

## 관류 기니픽 심장에서 $Mg^{2+}$ 유리에 미치는 $\alpha_1$ -adrenoceptor 자극효과

황성철 · 김상진 · 강형섭 · 이승옥 · 강창원 · 권오덕 · 김진상

전북대학교 수의과대학

(1996년 1월 19일 접수)

### Effects of $\alpha_1$ -adrenoceptor stimulation on $Mg^{2+}$ release in perfused guinea pig heart

Sung-chul Hwang, Sang-jin Kim, Hyung-sub Kang,

Seung-ok Lee, Chang-won Kang, Oh-deog Kwon, Jin-sang Kim

College of Veterinary Medicine, Chonbuk National University

(Received Jan 19, 1996)

**Abstract :** Recently in spite of the interest on the regulation of intracellular  $Mg^{2+}$  by neurotransmitters or drugs, the magnesium ion( $Mg^{2+}$ ) regulation by  $\alpha_1$ -adrenoceptor stimulation has not been studied in the heart yet.

To elucidate the regulation of  $\alpha_1$ -adrenoceptor stimulation-induced  $Mg^{2+}$  release and the effects of  $\alpha_1$ -adrenoceptor stimulation on pathophysiological conditions, in this study we have evaluated the effects of phenylephrine, PMA,  $H_7$ , staurosporine, verapamil and lidocaine on  $Mg^{2+}$  release in perfused guinea pig heart. During preperfusion exogenous  $Mg^{2+}$  was added to the medium to give 1.2mM 15min before starting to addition of drugs, and then the infusion of exogenous  $Mg^{2+}$  was stopped.  $Mg^{2+}$  in the perfusate leaving the heart was measured by atomic absorption spectrophotometry.  $Mg^{2+}$  free solution produced an increase in heart rate and phenylephrine elicited  $Mg^{2+}$  release from the heart.  $Mg^{2+}$  release by phenylephrine was abolished by combined treatment with prazosin. By contrast, cardiac  $Mg^{2+}$  uptake induced by a protein kinase C(PKC) activator, PMA was abolished by a selective PKC inhibitor, staurosporine. And the phenylephrine-induced  $Mg^{2+}$  release was not affected by the PKC inhibitor,  $H_7$ . When verapamil or lidocaine was added to perfusing solution,  $Mg^{2+}$  release was potentiated by phenylephrine from perfused guinea pig heart. These results suggest that  $\alpha_1$ -adrenoceptor stimulation caused  $Mg^{2+}$  release and that PKC is not involved in  $\alpha_1$ -adrenoceptor mediated  $Mg^{2+}$  release from perfused guinea pig heart. Under pathophysiological conditions, the  $Mg^{2+}$  alteration by  $\alpha_1$ -adrenoceptor stimulation is considerable.

**Key words :**  $\alpha_1$ -adrenoceptor, protein kinase C, magnesium ion, phenylephrine.

## 서 론

지난 10여년 동안 심장 생리학에 있어서 양이온들의 역할에 대한 연구가 급진적으로 진행되어 왔다.

이러한 연구는 주로  $Ca^{2+}$ ,  $K^+$ 와  $Na^+$  등이 중심이 되어 왔지만  $Mg^{2+}$ 의 중요성에 대해서는 비교적 관심이 적었다. 그러나  $Mg^{2+}$ 은 포유류의 생체내에 많이 함유하고 있고 세포내에 존재하는 많은 양이온 중  $Na^+$ 에 이어 두번째 많은 이온(0.2~1mM)으로<sup>1,2</sup> 생체에서 다음과 같은 중요한 생리학적 역할을 담당하고 있다. 첫째, 여러 효소의 활성을 위한 보조인자, glycolysis 및 DNA 합성 등을 위한 조절자로서 세포의 대사를 조절하고<sup>2</sup> 둘째, 세포와 핵산의 구조적 특성을 결정하는 요소<sup>2-4</sup> 셋째, 인산화를 조절하는 bioenergetics에 결정적인 영향을 주며<sup>1,4</sup> 넷째, 심근의 대사나 기능에 특별한 역할을 담당하고 있다<sup>5</sup>. 이와같이  $Mg^{2+}$ 은 생체내 필수적인 이온으로  $Ca^{2+}$ 처럼 2nd messenger로써 작용하지는 않지만 여러 이온들과 상호 밀접한 관계를 갖고 있다<sup>5</sup>. 그러나 이와같은  $Mg^{2+}$ 의 중요한 역할에 비하여 세포내  $Mg^{2+}$  항상성을 포함한 조절기전은 잘 밝혀져 있지 않다. 비록 giant cells, bacteria 및 적혈구에서  $Mg^{2+}$  농도 조절기전에 대해서는 보고 되어 있지만<sup>6-8</sup>, 포유동물의 심장 세포에서 이 기전은 거의 알려져 있지 않다. 최근 약물, 호르몬 및 양이온 등에 의한  $Mg^{2+}$ 의 변동을 관찰한 바 이들은 직접적으로 세포내  $Mg^{2+}$  농도변화를 일으킨다고 하였으며<sup>9-11</sup> noradrenaline의 투여는 심장 또는 심근 세포로부터  $Mg^{2+}$ 을 유리시킨다고 하였다<sup>9</sup>. 또한 많은 양의  $Mg^{2+}$  변화는 세포나 세포내 성분을 통과하여  $Mg^{2+}$ 의 재분배를 일으킬 수 있고 이는 심장세포 구조와 기능에 밀접한 관계가 있음은 의심할 여지가 없다. 그러므로  $Mg^{2+}$ 이 심장세포의 기능의 조절자라면  $Mg^{2+}$  자체는 생리적이거나 병리적인 상태하에서 당연히 변동될 것이다.

