

# 쥐 상장간막 동맥과 그 분지에서 pH 변화가 혈관평활근 수축성에 미치는 영향

최 수 승\*

## Effect of pH Change on Vascular Smooth Muscle Contractility in Rat Superior Mesenteric Artery and Its Branches

Soo Seung Choi, M.D.\*

**Background:** Extracellular and intracellular pH ( $pH_o$  and  $pH_i$ ), which can be changed in various pathological conditions such as hypoxia, affects vascular contractility. To elucidate the mechanism to alter vascular contractility by pH, the effects of pH on reactivity to vasoconstricting agents, intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  influx, and  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity in vascular smooth muscle were examined. **Material and Method:** Isometric contractions in rat superior mesenteric arteries (SMA) were observed. Intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) was recorded by microfluorometer using Fura-2/acetoxymethyl ester in muscle cells.  $pH_o$  was increased from 7.4 to 7.8 or decreased to 6.9 or 6.4.  $pH_i$  was decreased by applying  $\text{NH}_4^+$  or propionic acid or modulated by changing  $pH_o$  after increasing membrane permeability using  $\beta$ -escin. **Result:** Decreases in  $pH_o$  from 7.4 to 6.9 or 6.4 shifted concentration-response curve by norepinephrine (NE) or serotonin (SE) to the right and significantly increased half maximal effective concentration (EC50) to NE or SE. Increase in  $pH_o$  from 7.4 to 7.8 shifted concentration-response curve by norepinephrine (NE) or serotonin (SE) to the left and significantly reduced EC50 to NE or SE. NE increased  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  in cultured smooth muscle cells from SMA and the increased  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  was reduced by decreases in  $pH_o$ . NE-induced contraction was inhibited by  $\text{NH}_4^+$ , whereas the resting tension was increased by  $\text{NH}_4^+$  or propionic acid. When the cell membrane of SMA was permeabilized using  $\beta$ -escin, SMA was contracted by increasing extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration from 0 to 10  $\mu\text{M}$  and the magnitude of contraction was decreased by a decrease in  $pH_o$  and vice versa. **Conclusion:** From these results, it can be concluded that a decrease in  $pH_o$  might inhibit vascular contraction by reducing the reactivity of vascular smooth muscle to vasoactive agents,  $\text{Ca}^{2+}$  influx and the sensitivity of vascular smooth muscle to  $\text{Ca}^{2+}$ .

(Korean J Thorac Cardiovasc Surg 2010;43:345-355)

**Key words:** 1. Vascular tone and reactivity  
2. Hydrogen ion concentration  
3. Calcium  
4. Smooth muscle relaxation

\*이화여자대학교 의과대학 흉부외과학교실

Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, Ewha Womans University School of Medicine

논문접수일 : 2009년 4월 8일, 논문수정일 : 2009년 12월 25일, 심사통과일 : 2010년 1월 12일

책임저자 : 최수승 (158-710) 서울시 양천구 목6동, 이화여자대학교 복동병원 흉부외과

(Tel) 02-2650-5151, (Fax) 02-2649-4930, E-mail: gratia@unitel.co.kr

본 논문의 저작권 및 전자매체의 지적소유권은 대한흉부외과학회에 있다.

© This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

## 서 론

세포 밖의 pH (extracellular pH, pH<sub>e</sub>)는 여러 가지 병적인 상황에서 산성화 혹은 알칼리화 될 수 있으며 세포 내의 pH (intracellular pH, pH<sub>i</sub>)도 이에 따라 변한다. 이러한 세포 안팎의 pH 변화는 혈액 속에 있는 혈관활성물질에 대한 혈관평활근의 반응성과 혈관수축성을 변화시킨다 [1-4]. 혈관평활근 수축성에 영향을 주는 세포막의 이온통로나 펌프 등의 활동도는 세포 안팎의 H<sup>+</sup> 농도 변화에 민감하게 반응하므로 세포 안팎의 pH 변화는 이러한 이온 교환기전들의 활동도를 변화시켜 혈관평활근의 수축성을 조절한다[5].

산성화 즉 H<sup>+</sup>이 증가하면 H<sup>+</sup>은 막전압 의존성 Ca<sup>2+</sup> 통로(voltage-operated Ca<sup>2+</sup> channels)에 세포 안 혹은 밖에서 작용하여 Ca<sup>2+</sup> 유입을 조절하는데, 소 뇌(pial) 동맥과 쾨지 관상동맥에서는 pH<sub>i</sub> 증가가 L형 Ca<sup>2+</sup> 통로를 통한 Ca<sup>2+</sup> 전류를 증가시킨다[6,7]. 그리고, 산성화는 쾨지 관상동맥 평활근세포의 Ca<sup>2+</sup>에 의하여 활성화되는 K<sup>+</sup> 통로[8] 와 쥐 뇌동맥 세포에 있는 ATP 민감성 K<sup>+</sup> 통로[9]를 활성화시키는 것으로 알려져 있다. 이와 같이 H<sup>+</sup>은 세포막에 있는 Ca<sup>2+</sup> 통로나 K<sup>+</sup> 통로 등과 같은 이온통로를 조절하여 세포내 Ca<sup>2+</sup> 농도를 감소시키고 혈관평활근의 수축력을 감소시키는 것으로 알려져 있다.

한편 세포막에 있는 이온통로는 혈관에 따라 차이가 있는 것으로 알려져 있다. Inwardly rectifying K<sup>+</sup> (K<sub>ir</sub>) 통로는 대동맥과 같이 혈관구경이 큰 혈관보다는 저항혈관과 같은 구경이 작은 혈관들에 많이 분포한다[10]. 즉, 쾨지 관상동맥에서는 혈관구경이 작아질수록 K<sub>ir</sub> 전류의 크기가 증가하며 쥐 상장간막동맥에서는 혈관구경이 작아질수록 K<sub>ir</sub> 유전자의 발현이 증가한다[11]. 이러한 K<sub>ir</sub> 통로는 막전압을 과분극시켜 혈관이완을 일으키므로 세포내 혹은 세포밖의 pH 감소 즉 산성화가 되어 K<sub>ir</sub> 통로가 억제되면 막전압이 저분극되고 혈관수축이 일어날 수 있다 [12-14]. 이렇게 혈관구경에 따라 분포 차이가 있는 이온 통로가 있는 반면 voltage-dependent K<sup>+</sup> 전류는 혈관구경에 차이가 없는 것으로 알려져 있다[10]. 그러므로, pH 변화가 혈관수축성에 미치는 영향은 혈관 구경에 따라 차이가 날 수 있다[11].

이와 같이 세포内外의 pH 변화는 혈관 수축성에 큰 영향을 미치지만, pH 변화가 Ca<sup>2+</sup>에 대한 민감성에 미치는 영향 등 그 기전에 대해서는 아직 밝혀지지 않은 것들이 많다. 그러므로 본 연구에서는 pH 변화가 혈관수축물질

종류에 따른 차이와 세포 내 Ca<sup>2+</sup> 유입과 그 민감성에 미치는 영향을 규명하고자 하였다.

## 대상 및 방법

### 1) 실험 동물

본 실험은 미국 국립보건원(The National Institutes of Health)에서 발표한 실험동물지침(Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, NIH Publication No. 85-23, Revised 1996)에 따라 시행하였으며, 본 대학의 실험동물 윤리위원회의 심사를 통과하였다.

총 42마리의 쥐(rat, 250~300 g)를 복강 내에 entobar (80 mg/kg)과 heparin (2,000 IU/kg)을 주사하여 마취한 다음 경동맥을 절단 실혈시켜 죽사시켰다. 상장간막동맥과 그 분지를 적출하였으며 주변 조직을 깨끗이 박리한 다음 실험에 사용하였다.

