

기니픽 심장과 심근 세포에서 α_1 -Adrenergic 자극에 의한 Mg^{2+} 유리조절

강형섭·장성은·김진상

전북대학교 수의과대학 약리학교실 및 전북대학교 생체안전성연구소

Regulation of Mg^{2+} Release in Guinea Pig Heart and Isolated Ventricular Myocytes by α_1 -Adrenergic Stimulation. Hyung-Sub Kang, Sung-Eun Chang, and Jin-Sang Kim Department of Pharmacology, College of Veterinary Medicine, Chonbuk National University, Chonju, Chonbuk 561-756, Korea

Mg^{2+} is the fourth most abundant cation in cellular organisms. Although the biological chemistry and the physiological roles of the magnesium ion were well known, the regulation of intracellular Mg^{2+} in mammalian cells is not fully understood. More recently, however, the mechanism of Mg^{2+} mobilization by hormonal stimulation has been investigated in hearts and in myocytes. In this work we have investigated the regulation mechanism responsible for the Mg^{2+} mobilization induced by α_1 -adrenoceptor stimulation in perfused guinea pig hearts or isolated myocytes. The Mg^{2+} content of the perfusate or the supernatant was measured by atomic absorbance spectrophotometry.

The elimination of Mg^{2+} in the medium increased the force of contraction of right ventricular papillary muscles. Phenylephrine also enhanced the force of contraction in the presence of Mg^{2+} -free medium. α_1 -Agonists such as phenylephrine were found to induce Mg^{2+} efflux in both perfused hearts or myocytes. This was blocked by prazosin, a α_1 -adrenoceptor antagonist. Mg^{2+} efflux by phenylephrine was amplified by Na^+ channel blockers, an increase in extracellular Ca^{2+} or a decrease in extracellular Na^+ . By contrast, the Mg^{2+} influx was induced by verapamil, nifedipine, ryanodine, lidocaine or tetrodotoxin in perfused hearts, but not in myocytes. W_7 , a Ca^{2+} /calmodulin antagonist, completely blocked the phenylephrine-, A23187-, veratridine-, Ca^{2+} -induced Mg^{2+} efflux in perfused hearts or isolated myocytes. In addition, Mg^{2+} efflux was induced by W_7 in myocytes but not in perfused heart.

In conclusion, An increase in Mg^{2+} efflux by α_1 -adrenoceptor stimulation in hearts can be through IP_3 and Ca^{2+} -calmodulin dependent mechanism.

Key Words: α_1 -adrenoceptor, Magnesium, Cardiac myocytes, Phenylephrine, Heart

서 론

Mg^{2+} 은 일반적으로 생체에서 kinase, phosphatase 및 synthetases의 활성화를 위한 보조인자로, glycolysis, 지방 가수분해, DNA 합성 및 인산화의 조절인자로(Grubbs & Maguire, 1987), Ca^{2+} , K^+ 및 Na^+ 등의 수송을 조절하는 작용으로 세포의 대사를 조절할 뿐만 아니라(Grubbs &

Maguire, 1987; White & Hartzell, 1988; Horie et al, 1987; White & Hartzell, 1989) 수용체와 G-단백의 결합인자와 세포막 구성분을 안정화시켜 세포의 구조적 특성을 결정하고(Grubbs & Maguire, 1987; Maguire, 1984; Gunther, 1986), 세포의 bioenergetic를 조절하는 역할을 한다(White & Hartzell, 1989). 특히 다른 이온들처럼 심장의 생리적 기능을 조절하는 인자로 작용하고 있기 때문에 생체에서 필수적인 이온으로 인정되고 있다(White & Hartzell, 1988; White & Hartzell, 1989). 심근경색이나 심실 fibrillation과 같은 심맥관계 질환이 hypomagnesemia와 관

책임저자 : 김진상 ☎ 561-756 전북 전주시 덕진구 덕진동 1가 664-14, 전북대학교 수의과대학 약리학교실

런되는데 이 hypomagnesemia시 심장 세포내 Mg^{2+} 농도의 변동에 많은 관심이 집중되고 있다(Altura & Altura, 1985). 또한 Mg^{2+} 의 결핍은 심장 대사나 기능을 변동시키는데 그 중 허혈, 부정맥, 고혈압 및 심근경색에 대한 저항성이 감소되어 이들 질환이 잘 일어날 수 있고, 수술 후 회복기에 매우 유해한 결과를 일으킨다고 한다. 반면 지역적으로 Mg^{2+} 이 충분히 함유된 경수(hard water) 지역에서 거주하는 사람들의 허혈성 심장 질환이나 심장 관련 사망율이 현저히 낮다는 재미있는 보고가 있다(Anderson et al, 1975). 그래서 심장 세포내 Mg^{2+} 이 결핍되거나 특정 질환이나 약물에 의한 세포내 Mg^{2+} 변동은 곧 심장기능의 변동을 초래한다고 할 수 있다. 이와같이 Mg^{2+} 은 심장질환과 매우 밀접한 관련이 있을 뿐 아니라 그 기능에 대해서는 잘 알려져 있으나 Mg^{2+} 의 중요한 역할에 비하여 세포내 Mg^{2+} 항상성을 포함한 조절기전은 물론 호르몬이나 신경전달 물질 및 약물에 의한 심장 세포내 Mg^{2+} 조절기전에 대해서는 아직 잘 알려져 있지 않아서 심장에서의 Mg^{2+} 조절기전에 대한 연구 필연성을 강조하였다(White & Hartzell, 1989). 중요한 것은 심장세포에서 소량의 세포내 Mg^{2+} 양이 변동되어도 RNA translation, 세포막의 K^+ 과 Ca^{2+} 통로 활성도, 세포내 Ca^{2+} 저장소인 sarcoplasmic reticulum(SR)로부터 Ca^{2+} 유리 및 많은 효소활성 등과 같은 심장세포의 생리학적 기능에 현저한 영향을 주기 때문에 생리학적 또는 병리학적으로 세포내 Mg^{2+} 의 조절기전은 필연적인 연구분야이다.

α_1 -Adrenoceptor 자극은 많은 이온계의 변동을 일으켜 약리학적 생체반응을 일으키는 잘 알려져 있다. 그러나 심장에서 이 수용체 자극에 의한 Mg^{2+} 조절에 대해서는 전혀 연구된 바 없고, 단지 Jakob 등(1989)은 관류 흰쥐 간에서 phenylephrine이 Mg^{2+} 유리를 일으킬 수 있다는 실험 결과를 보고한 바 있어 심장에서도 α_1 -adrenoceptor 자극은 Mg^{2+} 을 변동시킬 수 있을 것으로 사료되었고, α_1 -adrenoceptor의 신호 전달계에 있어서 α_1 -adrenoceptor 자극시 세포막의 PLC(phospholipase C)를 활성화하여 phosphatidyl-inositol 4, 5-biphosphate(PIP_2)가 가수분해되어 두 종류의 second messenger인 IP_3 와 diacylglycerol(DAG)로 된다(Otani et al, 1986). 그래서 IP_3 는 세포내 Ca^{2+} 유리를 자극하고 DAG는 PKC를 활성화시키기 때문에 이들 second messenger를 경유한 Mg^{2+} 유리인지, 이들의 활성화에 의한 세포내 Ca^{2+} 및 Na^+ 같은 양이온의 변동으로 2차적인 Mg^{2+} 변동인지, 또는 심박수 변동에 의한 Mg^{2+} 변동인지를 규명하기 위하여 본 연구자 등은 관류 guinea pig 심장과 심근세포에서 Mg^{2+} 의 유리에 대한 α_1 -adrenoceptor 자극 효과와 이와 관련된 이온 조절에 의한 Mg^{2+} 의 변동을 관찰하여 α_1 -adrenoceptor 자극에 의한

Mg^{2+} 조절기전을 밝히고자 본 연구를 실시하였다.

실험재료 및 방법

심근 적출과 수축력 측정

체중 300 g 내외의 기니픽을 두부 타격 후 심장을 적출하여 $36^\circ C$, 95% O_2 : 5% CO_2 의 포화용액에서 혈액을 제거한 다음 stereozoom 현미경하에서 우심실로부터 직경 약 0.5~1 mm, 길이 2~3 mm의 유두근을 적출하였다. 적출한 유두근을 tissue chamber에 넣어 고정핀으로 sylgard 바닥에 고정하고 유두근의 원위부는 직경 25 μm 의 은선을 묶고 장력 transducer(Cambridge, M-405)에 연결하여 수축력을 측정하였다. 조직 chamber 통로를 통해 산소가 포화된 영양액($36\sim 37^\circ C$, 137 NaCl, 5.4 KCl, 1.05 $MgCl_2$, 0.45 NaH_2PO_4 , 11.9 $NaHCO_3$, 1.8 $CaCl_2$, 및 5 mM dextrose)을 관류시켰다. 영양액은 일정속도(8 ml/분)로 공급되어 근육 주위의 용액이 수초내에 다른 이온 농도 또는 다른 약물을 포함한 실험 용액으로 변동될 수 있다. 용액의 pH는 7.3~7.4가 되도록 하였다. 전기 자극은 자극기(WPI model 1830)로부터 자극 유리 장치를 경유한 사각파로 시행하였다. 자극 전압은 역치 전압보다 20~40% 높게 하고 근육은 1 Hz로 자극하였다. 장력 transducer를 통한 출력은 chart recorder(Gould)에 연결하여 계속 측정하였다. 이 transducer는 50 mV/mg의 감도까지 미세한 장력 변동을 측정할 수 있기 때문에 미세한 조직의 장력 측정에 유용하였다.

