

고혈압에서 myogenic tone의 변화: RhoA 단백질 및
protein kinase C의 역할

연세대학교 대학원

의과학사업단

서 정 필

고혈압에서 myogenic tone의 변화: RhoA 단백질 및
protein kinase C의 역할

연세대학교 대학원

의과학사업단

서 정 필

서정필의 박사 학위논문을 인준함

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

연세대학교 대학원

2002년 12월 일

감사의 글

먼저 이 논문을 완성하기까지 열정을 가지고 지도하여 주신 이영호 교수님께 다시 한번 감사를 드리고 실험내용에 대한 조언을 해주신 남택상 교수님, 장양수 교수님, 안덕선 교수님, 민경태 교수님께 감사를 드립니다. 또한 본 실험이 이루어지기까지 많은 수고를 해 주신 황미경 선생님과 류성경 선생님께 고마움을 전합니다.

저 자 씀

차 례

국문요약

I. 서	론	1
II. 재료 및 방법		2
1. 실험재료		4
가. 실험동물		4
나. 약물		4
2. 실험방법		4
가. 실험표본제작 및 근원성 장력의 측정		4
나. Western Blot		4
다. PKC isoform 및 rhoA의 translocation		5
라. 통계처리		6
III. 결	과	
1. SHR과 WKY의 basilar artery에서 신장이 장력에 미치는 영향		6
2. Nifedipine이 신장에 의한 장력 변화에 미치는 영향		7
3. Rho-kinase와 PKC 억제제가 신장에 의한 장력 변화에 미치는 영향		8
4. 신장이 rhoA 단백질과 PKC의 translocation에 미치는 영향		10
IV. 고	찰	12
V. 결	론	14
참고문헌		15
영문요약		16

그림 차례

Fig. 1. Typical records of myogenic tone induced by stretch in basilar artery of SHR and WKY	6
Fig. 2. Statistical analysis of the amplitude of myogenic tone induced by stretch between SHR and WKY	7
Fig. 3. Effect of nifedipine on the stretch-induced myogenic tone	8
Fig. 4. Effect of Y-27632 on the stretch-induced myogenic tone	9
Fig. 5. Effect of H-7 and calphostin-C on the stretch-induced myogenic tone	9
Fig. 6. Immunoblots of PKC- α , - ϵ , and rhoA in isolated basilar artery	10
Fig. 7. Stretch-induced translocation of rhoA	10
Fig. 8. Stretch-induced translocation of PKC α and PKC ϵ	11

국문요약

고혈압에서 myogenic tone의 변화: RhoA 단백질 및 protein kinase C의 역할

근원성 반응 (myogenic response)은 혈관내압이 증가할 때 일어나는 혈관수축, 역으로 혈관내압이 감소할 때 일어나는 혈관이완을 일컫는 것이다. 최근에 근원성 장력 (myogenic tone)에 관한 많은 연구들이 저항혈관에서의 긴장도 조절에 근원성 기전의 중요한 역할이 무엇인지, 특히 이러한 기전이 고혈압의 특징인 말초혈관 저항의 증가에 관여하는지를 규명하는 것에 초점이 맞추어 지고 있다. 따라서 본 연구에서는 SHR에서 증가된 근원성 장력이 SHR의 형성 및 유지에 관여하는지를 규명하고자 1) SHR과 WKY에서 신장 (stretch)에 의한 근원성 장력의 크기를 비교하고, 2) SHR과 WKY에서 근원성 장력의 형성에 관여하는 기전을 규명하고자 SHR과 WKY의 basilar artery를 신장시켰을 때 수축반응, rhoA 단백질 및 PKC의 immunoblot 및 translocation을 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 세포외액에 Ca^{2+} 이 존재하는 실험조건에서 basilar artery를 신장시켰을 때 SHR과 WKY에서 모두 근원성 장력이 유발되나 WKY에서 보다 SHR에서 큰 근원성 장력을 보였다. 그러나 세포외액에 Ca^{2+} 이 존재하지 않을 경우에는 SHR에서만 신장에 의해서 근원성 장력이 유발되었을 뿐 WKY에서는 신장에 의해 근원성 장력이 유발되지 않았다.

2. 신장에 의한 근원성 장력은 막전압 의존성 Ca^{2+} 통로 차단제인 nifedipine에 의해 SHR 및 WKY에서 모두 억제되었으며 그 억제 정도는 유사하였다.

3. Rho-kinase 억제제인 Y-27632는 SHR 및 WKY에서 신장에 의한 근원성 장력을 모두 억제하였으나 그 억제정도는 WKY에서 보다 SHR에서 더욱 더 현저하였다. 한편, PKC 억제제인 H-7이나 calphostin-C 역시 신장에 의한 근원성 장력을 현저하게 억제시켰으며, 그 억제 정도는 WKY에서 보다 SHR에서 더욱 더 현저하였다.

4. RhoA 및 PKC isoforms-specific antibody를 사용한 immunoblotting 결과 PKC α 의 경우 SHR과 WKY에서 유사한 정도의 band를 보였으나 rhoA 및 PKC ϵ 는 WKY보다 SHR에서 더욱 더 강한 band를 보였다.

5. RhoA 단백질은 SHR과 WKY에서 모두 신장을 가하지 않은 혈관조직에서는 세포질에 다량 존재하였으나 신장에 의해 세포막으로 translocation 하였다. 그러나 translocation의 정도는 WKY보다 SHR에서 더욱 더 많이 일어났다.

6. PKC α 는 SHR 및 WKY에서 모두 신장에 의해 세포질에서 세포막으로 유사한 정도로 translocation 하였으나 PKC ϵ 의 경우에는 SHR에서만 translocation이 일어났고 WKY에서는 일어나지 않았다.

이상의 실험을 종합하여 볼 때 SHR에서 신장에 의한 근원성 장력은 WKY의 경우 보다 크게 나타났으며, 이러한 증가는 rhoA 단백질과 PKC ϵ 의 양적 증가 및 활성화 증가에 기인하는 것으로 생각된다.

핵심되는 말: 근원성 장력, SHR, WKY, rho-associated kinase (ROK), PKC, Y-27632

고혈압에서 myogenic tone의 변화: RhoA 단백질 및 protein kinase C의 역할

<지도 이 명 호 교수>

연세대학교 대학원 의과학사업단

서 정 필

I. 서 론

많은 조직에서 관류압 (perfusion pressure)이 변함에도 불구하고 혈류 (blood flow)는 비교적 일정하게 유지되는데, 이러한 혈류가 일정하게 유지되는 것을 혈관의 자동조절 (autoregulation)이라 하며¹, 이는 근원성 (myogenic), 신경성 (neurogenic) 및 대사성 (metabolic) 영향의 상호작용에 의해 나타난다.² 혈류의 자동조절에 관여하는 근원성 반응 (myogenic response)은 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 신장 (stretch)에 의해 유발되어 질 수 있다. 따라서 근원성 반응에 의한 혈류의 자동조절은 신장에 반응하여 혈관근육의 수축상태를 변화시킬 수 있는 평활근 세포의 능력에 의존함으로써 어떤 신경성 또는 대사성 영향에 독립적이며 단지 근육에 가해지는 기계적인 힘과 연관성이 있다.

