

von Ebner 타액선 선포세포의 전기생리학적 특성에 관한 연구

-patch clamp를 위한 von Ebner 선포세포 분리방법의 개발-

강릉대학교 치과대학 생리학 및 신경과학교실

부교수 김 경 년

ABSTRACT

The study of electrophysiological characteristics of acinar cells of von Ebner salivary gland: A dissociation method for patch clamp

Kyung-Nyun Kim D.D.S., M.S.D., Ph.D.,

Associate Professor, Department of Physiology and Neuroscience College of Dentistry, Kangnung National University

The microenvironments of taste cells in circumvallate and foliate papillae are greatly influenced by secretions from the von Ebner salivary glands (vEGs). The vEGs are associated with the circumvallate and the foliate papillae and their secretions may have a strong impact on gustation. This study is designed to find a method for dissociating acinar cells suitable for patch clamping of the vEG acinar cells.

The single cells or clusters of vEG acinar cells were obtained by sequential trypsin and collagenase treatment. The ionic currents of resting and voltage-activated state were recorded with whole cell patch clamp mode. After the enzyme dissociation procedure, the number and quality of salivary acinar cells from the vEG were good enough for patch clamp experiments. The whole cell currents were mainly composed of outward currents. Their current-voltage relationship showed a strong outward rectification.

The dissociation procedure were found very satisfactory and it enabled us to study of the vEG physiology to better understand the perireceptor mechanism in circumvallate and foliate papillae, also it enabled us to understand the excitation-secretion mechanisms in serous salivary gland.

서론

혀의 유두에는 구강 내 화학 조성의 변화를 감지하는 수많은 미각세포들이 존재하고 있으며, 미각 물질은 반드시 타액에 녹아 수용액 상태에서만 미각세포를 자극할 수 있다¹⁾. 그러므로 미각세포를 둘러싸고 있는 타액의 조성 및 분비율과 연관된 미세환경의 변화는 미각물

질과 미각수용기의 상호작용에 매우 중요한 요소로 작용한다. 미각물질의 유입, 세척 및 미각세포 주위에 일정농도를 유지하는 시간은 미세환경의 변화에 따라 달라지게 된다²⁾. 미각수용기는 구강 내로 노출된 미각세포의 첨단부에 집중되어 있고, 그 주위의 이온 농도 및

본 연구는 한국학술진흥재단 신진연구비(1997)의 지원에 의하여 수행되었음.

조성의 변화는 미각물질로 유발되는 미각세포 활동전위의 양상에 영향을 줄 수 있다. 미각세포는 혀의 유두 중 버섯유두 (fungiform papilla), 성곽유두 (circumvallate papilla) 및 잎새 유두 (folia papilla)에 존재하며, 이 중 버섯유두는 전타액 (whole saliva)과 접촉하고 있지만 성곽유두와 잎새유두는 혀 뒤쪽의 고랑에 위치하며, 그 미세환경은 von Ebner 타액선 (vEG)에서 분비되는 타액으로 구성된다. vEG는 성곽유두와 잎새유두의 고랑에 도관이 개구되는 타액선으로 다른 부위에서는 발견되지 않으며 순수하게 장액성인 타액을 분비하는 것으로 알려져 있다³⁴⁾.

vEG에서 분비되는 타액은 다른 대타액선에서 분비되는 타액과는 달리 매우 독특한 조성을 갖고 있는 것으로 알려져 있는 바 amylase를 포함하고 있을 뿐만 아니라³⁵⁾, 다른 타액선에서는 그 존재가 확인된 바 없는 지방분해효소를 포함하고 있는 것으로 알려져 있고³⁶⁾ 최근에는 그 역할이 논란이 되고 있기는 하지만 지방용해성 물질과 결합성이 매우 뛰어난 물질이 확인된 바도 있다³⁷⁾. 이런 지방친화성 물질과 지방분해효소는 지방용해성 미각 물질의 미각 전달과 성곽유두와 잎새유두 주위 고랑 속의 미세환경의 유지에 중요한 역할을 할 가능성이 있다. Kock 등(1992)은 vEG에서 지방친화성 물질이 없으면 denatonium으로 유발되는 쓴맛이 감소한다고 보고하였으나, 분자생물학적으로 합성된 지방친화성 물질이 denatonium, caffeine 및 aspartame과 상호 결합을 형성하지는 않는다는 보고³⁸⁾도 있어 그 생리학적인 역할은 아직 논란이 되고 있다.

