

혈액과 조직의 CO₂완충능 및 세포막을 통한 H⁺농도 경사

서울대학교 의과대학 생리학교실

黃尙翼 · 朴榮培 · 閔丙九 · 金祐謙

=Abstract=

CO₂ Buffering and Hydrogen Ion Concentration Gradient across Cell Membrane in Acute Acid-Base Disturbances in Dogs

Sang Ik Hwang, M.D., Young Bae Park, M.D.,
Byoung Ku Min, PH.D., Woo Gyeum Kim, M.D.

Department of Physiology, College of Medicine, Seoul National University

The in vivo and in vitro buffer capacities of true plasma and tissue buffer capacities were compared on dogs. Intracellular pH was determined on skeletal muscle by a modification of the method of Schloerb and Grantham using C¹⁴ DMO.

The in vivo curve for plasma or extracellular fluid has a much lower slope than the in vitro curve. The in vivo slope of skeletal muscle in the dog is approximately 20 sl. The slope for skeletal muscle in vivo falls between the in vitro and in vivo slopes of true plasma.

It appears that intracellular hydrogen ion varies linearly with extracellular hydrogen ion when CO₂ tension is changed. Both hydrogen ion gradient and H_i/H_e ratio vary in skeletal muscle, with an increase in CO₂ tension.

Infusion of 0.3N HCl gave two distinct patterns, the H_i-H_e gradient decreased; and it would appear that very little hydrogen ion as such penetrated to the inside of the cells during the time of observation.

Although lactic acid presumably enters the cell and the same of larger load was given as was used for hydrochloric acid, only very mild intracellular acidosis resulted, ostensibly due to metabolism of this substrate. Gluconic acid produced a more severe acidosis, both intracellularly and extracellularly, but with both of these acids the hydrogen ion gradient decreased and the H_i/H_e ratio also decreased.

The experiments on the dogs with hemorrhagic shock the hydrogen ion increase producing the acidosis originates inside the cells. Even so, the hydrogen ion gradient increased only very slightly in the acute experiments. This may suggest that even over short intervals of time skeletal muscle cells have a capacity to pump out hydrogen ions at a rate which maintains approximately the normal H_i/H_e gradient when the source of the hydrogen ion is in the interior of the cell.

본 연구에 소요된 경비의 일부는 1983년도 서울대학교 병원 임상연구비로 충당되었음.

본 연구에 소요된 경비의 일부는 1982년도 문교부 학술연구비로 충당되었음.

머 리 말

이산화탄소 분압(P_{CO_2})변화에 의해 유발되는 pH 변화에 대한 혈액과 조직의 내력 즉, 완충능은 동원 가능한 완충제의 농도에 달려있다.

완충능은 Van Slyke 에 의하여 dB/dpH 로 정의되었고(dB 는 1 L 에 첨가된 강염기의 gm 당량), 이 완충치는 시험관 내에서는 용액에 첨가된 수소이온(H^+)당량에 대한 pH 변화를 직접은 적정곡선 기울기로써 쉽게 결정할 수 있다. 적정하는 산이 탄산(H_2CO_3)인 경우, 산의 첨가는 P_{CO_2} 오름으로 초래되고 이때에 첨가된 H^+ 당량은 증가한 중탄산염(HCO_3^-)농도로 측정할 수 있다. 여기서 HCO_3^- 한 당량이 생성될 때마다 같은 양의 H^+ 이 산으로부터 이온화되어 완충제와 결합했기 때문이다. 그러므로 P_{CO_2} 변화와 더불어 HCO_3^- 농도에 대한 pH 변화의 적정곡선 기울기는 그 용액의 H_2CO_3 에 대한 완충능을 말하는 셈이다. 따라서 완충치를 재려면 시험관 내에서 혈액 혹은 조직의 P_{CO_2} 을 변화시키고, 이에 따르는 pH와 HCO_3^- 농도를 측정하면 된다. 이리하여 얻은 완충치는 이때 활용된 완충제 농도를 말해준다. 그러나 생체에서는 체액의 여러 부분이 저마다 끊임없이 물질을 교환하는 동적 항상상태에 있으므로 시험관내에서 조직이 보여준 완충능이 생체에서의 실제 완충능과 큰 차이가 있을 수 있고, 조직이 세포 내외로 물질을 운반하는 능력이 완충치를 변동시킬 수 있는 것이다. 완충능은 어디까지나 생체에서의 완충능이 문제가 되므로 이를 '실제 완충능' 혹은 '효과적 완충능'으로 표현하는 것이 타당하다. 이 실제 완충능은 조직이 생체내에서 보여주는 완충능으로서 이것이 곧 우리가 알고자 하는 완충치이다. 시험관내 조직의 태도는 생체내에서 보여주는 태도와 같지 않으며 주로 학문적 흥미의 대상으로 그칠 때가 있다. 오늘날 조직 완충작용의 지식은 거의 시험관내 완충작용에 그친다. 그러나 약산 DMO 의 분포에 의해 세포내 pH 를 측정하는 기술이 개발되어 골격근의 생체내 완충능을 측정할 수 있게 되었고, 이를 앞서 얻은 시험관내에서 완충능과 비교할 수 있게 되었다.