Noradrenaline에 의한  $Mg^{2+}$ 의 이동기전은 Scarpa 등<sup>9-14</sup>에 의해서 연구되었는데, 이들은 최근 심장 세포에서  $\alpha_1$ -adrenergic 수용체 자극은 세포로부터  $Mg^{2+}$ 을 유리시키고<sup>9</sup>, protein kinase C(PKC) 활성화에 의한 자극시 세포외로부터 심장세포와 간세포에  $Mg^{2+}$ 이 축적된다고 보고하였다<sup>9,10</sup>. 이같은 결과는 심근세포는 수용체를 경유한 cAMP나 PKC의 활성화에 의해 신속하게 변동될 수 있는  $Mg^{2+}$ 의 주요한 저장소임을 암시하였고,

$Mg^{2+}$  농도조절에 있어서  $\beta$ -adrenergic 수용체의 역할을 강조하였다. 그러나 최근 심장에서  $\alpha_1$ -adrenoceptor를 경유한 수축력의 증가에 대한 중요성이 대두되었고  $\alpha_1$ -adrenoceptor 자극은  $\beta$ -adrenoceptor 자극효과와는 달리 cAMP의 증가를 일으키지 않아 심박수를 크게 변동시키지 않으므로 중요한 심근 수축력 증가제로 연구되고 있고, 부정맥이나 심부전 치료시 유발되는 심비대 원인과 치료를 위하여  $\alpha_1$ -adrenoceptor의 작용기전 및 그 차단제의 활용이 많아지고 있다<sup>15</sup>. 따라서  $\alpha_1$ -adrenoceptor를 경유한 세포내 이온 수송계나 이온농도의 변동이 일어날 수 있다면 이는 생리, 약리학적 측면에서 심장기능에 영향을 미칠 것이다.

$\alpha_1$ -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 없을 뿐만 아니라  $\alpha_1$ -adrenoceptor의 신호전달계에 있어서 PKC가 관여하고 있으므로<sup>16</sup>  $\alpha_1$ -adrenoceptor 자극은  $Mg^{2+}$ 을 변동시킬 수 있을 것으로 사료되었고, 1989년 Jakob 등<sup>17</sup>은 흰쥐 간에서 phenylephrine이  $Mg^{2+}$  유리를 일으킬 수 있다는 실험결과를 보고한 바 있어, 본 연구에서는 관류 guinea pig heart에서  $Mg^{2+}$ 의 유리에 대한  $\alpha_1$ -adrenoceptor 효현제인 phenylephrine의 영향, 신호전달계에서 조절기전 및 phenylephrine에 의한  $Mg^{2+}$ 의 유리효과에 대한  $Ca^{2+}$  통로 차단제인 verapamil과  $Na^+$  통로 차단제인 lidocaine의 영향을 관찰하였다.

## 재료 및 방법

실험동물과 관류심장 : 300g 내외의 기네피크을 두부 타격후 신속히 심장을 적출하여 heparin이 첨가된 산소포화용액( $O_2$  95%,  $CO_2$  5%, pH 7.3)에서 혈액을 제거한 다음, HEPES 완충용액이 관류되고 있는 관류 system(open system)의 연결관에 심장의 대동맥 부위를 삽입하여 결찰하였고, 심장의 관상동맥 등에서 혈액응고를 방지하기 위해 이 과정은 수습초 이내에 실시하였다. 심장을 관류 system에 결찰후 NaCl 120, KCl 3,  $CaCl_2$  1.2,  $MgCl_2$  1.2,  $KH_2PO_4$  1.2, glucose 10,  $NaHCO_3$  12, 그리고 HEPES 10mM의 영양액(37°C, 산소포화

pH 7.3)을 7~8ml/min 속도로 관류시켰다. 15분 후 상기 영양액에서  $MgCl_2$ 를 제거한  $Mg^{2+}$  free 또는 5-20 $\mu$ M의  $Mg^{2+}$ 가 함유된 영양액을 공급하여 관류액내  $Mg^{2+}$  농도가 낮게 유지되도록 하였다. 이와같은 상태는 미량의  $Mg^{2+}$ 의 변동을 측정하기에 적합한 조건으로 하기 위해서이다.  $Mg^{2+}$  free 영양액을 관류시킨 후 15~20분 부터 심장을 통해 관류된 영양액을 1분간격으로 취하기 시작하였다. 모든 실험결과와 그림에서는 관류된 영양액을 취하기 시작한 점을 1분으로 표기하였다. 약물처치는 적정량을 관류용액에 직접 희석하여 관류시켰다.

**사용 약물 및 투여방법 :** 관류된 영양액을 취하기 시작한 후  $\alpha_1$ -adrenoceptor 자극효과를 관찰하기 위하여 phenylephrine 및 기타 약물이 투여되었다. 약물은 모두 Sigma 제품을 사용하였다.

1) Atenolol : 일부 실험과정에서  $\beta$ -adrenoceptor에 의한 효과는 차단하고  $\alpha_1$ -adrenoceptor 효과만을 관찰하기 위하여  $Mg^{2+}$  free 영양액 내에  $10^{-5}$ M atenolol을 첨가하였다.

2) Prazosin : phenylephrine에 의한  $Mg^{2+}$  유리가  $\alpha_1$ -adrenoceptor를 경유한 효과인지를 확인하기 위하여 선택적  $\alpha_1$ -adrenoceptor 길항제인  $3 \times 10^{-6}$ M prazosin을 phenylephrine 투여전 15분부터 관류하여  $\alpha_1$ -adrenoceptor를 차단하였다.

3) PMA(phorbol 12-myristate 13-acetate) : PKC 활성화제인  $1.5 \times 10^{-6}$ M PMA를 관류액을 취하기 시작한 후 15분부터 10분간 관류시켰다.

4) Staurosporine : PKC 억제제인  $10^{-7}$ M staurosporine을 투여전 15분부터 관류시켰다.

5)  $H_7$ -hydrochloride : PKC 억제제인  $3 \times 10^{-6}$ M  $H_7$  존재하에서 phenylephrine의 효과를 관찰하기 위하여  $3 \times 10^{-5}$ M phenylephrine 투여 15분 전부터  $H_7$ 을 처치하였다.

6) Verapamil과 lidocaine : phenylephrine에 의한  $Mg^{2+}$  유리효과에 대해  $Ca^{2+}$  channel blocker인 verapamil과  $Na^+$  channel blocker인 lidocaine의 영향을 관찰하기 위하여  $3 \times 10^{-5}$ M phenylephrine 투여 40분 전부터  $10^{-5}$ M verapamil 또는  $10^{-5}$ M lidocaine을 관류시켰다.

**심박수와 심장 운동성 측정 :** 관류 system 상부에 연결된 3 way 관에 pressure transducer를 연결하여 생리기록기(Narco Bio systems. INC, MK-

III)를 이용하여 심박수 및 운동성을 측정하였다.

**$Mg^{2+}$  농도측정 :** 상기 방법에 의하여 취한 관류용액은 전처리 없이 직접 atomic absorption spectrophotometry(AA)에 의해  $Mg^{2+}$  농도를 측정하였다. 영양액에 0, 0.1, 0.5, 1ppm의  $Mg^{2+}$  표준액이 함유된 용액으로 표준곡선을 산출한 후 관류용액을 흡입시켜 1초 동안에 3회 판독하여 그 평균값을 산출하였다. 산출된 ppm값은 다시  $\mu$ M 단위로 환산하여 표기하였다.