심장 관류 model과 Mg^{2+} 농도 측정

기니픽을 두부 타격 후 신속히 심장을 적출하여 산소 포화 용액(95% O_2 : 5% CO_2 , pH 7.3)에서 혈액을 제거한 다음 HEPES 완충 용액이 관류되고 있는 관류 system(open system)의 연결관에 심장의 대동맥 부위를 삽입하여 결찰한다. 심장의 관상동맥 등에서 혈액 응고를 방지하기위해 이 과정은 수십 초 이내에 실시하였다. 심장을 관류 system에 결찰 후 NaCl 120, KCl 3, $CaCl_2$ 1.2, $MgCl_2$ 1.2, KH_2PO_4 1.2, glucose 10, $NaHCO_3$ 12, 그리고 HEPES 10 mM의 영양액 ($37^\circ C$, 산소포화 pH 7.3)을 7~8 ml/min 속도로 관류시켰다. 15분 후 free Mg^{2+} , 또는 5~20 μM 의 Mg^{2+} 이 함유된 영양액을 공급하였는데 세포내 Mg^{2+} 농도가 낮아짐으로서 생리학적 세포기능이 변동될 수 있지만 이와 같이 낮은 농도의 Mg^{2+} 은 atomic absorbance spectrophotometry(AA)를 이용하여 관류된 용액으로부터 Mg^{2+} 농도를 측정하기에 적합한 조건으로 하기 위해서이다(Romani & Scarpa, 1990). 만약 free Mg^{2+} 또는 낮은

농도의 Mg^{2+} 용액을 사용하지 않으면 고농도의 Mg^{2+} 상태 하에서 μM 단위의 Mg^{2+} 농도 변동을 측정하기 어렵다. Free Mg^{2+} 용액을 관류하게 되면 그림 2A에서 보는 바와 같이 심장에서부터 유리된 Mg^{2+} 농도가 시간에 따라 매우 일정 농도씩 감소되고, 그 변동 범위가 수십 또는 수 μM 이므로 이때 심장의 어떤 조건이나 약물에 의한 소량의 변동도 관찰할 수 있다. Free Mg^{2+} 영양액을 관류시킨 후 15~20분 후 심장을 통해 관류된 영양액을 30초~1분 간격으로 취하기 시작하고 다시 15분 후에 적정량의 약물을 관류 용액에 직접 희석하여 관류시켰다. 약물의 관류 시간은 조건에 따라 변동시켰다. 이렇게 취한 관류 용액내 Mg^{2+} 농도는 AA를 이용하여 측정하였다. 이 AA에 의한 Mg^{2+} 농도 측정은 다른 농도 측정 방법보다 정확하지만(Romani & Scarpa, 1990) 이 Mg^{2+} 농도는 심장에서부터 유리된 Mg^{2+} 에 의한 것이므로 직접적인 세포내 Mg^{2+} 농도는 측정할 수 없는 단점이 있다. 그래서 본 실험에서는 세포내 Mg^{2+} 농도는 심장 세포를 사용하여 측정하였다(심근세포로부터 Mg^{2+} 측정 방법 참고). 그리고 실험 조건에 따라 심장의 박동수를 증가시키기 위해서 심장의 전기 자극 장치나, 고농도 KCl용액을 사용하였다. 살아있는 심근 세포내의 Mg^{2+} 측정은 아직까지 다른 여러 방법보다 ion-선택적 미세 전극을 이용한 방법이 정확하다고 한다(Buri et al, 1989). 그러나 세포의 죽, 관류된 용액내에서 Mg^{2+} 농도는 AA에 의한 측정법이 정확하다(Romani & Scarpa, 1990).

심근세포 분리 방법 및 Mg^{2+} 측정

심근세포의 분리는 De Young 등(1989)의 collagenase 소화방법을 개선하여 다음과 같이 실시하였다. 체중 300 g 내외의 guinea-pig을 두부 타격 후 즉시 흉강을 절개하여 대동맥의 길이가 최대한 길게 되도록 신속히 심장을 적출한다. 적출 심장의 대사속도를 가능한 감소시키기 위해 상온의 heparin이 첨가되고 충분히 산소로 포화된 Ca^{2+} -Joklik buffer로 빠른 시간내 세척하면서 대동맥의 길이가 5 mm 이상 되도록 절개한다. 절개된 대동맥을 open Langendorff system의 cannula에 삽입하여 현수하고 결찰 후 폐와 심낭등의 조직을 조심스럽게 절제한다. 두부 타격 후 open Langendorff system의 cannula에 결찰할 때까지의 시간은 1분 이내에 이루어져야 한다. Cannula의 삽입이 지연되거나 심장 절개시 부주의하면 혈관내 혈액 응고가 생기거나 심장의 손상을 초래할 수 있으므로 신중하면서 신속하게 실시하여야 한다. 관류액은 Ca^{2+} -Joklik buffer로 11.1 g/l Joklik membrane powder(Sigma), 10 glucose, 12 $NaHCO_3$, 0.5 mM $CaCl_2$, 95 % O_2 , 5 % CO_2 , pH 7.3~7.4, 온도는 $37^\circ C$ 이다. Buffer내 pH는 항상 일정

하게 유지하면서 관류를 실시한다. 현수된 심장에 Ca^{2+} -Joklik buffer로 5분간 관류하여 심장내 혈액 등을 완전히 제거한 다음 Ca^{2+} -free Joklik buffer로 관류액을 전환하여 심박동이 완전히 정지할 때까지 관류한다. Ca^{2+} -free Joklik buffer의 관류가 끝나면 collagenase buffer(collagenase 10 mg/30 ml Ca^{2+} -free Joklik buffer, Worthington)로 심장의 상태를 확인하면서 30~35분 동안 관류액을 재관류시키면서 소화시킨다. Collagenase buffer로 소화시키는 동안 약 30분째 0.5 mM Ca^{2+} 을 첨가하여 관류시킨다. Ca^{2+} -tolerant 심장세포 분리시 가장 중요시 되어야 할 점은 hypoxia와 Ca^{2+} -paradox로서 hypoxia를 예방하기 위해 항상 산소공급이 이루어져야 하며 Ca^{2+} -paradox를 예방하기 위해서 Ca^{2+} -free Joklik buffer에 점차적으로 Ca^{2+} 이 재도입되어야 한다. 갑작스런 Ca^{2+} 농도의 증가는 세포에 치명적인 손상을 초래한다(De Young et al, 1989). Collagenase buffer로 관류가 끝나면 0.5 mM Ca^{2+} -trypsin collagenase buffer(trypsin 10 mg/30 ml, Ca^{2+} -Joklik buffer, Sigma)로 10~15분 관류시킨다. 0.5 mM Ca^{2+} -trypsin collagenase buffer로 관류시키는 동안 약 5분 째 0.5 mM Ca^{2+} 더 첨가하여 관류액내 Ca^{2+} 농도를 1 mM이 되도록 하여 관류시킨다. 육안적으로 심장의 상태가 열린 pink색을 띄고 Table면에서 끈적한 점도가 느껴질 때 1.2 mM Ca^{2+} -Joklik buffer로 5분간 심장을 세척하고 1.2 mM Ca^{2+} - Mg^{2+} free-1.2 mM Ca^{2+} buffer로 5분간 관류시킨 후 Mg^{2+} free-1.2 mM Ca^{2+} buffer로 약 10분간 관류시킨다. Mg^{2+} free-1.2 mM Ca^{2+} buffer의 조성은 120 NaCl, 3 KCl, 1.2 $CaCl_2$, 1.2 KH_2PO_4 , 10 glucose, 12 $NaHCO_3$, 및 10 mM HEPES, pH 7.3~7.4, 온도는 $37^\circ C$ 이다.

관류가 끝나면 심방근과 심실근을 각각 완전히 분리하여 bovine serum albumin(100 mg/10 ml Mg^{2+} free-1.2 mM Ca^{2+} buffer, Sigma)이 첨가된 buffer에서 조심스럽게 흔들어 심실근세포를 분리한 다음, 심실근 세포의 부유액을 250 μm Nylon-guaze을 이용하여 여과한다. 분리한 세포는 상온에 30~60분 방치하여 안정화시킨 후 세포의 생존율을 현미경하에서 검경하여 세포의 형태가 전형적인 rod-shape을 하고 있는 것으로 70 % 이상의 세포 생존율이 있을 때 세포계산기를 이용하여 10^5 세포(10^5 cells/ml)를 배양하여 실험을 실시한다.

실험은 10^5 세포가 배양된 1 ml의 Mg^{2+} free-1.2 mM Ca^{2+} buffer를 시험관에 대조군 및 약물 투여군으로 분주하여 교반기가 장착된 warming bath에서 각각의 시험관을 1, 5, 10분 동안 배양 후 그 상층액만을 얻어서 AA로 Mg^{2+} 의 농도를 측정한다.

사용 약물

Phenylephrine, atenolol, propranolol, tetrodotoxin, H₇ dihydrochloride, verapamil, HEPES, trypsin, heparine, lidocaine(이상 Sigma), prazosin, W₇ hydrochloride, D-myo-inositol-1,4,5-triphosphate, nifedipine, ryanodine, chloroethylclonidine(CEC), WB4101, Bay K 8644, caffeine, cyclopiazonic acid, calcimycin(A23187), veratridine(이상 RBI), collagenase(Worthington biochemical corporation).

통계처리

실험성적은 Mean ± SEM으로 나타내었고, 각군간의 유의성 검정은 Student's t-test와 ANOVA 분석을 이용하였다.

결 과

심근에서 Mg²⁺ 농도에 따른 α₁-adrenoceptor(α₁-AR) 자극에 의한 수축력 변동

Fig. 1는 Mg²⁺-free(좌측 panel) 또는 2.0 mM Mg²⁺(우측 panel) 영양액 존재하에서 10⁻⁵ M phenylephrine(PE)에 의한 심근의 수축력 증가 효과를 관찰한 8예 중 전형적인 한 예이다. 모든 실험 예에서 PE에 의한 수축력 증가효과를 나타낸 것으로 2.0 mM Mg²⁺ 존재하에서 PE는 148%의 수축력 증가효과를 나타낸 반면 Mg²⁺-free 영양액 하에서는 매우 유의한 180%의 수축력 증가 효과를 나타냈다(자료 제시치 않음). 심근에서 α₁-AR 자극에 의한 수축력 증가효과는 Ca²⁺ 통로 활성화, Na⁺-Ca²⁺ 교환기 활성화, Na⁺-H⁺ 교환기 활성화, 세포내 alkalinization 및 Ca²⁺ 유리 증가 등에 의해서 나타난다고 알려져 있다. 그러나 이제까지 Mg²⁺ 변동에 대해서는 알려져 있지 않았다. 또한 이전 예비 실험에서 α₁-AR 자극은 관류심장으로 부터 Mg²⁺ 유리현상이 나타났기 때문에 α₁-AR 자극에 의한 Mg²⁺ 유리가 수축력 증가 원인이 될 수 있음을 추측할 수 있으나 Mg²⁺ 유리와 수축력 증가와의 관계는 또 하나의 새로운 연구분야로 남는다.

