

악하선 선포세포에서 β -아드레날린계 활성화 후 세포내 Ca^{2+} 농도 증가에 미치는 옥탄올의 효과

최 정 이[†]
동우대학 치위생과

The effect of octanol on the intracellular Ca^{2+} increase in submandibular acinar cells evoked by β -adrenergic activation

Jeong-Iee Choi[†]

Department of Dental Hygiene, Dong-u College, Sokcho City, Kangwon-Do 217-711, Korea

ABSTRACT The concentration of intracellular Ca^{2+} was measured by spectrofluorometer after rat submandibular acinar cells were loaded with fura-2/AM(fura-2). After isoproterenol and octanol were administered while letting submandibular gland acinar cell placed in a perfusion chamber flow through a standard solution, the changes of Ca^{2+} concentration were measured. When they were administered separately, there showed little changes of intracellular Ca^{2+} concentration. When they were administered at the same time, however the concentration of intracellular Ca^{2+} was shown to increase. When forskolin, an adenylate cyclase activater, was administered together with octanol the response looked similar to the response of isoproterenol. In case of the extracellular Ca^{2+} was removed by omitting Ca^{2+} in standard solution and treating EGTA, isoproterenol and forskolin does not affect to the concentration of intracellular Ca^{2+} . Therefore, it was certified that the increase of intracellular Ca^{2+} was caused from outside the cell. In order to know that the Ca^{2+} influx is related with capacitative entry pathway, godolinium, blocker of that pathway was treated. With the result of that experiment there was no complete control of the increase in the concentration of intracellular Ca^{2+} . However, speed and amount of Ca^{2+} increase was comparatively diminished.

Key words Spectrofluorometer, Isoproterenol, Adenylate cyclase activater, EGTA, Capacitative entry pathway, Godolinium

서 론

세포내 유리칼슘(intracellular free calcium ion, Ca^{2+})은 세포가 고유기능을 발휘하는데 가장 일반적인 이차 전령¹⁻⁵⁾으로서 세포의 성장, 분비, 근세포의 수축, 지각 감지 등의 다양한 반응에 관여한다⁶⁾. 또한, 세포질 내 유리칼슘농도는 100 nM 정도로 세포외부의 칼슘농도 1-2 mM에 비해 매우 낮은 농도로 유지되어야 하므로 고도로 정확한 조절기전이 필요하다.

수많은 신경 전달물질이나 호르몬이 타액선 선포세포에 작용하는 경우 타액분비가 유발된다. 이 물질들이 작용하는 선포세포의 수용체로는 adenylate cyclase와 연관되어 cyclic AMP를 매개로 작용을 나타내는 수용체와 phospholipase C에 작용하여 diacylglycerol(DAG)과 inositol triphosphate(IP3)를 매개로 타액분비를 일으키는 수용체가 있다. 세포 내 Ca^{2+} 농도가 증가되어 세포의 apical pole에 존재하는 Ca^{2+} -activated

Cl-channel이 열림에 따라 전해질과 물이 도관내로 이동하면서 타액이 분비된다⁷⁾. 타액선 선포세포의 세포 내 Ca^{2+} 농도의 증가는 일시적인 증가와 감소가 주기적으로 반복되는 특이한 진동(oscillation)양상을 보이기도 한다^{8,9)}.

타액선 세포에서의 타액분비는 타액선 세포막의 아드레날린성 수용기를 통한 신경호르몬의 전달을 통해 cyclic AMP를 이용하는 기전, 즉 교감신경 전달물질이 세포막의 수용체와 결합하여 adenylate cyclase가 활성화 되면 cyclic AMP를 증가시켜 amylase나 mucin과 같은 단백질의 분비(exocytosis)가 유도되는 것이 있으며, 부교감 신경전달물질에 의한 세포막의 인지질인 phosphatidyl inositol-4,5 biphosphate를 통해 IP3 생성경로를 거쳐 세포 내 Ca^{2+} 이 증가됨으로서 체액성분이 세포 밖으로 분비된다⁷⁾. β -아드레날린계는 타액선 선포세포에서 α -아드레날린계에 비하여 훨씬 우세한 수용체의 분포를 보인다. β -아드레날린 수용체에 효현제가 결합하면 adenylate cyclase 활성화기전을 통해 cyclic AMP 농도를 활성화시키는 것으로 알려져 있으며 그 기전은 Ca^{2+} 경로와는 무관한 것으로 알려져 있다¹⁰⁾. β -아드레날린 작동성 수용기나 vasoactive intestinal polypeptide(VIP) 수용기에 의해 증가된 세포 내 cyclic AMP