### 2) 등장성 수축 실험

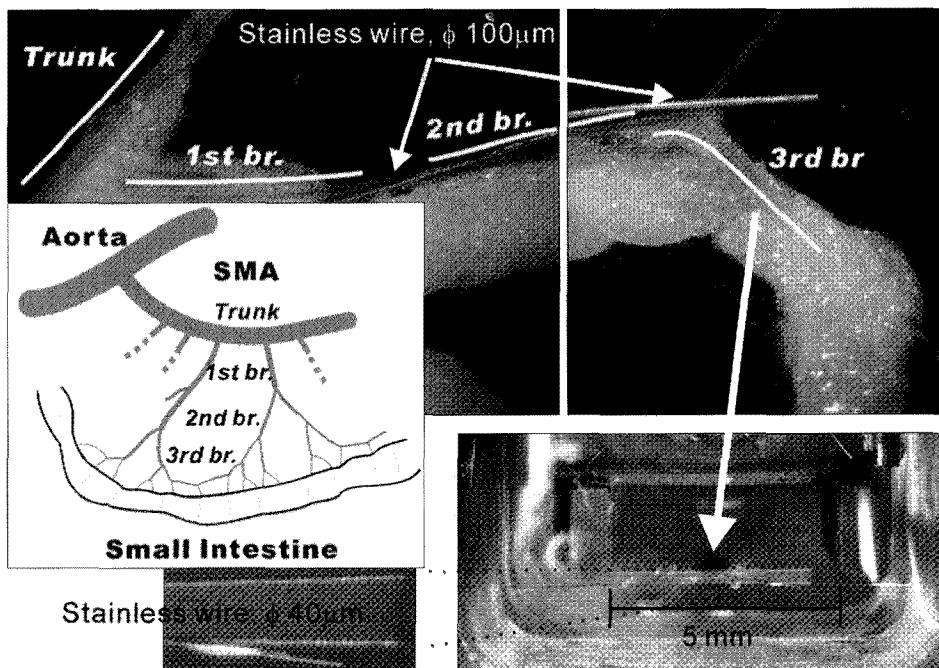
적출한 혈관들을 너비 2~3 mm 정도로 잘라 환형 절편(arterial ring)을 만든 다음, 이 절편을 95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>로 포화된 Krebs-Ringer 용액(NaCl 118.3, KCl 4.78, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 2.5, MgSO<sub>4</sub>·6H<sub>2</sub>O 1.2, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.22, NaHCO<sub>3</sub> 25.0, glucose 10 mM)이 3 mL/min의 속도로 흐르고 있는 실험용기에 옮겨 근육고정기와 근수축변환기를 연결하고 생체신호 기록기(physiograph)에서 등장성 수축을 기록하였다(Fig. 1).

혈관은 상장간막동맥 trunk, 그리고 각 분지들(Fig. 1)에서 1마리당 각각 1개씩 적출하여 실험하였으며 pH 7.40에서 여러 가지 약물 반응을 기록한 다음 pH 변화에 따른 반응을 기록하였다. 실험과 실험 간격은 1시간으로 하여 혈관이 충분히 회복할 수 있도록 하였다.

혈관들은 serotonin (SE), norepinephrine (NE)을 투여하거나 혹은 세포외 용액(Krebs-Ringer 용액)의 K<sup>+</sup> 농도를 증가시켜(Na<sup>+</sup>을 동일한 농도의 K<sup>+</sup>으로 대체) 수축을 유발시켰다. 혈관내피세포는 작은 솜뭉치를 이용하거나 스테인레스 막대를 이용하여 제거하였으며, 내피세포의 제거 여부는 acetylcholine (3 μM)에 의한 내피세포 의존성 이완 반응 발생여부로 판정하였다. 모든 실험은 37°C에서 시행하였다.

### 3) 혈관평활근 세포 배양

혈관평활근은 Robertson 등이 기술한 방법에 따라 분리하여 배양하였다[13]. 적출한 쥐 혈관들을 phosphate-buffered saline (PBS, Dulbecco without Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>) 속에서 외



**Fig. 1.** Home-made myograph and rat superior mesenteric arteries (SMA) used in this experiment. Among SMA branches, the first, second and third branches were used. The mounted artery was the second branch and stretched. Diameters of the arteries might be estimated comparing stainless wire.

막주변 지방과 결합조직을 깨끗이 제거한 후  $1\text{ mg/mL}$  papain,  $1\text{ mg/mL}$  bovine serum albumin,  $1\text{ mg/mL}$  dithioerythritol을 첨가한  $\text{Ca}^{2+}$ 이 없는 PBS에 넣고  $37^\circ\text{C}$ 에서 4~6분간 둔 다음 collagenase를 첨가한  $\text{Ca}^{2+}$ 이 없는 PBS에 이 혈관들을 넣고  $37^\circ\text{C}$ 에 두었다. 혈관굵기에 따라 다양한 시간 동안(상장간막동맥은 15분, 첫번째 분기는 10분, 그 이하는 5분) 혈관들을 collagenase에 노출시킨 다음  $\text{Ca}^{2+}$ 이 없는 PBS로 혈관들을 여러 차례 세척하여 위와 같은 효소들을 제거한 다음 입구를 넓게 만든 파스퇴르 피펫을 이용하여 분탕질을 하여 단일 세포를 분리하여 배양하였다.

배양 배지는  $80\text{ mL}$  Dulbecco's minimum essential medium (DMEM, GIBCO),  $10\text{ mL}$  fetal calf serum (GIBCO),  $2\text{ mL}$  penicillin/streptomycin ( $100\text{ U/mL}$ ),  $1\text{ mL}$  L-glutamine, 그리고  $1\text{ mL}$  minimal essential amino acids을 첨가하여 만들었다. 세포는 5번째 계대 배양한 것까지 실험에 이용하였으며 평활근 여부는 평활근에 있는  $\alpha$ -actin을 immunohistochemical 방법으로 염색하여 확인하여 판정하였다.

