

유체 압력에 의한 흰쥐 심실근세포 pH의 감소 및 Na⁺-H⁺ 교환체의 활성화

김준철 · 우선희[#]

충남대학교 약학대학 의약품개발연구소

(Received May 6, 2011; Revised May 23, 2011; Accepted May 30, 2011)

Decrease of Intracellular pH and Activation of Na⁺-H⁺ Exchanger by Fluid Pressure in Rat Ventricular Myocytes

Joon-Chul Kim and Sun-Hee Woo[#]

College of Pharmacy, IDR, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

Abstract — An increase in ventricular pressure can alter cardiac excitation and contraction. Recent report has demonstrated that fluid pressure (FP) suppresses L-type Ca²⁺ current with acceleration of the current inactivation in ventricular myocytes. Since the L-type Ca²⁺ channels known to be regulated by intracellular pH (pH_i), this study was designed to explore whether pressurized fluid flow affects pH_i in isolated rat ventricular myocytes. A flow of pressurized (~16 dyne/cm²) fluid, identical to that bathing the myocytes, was applied onto single myocytes, and intracellular H⁺ concentration was monitored using confocal H⁺ imaging. FP significantly decreased pH_i by 0.07±0.01 pH units (n=16, P<0.01). Intracellular acidosis enhances the activity of Na⁺-H⁺ exchanger (NHE). Therefore, we examined if the NHE activity is increased by FP using the NHE inhibitor, HOE642. Although HOE642 did not alter pH_i in control conditions, it decreased pH_i in cells pre-exposed to FP, suggesting enhancement of NHE activity by FP. In addition, FP-induced intracellular acidosis was larger in cells pre-treated with HOE642 than in cells under the control conditions. These results suggest that FP induces intracellular acidosis and that NHE may contribute to extrude H⁺ during the FP-induced acidosis in rat ventricular myocytes.

Keywords □ fluid pressure, intracellular pH, ventricular myocytes, Na⁺-H⁺exchanger, HOE642

세포내 pH는 심근 Ca²⁺ 신호화(signaling) 과정 및 수축력을 조절하는 중요한 인자이다.^{1,2)} 심근세포에는 몇 가지의 세포막 이온 수송체들이 세포내 pH를 정밀하게 조절하고 있다. 이 수송체들 중 하나인 Na⁺-H⁺ 교환체(exchanger)(NHE)³⁾는 특히 신장(stretch)이나 shear 스트레스와 같은 기계적 자극에 의해 활성화 될 수 있다고 보고되었다.^{4,5)} 뿐만 아니라 Na⁺-H⁺ 교환체에 대한 억제제들은 심근 허혈 후 재관류에 의한 손상이나 심실 부정맥을 방지해 준다고 보고된 바 있다.^{6,7)}

심장은 그 수축력의 변화나, 부피 및 압력의 변화에 의한 기계적 환경 변화에 반응하며, 이 때 그 수축력과 막의 흥분성이 달라진다.^{8,9)} 밸브 질환, 고혈압, 심부전과 같은 병적인 조건에서는 혈류동력학적 장애나 기계적 자극이 심근에 가해 질 수 있으며, 이 때 부정맥이 나타난다.⁹⁾ 관류 심장 모델에서 심실로 더 많은

혈액을 공급하면 활동전위의 지속기(duration)가 감소하게 되고, 그 유효 불응기가 감소된다고 알려져 있다.¹⁰⁻¹²⁾ 더욱이, 밸브 부전 환자에서는 심장 내 혈액의 역류에 의해 세동이 나타나고,¹³⁾ 심장 내부에 관을 삽입한 환자에서는 특발성 빈맥이 나타난다.¹⁴⁾ 이러한 임상적 증거들은 유체 압력(fluid pressure, FP)이나 직접적인 감각이 심근 세포막의 전기적 흥분성을 직접 변화시킬 가능성을 제시해 주고 있다.