[†]Corresponding author
Tel: 016-730-1897
Fax:
E-mail: biobrain@hanmail.net

는 Ca²⁺의 막투과성에 영향을 주어 세포 내 농도증가를 유발한다¹¹⁾. 이에 β-아드레날린 수용체를 활성화 시키는 isoproterenol을 투여한다면 세포 내의 Ca²⁺ 농도 증가가 나타날 것을 예상할 수 있다. 한편, gap junction은 세포에서 세포로 전기적 활성의 빠른 전달과 다양한 화학적 전령자들의 상호 교환을 허용한다. 이때, gap junction을 차단하는 것으로 알려진⁵⁾ octanol을 동시에 투여한다면 신경전달기전을 억제시킬 뿐 아니라 지용성 물질인 알콜의 특성상 세포막을 쉽게 통과하여 세포 내 Ca²⁺ 저장고를 포함한 세포내 소기관들(intracellular organelles)에 작용할 것으로 기대할 수 있다.

이러한 이론적 배경을 바탕으로 하여 β-아드레날린계 수용체에 비교적 특이적인 효현제라 할 수 있는 isoproterenol과 gap junction blocker로 알려진 octanol을 함께 투여함으로써 이들이 악하선 선포세포의 세포 내에서의 Ca²⁺ 농도변화에 어떠한 작용을 하는가를 실험적으로 관찰하여 확인 분석하고자 한다. 따라서 본 실험에서는 Ca²⁺ 경로와 무관하게 cyclic AMP 생성에 관여하는 β-아드레날린계 작동성 약물과 옥탄올이 악하선 선포세포의 세포질 내 Ca²⁺ 농도 증가에 어떤 효과를 나타내는지 확인할 수 있으리라 여겨진다.

재료 및 방법

1. 악하선 세포의 분리(preparation of submandibular acini)

체중 200~250 g의 Sprague-Dawley 계 수컷 흰쥐를 사용하였으며, 실험전에 탈수로 인한 비정상적인 반응을 배제하고자 물과 사료로 자연적인 조건을 부여해 주었다. Diethyl ether로 마취시켜 cardiac puncture로 희생시킨 후 즉시 양쪽 악하선을 적출하여, 미리 냉각시킨 bovine serum albumin(BSA)를 포함하고 있는 Ca²⁺-, HCO₃⁻-free 용액(NaCl 130 mM, KCl 4.5 mM, NaH₂PO₄ 1.0 mM, MgSO₄ 1.0 mM, HEPES-Na 10 mM, HEPES 10 mM, glutamine 2 mM, B-methoxyethoxymethyl chloride(MEM) amino acid 2 mM, 1% BSA)에 넣고 결체조직, 임파선 및 악하선 표면에 붙어 있는 설하선(sublingual gland)을 제거하고 잘게 자른 후 실리콘을 도포한 시험관(siliconized flask)에 넣었다. 60 U/ml의 collagenase를 포함하고 있는 15 ml의 용액을 이 시험관에 넣고 지속적으로 100%의 O₂를 공급하면서 37°C를 유지하고 있는 shaking water bath 속에서 1시간 배양하였다. 이 기간 중에 1~2회 5 ml pipette을 이용하여 기계적 분리를 시행하였다. 배양이 끝난 후 collagenase를 포함하지 않은 용액으로 3회 수세하여 5 ml pipette으로 조직절편을 다시 한번 분리하고 nylon mesh를 통과해 나온 세포들을 원심분리 하였다. 이 과정을 3회 반복하여 얻어진 세포들을 2 ml의 collagenase를 포함하지 않은 용액에 넣고 지속적으로 산소를 공급하였다.

2. 세포 내 Ca²⁺ 농도 측정

칼슘농도의 변화에 민감하게 반응하는 형광물질인 fura-2/AM은 세포 내로 들어가서 세포 내에 존재하는 효소인 esterase에 의해 분해되어 세포막을 통과하지 못하는 fura-2 형태로 축적된다. fura-2/AM은 농도가 2 μM이 되도록 dimethyl sulfoxide(DMSO)에 녹여 stock solution을 만든 후 세포를 포함하고

있는 용액 2 ml에 최종농도가 2 μM이 되도록 넣고 100% O₂를 공급하면서 실온에서 40분간 유지해 형광물질을 축적시켰다. 이후 95% O₂, 5% CO₂로 포화시킨, BSA를 포함하지 않고 Ca²⁺과 HCO₃⁻를 포함하고 있는 표준용액(NaCl 110 mM, KCl 4.5 mM, NaH₂PO₄ 1.0 mM, MgSO₄ 1.0 mM, CaCl₂ 1.5 mM, HEPES 5 mM D-glucose 10 mM)으로 원심분리하여 얻어진 세포들을 2 ml 용액에 넣어 얼음 속에 보관하였다. Ca²⁺-free 용액을 사용할 경우에는 표준용액에 CaCl₂를 빼고 1 mM의 EGTA를 첨가하였다.