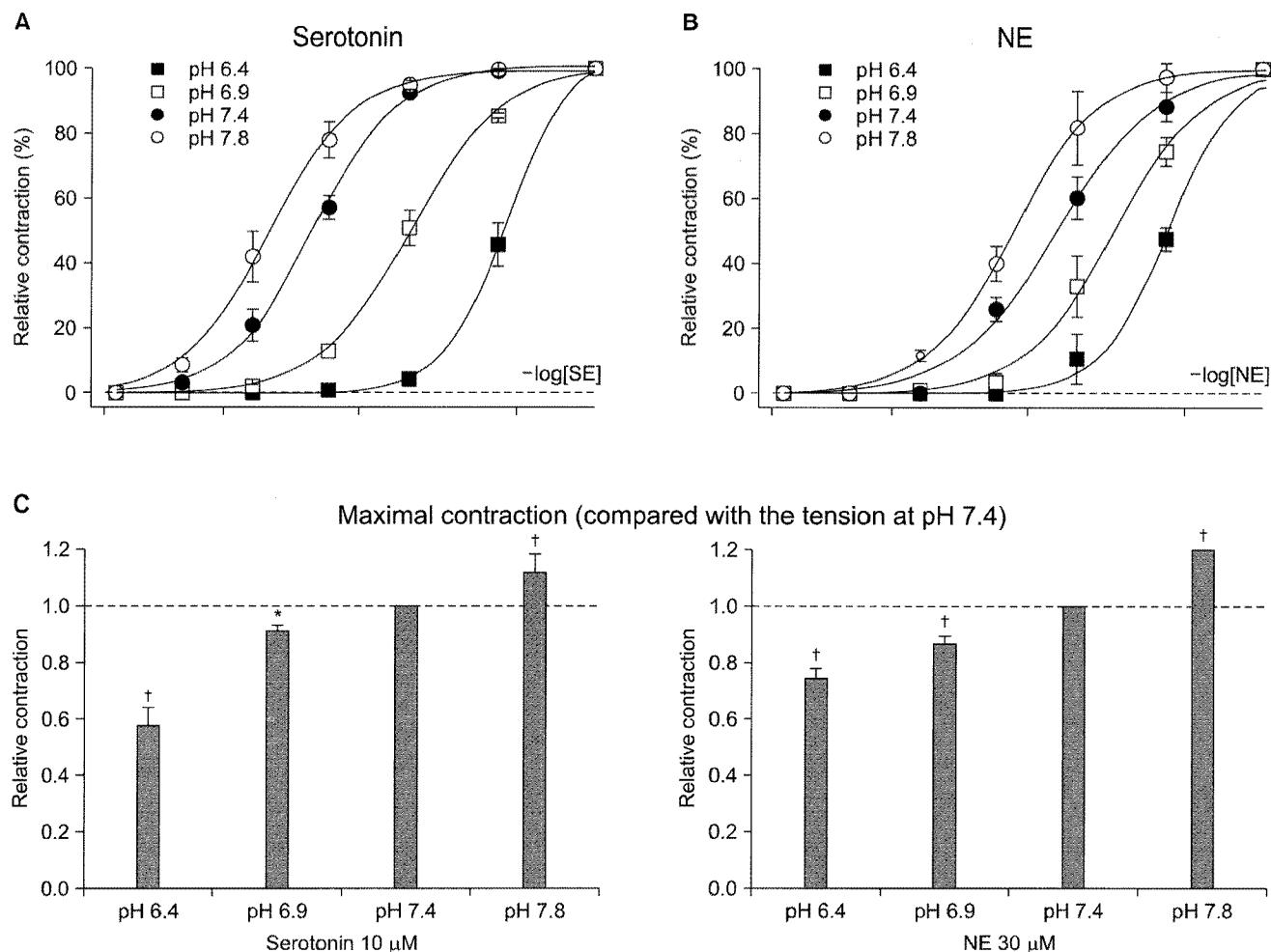
#### 4) 세포내 $\text{Ca}^{2+}$ 측정

Fura-2/AM (acetoxymethyl ester form)을 배양액에 첨가하여( $2\text{ }\mu\text{M}$ )  $37^\circ\text{C}$ 에서 25분간 혈관평활근세포에 노출시켜 부하/loading시킨 다음 Krebs 용액으로 세척하여 실험에 사용하였다. 세포내  $\text{Ca}^{2+}$  측정은 inverted microscope (DM IRB, Leica, Germany)과 microscope photometer (D-104, Photo-

ton Technology International Inc, U.S.A.) 등으로 구성된 미세 형광측정기(microfluorometer system)를 사용하였다. Fura-2/AM이 부하된 세포에  $340\text{ nm}$ 와  $380\text{ nm}$ 의 두 파장을 번갈아 조사(10 Hz)하고 방출(emission)되어 나오는  $510\text{ nm}$ 의 형광을 photomultiplier 튜브를 이용하여 측정하고 그 비(F340/380)로 세포내  $\text{Ca}^{2+}$  농도를 계산하였다(Felix, version 1.4, PTI, U.S.A.). 이 실험에 사용된 용액은  $150\text{ mM NaCl}$ ,  $6\text{ mM KCl}$ ,  $10\text{ mM}$  4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine-ethane-sulphonic acid (HEPES),  $10\text{ mM glucose}$ ,  $1.5\text{ mM CaCl}_2$ ,  $1\text{ mM MgCl}_2$ 을 첨가하여 만들었으며 pH는 7.4에 맞추었다.

#### 5) 세포막 이온 투과도 증가

혈관평활근을  $30\text{ }\mu\text{M}$   $\beta$ -escin에 노출시켜 세포막의 이온 투과도를 증가시켰다[15]. 등장성 수축실험 용기에 SMA를 걸어 놓은 다음 혈관을 관류하는 용액에서  $\text{Ca}^{2+}$ 을 제거하고  $\text{Na}^+$ 을  $\text{K}^+$ 으로 교체한 다음  $\beta$ -escin을 첨가하여 관류하였다. 30분이 지난 다음 관류용액에  $\text{Ca}^{2+}$   $10\text{ }\mu\text{M}$ 을 첨가하여 수축을 유발시켰다. 이후 10분 간격으로 반복하여  $\text{Ca}^{2+}$   $10\text{ }\mu\text{M}$ 에 의한 수축을 기록하였으며 수축의 크기가 안정상태에 도달하면 세포의 pH를 변화시키고 혈관평활근의 수축 크기 변화를 관찰하였다.  $\text{Ca}^{2+}$   $10\text{ }\mu\text{M}$ 에 의한 수축력이 감소하면 실험을 중지하였다.



**Fig. 2.** Extracellular pH ( $\text{pH}_o$ )-dependent change of vascular contractility in rat superior mesenteric artery (SMA). (A, B) Serotonin (SE) or Norepinephrine (NE) produced concentration-dependent contractions in SMA trunk. Note that the concentration-response curve was shifted by changing  $\text{pH}_o$  ( $n=8$ ). (C) Maximal contractions by SE or NE in SMA trunk ( $n=8$ ). The contractions at each  $\text{pH}_o$  were normalized versus NE-induced contractions at pH 7.4. \* $p<0.05$  and † $p<0.01$ .

## 6) 통계

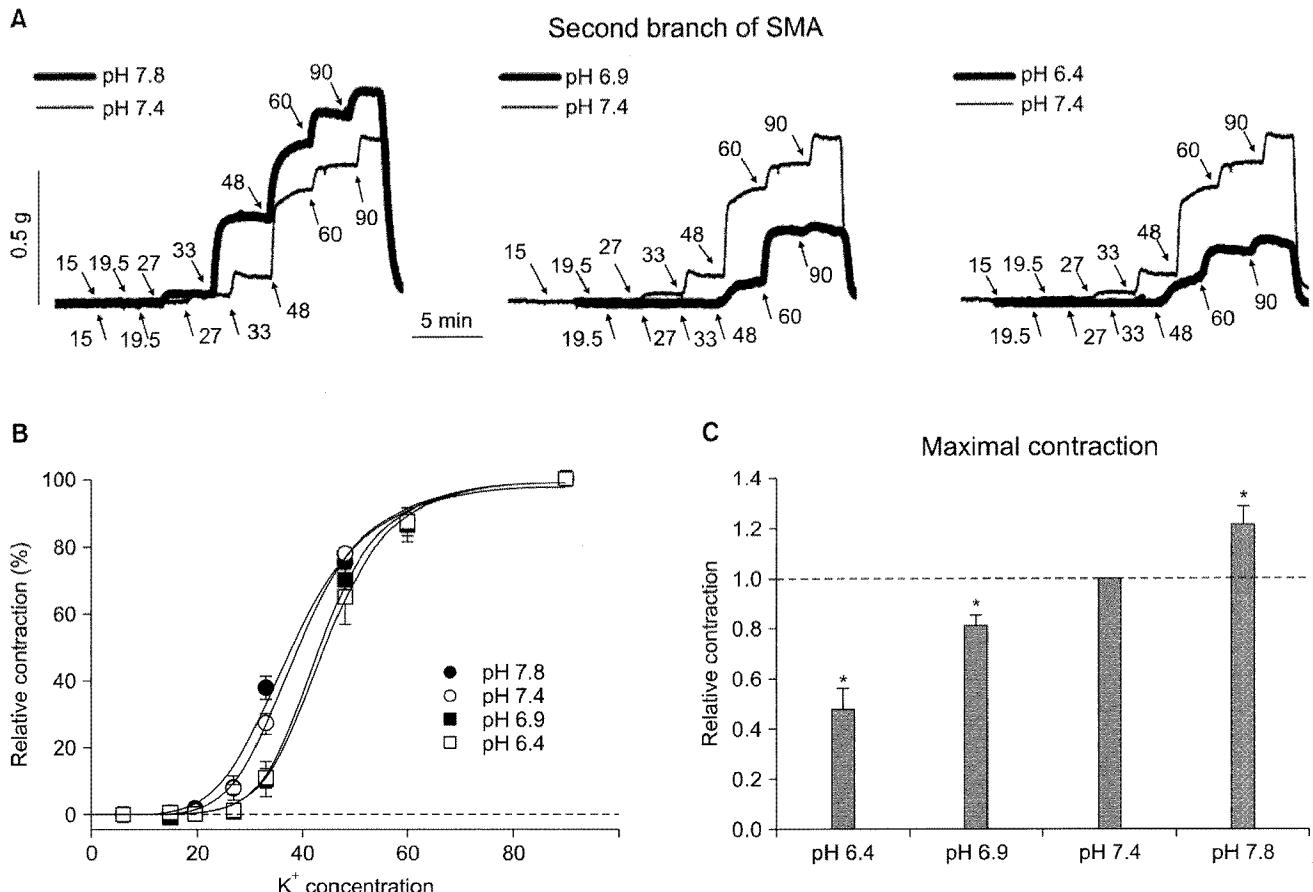
모든 통계자료는 평균과 표준편차로 표현하고 유의성 정도는 paired T-test로 하여 유의 수준  $p<0.05$ 로 검증하였다.