혈관내압의 변화나 혈관벽의 신장에 의해 유발되는 근원성 장력 (myogenic tone)의 기전은 아직까지 명확하게 밝혀지지 않고 있지만, 현재까지의 연구결과를 종합하여 볼 때, 혈관내압의 증가 또는 혈관 신장시에 세포내 Ca^{2+} 농도가 증가하여 혈관수축을 유발한다는 것이다.^{4,5,6} 이때 세포내 Ca^{2+} 농도의 증가는 1) 혈관평활근막에 존재하는 stretch activated cation 통로를 통한 Ca^{2+} 의 유입,⁷ 2) 막전압 의존성 Ca^{2+} 통로의 활성화를 통한 Ca^{2+} 의 유입,⁸ 3) 신장에 의해 활성화된 2차 신호전달계를 통한 세포내 Ca^{2+} 저장소로부터 Ca^{2+} 의 유리⁸ 등에 의해 일어나는 것으로 생각된다. 한편, 세포내 Ca^{2+} 농도의 증가이 외에 다른 이차적인 기전이 근원성 장력의 유발에 관여할 것이라는 것이 보고되었다. 즉, 신장에 의해 활성화된 protein kinase C (PKC)가 Ca^{2+} 에 대한 수축단백질의 Ca^{2+} 감수성 (Ca^{2+} sensitization)을 증가시켜 혈관수축을 유발한다는 것이다.⁹ 또한 최근에 small G-protein인 rhoA가 Ca^{2+} 감수성에 의한 수축에 중요한 역할을 한다는 것이 보고되었다.^{10,11,12,13} 즉, 혈관근육에 수축물질을 투여시에 Ca^{2+} 감수성에 의해 수축이 유발되는데, 이는 small G-protein인 rhoA를 통해 rho-kinase (ROK)가 활성화되어 이 효소가 myosin light chain phosphatase (MLCP)의 $M_{110-130}$ regulatory subunit를 인산화시켜 MLCP의 catalytic activity를 감소시킴으로써 수축을 유발한다는 것이다.^{10,11,12,13} 이러한 rhoA/ROK에 의한 Ca^{2+} 감수성이 근원성 장력의 형성에 중요한 역할을 한다는 것이 규명되었다.¹⁴

근원성 장력은 기초 혈관저항 (basal vascular resistance)의 형성에 매우 중요하고¹⁵ 다른 기전에 의해 형성된 저항의 양방향 조절을 위해서도 중요하다.¹⁶ 즉, 동맥과 정맥에서 혈관내압이 증가한 후 유발되는 장력은 일반적으로 혈관내경을 안정시 이하로 감소시키기에는 충분하지 못하여 혈관수축을 유발하지 못하나 미세동맥에서는 혈관내압이 증가한 후 혈관은 수축을 지속할 수가 있다. 따라서 근원성 반응은 혈관평활근이 부분적으로 활성화된 상태로 유지될 때 혈관의 직경을 증가 또는 감소시킬 수 있으므로 양방향으로 혈류조절이 가능하게 한다.¹⁷ 또한 근원성 반응은 혈류와 모세혈관압 (capillary pressure)의 조절에 중요한 역할을 할 것으로 생각된다.

한편, 근원성 반응의 변화는 질병의 원인으로서는 관여할 수도 있다. 즉, 본태성 고혈압 (spontaneously hypertensive rat, SHR)에서 증가된 기초장력 또는 근원성 장력이 보고되었으며¹⁸⁻¹⁹ 고혈압환자에서도 압력 변화에 반응하는 증가된 혈관수축 반응이 보고되었다.²⁰ 고혈압에서 증가된 말초저항을 유지하는데 관여하는 기본적인 기전은 아직까지 밝혀지지 않았다. 그러나 고혈압시에 혈관구조의 변화에 의해 야기된 동맥 및 세동맥의 증가된 장력이 증가된 말초저항에 중요하게 관여할 것으로 추측된다.^{21,22,23} 혈관평활근의 압력변화에 의한 근원성 수축 (myogenic constriction)은 저항 혈관에서 장력의 주된 결정인자이고⁷ 근원성 수축은 증가된 혈관내압의 결과로서 나타나는 것이므로²⁴ 고혈압에서처럼 증가된 말초저항의 형성과 유지에 관여할 수 있다. 그러나 고혈압에서 증가된 근원성 장력을 유지하는데 관여하는 기본적인 기전은 아직까지 밝혀지지 않았다. 다만 aortic-coarctation-induced hypertension을 가진 쥐로부터 분리된 대동맥은 정상혈압 쥐의 대동맥에서 보다 3-4배의 높은 PKC 활성도를 보인다고 보고가 되었을 뿐이다.²⁰

따라서 본 연구에서는 SHR에서 증가된 근원성 장력이 SHR의 형성 및 유지에 관여하는지를 규명하고자 1) SHR과 WKY (Wistar Kyoto rat)에서 신장에 의한 근원성 장력의 크기를 비교하고, 2) SHR과 WKY에서 근원성 장력의 형성에 관여하는 기전을 규명하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험재료

가. 실험동물

실험동물로는 12주령의 SHR ($200 \pm 12 \text{mmHg}$) 과 WKY ($140 \pm 12.5 \text{mmHg}$)을 암수 구별 없이 사용하였다.

나. 약물

본 실험에 사용한 약물로서 nifedipine, calphostin C, H-7 및 western blot의 일반적 인 시약은 Sigma회사 (St Louis, MO, USA)로부터 구입하였고, PKC 일차항체인 PKC ϵ 및 rhoA의 일차항체인 Rho A는 Santa Cruz 회사 (Santa Cruz, California, USA)로부터, 그리고 PKC α 는 Transduction Laboratory 회사 (San Diego, California, USA)로부터 구입하였다. Y-27632는 Welfide Corporation (Osaka, Japan)으로부터 기증 받았다.

2. 실험방법

가. 실험표본제작 및 근원성 장력의 측정

SHR과 WKY로부터 basilar artery는 다음과 같은 방법에 의해 제작하였다. 먼저 쥐를 마취시킨 후 basilar artery를 적출하였다. 적출한 조직을 95% O₂ + 5% CO₂로 포화시킨 Krebs-Henseleit 용액 (mM: NaCl 119, KCl 4.6, CaCl₂ 2.5, KH₂PO₄ 1.2, MgSO₄ 1.5, NaHCO₃ 25, glucose 11)에 담근 상태에서 preparation chamber에 핀을 이용하여 고정시킨 후 현미경하에서 혈관 주위의 결체조직을 안과용 미세가위 및 핀셋을 이용하여 조심스럽게 제거하였다. 이후 혈관을 helical strip형태로 만들어 혼합기체가 공급되고 37°C로 일정하게 유지되는 Krebs-Henseleit 용액에서 4mN의 안정장력을 가한 후 1시간 정도 평형시킨 다음 장력측정에 사용하였다. 모든 실험에서 용액에 적신 면봉으로 혈관 내면을 가볍게 문질러 내피세포를 제거하였으며 내피세포의 제거여부는 50.5mM 고농도 K⁺ 용액 (정상 Krebs-Henseleit 용액의 조성중 KCl의 농도가 50.5mM되게 NaCl을 감소시켜 만든 용액)으로 혈관수축을 유도한 후 10⁻⁶M acetylcholine을 처치하였을 경우 이완이 되지 않는 것으로 확인하였다.

