

세포 내 pH 변화가 임신 쥐 자궁
평활근의 수축력 및 이온 전류의
활성에 미치는 효과

연세대학교 대학원

의과학과

김영환

세포 내 pH 변화가 임신 쥐 자궁
평활근의 수축력 및 이온 전류의
활성에 미치는 효과

지도교수 이 영 호

이 논문을 석사학위 논문으로 제출함

2006년 12월 일

연세대학교 대학원

의과학과

김 영 환

김영환의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 _____인

심사위원 _____인

심사위원 _____인

연세대학교 대학원

2006년 12월 일

감사의 글

먼저 이 논문을 완성하기까지 열정을 가지고 지도하여주신 이영호 교수님과 안덕선 교수님께 감사를 드리고 또한 실험내용에 대한 조언을 해주신 김영태 교수님과 정승수 교수님께 감사드립니다.

항상 따뜻한 관심과 애정으로 지켜봐 주신 생리학 교실 선생님들께 감사드립니다. 항상 옆에서 실험을 도와주고 용기를 준 조영은, 최수경, 이시은 에게 고마움을 전합니다. 오늘이 있기 까지 사랑과 정성으로 키워주신 부모님과 함께 기쁨을 나누고자 합니다.

저자씀

차 례

국문요약	1
I. 서론	3
II. 재료 및 방법	7
1. 장력 및 $[Ca^{2+}]_i$ 의 동시 측정	7
2. 단일 평활근 세포의 분리	8
3. 이온전류 측정	9
III. 결과	13
1. 세포 내 pH 변화가 자궁 평활근 절편의 자 발적 수축과 $[Ca^{2+}]_i$ 에 미치는 효과	13
2. 세포 내 pH 변화가 막전압 의존성 Ca^{2+} 전 류의 활성화에 미치는 효과	16
3. 세포 내 pH 농도 변화가 막전압 의존성 K^+ 전류의 활성화에 미치는 효과	19
4. 세포 내 pH 변화가 Ca^{2+} 의존성 K^+ 통로 활성에 미치는 효과.....	22
IV. 고찰	24
V. 결론	29

참고문헌	31
영문 요약	35

그림 차례

- Fig. 1. Effects of intracellular pH change on contractility and $[Ca^{2+}]_i$ in pregnant rat myometrium. ····· 15
- Fig. 2. Changes in whole cell Ba^{2+} currents by intracellular pH change in pregnant rat myometrial cells. ····· 18
- Fig. 3. Effects of intracellular pH change on I_{dK} in pregnant rat myometrial cells. ····· 21
- Fig. 4. pH_i dependent change in Ca^{2+} -activated K^+ channel activity in pregnant rat myometrial cells. ····· 23

국문 요약

세포 내 pH 변화가 임신 쥐 자궁 평활근의 수축력 및 이온 전류의 활성화에 미치는 효과

임신 쥐의 자궁평활근에서 자발적 수축의 빈도와 크기가 세포 내 pH 변화에 의해 커다란 영향을 받는다고 보고 되었으나 pH 변화가 어떤 과정을 통해서 자궁평활근의 자발적 수축에 영향을 주는지에 대해서는 명확하지 않다. 따라서 본 연구에서는 (i) 세포 내 pH 변화가 임신 쥐 자궁평활근의 자발적 수축과 세포 내 Ca^{2+} 농도에 미치는 효과, (ii) 세포 내 pH 변화가 막전압 의존성 Ca^{2+} 통로 와 K^+ 통로 활성화 및 kinetic property에 미치는 효과, (iii) 세포 내 pH 변화가 Ca^{2+} 의존성 K^+ 통로의 활성화에 미치는 효과 등을 관찰함으로써 세포 내 pH 변화가 임신 쥐 자궁평활근의 자발적 수축에 미치는 영향과 그 기전을 규명하고자 하였다. 임신 18~20일되는 쥐에서 자궁평활근을 적출하여 longitudinal layer만을 분리하여 fura-2/AM을 축적시켜 장력과 세포 내 Ca^{2+} 을 측정하였고 longitudinal layer로부터 분리된 단일세포에서 patch clamp 방법을 통하여 이온전류들을 관찰 하였다. 평활근 절편의 자발적 수축과 $[Ca^{2+}]_i$ 는 약산인 Na-acetate를 처리하여 세포 내 H^+ 농도를 증가시킨 경우 억제되는 반면에, 약염기인 NH_4Cl 을 처리하여 세포 내 H^+ 농도를 감소시킨 경우에는 장력의 크기 및 $[Ca^{2+}]_i$ 가 증가

하는 것을 관찰할 수 있었다. 막전압 의존성 Ca^{2+} 전류의 크기가 Na-acetate 처리 시 모든 막전압 값에서 감소하는 반면에, NH_4Cl 처리 시 유의하게 증가하는 것이 관찰되었다. 이때 Ca^{2+} 전류의 전류-전압 곡선 상 최대크기를 보이는 전압의 크기나 역전전압 값이 Na-acetate 및 NH_4Cl 에 의해 변화되지 않았다. 막전압 의존성 K^+ 전류(I_{dK})의 크기는 막전압 의존성 Ca^{2+} 전류의 경우와는 달리 Na-acetate 처리 시 모든 막전압 값에서 증가하는 반면에, NH_4Cl 처리에 의해서는 감소하는 것이 관찰되었다. Ca^{2+} 의존성 K^+ 통로(BK_{Ca})의 활성화는 관류액의 pH를 낮춘 경우 감소하였다가 관류액의 pH를 높힌 경우 증가하는 것을 관찰할 수 있었다.

이상의 실험 결과로 볼 때 세포 내 H^+ 증가에 의한 자발적 수축의 소실과 세포 내 Ca^{2+} 농도의 감소는 주로 H^+ 에 의한 막전압 의존성 Ca^{2+} 통로를 억제하는 효과에 기인한다고 생각되며, 이와 같은 세포 내 낮은 pH에 의한 막전압 의존성 Ca^{2+} 전류 억제 효과는 지연 분만 시 관찰되는 자궁근 무력증의 주요 유발 기전의 하나라고 생각된다.

핵심되는 말 : 임신 쥐 자궁 평활근, 세포 내 pH, 막전압 의존성 칼슘통로, 막전압 의존성 포타슘 통로, 칼슘 의존성 포타슘 통로

세포 내 pH 변화가 임신 쥐 자궁 평활근의 수축력 및 이온 전류의 활성화에 미치는 효과

<지도교수 이 영 호>
연세대학교 대학원 의과학과
김 영 환

I. 서 론

자궁 평활근에서 자발적인 수축(spontaneous phasic contraction)이 일어나는 빈도와 수축력의 크기는 임신 주수에 따라 커다란 영향을 받는다.¹ 임신 초기 및 중기의 자궁 평활근에선 자발적인 수축이 거의 관찰되지 않지만 임신 말기가 되면서 자발적 수축의 빈도와 크기가 증가함으로써 분만이 유도된다.² 이같이 임신말기에 관찰되는 자궁평활근의 자발적인 수축은 정상적인 출산 과정에 필수적이지만 분만 과정이 오랫동안 지속되거나 (prolonged labor), 분만 유도제 등을 과다 사용한 경우 자궁무력증 (uterine atony)과 같은 치명적 산후 합병증이 유발될 수 있다.³⁻⁵ 자궁무력증의 발생 기전에 대해선 아직 명확하지는 않으나 분만유도제 등에 의해 자궁평활근의 긴장도가 과도하게 증가되면, 이에 의해 자궁 동맥을 통한 혈액 공급이 감소함으로써 자궁 평활근의 무산소성 대사(anaerobic metabolism) 및 이에 따른 세포 내 H^+ 의 축적이 자궁무력증의 유발 기전 중의 하나라고 생

각된다.^{4,6} 다만 세포 내 H^+ 의 축적이 어떤 기전을 통해 자궁평활근의 수축력에 영향을 주는가에 대해선 아직 명확하지 않다.