실 험 방 법

이 실험은 sodium pentobarbital(30 mg/kg)로 마취한 개를 이용하였다. 평형혈장의 시험관내 및 생체내 완충능력을 비교하였는데, 실험 동물을 100%산소로 호

흡시키며 60 ml 의 혈액을 채취하여 이를 대조 혈액으로 하였다. 이 혈액에서 pH, P_{CO_2} , HCO_3^- 농도를 측정하였다. 나머지 피를 셋으로 나누어 시험관내에서 5%, 15%, 30%의 CO_2 - O_2 혼합공기로 평형상태에 이르게 하였다. 그 후 개는 15% CO_2 - O_2 혼합공기로 15분간 호흡시키고, 이어서 30% CO_2 - O_2 혼합공기로 15분간 호흡시켰다. 각 혼합공기로 호흡시킨 후에 혈액시료를 더 채취하고 이들 시료로부터 다시 pH, P_{CO_2} , HCO_3^- 를 측정하였다. 세포내 pH 측정은 골격근에서 측정하였는데 sodium pentobarbital(30 mg/kg)로 마취하여 양쪽 콩팥을 절제하고, 1 gm/kg 의 sucrose, 0.7 μ C C^{14} DMO 를 정맥 주사하였다. 1시간 후에 대조혈액과 골격근 시료를 채취하였다. 동물은 1시간 동안 15% CO_2 - O_2 , 혹은 30% CO_2 - O_2 혼합공기로 호흡시킨 후 혈액과 골격근 시료를 채취하였다. 근육시료는 허벅지 근육을 채취하였고, 세포내 pH 측정을 위해 대퇴정맥으로부터 혈액을 채취하였다. 골격근과 혈액에서 복수의 시료를 채취하였다.

혈액 pH와 P_{CO_2} 는 37.5°C 의 전극으로 측정하였으며, 이들 성적을 개의 체온으로 조정하였다. HCO_3^- 농도와 조직의 HCO_3^- 농도는 혈액의 pH, P_{CO_2} 값에서 계산하였고, 세포내 pH 의 측정은 C^{14} DMO 를 이용하여 Schloerb and Grantham 의 방법으로 측정하였다.