성곽유두와 잎새유두에 있는 미각세포는 arachidonic acid나 linoleic acid와 같은 불포화지방산에 반응을 하는 것으로 알려져 있으며^{39,40)}, vEG에서 분비하는 타액에 포함된 lipase만으로도 음식 속에 포함된 지방을 분해하여 지방산이 형성된다는 보고도 있다³⁹⁾. 위의 사실들로 미루어 볼 때 vEG 타액선은 성곽유두와 잎새유두에서 미각물질이 미각수용기에 작용하는데 생리학적 역할을 할 가능성이 있으며 특히 지방산과 같은 지방용해성 미각물질의 작용에 중요할 수 있음을 시사하고 있다.

그러므로 vEG의 생리학적인 기능 및 타액 분비 기구를 이해하는 것은 미각의 전환기구를 이해하는데 필수적인 한 요소로 생각되지만, vEG는 성곽유두와 잎

새유두 주위에 매우 제한적으로 분포하고 있으며, 근육으로 둘러싸여 있고 그 수도 매우 적고 접근이 어려워 단지 형태학적인 접근만이 일부 시도되었고 본격적인 생리학적인 연구는 아직까지 수행된 바가 없는 실정이다. 본 연구는 vEG 선포세포의 patch clamp 방법을 개발하여 본격적인 전기생리학적인 연구로 선포세포의 전기생리학적 특성을 파악하여 분비기구를 더욱 정확히 살피고자 하였다.

실험 재료 및 방법

선포세포의 분리

실험동물은 Sprague-Dawley계 흰쥐(명진, 한국)를 강릉대학교 동물실에서 실험동물용 고형 사료와 물을 자유롭게 공급하며 일정기간 사육한 뒤 실험에 사용하였다. 체중 200g 내외의 흰쥐를 전신마취하에서 희생시킨 후 즉시 혀를 절제하였다. 절제한 혀를 즉시 100% 산소가스로 포화시키고 얼음으로 냉각시킨 N-2-hydroxy-ethylpiperazine-N-2-ethane-sulfonic acid (HEPES) 완충-Tyrode용액 (단위 mM, NaCl 140, KCl 5, MgCl₂ 1, CaCl₂ 1, HEPES 10, glucose 5, pyruvate 5, pH adjusted to 7.3 with NaOH)에 담근 뒤, 혀 후방부의 성곽유두와 주위의 von Ebner 장액선이 포함되도록 vibratome (Vibroslice, Campden Co., 미국)을 이용하여 100 ~ 200 μ m 두께로 잘라내었다. 잘라낸 절편을 해부 현미경으로 관찰하며 vEG 부위만을 얻어낸 후 tissue chamber에 옮겨, 100% 산소를 계속 공급하며 얼음으로 냉각시킨 HEPES 완충 Tyrode 용액에 보관하였다.

얻어진 장액선 절편을 Kim 등³³⁾의 방법을 참고로 HEPES완충-Tyrode용액에 녹인 trypsin (0.4 mg/ml, Sigma, 미국)으로 5분간, collagenase (60 U/ml, Sigma, 미국), trypsin inhibitor (2 mg/ml, Sigma, 미국) 혼합용액으로 15분간 36°C에서 순차적으로 처리하여 단일 선포 또는 선포세포군을 얻었다. 얻어진 세포는 HEPES완충-Tyrode용액에 넣어 산소를 계속 공급하며 4°C에 보관하고 추후 실험에 사용하였다. 분리된 세포를 보관하는 시간은 4시간을 넘지 않도록 하였다.

