Myogenic tone에서 protein kinase C 및 Rho A 단백질에 의한 Ca^{2+} sensitization의 역할

연세대학교 대학원
의과학사업단
김 정 섭

Myogenic tone에 protein kinase C 및 Rho A 단백질에 의한 Ca^{2+} sensitization의 역할

지도 이 영 호 부교수

이 논문을 박사 학위논문으로 제출함

2000년 12월 일

연세대학교 대학원
의과학사업단
김 정 섭

김정섭의 박사 학위논문을 인준함

심사위원_________________________인

심사위원_________________________인

심사위원_________________________인

심사위원_________________________인

심사위원_________________________인

연세대학교 대학원

2000년 12월   일

감사의 글

본 논문을 완성함에 있어 시종 간곡하신 지도편달과 노고를 아끼지 않으신 이영호 교수님께 충심으로 감사를 드리오며 본 논문의 완성을 위해 항상 격려와 조언을 아끼지 않으시고 학구적 배려를 하여주신 조승연 교수님, 남택상 교수님, 장양수 교수님, 권성춘 교수님께 진심으로 감사드립니다. 아울러 논문이 나오기까지 끊임없이 많은 조언과 도움을 주신 황미경 선생님과 생리학교실 여러분께도 감사를 드립니다. 끝으로 한결같은 사랑으로 돌보아 주시는 부모님과 가족 모두에게도 감사의 마음을 전합니다.

저자 씀

목 차

그 림 목 차

국문요약

Myogenic tone에서 protein kinase C 및 Rho A 단백질에 의한 Ca^{2+} sensitization의 역할

Myogenic tone은 혈관내압의 변화에 따른 혈관평활근의 반응능력을 말하는 것으로 혈관내압이 증가했을 때 수축, 또는 역으로 혈관내압이 감소했을 때 혈관이 이완되는 것이다. 그러나 혈관내압의 변화에 따른 혈관 근육의 반응기전은 아직까지 밝혀져 있지 않다. 본 연구에서는 rabbit basilar artery에서 myogenic tone의 형성에 PKC 및 Rho A 단백질에 의한 Ca^{2+} sensitization의 역할을 규명하고자 Fura-2 Ca^{2+} signal, 장력의 변화, PKC의 immunoblot, PKC 및 Rho A 단백질의 translocation 및 20KDa myosin light chain (MLC_{20}) 인산화의 변화를 측정해본 결과 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. Ca^{2+}이 존재하는 실험조건에서 rabbit basilar artery를 stretch 시켰을 때 세포내 Ca^{2+} 농도의 증가와 함께 장력이 증가되어 myogenic tone이 유발되었으나, 세포외액의 Ca^{2+}이 제거된 상태에서는 세포내 Ca^{2+} 농도와 장력은 변화되지 않았다.

2. Stretch에 의한 세포내 Ca^{2+} 농도와 장력의 증가는 voltage-dependent Ca^{2+} channel 차단제인 nifedipine에 의해 억제되었으나 stretch-activated cation channel 차단제인 gadolinium에 의해서는 억제되지 않았다.

3. PKC 억제제인 H-7이나 calphostin C는 stretch에 의한 세포내 Ca^{2+} 농도와 장력의 증가를 억제하였으나, 세포내 Ca^{2+} 농도보다 장력을 더욱 더 현저하게 감소시켰다. Rho-kinase 억제제인 Y-27632는 stretch에 의한 세포내 Ca^{2+} 농도의 증가에는 아무런 영향이 없었으나 장력은 현저하게 감소시켰다.

4. Isoforms-specific antibody를 사용한 immunoblotting 결과 PKCα 및 PKCε isoform은 rabbit basilar artery에 존재하였으나, PKCα가 PKCε보다 많이 존재하였다. PKCβ 및 PKCι isoform은 존재하지 않았다.

5. PKCα는 혈관 조직의 stretch에 의해 세포질에서 세포막으로 translocation 하였으나 PKCε의 경우에는 translocation이 일어나지 않았다.

6. RhoA는 stretch를 가하지 않은 혈관조직에서는 세포질에 다량 존재하였으나 stretch에 의해 세포막으로 translocation 하였다.

7. MLC_{20} 인산화를 측정한 결과 stretch는 MLC_{20} 인산화를 증가시켰으나, 이러한 증가는 PKC 억제제인 H-7과 Rho-kinase 억제제인 Y-27632에 의해 억제되었다.

이상의 실험을 종합하여 볼 때 stretch에 의한 myogenic tone은 세포내 Ca^{2+} 농도의 증가와 Ca^{2+} sensitization에 의해 유발되며, PKCα와 Rho A 단백질에 의한 MLC_{20} 인산화의 증가가 Ca^{2+} sensitization에 관여함을 알 수 있었다.

핵심되는말: Myogenic tone, 세포내 Ca^{2+} 농도, PKC, Rho A 단백질

Myogenic tone에서 protein kinase C 및 Rho A 단백질에 의한 Ca^{2+} sensitization의 역할

<지도 이 영 호 부교수>

연세대학교 대학원 의과학사업단

김 정 섭

I. 서 론

많은 조직에서 관류압 (perfusion pressure)이 변함에도 불구하고 혈류 (blood flow)는 비교적 일정하게 유지되는데, 이러한 혈류가 일정하게 유지되는 것을 혈관의 autoregulation이라 하며[1], 이는 근육성 (myogenic), 신경성 (neurogenic) 및 대사성 (metabolic) 영향의 상호작용에 의해 나타난다.[2] Autoregulation에 관여하는 myogenic response는 근육에 가해지는 기계적인 힘이나 혈관내압을 증가하였을 때 유발되는 혈관평활근의 수축, 역으로 기계적인 힘이나 혈관내압을 감소시켰을 때 유발되는 혈관평활근의 이완을 일컫는 말로서,[3] In vivo에서는 혈관내압의 증가에 의해 유발되어 지나 in vitro에서는 근육조직의 stretch에 의해 유발되어질 수 있다. 따라서 myogenic response에 의한 autoregulation은 stretch나 distension에 반응하여 혈관근육의 수축상태를 변화시킬 수 있는 평활근 세포의 능력에 의존함으로서 어떤 신경성 또는 대사성 영향에 독립적이며 단지 근육에 가해지는 기계적인 힘과 연관성이 있다.

Myogenic tone은 기초 혈관저항 (basal vascular resistance)의 형성에 매우 중요하고[4] 다른 기전에 의해 형성된 저항의 양방향 조절을 위해서도 중요하다.[5] 즉, 직경이 큰 동맥에서 혈관내압이 증가한 후 유발되는 장력은 일반적으로 혈관내경을 안정시 이하로 감소시키기에는 충분하지 못하나 미세동맥에서는 혈관내압이 증가한 후 혈관은 수축을 지속할 수가 있다. 따라서 myogenic response는 혈관평활근이 부분적으로 활성화된 상태로 유지될 때 혈관의 직경을 증가 또는 감소시킬 수 있으므로 양방향으로 혈류조절이 가능하게 한다.[6] 또한 myogenic response는 혈류와 모세혈관압 (capillary pressure)의 조절에 중요한 역할을 할 것으로 생각된다.[7]

혈관내압의 변화나 혈관벽의 stretch에 의해 유발되는 myogenic tone의 기전은 아직까지

명확하게 밝혀지지 않고 있지만, 현재까지의 연구결과를 종합하여 볼 때, 혈관내압의 증가 또는 혈관의 stretch시에 세포내 Ca^{2+} 농도가 증가하여 혈관수축을 유발한다는 것이다.[8,9,10] 이때 세포내 Ca^{2+} 농도의 증가는 1) 혈관평활근막에 존재하는 stretch activated cation channel을 통한 Ca^{2+}의 유입,[11] 2) Stretch activated channel을 통한 Ca^{2+}, Na^{+}의 유입으로 인한 세포막 전위의 탈분극이 voltage-dependent Ca^{2+} channel을 활성화시켜 Ca^{2+} 의 유입,[12] 3) Stretch가 활성화된 2차 신호전달계를 통한 세포내 Ca^{2+} 저장소로부터 Ca^{2+}의 유리[12] 등에 의해 일어나는 것으로 생각된다.

