

## 기니픽 심장과 심근세포에서 Phenylephrine에 의한 PKC 활성화가 $Mg^{2+}$ 유리에 미치는 영향

장성은 · 강형섭 · 김진상

전북대학교 수의과대학 약리학교실  
(1997년 9월 23일 접수)

### Effects of phenylephrine-induced PKC activation on $Mg^{2+}$ release in guinea pig heart and isolated ventricular myocytes

Sung-eun Chang, Hyung-sub Kang, Jin-sang Kim

*Department of Pharmacology, College of Veterinary Medicine, Chonbuk National University,  
Chonju, Chonbuk 561-756, Korea*

(Received Sep 23, 1997)

**Abstract :**  $Mg^{2+}$  is one of the most abundant divalent cations in mammalian body(0.2~1.0mM) and the important physiological roles are : first, the cofactor of many enzyme activities, second, the regulator of glycolysis and DNA synthesis, third, the important role of bioenergetics by regulating of phosphorylation, fourth, the influence of cardiac metabolism and function. In this work we have investigated the regulation of the  $Mg^{2+}$  induced by  $\alpha_1$ -adrenoceptor stimulation in perfused guinea pig hearts and 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, and the left ventricular pressure. Phenylephrine also enhanced the force of contraction in the presence of  $Mg^{2+}$ -free medium.  $\alpha_1$ -Agonists such as phenylephrine and methoxamine were found to induce  $Mg^{2+}$  efflux in both perfused hearts and myocytes. These effects were blocked by prazosin, an  $\alpha_1$ -adrenoceptor antagonist. The  $Mg^{2+}$  influx could also be induced by phenylephrine and R59022, a diacylglycerol kinase inhibitor. In the presence of protein kinase C(PKC) inhibitors, phenylephrine produced an increase in  $Mg^{2+}$  efflux from perfused hearts. Furthermore,  $Mg^{2+}$  efflux by phenylephrine was amplified by phorbol 12-myristate 13-acetate(PMA). This enhancement of  $Mg^{2+}$  efflux by PMA was blocked by prazosin in perfused hearts. By contrast, the  $Mg^{2+}$  influx could be induced by verapamil, nifedipine, ryanodine in perfused hearts, but not in myocytes.  $W_7$ , a  $Ca^{2+}$ /calmodulin antagonist, completely

---

본 연구는 한국과학재단의 핵심전문지원과제(KOSEF 961-0704-038-1)에 의하여 이루어졌음.

Address reprint requests to Dr. Jin-sang Kim, Department of Pharmacology, College of Veterinary Medicine, Chonbuk National University, Chonju, Chonbuk 561-756, Korea.

blocked the phenylephrine-induced  $Mg^{2+}$  efflux in perfused hearts.

In conclusion,  $Mg^{2+}$  is responsible for the cardiac activity associated with  $\alpha_1$ -adrenoceptor stimulation. The mobilization of  $Mg^{2+}$  is decreased or increased by  $\alpha_1$ -adrenoceptor stimulation in guinea pig hearts. These responses may be related specifically to the respective pathways of signal transduction. A decrease in  $Mg^{2+}$  efflux by  $\alpha_1$ -adrenoceptor stimulation in hearts can be through PKC dependent and intracellular  $Ca^{2+}$  levels.

**Key words :**  $\alpha_1$ -adrenoceptor, magnesium, cardiac myocytes, phenylephrine, heart.

## 서 론

$Mg^{2+}$ 는 포유동물내에 풍부히 존재하고, 특히 세포내에 두번째로 많이 함유하고 있는 양이온으로 알려져 있으며, 생체에서 kinase, phosphatase 및 synthetase의 활성화를 위한 보조인자<sup>1</sup>로 glycolysis, 지방 가수분해, DNA 합성 및 인산화의 조절인자<sup>1</sup>로,  $Ca^{2+}$ ,  $K^+$  및  $Na^+$  등의 수송을 조절하는 작용으로 세포 대사를 조절할 뿐만 아니라<sup>1-4</sup> 수용체와 G-단백 결합인자와 세포막 구성분을 안정화시켜 세포의 구조적 특성을 결정하고<sup>1,5,6</sup>, 세포의 bioenergetic을 조절하는 역할을 한다<sup>4</sup>. 또한 심장수술후 심장의 자극을 주기 위하여 임상적으로 저농도 또는 free  $Mg^{2+}$ 이 쓰여지기도 한다. 반면 실험적 임상적으로 세포의  $Mg^{2+}$  농도를 증가시키면 허혈성 심장을 예방할 수 있는데<sup>10</sup>, 이  $Mg^{2+}$ 에 의한 허혈성 심장손상의 예방효과는  $Mg^{2+}$ 에 의한  $Ca^{2+}$  antagonist 효과 때문이라고 한다<sup>11</sup>. 실험적으로 백서 허혈성 심장에 cardiac reperfusion은 ischemic 손상을 더욱 악화시키는데 이는 아마도 이 허혈 상태에서 갑작스런  $Mg^{2+}$ 의 결핍이 reperfusion 손상을 증가시키는 듯하다는 보고가 있고, 이 reperfusion 동안 고농도  $Mg^{2+}$  용액은 심장을 보호하고<sup>12</sup> 허혈후 심장의 대사 및 기능의 회복이 증진된다<sup>13</sup>. 또는 임상적으로 고농도  $Mg^{2+}$ 을 사용하여 세포내  $Ca^{2+}$  농도를 감소시켜 고혈압 환자를 치료하는데 실제 고혈압, 당뇨병 및 비만인 경우에는 세포내  $Ca^{2+}$ 이 높은 반면  $Mg^{2+}$  농도는 낮다고 한다<sup>7,10</sup>. 따라서 실험적으로 심근경색이 있는 동안 심근 허혈은 물론 관상동맥의 경련, 혈관수축제의 효과강화, 심부정맥, 고혈압, 심근경색( $MgCl_2$ 나  $MgSO_4$  공급으로