1시간 동안의 평형으로 안정장력이 일정해진 후 helical strip을 안정장력시에 나타나는 길이의 50%에 해당되는 길이 만큼 추가로 신장시켰다. Helical strip을 신장시켰을 때 발생하는 장력의 변화 (근원성 장력)를 측정하면서 장력이 일정해졌을 때 세포외부의 Ca²⁺를 제거하였을 경우 또는 nifedipine, H-7, calphostin C 및 Y-27632를 각각 처치하였을 때 근원성 장력의 변화를 관찰하였다.

나. Western Blot

SHR 및 WKY으로부터 basilar artery를 분리한 후 조직에 부착된 결체조직과 지방조직을 조심스럽게 제거한 후 dry ice/acetone을 사용하여 급속냉동 시킨 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 Na₃VO₄, 10mM NaF, 0.25% (wt/vol) sodium deoxycholate, 100 μ M ZnCl₂, 20mM β -glycerophosphate, 20 μ M phenylmethylsulfonyl fluoride가 함유된 buffer에서 homogenization 시켰다. Protein-matched sample (30 μ g protein/lane)을 10% SDS-polyacrylamide gel에 전기영동 시킨 후 Millipore Immobilon-P membrane에 transfer시켰

다. Membrane을 5% dried milk가 함유된 PBS-Tween buffer에서 1시간 동안 (room temperature) incubation 한 후 primary antibody, PKC α (1:500; Transduction Laboratory), PKC ϵ (1:500; Santa Cruz), 및 Rho A (1:200; Santa Cruz) 존재 하에 4°C에서 overnight 시키면서 incubation 하였다. 다음날 membrane을 세척한 후 horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (1:10,000; Calbiochem)에 1시간동안 실내온도에서 incubation 하였다. Immunoreactive band는 enhanced chemiluminescence (ECL; Amersham)로 발색시켰다. ECL에 의해 발색된 필름을 scan한 다음 PKC isoform 및 RhoA의 상대적인 양은 TINA 2.0 program (Raytest; Germany)이 설치된 Fuji Photo Film Image를 사용하여 X-ray film의 densitometry에 의해 정량하였다.

다. PKC isoform 및 rhoA의 translocation

혈관조직에서 신장에 의해 PKC α 및 PKC ϵ 과 rhoA 단백질의 translocation을 규명하기 위해 SHR과 WKY에서 세포질과 세포막성분을 분리하여 western blot 하였다. 이때 충분한 양의 세포질과 세포막 성분을 얻기 위해 각 실험군마다 최소한 8마리의 쥐로부터 basilar artery를 취하였다. 신장된 조직은 신장에 의한 근원성 장력이 유발되어 일정해진 후에 취하였으며, 신장시키지 않은 조직은 안정장력만 가한 후 취하였으나 신장시킨 조직과 동일한 시간동안 incubation 한 후 취하였다. 상기의 방법으로 얻은 조직을 liquid N₂-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 원심분리 시킨 다음 상층액을 취하여 이를 세포질성분으로 하였다. 세포막성분은 침전물을 0.1% Triton X-100이 첨가된 homogenization용액에 부유시켜 4°C에서 10분간 incubation 한 다음 추출하였고, 이 추출물을 100,000g(4°C)에서 60분간 원심분리 한 후 상층액을 취하여 세포막성분으로 하였다. 상기의 방법으로 얻은 두 성분의 protein-matched sample을 western blot과 동일한 방법으로 immunoblot하였다.

라. 통계처리

장력실험에 표시된 실험결과는 50.5mM 고농도 K⁺ 용액에 의한 수축반응의 백분율로 표시하였으며 모든 실험결과는 mean \pm S.E.로 표시하였다. 한 마리의 쥐로부터 하나의 strip만 취하였으며, "n"은 실험동물수를 나타낸다. 또한 각기 다른 실험은 항상 새로운 strip을 사용하였다. 각 실험군 간의 통계처리는 Student *t* test를 실시하여 *p* value가 0.05 미만인 것을 유의한 것으로 하였다.

III. 결 과

1. SHR과 WKY의 basilar artery에서 신장에 장력에 미치는 영향

SHR과 WKY에서 신장에 의해 유발되는 근원성 장력의 크기를 비교하기 위해 SHR과 WKY에서 분리한 basilar artery를 신장시킨 후 장력의 변화를 관찰하였다. Fig. 1에서 보는 바와 같이 세포외액에 2.5 mM Ca^{2+} 이 존재하는 조건에서 SHR과 WKY의 혈관조직을 신장시켰을 때 초기에는 수동적 장력 (passive tension)만이 유발되고 이후 서서히 감소되었다. 그러나 수동적 장력이 유발된 후 일부 감소되었던 장력이 다시 서서히 증가되어 유지됨을 알 수 있었다. 이와 같이 초기 수동적 장력 발생 후에 나타나는 이차적인 장력의 증가를 근원성 장력의 크기로 하였다. 이때 신장에 의한 근원성 장력의 크기는 Fig. 2에서 보는 바와 같이 SHR의 경우 50.5mM 고농도 K^+ 용액의 $62.1 \pm 12.2\%$ 이었고 WKY의 경우 $38.2 \pm 6\%$ 로서 SHR이 WKY보다 신장에 의한 근원성 장력을 보였다 ($p < 0.05$, $n = 14$).

이와는 달리 외부 Ca^{2+} 이 존재하지 않는 조건에서 SHR과 WKY의 혈관조직을 신장시켰을 경우, SHR은 근원성 장력이 유발되나 WKY는 근원성 장력이 유발되지 않았다 (Fig. 1). 이때 SHR의 경우 신장에 의한 근원성 장력은 $15 \pm 1.2\%$ (Fig. 2, $n = 14$)로 세포외액의 Ca^{2+} 이 존재하는 실험조건에서 보다 현저히 작은 것을 알 수 있다.

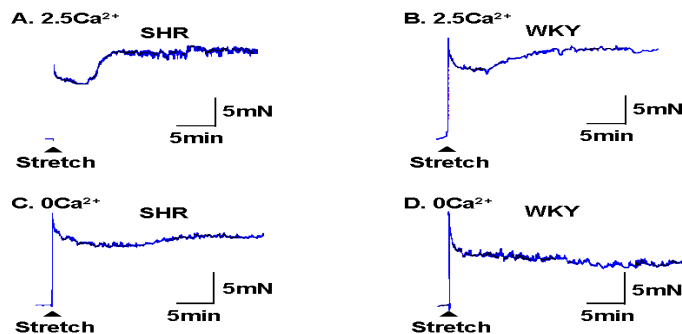


Fig. 1. Typical records of myogenic tone induced by stretch in basilar artery of SHR and WKY. A & B, Typical record of changes in tension by stretch in the presence of extracellular Ca^{2+} (2.5mM Ca^{2+} ; 2.5 Ca^{2+}). C & D, Typical record of changes in tension by stretch in the absence of extracellular Ca^{2+} (0 Ca^{2+}). Helical strips were stretched passively to the optimal length by imposing a stretch of 50% of resting length.