Taggart 등(1996)⁷은 세포 내 H^+ 변화에 따라 쥐 자궁평활근 절편의 수축력이 그에 비례해서 변화할 뿐 아니라 평활근 세포 내 Ca^{2+} 농도 역시 영향을 받음을 보고하였는데, 세포 내액의 H^+ 증가 시 자궁 평활근 절편의 자발적 수축이 소실될 뿐 아니라 안정 장력 (baseline tone)의 크기 및 세포 내 Ca^{2+} 농도 (baseline Ca^{2+} concentration; $[Ca^{2+}]_i$)가 감소하는 것을 관찰하였다. 이는 평활근 세포 내 H^+ 농도 변화에 따른 수축력의 변화 양상이 H^+ 에 의한 세포 내 Ca^{2+} 농도 변화를 통해 이루어졌음을 시사한다.

일반적으로 평활근 세포 내 Ca^{2+} 농도는 1) 세포막을 통한 Ca^{2+} 의 유입량 및 세포 내 Ca^{2+} 저장소(sarcoplasmic reticulum, SR)로부터의 Ca^{2+} 유리량, 2) 세포막의 Ca^{2+} -ATPase나 Na^+/Ca^{2+} exchange를 통한 Ca^{2+} 배출 및 SR로의 Ca^{2+} 재흡수양 사이의 차이에 의해 결정되는데, 자궁 평활근의 경우 nifedipine 등을 사용하여 세포막을 통한 Ca^{2+} 의 유입을 차단하는 경우, 자발적 수축 현상이 소실될 뿐 아니라 세포 내 Ca^{2+} 농도가 감소하는 것으로 볼 때, 세포막을 통해 유입되는 Ca^{2+} 의 양이 세포 내 Ca^{2+} 농도 및 수축력의 크기 결정에 중요한 역할을 수행함을 알 수 있다.⁸⁻¹²

자궁평활근 세포막을 통해 Ca^{2+} 이 유입되는 경로로는 주로 막전압 의존성 Ca^{2+} 통로 (voltage-dependent Ca^{2+} channel)가 사용되는데, 이

통로의 활성은 평활근 세포막 전압의 탈분극 정도에 비례하여 증가할 뿐 아니라 세포 내 이차전달자나 대사산물 (예, H^+)의 농도 등에 의해 영향을 받는다.^{10,13} 따라서 세포 내 H^+ 농도 증가 시 관찰되는 세포 내 Ca^{2+} 농도의 감소 현상이 H^+ 에 의해 Ca^{2+} 통로의 활성이 직접적으로 억제되던지, 혹은 H^+ 이 자궁 평활근 세포막전압의 과분극을 초래하여 이차적으로 Ca^{2+} 통로의 활성 저하를 초래할 가능성이 있으나 이에 대한 자세한 기전에 대해서는 아직 명확하지 않다. Shmigol 등(1995)¹⁴은 분리한 자궁 평활근 세포에서 +10mV의 test potential에 의해 유도된 Ca^{2+} 전류의 크기가 세포 내 H^+ 에 의해 감소하는 것을 보고하였지만, 어떤 기전을 통해 H^+ 이 Ca^{2+} 전류의 크기를 억제시켰는지에 대해서는 아직 보고된 바 없다. 즉 자궁 평활근에서 관찰되는 H^+ 에 의한 Ca^{2+} 전류 억제 효과가 Ca^{2+} 통로의 kinetic property에 영향을 주어서 나타난 것인지 혹은 단일 통로의 크기(single channel conductance) 감소나 Ca^{2+} 통로의 availability에 영향을 주어서 나타난 것인지에 대해서는 아직 보고된 바 없다.

한편, 평활근 세포막에는 여러 종류의 K^+ 통로가 존재하며, 이들 통로의 활성 정도에 따라 세포막 전압의 크기가 결정됨은 잘 알려져 있다.^{15,16} 특히 막전압 의존성 K^+ 전류 (delayed rectifier K^+ current)와 Ca^{2+} 의존성 K^+ 전류(Ca^{2+} -activated K^+ current)의 경우 평활근 세포막의 안정막 전압 크기 결정에 중요한 역할을 수행한다.^{17,18} 따라서 세포 내 H^+ 에 의해 이들 이온

통로의 활성이 증가하는 경우 막전압의 과분극을 초래하고, 이에 따라 Ca^{2+} 통로의 활성이 억제됨으로써 자궁 평활근 세포 내 Ca^{2+} 농도가 감소할 가능성이 있다. 세포 내 H^+ 이 이들 K^+ 통로의 활성에 미치는 효과에 대해선 측정에 사용한 장기의 종류나 측정된 K^+ 통로의 종류에 따라 매우 다양하게 보고되고 있으므로¹³ 단일 자궁 평활근 세포를 이용하여 막전압 의존성 K^+ 전류 및 Ca^{2+} 의존성 K^+ 전류의 활성에 미치는 H^+ 의 효과와 그의 작용 기전을 직접적으로 확인할 필요성이 있다.

따라서 본 연구자는 세포 내 pH 변화가 자궁 평활근의 수축력 및 세포 내 Ca^{2+} 농도에 미치는 영향과 그 기전을 규명하기 위해 적출된 자궁평활근 절편에서 (i) 세포 내 Ca^{2+} 농도 및 장력을 동시에 측정하면서 H^+ 농도의 변동이 자궁 평활근 절편의 긴장도와 세포 내 Ca^{2+} 농도에 미치는 효과를 관찰하고, (ii) 분리한 자궁평활근 세포를 이용하여 막전압 의존성 Ca^{2+} 통로와 K^+ 통로의 활성 및 kinetic property에 미치는 세포 내 H^+ 의 효과를 관찰하고, (iii) Ca^{2+} 의존성 K^+ 통로의 활성에 미치는 H^+ 의 효과와 그 작용 기전을 확인하여 자궁근무력증의 발생 기전을 밝히려고 한다.

II. 재료 및 방법

1. 장력 및 $[Ca^{2+}]_i$ 의 동시 측정

임신 18~20 일째의 쥐 (Sprague-Dawley rat) 자궁평활근을 다음과 같은 방법으로 제작하였다. 경추 탈골로 희생시킨 후 자궁을 적출하였다. 적출한 자궁을 100% O_2 로 포화시킨 정상 Tyrode 용액(mM; NaCl 135, KCl 5.4, $CaCl_2$ 2.5, $MgCl_2$ 1.2, HEPES 10, glucose 12, pH 7.4)에 담근 후 수술 현미경하에서 자궁 조직 주위의 응고된 혈액과 결체 조직을 안과용 미세가위 및 핀셋을 이용하여 조심스럽게 제거하였다. 이후 자궁 평활근의 longitudinal layer만을 분리한 후 이를 절편 형태 (길이 3~4mm, 폭 1mm)로 만들어 장력과 세포 내 Ca^{2+} 농도 측정에 사용하였다.

자궁 평활근 절편을 10 μ M fura-2/AM을 첨가한 Tyrode 용액에 담근 상태에서 3~4시간 동안 실온에서 incubation하여 fura-2/AM이 세포 내에 축적되도록 하였다. 이때 fura-2/AM의 용해도를 증가시키기 위해 cermophor EL (0.01%)을 배양액 내에 첨가하였다. 이후 실험포본을 fura-2가 없는 정상 Tyrode 용액으로 세척하여 근육 외부에 묻은 fura-2/AM을 제거하였다.