## 결 과

### 1) 세포외 pH 변화가 세로토닌과 노에피네프린에 의한 혈관평활근의 수축에 미치는 영향

쥐 상장간막동맥을 사용하여 세로토닌 혹은 노에피네프린에 의한 수축에 미치는 세포외 pH 변화 효과를 관찰하였다. 세로토닌을 10 nM에서 10  $\mu$ M까지 점차적으로 증

가시키면서 혈관평활근에 노출시키면 혈관평활근의 수축력은 농도에 비례하여 증가하였다(Fig. 2A). 농도에 따른 수축력의 크기(농도-반응 곡선, concentration-response curve)를 Hill식에 의하여 시뮬레이션을 하였다. 농도-반응 곡선은 pH 증가에 의하여 좌측 이동하였으며 pH 감소에 의하여 우측 이동하였다. 최대 수축력의 50% 수축력을 유발하는 농도인  $\text{EC}_{50}$  (half maximal effective concentration)는 pH 7.4에서 257 nM이었으며 pH를 7.8로 증가시키면 132 nM로 감소하였으며, pH 6.9와 6.4에서는 각각 1.02과 3.54  $\mu$ M로 증가하였다. 노에피네프린에 의한 농도-반응 곡선도 세로토닌과 동일한 반응을 보였는데  $\text{EC}_{50}$ 는 pH 7.4에서 2.37  $\mu$ M이었는데, pH 7.8에서는 1.28  $\mu$ M로 감소하였

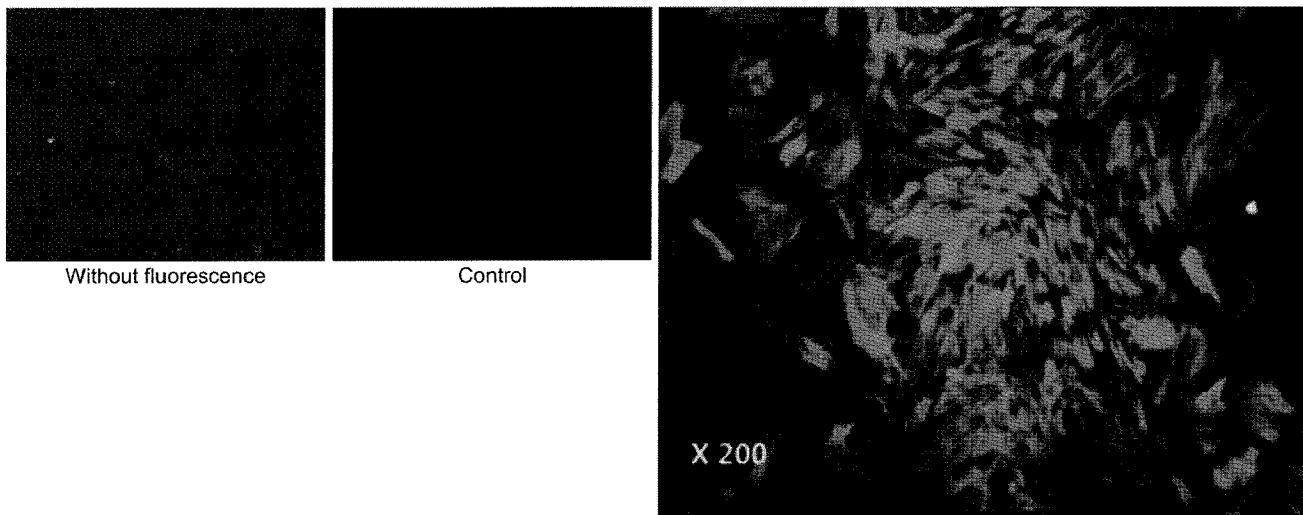


**Fig. 3.** Extracellular pH ( $\text{pH}_o$ )-dependent change of vascular contractility in SMA second branch. SMA second branch was contracted by increasing extracellular  $\text{K}^+$  concentration ( $\text{K}^+$ -induced contraction). A representative recordings (A) and concentration- dependent contractions (B) in SMA second branch. The shift in concentration-response curve by changing  $\text{pH}_o$  was not pronounced in  $\text{K}^+$ -induced contraction ( $n=7$ ). (C) Maximal contractions by extracellular  $\text{K}^+$  in SMA second branch ( $n=7$ ). The contractions at each  $\text{pH}_o$  were normalized versus  $\text{K}^+$ -induced contractions at pH 7.4. \* $p<0.01$ . SMA=Superior mesenteric arteries.

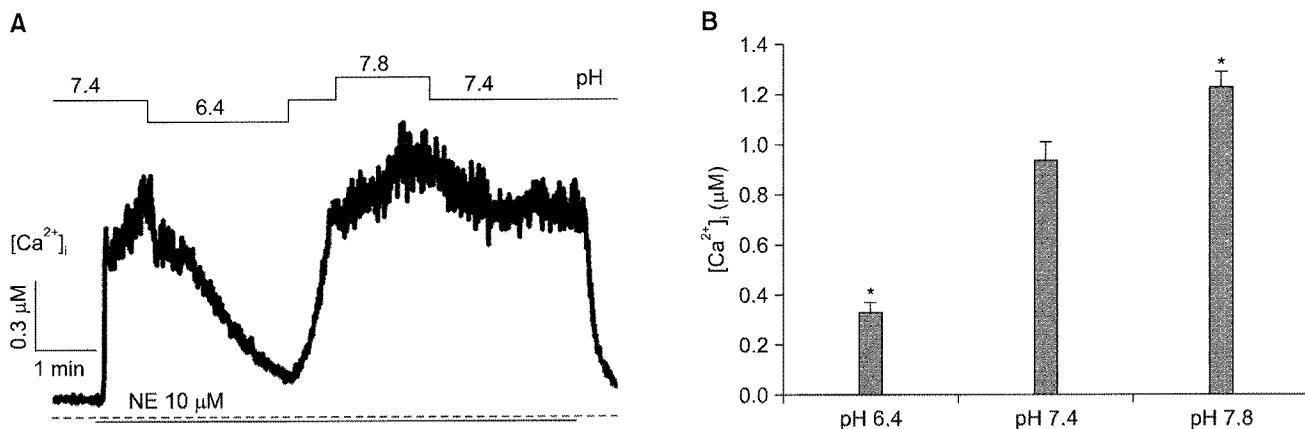
으며 pH 6.9와 6.4에서는 각각 5.11과 10.02  $\mu\text{M}$ 로 증가하였다(Fig. 2B). 그리고 세로토닌과 노에피네프린에 의한 최대 수축력의 크기도 pH 변화에 의하여 변하였다 (Fig. 2C). 즉 pH를 변화시켰을 때 세로토닌에 의한 최대 수축력의 크기를 pH 7.4에서의 크기와 비교하면 pH 7.8에서는 112% ( $p=0.008$ )로 유의하게 증가하였으며, pH 6.9와 6.4에서는 각각 91% ( $p=0.012$ )와 58% ( $p=0.007$ )로 유의하게 감소하였다. 노에피네프린도 세로토닌과 유사한 반응을 보였는데 최대 수축력의 크기를 pH 7.4에서의 크기와 비교하면 pH 7.8에서는 124% ( $p=0.093$ )로 유의하게 증가하였으며 pH 6.9와 6.4에서는 각각 87% ( $p=0.0047$ )와 74% ( $p=0.0001$ )로 유의하게 감소하였다.