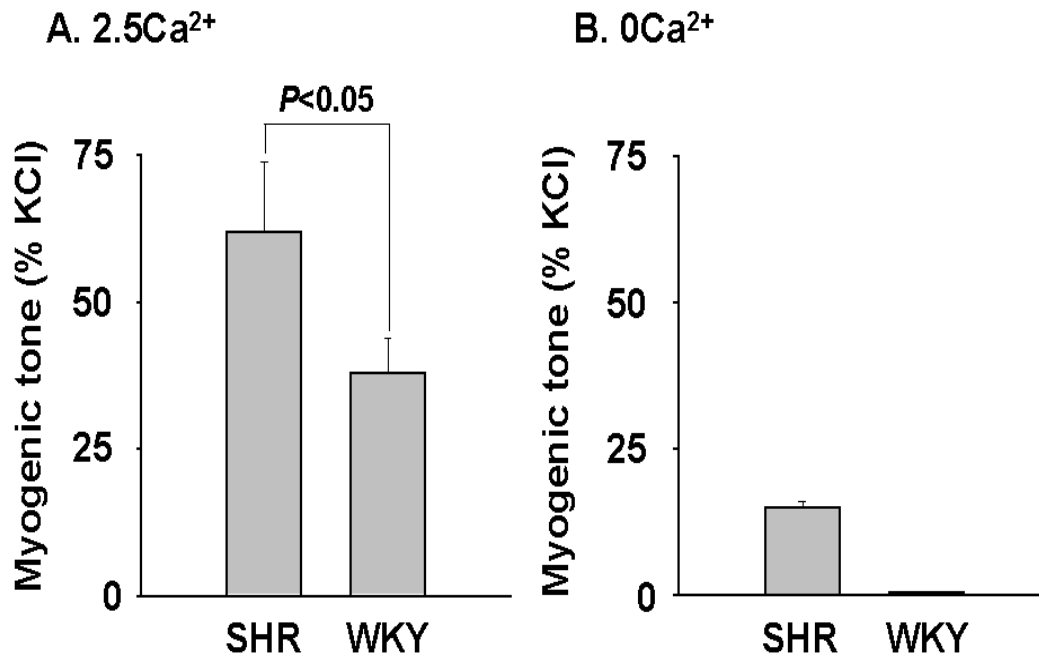


Fig. 2. Statistical analysis of the amplitude of myogenic tone induced by stretch between SHR and WKY. A, Comparison of amplitudes of myogenic tone between SHR and WKY in the presence extracellular Ca²⁺ (2.5mM Ca²⁺; 2.5Ca²⁺). B, Comparison of amplitudes of myogenic tone between SHR and WKY in the absence of extracellular Ca²⁺ (0Ca²⁺). Data are expressed as relative percentage of 50.5mM high K⁺ response. Results are expressed as mean±S.E. (n=14).

2. Nifedipine이 신장에 의한 장력 변화에 미치는 영향

신장에 의해 근원성 장력이 유발될 때 이의 유발기전을 규명하기 위해 막전압 의존성 Ca²⁺ 통로 차단제인 nifedipine의 효과를 관찰하였다 (Fig. 3). 먼저 SHR과 WKY에서 긴장에 의해 유발된 장력의 증가가 일정하게 유지된 후 10⁻³M nifedipine을 처치하여 본 결과 신장에 의해 유발되었던 근원성 장력은 두 동물 모두에서 감소되었다. 이때 nifedipine에 의한 근원성 장력의 감소정도는 SHR에서 23.2±2.3% (n=8), WKY에서는 20.2±3.6% (n=8)로 SHR과 WKY간에는 유의한 차이가 없었다.

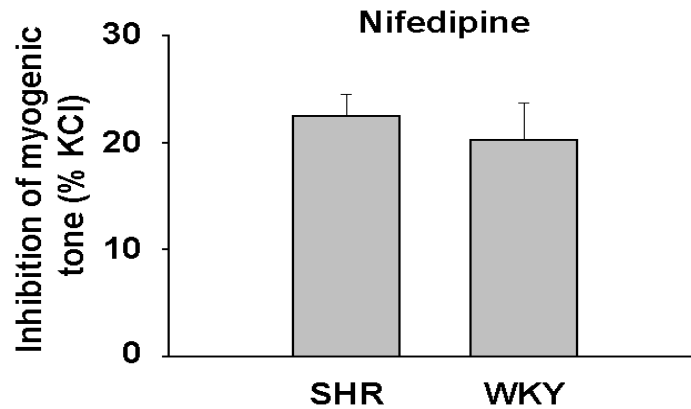


Fig. 3. Effect of nifedipine on the stretch-induced myogenic tone. Nifedipine (10^{-7} M) was added when stretch-induced myogenic tone was stable. Data are expressed as relative percentage of 50.5mM high K^+ response. Results are expressed as mean \pm S.E. (n=8).

3. Rho-kinase와 PKC 억제제가 신장에 의한 장력 변화에 미치는 영향

신장에 의한 근원성 장력의 유발에 rhoA 단백질 및 PKC가 관여하는지를 규명하기 위해 rho-kinase 억제제인 Y-27632 (Fig. 4) 및 PKC 억제제인 H-7 과 calphostin C (Fig. 5)의 효과를 관찰하였다. 먼저, SHR과 WKY에서 근원성 장력에 small G-protein인 rhoA의 역할을 관찰하기 위해 rho-kinase 억제제인 Y-27632의 효과를 관찰하였다 (Fig. 4). SHR과 WKY에서 신장에 의해 근원성 장력이 유발되어 일정해졌을 때 10^{-5} M Y-27632를 처리하였을 경우 Y-27632는 SHR과 WKY에서 모두 신장에 의해 유발된 근원성 장력을 억제하였으나, WKY에서 보다 SHR에서 그 억제정도가 현저하게 ($p < 0.05$) 큼을 알 수 있었다. 즉, Y-27632에 의한 근원성 장력의 억제정도는 SHR의 경우 $21.3 \pm 3.2\%$ 이었고 WKY의 경우 $11.2 \pm 13\%$ 이었다 ($p < 0.05$, n=9).

한편, PKC의 역할을 규명하기 위해 10^{-5} M H-7과 5×10^{-7} M calphostin-C의 효과를 관찰한 결과 Fig. 5에서 보는 바와 같이 SHR과 WKY에서 신장에 의해 유발된 근원성 장력은 이들 약물에 의해 모두 감소되었다. 그러나 두 약물에 의한 근원성 장력은 WKY에서 보다 SHR에서 현저하게 ($p < 0.05$) 감소됨을 알 수 있었다. 즉, SHR의 경우 H-7과 calphostin-C에 의해 근원성 장력의 감소정도가 각각 $12.2 \pm 2.2\%$ 및 $12.3 \pm 3.1\%$ (n=8)이었으나, WKY의 경우 각각 $5.3 \pm 2.1\%$ 및 $6.3 \pm 1.7\%$ (n=8) 이었다.