**이용기기 :** 기타 이용기기로는 AA(Sun II Lab), circulator(Jeio Tech Co), peristaltic pump(Vision), illuminator(Gold Star), pH meter(Wheaton) 및 stereozoom(Nikon) 등이었다.

## 결 과

**$Mg^{2+}$  free 영양액이 심박수와 심장 운동성에 미치는 영향 :** 심장을 적출하여 관류 system에 결합 후 정상 영양액을 관류하여 15분간 적응하도록 하였다. 이때 심박수는  $152 \pm 15$ 회였다. 다음 정상 영양액에서  $MgCl_2$ 를 제거한  $Mg^{2+}$  free 영양액을 관류시킨 결과  $225 \pm 22$ 회로 정상 영양액에서 보다 현저히 증가하였다. 또한 심장 운동성 역시 현저히 증가하였다.  $Mg^{2+}$  free 영양액을 관류한 후 증가된 심박수는 세포내  $Mg^{2+}$  농도가 감소함에도 불구하고 시간이 경과함에 따라 약간씩 감소하였다(자료 제시하지 않음).

**$Mg^{2+}$  유리에 미치는 phenylephrine의 영향 :** Fig 1의 panel A는  $Mg^{2+}$  free 영양액을 관류시킨 후 15분부터(Fig에서 1분으로 표시하였음) 관류액을 1분 간격으로 40분간 취하여 AA로 측정한 결과로써 4회의 실험예중 전형적인 한 예이다.  $Mg^{2+}$  free 영양액을 관류하기 때문에 세포내(또는 세포와 세포사이)의  $Mg^{2+}$ 이 유리되어 Fig 1에서 보는 바와 같이 시간에 따라 일정한 감소곡선을 나타내었고, 관류 후 40~50분에 관류액내  $Mg^{2+}$  농도는 최저치를 나타내었다. 또 다른 심장에서 상기한 panel A와 비슷한 조건을 유지하면서  $Mg^{2+}$  free 영양액 관류 후 15분부터 관류액을 취하면서 10분 후에  $10^{-4}$ M의 phenylephrine을 영양액에 혼합하여 10분간 관류시킨 결과 현저한 심박수 증가와 함

깨 뚜렷한  $Mg^{2+}$  유리를 나타낸 4회의 실험중 하나이다(Fig 1, panel B).

Phenylephrine의 효과에 미치는 prazosin과 atenolol의 영향 : 3회의 실험중 한 예로써  $\beta$ -adrenoceptor 길항제인  $10^{-6}M$  atenolol은  $3 \times 10^{-5}M$  phenylephrine에 의한  $Mg^{2+}$  유리를 경미하게 억제하는 경향이였다. atenolol과  $\alpha_1$ -adrenoceptor 길항제인  $3 \times 10^{-6}M$  prazosin은 phenylephrine에 의한  $Mg^{2+}$  유리를 완전히 차단하였다(Fig 2). 이때 길항제는 phenylephrine 투여 전 15분부터 관류시켰다.

$Mg^{2+}$  변동에 미치는 PMA의 영향 : 본 실험은  $\alpha_1$ -adrenoceptor 자극에 의한  $Mg^{2+}$  유리가 PKC를 경유한 효과인지를 확인하기 위하여 phenylephrine 대신 PKC 활성화제인  $1.5 \times 10^{-6}M$  PMA를 10분간 투여하였다. Fig 3에서 보는 바와 같이 PMA 투여 직후 부터  $Mg^{2+}$  유리가 억제 즉, Fig 3에서 PMA를 투여한 약 11분 부터  $Mg^{2+}$  유리곡선이 급격히 하강하였다.

이는  $Mg^{2+}$ 이 유입되었거나 유리가 억제되었음을 의미한다. Fig은 실험 3회중 한예로  $Mg^{2+}$ 이 유입된 결과를 보였다.

PMA의 효과에 미치는 staurosporine의 영향 :  $Mg^{2+}$ 의 세포내 유입 또는 유리억제가 PKC를 경유한 효과인지를 확인하기 위하여 선택적 PKC 억제제인 staurosporine 존재하에서 PKC 활성화제의 효과를 관찰하였다. 실험 3회중 한예로써  $10^{-7}M$  staurosporine을 관류하면서  $1.5 \times 10^{-6}M$  PMA를 투

여한 결과 Fig 3에서와 같이  $Mg^{2+}$ 의 세포내 유입 (또는 유리억제)이 차단되었다. 즉, PMA에 의한  $Mg^{2+}$  유리곡선의 급격한 하강효과가 staurosporine 존재하에서는 나타나지 않았다. 이는 PKC 활성화로 세포내  $Mg^{2+}$ 이 유입 또는 유리가 억제됨을 의미한다고 할 수 있다.

Phenylephrine의 효과에 미치는  $H_7$ 의 영향 : 관류심장에서 PKC 활성화제는  $Mg^{2+}$ 을 유리시키기 보다는 유입시켰기 때문에  $\alpha_1$ -adrenoceptor 자극에 의해서 세포내로 부터  $Mg^{2+}$  유리효과는 PKC를 경유하지 않음을 간접적으로 Fig 3의 결과로 부터 알 수 있다. 이를 확인하기 위하여 PKC 억제제인  $3 \times 10^{-6}M$   $H_7$ -hydrochloride 존재하에서 phenylephrine의 효과를 관찰하였다. Phenylephrine을 10분간 투여시  $Mg^{2+}$  유리가 일어났다. 즉, phenylephrine에 의한  $Mg^{2+}$  유리효과가  $H_7$ 으로 차단되지 않았다(Fig 4).