## 2) 세포외 pH 변화가 $\text{K}^+$ 유발 수축에 미치는 영향

저항혈관으로는 상장간막동맥의 두 번째 분지를 사용하여  $\text{K}^+$  유발 수축( $\text{K}^+$ -induced contraction)에 미치는 세포외 pH 변화 효과를 관찰하였다. 세포외  $\text{Na}^+$ 을 동일 농도의  $\text{K}^+$ 으로 대체하여 세포외  $\text{K}^+$  농도를 증가시켜  $\text{K}^+$  유발 수축을 유발하였다. 세포외  $\text{K}^+$  농도가 정상 6 mM에서 15, 19.5, 27, 33, 48, 60, 90 mM로 점차 증가시켜 감에 따라 혈관의 수축도 점차 증가하였다(Fig. 3). 농도-반응 곡선을 Hill식에 의하여 시뮬레이션하였는데 pH 증가에 의하여 좌측이동하는 경향을 보였다. EC50는 pH 7.8, 7.4, 6.9, 6.4에서 각각 37.8, 39, 43, 44 mM로 변하였지만 유의한 차이는 없었다. 한편 최대 수축력은 pH 7.4에서의 수축



**Fig. 4.** Characterization of smooth muscle cells isolated from branches of superior mesenteric arteries. Immunohistochemistry of the cultured cells and the representative staining of  $\alpha$ -actin. Almost all of isolated cells were well stained by anti- $\alpha$ -actin antibody.



**Fig. 5.** Effects of pH<sub>o</sub> on NE-induced [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> increase. (A) Modulation of [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> by changing pH<sub>o</sub> in a cultured smooth muscle cell. (B) Summary of the effect of pH<sub>o</sub> on NE-induced [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> increase (n=7). \*p<0.001.

력에 비교하면 pH 7.8에서는 122%로 증가하였으며 pH 6.9와 6.4에서는 81%와 48%로 유의하게 감소하였다.

### 3) 세포외 pH 변화가 세포내 Ca<sup>2+</sup> 증가에 미치는 영향

배양한 세포들이 혈관평활근 세포 여부를 평활근 표식자인  $\alpha$ -actin 유무로 판정하였다[16]. 즉  $\alpha$ -actin은 혈관에서 같이 배양될 수 있는 섬유모세포나 혈관내피세포에는 존재하지 않으므로 이것을 평활근 세포의 표식자로 사용하였다(Fig. 4).  $\alpha$ -actin이 있는 세포는 형광 하에서 푸른 색으로 관찰되었다. 동일한 부위를 형광을 사용하거나 혹

은 사용하지 않고 관찰하면, 형광을 사용하지 않았을 때 보이는 대부분의 세포들(95 % 이상)에서 형광이 관찰되므로 분리된 세포들은 대부분 혈관평활근 세포임을 확인할 수 있었다.

배양한 혈관평활근 세포에 노에피네프린을 투여하여 세포내 Ca<sup>2+</sup> 농도를 증가시킨 다음 세포외 pH농도 변화가 이에 미치는 영향을 관찰하였다(Fig. 5). 노에피네프린을 투여하면 혈관평활근세포 내 Ca<sup>2+</sup> 농도가 126±23 nM에서 940±70 nM로 증가하였으며 pH를 7.8로 증가시키면 1,231±61 nM로 더 증가하였으며 pH를 6.4로 낮추면 328±42 nM로 감소하였다. 즉, 노에피네프린에 의하여 증가한

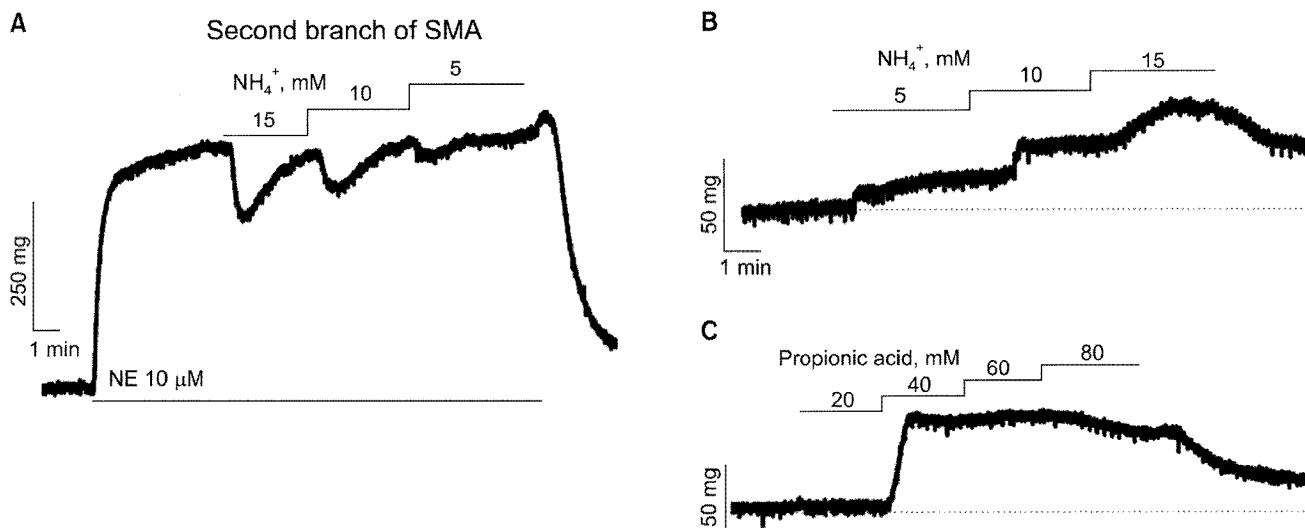


Fig. 6. Effects of NH<sub>4</sub><sup>+</sup> or propionic acid on NE-induced contraction or resting tension of SMA third branches. NE-induced contraction was relaxed by NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (A) and the resting tension was increased by NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (B) or propionic acid (C). SMA=Superior mesenteric arteries.