세포 내 Ca²⁺ 농도를 측정하기 위하여 세포를 포함한 30-40 μl의 용액을 관류장치(perfusion chamber)내 glass coverslip 위에 올려놓고 세포가 부착될 때 까지 2~3분간 방치하였다. 세포가 coverslip에 부착되면 spectrofluorometer와 연결된 역상현미경 위에 고정시키고 2 ml/min의 속도로 용액(NaCl 110 mM, KCl 4.5 mM, NaH₂PO₄ 1.0 mM, MgSO₄ 1.0 mM, CaCl₂ 1.5 mM, HEPES 5 mM, D-glucose 10 mM)을 관류하면서 20-30분간 세포가 새로운 환경에 적응하도록 기다린 후 β-아드레날린계 수용체 작동성 약물 isoproterenol 또는 octanol을 관류용액 내로 첨가한 후 Ca²⁺ 농도를 측정하였다. Spectrofluorometer의 fura-2에 대한 자극파장(excitation wavelength)은 340 nm와 380 nm가 반복되도록 해 주는데, 340 nm에서는 칼슘과 결합한 fura-2의 형광강도를 측정하고(F340), 380 nm에서는 칼슘과 결합하지 않은 fura-2의 형광강도를 측정하였다(F380). 즉 세포 내 칼슘농도는 두 파장간 형광강도의 비율(F340/F380)을 측정 한 후 이를 Ca²⁺ 농도로 환산하였다. Fura-2의 방출 파장(emission wavelength)은 510 nm 이다.

3. 실험결과와 분석

세포 내 Ca²⁺ 농도는 F340/F380 비율에 비례하며, 측정 한 값은 아래 공식을 이용하여 세포 내 Ca²⁺ 농도로 환산하였다¹²⁾.

$$[Ca^{2+}]_i = KdQ(R-R_{min}) / (R_{max}-R)$$

R	세포에서 측정된 형광강도 비율(fluorescence ratio)
R _{max}	Ca ²⁺ 이 최대로 포화되었을 때 두 파장 강도의 비율 (340/380)
R _{min}	Ca ²⁺ 을 완전히 제거하였을 때 두 파장 강도의 비율 (340/380)
Kd	Fura-2/AM의 Ca ²⁺ 에 대한 해리상수(224 nM)
Q	Sf2/Sb2로 Sf2는 칼슘이 없을 때, Sb2는 칼슘이 포화되었을 때 380 nm에서의 파장강도

세포 내 최대로 칼슘을 포화시키기 위해서는 ionomycin 25 μM을 투여하고, 칼슘을 완전히 제거하기 위해서는 표준용액에서 칼슘을 제거하고 pH 8.5에서 EGTA 10 mM을 투여하였다.

결 과

1. 악하선 선포세포에서 β-아드레날린계 활성화 약물들과 octanol 투여시 Ca²⁺ 농도 증가에 미치는 효과

세포에 자극을 가하지 않았을 때 세포 내 칼슘농도는 4.25 ± 0.30 nM(n=4)로서 비교적 일정한 값을 보였다. Octanol

(1 mM)을 투여하여 자극을 한 경우에도 칼슘농도의 변화는 나타나지 않았으며(Fig. 1), 또한 β -아드레날린계 활성약물인

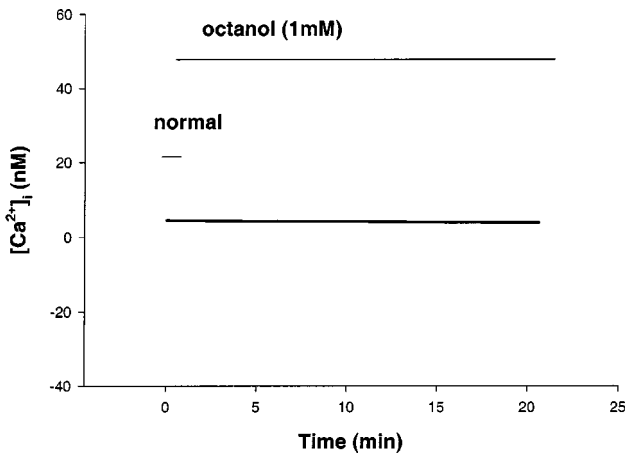


Fig. 1. Octanol(1 mM) had no effect on the intracellular calcium concentration $[Ca^{2+}]_i$ (4.25 ± 0.30 nM, $n=4$).