관류 심장에서 Mg²⁺ 변동에 미치는 phenylephrine의 영향

Fig. 2의 panel A는 적출한 심장을 관류 system에 현수한 후 1.2 mM Mg²⁺이 함유된 영양액을 20분간 관류하고 10~20분간 Mg²⁺-free 영양액을 관류한 다음 관류 영양액을 1 분 간격으로(3~4 ml/min) 취하여 AA에 의해서 측정된 관류액내 Mg²⁺ 농도이다. Mg²⁺-free 영양액을 관류하기 때문에 세포내(또는 세포간)의 Mg²⁺이 유리되어 panel A 처럼 시간에 따라 일정한 Mg²⁺ 감소곡선을 나타

내었고, 관류 후 40분에 관류액내 Mg²⁺ 농도는 최저치를 나타내었다. 모든 실험결과와 그림에서 관류된 영양액을 취하기 시작한 점을 1분으로 표기하였고 약물 처치는 적절량을 관류 용액에 직접 희석하여 관류하여 약물의 효과를 관찰하였다. panel A와 비슷한 조건을 유지하면서 관류액을 취하기 시작한 후 10분부터 10⁻⁵ M PE를 영양액에 혼합하여 10분간 관류시킨 결과 현저한 심박수 증가와 함께 뚜렷한 Mg²⁺ 유리증가를 보였으나(panel B, 21회 실험 중 16회) 어떤 경우에는 Mg²⁺ 유리가 변동이 없거나 오히려 감소(panel C, 21회 실험 중 5회) 효과를 보였다. 또한 PE에 의한 심장의 adrenoceptor 자극시 α₁-AR 효과는 물론 β-AR 자극효과도 나타날 수 있기 때문에 β-AR 길항제인 propranolol이나 atenolol 존재하에서 PE 효과를 관찰한 결과 현저한 Mg²⁺ 유리가 일어나 이 Mg²⁺ 유리가 α₁-AR를 경유한 효과임을 알 수 있었다. 또한 α₁-AR 자극은 심박수 증가를 초래하기 때문에 심박수 증가에 의한 Mg²⁺ 변동 여부를 확인하기 위하여 SA-node 부위를 제거한 심장을 현수하고 전기적 자극으로 심박수를 변동시키면서 Mg²⁺의 유동을 관찰한 결과 심박수 변동에 의해서는 Mg²⁺ 유동이 일어나지 않았다(Romani & Scarpa, 1990). 그리고 β-AR 자극효과를 배제하기 위하여 이하 모든 실험은 β-AR 차단제인 atenolol(10⁻⁵ M) 존재하에서 실시하였다. 분리 심근세포(10⁻⁵ cells/ml)를 1, 5, 10분간 배양하여 Mg²⁺의 농도를 측정할 바 대조군에서 Mg²⁺ 농도는 큰 변동이 없었으나 10⁻⁵ M PE를 처치한 군에서는 시간에 의존적으로 Mg²⁺ 농도가 증가되는 양상을 보였다(Table 1).

PE에 의한 Mg²⁺ 변동이 α₁-AR 자극을 경유한 효과임을 확인하기 위하여 β-AR 길항제인 atenolol(10⁻⁵ M)과 α₁-AR 길항제인 prazosin(3 × 10⁻⁶ M) 존재하에서 PE의 효과를 관찰한 바 Prazosin은 PE에 의한 Mg²⁺ 유리효과를 차단하였고(Hwang et al, 1996), 분리 심근 배양액에서 PE에 의한 Mg²⁺ 유리 증가효과 역시 prazosin에 의해 차단되었다(Table 1). 이로써 PE에 의한 Mg²⁺ 유리가 α₁-AR를 경유한 효과임을 확인할 수 있었다.

Calmodulin 길항제(W₇) 존재하에서 Mg²⁺ 유리효과에 미치는 α₁-AR 자극효과

DAG는 PKC를 활성화시키고 이 PKC에 의해서 단백질 인산화에 의해서 생리학적 반응을 나타내지만 IP₃는 세포내 mitochondria와 같은 Ca²⁺ 저장소로부터 Ca²⁺을 유리시켜 이 Ca²⁺이 Ca²⁺-의존성 calmodulin과 관련된 Ca²⁺/calmodulin kinase를 활성화시킴으로써 단백질 인산화가 일어나 생리학적 반응을 나타낸다. 따라서 IP₃ 경로를 경

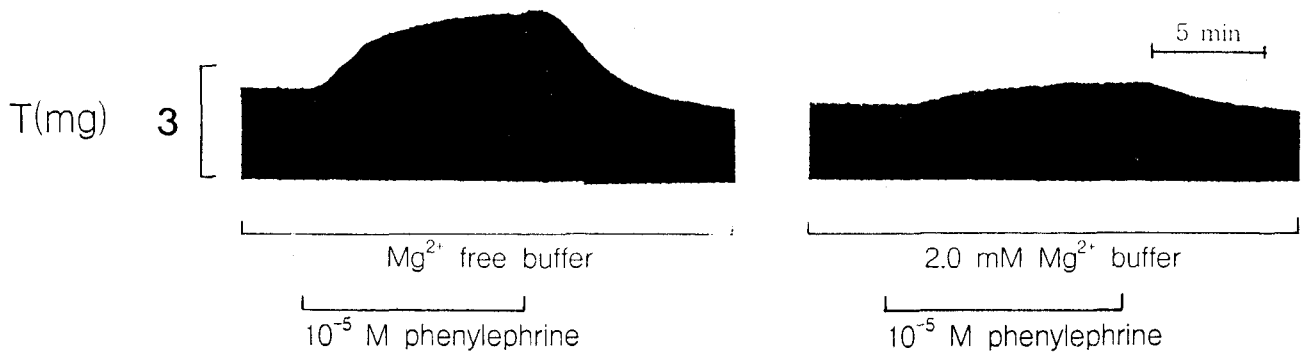


Fig. 1. Effects of 10^{-5} M phenylephrine in the presence of Mg^{2+} free buffer(panel A) or 2.0 mM Mg^{2+} buffer(panel B) on twitch force(T) in guinea pig papillary musca.

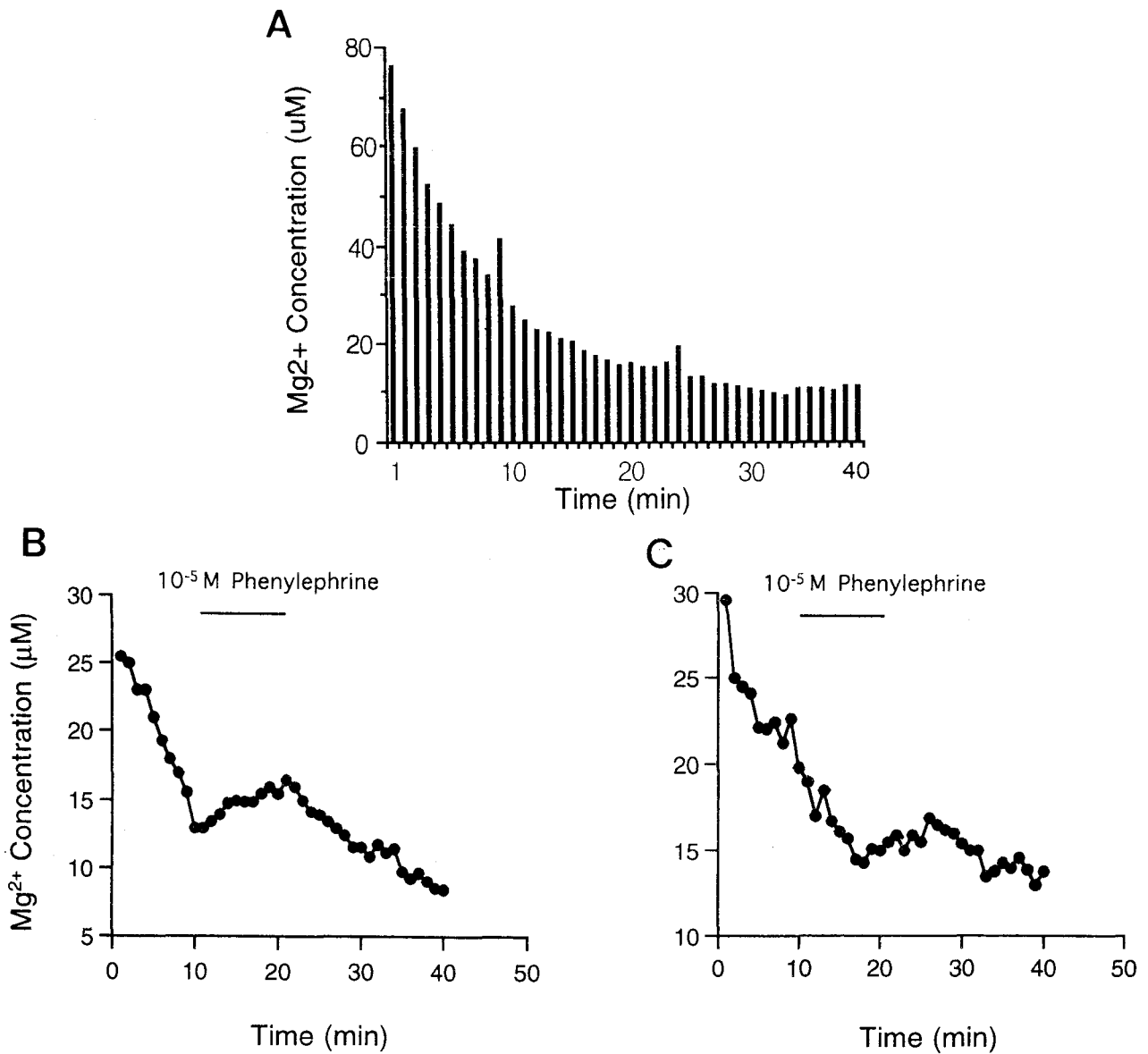


Fig. 2. Mg^{2+} efflux in control perfused guinea pig heart(panel A) and after addition of 10^{-5} M phenylephrine(panel B, C)

Table 1. Effects of phenylephrine, Ca^{2+} and Na^{+} modulators on Mg^{2+} fluxes in myocytes