Phenylephrine의 효과에 미치는 verapamil의 영향 :  $Mg^{2+}$ 이  $Ca^{2+}$ ,  $Na^+$  및  $K^+$  등의 다른 이온을 조절할 수 있고, 이들 이온들에 의해서  $Mg^{2+}$ 의 변동이 조절될 수 있다는 증거는 많다. Phenylephrine은 심박수, 심근 수축력을 증가시키므로 이들 증가에 의해서 또는 이들 증가에 의한  $Ca^{2+}$ ,  $Na^+$  및  $K^+$  등의 변동에 의해서  $Mg^{2+}$ 의 변동을 초래할 수 있다. 한편  $Mg^{2+}$ 은 "nature's physiological calcium blocker"로 잘 알려져 있어서  $Ca^{2+}$ 은  $Mg^{2+}$ 을,  $Mg^{2+}$ 은  $Ca^{2+}$ 을 조절할 수 있기 때문에 이들의 관계는 매우

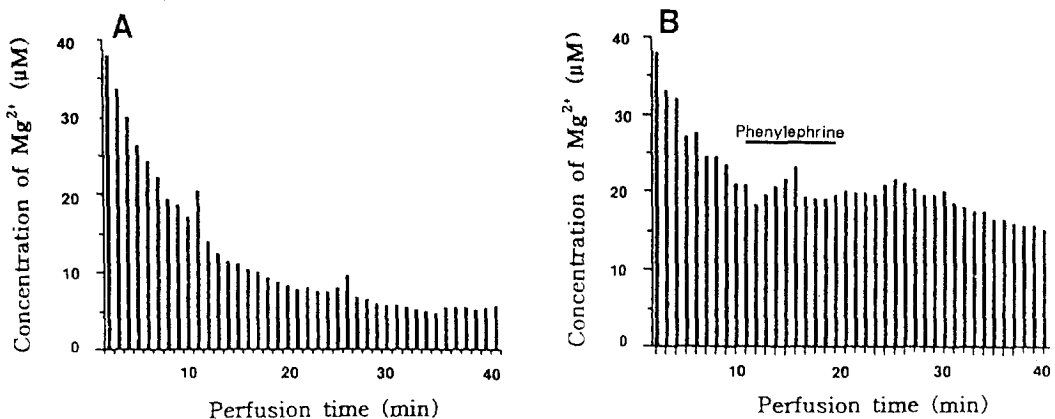


Fig 1. Effects of  $10^{-4}M$  phenylephrine on  $Mg^{2+}$  efflux in perfused guinea pig heart.

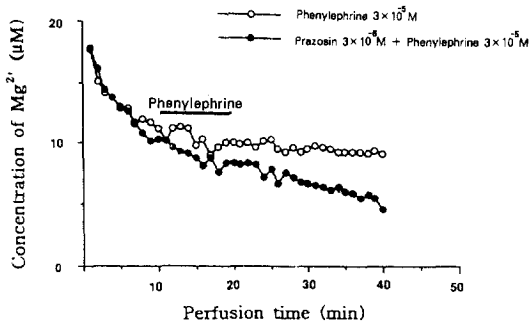


Fig 2. Effects of  $3 \times 10^{-6} \text{M}$  prazosin on  $\text{Mg}^{2+}$  efflux by  $3 \times 10^{-5} \text{M}$  phenylephrine in perfused guinea pig heart.

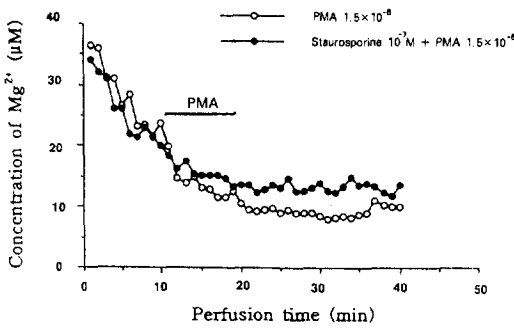


Fig 3. Effects of  $10^{-7} \text{M}$  staurosporine on  $\text{Mg}^{2+}$  efflux by  $1.5 \times 10^{-6} \text{M}$  PMA in perfused guinea pig heart.

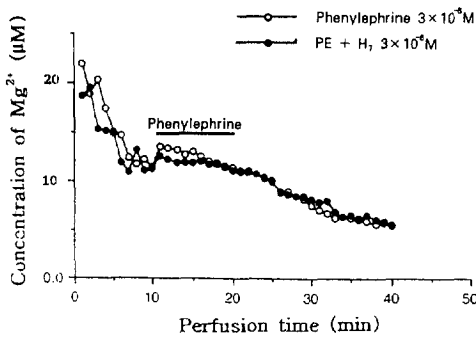


Fig 4. Effects of  $3 \times 10^{-6} \text{M}$   $\text{H}_7$  on  $\text{Mg}^{2+}$  efflux by  $3 \times 10^{-5} \text{M}$  phenylephrine in perfused guinea pig heart.

복잡하고 중요하다. 본 연구에서는  $\text{Ca}^{2+}$  통로 차단제인  $10^{-5} \text{M}$  verapamil을 관류시켜  $\text{Ca}^{2+}$  통로를 경유한 세포내로  $\text{Ca}^{2+}$  유입을 억제한 후 phenylephrine에

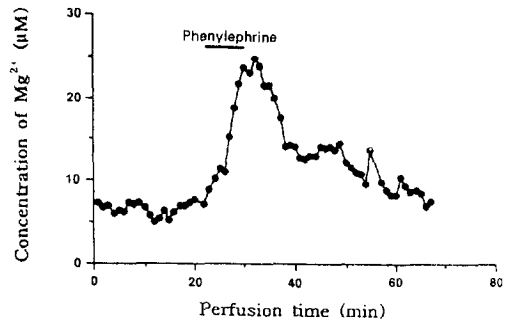


Fig 5. Effects of  $10^{-5} \text{M}$  verapamil on  $\text{Mg}^{2+}$  efflux by  $3 \times 10^{-5} \text{M}$  phenylephrine in perfused guinea pig heart.

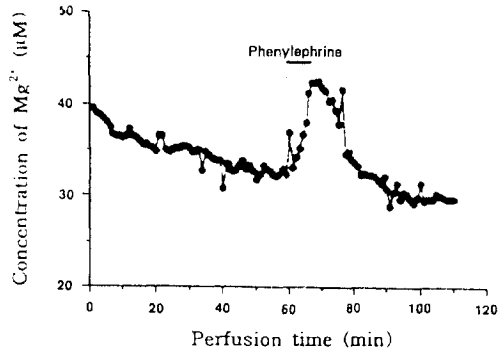


Fig 6. Effects of  $10^{-5} \text{M}$  lidocaine on  $\text{Mg}^{2+}$  efflux by  $3 \times 10^{-5} \text{M}$  phenylephrine in perfused guinea pig heart.

의한  $\text{Mg}^{2+}$  변동효과를 관찰한 것으로(Fig 5),  $\text{Ca}^{2+}$  통로 차단제  $10^{-5} \text{M}$  verapamil 존재하에서  $\alpha_1$ -adrenoceptor 자극에 의해서  $\text{Mg}^{2+}$  유출이 정상상태에서  $\alpha_1$ -adrenoceptor 자극보다 더 현저했는데 이는  $\alpha_1$ -adrenoceptor 자극시  $\text{Mg}^{2+}$  유출은 세포내  $\text{Ca}^{2+}$  농도에 의해 크게 영향받음을 의미한다.