한편, 세포내 Ca^{2+} 농도의 증가이외에 다른 이차적인 기전이 myogenic tone의 유발에 관여할 것이라는 것이 보고되었다. 즉, stretch에 의해 활성화된 protein kinase C (PKC)가 Ca^{2+}에 대한 수축단백질의 감수성을 증가시켜 (Ca^{2+} sensitization) myogenic vasoconstriction을 유발한다는 것이다.[13] 그러나 많은 경우 PKC 억제제들은 기초장력에 변화를 초래하여 근육의 초기 수축상태를 변화시키기 때문에 myogenic tone의 유발에 PKC의 역할을 규명하는데 어려움이 있다.

PKC는 세포성장, 분화 및 평활근 수축과 같은 많은 세포반응의 조절에 관여하는 중요한 효소이다.[14,15] PKC family는 11개의 isoform으로 구성되어 있는데 classical PKC (α, β_1, β_2, 및 γ)는 활성화되기 위해 Ca^{2+}, diacylglycerol 및 phosphatidylserine이 필요하나 novel PKC (δ, ε, η, 및 θ)는 Ca^{2+}-independent isoform으로서 diacylglycerol 및 phosphatidylserine이 활성화에 필요하다. Atypical PKC (ι, λ, 및 ζ)는 phosphatidylserine 단독에 의해 활성화 된다. Aorta 및 carotid artery와 같은 conduit artery에서 Ca^{2+}-independent isoform인 PKCε은 세포내 Ca^{2+} 농도 및 20KDa regulatory myosin light chain (MLC_{20}) 의 인산화가 변화되지 않는 상태에서도 Ca^{2+} sensitization에 의한 수축을 유발하나,[16,17,18] coronary artery 및 basilar artery와 같은 저항혈관에서 PKC에 의한 Ca^{2+} sensitization이 myogenic tone의 유발에 관여할 것이라는 실험 증거는 아직까지 보고되지 않았다.

한편, 최근에 small G-protein인 Rho A가 Ca^{2+} sensitization에 의한 수축에 중요한 역할을 한다는 것이 보고되었다.[19,20,21,22] 즉, 수축물질 자극시에 Ca^{2+} sensitization에 의해 수축이 유발되는데, 이는 small G-protein인 Rho A를 통해 Rho-kinase가 활성화되어 이 효소가 myosin light chain phosphatase (MLCP)의 $M_{110-130}$ regulatory subunit를 인산화시켜 MLCP의 catalytic activity를 감소시킴으로서 수축을 유발한다는 것이다.[19,20,21,22]

따라서 본 연구에서는 rabbit basilar artery를 stretch 시켰을 때 Fura-2 Ca^{2+} signal, 수축반응, PKC 및 Rho A의 immunoblot 및 MLC_{20} 인산화를 측정함으로서 미세혈관에서 myogenic tone의 유발에 PKC isoform 과 Rho A 단백질에 의한 Ca^{2+} sensitization의 역할을 규명하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험재료

가. 실험동물

실험동물로는 체중 1.5 2.0 Kg의 가토를 암수 구별 없이 사용하였다.

나. 약물

본 실험에 사용한 약물로서 각종 차단제 및 억제제인 nifedipine, H-7, calphostin C, gadolinium 과 cremophor EL 및 western blot의 일반적인 시약은 Sigma회사 (Columbia, Missouri, USA)로부터 구입하였고, Fura-2/AM은 Molecular Probe 회사 (Portland, Oregon, USA)로부터, PKC primary antibody인 PKCε 및 Rho primary antibody인 Rho A는 Santa Cruz 회사 (Santa Cruz, California, USA)로부터, 그리고 PKC primary antibody인 PKCα, PKCβ (β_I and β_{II}), PKCι는 Transduction Laboratory 회사 (San Diego, California, USA)로부터 구입하였다. Y-27632는 Uehata교수 (Yoshitomi Pharmaceutical Industries, Osaka, Japan)로부터 기증 받았다.

2. 실험방법

가. 실험표본제작

가토로부터 basilar artery는 다음과 같은 방법에 의해 제작하였다. 먼저 체중 1.5 - 2.0kg의 토끼의 이정맥 (ear vein)에 pentobarbital sodium (60mg/kg) 과 heparin (2,000 IU/kg)을 주사하여 마취시킨 후 경동맥을 절단하여 실혈시킨 다음 basilar artery 조직을 적출하였다. 적출한 조직을 95% O_2 + 5% CO_2로 포화시킨 Krebs-Henseleit 용액 (mM: NaCl 119, KCl 4.6, $CaCl_2$ 2.5, KH_2PO_4 1.2, $MgSO_4$ 1.5, $NaHCO_3$ 25, glucose 11)에 담근 상태에서 preparation chamber에 핀을 이용하여 고정시킨 후 현미경하에서 혈관 주위의 결체조직을 안과용 미세가위 및 핀셀을 이용하여 조심스럽게 제거하였다. 이후 혈관을 strip형태로 만들어 기체가 공급되고 37℃로 일정하게 유지되는 Krebs-Henseleit 용액에서 1시간 정도 평형시킨 다음 장력과 세포내 Ca^{2+} 농도측정에 사용하였다. 모든 실험에서 용액에 적신 면봉으로 혈관 내면을 가볍게 문질러 내피세포를 제거하였다. 내피세포의 제거여부는 70mM high K^+ 용액 (정상 Krebs-Henseleit 용액의 조성중 KCl의 농도가 70mM되게 NaCl을 감소시켜 만든 용액)으로 혈관수축을 유도한 후 10^{-6}M acetylcholine을 처치하였을 경우 이완이 되지 않는 것으로 확인하였다.

나. 세포내 Ca^{2+} 농도와 수축 측정

1) 세포내 Fura-2/AM 축적방법 : 세포내 유리 Ca^{2+} 의 농도는 fluorescent Ca^{2+} indicator인 Fura-2/AM을 이용하였다. 먼저 긴장도와 세포내 유리 Ca^{2+} 농도를 동시에 측정하기 위한 실험표본을 10μM Fura-2/AM (acetoxymethyl ester)이 존재하는 Krebs-Henseleit 용액에 (room tempertature) 3-4시간 incubation하여 Fura-2/AM을 세포내에 축적

시켰다. 이때 Fura-2/AM의 용해도를 증가시키기 위해 noncytotoxic detergent인 cremophor EL (0.01%)을 용액내에 첨가하였다. 이후 실험표본을 Krebs-Henseleit용액에 30분간 incubation하여 근육 외부에 묻은 Fura-2/AM을 세척하고 세포내 Fura-2/AM을 deesterification시켰다.

(2) <u>세포내 Ca^{2+} 농도와 장력의 동시 측정</u> : 30분간의 세척과정 후 혈관의 장력 변화와 세포내 유리 Ca^{2+} 농도변화의 동시 측정은 Intracellular Ion Analyzer (JASCO Model CAF 110)을 이용하여 Ozaki등의 방법[23]에 따라 실시하였다. Fura-2가 축적된 근육 절편을 온도가 37°C로 조절되는 organ bath에 수직으로 고정하고, 한쪽 끝은 근육의 장력을 측정하기 위해 strain gauge transducer (Harvard)에 고정하였다. 근육의 다른 한쪽은 근육조직에 UV light가 통과할 수 있도록 장력 측정의 반대쪽으로 고정하였다. 따라서 근육에서 발생되는 장력은 force transducer를 통해 computer에 저장하고, 동시에 UV light 조사에 의해 발생되는 fluorescence를 동일한 computer에 저장하여 결과를 분석하였다 (Fig. 1).