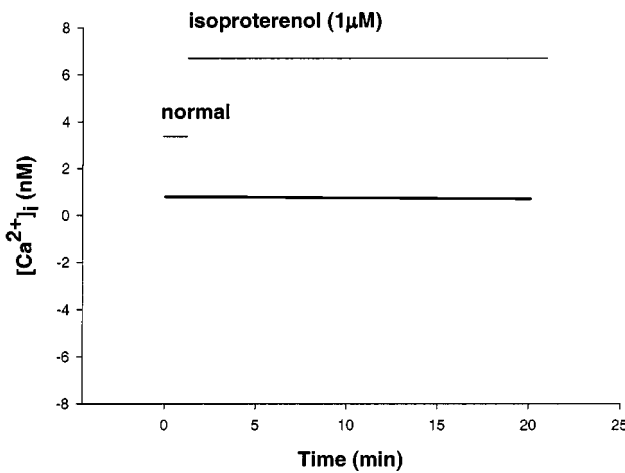


Fig. 2. Isoproterenol (1 μ M) had no effect on the intracellular calcium concentration $[Ca^{2+}]_i$.

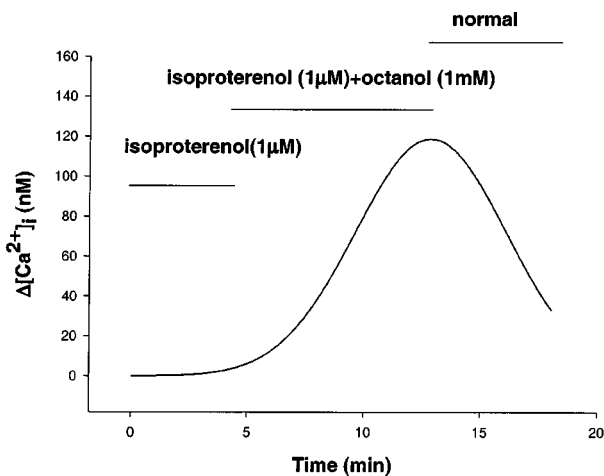


Fig. 3. The effects of co-administration of isoproterenol and octanol. The intracellular calcium concentration was increased and the response was reversible (122.40 ± 1.36 , $n=6$, $P<0.01$).

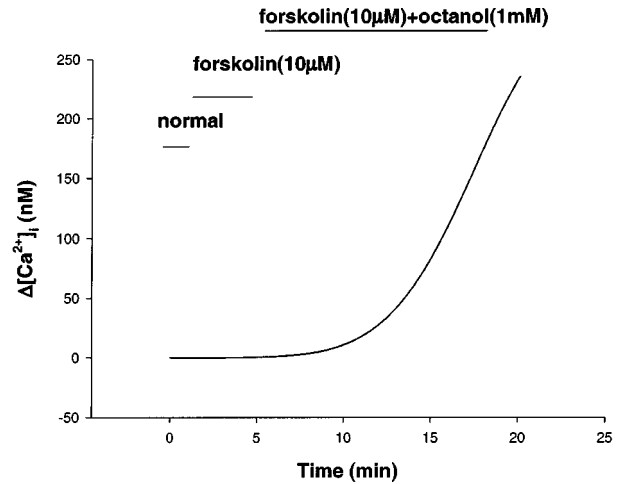


Fig. 4. The effects of co-administration of forskolin, an adenylate cyclase activater, and octanol. The intracellular calcium concentration was increased.

isoproterenol(1 μ M)을 투여한 경우에도 칼슘농도의 변화는 나타나지 않았다(Fig. 2). Isoproterenol을 전처치 한 후 Isoproterenol과 octanol을 함께 투여한 경우 칼슘농도는 122.40 ± 0.38 nM ($n=6$, $P<0.01$)로 증가하였다(Fig. 3).