Phenylephrine의 효과에 미치는 lidocaine의 영향 : Fig 6은 phenylephrine을 투여전 40분부터  $10^{-5} \text{M}$  lidocaine을 관류시켜  $\text{Na}^+$  통로를 경유한 세포내  $\text{Na}^+$  유입을 억제한 후 phenylephrine을 투여한 결과로써 실험 4회중 한 예이다. 본 실험에서  $\text{Na}^+$  channel blocker인 lidocaine 존재하에서 phenylephrine에 의한  $\text{Mg}^{2+}$  유출이 정상에서 보다 현저함을 관찰하였다.

## 고 찰

$\text{Mg}^{2+}$ 은 일반적으로 생체에서 kinases, phosphatases

및 synthetases의 활성화를 위한 보조인자로 glycolysis, 지방 가수분해, DNA 합성 및 인산화를 조절하여 세포의 대사를 조절할 뿐만 아니라 수용체와 G-단백의 결합인자와 세포막 구성분을 안정화시켜 세포의 구조적 특성을 결정하고, 세포의 bioenergetics를 조절하는 역할을 한다. 특히  $Mg^{2+}$ 은 심장의 생리적 기능을 조절하는 인자로 작용하고 있기 때문에 생체내 필수적인 이온으로 다른 여러 이온들과 상호 밀접한 관계를 갖고 다음과 같은 이온과 수송계에 영향을 미쳐서 심장세포의 기능에 많은 영향을 미칠수 있다<sup>18</sup>. 첫째,  $Mg^{2+}$ 은  $Ca^{2+}$  통로 antagonist로 작용할 수 있기 때문에 세포내  $Ca^{2+}$  농도의 완충작용이  $Mg^{2+}$ 에 의해 조절된다<sup>18,19</sup>. 세포내  $Mg^{2+}$ 은  $Ca^{2+}$  통로에 작용하거나  $Ca^{2+}$  통로를 탈인산화시키는 protein phosphatase를 자극하며<sup>18</sup>,  $Ca^{2+}$  통로의 voltage-의존성 비활성이 세포내  $Mg^{2+}$ 에 의한  $Ca^{2+}$  통로차단에 의한<sup>5,20</sup>. 본 실험에서도  $Mg^{2+}$  free 영양액은 심박수와 심장의 운동성을 현저히 증가시켰다. 이와같은 결과는  $Mg^{2+}$ 이  $Ca^{2+}$ 의 작용을 길항하고 있음을 의미한다. 따라서 실험적 또는 임상적으로 고농도  $Mg^{2+}$ 은 허혈성 심장에 방어효과가 있으며<sup>21</sup>, 지역적으로  $Mg^{2+}$ 이 충분히 함유된 경수(hard water) 지역에서는 허혈성 심장질환이나 심장 관련사망율이 현저히 낮다는 보고가 있다<sup>22</sup>. 둘째, 기니피프 심근 세포막 표면(cytoplasmic surface)의  $Mg^{2+}$  제거는 ATP-sensitive  $K^{+}$  통로의 내향성 rectification을 억제하고<sup>23</sup>, 정상적인  $Mg^{2+}$  농도는 ischemia나 hypoxia때 감소하는 ATP-sensitive  $K^{+}$  통로를 통한 외향성  $K^{+}$  current를 억제하기 때문에 ATP 결핍은  $Mg^{2+}$ 의 결합 부위가 감소되어  $Mg^{2+}$ 은 증가된다<sup>23</sup>. 셋째,  $Mg^{2+}$ 은 adenylate cyclase의 주요 활성인자로 알려져 있고  $Mg^{2+}$ 을 필요로 하는 이 adenylate cyclase의 활성에 의해 cAMP가 조절되게 된다<sup>35,24</sup>.

이와같이 세포내  $Mg^{2+}$ 은 이온 전달계에 결정적인 영향을 미친다는 점과 기타  $Mg^{2+}$ 의 주요 역할에 대해서는 많은 연구보고로 많은 정보가 알려진 반면 생체 또는 세포활성에 현저한 영향을 미치는 이  $Mg^{2+}$ 의 조절 기전에 대해서는 아직 잘 알려져 있지 않다. 중요한 것은 심장세포에서 세포내  $Mg^{2+}$ 량이 소량 변동되어도 RNA translation, 세포막의  $K^{+}$ 과  $Ca^{2+}$  통로 활성도, SR로부터  $Ca^{2+}$  유리 및 많은 효소 활성 등과 같은 심장세포의 생리학적 기능에 현저한 영향을 주기 때문에 생리학적 또는 병리학적으로 세포내  $Mg^{2+}$ 의 변동은 필연

적인 연구분야이다. 특히 신경전달물질, 호르몬 및 약물에 의한  $Mg^{2+}$ 의 변동기전에 대해서는 잘 알려져 있지 않아서 심장에서의  $Mg^{2+}$  조절기전에 대한 연구 필연성이 강조되고 있다. 지금까지 알려진  $Mg^{2+}$ 의 세포막 수송기전을 요약하면 다음과 같다.

1)  $Mg^{2+}$ 의 세포내 유입 : 심근세포는  $Mg^{2+}$ 의 투과성이 있음은 분명하지만 그 경로는 아직 잘 알려져 있지 않다. 세포내 유입에 대한 증거로 첫째, 개구리 골격근에서 voltage-gated  $Ca^{2+}$  통로를 경유하여  $Mg^{2+}$  유동이 있다고 하였으나<sup>25</sup> 심근세포에서 whole cell 또는 single channel 기록상  $Ca^{2+}$  통로를 통한  $Mg^{2+}$ 의 내향 전류를 측정하지 못해 이  $Ca^{2+}$  통로를 통한 유입으로는 볼 수 없다<sup>26</sup>. 둘째,  $Mg^{2+}$  current가  $Na^{+}$  통로 차단제인 tetrodotoxin이나 lidocaine 등에 의해 억제되고<sup>27</sup>  $Na^{+}$ 이나  $Ca^{2+}$ 이 결여된다면  $Mg^{2+}$ 의 내향성 전류는 발생하지 않는다<sup>28</sup>. 셋째,  $Mg^{2+}$  uptake는 bacteria에서 잘 알려져 있으나 심장에서 직접적인 증거는 없다<sup>6</sup>. 네째,  $Mg^{2+}$  유입은 유출처럼  $Na^{+}$  전위차에 의하여  $Na^{+}$ - $Mg^{2+}$  교환기를 통해 일어날 것이다<sup>7</sup>.