상기의 방법으로 고정된 근육절편에서 세포내 유리 Ca^{2+} 농도를 장력과 동시에 측정하기 위해서는 두개의 excitation light를 조직에 조사한 후 발생되는 emission light (fluorescence)를 측정하여 두 fluorescence intensity의 ratio {$R(F_{340}/F_{380})$}를 계산하여 세포내 Ca^{2+} 농도 (Fura-2 Ca^{2+} signal)의 척도로 하였다. 즉 excitation light는 rotating filter wheel (48Hz)이 장착된 xenon lamp에서 발사되는데, 이 때 filter wheel은 340nm와 380nm의

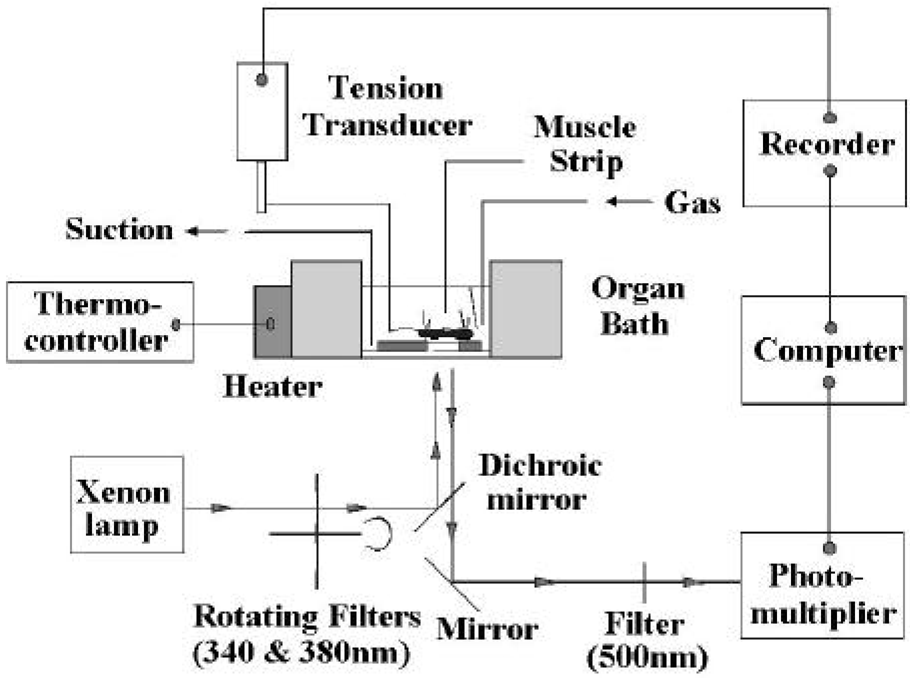

Fig. 1. Block diagram of the apparatus of fluorescence spectrometer specially designed for smooth muscle strip.

interface filter를 가지고 있다. 두 개의 excitation light의 조사에 의해 발생되는 emission light (fluorescence)를 500nm filter를 통해 수집한 후 340nm의 excitation light에 의한 fluorescence 와 380nm의 excitation light에 의한 fluorescence의 ratio를 계산하였다.
혈관에 600mg의 stretch를 가했을 때 발생되는 세포내 Ca^{2+} 농도 및 장력의 변화를 측정하면서 세포내 Ca^{2+} 농도와 장력이 일정해졌을 때 세포외부의 Ca^{2+}을 제거하였을 경우 또는 nifedipine, gadolinium, H-7, calphostin C 및 Y-27632를 각각 처치하였을 때 세포내 Ca^{2+} 농도와 장력의 변화를 관찰하였다.

다. Western Blot

분리된 혈관조직을 liquid N_2-cooled liquid chlorodifluoromethane을 이용하여 얼린 후 50mM Tris (pH 7.4), 10% glycerol, 5mM EGTA, 140mM NaCl, 1.0% Nonidet P-40, 5.5mM leupeptin, 5.5mM pepstatin, 20 KIU aprotinin, 1mM Na_3VO_4, 10mM NaF, 0.25% (wt/vol) sodium deoxycholate, 100μM $ZnCl_2$, 20mM β-glycerophosphate, 20μM phenylmethylsulfonyl fluoride가 함유된 buffer에서 homogenization 시켰다. Protein-matched sample (30μg protein/lane)을 10% SDS-polyacrylamide gel에 전기영동 시킨 후 Millipore Immobilon-P membrane에 transfer시켰다. Membrane을 5% dried milk가 함유된 PBS-Tween buffer에서 1시간 동안 (room temperature) incubation 한 후 primary antibody, PKCα (1:500; Transduction Laboratory), PKCβ ($β_I$ and $β_{II}$; 1:1,000; Transduction Laboratory), PKCε (1:500; Santa Cruz), PKCι (1:250; Transduction laboratory), 존재하에 4°C에서 overnight 시키면서 incubation 하였다. 다음날 membrane을 세척한 후 horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (1:10,000; Calbiochem)에 1시간동안 room temperature에서 incubation 하였다. Immunoreactive band는 enhanced chemiluminescence (ECL; Amersham)로 발색시켰다. ECL에 의해 발색된 film을 scan한 다음 PKC isoform들의 상대적인 양은 National Institute of Health (NIH) Image를 사용하여 X-ray film의 densitometry에 의해 정량하였다.

혈관조직에서 stretch에 의해 PKCα 및 PKCε과 Rho A protein의 translocation을 규명하기 위해 적절한 실험조건에서 얻은 조직을 liquid N_2-cooled liquid chlorodifluoromethane을 이용하여 얼린 후 homogenization 용액 {200mM Tris-HCl (pH 7.4), 0.3M sucrose, 5mM EDTA, 5mM DTT, 10mM EGTA, 0.3mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 0.3% 2-mercaptoethanol} 에서 homogenization 시켰다. Homogenates로부터 세포질성분을 분리하기 위해 homogenates를 100,000g (4°C)에서 60분간 centrifuge 시킨 다음 상층액을 취하였고, 세포막성분은 침전물을 0.1% Triton X-100이 첨가된 homogenization용액에 부유시켜 혼합한 후 centrifuge하여 상층액을 취하였다. 상기의 방법으로 얻은 두 성분의 protein-matched sample을 western blot과 동일한 방법으로 immunoblot하였다. 이때 Rho A의 primary antibody는 Rho A (1:200; Santa Cruz)를 사용하였다.

라. MLC_{20} 인산화 측정

MLC_{20} 인산화는 glycerol-urea minigel을 사용하여 측정하였다. 장력측정을 시행한 혈관조직을 장력측정 장치로부터 분리하여 liquid N_2-cooled liquid chlorodifluoromethane에 얼린 후 200μl의 urea sample buffer {8.0M urea, 20mM Tris base, 23mM glycine (pH 8.6), 10mM DTT, 10% glycerol, 0.04% bromphenol blue}에서 혼합한 다음 상층액을 glycerol-urea minigel (10% acrylamide/0.8% bisacrylamide, 40% glycerol, 20mM Tris base, 23mM glycine)에 loading하여 400V constant voltage에서 전기영동을 시행하였다. Gel로부터 Millipore Immobilon-P membrane에 protein의 electrophoretic transfer를 실시하였다. Membrane을 5% dried milk가 함유된 PBS-Tween buffer에서 60분간 incubation하여 blocking 시킨 다음 specific MLC_{20} monoclonal antibody (1:1000, Sigma)와 반응시키기 위해 4°C에서 overnight 시켰다. 그후 blot을 horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse IgG (1:1,000; Calbiochem)와 반응시킨 다음 ECL로 발색시켰다. MLC_{20} band는 NIH Image를 이용하여 densitometry하게 정량하였고, MLC_{20} 인산화 정도는 MLC_{20}의 총면적에 대한 인산화된 MLC_{20}의 백분율로 계산하였다.

III. 결 과

1. Stretch가 세포내 Ca^{2+} 농도와 장력에 미치는 영향

Myogenic tone의 유발에 세포내 Ca^{2+} 농도의 역할을 규명하기 위해 Fura-2/AM이 축적된 혈관

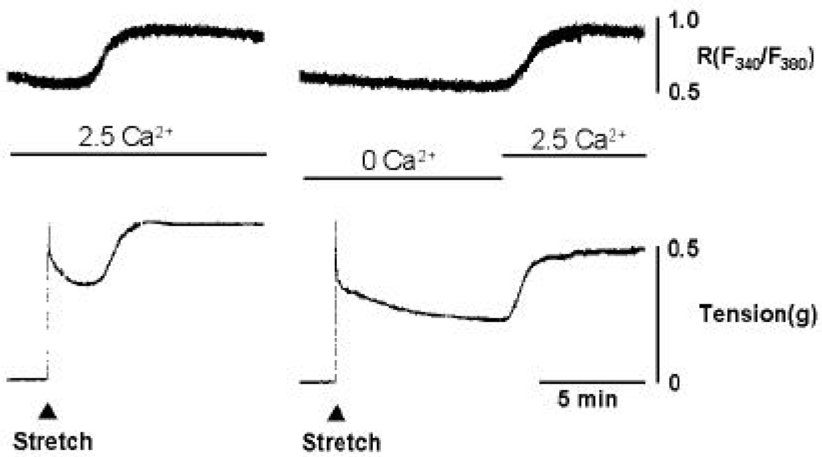

Fig. 2 Increase of the Fura-2 Ca^{2+} signal (top) and the tension (bottom) evoked by stretch in isolated rabbit basilar artery. Both the stretch-induced increase in Fura-2 Ca^{2+} signal [$R(F_{340}/F_{380})$] and tension are exhibited in the presence of extracellular Ca^{2+} (2.5 Ca^{2+}) but not in the absence of extracellular Ca^{2+} (0 Ca^{2+}).