최근 단일 심방근세포에서 빠른 유체 압력 자극이 자발성 Ca²⁺ 스파크의 발생 빈도를 증가시킨다고 보고된 바 있다.¹⁵⁾ 흰쥐 심실근세포에서는 유체 압력 자극이 L-형 Ca²⁺ 전류(L-type Ca²⁺ current)를 억제하였고, 이 전류의 불활성화(inactivation)를 촉진하였다.¹⁶⁾ 이러한 결과들을 분자 수준에서 설명하는 기전은 아직 잘 알려져 있지 않지만, 세포 Ca²⁺ 농도와 L-형 Ca²⁺ 통로의 불활성화를 조절할 수 있는 기전들 중에는 세포내 pH가 있다. 본 논문에서는 먼저 유체 압력이 세포내 pH를 변화시키는지 고찰하였고, 이를 Na⁺-H⁺ 교환체의 억제제를 이용하여 더 확인하였다. 세포 내의 pH를 측정하기 위해 H⁺에 선택적인 형광표지

[#]본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 042-821-5924 (팩스) 042-823-6566
(E-mail) shwoo@cnu.ac.kr

약을 사용하여 그 형광을 실시간 공초점 영상화 방법으로 측정하였다. 이 논문에서는 유체 압력이 세포 pH를 감소시키고, Na^+ - H^+ exchanger를 활성화시킬 수 있다는 증거를 보여주고 있는데, 이러한 세포 내 H^+ 농도의 증가는 이전에 보고된 유체 압력에 의한 L-type Ca^{2+} 전류 불활성화의 촉진을 설명하는 하나의 기전이 될 것이다.

실험방법

단일 심실 근세포의 분리

심실 근세포의 분리는 Lee 등¹⁶⁾의 방법으로 시행했다. 백서 수컷(Sprague Dawley, 체중 200~250 g)을 펜토바르비탈(sodium pentobarbital, 150 mg/kg, 복강투여)로 마취시킨 후 흉강을 열어 심장을 적출했다. 심장 적출 수술에 관련된 제반 절차는 충남대학교 동물관리윤리위원회의 심의를 통과하였다. 적출된 심장의 대동맥을 랑겐도르프 장치의 cannular에 매단 후 대동맥을 통해 36.5°C의 0 mM $[\text{Ca}^{2+}]$ -Tyrode 용액(0.137 NaCl, 5.4 KCl, 10 HEPES, 1 MgCl_2 , 10 glucose, pH=7.3)을 3분간 관류시켰다. 그 후 collagenase A(1.4 mg/ml, Type 1; Roche, Indianapolis, IN, USA)와 protease(0.14 mg/ml, Type XIV; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 포함한 0 mM $[\text{Ca}^{2+}]$ -Tyrode 용액을 12 분간 관류시키고, 마지막으로 0.2 mM $[\text{Ca}^{2+}]$ -Tyrode 용액을 8분 동안 관류시켰다. 심장에서 심실을 취하여 여러 조각으로 나눈 후, 조각들을 0.2 mM $[\text{Ca}^{2+}]$ -Tyrode 용액에서 흔들여 심실세포들이 떨어져 나오도록 하였다. 분리된 세포들은 실온의 0.2 mM $[\text{Ca}^{2+}]$ -Tyrode 용액에서 보관되었다.

유체압력의 처리

직경이 약 400 μm 되는 작은 미세관의 끝을 단일 세포 근처에 위치시킨 후, 미세관을 통해 압력을 가진 유체를 순간적으로 뽑어주는(puffing) 방법을 사용하여 유체 압력을 가하였다. 미세관은 정상 tyrode 용액으로 채우고, 용액의 저장고는 400 mm의 높이에 두었다. 용액이 흘러가는 관에는 전기적 밸브(: solenoid valve)를 장착하였고, 밸브의 여닫이를 컴퓨터 프로그램(pClamp 9.0, Molecular Devices, USA)으로 동작시키도록 고안하여, 유체 압력의 처리 시점과 지속 시간을 자동으로 조절되게 하였다. 미세관의 끝부분은 45° 각도로 기울여 바닥에 닿도록 하였다. 미세관의 끝을 세포 근처에 위치시키기 위해 현미경 하에서 미세 조절장치(micromanipulator)를 사용하였다. 용액 저장고의 높이 400 mm에서 실린더 형태의 관 내부에서 흐르는 액체의 유체 압력은 아래의 [식 1]로 계산될 수 있으며,¹⁷⁾ 400 mm의 저장고 높이에서는 ~16 dyne/cm^2 의 유체압력이 만들어진다.