2)  $Mg^{2+}$ 의 유출 : 심근세포에서  $Mg^{2+}$ 의 투과성은 매우 느리지만 세포내 약 1mM의 농도를 유지하기 위해서는 유출이 이뤄져야 한다. Squid axon에서  $Mg^{2+}$  유동이 세포의  $Na^{+}$  농도에 의존적(세포내  $Na^{+}$  증가로  $Mg^{2+}$  유입증가)이고 맥관 평활근에서  $Mg^{2+}$ 의 유입 및 유출에 대한 믿을만한 수송계로  $Na^{+}$ - $Mg^{2+}$  교환기라고 한다<sup>8</sup>. 최근 Gunther 등은 chicken 적혈구에서  $Na^{+}$ - $Mg^{2+}$  교환기를 동정하여 2개의  $Na^{+}$ 의 유출에 대한 한개의  $Mg^{2+}$  유입으로 이 교환기의 역할을 규명하였으나<sup>29,30</sup> 다른 세포에서는 잘 알려져 있지 않았다. 비록 심장에서  $Na^{+}$ - $Mg^{2+}$  교환기에 대한 증거는 적지만 Fry 등<sup>31</sup>은 기니피프와 ferret 심근에서 세포내  $Mg^{2+}$ 이 세포의  $Mg^{2+}$ 과  $Na^{+}$ 의 변동에 의해 조절되어  $Na^{+}$ - $Mg^{2+}$  교환기에 의한 조절일 수 있다고 하였고 이 기전은 이온 전위차, coupling 비 및 막전위에 따라  $Mg^{2+}$  유입을 결정한다고 하였다. 기니피프 유두근에서  $Mg^{2+}$ 을 고농도로 증가시킬 때 세포내  $Na^{+}$  농도가 감소되고 세포내  $Mg^{2+}$ 이 증가되어 이 세포내  $Na^{+}$  감소에 의한 화학적 전위차 에너지에 의해  $Mg^{2+}$  유입이 일어날 수 있다는  $Na^{+}$ - $Mg^{2+}$  교환기 작동기전이 아직까지는 가장 믿을만한 증거이다<sup>31</sup>. 전술한 바와 같이  $Mg^{2+}$ 의 역할은 중요하기 때문에 이를 변동시키는 요인과 이 조절기전에 대한 연구는 매

우 중요한데 이에 대한 연구는 아직 미흡하다. White 등<sup>5</sup>은  $Mg^{2+}$ 의 수송계와 완충계 그리고 심장에서의  $Mg^{2+}$  조절기전에 대한 연구 필요성을 강조하였고 특히 약물에 의한  $Mg^{2+}$  조절기전은 약리학적 측면에서 매우 중요한데 지금까지 연구결과가 미흡한 실정이다.

신경전달물질이나 호르몬에 의한  $Mg^{2+}$ 의 조절에 대한 연구는 최근에 이르러 Scarpa 등의 연구진에 의해 활발히 연구되고 있는데 이들의 연구내용은 다음과 같다. 백서의 관류심장과 심장세포에서 norepinephrine으로  $\beta$ -adrenoceptor를 자극할 경우 세포내 총  $Mg^{2+}$ 의 20%가 수분내에 유출됨을 관찰하였고<sup>9</sup> 그 조절기전은  $\beta$ -agonist에 의한 cAMP 활성화로 인한 결과임을 관찰하여 최초로  $Mg^{2+}$ 의 호르몬성 조절에 대해 보고하였다. 그래서  $Mg^{2+}$ 은 그 자체가 cAMP를 조절할 수 있지만 이 연구에서는 cAMP가 직접적으로  $Mg^{2+}$  유입을 억제하거나 또는 유출시켜 세포의 다른 구성분으로 부터  $Mg^{2+}$ 의 재분포를 유도할 수 있기 때문에 이는 심근세포 구조 및 그 기능에 심각한 영향을 줄 수 있고, 다량의  $Mg^{2+}$  변동은 여러 kinases, ATPase를 변동시킬 것이고 SR, sarcolemma 및 mitochondria를 통한  $Ca^{2+}$  수송계를 조절하거나 mitochondria의 인산화 변동, 효소반응과 대사경로에 영향을 줄 것이라고 언급하였다<sup>9</sup>. 또한 이들은 백서 심장세포와 간세포에서 PKC 자극에 의한  $Mg^{2+}$ 의 uptake가 증가되는<sup>10</sup> 반면 cAMP는  $Mg^{2+}$ 의 유리를 촉진하고<sup>12-14</sup> 세포 내외의 다른 양이온들에 의해  $Mg^{2+}$ 의 이동이 영향 받음을 보고하였다<sup>11</sup>. 이와 반대로 cAMP를 감소시키는 약물에 의해  $Mg^{2+}$  uptake가 촉진된다고 하였다<sup>9,10</sup>.

지금까지 심장에서  $\alpha_1$ -adrenoceptor 자극에 의한  $Mg^{2+}$  조절에 대한 연구보고는 없었다. 단지 1989년 Jakob 등<sup>17</sup>은 백서 간에서 phenylephrine의  $Mg^{2+}$  유리를 일으킬 수 있다는 단순한 결과 뿐 그 유리기전에 대한 결과는 보여주지 못했다. 저자는 기니픽 심장을 적출하여 관류 system에 고정된 후 phenylephrine으로  $\alpha_1$ -adrenoceptor를 자극한 결과 뚜렷한  $Mg^{2+}$  유리가 간에서 보여준  $Mg^{2+}$  유리양상과 비슷하게 관찰되었고(Fig 1) 이 유리가  $\alpha_1$ -antagonist인 prazosin에 의해 차단되어  $\alpha_1$ -adrenoceptor를 경유한 결과임을 확인하였다(Fig 2).