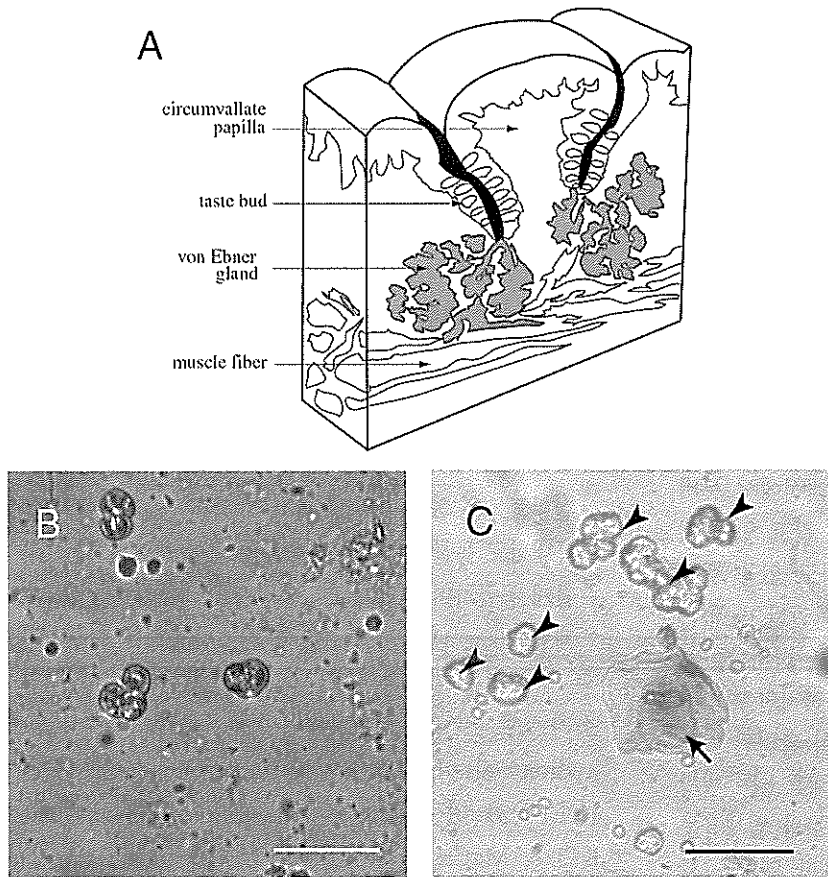


Fig. 1. Schematic diagram of location of von Ebner gland in lingual slice (A). Light microscopes of living dissociated vEG acinar cells. The dispersed cells after enzyme treatment. Doublet or Triplet of isolated vEG acinar cells (B). Fragment of muscular cells and dead vEG acinar cells were stained with trypan blue (arrow), but live vEG acinar cells were not (arrow heads)(C). Calibration bar in B = 30 μ m, C = 100 μ m.

Dye exclusion test

세포가 살아있는지 여부를 등장성 식염수에 녹인 Trypan blue solution (0.4%, Sigma, 미국)를 이용하여 검사하였다. Patch clamp를 시행하기 직전에 100 μ l의 trypan blue 용액을 기록 용기에 첨가하고 3분 뒤 HEPES완충-Tyrod 용액으로 세척한 뒤 세포가 염색되어 있는지 여부를 관찰하여 염색되지 않은 세포만 다른 실험에 사용하였다.

세포내 형광분석법을 이용한 칼슘농도 측정

분리된 설포세포가 vEG 설포세포인지 확인하기 위하여 분비자극물질로 유발된 세포 내 칼슘 이온의 농도

의 변화를 측정하였다. 칼슘의 농도에 반응하여 형광을 내는 fura-2 acetoxymethyl ester (fura-2 AM, Molecular Probe, 미국)를 이용하여, 분리된 설포세포를 fura-2 AM을 5 μ M 농도로 녹인 200 μ l의 HEPES완충 Tyrod 용액에 넣고 상온(20 ~ 22°C)에서 분당 60회로 흔들면서 주입하였다. 30분 뒤 동일한 완충 용액으로 3회 세척한 뒤 다시 20분간 상온에서 교반 배양하여 세포내의 fura-2 AM이 fura-2로 전환되도록 하였다. Fura-2가 주입된 설포세포를 adhesive protein (Sigma, 미국)으로 도포한 실리콘과 cover slip을 이용하여 제작한 용적 200 μ l의 용기에 옮겨 세포(군)가 배양 용기의 바닥에 부착되도록 하고 형광현미경(Axiovert 100, Zeiss, 독일)을 사용하여 관찰하였다.