Fura-2가 축적된 자궁평활근 절편의 한쪽 끝은 strain gauge

transducer (Harvard, Holliston, MA, USA)에 고정하여 장력의 변화를 측정할 수 있도록 하였으며, 다른 한쪽 끝은 UV light가 통과할 수 있도록 측정 용기의 바닥에 고정하였다. 이후 조직 절편에 1g의 안정장력을 가한 상태에서 자발적 수축반응의 크기와 빈도가 일정해질 때까지 기다린 후 실험을 실시하였다. $[Ca^{2+}]_i$ 의 변화를 측정하기 위해 340nm와 380nm 파장의 UV light를 자궁 평활근 절편에 번갈아 조사(irradiation)한 후, 이에 의해 유발되는 emission light (fluorescence)를 computer에 기록하였다. 340nm 파장의 UV light에 의한 fluorescence와 380nm 파장의 UV light에 의해 유발된 fluorescence의 ratio (F_{340}/F_{380})를 계산하여 이를 세포 내 Ca^{2+} 농도의 변화로 간주하였다.

2. 단일 평활근 세포 분리

자궁 평활근 조직 절편을 미세가위로 잘게 잘라 길이와 폭이 1mm 정도 되는 조직 절편을 제작한 후 이를 37°C의 Ca^{2+} -free Tyrode 용액(정상 Tyrode용액에서 $CaCl_2$ 를 제거한 용액)에서 10분간 배양하여 조직 표면에 존재하는 Ca^{2+} 의 양을 최소화하였다. 이후 배양액 내에 collagenase(3mg/ml), trypsin inhibitor (0.33mg/ml), DTT(0.33mg/ml), papain(0.033mg/ml), 1% bovine serum albumin, 50uM $CaCl_2$ 를 첨가한 후

35°C에서 30분간 배양하였다. 배양이 끝난 후 조직절편이 포함된 배양액을 500 G로 1분간 원심분리하여 조직절편 및 평활근 세포가 침전되도록 한 후 상층액을 조심스럽게 제거하였다. 이후 동량의 KB 용액(mM; KCl 20, KH₂PO₄ 10, glucose 10, L-glutamic acid 70, B-hydroxybutyric acid 10, taurine 10, EGTA 0.5, albumin 1%)을 첨가하여 잘 흔들어서 세포부유액을 만든 후 다시 원심분리를 시행하였다. 이같은 과정을 2-3회 반복하여 세포부유액 내에 존재하는 collagenase 등을 제거한 후 유리 대롱을 이용하여 조직 절편을 조심스럽게 흔들어주어서 단일 평활근 세포가 자궁근 절편에서 유리되도록 하였으며, 실험에 사용하기 전까지 4°C에서 냉장보관하였다.

3. 이온전류 측정

소량의 평활근 세포 부유액을 실험 용기에 떨어트린 후 약 5-10 분 정도 기다려서 평활근 세포가 실험 용기 바닥에 부착하도록 한 후 실험을 실시하였다. 실험 용액은 중력에 의해 1ml/min의 속도로 관류되도록 하였으며, 특별한 온도 조절 없이 상온(25°C)에서 실험을 수행하였다. 실험에 사용한 microelectrode (Sutter Co. Novata, CA, USA)는 vertical puller (Narishige Co. Tokyo, Japan)를 이용하여, 전극 내액을 채웠을 때 전극 저항이 2-3 MΩ이 되도록 유리미세전극의 크기를 조절하였다.

평활근 세포막의 막전압 의존성 Ca^{2+} 전류, 막전압 의존성 K^+ 전류의 활성화에 미치는 세포 내 H^+ 의 효과는 whole cell clamp 방법, 즉 유리미세전극과 세포막 사이에 giga ohm seal을 만든 후 전극 내부에 음압을 가하여 whole cell을 만든 후 확인하였다(Hamil 등, 1981).¹⁹ Patch clamp 증폭기(Axopatch 1-D, Axon Inc. USA)를 이용하여 자궁 평활근 세포의 막전압을 일정하게 고정된 상태에서 일시적인 탈분극 자극을 세포에 가하여 얻은 막전류의 변화를 analog to digital converter(digidata 1200, Axon Inc. USA)를 이용해서 computer hard disk에 기록하였다. 이때 얻은 전류를 8 pole Bessel filter(1K Hz)를 이용하여 여과한 후 5 KHz의 빈도로 digitization하여 signal의 변형을 최소화하였다. 세포 내 H^+ 농도의 변화가 이온 전류의 활성화에 미치는 효과는 약산인 Na-acetate나 약염기인 NH_4Cl 를 첨가한 용액으로 세포를 관류하면서, 이들 약산 및 약염기에 의한 이온 전류 크기 변화를 측정함으로써 확인하였다. 각각의 경우에 따른 막전압 고정 방법은 그림 설명에 따로 기술하였다.

막전압 의존성 Ca^{2+} 전류 측정 시 K^+ 전류를 차단하기 위해 관류액의 KCl 대신에 5mM tetraethylammonium chloride를 사용하였고, CaCl_2 를 BaCl_2 (5mM)로 치환한 Tyrode 용액을 사용하였다. 전극 내액으로는 다음과

같은 조성의 용액을 사용하였다(mM; Cs aspartate 100, CsCl 30, MgSO₄ 5.7, Na₂ATP 5, Na₂GTP 1, BAPTA 10, HEPES 10, pH=7.2 with CsOH). 막전압 의존성 K⁺ 전류를 측정하는 경우에는 관류액으로 정상 Tyrode 용액에서 CaCl₂를 MnCl₂로 치환한 용액을 사용하였으며, 전극 내액으로는 다음과 같은 조성의 용액을 사용하였다(mM; K gluconate 100, KCl 30, MgSO₄ 5.7, K₂ATP 5, Na₂GTP 1, BAPTA 10, HEPES 10, pH=7.2 with Tris). 세포 내액의 pH를 변화시키기 위해 20mM Na-acetate 혹은 20mM NH₄Cl를 관류액에 첨가하였는데, 이때 관류액의 삼투압의 변화를 막기 위해 관류액에서 동량의 NaCl을 제거하였다.

Ca²⁺-activated K⁺ 통로(BK_{Ca})의 활성화에 미치는 세포 내 H⁺의 효과는 inside-out patch clamp 방법을 이용하여 확인하였다. 즉 유리미세전극과 세포막 사이에 giga ohm seal을 만든 후 미세전극을 위로 당겨서 세포막의 일부 (patch)를 세포에서 분리하였다. 이후 유리미세전극 내 전압을 일정하게 유지한 상태에서 관류액의 pH 값을 7.4에서 7.0 및 7.8로 각각 바꾸어 주면서 BK_{Ca} 통로의 활성화 변화를 기록하였다. 전극 내액의 조성은 140mM KCl, 1mM MgCl₂, 10mM HEPES, pH=7.4인 용액을 사용하였고, 관류액으로는 140mM KCl, 1mM MgCl₂, 10mM HEPES, 5mM EGTA의 조성에 pH

값을 각각 7.0, 7.4, 7.8인 용액을 만들어서 사용하였다. 이때 pH 변동에도 불구하고 용액 내 유리 Ca^{2+} 농도를 일정하게 (pCa 6.5) 유지하기 위해 적절한 양의 CaCl_2 를 컴퓨터 프로그램(WinMax 3.2)을 이용하여 구한 후 첨가하였다.