실 험 성 적

실험성적을 Table 1 에 표시하였다. 평형혈장의 시험관내 실험 성적으로 그린 적정곡선은 Fig. 1 에 표시하였다. 생체내 세포외액의 적정곡선은 같은 동물 골격근에서 얻은 성적으로 그렸다. 앞서 말한 바와같이 혈액의 생체내 적정곡선은 분명히 시험관내 적정곡선보다 기울기가 훨씬 덜 가파르다. 그것은 혈액의 CO_2 완충작용은 주로 혈색소에 의존하며 생체내에서 CO_2 완충작용으로 형성되는 HCO_3^- 의 분포 용적이 시험관내에서와 비교하여 훨씬 크므로 생체내에서는 완충작용으로 형성된 HCO_3^- 이 간질액 공간으로 희석되기 때문이다. 그러나 생체내의 세포외액과 골격근 세포내액의 완충능을 비교하면 그나마 세포외액의 완충능이 크며, 생체내 골격근 세포내액의 완충치는 약 20 sl 이다. (Woodbury⁴⁾는 완충곡선 기울기를 slyke 로 표시하기를 주장하였는데 이는 D D Van Slyke 이름에서만 단위이며 완충치 단위는 따라서 mM/L/pH 가 된다. 이 성적은 Irving, Foster, Ferguson⁵⁾들이 보고한 성적과 대략 비슷하다. 이들도 개의 생체내 비장

Table 1. Acid-Base values in skeletal muscle cells and ECF in hypocapnea and/or hypercapnea in dogs

	$[H]_e$ nM/L	$[H]_i$ nM/L	$[H]_i - [H]_e$ nM/L	$[H]_i/[H]_e$	P_{CO_2} mmHg
Control	51	100	49	1.96	52
Hyperventilation	37	74	37	2.00	33
Control	46	105	59	2.32	42
CO ₂ -30%	180	283	103	1.59	207
CO ₂ -15%	105	175	70	1.67	110

Table 2. Acid-Base values in skeletal muscle cells and ECF after the infusion of .3N hydrochloric acid or .6M sodium bicarbonate in dogs

	$[H]_e$ nM/L	$[H]_i$ nM/L	$[H]_i - [H]_e$ nM/L	$[H]_i/[H]_e$	P_{CO_2} mmHg
Control	45	108	63	2.44	44
HCl	100	133	33	1.33	57
Control	50	118	68	2.35	52
NaHCO ₃	25	132	117	5.52	63

근의 성적으로서 Fenn⁶⁾이 개구리 근육을 시험관내에서 측정 한 값보다 상당히 높다. 그러므로 생체내 골격근의 완충곡선 기울기는 시험관내와 생체내 평형혈장 기울기 중간치인 셈이다. 이들 조직의 완충능력을 결정하는 상대적요인을 감안하여 시험관내 완충치로부터 생체내 완충치를 짐작함은 매우 어려움을 알 수 있다. 골격근은 세포외액보다 높은 완충치를 갖는다. 이

와같은 완충작용 순위를 P_{CO₂}와 H⁺농도로 대비한 관계를 Table 2, 3, 4에서 보였다. 앞서 지적하였지만 조직의 CO₂완충능은 단순한 화학적 완충작용 이상의 것으로 보인다. CO₂완충작용 기전은 완전히 밝혀지지 않았지만 세포막의 H⁺-펌프 능력도 포함돼야 할 것으로 믿어진다.

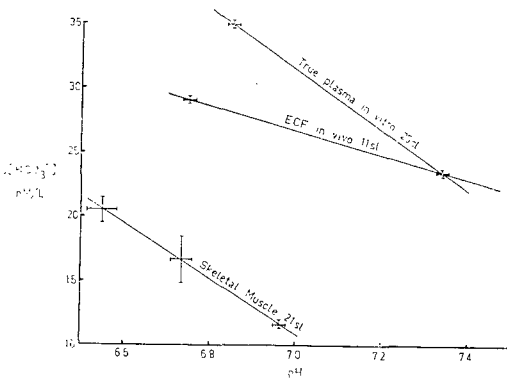


Fig. 1. Comparison of buffer capacities of true plasma in vitro, ECF in vivo and skeletal muscle in vivo.

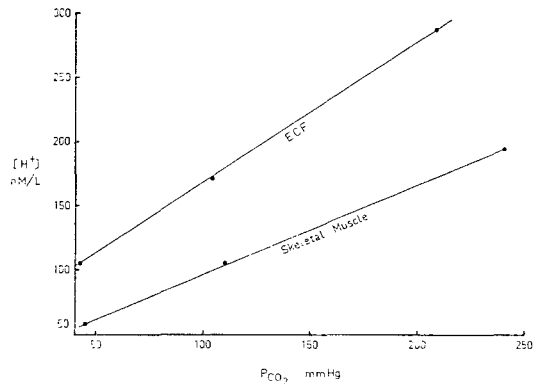


Fig. 2. Relationship between P_{CO₂} and hydrogen ion concentration in ECF and skeletal muscle cells in dogs.