$$FP(\text{dyne/cm}^2) = 4\mu Q/\pi r^3$$

[식 1]

(여기서, μ 는 용액의 점도, Q는 유속(ml/s), r은 튜브의 내부 반경)

공초점 H^+ 영상화(imaging) 및 영상 분석

세포막을 투과하는 성격을 가진 carboxy-SNARF-1 AM (Invitrogen, Eugene, OR, 미국) 형광 지시약을 10 μM 농도로 10분간 실온에서 세포에 처리하였다. 아르곤/크립톤(Ar/Kr) 이온 레이저(Omnichrome)를 이용하여 540 nm 파장의 빔(beam)을 도립현미경(inverted Leica DM IRBE) 대물렌즈를 통해 세포에 쬐어 주어 형광의 들뜸을 유도하였으며, 형광 여기(emission)는 590±5 nm과 640±5 nm 두 파장에서 공초점영상화 시스템(TCS SP1, Leica, 독일)을 이용하여 측정하였다. 이차원 영상은 TCS NT 프로그램(Workstation용, Leica)으로 기록하였으며, LCS Lite 소프트웨어(Leica)로 분석하였다. 공초점영상화 실험에는 60배 oil-immersion 대물렌즈(Plan Apo, 개구수 1.3)를 사용하였다. (590 nm에서의 형광)/(640 nm에서의 형광) 값은 H^+ 농도가 증가할수록 증가한다. 이 값을 pH 값으로 전환하기 위해, 기존에 보고된 nigericin 보정(calibration)법을 사용하였다.¹⁸⁾ 보정에 사용된 용액에는 기본적으로 140 mM KCl, 1 mM MgCl_2 , 0.5 mM EGTA, 0.01 mM nigericin이 포함되어 있으며, pH 5.5 용액을 제조하기 위해 20 mM Mes(2-(N-morpholino) ethanesulphonic acid)를, pH 9.5 용액을 제조하기 위해 20 mM Tris(2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol)를 각각 더 첨가하였다.

HOE642((4-isopropyl-3-methylsulfonyl-benzoyl)-guanidine methane sulfonate)는 Sanofi-Aventis(Deutschland GmbH, 독일)로 부터 제공받았다. HOE642는 세포 외액에 녹여 실험 목적에 따라 유체 압력 장치 혹은 superfusion 방식으로 세포에 처리하였다.

모든 실험은 실온(22~25°C)에서 시행하였다.

통계 분석

실험 데이터의 수치들은 평균±표준오차(standard error of mean, SEM)로 요약되었고, 통계학적인 비교는 "t-test"로 이루어졌다. P 값이 0.05 미만일 때 통계학적으로 유의한 차이가 있는 것으로 판단되었다.

실험결과 및 고찰

H^+ 지시약으로 loading된 분리한 심실근세포를 세포 챔버에 안착한 후 2 mM Ca^{2+} 이 포함된 tyrode 용액(pH=7.4)으로 계속 superfusion 시켰다. 유체 압력 처리를 위해 미세관을 단일 세포 근처에 위치시킨 후(자세한 설명은 실험 방법을 참조), 약 16 dyne/cm^2 의 유체 압력을 단일 심실근세포에 자동 개폐장치를 사용하여 처리하였다(실험 방법 참조). Fig. 1은 심실근세포에 유체 압력을 가할 때 시간에 따라 변화되는 세포내 pH를 보여주고 있

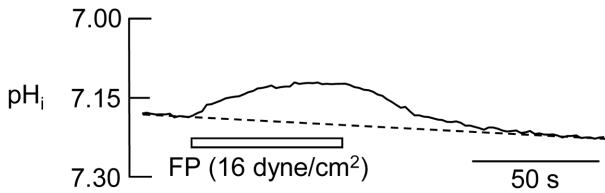


Fig. 1 – Effect of fluid pressure (FP) on intracellular pH (pH_i) in a rat ventricular myocyte. The trace shows a representative time course of pH_i change during the exposure to FP (~ 16 dyne/cm²). FP decreased pH_i reversibly. Square box under the trace indicates the period of FP exposure. FP was applied onto the single myocytes using electronically controlled microbarrel system (see *Materials and Methods*). Dashed line displays an extrapolated curve fitted to the gradual change of pH_i under control condition.