조직에 600mg의 stretch를 가했을 때 세포내 Ca^{2+} 농도와 장력의 변화를 동시에 관찰하였다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 Ca^{2+}이 존재하는 조건에서 혈관조직을 stretch시켰을 때 세포내 Ca^{2+} 농도는 변화되지 않고 passive tension만이 유발됨을 알 수 있었다. Passive tension이 유발된 후 세포내 Ca^{2+} 농도가 서서히 점진적으로 증가하여 지속적으로 유지되는데 Ca^{2+} 농도가 증가되면서 일부 감소되었던 passive tension이 다시 Ca^{2+} 농도 변화의 형태와 유사하게 증가 (myogenic tone)되어 유지됨을 알 수 있었다. 이와는 달리 외부 Ca^{2+}이 존재하지 않는 조건에서 혈관조직을 stretch 시켰을 경우, 세포내 Ca^{2+}농도는 거의 변화되지 않았으며 passive tension 유발 후 나타났던 myogenic tone도 유발되지 않았다. 이러한 실험조건에서 외부 Ca^{2+}을 첨가하면 세포내 Ca^{2+} 농도의 증가와 함께 장력 또한 증가되어 myogenic tone이 유발됨을 알 수 있다. 이때 stretch에 의한 세포내 Ca^{2+} 농도의 증가는 40mM K^{+} 용액의 48.8±12.2% (n = 16)였으며, tension의 증가는 70.2±13.4% (n = 16)였다.

2. Nifedipine과 gadolinium이 stretch에 의한 세포내 Ca^{2+} 농도와 장력의 변화에 미치는 영향

Stretch에 의해 세포내 Ca^{2+} 농도와 장력이 증가될 때 세포내 Ca^{2+} 농도의 증가기전을

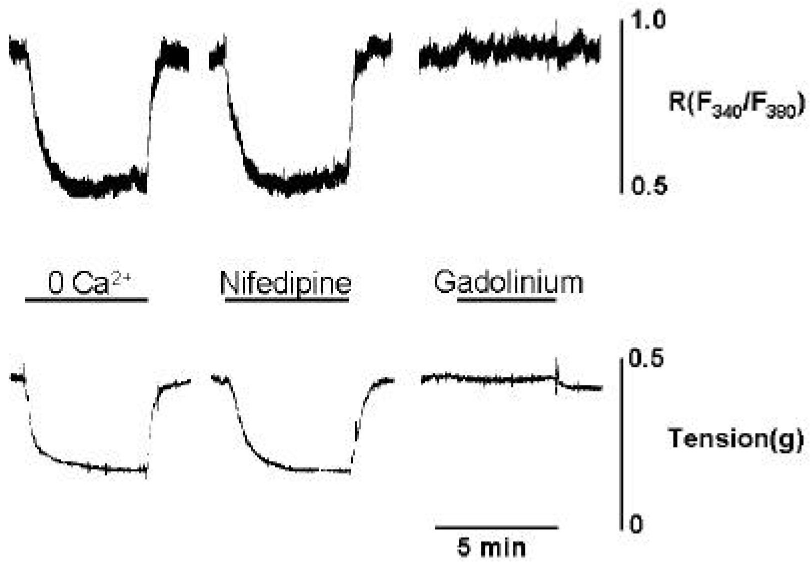

Fig. 3. Changes in the stretch-induced increase in Fura-2 Ca^{2+} signal [R(F_{340}/F_{380}); top] and tension (bottom) by treatment of nifedipine and gadolinium. Tracings showing effects of elimination of extracellular Ca^{2+} (left), nifedipine (middle) and gadolinium (right) on stretch-induced Fura-2 Ca^{2+} signal and tension. Elimination of extracellular Ca^{2+} and nifedipine are decreased stretch-induced Fura-2 Ca^{2+} signal and tension, respectively, but not gadolinium.

규명하기 위해 voltage-dependent Ca^{2+} channel **차단제인** nifedipine[24]**과** stretch activated cation channel **차단제인** gadolinium[24]**의 효과를 관찰하였다** (Fig. 3). **먼저** 600mg**의** stretch**에 의해 유발된 세포내** Ca^{2+} **농도와 장력의 증가가 일정하게 유지된 후 세포외액의** Ca^{2+}**을 제거하였을 경우 그림에서 보는 바와 같이 세포내** Ca^{2+} **농도의 감소와 함께 장력 또한 동시에 감소함을 알 수 있었다. 이 때 세포내** Ca^{2+} **농도의 감소는** stretch**에 의해 증가되기 전의 상태까지 전부 감소하였고, 장력은** stretch**에 의해 이차적으로 증가되었던 장력의 크기만큼 또는 약간 더 많이 감소하였다. 이와 같이 세포외액의** Ca^{2+}**을 제거하였을 때 나타나는 세포내** Ca^{2+} **농도와 장력이 감소되는 정도를 총** myogenic tone (100%)**의 크기로 하였다.**

한편, stretch**에 의해 세포내** Ca^{2+} **농도의 증가가** voltage-dependent Ca^{2+} channel**을 통한** Ca^{2+} **유입에 의한 것인지를 확인하기 위해** voltage-dependent Ca^{2+} channel **차단제인** 10^{-7}M nifedipine**을 처치하여 본 결과** stretch**에 의한 세포내** Ca^{2+} **농도의 증가를** 72.7±11.9% (n = 7), tension**의 증가를** 73.7±7.7% (n = 7) **감소시켰다** (Fig. 4). **그러나** stretch activated cation channel**의 관여를 확인하기 위해 실험한 결과** stretch-activated cation channel **차단제인** 10^{-5}M gadolinium**은 세포내** Ca^{2+} **농도** (6.2±2.1%, n = 7) **와 장력** (5.8±3.4, n = 7)**에 거의 영향이 없었다.**

3. PKC 와 Rho-kinase 억제제가 stretch에 의한 세포내 Ca^{2+} 농도와 장력의 변화에 미치는 영향

Stretch**에 의한 세포내** Ca^{2+} **농도와 장력의 증가에** PKC **및** Rho A **단백질에 의한** Ca^{2+}

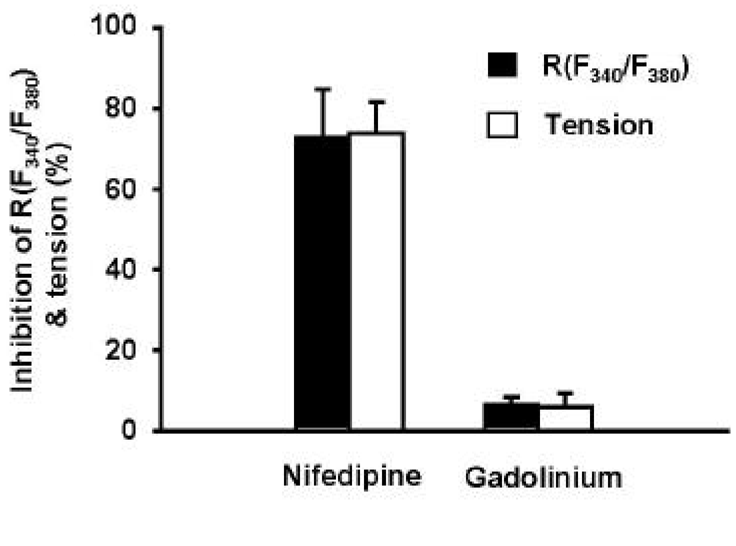

Fig. 4. Statistical analysis of effects of nifedipine (left) and gadolinium (right) on stretch-induced Fura-2 Ca^{2+} signal [R(F_{340}/F_{380}); filled bar] and tension (open bar). Results are expressed as percentage of a elimination of extracellular Ca^{2+}-evoked response and are the means±SE of 7 different vessels.

sensitization 기전이 관여하는지를 규명하기 위해 PKC 억제제인 H-7[25] 과 calphostin C[24] 및 Rho-kinase 억제제인 Y-27632[26]의 효과를 관찰하였다 (Fig. 5). 먼저 PKC의 역할을 규명하기 위해 10^{-5}M H-7과 5×10^{-7}M calphostin C의 효과를 관찰한 결과 그림에서 보는 바와 같이 stretch