Agent	Incubation time(min)		
	5	10	15
	Extracellular Mg^{2+} content(nmol $Mg^{2+}/10^5$ cells)		
Control	50.36 ± 0.73	50.92 ± 0.88	51.82 ± 0.82
10^{-5} M phenylephrine	52.53 ± 0.51	55.48 ± 1.30*	59.20 ± 1.20**
10^{-5} M PE + 3×10^{-6} M Prazosine	51.30 ± 1.32	50.48 ± 2.48 ⁺	51.22 ± 1.37 ⁺⁺
10^{-5} M Verapamil	45.59 ± 0.20**	46.60 ± 1.80**	45.27 ± 1.36**
10^{-5} M Ryanodine	42.36 ± 1.20**	43.27 ± 2.50*	44.48 ± 1.97**
10^{-5} M Lidocaine	52.43 ± 1.17	51.27 ± 2.72	52.76 ± 1.41
10^{-5} M Cyclopiazoic acid	52.35 ± 1.54	56.18 ± 2.47**	60.26 ± 2.35**
10^{-5} M Veratridine	47.40 ± 0.32	55.30 ± 0.22*	59.89 ± 2.98*
10^{-5} M Lidocaine + 10^{-5} M PE	51.41 ± 1.21	54.92 ± 1.53	57.71 ± 1.50

Values are mean ± SEM of 4 different preparations. Significantly different from control group; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.005$. Significantly different from PE group; ⁺ $P < 0.01$, ⁺⁺ $P < 0.005$

Table 2. Inhibition by W_7 on Mg^{2+} fluxes induced by A23187, phenylephrine or/and PMA in myocytes

Agent	Incubation time(min)		
	5	10	15
	Extracellular Mg^{2+} content(nmol $Mg^{2+}/10^5$ cells)		
control	52.41 ± 1.05	51.86 ± 2.49	53.02 ± 1.07
3×10^{-6} M A23187	48.71 ± 1.46	56.27 ± 2.91**	62.41 ± 3.97***
10^{-5} M W_7	50.21 ± 2.31	57.19 ± 2.84*	60.27 ± 2.75
3×10^{-6} M A23187 + 10^{-5} M W_7	60.27 ± 1.50	62.74 ± 3.02	62.49 ± 3.15
10^{-5} M PE + 10^{-5} M PMA	52.41 ± 1.59	59.43 ± 1.08	67.24 ± 3.52
10^{-5} M PE + 10^{-5} M PMA + 10^{-5} M W_7	65.19 ± 2.42	66.78 ± 2.83	66.10 ± 3.85
10^{-5} M PE + 10^{-5} M W_7	67.49 ± 3.47	66.63 ± 1.95	68.75 ± 3.29

Values are mean ± SEM of 3 different preparations. Significantly from control group; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.005$

유해서 Mg^{2+} 유리효과가 일어난다면 이는 calmodulin과 관련될 것이다. 즉, calmodulin의 작용을 억제하면 IP_3 에 의한 반응이 나타나지 않을 것으로 사료되어 calmodulin 길항제인 W_7 존재하에서 α_1 -AR 자극 효과를 관찰하였다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 3×10^{-5} M W_7 존재하에서 PE 및 또 다른 α_1 -AR 효현제인 methoxamine에 의한 Mg^{2+} 유리효과가 전혀 일어나지 않았다. W_7 은 심근 세포 배양액 내 Mg^{2+} 유리를 증가시켰으나(Table 2), 관류심장에서는 Mg^{2+} 의 유리 효과에 영향을 미치지 못했다. 따라서 α_1 -AR 자극에 의한 Mg^{2+} 유리효과는 IP_3 를 경유한 Ca^{2+} 의존성 calmodulin의 활성화에 의한 Ca^{2+} /calmodulin kinase의 활

성화 결과임을 알 수 있었다.

PMA와 선택적 α_1 -AR subtype 길항제 존재하에서 α_1 -AR 자극효과

이제까지의 결과에 의하면 α_1 -AR 자극으로 DAG를 경유한 Mg^{2+} 유리효과와 IP_3 를 경유한 유리효과를 볼 수 있었다. 최근 α_1 -AR은 몇몇 subtype로 구분되어 있는데 특히 α_{1A} -와 α_{1B} -AR subtype이 잘 알려져 있어 이들 subtype의 자극효과와 Mg^{2+} 유리와의 관계를 알아보기 위하여 Fig. 4에서 처럼 각각의 선택적 길항제 존재하에서 α_1 -AR 자극 효과를 관찰하였다. chloroethylclo-

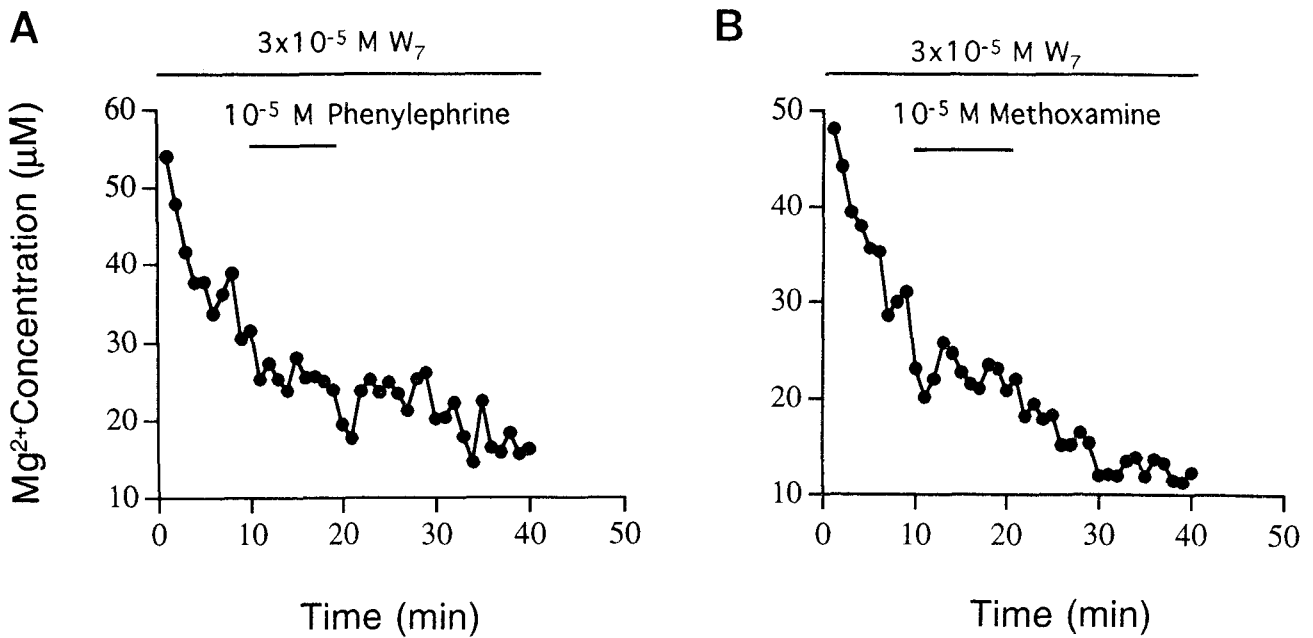


Fig. 3. Effects of 10^{-5} M phenylephrine(panel A) and 10^{-5} M methoxamine(panel B) in the presence of 3×10^{-5} M W_7 on Mg^{2+} efflux in perfused guinea pig heart.

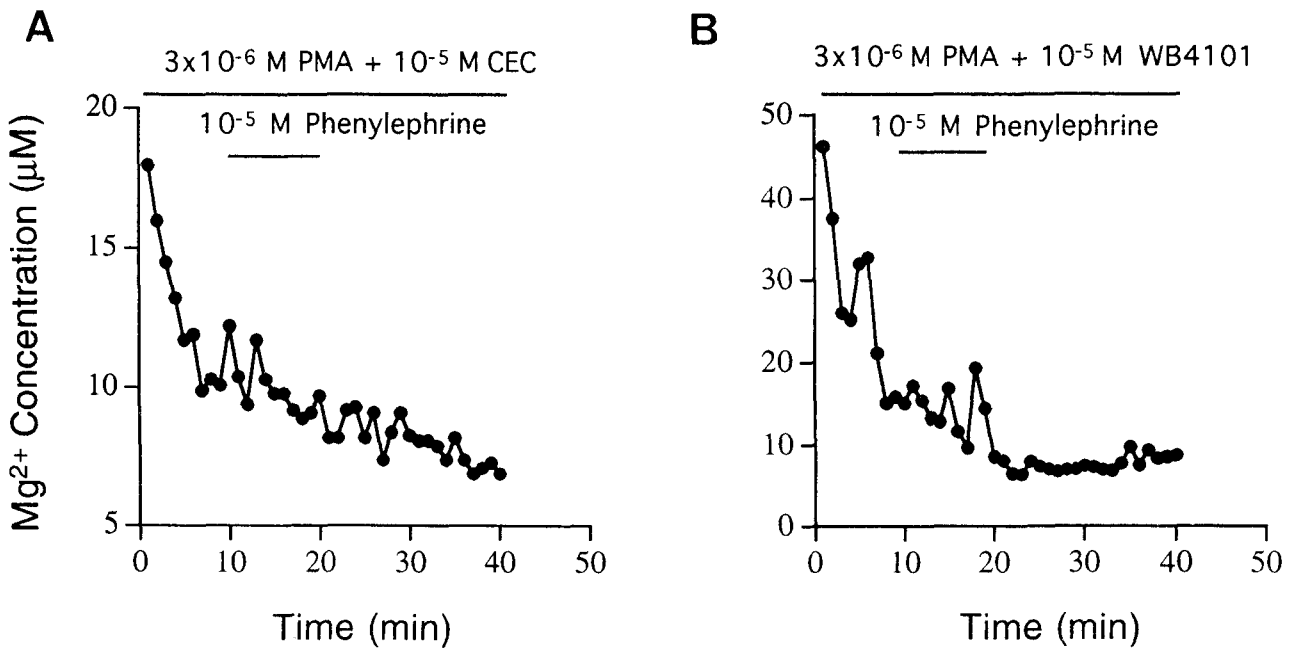


Fig. 4. Effects of 10^{-5} M phenylephrine in the presence of 10^{-5} M CEC + 3×10^{-6} M PMA(panel A) and 10^{-5} M WB4101 + 3×10^{-6} M PMA(panel B) on Mg^{2+} efflux in perfused guinea pig heart.

nidine(CEC, α_{1B} -선택적 길항제), 또는 WB4101(α_{1A} -선택적 길항제) 존재하에서 PE에 의한 Mg^{2+} 유리효과를 관찰한 결과 모두 Mg^{2+} 유리 증가 효과가 일어나지 않았다

(Fig. 4). 결과적으로 α_1 -AR 자극에 의한 Mg^{2+} 유리는 α_{1A} 및 α_{1B} -AR이 관여하고 있음을 의미한다.