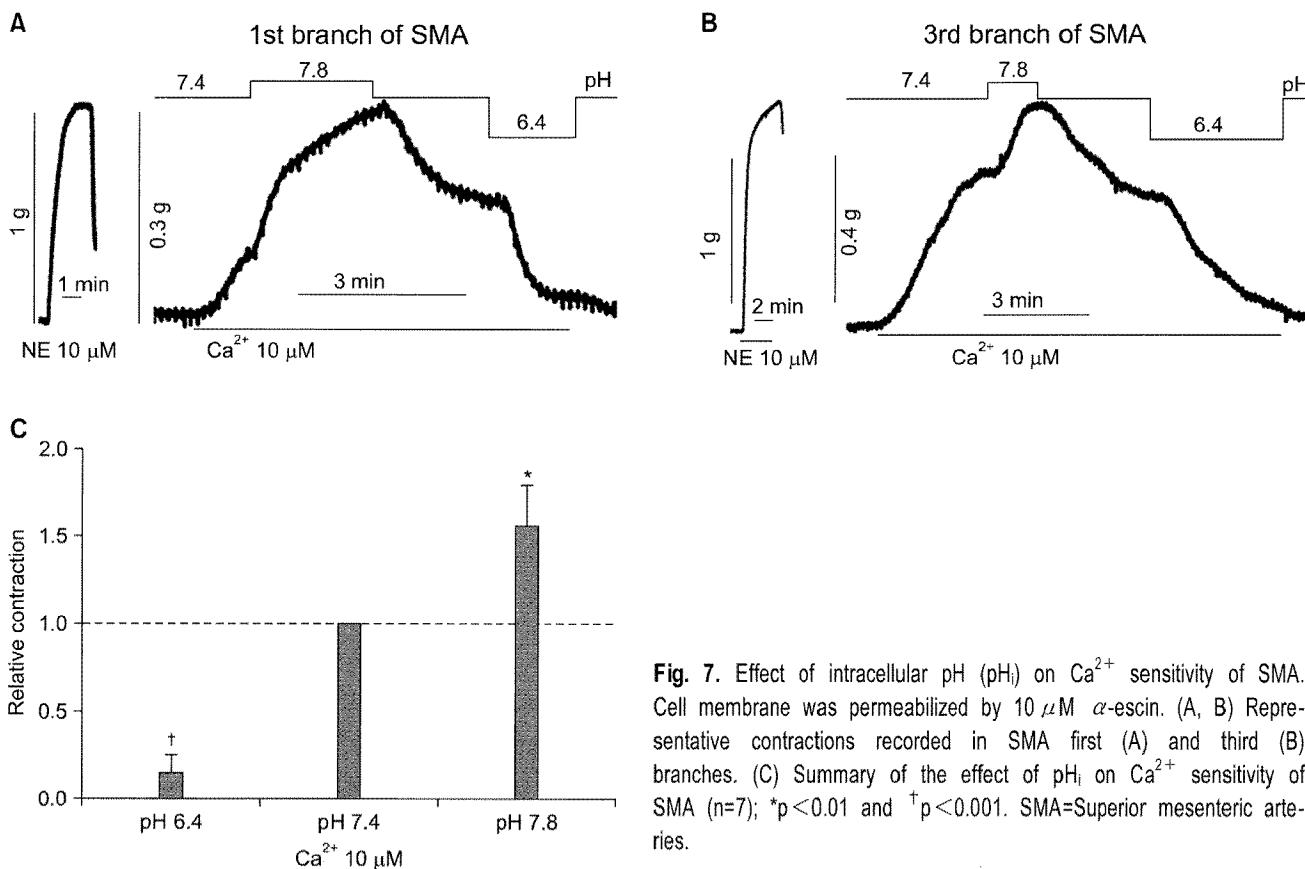


Fig. 7. Effect of intracellular pH (pHi) on Ca<sup>2+</sup> sensitivity of SMA. Cell membrane was permeabilized by 10 μM  $\alpha$ -escin. (A, B) Representative contractions recorded in SMA first (A) and third (B) branches. (C) Summary of the effect of pHi on Ca<sup>2+</sup> sensitivity of SMA (n=7); \*p<0.01 and †p<0.001. SMA=Superior mesenteric arteries.

혈관평활근세포  $\text{Ca}^{2+}$  농도는 세포밖 pH 증가에 의하여 증가하였으며 세포밖 pH 감소에 의하여 감소하였다.

#### 4) 세포내 pH 변화가 혈관평활근 수축성에 미치는 영향

$\text{NH}_4^+$ [17] 혹은 propionic acid[18]는 세포내 pH를 감소시키는 약물로 사용된다. 이러한 약물을 사용하여 세포 내 pH를 변화시켰을 때, 노에피네프린에 의한 수축력과 안정 상태에서 근 긴장도에 미치는 영향을 관찰하였다(Fig. 6). 노에피네프린을 투여하여 수축을 유발시킨 다음  $\text{NH}_4^+$ 을 투여하여 세포내 pH를 감소시키면 노에피네프린에 의한 수축이 감소하였다(Fig. 6A). 그리고 propionic acid도  $\text{NH}_4^+$ 과 마찬가지로 노에피네프린에 의한 수축을 억제하였다. 반면에 안정상태에서의 근 긴장도는  $\text{NH}_4^+$  혹은 propionic acid에 의하여 오히려 증가하였다.

#### 5) 혈관평활근의 $\text{Ca}^{2+}$ 민감도에 미치는 pH의 영향

세포외 용액의  $\text{Na}^+$ 을 세포내 용액과 유사하게 하기 위해  $\text{Na}^+$ 을  $\text{K}^+$ 으로 대체하고 수축을 억제하기 위하여  $\text{Ca}^{2+}$ 을 제거한 다음  $\alpha$ -escin을 첨가하여 상장간막동맥 첫 번째 분지와 세 번째 분지에 노출시켰다. 30분에서 1시간 정도 노출시킨 다음 세포외 용액에  $\text{Ca}^{2+}$ 을 첨가  $\text{Ca}^{2+}$  농도를 10  $\mu\text{M}$ 로 증가시켜 수축을 유발하였다(Fig. 7). 이렇게 유발된 수축은 세포외 pH 증가(pH 7.4에서 7.8로)에 의하여 수축력이 증가하였으며 증가된 pH를 다시 7.4로 감소시키면 수축력은 감소하였으며 세포외 pH를 6.4로 더욱 감소시키면 혈관평활근의 수축력은 더욱 크게 감소하였다.

### 고 찰

#### 1) 세포외 pH 변화가 혈관수축물질에 대한 혈관평활근 반응성에 미치는 영향

세포외 pH 감소는 세로토닌과 노에피네프린과 같은 혈관수축물질의  $\text{EC}_{50}$ 을 증가시키고 농도-반응 곡선을 우측 이동 시켰다. 이러한 결과 즉 최대 수축력의 50%를 유발시키는 농도가 pH 감소에 의하여 크게 증가하는 것으로 미루어 세포외 pH 감소(산성화)는 혈관수축물질에 대한 혈관평활근의 반응성을 감소시키는 것으로 추정된다. 한편 산성화에 의한 혈관평활근의 혈관수축물질에 대한 반응성 감소 기전에 대해서는 아직 불명확하다.  $\text{H}^+$ 이 이러한 혈관수축물질의 수용체에 반응하여 수용체의 전하량 혹은 구조를 변화시켜 반응성을 감소시켰을 가능성이 있

으나 추후 연구가 더 필요하다.

반면  $\text{K}^+$  유발 수축과 같은 수용체를 통하지 않는 수축의 경우에는 pH 감소에 의하여 농도-반응 곡선이나  $\text{EC}_{50}$ 에는 거의 변화가 없었다. 그러나 세로토닌과 노에피네프린에 의한 반응처럼  $\text{K}^+$  유발 수축도 최대 수축력을 유의하게 감소하였다. 이는 pH 감소에 의한 수축력 감소가 혈관수축물질에 의한 혈관 반응성 감소 이외에 다른 기전에 의해서도 일어날 가능성이 있음을 의미한다.

