissociated by enzyme were successfully cultured and these SG cells were characterized as epithelial-like cells by light microscope and electron microscope.
- 2) IPR inhibited both the DNA and protein synthesis dramatically and dose dependently.
- 3) Serum collected from IPR treated mice appeared to stimulate DNA synthesis of the cultured SG cells dramatically, but not the protein synthesis by the cells. Therefore, it is suggested that IPR may play a role indirectly on DNA synthesis of SG cells *in vivo*.
- 4) The IPR-induced inhibition of DNA synthesis was reduced or prevented by antioxidant, ascorbate. In contrast to ascorbate, application of the beta-blocker propranolol (5×10^{-4} M) in combination with 1×10^{-4} M IPR does not prevent inhibition of DNA synthesis by IPR.
- 5) EGF secretion by cultured SG cells increased markedly by IPR treatment. This data suggest that EGF secretion may be controlled via beta-adrenergic receptor.

In conclusion, the results presented in this paper suggest that the effect of IPR on the DNA synthesis of cultured SG cells is not the result of beta-adrenoceptor activation, but is mediated by the formation of free radicals.