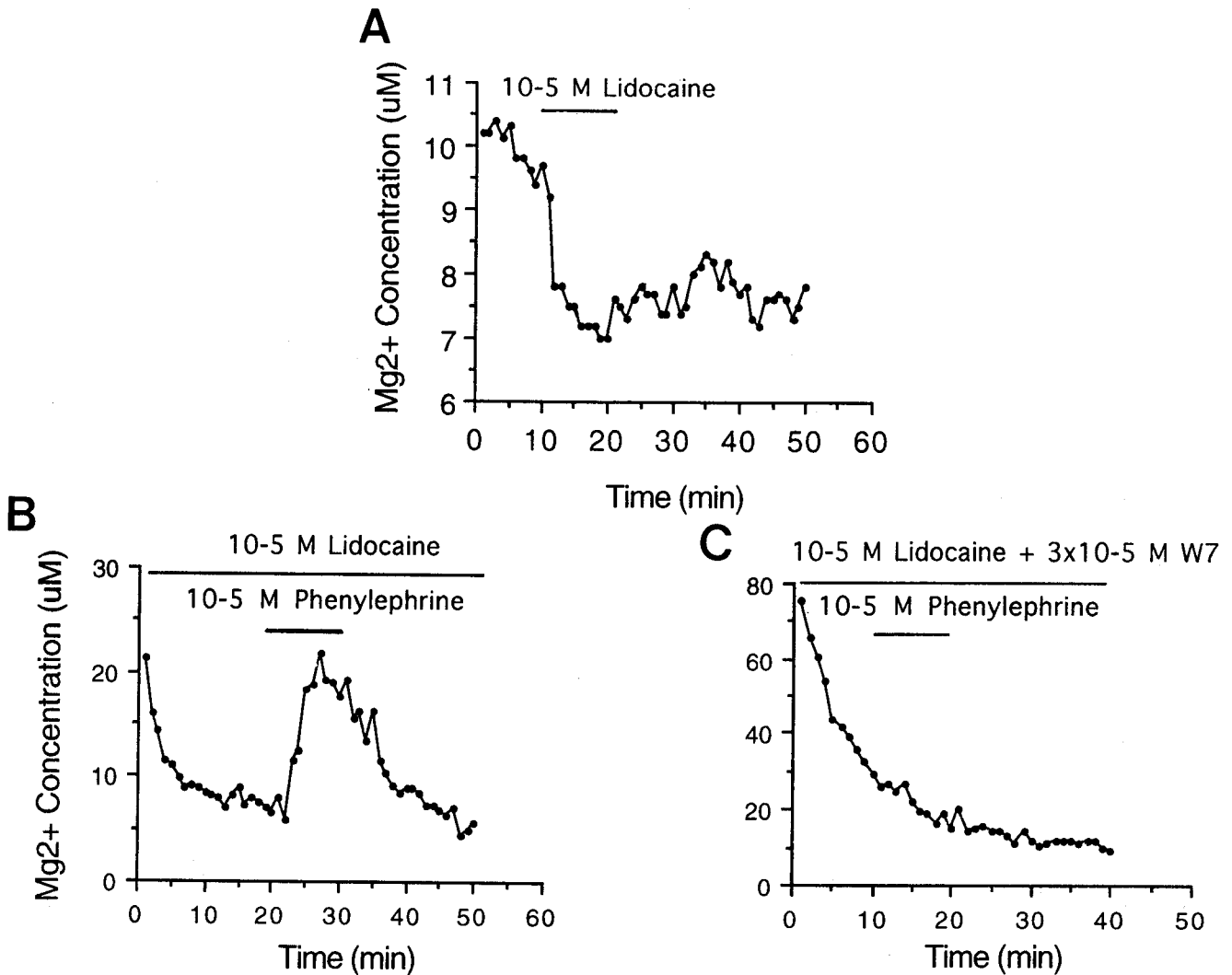


Fig. 5. Effects of 10^{-5} M lidocaine(panel A) on Mg^{2+} efflux and effects of 10^{-5} M phenylephrine in the presence of 10^{-5} M lidocaine(panel B) and 10^{-5} M lidocaine + 3×10^{-5} M W_7 (panel C) on Mg^{2+} efflux in perfused guinea pig heart.

Mg^{2+} 변동에 미치는 Na^+ modulator 및 Na^+ modulator 존재 하에서 α_1 -AR 자극효과

닭 적혈구에서 Na^+ - Mg^{2+} 교환기가 존재한다는 근거로 Na^+ 역시 Mg^{2+} 유리에 영향을 미칠 것으로 사료되어 Na^+ 통로 차단제인 lidocaine과 tetrodotoxin 자체에 의한 Mg^{2+} 유리효과를 관찰한 결과 두 차단제 모두 현저한 Mg^{2+} 유리억제효과를 보였으며 이들 차단제 존재하에서 α_1 -AR 자극은 Mg^{2+} 유리를 강화시켰으며(Hwang et al, 1996), 분리 심근 세포에서도 lidocaine은 PE에 의한 Mg^{2+} 유리 증가 효과에 영향을 미치지 못했다(Table 1). 그러나 lidocaine 존재하에서 PE에 의한 Mg^{2+} 유리 강화효과가 3×10^{-5} M W_7 에 의해서 현저하게 차단되었다(Fig. 5). 이

와 같은 결과는 임상적으로 매우 흥미있는 결과라고 할 수 있으나 그 기전에 대해서 본 연구 결과로 알 수 없다. 단지 심장에서도 Na^+ - Mg^{2+} 교환기가 존재한다면 이는 다음과 같이 설명될 수 있다. Na^+ - Mg^{2+} 교환기는 2개의 Na^+ 이 세포내로 유입되면서 하나의 Mg^{2+} 을 유출시킴으로 Na^+ 통로 차단제에 의해서 세포내외의 Na^+ 농도비가 증가되어 있는 상태에서 Na^+ - Mg^{2+} 교환기는 자극되어 Mg^{2+} 유출이 증가될 것이다. 이는 α_1 -AR 자극에 의한 Na^+ - Mg^{2+} 교환기 자극 여부 등이 밝혀져야 함으로 세부적인 연구가 필요할 것이다.

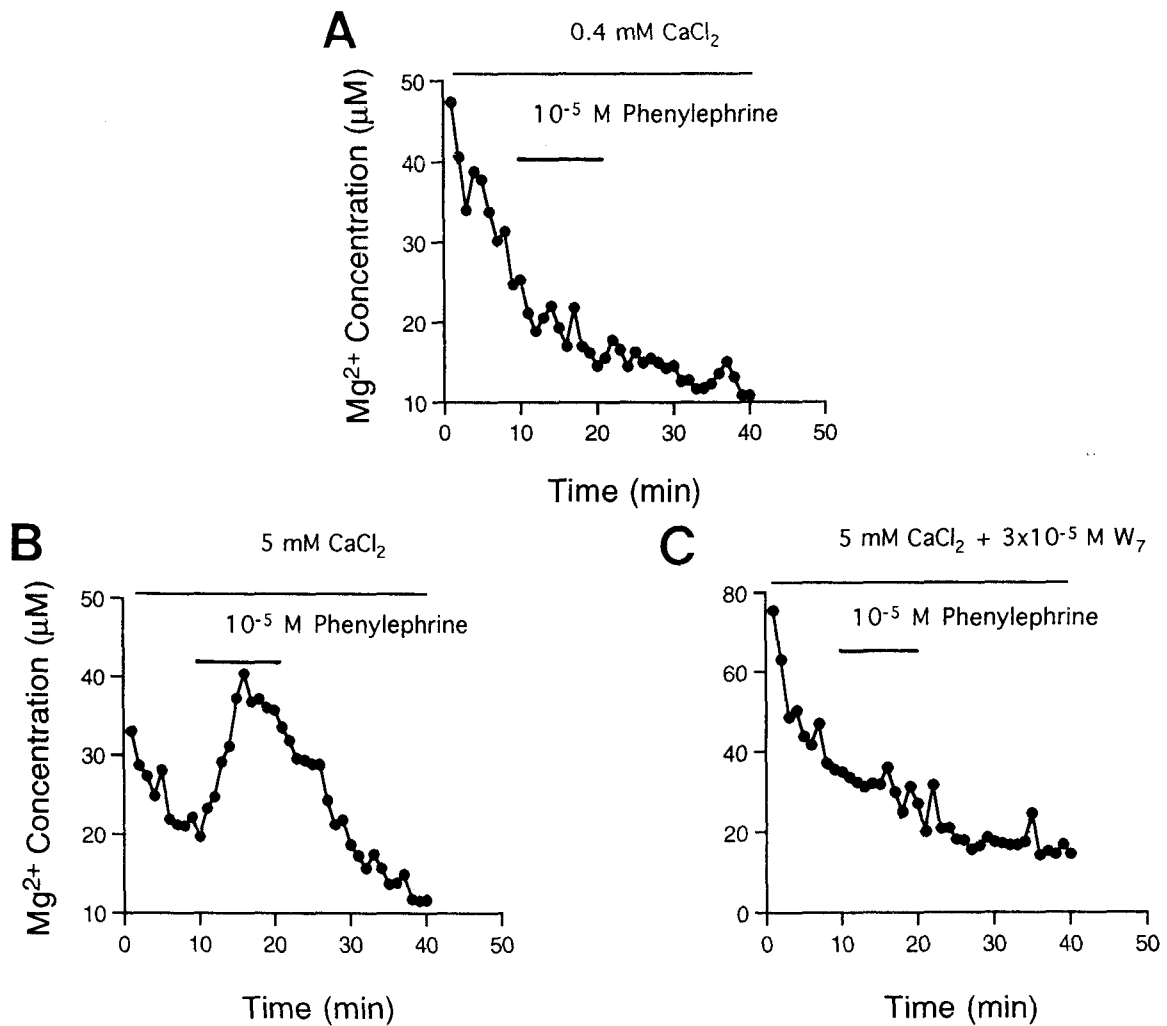


Fig. 6. Effects of 10^{-5} M phenylephrine in the presence of 0.4 mM $CaCl_2$ (panel A), 5 mM $CaCl_2$ (panel B) and 5 mM $CaCl_2 + 3 \times 10^{-5}$ M W_7 (panel C) on Mg^{2+} efflux in perfused guinea pig heart.