Table 3. Acid-Base values in skeletal muscle cells and ECF after the infusion of .3M lactic acid or gluconic acid in dogs

	$[H]_e$ nM/L	$[H]_i$ nM/L	$[H]_i - [H]_e$ nM/L	$[H]_i / [H]_e$	P_{CO_2} mmHg
Control	43	117	74	2.72	43
Lactic Acid	86	132	56	1.54	51
Control	44	106	62	2.41	46
Gluconic Acid	119	147	28	1.23	48

Table 4. Acid-Base values in skeletal muscle cells and ECF after the induction of hemorrhagic shock in dogs

	$(H)_e$ nM/L	$(H)_i$ nM/L	$(H)_i - (H)_e$ nM/L	$(H)_i / (H)_e$	P_{CO_2} mmHg
Control	46	126	80	2.74	49
Shock	87	177	90	2.03	59

고 찰

항상성 유지 기전 가운데 세포 내외의 H^+ 농도를 일정하게 유지함은 생명 유지를 위하여 가장 중요한 것임은 재언의 여지가 없다. 세포가 H^+ 농도를 유지함에 있어 작용하는 기전은 적어도 세가지 관점에서 논의해야 할 것이다.

첫째, 세포내 H^+ 농도를 정상시에 110 ± 5 nM/L로 유지하는 것.

둘째, 정상적으로 세포내외 세포외 H^+ 농도 경사를 약 60 nM/L로 유지하는 것.

셋째, H_i/H_e 비율을 대략 2.5로 유지하는 것이다.

이 문제들은 아직 결정적으로 말할 수는 없지만 여러 산-염기 장애에서 얻은 세포내 pH 성적들을 Table 1~Table 4로 표시하였다.

Table 1은 앞서 발표한 성적으로 표시하였다. 그러나 Adler, Roy, Relman²⁾들에 의하면 세포내 pH는 세포밖 H^+ 농도를 P_{CO_2} 변화 혹은 HCO_3^- 농도를 넓은 범위로 변동시켰음에도 불구하고, 일정하게 유지되었다. 그러나 본 실험과 Schloerb, Grantham²⁾의 성적은 개의 생체 실험에서 그렇지 않았다. 여기서는 세포내 pH는 P_{CO_2} 변화로 세포외 H^+ 농도 변화와 비례하여 변동하였다. 더구나 H^+ 경사와 H_i/H_e 비율은 골격근에서 P_{CO_2} 오름과 더불어 변동하였다. 이들 조직에서 H_i/H_e 비율은 골격근에서는 H^+ 농도 경사가 증가할 때 감소하였

다. 이밖의 모든 세포내 성적들은 골격근에 준한 성적을 보인다.

저자의 0.3 N HCl 주입실험에서는 두가지 두드러진 모습을 보였다(Table 2). 10마리의 실험 가운데 7마리는 H_i/H_e 비율이 감소하였는데 이는 기대한 반응이었다.