III. 결 과

1. 세포 내 pH 변화가 자궁 평활근 절편의 자발적 수축과 $[Ca^{2+}]_i$ 에 미치는 효과

분만 과정에서 관찰되는 모체 혈액의 산증 (maternal acidosis)이 자궁 평활근의 수축력에 미치는 효과를 확인하기 위해 자궁근 절편의 자발적 수축과 $[Ca^{2+}]_i$ 에 대한 세포 내 H^+ 의 효과를 관찰하였다. 임신 18~20일째 쥐에서 얻은 자궁 평활근 절편에 1g의 안정장력을 가한 경우 자발적인 수축 현상과 이에 동반하는 $[Ca^{2+}]_i$ 의 주기적 변화를 관찰할 수 있었다. 세포 외액의 pH는 일정하게 유지한 상태에서 세포 내액의 H^+ 농도만을 증가시키기 위해 20mM Na-acetate를 첨가한 Tyrode 용액으로 관류시킨 경우, 평활근 절편의 자발적인 수축이 소실되었으며, 안정시 세포 내 Ca^{2+} 농도 (baseline Ca^{2+} concentration)도 정상에 비해 감소하였다(n=10). 반면에 20mM NH_4Cl 을 첨가한 Tyrode 용액으로 평활근 절편을 관류하여 세포 내액의 H^+ 농도를 감소시킨 경우 Na-acetate 용액으로 관류한 경우와는 달리 평활근 절편의 주기적이며 일시적 수축 현상(phasic contraction)이 긴장성 수축 (tonic contraction)으로 변화하였으며, 안정 시 세포 내 Ca^{2+} 농도 역시 정상에 비해 유의하게 증가한 것을 관찰할 수 있었다(n=10). 평활근 절편의 자발적

수축과의 변화 현상은 정상 Tyrode 용액으로 재관류시 대조군 상태로 회복
되는 것을 관찰할 수 있었다 (Fig. 1).

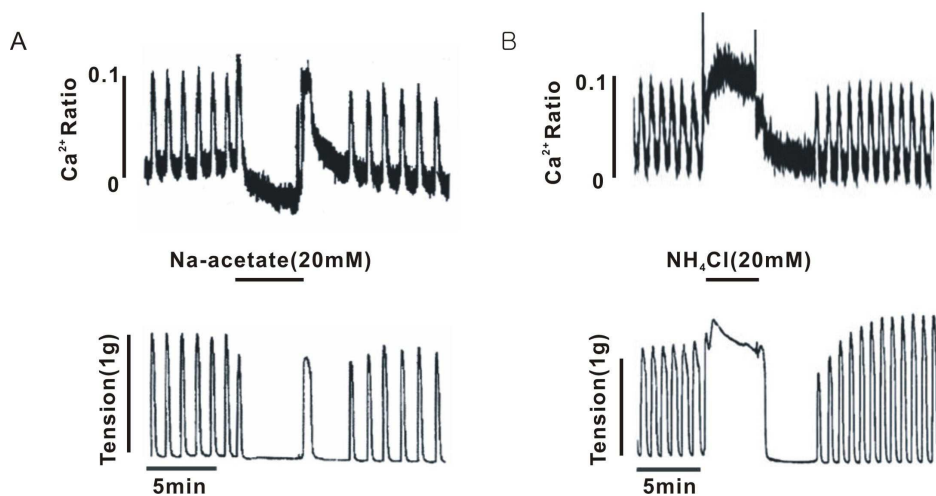


Fig. 1. Effects of intracellular pH change on contractility and $[Ca^{2+}]_i$ in pregnant rat myometrium. A. Application of 20mM Na-acetate-containing Tyrode solution decreased baseline Ca^{2+} concentration and inhibited spontaneous contraction. B. Application of 20mM NH_4Cl -containing Tyrode solution induced a tonic contraction and increased baseline Ca^{2+} concentration reversibly. Force and $[Ca^{2+}]_i$ were recorded simultaneously. Fluorescence ratio(F_{340}/F_{380}) is indicative of intracellular $[Ca^{2+}]_i$.

2. 세포 내 pH 변화가 막전압 의존성 Ca^{2+} 전류의 활성화에 미치는 효과

세포 내 pH 변동에 따른 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 농도 변화가 세포막을 통한 Ca^{2+} 유입량의 변화를 통해 일어났는지를 확인하기 위해 막전압 의존성 Ca^{2+} 전류의 활성화에 미치는 세포 내 pH의 효과를 관찰하였다. 자궁 평활근 세포의 세포의 막전압을 -80mV 로 고정한 상태에서 0mV 의 test pulse를 매 10초 간격으로 가하면서 얻은 내향 전류를 대조군으로 삼았다. 이후 관류액을 20mM Na-acetate가 포함된 Tyrode 용액으로 대체한 경우 내향 전류의 크기가 대조군에 비해 현저히 감소하였으며(% decrease of I_{Ba} ; $47.81 \pm 10.44\%$ of control, $n=6$, $p<0.01$), 정상 Tyrode 용액으로 재관류시 감소하였던 내향전류의 크기가 다시 대조군 상태로 돌아오는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 2A). 이때 관류액에 Ca^{2+} 통로 차단제로 알려진 nifedipine ($3\mu\text{M}$)을 첨가하는 경우 내향전류가 소실되는 것으로 보아 본 실험 조건에서 기록된 내향전류는 막전압 의존성 Ca^{2+} 전류임을 확인할 수 있었다. Ca^{2+} 전류의 막전압 의존성질에 세포 내 pH 변화가 영향을 끼치는지를 확인하기 위해 Ca^{2+} 전류의 전류-전압 곡선에 Na-acetate가 미치는 효과를 관찰하였다. Test pulse의 크기를 -50mV 에서 $+60\text{mV}$ 까지 10mV 간격으로 변화시켜 가면서 각각의 test pulse에 의해 유발되는 내향성 전류를 기록하여 Ca^{2+} 전류의

전류-전압곡선을 작성하였다. 이후 관류액을 Na-acetate가 첨가된 Tyrode 용액으로 바꾼 상태에서 동일한 방법으로 내향성 전류를 얻은 후 이를 전류-전압 곡선 상에 표시하였다. Na-acetate가 첨가된 Tyrode 용액으로 관류 시 측정에 사용한 모든 막전압 값에서 Ca^{2+} 전류의 크기가 감소한 것을 관찰할 수 있었으며, Ca^{2+} 전류의 크기가 최대로 되는 전압값이나 Ca^{2+} 전류의 역전전압 값은 유의하게 변화하지 않았다(Fig. 2B).

관류액을 20mM NH_4Cl 이 포함된 Tyrode 용액으로 대체하여 평활근 세포 내 pH를 증가시킨 경우 Na-acetate 용액을 관류시킨 경우와는 달리 Ca^{2+} 전류의 크기가 대조군에 비해 현저히 증가하였으며(% increase of I_{Ba} ; $39.69 \pm 7.8\%$ of control, $n=6$, $p<0.01$), 이같은 효과는 측정에 사용한 모든 막전압 값에서 유사하게 관찰되었다 (Fig. 2C 및 D).