Adenylate cyclase를 활성화 하는 것으로 알려진 forskolin을 투여하여 세포 내 칼슘농도 증가와 cyclic-AMP와의 연관성을 찾고자 Isoproterenol과 동일한 방법으로 forskolin(10 μ M)을 전 처치 한 후에 forskolin(10 μ M)과 octanol(1 mM)을 함께 투여하여 세포 내 칼슘농도변화를 관찰한 결과 칼슘농도의 증가를 확인할 수 있었다(Fig. 4).

2. Isoproterenol과 octanol 투여시 세포 내 Ca^{2+} 유입 경로

세포 내의 칼슘이 어떤 경로를 통해 증가하는지 정확하게 밝힐 수는 없지만, 내부저장고에서 유리된 것인지 또는 외부에서 유입된 것인지를 관찰하고자 표준용액의 칼슘을 제거하고 pH 8.5에서 EGTA 1 mM을 첨가하여 세포 외부의 칼슘을 완전히 제거하였다. 이어 isoproterenol을 전 처치한 후 isoproterenol과 octanol을 함께 투여한 결과 칼슘의 증가가 현저히 감소함을 확인할 수 있었으며, 칼슘이 포함된 관류액을 다시 통과시키면 칼슘의 양이 현저하게 증가함을 볼 수 있었다(Fig. 5). 이러한 결과를 통해 외부로부터 칼슘이 유입됨은 물론 내부 저장고에서도 소량의 칼슘이 유리되고 있음을 확인할 수 있었다. 또한 외부에서의 칼슘 유입 경로를 확인하고자 세포 내 칼슘 저장고의 고갈상태에 따라 세포막을 통한 칼슘의 투과성을 조절한다는 capacitative entry pathway를 block 하는 것으로 알려진 gadolinium(10 μ M)을 처리하여 칼슘의 농도 변화를 관찰해 본 결과 gadolinium을 처리하였을 때, 세포 내의 칼슘증가가 완전히 감소되지는 않았으나 처치 전과 후를 비교할 때 세포 외부로부터의 칼슘유입에 의한 세포 내 칼슘농도 증가가 다소 감소하였다. 따라서 gadolinium의 영향을 받아 capacitative entry pathway를 통한 세포 내 칼슘유입 일부가 억제됨을 확인할 수 있었으며, 이는 isoproterenol과 octanol

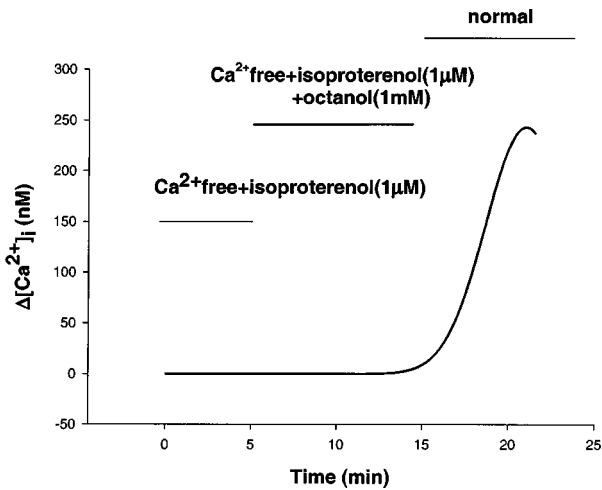


Fig. 5. Co-administration of isoproterenol and octanol did not effect the intracellular calcium concentration in the absence of extracellular calcium, when extracellular calcium added to perfusing solution the intracellular calcium concentration increased.

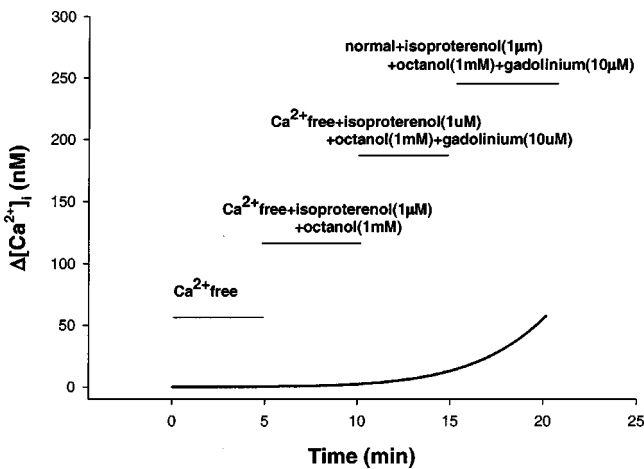


Fig. 6. The effects of godolinium (10 µM) on the increased intracellular calcium by isoproterenol and octanol treatment. Godolinium application decreased both of the speed and amount of intracellular calcium increase by isoproterenol and octanol.