Fura-2의 형광을 유발시키기 위하여 Xenon전구를 광원으로 한 빛을 dual spectrophotometer (Photon Technology International, 미국)로 통과시켜

회전 파장 선택기를 사용하여 340 nm와 380 nm가 60Hz의 빈도로 교대로 비추어지도록 하였다. 이 자외선에 의하여 유발된 형광을 510 nm에서 모아서 증폭하여 분석에 사용하였다.

설포세포의 자극 위하여 증력을 이용하여 분당 1 ml의 속도로 관류하였다. 분비자극물질은 1 μ M의 Carbachol (CCh, Sigma, 미국)사용하였다.

얻어진 형광은 Felix 소프트웨어 (Photon Technology International, 미국)를 사용하여 분석하였다. 두 가지 자외선 흥분파에 의하여 얻어진 형광을 농도로 전환하기 위하여 표준 칼슘용액(Molecular Probe, 미국)을 이용하여 색상으로 전환하였다. 세포

내 칼슘 농도 표준화를 시도하였으나 선포세포가 ionophore로 유도된 세포 내 칼슘이온 농도의 증가로 빠르게 세포막이 부풀어오르고 파괴되어 세포 외 칼슘 농도 표준화법을 사용하여 선포세포 내 칼슘이온의 농도를 추정하였다.

Patch clamp 기록

선포세포의 patch clamp는 HEPES완충 Tyrode 용액을 관류 용액으로 하여 whole cell voltage clamp 기록방법¹⁴⁾을 사용하였다. 적혈구용적률 측정용 모세관 (Fisher, 미국)을 이용하여 저항이 1 - 2 M Ω 이 되도록 미세전극을 제작하였다. 세포내 용액은 HEPES완충-고칼륨용액(in mM, KCl 140, MgCl₂ 1, CaCl₂ 1, EDTA 11, HEPES 10, ATP 2, pH adjusted to 7.2 with KOH)을 사용하였다. 세포막을 통한 전류는 Axopatch 200A 증폭기 (Axon Instruments, 미국)를 이용하여 low pass filter를 1 kHz로 설정하고 기록하였다. 막전위의 고정 및 실험결과와 저장은 증폭기를 digidata 1200 (Axon Instruments, 미국)를 이용하여 컴퓨터와 연결하고 pClamp (version 6; Axon Instruments, 미국)로 시행하였다. 저장된 실험 결과는 추후 pClamp를 이용하여 분석하였다.

Whole cell mode가 설정이 되면 통법에 따라 직렬

저항과 세포막 capacitance를 보상하고 세포막 전위를 기록한 뒤 추후 실험을 계속하였으며, 누출저항은 보상하지 않고 전류를 기록하였다.

실험결과

분리세포의 형태학적 고찰

성곽유두 및 주위의 vEG를 모식적으로 도시하였다 (Fig. 1 A). 순차적 효소처리법으로 처리한 결과는 세포 또는 세포절편들이 얻어졌다. 이들 중에서 vEG 선포세포는 선포와 유사한 구조를 보이고 세포막이 매우 깨끗하여 쉽게 구별할 수 있었으며 (Fig. 1 B), 선포세포외에는 근육세포의 절편들이 많이 가장 많이 관찰되었다. 이 세포들은 trypan blue염색을 시도한 결과 살아있는 선포세포는 염색이 되지 않았지만, 근육세포의 절편들은 염색이 되어 쉽게 구분할 수 있었다 (Fig. 1 C). 선포세포를 4시간 동안 4°C에 보관한 이후에도 같은 결과를 관찰할 수 있었다.

세포내 칼슘 농도의 변화

von Ebner 장액선 선포세포에서 안정시 세포 내 칼슘이온 농도는 모든 경우에서 100 nM 이하로 52 ± 27 nM (평균 \pm 표준오차, n = 5) 이내였다 (Fig. 2, images