그 까닭은 H^+ 이 쉽게 세포막을 뚫고 세포내로 이동할 수 없기 때문으로 믿어진다. 그러나 세실험에서는 농도경사는 변화하지 않거나 혹은 약간 증가하였다. 첫 무리에서는 108~133 nM/L로 H_i 농도의 증가는 P_{CO_2} 이 44 mmHg에서 58 mmHg로 오르기 때문으로 믿어진다. HCl 주입 실험에서 예컨대 동맥혈 P_{CO_2} 가 약 40 mmHg에서 25 mmHg로 떨어졌는데 이 사이 대퇴정맥혈 P_{CO_2} 는 44 mmHg에서 57 mmHg로 높아졌다. 이는 분명히 HCl 주입 후에 하지를 통한 혈류량이 감소하였기 때문이다. 이 사이 H^+ 이 세포내로 투과한 양은 매우 적으리라는 것은 분명하다. 이들 소견은 세포막이 H^+ 에 대하여 투과성이 매우 낮다는 종래의 정설을 굳혀준다. HCl 주입 첫 무리 실험에서 분명한 것은 H^+ 경사는 낮아지고, H_i/H_e 비율도 역시 감소한 것이다. 세 실험에서 H^+ 경사는 증가하거나 혹은 변화하지 않았으며, 평균치는 Table 2 위에 표시하였다. 여기서 H^+ 은 세포내로 들어가지 않음은 분명하다. 일정한 P_{CO_2} 에서 H_i 농도가 증가함을 보아 알 수 있다. 또 다른 설명은 세포외 HCO_3^- 농도가 감소함에도 불구하고 HCO_3^- 은 세포내에서 세포외로 어떤 다른 세포의 음이

은과 교환하여 이동한다는 것이다. Table 1과 Table 2의 성적은 1시간반 내지 3시간의 평형시간 후에 얻은 것으로 만성적 변화 혹은 근세포의 시간에 따르는 세포내 산에 대한 보상능력을 말해주는 것은 아니다.

1 M 락트산을 주입한 5마리 개의 성적과 1 M gluconic acid를 주입한 5마리 개의 평균치를 각각 Table 3에 표시하였다.

락트산은 염산과 마찬가지로 대량을 투여하였으나 아마 세포내로 들어가겠지만 세포내 산증은 경미하였다. 이는 세포내에서 락트산이 대사되었기 때문이다. 이에 대하여 gluconic acid는 세포 내외의 더욱 심한 산증을 유발시켰다. 그러나 이들 두가지 산은 모두 H⁺경사와 H_i/H_o비율을 감소시켰다. 그리고 락트산 실험에서 동맥혈 Pco₂은 35 mmHg에서 20 mmHg로 떨어졌는데 대퇴정맥혈 Pco₂은 43 mmHg에서 51 mmHg로 올랐었다. 이 Pco₂오름은 H_i농도의 증가에 대략 절반은 기여할 것이다.

실험성 속이 빠진 7마리 개의 성적을 Table 4에 표시하였다. 이 실험에서는 급성속 실험으로서 H⁺농도의 증가는 세포내에서 원발한 것이다. 그렇지만 세포내 H⁺농도 증가는 매우 미약하였다. 이는 골격근세포가 단시간에 H⁺을 퍼낼 기구를 갖추고 있으며 대략 정상치에 가까운 H_i/H_o비율을 유지함은 세포내에서 H⁺이 발생되거나 세포외에서 발생되거나 마찬가지로 입을 말해준다. 이들 실험을 통털어 생각할 때 골격근은 H⁺을 쉽게 세포내로 들여보내지 않으며 세포내에 H⁺이 생성될 때에도 이를 퍼낼 능력이 있음을 말해준다. Irving, Saunders, Milne, Crawford⁹⁾ 및 Grantham, Schloerb¹⁰⁾의 성적에 의하면 칼륨결핍시에 세포내 H⁺농도는 꽤 빨리 증가하였다. 이들 성적은 흰쥐와 개에서 얻은 것으로 만성 실험에서도 그러하였다. 이는 세포내의 H⁺농도를 조절함에 있어서 다른 이온 농도와 독자적으로 할 수 없음을 말해준다.

물론 세포내 H⁺농도를 조절하기 위하여 작용하는 많은 요소가 있을 것이다. 능동적 H⁺펌프의 효율과 이 능력에 영향을 미치는 여러 요인들, 다른 이온과의 관계 특히 K⁺과의 관계, 또는 Donnan 평형의 영향, 세포막을 통한 전기적 경사들이 모두 세포내 H⁺농도 조절에 이바지할 것으로 믿어진다.

결 론

개를 실험동물로 하여 시험관내와 생체내에서의 평형혈장 완충능을 비교하고, 골격근 세포의 완충능을

측정하였다. 세포내 pH는 골격근에서 C¹⁴ DMO 법으로 측정하였다.