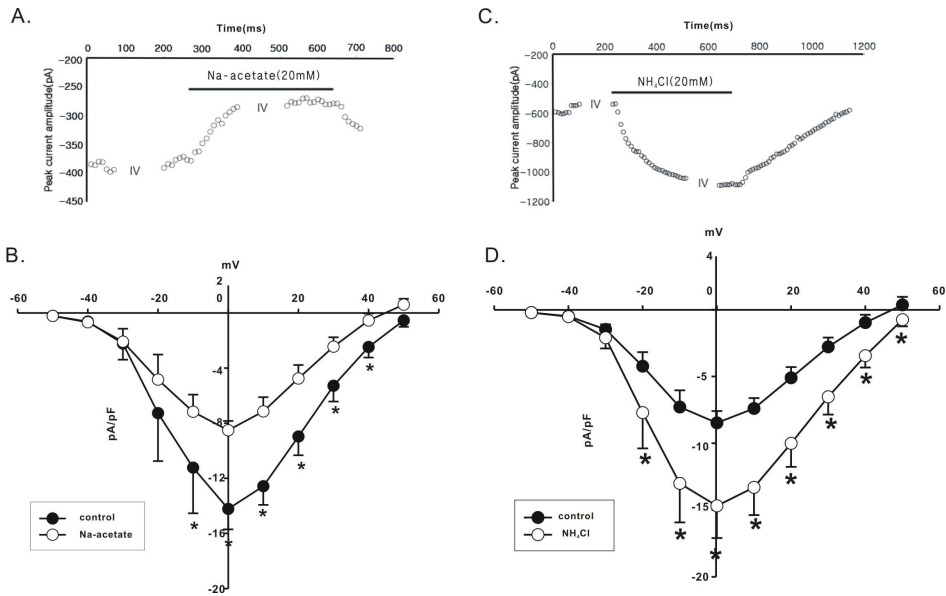


Fig. 2. Changes in whole cell Ba^{2+} currents by intracellular pH change in pregnant rat myometrial cells. A. Time course of typical changes in I_{Ba} elicited by test pulses to 0 mV from a holding potential of -80 mV on Na-acetate exposure. Horizontal bar indicates the time of perfusion of 20mM Na-acetate-containing Tyrode solution. B. Effect of Na-acetate on current-voltage relations of I_{Ba} . Summary of voltage dependence of I_{Ba} for control (○) and 20mM Na-acetate (●). At each voltage steps, peak values of current were determined and averaged (n=8). C. Time course of typical changes in I_{Ba} by perfusion of 20mM NH_4Cl -containing Tyrode solution. D. Effect of NH_4Cl on current-voltage relations of I_{Ba} . Summary of voltage dependence of I_{Ba} for control (○) and 20mM NH_4Cl (●). At each voltage steps, peak values of current were determined and averaged (n=8). *represents statistically significant (p<0.01).

3. 세포 내 pH 변화가 막전압 의존성 K^+ 전류의 활성화에 미치는 효과

평활근 세포막에 존재하는 여러 종류의 K^+ 통로 중에서 막전압 의존성 K^+ 전류만을 선택적으로 기록하기 위해 관류액의 $CaCl_2$ 를 $MnCl_2$ 로 대체하였고, 전극내액으로는 고농도 BAPTA(10mM)와 ATP(5mM)를 첨가한 용액을 사용하여 Ca^{2+} 의존성 K^+ 전류(I_{K-Ca})나 ATP 민감성 K^+ 전류가 발생하는 것을 최소화하였다. 이를 확인하기 위해 I_{K-Ca} 전류의 선택적 차단제인 iberiotoxin(100 nM)을 처리한 경우, 탈분극 자극에 의해 유발되는 외향성 전류의 크기에 영향이 없었다. 따라서 본 실험조건에서 측정된 외향성 K^+ 전류는 주로 막전압 의존성 K^+ 전류(delayed rectifier K current; I_{dk})임을 확인할 수 있었다.

이와 같은 실험조건에서 기록된 I_{dk} 전류의 활성화에 세포 내 pH 변화가 미치는 효과를 확인하기 위해 관류액에 20mM의 Na-acetate 혹은 NH_4Cl 를 첨가한 상태에서 I_{dk} 전류의 활성화 변화를 기록하였다. 막전압을 -80mV로 고정된 상태에서 +20mV의 탈분극 자극을 매 10초 간격으로 가하여 얻은 전류의 크기를 대조군으로 삼은 후, 관류액을 20mM Na-acetate를 첨가한 Tyrode 용액으로 치환한 경우 K^+ 전류의 크기가 증가하는 것을 관찰할 수 있었으며, 정상 Tyrode 용액으로 재관류 시 증가하였던 K^+ 전류의 크기가

대조군 상태로 돌아오는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 3A). Fig. 3B는 탈분극 자극의 크기를 -50mV 에서 $+65\text{mV}$ 까지 10mV 간격으로 변화시켜가면서 얻은 I_{dK} 의 전류-전압 관계 (current-voltage relation)에 미치는 Na-acetate의 효과를 보여주고 있다. 20mM Na-acetate를 첨가한 Tyrode 용액으로 세포를 관류시킨 경우 측정에 사용한 모든 막전압 범위에서 K^+ 전류의 크기가 유의하게 증가한 것을 관찰할 수 있다.

관류액을 20mM NH_4Cl 이 포함된 Tyrode 용액으로 대체하여 평활근 세포 내 pH를 증가시킨 경우, Na-acetate가 첨가된 Tyrode 용액으로 관류시킨 경우와는 달리 K^+ 전류의 크기가 대조군에 비해 현저히 감소하였으며 (Fig. 3C), 이같은 효과는 측정에 사용한 모든 막전압 값에서 유사하게 관찰되었다 (Fig. 3D).

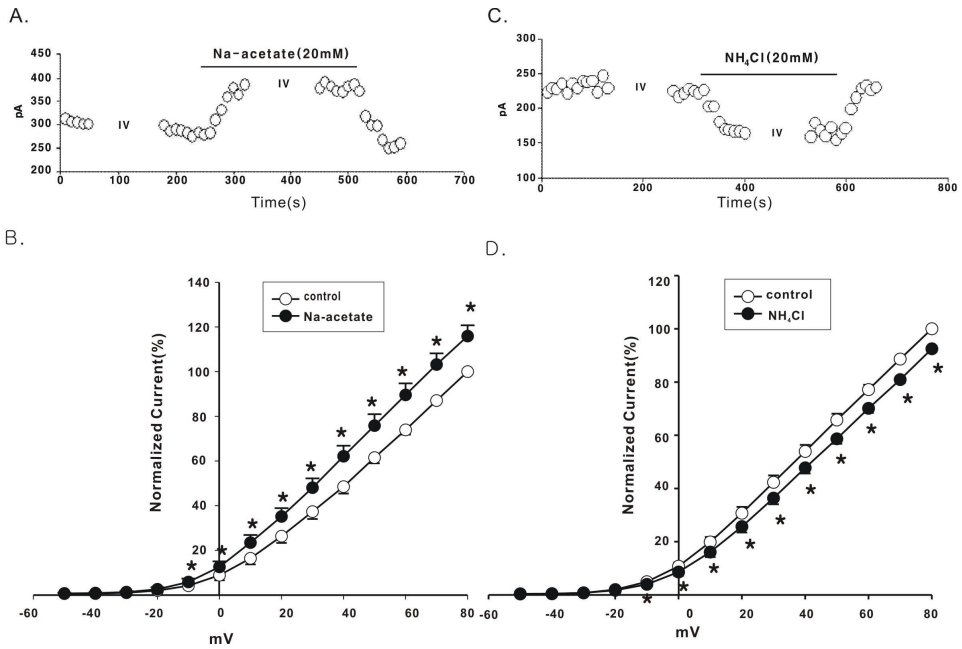


Fig. 3. Effects of intracellular pH change on I_{dK} in pregnant rat myometrial cells. Time course of typical changes in I_{dK} elicited by test pulses to 20 mV from a holding potential of -80 mV on Na-acetate (A) or NH_4Cl (C) exposure. Horizontal bar indicates the time of perfusion of 20mM Na-acetate or NH_4Cl -containing Tyrode solution. B. Effect of Na-acetate on current-voltage relations of I_{dK} . Summary of voltage dependence of I_{dK} for control(\circ), and 20mM Na-acetate (\bullet). At each voltage steps, peak values of current were determined and averaged ($n=7$). D: Effect of NH_4Cl on current-voltage relations of I_{dK} . Summary of voltage dependence of I_{dK} for control(\circ) and 20mM NH_4Cl (\bullet). *represents stastically significant($p<0.01$).