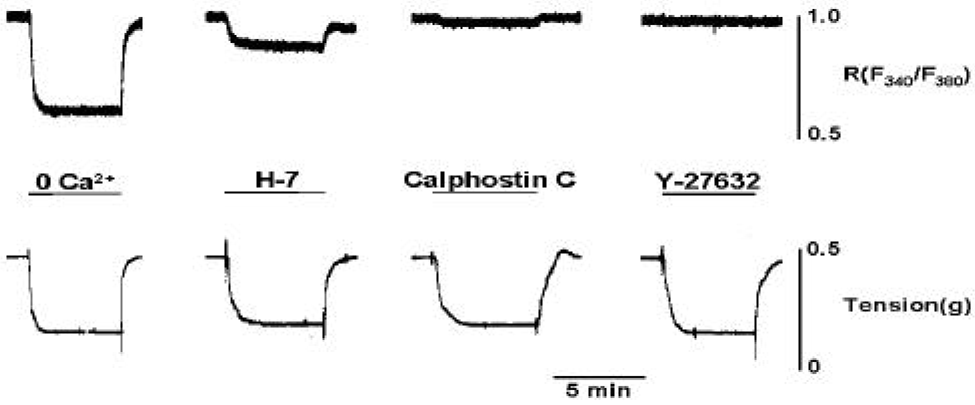

Fig. 5. Changes in the stretch-induced increase in Fura-2 Ca^{2+} signal [R(F_{340}/F_{380}); top] and tension (bottom) by treatment of PKC and Rho-kinase inhibitors. Tracings showing effects of elimination of extracellular Ca^{2+}, H-7 (10^{-5}M), calphostin C (5×10^{-7}M) and Y-27632 (10^{-5}M) on stretch-induced Fura-2 Ca^{2+} signal and tension.

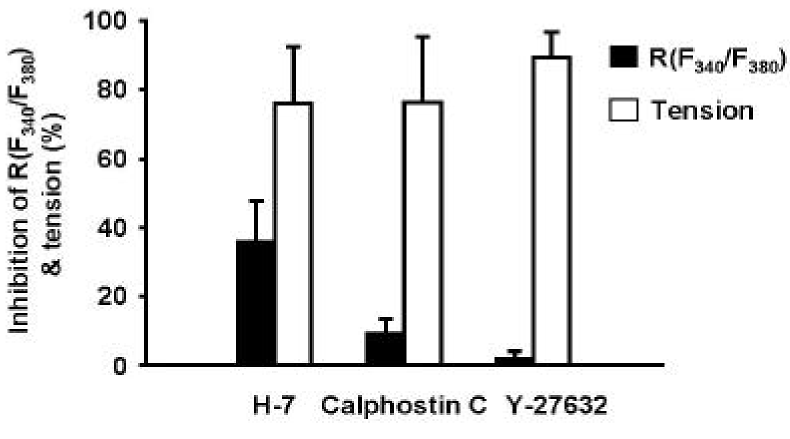

Fig. 6. Statistical analysis of effects of PKC and Rho-inhibitors on stretch-induced Fura-2 Ca^{2+} signal [R(F_{340}/F_{380}); filled bar] and tension (open bar). Results are expressed as percentage of a elimination of extracellular Ca^{2+}-evoked response and are the means±SE of 8 different vessels.

에 의해 증가된 세포내 Ca^{2+} 농도와 장력은 이들 약물에 의해 감소되었다. 그러나 두 약물에 의한 세포내 Ca^{2+} 농도의 감소는 세포외액의 Ca^{2+}을 제거하였을 경우보다 그 감소정도는 아주 미약하였으나 (H-7 = 35.7±12%; calphostin C = 9.2±4.2%, n = 8, Fig. 6) 장력의 감소는 거의 비슷한 정도를 보였다 (H-7 = 76.27±16.2%; calphostin C = 76.4±18.9%, n = 8, Fig. 6)

한편, myogenic tone에 small G-protein인 Rho A 에 의한 Ca^{2+} sensitization의 효과를 관찰하기 위해 Rho-kinase 억제제인 10^{-5}M Y-27632의 효과를 관찰하였다 (Fig. 5). Y-27632의 경우 stretch에 의한 세포내 Ca^{2+} 농도의 증가에는 아무런 영향이 없었으나 (2.0±2.0%, n = 8) myogenic tone은 현저히 감소시킴을 알 수 있었다 (89.4±7.3%, n = 8).

4. Stretch가 PKC 와 Rho A 단백질의 translocation에 미치는 영향

Rabbit basilar artery에 존재하는 PKC isoforms을 규명하기 위해 PKC isoform specific antibody를 사용해 western blot한 결과 Fig. 7에 나타낸 바와 같다. 그림에서 보는 바와 같이 rabbit basilar artery에는 PKCα 및 PKCε은 존재하였으나 PKCα가 PKCε보다 많이 존재하는 것으로 나타났다. PKCβ는 존재하지 않았으며 PKCι 또한 존재하지 않았다.

Stretch에 의한 PKC isoforms의 translocation을 확인하기 위해 세포질과 세포막 성분에서

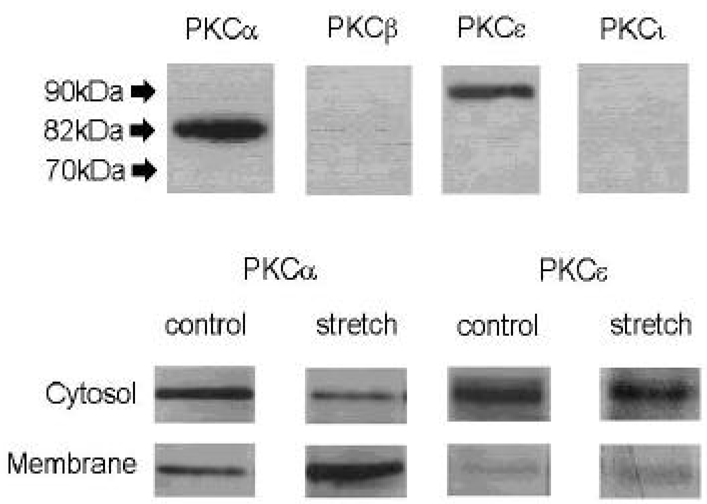

Fig. 7. Top: Immunoblots of PKC-α, -β, -ε, -ι from isolated rabbit basilar artery. Immunoblots are representative of immunoblots of five independent preparations. Bottom: Translocation of PKCα and PKCε induced by stretch. Results are representative of five to six experiments showing that PKCα is translocated from the cytosol to the membrane fraction.

PKCα와 PKCε의 함량변화를 관찰하였다 (Fig. 7). 그림에서 보는 바와 같이 PKCα의 경우 stretch를 가하지 않는 조직의 세포막 성분에 29.6±8.2% (n = 5) 였으나 stretch에 의해 86.3±11.4% (n = 5)로 증가하였다. 그러나 PKCε의 경우 stretch를 가하지 않은 경우 6.7±3.2% (n = 6), stretch를 가했을 경우 11.1±4.3% (n = 6)로 거의 유사하였다.

한편, stretch에 의해 Rho A 가 세포질에서 세포막으로 translocation되는지를 확인하기 위해 실험한 결과 Fig. 8에서 보는 바와 같이 stretch를 하지 않은 조직에서는 Rho A가 세포질에 다량 존재하였으나 (세포질 = 80.3±8.2%, 세포막 = 14.8±6.2%, n = 3), stretch에 의해서는 세포막에 존재하는 Rho A의 함량이 증가함을 알 수 있다 (세포질 = 25.6±9.2%, 세포막 = 74.4±9.4%, n = 3).

5. Stretch가 myosin의 인산화에 미치는 영향

Stretch에 의해 PKC와 Rho A가 활성화되었을 때 이들에 의한 Ca^{2+} sensitization의 downstream effectors를 규명하기 위해 MLC_{20} 인산화의 변화를 측정하였다 (Fig. 8). 그림에서 보는 바와 같이 MLC_{20} 인산화는 stretch에 의해 통계적으로 유의하게 증가되었고 (Control = 31.7±7.3%, Stretch = 47.2±9.4%, n = 5, $p<0.05$), 이러한 증가는 10^{-5}M H-7 (31.3±6.7%,

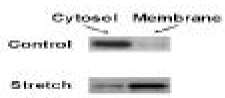

Fig. 8. Translocation of Rho A induced by stretch. Results are representative of three experiments showing that RhoA is translocated from the cytosol to the membrane fraction by stretch.