투여시 세포 내 칼슘 증가가 capacitative entry pathway에 일부 의존적임을 시사해 주는 결과이다(Fig. 6).

고찰

칼슘은 세포막의 흥분성을 조절하고 세포 내 신호전환체계 및 항상성을 유지해 주며 세포에 따라 근세포의 수축, 선세포의 분비, 이온의 이동, 그리고 세포분화 등 다양한 생리적 반응을 일으키며, 세포 내 칼슘은 세포막을 통한 칼슘의 유입, 세포내 저장고로부터 칼슘유리를 통하여 변화한다^{13,14}. 타액선 선세포는 비흥분성 세포로서 흥분성 조직인 근육 및 신경과는 달리 세포막에 존재하는 수용체와 이와 관련한 전달물질을 통하여 자극-분비 연결(stimulus-secretion coupling) 과정을 통하여 단백질 및 전해질을 분비한다. 이러한 분비과정은 cAMP

pathway와 PIP₂ 분해과정을 통하지만, 칼슘과 관련하여 PIP₂ 분해과정이 초점이 되어 많은 연구가 진행되고 있다¹⁵.

세포 내부의 칼슘변화는 ion-sensitive electrode를 세포 내부에 직접 삽입하여 측정하는 방법¹⁶, 그리고 fura-2와 같은 Ca²⁺ dye를 이용하는 방법¹², 이외에도 K⁺-efflux(K⁺-current 포함) 또는 Cl⁻ current를 측정하여 이를 세포 내 칼슘농도의 변화로 간주하는 간접적인 방법 등이 있다.

본 실험에서는 악하선 선포세포에서 세포 내 칼슘동원기전인 IP₃를 생성시키지 않고도 세포 내부의 칼슘을 증가시키는 약물을 사용함으로써 세포 내 칼슘농도에 어떠한 변화를 일으키는지를 fura-2와 spectro-fluorometry를 이용하여 살펴보았다. 악하선 선포세포의 muscarine 수용체가 자극을 받으면 세포 내 칼슘변화는 두 가지 형태로써 초기에는 칼슘농도의 상승이 나타난 후에 곧 칼슘의 주기적 변동이 한동안 유지되는 특징을 보인다¹⁷. 이러한 칼슘의 주기적 반응은 IP₃에는 반응을 하지 않고 세포 내 증가된 칼슘에 의해 칼슘을 유리하는 저장고에서 유발된다는 설이 대두되고 있다. 그러나 본 실험의 결과, 악하선에서의 칼슘의 변화는 이러한 가설과 다른 양상을 보였다. 즉, β-아드레날린계 작용성 약물인 isoproterenol 이나, gap junction blocker로 알려진 octanol을 단독으로 처리하였을 경우에는 세포 내 칼슘이 증가하지 않는 반면 함께 투여하였을 경우에는 칼슘이 증가함을 확인할 수 있었다. Isoproterenol은 adenylate-cyclase를 활성화시켜 cyclic-AMP 형성에 관여하여 칼슘과는 무관한 약물로 알려져 있으며, octanol을 투여하였을 때 칼슘을 비롯한 작은 분자들의 세포 내 유입경로를 막는 것으로 알려지고 있다. 이와 같이 위의 두 약물은 칼슘의 증가와는 무관하게 작용을 하고 있으나, cyclic AMP가 활성화될 때 이와 함께 octanol이 작용하여 칼슘을 증가시키는 것으로 생각되어진다.

칼슘이 세포 내로 유입되는 기전으로는 크게 두 가지의 통로 즉, 막전압 의존성 칼슘통로와 막전압 비의존성 칼슘 통로가 있다¹⁸. 막전압 의존성 칼슘통로는 세포막을 통한 전류의 측정이 patch clamp 방법의 개발로¹⁹ 가능해지면서 그 특성이 널리 연구되어, 주로 근육, 심장, 신경과 같은 흥분성 세포에서 그 분포와 종류가 밝혀진 바 있다. 막전압 비의존성 칼슘 통로에는 ionotropic receptor channel(ROC) 외에도 이차 전령체에 의한 통로(SMOC, second messenger-operated channel) 그리고 세포 내 저장고로부터 기인하는 칼슘통로(SOCC, store-operated calcium channel) 등이 존재하는 것으로 알려지고 있다.