Mg^{2+} 유리에 미치는 Ca^{2+} modulator 및 ECF내 $CaCl_2$ 변동하에서 α_1 -AR 자극효과

α_1 -AR 자극에 의한 Mg^{2+} 유리 증가 효과가 calmodulin 길항제인 W_7 에 의해서 차단되었기 때문에 Mg^{2+} 유리 증가 효과가 Ca^{2+} 과 밀접한 관련이 있을 것으로 추측되었고, 다른 연구자들의 연구보고에 의하면 Ca^{2+} 과 Mg^{2+} 은 서로 길항작용이 있다고 하였다. 아울러 PE에 의한 Mg^{2+} 유리 증가 효과 역시 nifedipine과 같은 Ca^{2+} 통로 차단제에 의하여 억제되었기 때문에 Mg^{2+} 유리 증가 효과는 α_1 -AR 자극에 의한 Ca^{2+} 의 변동에 의해 조절될 것으로 보인다. 따라서 다음과 같이 Ca^{2+} modulator들 자체에 의한 Mg^{2+} 변동효과 대하여 관찰하였다. Ca^{2+} 통로 활성제인 Bay K 8644, 세포내 저장소로부터 Ca^{2+} 을 유리시켜 세포

내 Ca^{2+} 을 증가시키는 caffeine 및 SR이나 ER에서 Ca^{2+} -ATPase를 억제하여 세포내 Ca^{2+} 을 증가시키는 cyclopiazonic acid 등 모두 Mg^{2+} 유리 증가를 촉진시켰다. 또한 세포내 Ca^{2+} 을 올리기 위하여 많이 응용되는 calcimycin(A23187, Ca^{2+} inophore) 역시 Mg^{2+} 유리 증가를 현저하게 일으켰다. A23187의 농도에 의존적으로 Mg^{2+} 유리 증가 효과가 나타났고 Ca^{2+} modulator들 중 가장 뚜렷하게 Mg^{2+} 유리 증가를 촉진시켰다(Table 1). 그러나 이와 같은 A23187에 의한 Mg^{2+} 유리효과가 calmodulin 길항제인 W_7 에 의해서 현저히 차단됨을 관찰할 수 있었다(Table 2). 따라서 세포내 Ca^{2+} 이 증가한다 해도 calmodulin이 억제되면 Ca^{2+} /calmodulin kinase가 활성화되지 못해서 궁극적인 세포반응을 일으키지 못하여 Ca^{2+} 증가에 의한 Mg^{2+} 유리가 억제되는 것으로 추측된다. 한

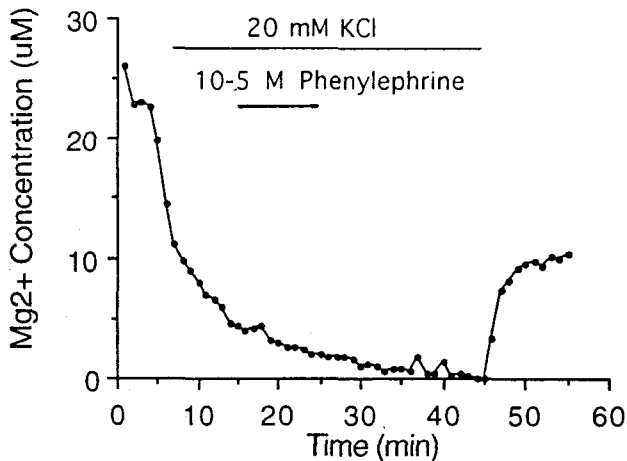


Fig. 7. Effects of 10^{-5} M phenylephrine in the presence of 20 mM KCl on Mg^{2+} efflux in perfused guinea pig heart.

편 상기 실험과는 대조적으로 세포내 Ca^{2+} 을 감소시키는 약물 즉, Ca^{2+} 통로 차단제인 verapamil과 nifedipine 및 SR로부터 Ca^{2+} 유리 차단제인 ryanodine은 현저한 Mg^{2+} 유리억제 효과를 보여 Mg^{2+} 유리에 Ca^{2+} 이 관여하고 있음을 입증하고 있다(Table 1). 세포외(관류액)내 $CaCl_2$ 나 NaCl 변동은 세포내 Ca^{2+} 변동을 초래할 수 있다. 즉 고농도 $CaCl_2$ 는 세포내 Ca^{2+} 을 직접적으로 증가시키지만 관류액내 NaCl 감소는 세포내외의 Na^+ 농도비가 감소됨으로써 Na^+ - Ca^{2+} 교환기가 활성화 될 것이다. 따라서 세포내 Ca^{2+} 은 증가할 것이다. 관류액내 NaCl 감소시 삼투압 유지를 위하여 Na^+ 대신 sucrose로, Cl^- 대신 choline chloride로 대체시켰다. 결국 Fig. 6에서 보는 바와 같이 저농도 $CaCl_2$ 존재하에서 보다 고농도 $CaCl_2$ 존재하에서 PE는 더 현저한 Mg^{2+} 유리를 촉진시켰고, 이러한 강화효과가 3×10^{-5} M W_7 에 의해 차단되었다(Fig. 6). 따라서 α_1 -AR 자극에 의한 Mg^{2+} 유리 증가 기전은 Ca^{2+} 과 관련이 있다는 결과를 뒷받침하고 있다.

고농도 KCl 존재하에서 α_1 -AR 자극효과

막전위 탈분극 및 탈분극 상태에서 α_1 -AR 자극 효과를 알아보기 위하여 고농도 K^+ 의 관류액의 효과 및 탈분극 상태에서 PE의 영향을 관찰하였다. Fig. 7에서 보는 바와 같이 20 mM KCl은 현저한 Mg^{2+} 유리억제를 일으켰고 이와 같은 탈분극 조건에서 10^{-5} M PE는 Mg^{2+} 유리 증가를 일으키지 못했다. 또한 고농도 KCl에서 정상적 영양액(3 mM KCl)를 대체하면 Mg^{2+} 유리 증가가 회복되었다. 따라서 세포막 전위는 물론 막전위 변동에 따라 α_1 -AR 자극에 의한 Mg^{2+} 유리 증가 효과는 변동 될 수 있음을 의미한다.

고 찰

Mg^{2+} 은 생체 내에 필수적인 이온으로써 역할을 담당하고 있어 Mg^{2+} 의 생체내 생리적 역할에 대해서 비교적 널리 알려져 있으나(Grubbs & Maguire, 1987; White & Hartzell, 1988; Horie et al, 1987; White & Hartzell, 1989; Maguire, 1984; Gunther, 1986; Bersohn, 1982), 생체내 Mg^{2+} 의 항상성 유지 및 조절기전에 대해서는 잘 밝혀져 있지 않다. 비록 giant cell, bacteria 및 적혈구에서 Mg^{2+} 농도 조절기전에 대해서는 보고된 바 있지만(Murphy et al, 1989; Snavelly et al, 1991; shetty & Weiss, 1988), 특히 포유동물의 심장 및 심장세포에서 α_1 -AR 자극에 의한 Mg^{2+} 의 조절기전에 대해서는 전혀 보고된 바 없으며, 최근 심장에서 α_1 -AR의 자극에 대한 심박수 및 수축력 증가 등에 대한 연구가 많이 진행되고 있는데 α_1 -AR 자극은 세포내 cAMP level을 증가시키는 β -adrenoceptor 자극과는 달리 심박수의 변동 없이 심근의 수축력을 증가시키는 것으로 알려져 중요한 심근 수축력 강화제로써 대두된 바 있고, 특히 임상적으로 부정맥, 심부전 치료시 심비대의 원인과 치료를 위하여 α_1 -AR의 작용기전 및 그 차단제의 활용이 높아지므로써(Altura & Altura, 1987) α_1 -AR를 경유한 세포내 이온 수송계나 이온농도에 변동이 초래될 수 있다면 심장기능에도 영향을 미칠 것으로 생각되어 α_1 -AR 자극에 의한 Mg^{2+} 의 변동을 관찰하고자 하였다.

Jakob등(1989)의 보고에 의하면 쥐의 간에서 phenylephrine은 Mg^{2+} 의 유리를 일으킨다고 하였으나, Scarpa 등은 쥐의 심장, 심근세포에서 PKC의 활성화는 세포내 Mg^{2+} 의 유입을 증가시킨다고 보고하였다(Romani & Scarpa, 1990; Romani et al, 1992; Romani et al, 1993). α_1 -AR의 신호전달계 작용에 따르면 PKC를 활성화하므로 phenylephrine에 의해 Mg^{2+} 의 변동이 유발된다면 기니픽 심장 및 심장세포에서도 Mg^{2+} 의 유리의 증가보다는 유입되는 양상을 보여야 할 것이다. 그러나 본 연구의 실험에서 기니픽 심장 및 심장세포에서 phenylephrine은 Mg^{2+} 의 유리 증가를 일으켰다. 이는 아마도 기니픽 심장에서 phenylephrine에 의한 Mg^{2+} 의 유리 증가효과는 신호전달계 중 PKC 활성화 보다는 또다른 pathway를 경유할 것으로 생각되었다. 즉, IP_3 경로를 경유한 Mg^{2+} 유리가 일어날 수 있음을 추측하였다. 또한 phenylephrine은 α_1 -AR에 주요작용을 하지만 β -adrenoceptor에도 영향을 미치기 때문에 본 연구에서는 β -antagonist를 전 처치한 후에 실험을 실시하였다. 역시 다른 α_1 -agonist인 methoxamine에 의해서도 phenylephrine과 유사한 결과가 나타났으며, 이 같은 α_1 -agonist에 의한 Mg^{2+} 유리 증가효과는 α_1 -선택

적인 길항제인 prazosine의 전처리에 의해 완전히 차단됨을 관찰하여, 관류 기니픽 심장 및 심근세포에서 phenylephrine에 의한 Mg^{2+} 의 유리 증가효과는 α_1 -AR에 선택적이며 직접적인 효과로 생각되었다.