Fig. 9. Changes in 20-KDa myosin light chain (MLC) phosphorylation with stretch and effects of H-7 and Y-27632 on the MLC phosphorylation. Results are representative of immunoblots of five independent preparations. Stretch increased level of the MLC phophorylation (MLC-P) but these increase are inhibited by treatment of stretched tissue with H-7 and Y-27632, respectively.

n = 5, p<0.05)과 10^{-5}M Y-27632 (20.4±9.6%, n = 5, p<0.05)에 의해 현저하게 억제되었다.

Ⅳ. 고 찰

본 연구의 주 실험목적은 미세혈관에서 myogenic tone의 유발에 PKC isoform 과 Rho A 단백질에 의한 Ca^{2+} sensitization의 역할을 규명하고자 하였다. 이를 위해 먼저 myogenic tone의 형성에 Ca^{2+} sensitization 성분이 존재하는 지를 규명하기 위해 rabbit basilar artery를 stretch 시켰을 때 Fura-2 Ca^{2+} signal 과 수축반응을 동시에 측정한 결과, myogenic tone은 세포내 Ca^{2+} 농도 증가와 Ca^{2+} sensitization에 의해 유발되는 것이 확인되었다. 또한 본 연구에서는 세포내 Ca^{2+} 농도의 증가는 stretch activated cation channel을 통한 Ca^{2+}의 유입에 의한 것은 아니고 voltage-dependent Ca^{2+} channel을 통한 Ca^{2+}의 유입에 따른 것임을 알 수 있었다. 즉 stretch에 의한 myogenic tone 및 세포내 Ca^{2+} 농도의 증가가 stretch activated cation channel 차단제인 gadolinium에 의해서는 억제되지 않고 voltage-dependent Ca^{2+} channel 차단제인 nifedipine에 의해서는 억제된 실험결과들이 이를 증명한다. Myogenic tone에 관한 초기 연구에서는 고양이 middle cerebral artery의 혈관내압을 증가시켰을 때 세포막 전위가 탈분극되는 것이 밝혀졌고,[8] Meininger등[27]은 혈관내압 증가시 stretch activated cation channel이 활성화되어 이 channel을 통한 Na^{+}의 유입이 증가되어 세포막전위의 탈분극이 유발된다고 추측하였다. 따라서 혈관내압의 증가시 stretch activated cation channel의 활성화에 따른 세포막 전위의 탈분극으로 인해 이차적으로 voltage-dependent Ca^{2+} channel이 활성화됨으로서 세포 외부로 부터 Ca^{2+}이 유입되어 myogenic tone이 유발되는 것으로 추측하였다.[28] 이러한 실험결과들은 본 실험결과와 상반되는 결과이다. 그러나 voltage-dependent Ca^{2+} channel 차단제인 nifedipine을 처치하여 Ca^{2+} 유입을 억제시켰을 경우 myogenic tone이 억제된다는 것이 또한 규명되었으며,[10,29] 최근에는 stretch가 voltage-dependent Ca^{2+} channel을 직접 활성화시킨다는 것이 규명되었다.[30] 따라서 실험동물 및 실험부위에 따라 stretch나 혈관내압의 변화에 따른 세포내 Ca^{2+} 농도의 증가기전은 다를 것으로 추측된다.

한편, 본 연구에서는 myogenic tone의 형성에 Ca^{2+} sensitization이 관여함을 확인하였고, 이러한 Ca^{2+} sensitization에 PKC가 관여함을 알 수 있었다. 즉 stretch에 의해 myogenic tone의 유발과 함께 세포내 Ca^{2+} 농도의 증가가 PKC 억제제인 H-7과 calphostin C의 처치에 의해 세포내 Ca^{2+} 농도의 억제는 미약하거나 거의 나타나지 않는 반면에 myogenic tone은 현저히 감소됨을 알 수 있었다. PKC가 myogenic tone의 형성에 관여한다는 것은 이미 보고되었다.[13] 즉 PKC에 비교적 선택적인 억제제를 사용하였을 경우 저항혈관의 myogenic tone을 억제한다는 것이 보고되었다.[10] 그러나 많은 경우 PKC 억제제들은 기초장력에 변화를 초래하여 근육의 초기 수축상태를 변화시키기 때문에 myogenic tone의 유발에 PKC의 역할을 규명하는데 어려움이 있었다. 또한 myogenic tone에 관여하는 PKC isoform이 규명되지 않았다. 따라서 stretch에 의한 myogenic tone에 PKC의 역할을 규명하기 위해서는 가토 basilar artery에 존재하

는 PKC isoform을 확인하고 이들이 stretch에 의해 활성화되는지를 규명하여야 한다. 이를 확인하기 위해 먼저 PKC isoform-specific anitibody를 사용하여 실험한 결과 가토의 basilar artery에서는 두 개의 다른 isoform인 PKCα (Ca^{2+} 의존성, classical PKC) 및 PKCε (Ca^{2+} 비 의존성, novel PKC)이 존재함을 증명하였고, PKCα가 PKCε보다 다량 존재하였다. 그러나 혈관의 smooth muscle에 존재한다고 보고[31]된 PKCβ (Ca^{2+} 의존성, classical PKC) 및 PKCι (Ca^{2+} 비 의존성, atypical PKC)가 존재하지 않음을 증명하였다. 한편, PKC가 활성화되기 위해서는 세포질로부터 세포막으로 translocation되어야 된다는 것이 밝혀졌다.[32,33,34] 따라서 본 실험에서도 가토의 basilar artery에 존재하는 두 개의 isoform중 어떤 것이 myogenic tone에 관여하는 지를 규명하기 위해 stretch에 의한 myogenic tone이 일정하게 유지된 상태의 basilar artery로부터 세포질 성분과 세포막 성분중에 존재하는 PKCα 및 PKCε의 양을 western blot으로 확인해 본 결과 PKCα만이 stretch에 의해서 세포질에서 세포막으로 translocation되어 활성화됨을 알 수 있었다. 즉 가토의 basilar artery에는 PKCα 및 PKCε이 동시에 존재하나 stretch에 의해서 PKCα만이 활성화되어 myogenic tone에 관여함을 알 수 있었다. 이러한 실험결과는 aorta와 같이 myogenic tone을 보이지 않는 혈관에서 PKCε이 PKCα보다 다량 존재하여 Ca^{2+} 비 의존성인 PKC isoform에 의한 수축이 유발되고,[16,34] basilar artery와 같은 미세혈관에서는 비교적 PKCα가 PKCε보다 다량 존재하여 Ca^{2+} 의존성인 PKC isoform에 의한 수축이 유발됨을 의미한다.

만일 PKCα translocation이 basilar artery의 수축에 관련이 있다면 이에 관여하는 기전이 규명되어야 한다. 현재까지 밝혀진 PKC와 연관된 Ca^{2+} sensitization의 기전은 두 가지가 밝혀졌다.[17,18,36] 즉 PKC가 caldesmon과 같은 thin filament를 인산화시켜 수축을 유발하거나,[17,18,34] MLCP의 활성도를 억제시켜 MLC의 인산화를 증가시키는 것이다.[35] 따라서 본 연구에서 stretch가 MLC_{20} 인산화에 미치는 영향을 관찰해 본 결과 stretch는 MLC_{20} 인산화를 증가시켰으며 이러한 증가는 PKC 억제제인 H-7에 의해 차단됨을 알 수 있었다. 따라서 stretch에 의해 활성화된 PKCα는 MLC_{20} 인산화를 증가시킴으로서 Ca^{2+} sensitization을 관여함을 알 수 있다. 그러나 본 연구의 결과로부터 stretch가 PKCα를 활성화시키는 기전과 PKCα에 의한 MLC_{20}의 증가기전은 규명할 수가 없었다. 다만 혈관내압의 증가가 G-protein과 phospholipase C (PLC)를 활성화시키고, 활성화된 PLC에 의해 phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate로부터 형성된 dicyglycerol에 의해 PKC가 활성화된다는 보고[36]와 PKC가 MLCP를 직접 억제하거나[37] CPI-17 단백질을 인산화시키고 인산화된 CPI-17이 MLCP를 억제함으로서 MLC_{20} 인산화를 증가시킨다는 결과들이 보고되었다.[38]