이와 같이 칼슘 동원에는 세포 외부로부터의 칼슘유입, 세포 내부의 칼슘저장고가 관여하지만²⁰ 수용체 활성화로 생성된 IP₃가 세포 내 칼슘 저장고로부터 칼슘을 유리하는 기전은 아직 완전히 밝혀져 있지 않다. 그러나 IP₃ sensitive Ca²⁺ pool (ISCP) 막에 칼슘통로를 포함하고 있는 IP₃ 수용체의 존재가 확인되었으며^{21,22}, 이 수용체에 IP₃가 결합한 후 칼슘통로를 통해 칼슘이 유리되는 것으로 알려지고 있다. 반면에 수용체 자극물질에 의해 세포 외부로부터 칼슘이 유입되는 과정은 아직도 논란의 대상이 되고 있다^{23,13}.

세포 외부로부터 칼슘유입과정과 관련, 세포 내 칼슘저장고의 칼슘보유량이 외부로부터의 칼슘 유입을 조절한다는 Putney²⁴의 capacitative model이 제시된 이래, 최근에는 이를

입증하는 결과가 계속 발표되고 있어^{25,14)} 이 가설을 뒷받침 해 주고 있다. 본 실험에서도 capacitative entry pathway를 통해 칼슘이 증가되는가를 확인하고자 세포외부에 칼슘이 없는 상태에서 악하선 절편조직에 isoproterenol과 gap junction blocker로 알려진 octanol을 함께 투여하고 이 경로를 통한 칼슘의 유입을 막는 것으로 알려진 gadolinium을 처치하여 칼슘의 농도 변화를 확인하였다. 그 결과 세포 외부의 칼슘을 제거하고 위의 두 약물을 투여하였을 때와 칼슘의 증가를 비교해 볼 때 완전히 억제되지는 않았지만 증가하는 칼슘농도가 감소함을 확인할 수 있었고 증가속도 역시 감소됨을 확인할 수 있었다. 진술한 바와 같이 본 실험에서의 칼슘의 증가는 capacitative entry pathway를 통해 일부 유입됨을 확인할 수 있었으나 또 다른 경로를 통한 유입경로도 있을 것으로 추측되는 바 앞으로 연구되어야 할 과제라고 생각한다.

요 약

Sprague-Dawley계 흰쥐의 악하선에서 선세포를 분리하여 fura-2/AM(fura-2)으로 염색한 후 spectrofluorometer로 세포 내 Ca^{2+} 농도를 측정하였다. 악하선 세포를 관류장치(perfusion chamber)에 넣고 표준용액을 관류시키면서 isoproterenol(1 μ M)과 octanol(1 mM)을 투여한 후 Ca^{2+} 농도 변화를 측정하였는데 단독 투여시 Ca^{2+} 농도는 거의 변화하지 않았으나 함께 투여한 경우 세포 내 Ca^{2+} 농도가 증가함을 확인할 수 있었다. Adenylate-cyclase를 활성화 시키는 forskolin(10 μ M)과 octanol을 함께 투여하였을 때도 isoproterenol의 경우와 유사한 증가 현상을 보이는 것으로 볼 때 octanol과 isoproterenol 또는 forskolin이 함께 작용할 때 세포 내 Ca^{2+} 이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. Ca^{2+} 의 증가기전을 확인하고자 표준용액의 Ca^{2+} 을 제거함은 물론 EGTA를 처리하여 세포외부의 Ca^{2+} 을 제거한 후 상기한 바와 동일한 실험을 반복한 결과 Ca^{2+} 농도의 증가를 보이지 않았다. 따라서 세포 내 Ca^{2+} 의 증가는 세포 외부로부터의 Ca^{2+} 유입 때문인 것으로 확인할 수 있었다. 이러한 Ca^{2+} 의 유입 capacitative entry pathway를 이용하는지 확인코자 gadolinium(10 μ M)을 처리하였을 때 Ca^{2+} 농도의 증가가 완전히 억제되지는 않았지만 Ca^{2+} 의 증가속도와 증가량이 감소되어 있음을 확인할 수 있었다. 이상의 실험결과들을 정리 하면 세포 내 Ca^{2+} 농도의 증가와 관련 β -아드레날린계 관련 약물과 옥탄올(octanol)을 함께 처리할 경우 세포 내 Ca^{2+} 은 세포 외부에서 유입되어 증가되고 그 경로는 일부 capacitative entry pathway를 통함을 확인할 수 있었다.