치료효과가 좋은 경색증), 맥관계 내피세포의 손상 등의 심맥관계 손상을 일으키는 1차적 증상이 특징이라고 한다<sup>10,14-18</sup>. 이와같이 심장기능에 중요한 역할을 하고 있는  $Mg^{2+}$ 에 대해서 giant cells, bacteria 및 적혈구에서  $Mg^{2+}$  농도조절 기전에 대해서 보고되었을 뿐<sup>19-21,35,36</sup> 포유동물의 심장세포에서 이 기전은 잘 알려져 있지 않았고, 단지  $Na^+$ - $Mg^{2+}$  교환기가 아직까지 가장 잘 알려진  $Mg^{2+}$  조절기전이다<sup>4,20,32</sup>. 최근 약물, 호르몬 및 양이온 등에 의한  $Mg^{2+}$ 의 변동을 관찰한 바 이들은 직접적으로 세포내  $Mg^{2+}$  농도변화를 일으킨다고 하였으며<sup>22-24</sup> noradrenaline의 투여는 심장 또는 심근세포로부터  $Mg^{2+}$ 을 유리시킨다고 하였다<sup>22</sup>. 또한 vasopressin과 glucagon의 정맥내 직접 투여가 mitochondria내  $Mg^{2+}$  농도를 증가<sup>25</sup>시키기 때문에 많은 양의  $Mg^{2+}$  변화는 세포나 세포내 성분을 통과하여  $Mg^{2+}$ 의 재분배를 일으킬 수 있고 이는 심장세포 구조와 기능에 많은 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 그러므로  $Mg^{2+}$ 이 심장세포의 기능의 조절인자라면  $Mg^{2+}$  자체는 생리적 조건에 따라서 변동될 것이다. Noradrenaline에 의한  $Mg^{2+}$ 의 이동기전은 Scarpa et al<sup>22-24,26-28</sup>에 의해서 연구되었는데 이들은 최근 심장세포에서  $\beta$ -adrenergic 수용체 자극은 세포로부터  $Mg^{2+}$ 을 유리시키고<sup>22</sup>, protein kinase C(PKC) 활성화에 의한 자극시 세포로부터 심장세포와 간세포에서  $Mg^{2+}$ 이 축적된다고 보고하였다<sup>22,23</sup>. 이같은 결과는 심근세포는 수용체를 경유한 cAMP나 PKC의 활성화에 의해 신속하게 변할 수 있는  $Mg^{2+}$ 의 주요 저장소임을 암시하였고,  $Mg^{2+}$  농도조절에 있어서  $\beta$ -adrenergic 수용체의 역할을 강조하였다<sup>22,23,28</sup>. 그러나 최근 심장에서  $\alpha_1$ -adrenoceptor를 경유한 수축력의 증가에 대한 중요성이 대두되었고,  $\alpha_1$ -adrenoceptor 자

극은  $\beta$ -adrenoceptor 자극효과와는 달리 cAMP의 증가를 일으키지 않아 심박수를 크게 변동시키지 않으므로 중요한 심근수축력 증가제로 연구되고 있고, 부정맥이나 심부전 치료시 유발되는 심비대 원인과 치료를 위하여  $\alpha_1$ -adrenoceptor의 작용기전 및 그 차단제의 활용이 많아지고 있다<sup>29</sup>. 따라서  $\alpha_1$ -adrenoceptor를 경유한 세포내 이온수송계나 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 없고, 단지 1989년 Jakob *et al*<sup>30</sup>은 관류 흰쥐 간에서 phenylephrine(PE)이  $Mg^{2+}$  유리를 일으킬 수 있다는 실험결과를 보고한 바 있어 심장에서도  $\alpha_1$ -adrenoceptor 자극은  $Mg^{2+}$ 을 변동시킬 수 있을 것으로 사료되었고,  $\alpha_1$ -adrenoceptor의 신호전달계에 있어서  $\alpha_1$ -adrenoceptor 자극시 세포막의 PLC(phospholipase C)를 활성화 하여 phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate( $PIP_2$ )가 가수분해 되어 두 종류의 second messenger인  $IP_3$ 와 diacylglycerol(DAG)로 된다<sup>31</sup>. 그래서  $IP_3$ 는<sup>42-44</sup> 세포내  $Ca^{2+}$  유리를 자극하고, DAG는 PKC를 활성화 시키기 때문에<sup>40-41,45</sup> 이들 second messenger를 경유한  $Mg^{2+}$  유리 및 유입인지, 이들의 활성화에 의한 세포내  $Ca^{2+}$  같은 양이온의 변동으로 2차적인  $Mg^{2+}$  변동인지를 규명하기 위하여 본 연구자 등은 관류 guinea pig heart와 심근세포에서  $Mg^{2+}$ 의 유입에 대한  $\alpha_1$ -adrenoceptor 자극 효과를 밝히고자 본 연구를 실시하였다.