생체내 혈장 혹은 세포외액의 완충곡선은 시험관내 혈장보다 기울기가 훨씬 완만하였다. 개골격근의 완충곡선 기울기는 대략 20sl이었다. 그리고 이는 시험관내와 생체내 평형혈장 기울기의 중간치에 해당하였다.

이산화탄소 분압이 변화할 때, 세포내 H⁺ 농도는 세포외 H⁺ 농도와 더불어 변화하며, H⁺ 경사와 세포내의 H_i/H_o 비율도 Pco₂ 증가와 더불어 변화하였다.

0.3N HCl 주입에서는 H_i/H_o 비율은 감소하며, 이는 또 급성기에는 세포막이 H⁺을 거의 투과시키지 않음을 시사하였다.

락트산은 염산처럼 대량 투여하여도 세포내 산증은 경미하였다. 이는 락트산이 세포내에서 대사되었기 때문으로 믿어진다. gluconic acid도 세포 내외에서 더욱 심한 산증을 유발시키지만 이들 산은 모두 H⁺ 경사와 H_i/H_o 비율을 감소시켰다.

실험성 속이 빠진 개에서는 세포내에서 원발한 산증으로 H⁺ 농도를 증가시키지만 급성 실험에서도 H_i/H_o 경사의 증가는 매우 경미하였다. 이는 골격근 세포가 짧은 시간에 H⁺을 퍼낼 능력을 가지며 대략 정상적 H_i/H_o 비율을 유지할 수 있음을 시사하였다.

REFERENCES

- 1) Van Slyke, D.D.: *On the measurement of buffer values on the relationship of buffer value to the dissociation constant of the buffer and the concentration and reaction of the buffer solution.* *J. Biol. Chem.* 52:525-70, 1922.
- 2) Schloerb, Paul R. and J.J. Grantham: *Intracellular pH measurement with tritiated water, carbon-14 labeled 5,5-dimethyl-2,4-oxazolinedione and chloride-35.* *J. Lab. Clin. Med.* 65:669-676, 1965.
- 3) Brown, E.B., Jr. and R.L. Clancy: *In vivo and in vitro CO₂ blood buffer curves.* *J. Appl. Physiol.* 20:885-889, 1965.
- 4) Woodbury, J.W. Regulation of pH: *In Physiology and Biophysics. Edited by Ruch and Patton. Philadelphia: Saunders Co., 1965.*
- 5) Irving, L., H.C. Foster, and J.K.W. Ferguson: *The carbon dioxide dissociation curve of living mammalian muscle.* *J. Biol. Chem.* 95:95-

- 113, 1932.
- 6) Fenn, W.O.: *The carbon dioxide dissociation curve of nerve and muscle. J. Physiol. 85: 207-214, 1928.*
- 7) Brody, H.: *The carbon dioxide dissociation curve of frog heart muscle. Am. J. Physiol. 93:190-196, 1930.*
- 8) Adler, S., A. Roy, and A.S. Relman.: *Intracellular acid-base regulation. I. The response of muscle cells to changes in CO₂ tension or extracellular bicarbonate concentration. J. Clin. Invest. 44:8-20, 1965.*
- 9) Irvine, R.O.H., S.J. Saunders, M.D. Milne, and M.A. Crawford.: *Gradients of potassium and hydrogen ion in potassium-deficient voluntary muscle. Clin. Sci. 20:1-18, 1960.*
- 10) Grantham, J.J. and P.R. Schloerb.: *Interrelation of potassium and hydrogen ion gradients in metabolic alkalosis. Am. J. Physiol. 208: 1114-1118, 1965.*
- 11) Brown, E.B., Jr., W.G. Kim, and F.A. Moorhead, Jr.: *Intracellular pH during metabolic acidosis of intracellular and extracellular origin. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 126:595-599, 1967.*
- 12) Madias, Nicolaos E., and Horacio J. Adrogué.: *Influence of chronic metabolic acid-base disorders on the acute CO₂ titration curve. J. Appl. Physiol. 55(4):1187, 1983.*