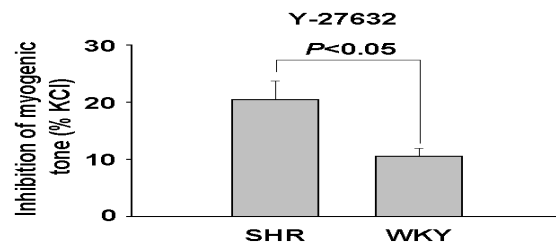


Fig. 4. Effect of Y-27632 on the stretch-induced myogenic tone. Y-27632 (1 μ M) was added when stretch-induced myogenic tone was stable. Data are expressed as relative percentage of 50.5mM high K^+ response. Results are expressed as mean \pm S.E. (n=9).

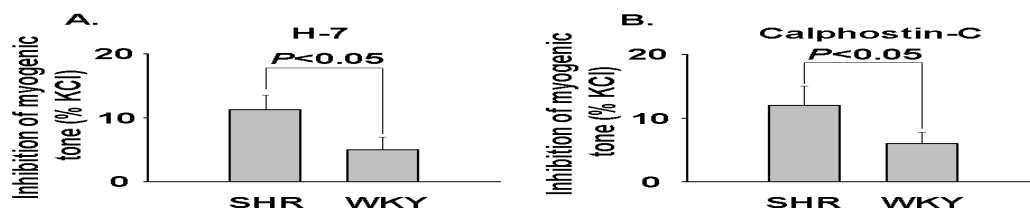


Fig. 5. Effect of H-7 and calphostin-C on the stretch-induced myogenic tone. H-7 (10^{-5} M) and calphostin-C (5×10^{-7} M) was added when stretch-induced myogenic tone was stable. Data are expressed as relative percentage of 50.5mM high K^+ response. Results are expressed as mean \pm S.E. (n=8).

4. 신장이 rhoA 단백질과 PKC의 translocation에 미치는 영향

SHR과 WKY의 basilar artery에 존재하는 rhoA 단백질 및 PKC isoforms의 양을 비교하기 위해 rhoA 및 PKC isoform specific antibody를 사용해 western blot한 결과 Fig. 6에 나타낸 바와 같다. 그림에서 보는 바와 같이 동일한 단백질 양으로 western blot한 결과 PKC α 는 SHR과 WKY에서 거의 유



Fig. 6. Immunoblots of PKC- α , - ϵ , and rhoA in isolated basilar

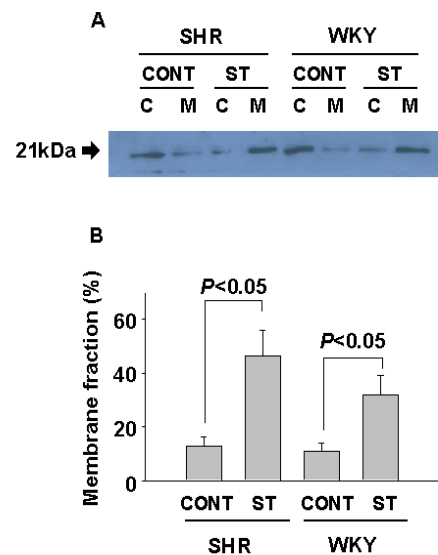


Fig. 7. Stretch-induced translocation of rhoA. A, Typical data for stretch-induced translocation of rhoA. Results are representative of five experiments showing that rhoA is translocated from the cytosol(C) to the membrane(M) fraction by stretch (ST) in both SHR and WKY. B, Statistical analysis for changes in membrane fraction by stretch in both SHR and WKY. Results are expressed as mean \pm S.E. CONT: non-stretched tissues.

사한 정도의 band를 보였으나, PKC ϵ 및 rho A는 WKY보다 SHR에서 더욱더 강한 band를 보였다.

신장에 의해 rhoA가 세포질에서 세포막으로 translocation되는지를 확인하기 위해 실험한 결과 Fig. 7에서 보는 바와 같이 SHR과 WKY에서 신장시키지 않은 조직에서는 rhoA가 세포질에 다량 존재하였으나 신장에 의해서는 세포막에 존재하는 rhoA의 함량이 증가함을 알 수 있다. 즉, SHR의 경우 rhoA의 세포막 성분은 신장시키지 않은 조직에서 $12.7 \pm 3.4\%$ 였으나 신장에 의해 $46.3 \pm 9.6\%$ 로 유의있게 ($p < 0.05$, $n = 5$) 증가하였고, WKY에서도 신장시키지 않은 조직에서 $11.0 \pm 2.9\%$ 였으나 신장에 의해 $32.1 \pm 7.1\%$ 로 유의있게 ($p < 0.05$, $n = 5$) 증가하였다. 그러나 WKY에서보다 SHR에서 rhoA 단백질의 translocation 정도가 많음을 알 수 있다.

한편 신장에 의한 PKC isoforms의 translocation을 확인하기 위해 세포질과 세포막 성분에서 PKC α 와 PKC ϵ 의 함량변화를 관찰하였다 (Fig. 8). 그림에서 보는 바와 같이 PKC α 의 경우 SHR과 WKY에서 신장에 의해 거의 유사한 정도의 세포막 성분이 증가함을 알 수 있다. 즉, 신장시키지 않은 조직에서 SHR과 WKY의 세포막 성분은 각각 $10.4 \pm 4.7\%$ 및 $8.3 \pm 2.2\%$ ($n = 5$)였으나 신장시킨 조직의 세포막 성분은 각각 $52.6 \pm 7.4\%$ 및 $50.2 \pm 9.1\%$ ($n = 5$)로서 신장에 의해 PKC α 의 translocation은 유의있게 ($p < 0.05$) 증가하나 SHR과 WKY에서 PKC α 의 translocation이 거의 유사한

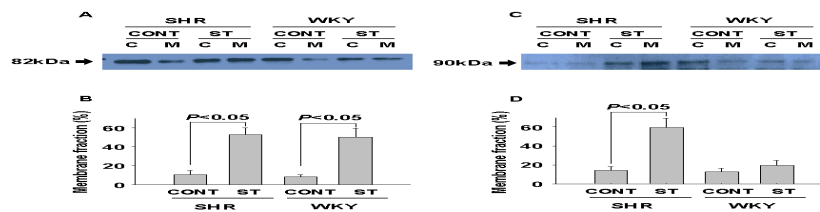


Fig. 8. Stretch-induced translocation of PKC α (A) and PKC ϵ (C). Results are representative of five experiments. B & D, Statistical analysis for changes in membrane fraction by stretch in both SHR (B) and WKY (D). Results are expressed as mean \pm S.E.

정도로 일어남을 알 수 있다. 그러나 PKC ϵ 의 경우 신장에 의해 translocation이 SHR에서만 일어남을 알 수 있다. 즉, SHR에서 세포막 성분은 신장시키지 않은 경우 $14.3 \pm 3.9\%$ ($n=5$), 신장시킨 경우 $59.3 \pm 10.1\%$ ($n=5$)로 translocation이 유의하게 ($p<0.05$) 증가하나, WKY에서는 $12.5 \pm 4.2\%$ ($n=5$) 및 $19.5 \pm 5.2\%$ ($n=5$)로 거의 유사하였다.