4. 세포 내 pH 변화가 Ca^{2+} 의존성 K^+ 통로 활성화에 미치는 효과

세포 내 pH 변동이 Ca^{2+} 의존성 K^+ 통로(BK_{Ca})의 활성화에 미치는 효과를 확인하기 위해 inside out patch를 만든 상태에서 실험을 실시하였다. 이때 관류액의 Ca^{2+} 농도와 막전압이 BK_{Ca} 통로의 활성화에 미치는 영향을 배제하기 위해 막전압을 +20mV로, 관류액 내 유리 Ca^{2+} 농도를 5×10^{-6} M (pCa 6.5)로 일정하게 유지한 상태에서 실험을 실시하였다. Fig. 4에서 나타난 바와 같이 관류액의 pH 값을 7.4에서 7.0으로 감소시킨 경우, 그에 비례해서 BK_{Ca} 통로의 활성이 유의하게 감소하는 것을 확인할 수 있었으며 (% NPo change: $n=5$, $p<0.05$), 정상 용액 (pH 7.4)으로 재관류시 감소하였던 BK_{Ca} 통로의 활성이 회복되는 것을 관찰할 수 있었다. 이후 관류액의 pH 값을 증가시킨 경우 (pH 7.8), 그에 비례해서 BK_{Ca} 통로의 활성이 유의하게 증가하는 것을 확인할 수 있었다 (% NPo change: $n=5$, $p < 0.05$). 이같은 세포 내 pH 변동이 BK_{Ca} 통로의 single channel conductance 값에는 유의한 효과를 보이지 않았다 (235.7pS in control; 236.8pS in pH 7.0; 231.2pS in pH 7.8, $n=5$)

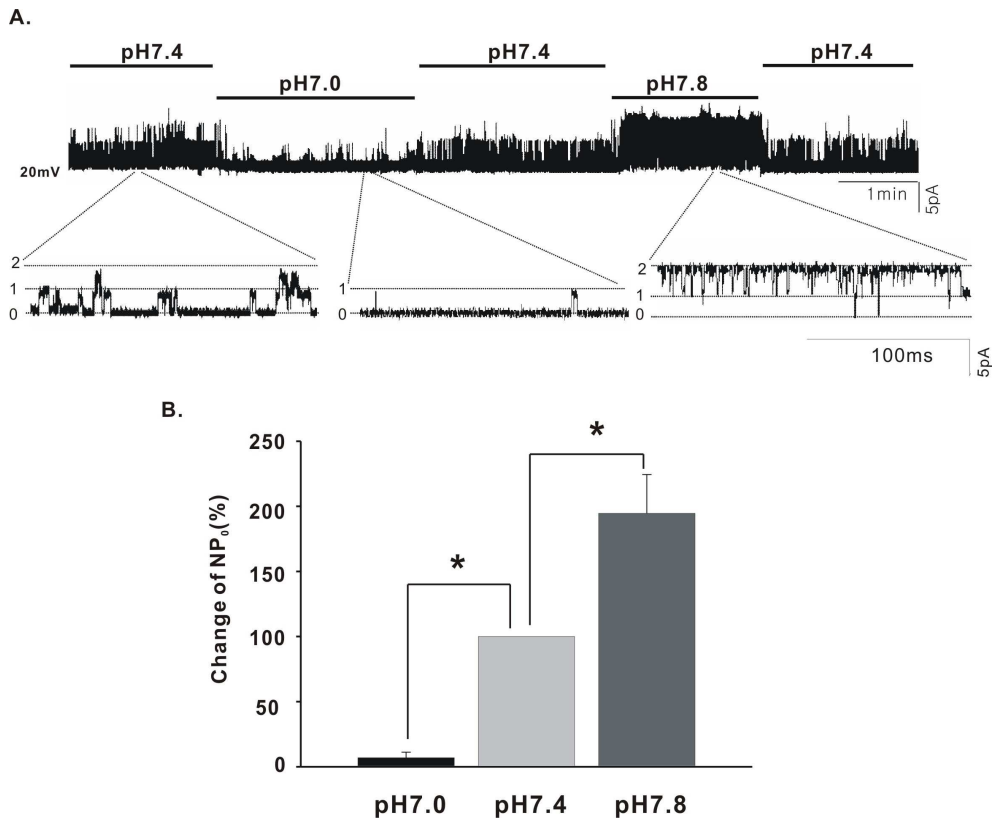


Fig. 4. pH_i dependent change in Ca^{2+} -activated K^+ channel activity in pregnant rat myometrial cells. A. After making an inside-out patch, the membrane potential was clamp to +20mV. pH of perfusing solution was changed from 7.4 to 7.0 or 7.8 as indicated in the figure and the resulting change in K^+ channel activity was recorded. B. Summarized result of pH_i -dependent changes in K^+ channel activity, which was expressed as a percentile of control (pH 7.4). *represents stastically significant($\text{p}<0.05$).

IV. 고찰

자궁 평활근 세포의 $[Ca^{2+}]_i$ 농도 및 막전압 의존성 이온 전류의 활성화에 미치는 세포 내 H^+ 의 효과를 조사한 본 실험을 통해 얻은 주요한 결과는 다음과 같다. 즉 1) 평활근 절편의 자발적 수축과 $[Ca^{2+}]_i$ 농도는 약산인 Na-acetate를 처리하여 세포 내 H^+ 농도를 증가시킨 경우 억제되는 반면에 약염기인 NH_4Cl 을 처리하여 세포 내 H^+ 농도를 감소시킨 경우에는 증가하는 것을 관찰할 수 있었다. 2) 막전압 의존성 Ca^{2+} 전류의 크기가 Na-acetate 처리 시 모든 막전압 값에서 감소하는 반면에 NH_4Cl 처리 시 유의하게 증가하는 것이 관찰되었다. 이때 Ca^{2+} 전류의 전류-전압 곡선 상 최대크기를 보이는 전압의 크기나 역전전압 값이 Na-acetate 및 NH_4Cl 처리에 의해 변화하지 않았다. 3) 막전압 의존성 K^+ 전류(I_{dK})의 크기는 Ca^{2+} 전류의 경우와는 달리 Na-acetate 처리 시 모든 막전압 값에서 증가하는 반면에 NH_4Cl 처리에 의해서는 감소하는 것이 관찰되었다. 4) Ca^{2+} 의존성 K^+ 통로(BK_{Ca})의 활성화는 관류액의 pH를 낮춘 경우 감소하였다가 관류액의 pH를 높힌 경우 증가하는 것을 관찰할 수 있었다. 이와 같은 결과는 세포 내 산증 시 관찰되는 자궁평활근의 수축력 저하와 세포 내 $[Ca^{2+}]$ 농도 감소 현상에 세포 내 H^+ 에 의한 이온 통로의 활성화 변화, 특히 막전압 의존성

Ca^{2+} 통로의 활성 변화가 주로 관여함을 알 수 있다.

세포 내외의 pH 변동에 의해 막전압 의존성 Ca^{2+} 통로의 활성이 영향을 받음은 여러 연구자들에 의해 이미 보고된 바 있다. 즉 Klockner 및 Isenberg (1994)²⁰는 세포 외 pH를 감소시킨 경우 Ca^{2+} 통로의 막전압 의존 성질이 감소하고, Ca^{2+} 통로의 전도도가 감소함으로써 Ca^{2+} 전류의 크기가 감소한다고 보고하였다. 이같은 세포 외 H^+ 의 효과와는 달리 세포 내 H^+ 을 변화시킨 경우에는 막전압 의존성질의 변화 없이 Ca^{2+} 통로의 availability를 변화시켜 Ca^{2+} 전류의 활성을 조절한다고 보고하였다.^{20,21} 본 실험에서도 Na-acetate를 관류하여 세포 내 pH를 감소시킨 경우, Ca^{2+} 전류의 전류-전압 곡선에서 최대 크기를 나타내는 막전압이나 역전전압의 크기에 변화없이 Ca^{2+} 전류의 크기가 감소하는 것으로 볼 때 자궁 평활근 세포의 경우, 다른 평활근 세포와 유사하게 세포 내 H^+ 이온에 의해 Ca^{2+} 통로의 availability가 감소하여 Ca^{2+} 전류의 크기가 작아짐을 의미한다.