α_1 -AR 자극은 PKC 활성화와 더불어 세포내 IP_3 를 증가시켜 세포반응을 일으키는 것으로 잘 알려져 있다(Otani et al, 1986). 결국 phenylephrine에 의한 Mg^{2+} 유리 증가효과는 PKC가 아닌 다른 작용 경로를 의심하게 되었고, 다른 경로로 IP_3 가 세포내 Ca^{2+} level의 변동을 일으키거나, 2nd messenger의 활성화에 의한 세포내 Ca^{2+} 및 Na^+ 등과 같은 양이온의 변동을 초래하여, 이로 인하여 Mg^{2+} 의 유리 증가효과가 일어날 것으로 생각되었다. 그러나 실험적으로 D-myo-inositol-1, 4, 5-triphosphate(IP_3)나 세포내 IP_3 를 증가시킬 수 있는 GTP- γ -S는 세포막을 투과하기 어렵다(Stephani et al, 1987; Micheal & Robin, 1984). 실제로 본 저자 등의 실험에서 관류액내 IP_3 나 GTP- γ -S를 처치한 결과 Mg^{2+} 변동에 큰 변화를 주지 못하여 간접적인 방법에 의해 IP_3 를 경유한 Mg^{2+} 유리 증가효과를 확인하였다.

세포내의 Na^+ 과 Mg^{2+} 와의 관계

심근세포는 Mg^{2+} 의 투과성이 있음은 분명하지만 그 경로에 대해서는 잘 알려져 있지 않으나 몇 가지 예가 보고되어 있다. Mg^{2+} 의 교환은 세포막을 통한 다른 이온과의 electrochemical gradient를 이용하여 다른 이온과 교환된다, 즉 Mg^{2+} 전류가 Na^+ 통로 차단제인 tetrodotoxin이나 lidocaine 등에 의해 억제되고(Spah & Fleckenstein, 1979), Na^+ 이나 Ca^{2+} 이 결여되면 Mg^{2+} 의 내향전류는 발생하지 않으며(Kohlhardt et al, 1973), Mg^{2+} 의 변동은 Na^+ 전위차에 의해 Na^+ - Mg^{2+} 교환기를 통하여 이루어진다고 보고하였다(Murphy et al, 1989). Squid axon에서 Mg^{2+} 의 변동이 Na^+ - Mg^{2+} 교환기를 경유하여 1:1로 교환이 세포내 Na^+ 에 의존적으로 일어나며(De Weer, 1976), 맥관 평활근에서 Mg^{2+} 의 변동에 대한 믿을 만한 수송계로 Na^+ - Mg^{2+} 교환기라고 하였다(Shetty & Weiss, 1988). 최근 Gunther 등(1984, 1985)은 chicken의 적혈구에서 Na^+ - Mg^{2+} 교환기를 동정하여 2개의 Na^+ 유출에 따른 1개의 Mg^{2+} 유입으로 Na^+ - Mg^{2+} 교환기의 역할을 규명하였으나, 다른 세포에서는 잘 알려져 있지 않다. 비록 심장에서 Na^+ - Mg^{2+} 교환기에 대한 증거는 적지만, Fry 등(1986)은 세포의 Mg^{2+} 농도가 Na^+ 에 의해 조절되어 Na^+ - Mg^{2+} 교환기에 의한 조절에 의하며, 이 기전은 이온의 전위차, coupling비 및 막전위에 따라 Mg^{2+} 의 변동이 일어날 것이라고 하였다. 본 저자 등의 실험에서도 기니픽 심장에 Na^+ channel blocker인 lidocaine처치는 Mg^{2+} 을 유입하는

결과를 보였으나(Fig. 5), Na^+ channel opener인 veratridine은 Mg^{2+} 의 유리를 현저히 증가시켜(Hwang et al, 1996), 세포의 Mg^{2+} 의 농도는 Na^+ 농도에 의존적임을 알 수 있었으나, Na^+ channel blocker 존재하에 phenylephrine은 Mg^{2+} 의 유리를 현저히 증가시켰으며, 또한 세포의 Na^+ 농도를 감소시킨 후 phenylephrine의 효과를 관찰한 바 세포의 Na^+ 농도에 의존적으로 Mg^{2+} 의 유리 증가 효과를 보여(자료 제시하지 않음), Mg^{2+} 유리와 세포의 Na^+ 농도는 밀접한 관계가 있으며, 세포의 Na^+ 이 정상인 상태에서는 α_1 -AR 자극에 의한 Mg^{2+} 유리 증가효과에는 세포내 Na^+ 의 변화에 작용이 아님을 알 수 있었다. 즉, 심장 세포에서도 Mg^{2+} 의 유리효과에 세포의 Na^+ 은 밀접한 관계가 있으며, 닭의 적혈구에서 보여준 Na^+ - Mg^{2+} 교환기와(Gunther et al, 1984; Gunther & Vormann, 1985) 유사한 작용기가 있음을 추측할 수 있었다.

Mg^{2+} 유리에 미치는 K^+ 이온의 영향

이온의 전위차 coupling비 및 막전위는 Mg^{2+} 의 세포내외 변동에 영향을 미치는 것으로 알려져(Fry, 1986) 세포의 K^+ 농도를 20 mM로 조절하여 Mg^{2+} 유리효과를 관찰한 바 현저한 Mg^{2+} 유리 억제효과를 관찰하였고, 20 mM KCl 존재하의 phenylephrine은 Mg^{2+} 변동에 영향을 미치지 못함을 관찰한 바(Fig. 7) 세포막 막전위의 변동은 Mg^{2+} 의 유리를 조절할 수 있으며 막전위 변동시 α_1 -AR 자극에 의한 Mg^{2+} 유리 증가효과에 변동을 일으킴을 알 수 있었다.

Ca^{2+} 의 변화에 따른 Mg^{2+} 의 변동관찰

Quamme 등(1990, 1991)은 계태아 심장과 MDCK cell에서 Ca^{2+} channel 억제제에 의해 Mg^{2+} 의 수송 경로를 차단되며, 세포내 Mg^{2+} 과 Ca^{2+} 이 서로 밀접한 상호관계가 있다고 주장하였고(Agus et al, 1989), 또한 Ca^{2+} channel의 억제는 Mg^{2+} 의 유입과 유출 양자에 모두 관여한다는 보고가 있으며(Romani et al, 1993), Mg^{2+} 은 Ca^{2+} 통로의 길항제로써 작용할 수 있기 때문에 세포내 Ca^{2+} 농도의 변동에 대한 완충작용은 Mg^{2+} 에 의해 조절되어질 수 있다. 즉, 세포내 Mg^{2+} 은 Ca^{2+} 통로에 작용할 수 있으며, Ca^{2+} 통로를 탈인산화시키는 protein phosphatase를 자극하여 Ca^{2+} 통로의 voltage의존적 비활성은 세포내 Mg^{2+} 에 의해 Ca^{2+} 을 차단한다고 알려져 있다(White & Hartzell). 본 연구(Fig. 1)에서도 Mg^{2+} 을 제거한 영양액에서 심박동수와 심근 수축력을 현저히 증가시킴을 관찰한바, Mg^{2+} 이 Ca^{2+} 과 길항하고 있음을 확인할 수 있었다. 임상적으로도 경수(hard water)를 섭취한 지역에서는 허혈성 심장 질환(Headrick & Willis, 1991; Murphy et al, 1989)이나 심

장병에 의한 사망률이 현저히 낮다는 보고가 있을 뿐만 아니라(Anderson et al, 1975) 고농도의 Mg^{2+} 은 허혈성 심장질환에 방어효과가 있는 것으로 알려져있다(Rasnyssen et al, 1986).

관류액내 $CaCl_2$ 나 $NaCl$ 변동은 세포내 Ca^{2+} 의 변동을 초래할 수 있고 고농도 Ca^{2+} 은 세포내 직접적으로 Ca^{2+} 농도를 증가시키지만 관류액내 $NaCl$ 농도 감소는 세포 내외의 Na^+ 농도비가 감소함에 따라 Na^+ - Ca^{2+} 교환기가 활성화될 것임으로 결국 세포내 Ca^{2+} 이 증가될 것이다. Fig. 6에서 보는 바와 같이 저농도 $CaCl_2$ 보다는 고농도 $CaCl_2$ 존재하에서 phenylephrine은 현저한 Mg^{2+} 유리효과를 나타냈다. 또한 Ca^{2+} -calmodulin antagonist인 W_7 의 단독 처치는 Mg^{2+} 의 유리 변동에 큰 영향을 미치지 못하였으나, phenylephrine에 의한 Mg^{2+} 유리 증가효과 역시 W_7 에 의해 완전히 차단되어, α_1 -AR 자극에 의한 Mg^{2+} 의 유리기전은 IP_3 를 경유한 세포내 Ca^{2+} 증가와 Ca^{2+} -calmodulin과 관련된 kinase와 밀접한 관계가 있을 것으로 사료되었다. 그러나 W_7 은 심장세포에서는 Mg^{2+} 유리를 증가시켰으나 관류심장에서는 Mg^{2+} 의 변동에 영향을 미치지 않아 그 차이점을 본 연구 결과로써는 알 수 없었다. 결과적으로 이전 많은 연구자들에 의해 보고된 심장에서의 α_1 -AR의 작용기전과 신호 전달기전을 기초로 하여 기니픽 심근과 심근세포에서 phenylephrine 및 관련 약물에 의한 Mg^{2+} 변동기전을 연구한 결과 다음과 같은 결과를 얻었다. 첫째, Ca^{2+} 과 Na^+ 처럼 Mg^{2+} 도 심근 수축력과 심박수 조절에 많은 영향을 미칠 수 있기 때문에 심장질환과 Mg^{2+} 농도는 매우 밀접한 관련이 있을 것으로 생각된다. 또한 α_1 -AR 자극효과가 심장 세포내외의 Mg^{2+} 농도에 따라 영향을 받을 수 있기 때문에 임상적으로 고려해야만 할 사항이다. 둘째, 심장에서 α_1 -AR 자극으로 Mg^{2+} 이 유리되거나 유입될 수 있는 두가지 효과를 나타낼 수 있는데 심장에 따라 두가지 효과가 나타날 수 있는 조건을 알 수 없으나 α_1 -AR 신호전달경로 중 DAG 경로를 경유한 유입효과와 IP_3 또는 Ca^{2+} 의존적인 경로를 경유한 유리효과가 나타날 수 있음을 알았다. PKC를 경유한 Mg^{2+} 유입에 대한 보고는 있었지만 IP_3 에 의한 유리기전에 대해서 아직 알려져 있지 않아 본 연구에서는 IP_3 를 경유한 유리기전을 밝히는데 주목하였다. 그 결과 calmodulin 길항제인 W_7 에 의해서 α_1 -AR 자극에 의한 Mg^{2+} 유리가 차단됨을 관찰하여 calmodulin과 관련된 kinase에 의해서 Mg^{2+} 이 유리될 수 있음을 추측하였다. 셋째, calmodulin 길항제로 Mg^{2+} 유리효과가 억제됨을 관찰하였기 때문에 이는 Ca^{2+} 과 관련된 Ca^{2+} -calmodulin kinase가 Mg^{2+} 유리에 관여하고 있음을 추측할 수 있다. 따라서 이를 확인하기 위하여 세포내 Ca^{2+} 을 유리시키거