IV. 고 찰

고혈압의 특징인 말초혈관 저항의 증가에 관여하는 기전은 아직까지 규명되지 않고 있다. 그러나 혈관 긴장도에 관여하는 기전의 변화는 고혈압의 형성 및 유지에 관여할 수 있다. 즉, 정상혈압 동물에서 혈관을 이완시키는 기전이 억제되거나, 혈관을 수축시키는 기전이 항진될 경우 말초혈관 저항의 증가에 관여할 수 있다. 따라서 혈관평활근의 압력변화에 의한 근원성 수축은 저항 혈관에서 장력의 주된 결정인자이고⁷ 근원성 수축은 증가된 혈관내압의 결과로서 나타나는 것이므로²⁴ 고혈압에서처럼 증가된 말초저항의 형성과 유지에 관여할 수 있다. 이에 본 연구에서는 고혈압동물 모델인 SHR에서 증가된 근원성 장력이 SHR의 형성 및 유지에 관여하는지를 규명하고자 SHR과 WKY에서 신장에 의한 근원성 장력의 크기를 비교하였다. 본 연구결과 세포외액에 Ca^{2+} 이 존재할 경우 신장에 의해 유발되는 근원성 장력은 WKY에서 보다 SHR에서 크게 나타남을 알 수 있었고, 세포외액에 Ca^{2+} 이 존재하지 않을 경우 신장에 의한 근원성 장력은 WKY에서는 유발되지 않았으나 SHR에서는 근원성 장력이 유발되었다. 이러한 연구는 SHR에서 근원성 장력의 증가가 SHR의 특징인 증가된 말초혈관 저항에 관여할 것이라는 것을 제시한다. 근원성 장력에 대한 최근의 연구는 저항혈관에서 안정장력을 조절하는데 관여하는 기전과 이러한 기전이 고혈압의 특징인 증가된 말초혈관 저항에 관여하는지를 규명하는 것이다. 본 연구결과와 유사하게 SHR의 cremaster의 혈관²⁵ 과 신장혈관²⁶에서 증가된 근원성 장력이 보고되었으며, 고혈압환자에서도 압력 변화에 반응하는 증가된 혈관수축 반응이 보고되었다.²⁰ 따라서 근원성 장력은 말초혈관 저항의 증가에 관여할 수 있다는 것을 제시한다.

고혈압에서 근원성 장력이 증가하는 기전은 아직까지 밝혀지지 않았다. 그러나 고혈압은 전형적으로 동맥혈관 근육층이 두꺼워 지고 혈관내강이 좁아지면서 근육층과 혈관내강의 비가 증가한다.²⁷ 이런 구조적인 변화는 근원성 장력의 증가를 초래할 수 있다. 그러나 20주령의 SHR에서 근육층과 혈관내강이 WKY에서 보다 각각 증가, 감소되어 있음에도 불구하고 혈관내압의 증가에 따른 근원성 장력의 변화가 SHR과 WKY에서 유사하였고,²⁸ SHR의 작은 mesenteric artery에서도 유사한 결과가 보고되었다.²⁹ 또한 근육층과 혈관내강의 변화가 동반되지 않고 혈압만 증가된 SHR의 동맥에서 근원성 장력이 증가됨이 보

고되었다.^{25-26,30} 따라서 고혈압에서의 특징인 혈관 근육층의 증가가 근원성 장력 증가의 기전으로 작용하는지는 더욱 더 규명되어야 할 과제인 것 같다.

한편, aortic coarctation에 의해 유발된 고혈압 쥐의 대동맥에서 세포외액의 Ca^{2+} 을 제거하였을 경우 기초장력이 현저하게 감소되는데 반해 정상혈압 쥐에서는 기초장력의 변화가 관찰되지 않았다.³¹ 이것은 고혈압 쥐의 대동맥은 외부의 혈관 수축제가 존재하지 않는 조건에서도 어느 정도의 기초장력을 가지고 있고, 더욱 더 어려운 기초장력이 세포외액의 Ca^{2+} 에 의존적임을 암시한다. 따라서 본 연구에서도 SHR에서 증가된 근원성 장력의 형성이 세포외액으로부터의 Ca^{2+} 유입 증가에 기인하는 것인지를 확인하기 위해 막전압 의존성 Ca^{2+} 통로 차단제인 nifedipine의 효과를 SHR과 WKY에서 비교하였다. 본 실험에서는 기초장력 상태에서 조직을 신장시켰을 때 근원성 장력이 유발된 상태에서 nifedipine을 처치하였을 경우 SHR과 WKY에서 모두 근원성 장력이 현저하게 감소하였다. 그러나 그 감소정도는 두 실험동물간의 거의 차이가 없음을 알 수 있었다. 비록 안정시 세포내 Ca^{2+} 농도가 SHR 및 aortic coarctation에 의한 고혈압 쥐의 혈관평활근에서 높게 유지되고^{32,33}, 이러한 것이 Ca^{2+} 통로 활성화 변화에 기인한다는 보고³⁴ 등이 있으나 기초장력상태에서 가한 신장에 의한 막전압 의존성 Ca^{2+} 통로 활성화 증가는 SHR과 WKY에서 유사할 수도 있다. 한편, nifedipine에 의한 근원성 장력의 감소가 SHR과 WKY에서 차이가 없는 것은 본 연구에서 사용한 nifedipine의 농도가 다른 연구자가 사용한 농도 ($10^{-5}M$)보다 낮은 농도³⁵여서 이런 결과를 초래할 수 있다. 그러나 $10^{-7}M$ nifedipine이 거의 대부분의 근원성 장력을 감소시킨다는 보고³⁶로 미루어 볼 때 본 연구결과가 낮은 농도의 nifedipine에 의한 것은 아닌 것으로 생각된다.

본 연구에서 세포외액의 Ca^{2+} 을 제거하였을 경우 WKY에서는 나타나지 않지만 SHR에서는 그 크기가 작기는 하나 신장에 의한 근원성 장력이 유발되었으며, 세포외액의 Ca^{2+} 이 존재하는 조건에서도 신장에 의한 근원성 장력이 nifedipine에 의해 완전히 억제되지 않음을 알 수 있었다. 이러한 결과는 신장에 의한 근원성 장력의 기전에 Ca^{2+} 감수성이 관여함을 시사한다. 최근에 rhoA 단백질이 Ca^{2+} 감수성에 관여한다는 연구결과들이 보고되었으며,³⁷⁻³⁹ rhoA 단백질에 의한 Ca^{2+} 감수성이 근원성 장력의 형성에도 관여함이 증명되었다.³⁴ 만일 SHR에서 rhoA 단백질의 양이나 활성도가 WKY에서 보다 증가한다면 이것으로 인해 SHR에서 증가된 근원성 장력이 유발될 수 있다. 본 연구에서 이를 확인하기 위해 일련의 실험결과 첫째, rho-kinase 억제제인 Y-27632가 신장에 의한 근원성 장력을 WKY에서 보다 SHR에서 현저히 감소시킴을 확인하였고, 둘째 본 연구에서 rhoA 단백질의 DNA양을 정량하지 않았으나 동일한 단백질 함량으로 western blot한 결과 rhoA의 band가 WKY에서 보다 SHR에서 더욱 더 강하게 나타났으며, 마지막으로 SHR과 WKY에서 rhoA 단백질이 신장에 의해 세포질에서 세포막으로 모두 translocation 되나 그 정도가 WKY에서 보다 SHR에서 더욱 더 현저하였다. 따라서 SHR에서 rhoA 단백질의 함량 및 활성도 증가에 의한 Ca^{2+} 감수성의 증가가 신장에 의한 근원성 장력의 증가에 관여함을 알 수 있었다.