다만 본 실험에서는 세포 내액의 pH를 직접 낮춰준 상태에서 Ca^{2+} 전류를 기록한 것이 아니라 Na-acetate와 같은 약산을 관류시킨 상태에서 Ca^{2+} 전류의 크기를 기록하였다. 따라서 세포 내 pH 변화에 의한 효과가 아니라 Na-acetate에 의한 side effect로 Ca^{2+} 전류의 크기가 감소하였을 가능성이

있다. 그런데 20mM Na-acetate나 Na-butyrate와 같은 약산을 관류할 경우 세포 내액의 pH가 0.15 unit 정도 감소한다는 보고²²와 NH₄Cl과 같은 약염기를 관류시켰을 때 Na-acetate와 같은 약산을 관류시켰을 때와는 반대로 Ca²⁺ 전류의 크기가 증가한다는 본 실험의 결과(Fig. 2B)로 볼 때 Na-acetate에 의한 Ca²⁺ 전류 감소 효과는 세포 내 pH 감소에 의한 것임을 알 수 있다.

한편 막전압 의존성 Ca²⁺ 통로의 활성화는 기본적으로 평활근 세포막 전압의 탈분극 정도에 비례하고, 평활근 세포막 전압의 크기는 K⁺ 통로의 활성화 정도에 따라 결정됨은 잘 알려져 있다.^{10,18} 따라서 세포 내 낮은 pH에 의해 이들 K⁺ 통로의 활성이 증가하고, 이에 의해 이차적으로 Ca²⁺ 통로의 활성이 억제되었을 가능성도 배제할 수 없다. 자궁 평활근 세포막에 존재하는 여러 종류의 K⁺ 통로 중에서 막전압 의존성 K⁺ 전류 (I_{dk})와 Ca²⁺-의존성 K⁺ 전류(BK_{Ca})의 경우 평활근 세포막의 안정막 전압 및 수축력의 크기 결정에 중요한 역할을 수행하므로 세포 내 H⁺ 농도 변화가 이들 K⁺ 통로의 활성화에 미치는 효과를 확인하고자 하였다.^{16,18,23}

막전압 의존성 K⁺ 전류의 활성을 기록하기 위해 본 실험에선 전극내액에 고농도 ATP(5mM) 및 EGTA(5mM)가 첨가된 용액을 사용하였으며, 외향전류를 얻기 위해 강한 탈분극자극을 가하였다. 따라서

ATP 민감성 K^+ 전류나 내향성 K^+ 전류 등이 측정된 외향전류에 포함될 가능성은 매우 미미하며, 또한 관류액에 Ca^{2+} -의존성 K^+ 전류의 선택적 차단제로 알려진 iberiotoxin을 투여한 경우에도 외향 전류의 크기에 변화가 없는 것으로 보아 외향전류의 대부분이 막전압 의존성 K^+ 전류로 구성되어 있음을 확인할 수 있었다(unpresented result, Robertson 및 Nelson, 1994).²⁴ 이 같은 조건에서 약산인 Na-acetate를 관류시킬 경우 막전압 의존성 K^+ 전류의 크기가 측정에 사용한 모든 막전압 범위에서 유의하게 증가하는 것을 관찰할 수 있었으며, 약염기인 NH_4Cl 을 관류시킨 경우에는 막전압 의존성 K^+ 전류의 크기가 감소하는 것을 관찰할 수 있었다. 이는 관상동맥 평활근 세포막의 막전압 의존성 K^+ 전류의 활성이 세포 내 낮은 pH에 의해 증가한다는 Berger 등 (1998)²⁵의 보고와 일치하는 결과라고 생각되며, 막전압 의존성 K^+ 통로의 활성 증가는 자궁 평활근 세포막 전압의 과분극을 초래함으로써 이차적으로 Ca^{2+} 전류의 활성을 억제하였을 가능성이 있다. 한편 Shmigol 등(1995)¹⁴은 본 실험의 결과와는 달리 세포 내 pH를 변화시키더라도 자궁 평활근 세포의 외향전류의 크기에 변화가 없음을 보고하였으나 이들의 실험 조건에선 측정된 외향전류가 막전압 의존성 K^+ 전류만이 아니라 Ca^{2+} -의존성 K^+ 전류가 함께 포함되어 있어서 외향전류의 크기가 세포 내 pH에 의해 변화하지 않았을 가능성이 있다. 막전압 의존성 K^+ 통로 이외에도

Ca^{2+} -의존성 K^+ 통로 역시 평활근 세포막 전압의 크기 결정에 중요한 역할을 수행하므로,^{17,23} 세포 내 pH 변동이 Ca^{2+} -의존성 K^+ 통로(BK_{Ca})의 활성화에 미치는 효과를 확인하였다. Inside-out patch를 만든 상태에서 관류액의 pH를 7.4에서 7.0으로 변화시킨 경우 그에 비례하여 BK_{Ca} 통로의 활성화가 현저하게 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 이같은 활성화 변화는 세포 내 H^+ 에 의해 BK_{Ca} 통로의 막전압 의존성이 감소하고, Ca^{2+} 에 대한 반응성이 약화되어 나타난 결과라고 생각된다.²⁶

이와 같이 자궁 평활근 세포막 전압의 크기에 중요한 역할을 하는 막전압 의존성 K^+ 통로의 활성화는 세포 내 낮은 pH에 의해 증가하는 반면에 Ca^{2+} -의존성 K^+ 통로의 활성화는 억제되는 본 실험 결과로 볼 때, 세포 내 낮은 pH에 막전압이 과분극되고, 이에 의해 이차적으로 Ca^{2+} 통로의 활성화가 억제되는지의 여부에 대해선 불확실하다. 따라서 이에 대해선 intracellular microelectrode 등을 이용하여 직접 평활근 세포의 막전압을 측정함으로써 확인하여야 할 것으로 생각한다.

V. 결 론

임신 쥐 자궁 평활근 세포의 장력, $[Ca^{2+}]_i$, 그리고 이온 전류의 활성화에 미치는 세포내 H^+ 의 효과를 관찰한 본 실험을 통해 다음과 같은 결과를 얻을 수 있었다.

1. 평활근 절편의 자발적 수축과 $[Ca^{2+}]_i$ 농도는 약산인 Na-acetate를 처리하여 세포 내 H^+ 농도를 증가시킨 경우 억제되는 반면에 약염기인 NH_4Cl 을 처리하여 세포 내 H^+ 농도를 감소시킨 경우에는 장력의 크기 및 $[Ca^{2+}]_i$ 가 증가하는 것을 관찰할 수 있었다.

2. 막전압 의존성 Ca^{2+} 전류의 크기가 Na-acetate 처리 시 모든 막전압 값에서 감소하는 반면에 NH_4Cl 처리 시 유의하게 증가하는 것이 관찰되었다. 이때 Ca^{2+} 전류의 전류-전압 곡선 상 최대크기를 보이는 전압의 크기나 역전전압 값이 Na-acetate 및 NH_4Cl 처리에 의해 변화하지 않았다.

3. 막전압 의존성 K^+ 전류(I_{dK})의 크기는 Ca^{2+} 전류의 경우와는 달리

Na-acetate 처리 시 모든 막전압 값에서 증가하는 반면에 NH_4Cl 처리에 의해서는 감소하는 것이 관찰되었다.

4. Ca^{2+} 의존성 K^+ 통로(BK_{Ca})의 활성화는 관류액의 pH를 낮춘 경우 감소하였다가 관류액의 pH를 높힌 경우 증가하는 것을 관찰할 수 있었다.

이상의 실험 결과로 볼 때 세포 내 H^+ 증가에 의한 자발적 수축의 소실과 세포내 Ca^{2+} 농도의 감소는 주로 H^+ 에 의한 막전압 의존성 Ca^{2+} 통로를 억제하는 효과에 기인한다고 생각되며, 이와 같은 세포내 낮은 pH에 의한 막전압 의존성 Ca^{2+} 전류 억제 효과는 지연 분만 시 관찰되는 자궁근 무력증의 주요 유발 기전의 하나라고 생각된다.