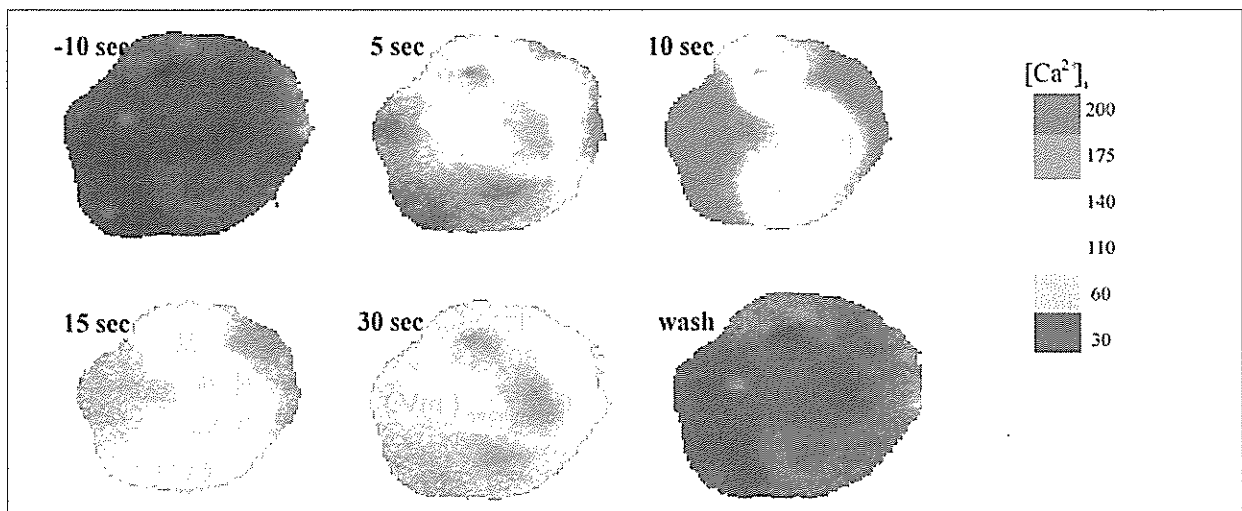


Fig. 2. Representative pseudocolor ratio images of cluster of von Ebner salivary acinar cells loaded with fura-2 after superfusion of HEPES buffered Tyrode solution containing 1 μ M CCh. The pseudo color scale of the image has 240 shades, of which 6 were selected for calibration bar on the right. At the 0 second superfusion with CCh solution began. The cluster of acinar cells were imaged at 30 consecutive times. 6 images of this set were shown.

at -10 sec). 관류액에 1 μ M의 CCh를 첨가한 경우 세포 내 칼슘 농도는 5초 이내에 급격히 증가하여 자극 후 10초에 189 ± 57 nM 로 최고 농도에 이르렀으며 그 후 서서히 감소하였으나 CCh가 있는 동안은 계속 안정시 보다 높은 칼슘 농도를 유지하였다(Fig. 2, images at 5, 10, 15, and 30 sec).

세포막 전류

Giga seal로 whole cell mode가 이루어진 후 세포막 전위를 측정된 결과 상당히 높은 안정막 전위를 기록할 수 있었으며(-62.7 ± 13.9 , $n = 5$), 이는 세포막의 기능이 정상적으로 유지되고 있음을 시사한다. 이 세포들에서 -60 mV로 막전위를 고정된 후 -60 mV에서 $+60$ mV까지 막전위의 변화를 100 msec동안 유

발한 결과 최대 수 nA의 전압 의존성 외향성 전류가 관찰되었다(Fig. 3). 외향성 전류는 비교적 천천히 활성화되어 약 50 msec 후에는 거의 최고점에 이르렀으며, 이후 계속 유지되었다(Fig. 3, inset). 마지막 10 msec 동안의 전류 평균값을 비교한 결과 역전전압이 약 -5 mV인 강력한 외향성 정류현상을 관찰할 수 있었다(Fig. 3)

총괄 및 고찰

본 실험 결과 순차적인 효소처리법에 의하여 건강한 vEG 선포세포를 충분히 얻을 수 있음이 확인되었다.

순차적 효소처리 후 선포와 비슷한 세포군이 많이 관찰된 바, 이는 vEG 선포세포가 tight junction에 의하여 선강측 세포막이 연결되어 있고⁴⁾, tight junction

은 단백질 분해효소에 의하여 잘 파괴되지 않기 때문에 순차적 효소처리 후에도 선강측의 tight junction이 유지된 결과로 생각할 수 있다. 그러므로 세포군의 바깥쪽을 basolateral 측으로 생각하고 실험을 시행하였다.