$\alpha_1$ -Adrenoceptor 자극시 세포막의 PLC(phospholipase C)를 활성화하여 phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate( $PIP_2$ )가 가수분해되어 두 종류의 2nd messenger인  $IP_3$ 와

diacylglycerol(DAG)로 된다. 그래서  $IP_3$ 는 세포내  $Ca^{2+}$  유리를 자극하고 DAG는 PKC를 활성화시킨다. 따라서  $Mg^{2+}$  조절에 있어서 신경전달물질의 2nd messenger들이 관련되어 있음을 고려하여  $\alpha_1$ -adrenoceptor 효현제인 phenylephrine으로 guinea pig 심장을 자극할 경우  $Mg^{2+}$  유리가 2nd messenger를 경유한  $Mg^{2+}$  유리인지를 규명하기 위해 PKC 활성화제인 PMA로 관류 심장을 자극한 결과 유리보다는 유입 또는 유리 억제경향을 나타냈다(Fig 4). 이와 같은 결과는 백서 간세포와 심장세포에서 PKC에 의한  $Mg^{2+}$  uptake 증가효과<sup>10</sup>와 일치하였고, 또 PKC 억제제인 staurosporin은 PMA의 효과를 억제하였으나  $H_2$ 은 phenylephrine에 의한  $Mg^{2+}$  유리효과에 영향을 미치지 않았다(그림 4).

즉, 본 실험결과와 이전 연구결과를 종합해 볼 때 PKC를 경유한  $Mg^{2+}$ 유리기전이 아님을 알 수 있었다. 이 유리는 PKC를 경유한 효과가 아닌 다른 기전에 의한 함을 의미하는데 그 가능성 있는 조절기전으로  $IP_3$  경유,  $Ca^{2+}$  및  $Na^+$  같은 양이온의 변동에 의한 2차적  $Mg^{2+}$  유리, 심박수 증가에 의한 유리 등에 주목할 수 있다. 그러나 본 실험의 문제점은 이 억제제의 영향을 관류심장에서 관찰하기에는 전체 심장에서 조절되고 있는 총  $Mg^{2+}$  변동량이 소량이기 때문에 비록 어떤 영향이 있어도 나타나지 않을 수 있으므로 이 실험은 심장세포를 분리하여 실험해야 할 것이다. 또한 Fig 5, 6에서 보는 바와 같이  $Ca^{2+}$  통로 차단제인 verapamil이나  $Na^+$  통로 차단제인 lidocaine 존재하에서는 phenylephrine에 의한  $Mg^{2+}$  유리가 정상에서 보다도 현저히 많음이 관찰되었다. 물론  $Mg^{2+}$  조절에 대해 많은 양이온들이 관련되어 있다. 그런데 Scarpa 등<sup>11</sup>은 심장세포와 간세포에서  $\beta$ -adrenoceptor 자극시  $Ca^{2+}$  통로 차단제에 의해서  $Mg^{2+}$ 의 유출이 억제될 뿐만 아니라 세포의  $Na^+$  농도가 높을수록  $Mg^{2+}$ 의 uptake가 증가한다고 하여 본 실험 결과와는 상반되었다. 이전 연구와 본 실험을 비교해 볼 때 정상 기니픽 심장에서  $\alpha_1$ -adrenoceptor 자극에서 보다도  $Ca^{2+}$  통로 또는  $Na^+$  통로 차단제 존재하에서 phenylephrine에 의한  $Mg^{2+}$  유리가 현저해졌음은 매우 상이한 결과이므로 본실험의 결과가 직접적으로  $\alpha_1$ -adrenoceptor를 경유한 결과라면 이는 병리학적 측면에서 매우 중요하다. 왜냐하면, 정상적으로  $Ca^{2+}$ 이나  $Na^+$ 이 조절되지 못하는 심장의 병적인 상태에서  $\alpha_1$ -adrenoceptor의 자극은 더 많은  $Mg^{2+}$ 을 유리시켜 더 악

화시킬 우려가 있기 때문이다.

끝으로  $\alpha_1$ -adrenoceptor 자극에 의한 많은 이온계의 변동을 일으켜 약리학적 생체반응을 일으키는 잘 알려져 있으나 심장에서 이 수용체 자극에 의한  $Mg^{2+}$  조절에 대해서는 전혀 연구된 바 없을 뿐만 아니라  $Mg^{2+}$ 이 소량 변동해도 심장에서는 다른 이온계, 효소계, 대사계, 세포와 핵산의 구조적 특성 및 세포 에너지 생성에 큰 변동을 줄 수 있기 때문에  $Mg^{2+}$  조절기전에 대해서 특별한 연구가 있어야 할 것으로 사료된다.

## 결 론

최근 신경전달물질이나 약물에 의한 세포내  $Mg^{2+}$  농도의 조절에 대한 관심에도 불구하고, 심장에서  $\alpha_1$ -adrenoceptor에 의한  $Mg^{2+}$  분비조절에 대해서는 연구된 바 없다. 따라서 저자는  $\alpha_1$ -adrenoceptor 자극에 의한  $Mg^{2+}$  유리 조절과 비정상적인 상태에서  $\alpha_1$ -adrenoceptor 자극 효과를 알아보기 위하여 관류 기니피 심장에서 phenylephrine, PMA, staurosporine,  $H_2$ , verapamil과 lidocaine 등에 의한  $Mg^{2+}$  유리 효과를 관찰하였다.

심장을 관류 system에 결합후 약물을 투여하기전 15분 동안 1.5mM  $Mg^{2+}$ 이 첨가된 영양액을 관류시켰고 그후  $Mg^{2+}$  free 영양액을 관류시켜 심장으로 부터 유리되는 관류액내의  $Mg^{2+}$ 을 atomic absorption spectrophotometry를 이용하여 측정하였다.  $Mg^{2+}$  free 영양액은 심박수를 증가시켰으며 phenylephrine은 심장에서  $Mg^{2+}$  유리를 증가시켰다. 그리고 phenylephrine에 의한  $Mg^{2+}$  유리증가는 prazosin 존재하에서 억제되었다. 반면 PKC 활성화제인 PMA에 의한  $Mg^{2+}$  유입 또는 유리 억제는 선택적 PKC 억제제인 staurosporin에 의해 억제되었다. 그러나 phenylephrine에 의한  $Mg^{2+}$  유리증가효과는 PKC 억제제인  $H_2$ 에 의해 영향을 받지 않았다. 그리고  $Ca^{2+}$  및  $Na^+$  통로 차단제인 verapamil이나 lidocaine을 전처리한 심장에서는 phenylephrine에 의한  $Mg^{2+}$  유리가 현저히 증가됨을 관찰하였다.

이들 결과에서 관류 기니피 심장에서  $\alpha_1$ -adrenoceptor 자극에 의한  $Mg^{2+}$  유리효과는 PKC를 경유하지 않는 것을 알 수 있었고 또한 심장세포내 비정상적인 이온농도의 변화가 있는 병적인 상태에서의  $\alpha_1$ -adrenoceptor 자극은 심장세포의  $Mg^{2+}$  농도변화에 상당한 영향을 미칠 것으로 사료된다.