한편, 최근에 Rho A 단백질이 Ca^{2+} sensitization에 관여한다는 연구결과들이 보고되었는데 본 연구에서도 PKC이외에 Rho A 단백질에 의한 Ca^{2+} sensitization이 myogenic tone의 형성에 관여함을 증명하였다. Rho A 단백질이 Ca^{2+} sensitization에 관여한다는 것은 몇가지 연구결과들로부터 유추되었다. 즉, constitutively active Rho A를 β-escin으로 투과도를 증가시킨 혈관에 처치시 농도 의존적으로 Ca^{2+} sensitization이 증가함을 알수 있었고, 이러한 증가는 억제제인 C3나 EDIN에 의해 억제됨이 보고되었다.[39] 또한 GTPγS를 처치하여 수축을 유발한 혈

관에서 수축의 크기와 Rho A 단백질의 세포막 성분의 함량 (translocation의 척도)이 잘 일치한다는 것이 보고되었으며,[40] Rho A 단백질의 downstream effector인 Rho-kinase의 억제제인 Y-27632가 oxytocin에 의한 Ca^{2+} sensitization을 억제한다는 결과[26]들이 보고되었다. 또한 Rho-kinase는 MLCP의 myosin binding subunit를 인산화 시킴으로서 MLCP의 활성화를 억제시킨다는 것이 보고되었다.[41] 이러한 연구결과들을 종합하며 보면 agonist에 의한 Ca^{2+} sensitization은 agonist에 의해 Rho A 단백질이 활성화되면 Rho-kinase가 활성화되고 이 kinase가 MLCP를 인산화 시킴으로서 MLCP의 활성을 억제시켜 MLC_{20} 인산화의 증가 및 수축을 유발한다고 생각된다. 따라서 Rho A 단백질이 stretch에 의한 Ca^{2+} sensitization에 관여한다면 위에 기술한 몇 가지 연구결과들과 일치하는 연구결과들이 제시되어야만 한다. 본 연구에서 이를 확인하기 위해 일련의 실험결과 첫째, Rho-kinase 억제제인 Y-27632가 stretch에 의한 세포내 Ca^{2+} 농도에는 거의 영향을 미치지 않으면서 myogenic tone은 현저히 감소시킴을 확인하였고, 둘째 stretch에 의한 myogenic tone이 일정하게 유지된 상태의 basilar artery로부터 세포질 성분과 세포막 성분중에 존재하는 Rho A 단백질을 western blot으로 확인해 본 결과 Rho A 단백질이 stretch에 의해서 세포질에서 세포막으로 translocation되어 활성화됨을 알 수 있었다. 마지막으로 Rho A 단백질 및 Rho-kinase가 MLC_{20} 인산화에 관여하는지를 확인하기 위해 이들 신호전달체계의 억제제인 Y-27632를 처치한 결과 Y-27632는 stretch에 의해 증가된 MLC_{20} 인산화를 억제시킴을 알 수 있었다. 따라서 stretch에 의한 Ca^{2+} sensitization에 PKC이외에 Rho A 단백질/rho-kinase system이 관여함을 알 수 있었다.

PKCα 및 Rho A 단백질/rho-kinase system에 의한 Ca^{2+} sensitization은 서로 일치하는 중간과정을 가지거나 상호 연계작용에 의해 MLCP를 억제할 수 있다.[41] 그러나 Somlyo의 보고[19]에 따르면 이들간의 상호작용은 미약하거나 거의 없는 것으로 보고되었다. 본 연구에서는 이를 확인할 수가 없었으며, 또한 stretch가 Rho A 단백질을 활성화시키는 기전 또한 규명되지 않았다. 이들에 대한 연구는 추후에 계속 연구되어져야 할 과제이다.

이상의 연구결과를 종합하여 볼 때 미세 저항혈관에서 myogenic tone은 세포내 Ca^{2+} 농도 증가 및 Ca^{2+} sensitization 기전에 의해 유발되며, PKC 및 Rho A 단백질에 의한 Ca^{2+} sensitization이 stretch에 의한 myogenic tone의 형성에 관여함을 알 수 있었다.

V. 결　론

미세순환 혈관에서 myogenic tone의 유발에 PKC isoforms 과 Rho A 단백질에 의한 Ca^{2+} sensitization의 역할을 규명하고자 rabbit basilar artery를 stretch 시켰을 때 Fura-2 Ca^{2+} signal, 수축반응, PKC 및 Rho A 단백질의 immunoblot 및 MLC_{20} 인산화을 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. Ca^{2+}이 존재하는 실험조건에서 rabbit basilar artery를 stretch 시켰을 때 세포내 Ca^{2+} 농도의 증가와 함께 장력이 증가되어 myogenic tone이 유발되었으나, 세포외액의 Ca^{2+}이 제거된 상태에서는 세포내 Ca^{2+} 농도와 장력은 변화되지 않았다.

2. Stretch에 의한 세포내 Ca^{2+} 농도와 장력의 증가는 voltage-dependent Ca^{2+} channel 차단제인 nifedipine에 의해 억제되었으나 stretch activated cation channel 차단제인 gadolinium에 의해서는 억제되지 않았다.

3. PKC 억제제인 H-7이나 calphostin C는 stretch에 의한 세포내 Ca^{2+} 농도와 장력의 증가를 억제하였으나, 세포내 Ca^{2+} 농도보다 장력을 더욱 더 현저하게 감소시켰다. Rho-kinase 억제제인 Y-27632는 stretch에 의한 세포내 Ca^{2+} 농도의 증가에는 아무런 영향이 없었으나 장력은 현저하게 감소시켰다.

4. Isoforms-specific antibody를 사용한 immunoblotting 결과 PKCα 및 PKCε isoform은 rabbit basilar artery에 존재하였으나, PKCα가 PKCε보다 많이 존재하였다. PKCβ 및 PKCι isoform은 존재하지 않았다.

5. PKCα는 혈관 조직의 stretch에 의해 세포질에서 세포막으로 translocation 하였으나 PKCε의 경우에는 translocation이 일어나지 않았다.

6. Rho A 단백질은 stretch를 가하지 않은 혈관조직에서는 세포질에 다량 존재하였으나 stretch에 의해 세포막으로 translocation 하였다.

7. MLC_{20} 인산화을 측정한 결과 stretch는 MLC_{20} 인산화를 증가시켰으나, 이러한 증가는 PKC 억제제인 H-7과 Rho-kinase 억제제인 Y-27632에 의해 억제되었다.

이상의 실험을 종합하여 볼 때 stretch에 의한 myogenic tone은 세포내 Ca^{2+} 농도의 증가와 Ca^{2+} sensitization에 의해 유발되며, PKCα와 Rho A 단백질에 의한 MLC_{20} 인산화의 증가가 Ca^{2+} sensitization에 관여함을 알 수 있었다.

참 고 문 헌

1. Johnson PC. The myogenic response. In Bohr DF, Somlyo AP & Sparks HV editors. The Handbook of Physiology. The Cardiovascular System. Vascular Smooth Muscle, sec 2, Baltimore: Waverly Press; 1980. p.409-442.
2. Folkow B. Description of the myogenic hypothesis. Cir Res 1964;15:279-287.
3. Bayliss WM. On the local reactions of the arterial wall to changes of internal pressure. J Physiol (Lond) 1902;28:220-231.

4. Folkow B. Transmural pressure and vascular tone-some aspects of an old controversy. Arch Int Pharmacodyn 1962;324:455-469.

5. Meininger GA, Trzeciakowski. Combined effects of autoregulation and vasoconstrictors on hindquaters vascular resistance. Am J Physiol 1990;258:H1032-H1042.

6. Osol G, Halpern W. Myogenic properties of cerebral vessels from normotensive and hypertensive rats. Am J Physiol 1985;249:H914-H921.

7. Johnson PC. The myogenic response and the microcirculation. Microvasc Res 1977;13: 1-18.

8. Harder DR. Pressure-dependent membrane depolarization in cat middle cerebral artery. Circ Res 1984;55:197-202.

9. Laher LC, Van Breemen C, Bevan JA. Stretch-dependent calcium uptake associated with myogenic tone in rabbit facial vein. Cir Res 1988;63:669-672.

10. Meininger GA, Davis MJ. Cellular mechanism involved in the vascular myogenic responses. Am J Physiol 1992;263:H647-H659.

11. Davis MJ, Meininger GA, Zawieja DC. Stretch-induced increases in intracellular calcium of isolated vascular smooth muscle cells. Am J Physiol 1992;263:H1292-H1299.