참고문헌

- Rhee SG: Inositol phospholipid-specific phospholipase C: interaction of the isoform with tyrosine kinase. Trends Biol 16: 297-301, 1991.
- Carafoli E: The plasma membrane calcium pump. Structure, function, regulation. Biochim Biophys Acta 17: 266-267, 1992.
- Berridge MJ: Inositol triphosphate and calcium signaling. Nature 361: 315-325, 1993.
- Clapham DE, Neer EJ: New roles for G-protein β , γ -dimers in transmembrane signaling. Nature 365: 403-406, 1993.

- Carlota L, Geoffrey CT, Peter GA, Oscar H, George GS: Heptanol but not fluoroacetate prevents the propagation of spreading depression in rat hippocampal slices. J Neurophysiol 77: 9-16, 1997.
- Berridge MJ: Calcium oscillations. J Biol Chem 265: 9583-9586, 1990.
- Quissell DO: Stimulus-exocytosis coupling mechanism in salivary gland. In Biology of the salivary glands(Dobrosielski-Vergona, K., ed.). pp. 181-200, CRC Press Boca Raton FL 1993.
- Crawford KM, Stuenkel EL, Ernst SAZ: Agonist-induced frequency modulation of Ca^{2+} oscillations in salt gland secretory cells. Am J Physiol 263: C177-C184, 1991.
- Foskett JK, Wong D: Free cytoplasmic Ca^{2+} concentration oscillations in thapsigargin-treated parotid acinar cells are caffeine-ryanodine-sensitive. J Biol Chem 266: 14535-14538, 1991.
- Cook DI, Day ML, Champion MP, Young JA: Ca^{2+} not cAMP mediates the fluid secretory response to isoproterenol in the rat mandibular salivary and whole-cell patch-clamp studies. Pfluegers Arch 413: 67-76, 1988.
- Dehaye JP, Valdez IH, Turner RJ: Beta-adrenergic stimulation and cAMP mobilize Ca^{2+} from an IP_3 -insensitive pool in rat submandibular granular ducts. Am J Physiol Nov(5 Pt 1): C1356-1362, 1993.
- Gryniewicz G, Poenie M, Tsien RY: A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. J Biol Chem 260: 3440-3450, 1985.
- Takemura H, Hughes AR, Thastrup O, Putney JW Jr: Activation of calcium entry by the tumor promoter thapsigargin in parotid acinar cells. J Biol Chem 264(21): 12266-12271, 1989.
- Taylor SM, Laegreid WW, Englen MD, Dani GM, Silflow RM, Liggitt HD, Leid RW: Influence of extracellular calcium on the metabolism of arachidonic acid in alveolar macrophages. J Leukoc Biol 48(6): 502-511, 1990.
- Berridge MJ, Irvine MF: Inositol triphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. Nature 312: 315-321, 1984.
- O'Doherty J, Stark SJ, Crane KL: Changes in cytosolic calcium during cholinergic and adrenergic stimulation of the parotid salivary gland. Pfluegers Arch 398: 241-246, 1983.
- Gray PT: Oscillations of free cytosolic calcium evoked by cholinergic and catecholaminergic agonists in rat parotid acinar cells. J Physiol 406: 35-53, 1988.
- Hupe DJ, Boltz R, Cohen CJ, Felix J, Ham E, Miller D, Soderman D, Van Skiver D: The inhibition of receptor-mediated and voltage-dependent calcium entry by the antiproliferative L-651,582. J Biol Chem 266(16): 10136-10142, 1991.
- Neher E, Sakmann B: Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibers. Nature 260: 799-802, 1976.
- Merritt JE, Rink TH: The effects of substance P and carbachol on inositol trisphosphate and tetrakisphosphate formation and cytosolic free calcium in rat parotid acinar cells. J Biol Chem 262: 14912-14916, 1987.
- Supattapone S, Worley PF, Barban JM, Snyder SH: Solubilization purification and characterization of an inositol triphosphate receptor. J Biol Chem 266: 11068-11077, 1991.
- Maeda N, Matsuoka N, Yamaguchi I: Septohippocampal cholinergic pathway and penile erections induced by dopaminergic and cholinergic stimulants. Brain Res 537(1-2): 163-168, 1990.
- Putney JW Jr: A model for receptor-regulated calcium entry. Cell Calcium 7: 1-12, 1986.
- Putney JW Jr: Identification of cellular activation mechanisms associated with salivary secretion. Ann Rev Physiol 48: 75, 1986.
- Mertz LM, Baum BJ, Ambudkar IS: Refill status of the agonist-sensitive Ca^{2+} pool regulates Mn^{2+} influx into parotid acini. J Biol Chem 265(25): 15010-15014, 1990.

(Received May 12, 2002; Accepted June 24, 2002)