한편, 본 연구에서는 SHR에서 증가된 근원성 장력의 형성에 Ca^{2+} 감수성이 관여함을 확인하였고, 이러한 Ca^{2+} 감수성에 rhoA/rho-kinase이외에 PKC가 관여함을 알 수 있었다.

먼저 PKC 억제제인 H-7과 calphostin-C가 신장에 의한 근원성 장력을 WKY에서 보다 SHR에서 현저히 감소시킴을 확인하였다. 또한 동일한 단백질 함량으로 western blot한 결과 PKC α 는 SHR과 WKY에서 유사한 정도의 band를 보였으나 PKC ϵ 의 band는 WKY보다 SHR에서 더욱 더 강하게 나타났다. 마지막으로 PKC가 신장에 의해 활성화되는지를 관찰하기 위해 조직을 신장시킨 후 근원성 장력이 일정해졌을 때 세포질과 세포막 성분에서 PKC를 western blot한 결과 PKC α 의 경우 SHR과 WKY에서 유사한 정도의 translocation을 보이나 PKC ϵ 의 경우 SHR에서만 세포질에서 세포막으로 translocation 되었다. 따라서 PKC α 의 경우 근원성 장력의 형성에 관여한다는 이전의 보고³⁴와 유사하나 SHR의 증가된 근원성 장력의 형성에는 관여하지 않는 것으로 생각되고, PKC ϵ 의 경우 SHR에서 단백질의 함량 및 활성도의 증가에 의해 SHR의 증가된 근원성 장력의 형성에 관여하는 것으로 생각된다. PKC는 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. 따라서 PKC α 는 SHR과 WKY에서 모두 근원성 장력 형성에 관여하고, PKC ϵ 은 SHR의 증가된 근원성 장력의 형성에 관여할 것으로 생각된다.

만일 rhoA 단백질과 PKC ϵ 의 translocation이 신장에 의한 근원성 장력에 관련이 있다면 이에 관여하는 기전이 규명되어야 한다. 본 연구에서는 그 기전을 완전하게 규명할 수는 없었으나 이전의 연구결과로 볼 때 rhoA 및 PKC가 활성화되어 myosin light chain의 인산화를 증가시킬 것으로 생각된다.³⁴ 즉, rhoA나 PKC가 myosin light chain phosphatase의 활성도를 억제시켜 myosin light chain의 인산화를 증가시키는 것이다.^{34,40} 그러나 본 연구의 결과로부터 신장 rhoA와 PKC를 활성화시키는 기전을 규명할 수는 없었다. 다만 PKC의 경우 혈관내압이 증가할 때 G-protein과 phospholipase C를 활성화시키고, 활성화된 phospholipase C에 의해 phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate로부터 형성된 dicylglycerol에 의해 PKC가 활성화된다는 보고가 있다.⁴⁷

이상의 연구결과를 종합하여 볼 때 SHR에서 신장에 의한 근원성 장력은 WKY의 경우보다 크게 나타났으며, 이러한 SHR에서의 증가된 근원성 장력은 rhoA 단백질과 PKC ϵ 의 양적 증가 및 활성도 증가에 기인하는 것으로 생각된다.

V. 결 론

SHR에서 증가된 근원성 장력이 SHR의 형성 및 유지에 관여하는지를 규명하고자 1) SHR과 WKY에서 신장에 의한 근원성 장력의 크기를 비교하고, 2) SHR과 WKY에서 근원성 장력의 형성에 관여하는 기전을 규명하고자 SHR과 WKY의 basilar artery를 신장시켰을 때 수축반응, rhoA 단백질 및 PKC의 immunoblot 및 translocation을 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 세포외액에 Ca^{2+} 이 존재하는 실험조건에서 basilar artery를 신장시켰을 때 SHR과

WKY에서 모두 근원성 장력이 유발되나 WKY에서 보다 SHR에서 큰 근원성 장력을 보였다. 그러나 세포외액에 Ca^{2+} 이 존재하지 않을 경우에는 SHR에서만 신장에 의해서 근원성 장력이 유발되었을 뿐 WKY에서는 신장에 의해 근원성 장력이 유발되지 않았다.

2. 신장에 의한 근원성 장력은 막전압 의존성 Ca^{2+} 통로 차단제인 nifedipine에 의해 SHR 및 WKY에서 모두 억제되었으며 그 억제 정도는 유사하였다.

3. Rho-kinase 억제제인 Y-27632는 SHR 및 WKY에서 신장에 의한 근원성 장력을 모두 억제하였으나 그 억제 정도는 WKY에서 보다 SHR에서 더욱 더 현저하였다. 한편, PKC 억제제인 H-7이나 calphostin C 역시 신장에 의한 근원성 장력을 현저하게 억제시켰으며, 그 억제 정도는 WKY에서 보다 SHR에서 더욱 더 현저하였다.

4. RhoA 및 PKC isoforms-specific antibody를 사용한 immunoblotting 결과 PKC α 의 경우 SHR과 WKY에서 유사한 정도의 band를 보였으나 rhoA 및 PKC ϵ 는 WKY보다 SHR에서 더욱 더 강한 band를 보였다.

5. RhoA 단백질은 SHR과 WKY에서 모두 신장시키지 않은 혈관조직에서는 세포질에 다량 존재하였으나 신장에 의해 세포막으로 translocation 하였다. 그러나 translocation의 정도는 WKY보다 SHR에서 더욱 더 많이 일어났다.

6. PKC α 는 SHR 및 WKY에서 모두 신장에 의해 세포질에서 세포막으로 유사한 정도로 translocation 하였으나 PKC ϵ 의 경우에는 SHR에서만 translocation이 일어났고 WKY에서는 일어나지 않았다.

이상의 실험을 종합하여 볼 때 SHR에서 신장에 의한 근원성 장력은 WKY의 경우 보다 크게 나타났으며, 이러한 증가는 rhoA 단백질과 PKC ϵ 의 양적 증가 및 활성화 증가에 기인하는 것으로 생각된다.