는데, 유체 압력이 세포내 H^+ 농도를 증가시킴을 잘 보여주고 있다. 여러 심실근세포에서 유체 압력을 처리한 결과 모든 세포에서 pH_i 가 가역적으로 감소하였고, 그 감소 정도는 0.07 ± 0.01 ($n=16, P<0.001$) 이었다.

세포내 H^+ 의 농도가 증가하면 증가된 H^+ 을 세포 외로 제거하는 기전이 작동될 가능성이 크다. 이러한 기전에는 세포막에 존재하는 Na^+-H^+ 교환체와 $Na^+-HCO_3^-$ 교환체가 있다.¹⁹⁾ 본 실험에서는 HCO_3^- 완충액을 사용하지 않고 대신 HEPES 완충액을 사용하였기 때문에, 이 두 기전 중 Na^+-H^+ 교환체가 작동할 것으로 예상된다.¹⁹⁾ 유체 압력에 의해 발생한 세포내 H^+ 농도 증가가 Na^+-H^+ 교환체의 활성화에 영향을 미치는지 알아보고자, Na^+-H^+ 교환체에 대한 선택적인 억제제 HOE642를 사용하여 다음 실험을 진행하였다. 유체 압력을 처리하여 심실근세포 pH_i 가 감소된 것을 관찰한 후, HOE642(10 μM)를 유체 압력이 계

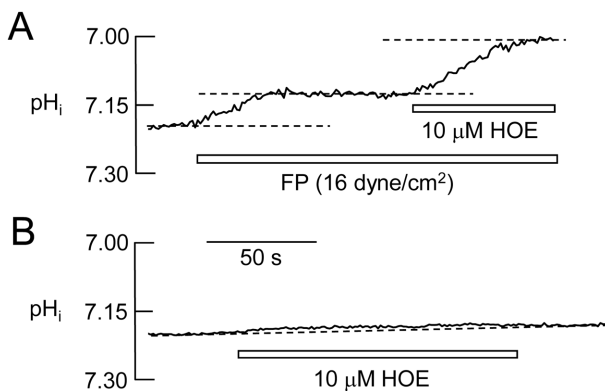


Fig. 2 – Effects of inhibition of Na^+-H^+ exchanger (NHE) on pH_i in the presence (A) and absence (B) of FP in rat ventricular myocytes. To inhibit the NHE 10 μM HOE642 (HOE) was used. Panel A and B show representative traces of pH_i in each experiment. Square boxes under the trace indicate the periods of interventions. Dashed line displays an extrapolated curve fitted to the gradual change of pH_i under control conditions.

속 존재하는 상태에서 더 처리 하였을 때, pH_i 가 보다 현저히 더 감소됨을 관찰하였다(감소량: 0.12 ± 0.01 pH units, $n=14, P<0.001$; Fig. 2A). 그러나 흥미롭게도, HOE642는 단독으로는 심실근세포 pH_i 에 현저한 영향이 없었다(Fig. 2B). HOE642는 Na^+-H^+ 교환체를 억제하여 H^+ 이 세포 밖으로 제거되지 못하도록 할 것으로 예상되며, 이 때 H^+ 농도는 증가될 것이다. 이 실험 결과는 평소 아무런 자극이 주어지지 않은 상태에서는 Na^+-H^+ 교환체의 활성이 매우 낮기 때문에, 이 단백질을 억제하여도 현저한 차이가 없음을 알 수 있다. 반면, 유체 압력 하에서는 세포내에 누적된 많은 양의 H^+ 이 이 단백질의 활성을 증가시켜 세포내 pH_i 의 과도한 증가를 방지해 줄 것으로 생각된다. 따라서 유체 압력 하에서는 HOE642에 의해 Na^+-H^+ 교환체가 억제되면, 더욱 더 pH_i 가 감소될 것이다.