## 참 고 문 헌

1. Flatman PW. Magnesium transport across cell membranes. *J Mem Biol*, 80 : 1~14, 1984.
2. Grubbs RD and Maguire ME. Magnesium as a regulatory cation : Criteria and evaluation. *Magnesium*, 6 : 113~127, 1987.
3. Maguire ME. Hormone-sensitive magnesium transport and magnesium regulation of adenylate cyclase. *Trends Pharmacol Sci*, 5 : 73~77, 1984.
4. Gunther T. Functional compartmentation of intracellular magnesium. *Magnesium*, 5 : 53~59, 1986.
5. White RE and Hartzell HC. Magnesium ions in cardiac function : Regulation of channel and second messengers. *Biochem pharmacol*, 38 : 859~867, 1989.
6. Snavely MD, Gravina SA, Cheung TBT, et al. Maguire ME. Magnesium transport in Salmonella Typhimurium : Regulation of mgtA and mgtB expression. *J Biol Chem*, 266 : 824~829, 1991.
7. Murphy E, Freunderich CG, Liebermann M. Cellular magnesium and Na/Mg exchange in heart cells. *Annu Rev Physiol*, 53 : 273~287, 1991.
8. Shetty SS and Weiss GB. Alterations in Mg distribution and movements in rabbit aortic smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther*, 245 : 112~119, 1988.
9. Romani A, and Scarpa A. Hormonal control of  $Mg^{2+}$  transport in the heart. *Nature*, 346 : 841~844, 1990.
10. Romani A, Marfella C and Scarpa A. Regulation of  $Mg^{2+}$  uptake in isolated rat myocytes and hepatocytes by protein kinase C. *FEBS Lett*, 296 : 135~140, 1992.
11. Romani A, Marfella C and Scarpa A. Regulation of magnesium uptake and release in the heart and in isolated ventricular myocytes. *Cir Res*, 72 : 1139~1148, 1993.
12. Zheng JS, Christie A, De Young MB, et al. Synergism between cAMP and ATP in signal transduction in cardiac myocytes. *Am J Physiol*, 262 : C128~C135, 1992.
13. Romani A, Dowell E and Scarpa A. Cyclic AMP-induced  $Mg^{2+}$  release from rat liver hepatocytes, per-



- meabilized hepatocytes and isolated mitochondria. *J Biol Chem*, 266 : 24376~24384, 1991.
14. Romani A and Scarpa A. Norepinephrine evokes a marked  $Mg^{2+}$  efflux from liver cells. *FEBS Lett*, 269 : 37~40, 1989.
  15. Simpson P. Stimulation of hypertrophy of cultured neonatal rat heart cells through an  $\alpha_1$ -adrenergic receptor and induction of beating through an  $\alpha_1$ - and  $\beta$ -adrenergic receptor interaction. *Cir Res*, 56 : 884~894, 1989.
  16. Otani H, Hitomi, and Dipak KD. Evidence that phosphoinositide response is mediated by  $\alpha_1$ -adrenoceptor stimulation, but not linked excitation contraction coupling in cardiac muscle. *Biochem Biophys Res Commun*, 136 : 863~869, 1986.
  17. Jakob A, Beckert J, Schottli G, et al.  $\alpha_1$ -A-drenergic stimulation causes  $Mg^{2+}$  release from perfused rat liver. *FEBS Lett*, 246 : 127~130, 1989.
  18. White RE and Hartzell HC. Effect of intracellular free magnesium on calcium current in isolated cardiac myocytes. *Science*, 239 : 778~780, 1988.
  19. Bersohn MM, Shine KI and Sterman WD. Effects of increased magnesium on recovery from ischemia in rat and rabbit hearts. *Am J physiol*, 242 : H89~H93, 1982.
  20. Eckert R and Chad JE. Inactivation of Ca channels. *Prog Biophys Mol Biol*, 44 : 215~267, 1984.
  21. Rasnyssen HS, Norrgard P, Lindeneg O, et al. Intravenous magnesium in acute myocardial infarction. *Lancet*, 1 : 234~236, 1986.
  22. Anderson TW, Neri LC, Schreiber GB, et al. Ischemic heart disease, water hardness and myocardial magnesium. *Can Med Assoc J*, 113 : 203, 1975.
  23. Horie M, Irisawa H and Noma A. Voltage-dependent magnesium block of adenosine-triphosphate-sensitive potassium channel in guinea-pig ventricular cells. *J Physiol(Lond)*, 387 : 251~272, 1987.
  24. Iyengar R and Birnbaumer L. Hormone receptor modulates the regulatory component of adenylyl cyclase by reducing its requirement for  $Mg^{2+}$  and engaging its extent of activation by guanine nucleotides. *Proc Natl Acad Sci USA*, 79 : 5179~5183, 1982.
  25. Almers W and Palade PT. Slow calcium and potassium currents across frog muscle membrane: Measurements with a vaseline-gap technique. *J Physiol(Lond)*, 312 : 159~176, 1981.
  26. Kohlhardt M, Haastert HP and Krause H. Evidence of non-specificity of the Ca channel in mammalian myocardial fibre membranes. Substitution of Ca by Sr, Ba or Mg as charge carriers. *Pflugers Arch*, 342 : 125~136, 1973.
  27. Spah F and Fleckenstein A. Evidence of a new, preferentially Mg-carrying, transport system besides the fast Na and the slow Ca channels in the excited myocardial sarcolemma membrane. *J Mol Cell Cardiol*, 11 : 1109~1127, 1979.
  28. Chesnais JM, Coraboeuf E, Sauviat MP et al. Sensitivity to H, Li and Mg ions of the slow inward sodium current in frog atrial fibres. *J Mol Cell Cardiol*, 7 : 627~642, 1975.
  29. Gunther T, Vormann J and Forster R. Regulation of intracellular magnesium by  $Mg^{2+}$  efflux. *Biochem Biophys Res Commun*, 119 : 124~131, 1984.
  30. Gunther T and Vormann J.  $Mg^{2+}$  efflux is accomplished by an amiloride-sensitive  $Na^+/Mg^{2+}$  antiport. *Biochem Biophys Res Commun*, 131 : 540~545, 1985.
  31. Fry CH. Measurement and control of intracellular magnesium ion concentration in guinea pig and ferret ventricular myocardium. *Magnesium*, 5 : 306~316, 1986.