본 실험에서 whole cell voltage clamp를 위한 세포로의 접근은 주로 basolateral 측으로 시도되었다. 대부분의 세포들이 trypan blue에 의하여 염색이 되지 않고 상당히 높은 음성의 안정막 전위를 보이고 높은 input resistance를 나타내는 것으로 보아 본 실험 조건에서 세포들이 살아있음을 알 수 있다.

분리된 세포의 세포내 칼슘 농도는 안정 시 매우 낮게 유지되고 있었으며, CCh로 처리한 결과 매우 급격히 증가

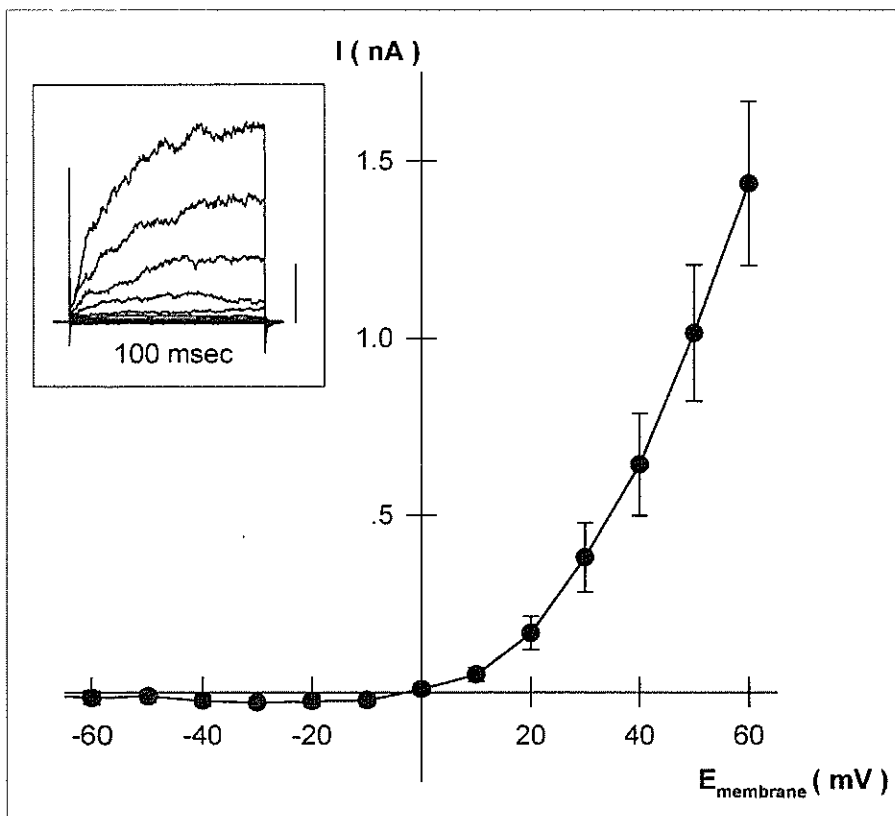


Fig. 3. The currents-voltages relationships obtained from the whole cell currents of acinar cells of von Ebner salivary gland (vEG). The vertical bars in I-V curve mean S.E.M. of 5 independent experiments. The representative voltage-activated whole cell currents of vEG acinar cell (inset). Intracellular calcium ion concentration was maintained at 10^{-8} M with 11 mM EGTA in pipette solution. Holding potential was -60 mV and test potentials were applied from -60 mV to $+60$ mV with 10 mV step for 100 msec. Vertical calibration bar in inset diagram represents 500 pA.

하였다. 낮게 유지되는 세포내 칼슘 농도는 세포막의 기능이 정상적으로 유지되고 있음을 시사하고, 또한 CCh 처리시 나타나는 급격한 칼슘 농도의 증가는 vEG 세포가 부교감 신경의 자극으로 분비를 일으킨다는 보고¹⁵⁾로 미루어 보아 순차적 효소처리법으로 분리된 세포가 vEG 선포세포임을 시사한다.

본 실험에서 얻어진 막전위 전위는 62.7 mV로 3M KCl로 충전된 미세전극으로 전통적인 세포내 전위기록법을 사용하여 측정된 경우보다 큰 값을 보이는 바, 이런 현상은 악하선이나 이하선 선포세포의 경우에도 널리 알려져 있는 일반적인 현상이다^{16,17)}. 이런 차이는 미세전극이 세포막으로 들어갈 때 생기는 간극으로 인하여 세포 내로 칼슘이 유입되어 일어나는 것으로 알려져 있다¹⁸⁾.