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. Harder DR. Pressure-dependent membrane depolarization in cat middle cerebral artery. *Circ Res* 1984;55:197-202.
 5. 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.
 6. Meininger GA, Davis MJ. Cellular mechanism involved in the vascular myogenic responses. *Am J Physiol* 1992;263:H647-H659.
 7. 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.
 8. 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.
 9. 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.
 10. 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.
 11. Pfitzer G, Arner A. Involvement of small GTPase in the regulation of smooth muscle contraction. *Acta Physiol Scand* 1998;164:449-456.
 12. 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.
 13. Somlyo AP, Somlyo AV. From pharmacomechanical coupling to G-proteins and myosin phosphatase. *Acta Physiol Scand* 1998;164:437-448.
 14. Yeon DS, Kim JS, Ahn DS, Kwon SC, Kang BS, Morgan KG, Lee YH. Role of protein kinase-C or RhoA-induced Ca^{2+} sensitization in stretch-induced myogenic tone. *Cardiovas Res* 2001;in press.
 15. Folkow B. Transmural pressure and vascular tone-some aspects of an old

- controversy. *Arch Int Pharmacodyn* 1962;324:455-469.
16. Meininger GA, Trzeciakowski. Combined effects of autoregulation and vasoconstrictors on hindquarters vascular resistance. *Am J Physiol* 1990;258:H1032-H1042.
 17. Osol G, Halpern W. Myogenic properties of cerebral vessels from normotensive and hypertensive rats. *Am J Physiol* 1985;249:H914-H921.
 18. Huang A, Sun D, Koller A. Endothelial dysfunction augments myogenic arteriolar constriction in hypertension. *Hypertension* 1993;22:913-921.
 19. Pucci ML, Tong X, Miller KB, Guan H, Nasjletti A. Calcium- and protein kinase C-dependent basal tone in the aorta of hypertensive rats. *Hypertension* 1995;25:752-757.
 20. Henriksen O, Skagen K, Amtorp O, Hartling O. Augmented vasoconstrictor response to changes in vascular transmural pressure in patients with essential arterial hypertension. *Acta Physiol Scand* 1996;112:323-329.
 21. Folkow B. Structure factor in primary and secondary hypertension. *Hypertension* 1990;16:89-101.
 22. Mulvany MJ, Aalkjaer C. Structure and function of small arteries. *Physiol Rev* 1990;70:921-962.
 23. Mulvany MJ, Hansen PK, Aalkjaer C. Direct evidence that the greater contractility of resistance vessels in spontaneously hypertensive rats is associated with a narrowed lumen, a thickened media, and an increased number of smooth muscle cell layers. *Cir Res* 1978;43:854.
 24. Lombard JH. Neural and local control of the microcirculation in hypertension. In: Lee RMKW editor. *Blood Vessel Changes in Hypertension: Structure and Function*. Boca Raton, FL: CRC, 1989. vol 2, p.92-126.
 25. Falcone JC, Granger HJ, Meininger GA. Enhanced myogenic activation in skeletal muscle arteriole from spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol* 1993;265:H1847-H1855.
 26. Gebremedhin D, Ma Y-H, Imig JD, Harder DR, Roman RJ. Role of cytochrome P-450 in elevating renal vascular tone in spontaneously hypertensive rats. *J Vasc Res* 1993;30:53-60.
 27. Heagerty AM, Aalkjaer C, Bund SJ, Korsgaard N, Mulvany MJ. Small artery structure in hypertension: dual processes of remodeling and growth. *Hypertension* 1993;21:391-397.
 28. Garcia SR, Izzard AS, Heagerty AM, Bund SJ. Myogenic tone in coronary arteries from spontaneously hypertensive rats. *J Vasc Res* 1997;34:109-116.
 29. Izzard AS, Bund SJ, Heagerty AM. Myogenic tone in mesenteric arteries from spontaneously

- hypertensive rats. *Am J Physiol* 1996;270:H-H6.
30. Hayashi K, Epstein M, Loutzenhiser P. Pressure-induced vasoconstriction of renal microvessels in normotensive and hypertensive rats: Studies of the isolated perfused hydronephrotic kidney. *Circ Res* 1989;65:1475-1484.
 31. Susuno S, Osugi S, Yamamoto K, Shimamura K. Influence of the endothelium on the elevation of basal tension in aortae from various strains of spontaneously hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 1991;17(suppl 3):S137-S140.
 32. Losse H, Zidek W, Vetter H. Intracellular sodium and calcium in vascular smooth muscle of spontaneously hypertensive rats. *J Cardiovas Pharmacol* 1984;6(suppl 1):S32-S34.
 33. Papageorgiou P, Morgan KC. Intracellular free Ca^{2+} is elevated in hypertrophic aortic muscle from hypertensive rats. *Am J Physiol* 1991;260:H507-H515.
 34. Sharma RV, Bhalla RC. Calcium and abnormal reactivity of vascular smooth muscle in hypertension. *Cell Calcium* 1988;9:267-274.
 35. Watanabe J, Karibe A, Horiguchi S, Keitoku M, Satoh S, Takishima T, Shirato K. Modification of myogenic intrinsic tone and $[Ca^{2+}]_i$ of rat isolated arterioles by ryanodine and cyclopiazonic acid.
 36. Asano M, Kuwako M, Nomura Y, Suzuki Y, Shibuya M, Sugita K, Ito K. Possible mechanism of the potent vasoconstrictor responses to ryanodine in dog cerebral arteries. *Eur J Pharmacol* 1996;311:53-60.
 37. 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.
 38. Gong MC, Fujihara H, Somlyo AV, Somlyo AP. Translocation of rho A associated with Ca^{2+} sensitization of smooth muscle. *J Biol Chem* 1997;272:10704-10709.
 39. 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.
 40. Buus CL, Aalkjaer 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.
 41. Osol G, Iaher 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.

Abstract

Changes in myogenic tone in hypertension: Role of Rho A and Protein Kinase C

Jeong-Pil Seo

Department of BK 21 Project for Medical Sciences, The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Associate Professor Young-Ho Lee)

The myogenic response was originally described as the contraction of a blood vessel that occurred following an increase in intravascular distending pressure. Conversely, reductions in intravascular pressure produce myogenic vascular relaxation. Recent attention has focused on the potential role of the myogenic mechanism in the control of tone in the resistance vasculature, and in particular how this mechanism could contribute to the increased vascular resistance characteristic of hypertension. Therefore, in the present study, the role of myogenic tone on the generation and/or maintenance of hypertension was investigated by measuring contractile responses, protein kinase C (PKC) immunoblots, translocation of the PKC and rho A.

In the presence of extracellular Ca^{2+} , stretch of the resting vessel evoked a myogenic contraction in basilar artery of SHR and WKY rats. Myogenic tone was significantly greater in SHR than in WKY. However, in the absence of extracellular Ca^{2+} , stretch evoked a myogenic contraction in SHR, but not in WKY.

The stretch-induced myogenic tone was inhibited by treatment of the tissue with nifedipine, a blocker of voltage-dependent Ca^{2+} channel. The effect of nifedipine was similar in both SHR and WKY rats. The PKC inhibitors, H-7 and calphostin C, and a rho A-activated protein kinase (ROK) inhibitor, Y-27632, also inhibited the stretch-induced myogenic tone in both SHR and WKY rats. The inhibitory effects of PKC inhibitors and Y-27632 were greater in SHR than in WKY. Immunoblotting using isoform-specific antibodies showed rho A and PKC α were translocated from the cytosol to the cell membrane by stretch in both SHR and WKY. PKC ϵ , however, was translocated by stretch in SHR, but not in WKY.

These results suggest that stretch-induced myogenic tone was significantly greater in SHR than in WKY. Furthermore, increase in amount and/or activity of PKC ϵ and ROK may be key mechanisms for the enhanced myogenic tone in SHR.

Key Words: myogenic tone, SHR, WKY, rho-associated kinase (ROK), PKC, Y-27632