나 세포내 Ca^{2+} 을 높일 수 있는 약물의 효과를 관찰한 결과 역시 Ca^{2+} modulator들도 Mg^{2+} 을 유리시키고 이 Mg^{2+} 유리효과가 역시 W_7 에 의해 차단됨을 관찰하여 상기 사항을 확인하였다. 네째, Ca^{2+} 이나 Na^{2+} 과 같은 이온들에 의해서 α_1 -AR 자극에 의한 Mg^{2+} 유리 효과가 변동될 수 있다. 결국 Mg^{2+} 의 생리학적 역할이 매우 중요하기 때문에 어떠한 조건에 의해서 생체내 Mg^{2+} 의 변동이 유발되는가를 이해하는 것은 매우 중요하다. 이러한 Mg^{2+} 변동요인 중 하나가 α_1 -AR 자극에 의해서도 일어날 수 있기 때문에 α_1 -AR과 관련된 약물의 임상적 적용시 주의해야 함을 제시할 수 있다는 점에서 본 연구의 의의는 크다고 하겠다.

결 론

본 연구에서는 기니픽 관류심장과 심근세포에서 α_1 -adrenoceptor 자극에 의한 Mg^{2+} 유리기전을 연구하였다. 관류심장으로부터의 관류액내 그리고 심근세포로부터 유리된 Mg^{2+} 농도는 atomic absorbance spectrophotometry를 이용하여 측정된 바 아래와 같은 결론을 얻었다.

PE는 Mg^{2+} 이 존재하는 용액에서보다 Mg^{2+} 이 제거된 용액내에서 심근 수축력을 현저히 증가시켰다. Phenylephrine과 같은 α_1 -효현제는 관류심장과 심근세포에서 Mg^{2+} 을 유리시켰고 이와 같은 효과가 α_1 -길항제인 prazosin으로 차단되었다. PE에 의한 Mg^{2+} 유리가 Na^+ 통로 차단제, 또는 관류액내 Ca^{2+} 증가 및 Na^+ 감소로 강화되었다. 관류심장과 심근세포에서 역시 Bay K 8644, caffeine, cyclopiazoic acid, A23187, 및 veratridine이 Mg^{2+} 을 유리시켰다. 그러나, verapamil, nifedipine, ryanodine, lidocaine 및 tetrodotoxin은 관류심장에서 Mg^{2+} 을 유입시켰으나, 심근세포에서는 효과가 없었다. 관류심장과 심근세포에서 Ca^{2+} /calmodulin antagonist인 W_7 은 phenylephrine, A23187, veratridine, 및 Ca^{2+} 증가에 의한 Mg^{2+} 유리를 현저히 차단하였다. 덧붙여 W_7 은 심근세포에서 Mg^{2+} 을 유리시켰으며 관류심장에서는 효과가 없었다.

이상의 결과에 의하면 기니픽 심장에서 Mg^{2+} 변동이 α_1 -adrenoceptor 자극에 의한 신호전달체계의 선택적인 경로를 경유한 반응과 관련될 수 있고, Mg^{2+} 유리효과는 IP_3 와 Ca^{2+} /calmodulin에 의존적인 결과임을 관찰하였다.

감사의 글

본 연구는 한국과학재단의 핵심전문지원과제(KOSEF

961-0704-038-1)에 의하여 이루어졌음.

참 고 문 헌

- Altura BM, Altura BT. New perspectives on the role of magnesium in the pathophysiology of the cardiovascular system. *Magnesium* 4: 226–244, 1985
- Altura BT, Altura BM. Endothelium-dependent relaxation in coronary arteries requires magnesium ions. *Br J Pharmacol* 91: 449–451, 1987
- Anderson TW, Neri LC, Schreiber GB, Talbot F, Zdrojewski A. Ischemic heart disease, water hardness and myocardial magnesium. *Can Med Assoc J* 113: 203, 1975
- Bersohn MM, Shine KI, Sterman WD. Effects of increased magnesium on recovery from ischemia in rat and rabbit hearts. *Am J Physiol* 242: H89–H93, 1982
- Buri A, Chen S, Fry CH, Illner H, Kickenweiz E, McGuigan JA, Noble D, Powell T, Twist VW. The regulation of intracellular Mg^{2+} in guinea-pig heart, studied with Mg^{2+} -selective microelectrodes and fluorochromes. *Exp Physiol* 78: 221–233, 1993
- De Weer P. Axoplasmic free magnesium levels and magnesium extrusion from squid giant axon. *J Gen Physiol* 68: 159–178, 1976
- De Young MB, Giannattasio B, Scarpa A. Isolation of calcium-tolerant atrial and ventricular myocytes from adult rat heart. *Methods Enzymol* 173: 662–676, 1989
- Fry CH. Measurement and control of intracellular magnesium ion concentration in guinea pig and ferret ventricular myocyte. *Magnesium* 5: 306–316, 1986
- Grubbs RD, Maguire ME. Magnesium as a regulatory cation: Criteria and evaluation. *Magnesium* 6: 113–127, 1987
- Gunther T. Functional compartmentation of intracellular magnesium. *Magnesium* 5: 53–59, 1986
- Gunther T, Vormann J, Forster R. Regulation of intracellular magnesium by Mg^{2+} efflux. *Biochem Biophys Res Commun* 119: 124–131, 1984
- Gunther T, Vormann J. Mg^{2+} efflux is accomplished by an amiloride-sensitive Na^+/Mg^{2+} antiport. *Biochem Biophys Res Commun* 131: 540–545, 1985
- Headrick JP, Willis RJ. Cytosolic free magnesium in stimulated, hypoxic and underperfused rat heart. *J Mol Cell Cardiol* 23: 991–999, 1991
- Horie M, Irisawa H, Noma A. Voltage-dependent magnesium block of adenosine-triphosphate-sensitive potassium channel in guinea-pig ventricular cells. *J Physiol(Lond)* 387: 251–272, 1987
- Hwang SC, Kim SJ, Kang HS, Lee SO, Kang CW, Kwon OD, Kim JS. Effects of α_1 -adrenoceptor stimulation on Mg^{2+} release in perfused guinea pig heart. *Kor J Vet Res* 36(2): 327–335, 1996
- Jakob A, Beckert J, Schottli G, Fritzsche G. α_1 -Adrenergic stimulation causes Mg^{2+} release from perfused rat liver. *FEBS Lett* 246: 127–130, 1989
- Maguire ME. Hormone-sensitive magnesium transport and magnesium regulation of adenylate cyclase. *Trends Pharmacol Sci* 5: 73–77, 1984
- Micheal JB, Robin FI. Inositol triphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature* 312(22): 315–321, 1984
- Murphy E, Steenbergen C, Levy LA, Raju B, London RE. Cytosolic free magnesium levels in ischemic rat heart. *J Biol Chem* 264: 5622–5627, 1989
- Otani H, Hitomi, Dipak KD. Evidence that phosphoinositide response is mediated by α_1 -adrenoceptor stimulation, but not linked excitation contraction coupling in cardiac muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 136: 863–869, 1986
- Rasnysen, HS, Norrgard P, Lindeneg O, Mcair P, Backer W, Balslev S. Intravenous magnesium in acute myocardial infarction. *Lancet* 1: 234–236, 1986
- Romani A, Scarpa A. Hormonal control of Mg^{2+} transport in the heart. *Nature* 346: 841–844, 1990
- Romani A, Marfella C, Scarpa A. Regulation of Mg^{2+} uptake in isolated rat myocytes and hepatocytes by protein kinase C. *FEBS Lett* 296: 135–140, 1992
- Romani A, Marfella C, Scarpa A. Regulation of magnesium uptake and release in the heart and in isolated ventricular myocytes. *Cir Res* 72: 1139–1148, 1993
- Shetty SS, Weiss GB. Alterations in Mg distribution and movements in rabbit aortic smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther* 245: 112–119, 1988
- Snavelly MD, Gravina SA, Cheung TBT, Miller CG, Maguire ME. Magnesium transport in Salmonella Typhimurium: Regulation of mgtA and mgtB expression. *J Biol Chem* 266: 824–829, 1991
- Spah F, Fleckenstein A. Evidence of a new, preferentially Mg-carrying, transport, system besides the fast Na and slow Ca channels in the excited myocardial sarcolemma membrane. *J Mol Cell Cardiol* 11: 1109–1127, 1979
- Stephanie O, Patricia A, Joan HB. Guanosine 5'-O-(thiotriphosphate)-dependent inositol triphosphate formation in membranes, is inhibited by phorbol ester and protein kinase C. *J Biological Chem* 262(4): 1638–1643, 1987
- Quamme GA, Rakin SW. Cytosolic free magnesium in cardiac myocytes: Identification of a Mg^{2+} influx pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 167: 1406–1412, 1990

Quamme GA, Dai LJ. Presence of a novel influx pathway for Mg^{2+} in MDCK cells. *Am J Physiol* 259: C521–C525, 1991

White RE, Hartzell HC. Effect of intracellular free magnesium on calcium current in isolated cardiac myocytes.

Science 239: 778–780, 1988

White RE, Hartzell HC. Magnesium ions in cardiac function: Regulation of channel and second messengers. *Biochem Pharmacol* 38: 859–867, 1989