본 실험에서 막전위 고정법으로 얻어진 전류의 역전전위가 약 -5 mV이었다. 악하선 선포세포와 이하선 선포세포에서 막전위 고정법으로 얻어진 전류는 칼륨과 염소 이온 전류로 구성되어 있음이 잘 알려져 있다^{16,17)}. 본 실험 조건에서도 외향성 전류를 나타낼 가능성이 있는 이온 이동은 칼륨이온의 유출과 염소이온의 유입인 바, 각각의 Nernst 평형전위는 -84mV 와 1mV 이다. 본 실험의 역전전위인 -5 mV에서는 Goldman 방정식으로 두 이온의 상대적 투과도를 계산하면 칼륨이온이 약 7%, 염소이온이 약 93%의 기여를 하고 있는 것으로 보여 악하선 선포세포¹⁶⁾, 이하선 선포세포¹⁷⁾, 누액선 선포 세포¹⁹⁾ 및 돼지의 췌장 선포세포²⁰⁾와도 차이를 보이고 있다.

vEG 선포세포의 역전전위와 다른 선포세포의 역전전위가 차이를 보이는 이유로 생각할 수 있는 것은 첫째 세포 내 칼슘의 농도가 칼슘의존성 칼륨전류를 활성화 시키기에는 부족했을 가능성이 있다. 칼슘의존성 칼륨통로의 막전위의존성은 막전위 의존성 칼륨통로에 의하여 일어나는 현상이므로²¹⁾ 본 실험에서 사용된 세포 내 용액인 HEPES완충-고칼륨 용액에 포함된 EGTA로 인하여 세포 내 칼슘 농도가 약 10 nM로 고정되고 이로 인하여 칼륨전류의 활성화가 차단되었을 가능성이 있다. 다른 이유로는 vEG 선포세포에는 원래 전위의존성 칼륨통로나 칼슘의존성 칼륨 통로의 분포가 적을 가능성이 있다. 그러나 현재 vEG 선포세

포의 이온통로 분포에 관한 보고를 찾아볼 수 는 없지만 악하선 선포세포의 경우 많은 칼슘의존성 칼륨 통로를 갖고있으며, 이로 인해 역전전위가 보다 칼륨의 평형전위에 접근해 있는 사실과 두 타액선이 같은 발생학적인 기원을 갖는 사실로 보아 그 가능성이 적어 보인다. 또 다른 가능성으로는 본 실험에서 사용된 순차적 효소처리법이 전위의존성 칼륨 통로 또는 칼슘의존성 칼륨 통로만을 선택적으로 파괴하였을 가능성이 있지만 그 외의 다른 가능성을 포함하여 보다 뚜렷한 원인을 알기 위해서는 계속적인 실험이 필요하다.

본 논문에서 제시한 순차적 효소처리법은 매우 간단한 방법으로 patch clamp에 필요한 충분한 수의 건강한 세포를 얻을 수 있었다. 본 실험 방법을 응용하면 전기생리학적인 연구뿐만 아니라 생화학적인 연구, 약리학적인 연구 및 형광분석법에도 응용할 수 있을 것으로 생각된다.

결론

타액의 분비와 미각의 전환은 모두 구강에서 일어나고 있는 중요한 생리현상이며 두 기능간에는 매우 밀접한 연관성을 갖고 있음에도 불구하고 적절히 연관지어 설명하지 못하고 있다. 특히 혀의 후방부의 미각을 담당하고 있는 잎세유두와 성곽유두의 미세환경을 제공하는 von Ebner 장액선에 대하여는 거의 알려진 바가 없는 실정이다. 본 연구는 patch clamp를 위하여 von Ebner 장액선 선포세포를 분리하고 전기생리학적 특성을 알아보기 위하여 고안되었다.

von Ebner 장액선 단일 선포세포는 trypsin과 collagenase를 사용하여 분리하여 실험에 사용하였다. Dye exclusin검사와 세포 내 형광분석법을 통하여 세포가 살아있으며, 부교감 신경성 자극에 반응하는 세포임을 확인하였다. 분리된 세포에 whole cell voltage clamp를 시행하여 칼륨이온전류와 염소이온전류로 구성된 전위의존성 외향성 전류를 관찰하였다.

von Ebner 장액선 생리에 관한 본 연구로 장액선의 타액 분비기구의 규명에 도움이 될 뿐만 아니라 성곽유두와 잎세유두에 존재하는 미각세포의 미각 수용기 인 접부에서의 기질-수용기 작용기구의 이해에도 도움이 될 것이다.