12. Harder DR, Romain RJ, Lombard JH. Cellular and biochemical mechanism of pressure-induced myogenic tone in arteries. In Mulvany MJ editor. Proceedings of the Third International Symposium on Resistance Arteries. Amsterdam: Elsevier; 1991. p.178-182.

13. Laher I, Bevan JA. Protein kinase C activation selectively augments a stretch-induced, calcium-dependent tone in vascular smooth muscle. J Pharmacol Exp Therap 1987;242:566-572.

14. Nishizuka Y. Intracellular signalling by hydrolysis of phospholipids and activation of PKC. Science 1992;258:607-614.

15. Walsh MP, Horowitz A. Clement-Chomienne O, Andrea JE, Allen BG, Morgan KG. Protein kinase C mediation of Ca^{2+}-independent contractions of vascular smooth muscle. Biochem Cell Biol 1996;74:785-802.

16. Collins EM, Walsh MP, Morgan KG. Contraction of single vascular smooth muscle cells by phenylephrine at constant $[Ca^{2+}]_i$. Am J Physiol 1992;262:H754-H762.

17. Katsuyama H, Morgan KG. Mechanisms of Ca^{2+}-independent contraction in single permeabilized ferret aorta cells. Circ Res 1992;72:651-657.

18. Dessy C, Kim I, Sougnez CL, Laporte R, Morgan KG. A role for MAP kinase in differentiated

smooth muscle contraction evoked by α-adrenoceptor stimulation. Am J Physiol 1998;275:C1081-C1086.

19. Somlyo AP, Somlyo AV. Signal transduction by G proteins, Rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin II. J Physiol 2000;522(2):177-185.

20. Pfitzer G, Arner A. Involvement of small GTPase in the regulation of smooth muscle contraction. Acta Physiol Scand 1998;164:449-456.

21. Somlyo AP, Wu X, Walker LA, Somlyo AV. Pharmacomechanical coupling; the role of calcium, G-proteins, kinases and phosphatases. Rev Physiol Biochem Pharmacol 1998;134:203-236.

22. Somlyo AP, Somlyo AV. From pharmacomechanical coupling to G-proteins and myosin phosphatase. Acta Physiol Scand 1998;164:437-448.

23. Ozaki H, Randel JS, David PB, Nelson GP, Sanders KM. Simultaneous measurement of membrane potential, cytosolic Ca^{2+}, and tension in intact smooth muscles. Am J Physiol 1991;260:C917-C925.

23. Miriel VA, Mauban JR, Blaustein MP, Wier WG. Local and cellular Ca^{2+} transients in smooth muscle of pressurized rat resistance arteries during myogenic and agonist stimulation. J Physiol 1999;518(3):815-824.

24. Bakker EN, Kerkhof CJ, Sipkema P. Signal transduction in spontaneous myogenic tone in isolated arterioles from rat skeletal muscle. Cardiovasc Res 1999;41(1):229-236.

25. Ruzycky AL, Morgan KG. Involvement of the protein kinase C system in calcium-force relationships in ferret aorta. Br J Phramacol 1989;97(2):391-400.

26. Uehata M, Ishizaki T, Satoh H, Ono T, Kawahara T, Morishita T, et al. Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension. Nature 1997;389:990-994.

27. Meininger GA, Zawieja DC, Falcone JC, Hill MA, Devey JP. Calcium measurement in isolated arterioles during myogenic and agonist stimulation. Am J Physiol 1991;261:H950-H959.

28. Hill MA, Meininger GA. Calcium entry and myogenic phenomena in skeletal muscle arterioles. Am j Physiol 1994;267:H1085-H1092.

29. D'Angelo G, Meininger GA. Transduction mechanisms involved in the regulation of myogenic activity. Hypertension 1994;23:1096-1105.

30. Mooren FC, Kinne RK. Intracellular calcium in primary cultures of rat renal inner medullary collecting duct cells during variations of extracellular osmolarity. Pflugers Arch 1994;427(5-6):463-472.

31. Ohanian V, Ohanian J, Shaw L, Scarth S, Parker PJ, Heagerty AM. Identification of protein kinase C isoforms in rat mesenteric small arteries and their possible role in agonist-induced

contraction. Circ Res 1996;78:806-812.

32. Newton AC, Johnson JE. Protein kinase C: a paradigm for regulation of protein function by two membrane-targeting molecules. Biochim Biophys Acta 1998;1376:155-172.

33. Newton AC. Protein kinase C: structure, function and regulation. J Biol Chem 1995;270(48):28495-28498.

34. Lee YH, Kim IK, Laporte R, Walsh MP, Morgan KG. Isozyme-specific inhibitors of protein kinase C translocation: effects on contractility of single permeabilized vascular smooth muscle cells of the ferret. J Physiol 1999;517(3):709-720.

35. Buus CL, Aalkajaer C, Nilsson H, Juul B, Moller JV, Mulvany MJ. Mechanisms of Ca^{2+} sensitization of force production by noradrenaline in rat mesenteric small arteries. J Physiol 1998;510(577-590.

36. Osol G, laher I, Kelly M. Myogenic tone is coupled to phospholipase C and G protein activation in small cerebral arteries. Am J Physiol 1993;265:H415-H420.

37. Somlyo AP, Kitazawa T, Himpens B, Mattilijs G, Horiuti K, Kobayashi S, et al. Modulation of Ca^{2+}-sensitivity and of the time course of contraction in smooth muscle: a major role of protein phosphatase? Adv in Protein Phosphatase 1989;5:181-195.

38. Kitazawa T, Takizawa N, Ikebe M, Eto M. Reconstitution of protein kinase C-induced contractile Ca^{2+}-sensitization in triton X-100 demembranated rabbit arterial smooth muscle. J Physiol 1999;520:139-152.

39. Gong MC, Iizuka K, Nixon G. The role of G-proteins, ras-family, trimeric or both, in Ca^{2+}-sensitization of smooth muscle. Proc Natl Acad Sci 1996;93:1340-1345.

40. Gong MC, Fujihara H, Somlyo AV, Simlyo AP. Translocation of rho A associated with Ca^{2+} sensitization of smooth muscle. J Biol Chem 1997;272:10704-10709.

41. Jensen PE, Gong MC, Somlyo AV, Somlyo AP. Separate upstream and convergent downstream pathways of G-protein and phorbol ester-mediated Ca^{2+} sensitization of myosin light chain phosphorylation in smooth muscle. Biochem J 1996;318:469-475.

Abstract

Role of protein kinase C- or Rho A proteins-induced Ca^{2+} sensitization in myogenic tone

Jung-Sup Kim

Brain Korea 21 Project for Medical Sciences
The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Associate Professor Young-Ho Lee)

Myogenic tone refers to the ability of vascular smooth muscle to alter its state of contractility in response to changes of intraluminal pressure; the vessel constricts in opposition to an increase in intravascular pressure and dilates when the pressure decreases. The mechanisms by which vascular smooth muscle cells respond to changes in intravascular pressure are still not well understood. In this study, we investigated the role of PKC- or Rho A proteins-induced Ca^{2+} sensitization in myogenic tone of the rabbit basilar microcirculation by measuring Fura-2 Ca^{2+} signals, contractile responses, PKC immunoblots, translocation of the PKC and Rho A proteins, and phosphorylation of 20kDa myosin light chains.

Stretch evoked myogenic tone with increase in $[Ca^{2+}]_i$ only in the presence of extracellular Ca^{2+}. Stretch-induced increase in $[Ca^{2+}]_i$ & contractions were completely abolished in the absence of extracellular Ca^{2+}. Stretch-induced increase in $[Ca^{2+}]_i$ & contractions were inhibited by treatment of tissue with nifedipine, blocker of voltage-dependent Ca^{2+} channel, but not in gadolinium, blocker of stretch-activated cation channel. PKC inhibitors, H-7 & calphostin C, and Rho-kinase inhibitor, Y-27632, inhibited a stretch-induced myogenic tone without changes in $[Ca^{2+}]_i$. Imunoblotting using isoenzyme-specific antibodies showed the presence of PKC α and PKC ε in the rabbit basilar artery. PKC α, but not PKC ε, and Rho A proteins were translocated from cytosol to the cell membrane by stretch. Phosphorylation of MLC_{20} was increased by stretch and these increases were blocked by treatment of tissue with H-7 & Y-27632.

These results suggest a link between the Ca^{2+} sensitization that occurs during the myogenic contraction and activation of the PKC α and Rho A proteins.

Key Words: myogenic tone, $[Ca^{2+}]_i$, PKC, Rho A protein