#### 2) pH 변화가 혈관평활근 수축력을 감소시키는 기전

세포외 pH 감소에 의한 세로토닌과 노에피네프린에 의한 최대 수축력과  $\text{K}^+$  유발 최대 수축력을 감소시키는 것은 다음 기전에 의하여 일어났을 것을 생각된다. 첫째, 세포내  $\text{Ca}^{2+}$  증가 ( $\text{Ca}^{2+}$  유입)를 억제하였을 것으로 추정된다. 노에피네프린과 같은 혈관수축물질에 의한 세포내  $\text{Ca}^{2+}$  증가는 세포내  $\text{Ca}^{2+}$  저장고에서 유리와 세포 밖  $\text{Ca}^{2+}$ 의 유입 두 가지 기전에 의하는데 세포내 저장고에서의 유리는  $\text{Ca}^{2+}$  증가 초기의 일시적인 증가를 지속적인  $\text{Ca}^{2+}$  증가는  $\text{Ca}^{2+}$  유입에 의한다 [19]. 본 실험에서는 지속적인  $\text{Ca}^{2+}$  증가가 pH 감소에 의하여 억제되어 산성화는  $\text{Ca}^{2+}$  유입을 억제하는 것으로 추정된다. 혈관평활근에서 세포내  $\text{Ca}^{2+}$  유입에는 여러 가지 이온통로가 관여한다. 유입통로로는 voltage-operated  $\text{Ca}^{2+}$  channel (VOC)이 담당하는데 nonselective cation channel이 활성화되어 막전압이 저분극되면 VOC를 활성화시켜  $\text{Ca}^{2+}$  유입을 일으키며[20] 유입된  $\text{Ca}^{2+}$ 에 의하여  $\text{K}^+$  통로가 활성화되어 막전압이 재분극되면 VOC가 닫혀서  $\text{Ca}^{2+}$  유입은 감소한다[20-22]. 그러므로 pH 감소에 의한  $\text{Ca}^{2+}$  유입 감소에는 여러 가지 이온통로들이 관여할 가능성이 있다. 이미 밝혀진 것처럼  $\text{H}^+$ 에 의하여 VOC가 억제되어 일어났을 가능성이 있으며 nonselective cation channel 억제 혹은  $\text{K}^+$  통로 활성화에 의해서도  $\text{Ca}^{2+}$  유입이 억제되었을 가능성이 있다. 한편 세포내  $\text{Ca}^{2+}$  저장고에서  $\text{Ca}^{2+}$  유리에 미치는 영향에 대해서는 추후 연구가 필요하다.

둘째, 세포내 pH 감소는 수축단백의  $\text{Ca}^{2+}$ 에 대한 민감도를 감소시켰을 것으로 추정된다. 세포내 pH를  $\text{NH}_4^+$  혹은 propionic acid로 산성화시켰을 때 노에피네프린에 의한 수축이 감소하였으며 특히 세포막의 투과성을  $\alpha$ -escin으로 증가시켜 세포내  $\text{Ca}^{2+}$  농도를 세포외 용액  $\text{Ca}^{2+}$  농도와 동일하게 하였을 때 pH 감소로 인하여 수축력이 감소한 것은 수축단백의  $\text{Ca}^{2+}$ 에 대한 민감도가 감소한 결과로 사료된다.

$\beta$ -escin에 의하여 세포막 투과도가 증가하면  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{H}^+$ 과 같은 이온들은 자유롭게 이동하지만 세포내 기관들은 세포밖으로 이동하지 못하므로, 세포내 이온 조성을 세포 외 용액의 이온 조성으로 변화시킬 수 있다. 즉, 세포내의  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{H}^+$  농도를 세포외 용액의 농도 변화로 조절할 수 있다. 그러므로 세포내  $\text{Ca}^{2+}$  농도와  $\text{H}^+$  농도는 세포외 용액 농도로 조절할 수 있으며 이런 방법으로 세포내 pH 변화가 혈관평활근의  $\text{Ca}^{2+}$  민감성에 미치는 영향을 알 수 있었다. 세포내  $\text{Ca}^{2+}$  농도를 고정시킨 다음 세포내 pH를 감소시키면 수축력이 감소하고 증가하면 수축력이 증가하여 수축 단백에 대한  $\text{Ca}^{2+}$  민감도가 pH 감소에 의하여 감소함을 알 수 있다. 이와 같이 세포내 산성화가 혈관평활근의  $\text{Ca}^{2+}$ 에 대한 민감도가 감소하는 것은 troponin C가  $\text{Ca}^{2+}$ 과 결합하는 것이 산성화에 의하여 억제된 결과로 사료된다[12].

이외에도 세포외 pH 감소는 혈관평활근의 수축성에 영향을 주는  $\text{K}^+$  channel이나  $\text{Na}^+-\text{K}^+$  pump에 영향을 주어서 수축성을 변화시켰을 가능성도 있다. Inward-rectifying  $\text{K}^+$  channel은 막전압을 과분극시켜 혈관을 이완시키므로 억제하면 막전압이 저분극되어 혈관평활근의 수축성이 증가할 수 있다. 그리고  $\text{Na}^+-\text{K}^+$  pump를 억제하면 세포내  $\text{Na}^+$  증가에 의한  $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$  exchange (reverse mode) 활성화에 의해 세포내  $\text{Ca}^{2+}$ 이 증가하여 혈관평활근의 수축성을 증가시킨다. 그러므로 세포외 pH 감소는 inward-rectifying  $\text{K}^+$  channel과  $\text{Na}^+-\text{K}^+$  pump를 억제하여 세포내  $\text{Ca}^{2+}$ 을 증가시키고 수축성을 증가시킬 수 있다[11]. 그러나 이러한 pH의 효과는 수축단백의  $\text{Ca}^{2+}$  민감도 감소에 의해 상쇄될 것으로 사료된다.

한편  $\beta$ -escin은 HL-60 human leukemia cell의 증식과 세포 자연사(apoptosis)를 유발한다고 보고된 바[23]있어,  $\beta$ -escin에 의한 혈관평활근세포 손상이 실험결과를 왜곡하였을 가능성이 있다. 그러나 Fig. 7에서 보는 바와 같이  $\beta$ -escin 처리 후 pH 변화에 따른 반응이 pH 증가 후 수축이 증가하였다가 pH 감소에 의해 수축이 감소하는 등 pH에 의한 반응이 반복적으로 일어나고 있어  $\beta$ -escin에 의한 혈관평활근 손상의 영향을 배제할 수 있었다.

### 3) 생리학적 중요성

혈액 pH 변화는 여러 가지 경우에 관찰될 수 있다. 저산소증에 빠지거나 체액에 산이 첨가되는 경우 혹은 호흡곤란 등에 의하여 산성화가 일어 날 수 있으며 다양한 경우에 혈액 pH는 감소하거나 증가할 수 있다. 이러한 pH

감소에 의하여 혈액 속에 있는 혈관수축물질에 대한 혈관평활근의 수축성이 감소하고 혈관평활근의  $\text{Ca}^{2+}$ 에 대한 민감도가 감소하면 혈관 이완이 보다 쉽게 일어날 수 있어 저산소증에 빠진 혈관의 경우 혈관 이완에 의한 혈액 공급 증가가 가능하다. 그러므로 pH 감소에 의한 혈관평활근의 혈관수축물질에 대한 반응성 감소와  $\text{Ca}^{2+}$ 에 대한 민감도 감소는 pH 감소를 유발하는 원인을 제거할 수 있는 대응 기전으로 사료된다.

## 결 론

세포외 pH의 감소는 혈관평활근의 수축성을 감소시키는데 이는 세포외 pH 감소에 의한 혈관평활근의 혈관수축물질에 대한 반응성 감소, 혈관평활근 세포내  $\text{Ca}^{2+}$  유입 억제 그리고  $\text{Ca}^{2+}$ 에 대한 혈관평활근의 민감성 감소에 의하여 일어난 것으로 추정할 수 있었다. 한편 pH 감소에 의한 혈관평활근의 혈관수축물질에 대한 반응성 감소 기전과 혈관평활근의  $\text{Ca}^{2+}$ 에 대한 민감성 감소 기전은 더 연구가 필요하다고 사료된다.