참고문헌

1. Spielman AI. Interaction of saliva and taste. *J Dent Res* 69: 838-843, 1990.
2. Carr WES, Gleeson RA, Trapido-Rosenthal HG. The role of perireceptor events in chemosensory processes. *TINS* 13: 212-215, 1990.
3. Ellis RA. Circulatory patterns in the papillae of the mammalian tongue. *Ana Rec* 133: 579, 1959.
4. Hand AR. The fine structure of von Ebner's gland of the rat. *J Cell Biol* 44: 340-353, 1970.
5. Field RB, Hand AR. Secretion of lingual lipase and amylase from rat lingual serous glands. *Am J Physiol* 253: G217-G225, 1987.
6. Hamosh M, Scow RO. Lingual lipase and its role in the digestion of dietary lipid. *J Clin Invest* 52: 88-95, 1973.
7. Schmale H, Holtgreve-Grez H, Christiansen H. Possible role for salivary gland protein in taste reception indicated by homology to lipophilic-ligand carrier proteins. *Nature* 343: 366-369, 1990.
8. Kock K, Bloker M, Schmale H. Postnatal development of von Ebner glands: accumulation of lipocalcin superfamily in taste papillae of rat tongue. *Cell Tissue Res* 267: 313-320, 1992.
9. Creuzenet C, Mangroo D. Physico-chemical characterization of human von Ebner gland protein expressed in *Escherichia coli*: Implications for its physiological role. *Protein Express & Puri* 14: 254-260, 1998.
10. Gilbertson TA, Fontenot DT, Liu L, Zhang H, Monroe WT. Fatty acid modulation of K^+ channels in taste receptor cells: gustatory cues for dietary fat. *Am J Physiol* 272: C1203-C1210, 1997.
11. Gilbertson TA. Gustatory mechanisms for the detection of fat. *Curr Opin Neurobiol* 8: 447-452, 1998.
12. Harris JT. Fat absorption in the newborn. *Acta Paediatr Scand Suppl* 299:17-23, 1982.
13. Kim KN, Kim JS, Lee JH. Influences of cholecystokinin on potassium channels in submaxillary acinar cells of rat. *J Oral Biol* 18: 63-70, 1994.
14. Hamil OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, and Sigworth FJ. Improved patch-clamp technique for high-resolution current recording from cell and cell free membrane patches. *Pflugers Arch* 391: 85-100, 1981.
15. Gurkan S and Bradley RM. Effects of electrical stimulation of autonomic nervous system on degranulation of von Ebner's gland acini. *Brain Res* 473:127-133, 1988.
16. Gallacher DV, Morris AP. A patch clamp study of potassium currents in resting and acetylcholine-stimulated mouse submandibular acinar cells. *J Physiol* 373: 379-395, 1986.
17. Iwatsuki N, Maruyama Y, Matsumoto O, Nishiyama A. Activation of Ca^{2+} -dependent Cl^- and K^+ conductances in rat and mouse parotid acinar cells. *Jpn J Physiol* 35: 933-944, 1985.
18. Marty A, Neher E. Tight seal whole-cell recording. In Single channel recording. 2nd ed. edited by Sakmann, B. and Neher, E., Plenum Press, New York, 1995.
19. Findlay IA. patch-clamp study of potassium channels and whole-cell currents in acinar cells of the mouse lacrimal gland. *J Physiol* 350: 179-195, 1984.
20. Iwatsuki N, Nishiyama A. Action of tetraethylammonium on calcium-activated potassium channels in pig pancreatic acinar cells studied by patch-clamp single channel and whole-cell current recording. *J Memb Biol* 86: 139-144, 1985.
21. Hille B. Potassium channels and chloride channels. In Ionic channels of excitable membranes. 2nd ed. edited by Hille, B. Sinauer Associates Inc., Sunderland, 1992.