참 고 문 헌

1. Bengtsson B. Factors of importance for regulation of uterine contractile activity. *Acta Obstet Gynecol Scand Suppl* 1982;108:13-16.
2. Olson DM, Mijovic JF, Sadowsky DW. Control of human parturition. *Semin Perinatol* 1995;19:52-63.
3. Earley L, Wray S. An investigation into the effects of hypoxia on uterine force produced by agonists, depolarization and arising spontaneously. *J Reprod Fertil* 1993;99:539-544.
4. Larcombe-McDouall J, Buttell N, Harrison N, Wray S. In vivo pH and metabolite changes during a single contraction in rat uterine smooth muscle. *J Physiol* 1999; 518:783-790.
5. Wray S. Hypoxia in the uterus. *NIPS* 1994;9:88-92
6. Neilson JP, Lavender T, Quenby S, Wray S. Obstructed labour. *Br Med Bull* 2003;67:191-204.
7. Taggart MJ, Burdyga T, Heaton R, Wray S. Stimulus-dependent modulation of smooth muscle intracellular calcium and force by altered intracellular pH. *Pflugers Arch.* 1996;432:803-11.
8. Coleman HA, Hart JDE, Tonta MA, Parkington HC. Changes in the mechanisms involved in uterine contractions during pregnancy in guinea-pigs. *J Physiol* 2000; 523:785-798.
9. Naderali EK, Buttell N, Taggart MJ, Bullock AJ, Eisner DA, Wray S. The role of the sarcolemmal Ca^{2+} -ATPase in the pH transients

- associated with contraction in rat smooth muscle. *J Physiol* 1997;505:329-336.
10. Nelson MT, Patlak JB, Worley JF, Standen NB. Calcium channels, potassium channels and voltage dependence of arterial smooth muscle tone. *Am J Physiol* 1990;259:C3-C18.
 11. Taggart MJ, Wray S. Contribution of sarcoplasmic reticular calcium to smooth muscle contractile activation: gestational dependence in isolated rat uterus. *J Physiol* 1998;511:133-144.
 12. Taggart MJ, Wray S. Agonist mobilization of sarcoplasmic reticular calcium in smooth muscle: functional coupling to the plasmalemmal $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger? *Cell Calcium* 1997;22:333-341.
 13. Austin C, Wray S. Interactions between Ca^{2+} and H^+ and functional consequences in vascular smooth muscle. *Circ Res* 2000;86:355-363.
 14. Shmigol AV, Smith RD, Taggart MJ, Wray S, Eisner DA. Changes of pH affect calcium currents but not outward potassium currents in rat myometrium cells. 1995;431:135-137.
 15. Miyoshi H, Urabe T, Fujiwara A. Electrophysiological properties of membrane currents in single myometrial cells isolated from pregnant rats. *Pflugers Arch* 1991;419:386-393.
 16. Nelson MT, Quayle JM. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. *Am J Physiol* 1995;268:C799-C822.

17. Anwer K, Oberti C, Perez GJ, Perezreyes N, McDougall JK, Monga M, et al. Calcium-activated K^+ channels as modulators of human myometrial contractile activity. *Am J Physiol* 1993;265:C976-C985.
18. Khan RN, Matharoo-Ball B, Arulkumaran S, Ashfor MLJ. Potassium channels in the human myometrium. *Exp Physiol* 2001;86:255-264.
19. Hamil OP, Marty A, Neher E, Sackman B, Sigworth FJ. Improved patch-clamp techniques for high resolution current recording from cells and cell-free membrane patched. *Pfluers Arch* 1981;391:85-100.
20. Klockner U, Isenberg G. Calcium channel current of vasuclar smooth muscle cells: extracellular protons modulate gating and single channel conductance. *J Gen Physiol* 1994;103:665-678.
21. Iino S, Hayashi H, Saito H, Tokuno H, Tomita T. Effects of intracellular pH on calcium currents and intracellular calcium ions in the smooth muscle of rabbit portal vein. *Exp Physiol* 1994;79:669-680.
22. Taggart MJ, Wray S. Simultaneous measurement of intracellular pH and contraction in uterine smooth muscle. *Pflugers Arch.* 1993;423:527-529.
23. Aaronson PI, Sarwar U, Gin S, Rockenbauch U, Connolly M, Tillet A, et al. A role for voltage-gated, but not Ca^{2+} -activated, K^+ channels in regulating spontaneous contractile activity in myometrium from virging and pregnant rats. *Br J Pharmacol* 2006;147:815-824.
24. Robertson BE, Nelson MT. Aminopyridin inhibition and voltage

dependent of K^+ channels in smooth muscle cells from cerebral arteries. *Am J Physiol* 1994;267:C1589-C1597.

25. Berger MG, Vandier C, Bonnet P, Jackson WF. Intracellular acidosis differentially regulates K_V channels in coronary and pulmonary vascular muscle. *Am J Physiol* 1998;275:H1351-H1359.
26. Schubert R, Krien U, Gagov H. Protons inhibit the BKCa channel of rat small artery smooth muscle cells. *J Vasc Res* 2001;38:30-38

Abstract

Effects of pH_i change on spontaneous contraction and ionic currents in pregnant rat uterine smooth muscle.

Young Hwan Kim

Department of Medical Science

The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Associate Professor Young-Ho Lee)

It is known that alteration of the intracellular pH significantly affects the frequency and amplitude of spontaneous contraction in pregnant rat uterine smooth muscle, however, the precise mechanisms did not elucidated. Therefore, this study was designed to determine the effect of intracellular pH change on spontaneous contractions of rat uterine smooth muscle and its possible cellular mechanisms. We examined the effect of intracellular pH change on pregnant rat uterine contractility using several experiments following (i) the effect of intracellular pH change on the spontaneous contraction and intracellular Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) in pregnant rat myometrium and (ii) the effect of intracellular pH change on the activity and kinetic property of voltage-dependent Ca^{2+} channels and delayed rectifier K^+ channels, and (iii) the effect of intracellular pH change on the activity of

Ca^{2+} -activated K^+ channels. Uterine smooth muscle was obtained in rats at 18~20 days of gestation. Longitudinal strips were dissected and loaded with the Ca^{2+} sensitive indicator Fura 2/AM. Patch clamp technique on isolated longitudinal single smooth muscle cell was used. The addition of sodium acetate to spontaneous contractions produced a brief abolition of spontaneous contractions, followed by decreased spontaneous contractions. However, the application of ammonium chloride caused a marked increase in the frequency and amplitude of spontaneous contractions. In some preparations, ammonium chloride caused tonic contractions. The force was associated with corresponding increase in the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ transients. Intracellular acidosis (20mM Na-acetate) decreased the magnitude of the voltage-dependent Ca^{2+} current, but the intracellular alkalosis (20mM NH_4Cl) increased the magnitude of the voltage-dependent Ca^{2+} current. Intracellular acidosis increased the delayed rectifier K^+ current but intracellular alkalosis decreased the delayed rectifier K^+ current. Activity of Ca^{2+} activated K^+ channels(BK_{Ca}) was decreased by intracellular acidosis and increased by intracellular alkalosis.

These results indicate that pH dependent change in Ca^{2+} channel and K^+ channel may be involved in the pH dependent modulation of phasic contraction.

Key words : pregnant rat uterine smooth muscle, intracellular pH,
voltage dependent Ca^{2+} channel, delayed rectifier K^+
current, Ca^{2+} -activated K^+ channel.