## 참 고 문 헌

- Hessellund A, Aalkjaer C, Bek T. Effect of acidosis on isolated porcine retinal vessels. *Curr Eye Res* 2006;31:427-34.
- Baxter KA, Laher I, Church J, Hsiang YN. Acidosis augments myogenic constriction in rat coronary arteries. *Ann Vasc Surg* 2006;20:630-7.
- Kim YC, Lee SJ, Kim KW. Effects of pH on vascular tone in rabbit basilar arteries. *J Korean Med Sci* 2004;19:42-50.
- Hyvelin JM, O'Connor C, McLoughlin P. Effect of changes in pH on wall tension in isolated rat pulmonary artery: role of the RhoA/Rho-kinase pathway. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004;287:L673-84.
- Austin C, Wray S. Interactions between  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{H}^+$  and functional consequences in vascular smooth muscle. *Circ Res* 2000;86:355-63.
- Klockner U, Isenberg G. Calcium channel current of vascular smooth muscle cells: extracellular protons modulate gating and single channel conductance. *J Gen Physiol* 1994; 103:665-78.
- Klockner U, Isenberg G. Intracellular pH modulates the availability of vascular L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels. *J Gen Physiol* 1994;103:647-63.
- Hayabuchi Y, Nakaya Y, Matsuoka S, Kuroda Y. Effect of acidosis on  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$  channels in cultured porcine

- coronary artery smooth muscle cells. *Pflugers Arch* 1998; 436:509-14.
9. Horiuchi T, Dietrich HH, Hongo K, Goto T, Dacey RG Jr. *Role of endothelial nitric oxide and smooth muscle potassium channels in cerebral arteriolar dilation in response to acidosis*. *Stroke* 2002;33:844-9.
  10. Nakamura Y, Ohya Y, Abe I, Fujishima M. *Sodium-potassium pump current in smooth muscle cells from mesenteric resistance arteries of the guinea-pig*. *J Physiol* 1999;519:203-12.
  11. Kim MY, Liang GH, Kim JA, Park SH, Hah JS, Suh SH. *Contribution of  $\text{Na}^+-\text{K}^+$  pump and KIR currents to extracellular pH-dependent changes of contractility in rat superior mesenteric artery*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005;289:H792-800.
  12. Komukai K, Ishikawa T, Kurihara S. *Effects of acidosis on  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity of contractile elements in intact ferret myocardium*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1998;274(1 Pt 2):H147-54.
  13. Robertson BE, Bonev AD, Nelson MT. *Inward rectifier  $\text{K}^+$  currents in smooth muscle cells from rat coronary arteries: block by  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ , and  $\text{Ba}^{2+}$* . *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1996;271:H696-705.
  14. Therien AG, Blostein R. *Mechanisms of sodium pump regulation*. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000;279:C541-66.
  15. Xiao D, Huang X, Longo LD, Pearce WJ, Zhang L. *Regulation of baseline  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity in permeabilized uterine arteries: effect of pregnancy*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006;291:H413-20.
  16. Xie CQ, Huang H, Wei S, et al. *A comparison of murine smooth muscle cells generated from embryonic versus induced pluripotent stem cells*. *Stem Cells Dev* 2009;18:741-8.
  17. Berger MG, Vandier C, Bonnet P, Jackson WF, Rusch NJ. *Intracellular acidosis differentially regulates KV channels in coronary and pulmonary vascular muscle*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1998;275:H1351-9.
  18. Santa N, Kitazono T, Ago T, et al. *ATP-sensitive potassium channels mediate dilatation of basilar artery in response to intracellular acidification in vivo*. *Stroke* 2003;34:1276-80.
  19. Suh SH, Vennekens R, Manolopoulos VG, et al. *Characterisation of explanted endothelial cells from mouse aorta: electrophysiology and  $\text{Ca}^{2+}$  signalling*. *Pflugers Arch* 1999; 438:612-20.
  20. Cha CY, Earm KH, Youm JB, Baek EB, Kim SJ, Earm YE. *Electrophysiological modelling of pulmonary artery smooth muscle cells in the rabbits--special consideration to the generation of hypoxic pulmonary vasoconstriction*. *Prog Biophys Mol Biol* 2008;96:399-420.
  21. Ozdem SS, Yalcin O, Meiselman HJ, Baskurt OK, Usta C. *The role of potassium channels in relaxant effect of levosimendan in rat small mesenteric arteries*. *Cardiovasc Drugs Ther* 2006;20:123-7.
  22. Standen NB, Quayle JM.  *$\text{K}^+$  channel modulation in arterial smooth muscle*. *Acta Physiol Scand* 1998;164:549-57.
  23. Niu YP, Wu LM, Jiang YL, Wang WX, Li LD. *Beta-escin, a natural triterpenoid saponin from Chinese horse chestnut seeds, depresses HL-60 human leukaemia cell proliferation and induces apoptosis*. *J Pharm Pharmacol* 2008;60:1213-20.

=국문 초록=

**배경:** 산성화를 초래하는 Hypoxia 등 여러 가지 조건에서 변화하는 세포외 pH 변화는 궁극적으로 세포내 pH 변화를 유발하며 세포 내외 pH 변화는 혈관평활근 수축성 변화를 유발한다. 이러한 세포 내외 pH 변화에 의한 혈관 수축성 변화 기전을 규명하고자, pH 변화가 혈관수축인자들에 의한 혈관평활근 수축, 혈관평활근세포내  $\text{Ca}^{2+}$  농도, 그리고 혈관평활근의  $\text{Ca}^{2+}$ 에 대한 민감도에 미치는 영향을 알아보고자 하였다. **대상 및 방법:** 쥐에서 분리한 상장간막동맥과 그 분지에서 등장성 수축을 기록하였으며 배양한 상장간막동맥 세포에서 세포내  $\text{Ca}^{2+}$  변화를 측정하였다. 세포외 pH는 정상인 7.4에서 6.4, 6.9 혹은 7.8로 변화시켰으며, 세포내 pH 변화는 propionic acid나  $\text{NH}_4$ 를 투여하거나  $\beta$ -escin으로 세포막의 투과성을 증가시켜 세포외 용액의 pH 변화로 유발시켰다. **결과:** 세포외 pH를 7.4에서 6.9, 6.4로 감소시키면 노에피네프린과 세로토닌에 의한 용량-반응 곡선이 우측 이동하였으며 최대 수축력의 50% 수축력을 유발하는 농도(half maximal effective concentration)가 증가하였고, pH를 7.8로 증가시키면 그 반대 현상이 일어났다. 노에피네프린은 배양한 혈관평활근세포에서 세포내  $\text{Ca}^{2+}$  농도를 증가시켰으며, 이 세포내  $\text{Ca}^{2+}$  증가는 세포외 pH 감소에 의하여 억제되었으며 세포외 pH 증가에 의하여 증가하였다. 노에피네프린에 의한 수축은 세포내 pH를 감소시키는  $\text{NH}_4^+$ 에 의하여 억제된 반면, 안정 장력은  $\text{NH}_4^+$ 과 propionic acid에 의하여 증가하였다.  $\beta$ -escin으로 세포막의 투과도를 증가시킨 후 세포외 용액의  $\text{Ca}^{2+}$  농도를 증가시켜 수축을 유발시킨 후 세포외 용액의 pH를 변화시키면 pH 감소에 의하여 수축력이 감소하였으며 증가에 의하여 수축력이 증가하였다. **결론:** 세포외 pH의 감소는 혈관평활근의 수축성을 감소시키는데 이는 세포외 pH 감소에 의한 혈관평활근의 혈관수축물질에 대한 반응성 감소, 혈관평활근 세포내  $\text{Ca}^{2+}$  유입 억제 그리고  $\text{Ca}^{2+}$ 에 대한 혈관평활근의 민감성 감소에 의하여 일어난 것으로 추정할 수 있었다.

- 중심 단어 : 1. 혈관 수축력과 반응성  
2. 수소이온농도  
3. 혈관평활근  
4. 칼슘