이러한 가설을 검증하기 위해, 다음 실험에서는 Na^+-H^+ 교환체를 먼저 억제한 후 유체 압력에 의한 pH_i 변화를 고찰하였다. HOE642를 처리하였을 때 위에서 관찰한 바와 같이 pH_i 에는 현저한 변화가 없었다. HOE642를 약 8분간 처리한 후, 동일한 강

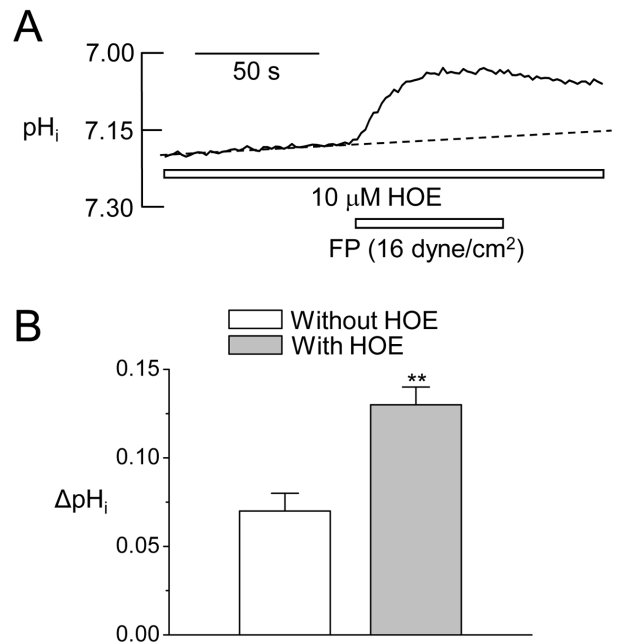


Fig. 3 – Higher effects of FP on pH_i in HOE-pretreated rat ventricular myocytes. Panel A shows intracellular acidosis induced by FP in an HOE (10 μM) pre-incubated cell. Square boxes under the trace indicate the periods of interventions. Dashed line displays an extrapolated curve fitted to the gradual decrease of pH_i under control condition. Panel B illustrates mean changes in pH_i during FP (~ 16 dyne/cm²) in cells with ($n=6$) and without (control conditions; $n=16$) pre-incubation with HOE. HOE did not change pH_i by itself, but FP-induced acidosis was significantly larger in the presence of HOE than in the absence of HOE. HOE (10 μM) was applied for 7–8 min before the application of FP. ****** $P<0.01$ vs. 'Without HOE'.

도의 유체압력을 가하였을 때 측정된 pH의 변화(0.13 ± 0.01 pH units, $n=6$)가 HOE642를 전처리하지 않은 세포에서 보다 약 2 배 더 크게 나타났다($P < 0.01$; Fig. 3). 이 결과는 유체 압력 시 증가된 세포내 H^+ 들이 Na^+-H^+ 교환체에 의해 세포 외부로 제거되었을 가능성을 보여주고 있다.

결 론

본 연구에서는 분리한 흰쥐 심실근세포에서 유체 압력이 pH를 감소시킴을 보여주었다. 이러한 세포내의 산증은 이전에 보고된 유체 압력에 의한 L형 Ca^{2+} 통로 불활성화의 가속화를 설명할 수 있는 한 기전이며, 이에 대한 자세한 연구가 앞으로 필요할 것이다. 본 연구 결과는 또한 유체압력에 의해 심실근세포 Na^+-H^+ 교환체의 활성이 증가할 가능성을 보여주고 있다. 본 실험 결과들로 미루어, 이러한 Na^+-H^+ 교환체의 활성은 유체 압력에 의해 증가된 H^+ 들을 세포 밖으로 제거하는 역할을 할 것으로 사료된다.

감사의 말씀

이 연구는 한국 교육과학기술부 한국연구재단 연구비(2011-0002146, 2011-0015637, 2009-0093815)에 의해 지원되었음.

참고문헌

- 1) Kurachi, Y. : The effects of intracellular protons on electrical activity of single ventricular cells. *Pflügers Arch.* **394**, 264 (1982).
- 2) Kaibara, M. and Kameyama, M. : Inhibition of the calcium channel by intracellular protons in single ventricular myocytes of the guinea-pig. *J. Physiol.* **403**, 621 (1988).
- 3) Karmazyn, M., Gan, X. T., Humphreys, R. A., Yoshida, H. and Kusumoto, K. : The myocardial Na^+-H^+ exchange. Structure, regulation, and its role in heart disease. *Circ. Res.* **85**, 777 (1999).
- 4) Yamazaki, T., Komuro, I., Kudoh, S., Zou, Y., Nagai, R., Aikawa, R., Uozumi, H. and Yazaki, Y. : Role of ion channels and exchangers in mechanical stretch-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Circ. Res.* **82**, 430 (1998).
- 5) Cingolani, H. E., Perez, N. G., Pieske, B., von Lewinski, D. and Camilion de Hurtado, M. C. : Stretch-elicited Na^+/H^+ exchanger activation: the autocrine/paracrine loop and its mechanical counterpart. *Cardiovasc. Res.* **57**, 953 (2003).
- 6) Scholz, W., Albus, U., Counillon, L., Gogelein, H., Lang, H. J., Linz, W., Weichert, A. and Scholkens, B. A. : Protective effects of Hoe 642, a selective sodium-hydrogen exchange subtype 1 inhibitor, on cardiac ischemia and reperfusion. *Cardiovasc. Res.* **29**, 260 (1996).
- 7) Xue, Y. X., Aye, N. N. and Hashimoto, K. : Antiarrhythmic effects of Hoe 642, a novel Na^+/H^+ -exchange inhibitor on ventricular arrhythmias in animal hearts. *Eur. J. Pharmacol.* **317**, 309 (1996).
- 8) Lakatta, E. G. : Cardiovascular regulatory mechanisms in advanced age. *Physiol. Rev.* **73**, 413 (1993).
- 9) Lab, M. J. : Mechanoelectric feedback (transduction) in heart: concepts and implications. *Cardiovasc. Res.* **32**, 3 (1996).
- 10) Lerman, B. B., Burkhoff, D., Yue, D. T., Franz, M. R. and Sagawa, K. : Mechanoelectric feedback: independent role of preload and contractility in modulation of canine ventricular excitability. *J. Clin. Invest.* **76**, 1843 (1985).
- 11) Levine, J. H., Guarnieri, T., Kadish, A. H., White, R. I., Calkins, H. and Kan, J. S. : Changes in myocardial repolarization in patients undergoing balloon valvuloplasty for congenital pulmonary stenosis: evidence for contraction-excitation feedback in humans. *Circulation* **77**, 70 (1988).
- 12) Franz, M. R., Burkhoff, D., Yue, D. T. and Sagawa, K. : Mechanically induced action potential changes and arrhythmia in isolated and *in situ* canine hearts. *Cardiovasc. Res.* **23**, 213 (1989).
- 13) Nazir, S. A. and Lab, M. J. : Mechanoelectric feedback and atrial arrhythmias. *Cardiovasc. Res.* **32**, 52 (1996).
- 14) Conwell, J., Cocalis, M. and Erickson, L. : EAT to the beat: 'ectopic' atrial tachycardia caused by catheter whip. *Lancet* **342**, 740 (1993).
- 15) Woo, S. H., Risius, T. and Morad, M. : Modulation of local Ca^{2+} release sites by rapid fluid puffing in rat atrial myocytes. *Cell Calcium* **41**, 397 (2007).
- 16) Lee, S., Kim, J. C., Li, Y., Son, M. J. and Woo, S. H. : Fluid pressure modulates L-type Ca^{2+} channel via enhancement of Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release in rat ventricular myocytes. *Am. J. Physiol.* **294**, C966 (2008).
- 17) Olsen, S.-P., Clapham, D. E. and Davies, P. F. : Haemodynamic shear stress activates a K^+ current in vascular endothelial cells. *Nature* **331**, 168 (1988).
- 18) Ch'en F. F. T., Dilworth, E., Swietach, P., Goddard, R. S. and Vaughan-Jones, R. D. : Temperature dependence of Na^+-H^+ exchange, $Na^+-HCO_3^-$ co-transport, intracellular buffering and intracellular pH in guinea-pig ventricular myocytes. *J. Physiol.* **522**, 715 (2003).
- 19) Pedersen, S. F., O'Donnell, M. E., Anderson, S. E. and Cala, P. M. : Physiology and pathophysiology of Na^+/H^+ exchange and $Na^+-K^+-Cl^-$ cotransport in the heart, brain, and blood. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **291**, R1 (2006).