## 재료 및 방법

**심근적출과 수축력 측정 :** 체중 300g 내외의 기니픽을 두부타격후 심장을 적출하여 36℃, 95%  $O_2$ , 5%  $CO_2$ 의 포화용액에서 혈액을 제거한 다음, stereozoom 현미경하에서 우심실로부터 직경 약 0.5~1mm, 길이 2~3mm의 유두근을 적출하였다. 적출한 유두근을 tissue chamber에 넣어 고정핀으로 sylgard 바닥에 고정하고, 유두근의 원위부는 직경 25 $\mu$ m의 은선을 묶고 장력 transducer(Cambridge, M-405)에 연결하여 수축력을 측정하였다. 조직 chamber 통로를 통해 산소가 포화된 영양액(36~37℃, 137mM NaCl, 5.4mM KCl, 1.05mM  $MgCl_2$ , 0.45mM NaH

$_2PO_4$ , 11.9 mM  $NaHCO_3$ , 1.8mM  $CaCl_2$  및 5mM dextrose)을 관류시켰다. 영양액은 일정속도(8ml/분)로 공급되어 근육주위의 용액이 수초내에 다른 이온농도 또는 다른 약물을 포함한 실험용액으로 변동될 수 있도록 하였다. 용액의 pH는 7.3~7.4가 되도록 하였다. 전기자극은 자극기(WPI model 1830)로 부터 자극 유리장치를 경유한 사각파로 시행하였다. 자극전압은 역치전압보다 20~40% 높게 하고, 근육은 1Hz로 자극하였다. 장력 transducer를 통한 출력은 chart recorder(Gould)에 연결하여 계속 측정하였다. 이 transducer는 50mV/mg의 감도까지 미세한 장력변동을 측정할 수 있기 때문에 미세한 조직의 장력측정에 유용하였다.

**심장관류 model과  $Mg^{2+}$  농도측정 :** 기니픽을 두부타격후 신속히 심장을 적출하여 산소 포화용액(95%  $O_2$ , 5%  $CO_2$ , pH 7.3)에서 혈액을 제거한 다음, HEPES 완충용액이 관류되고 있는 관류 system(open system)의 연결관에 심장의 대동맥 부위를 삽입하여 결찰한다. 심장의 관상동맥 등에서 혈액응고를 방지하기 위해 이 과정은 수십초 이내에 실시하였다. 심장을 관류 system에 결찰 후 NaCl 120mM, KCl 3mM,  $CaCl_2$  1.2mM,  $MgCl_2$  1.2mM,  $KH_2PO_4$  1.2mM, glucose 10mM,  $NaHCO_3$  12mM 그리고 HEPES 10mM의 영양액(37℃, 산소포화 pH 7.3)을 7~8ml/min 속도로 관류시켰다. 15분후 free  $Mg^{2+}$  또는 5~20 $\mu$ M의  $Mg^{2+}$ 가 함유된 영양액을 공급하였는데 세포내  $Mg^{2+}$  농도가 낮아짐으로서 생리학적 세포기능이 변동될 수 있지만 이와같이 낮은 농도의  $Mg^{2+}$ 는 atomic absorbance spectrophotometry(AA, Sunil)를 이용하여 관류된 용액으로부터  $Mg^{2+}$  농도를 측정하기에 적합한 조건으로 하기 위해서 이다<sup>22</sup>. 만약 free  $Mg^{2+}$  또는 낮은 농도의  $Mg^{2+}$  용액을 사용하지 않으면 고농도의  $Mg^{2+}$  상태하에서  $\mu$ M 단위의  $Mg^{2+}$  농도변동을 측정하기 어렵다. 그 변동범위가 수십 또는 수  $\mu$ M이므로 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 관류용액에 직접 희석하여 관류시켰다. 약물의 관류시간은 조건에 따라 변동시켰다. 이렇게 취한 관류용액내  $Mg^{2+}$  농도는 AA를 이용하여 측정하였다. 실험조건에 따라 심장의 박동수를 증가시키기 위해서 심장의 전기자극 장치나 고농도 KCl용액을 사용하였다. 살아있는 심근세포내의  $Mg^{2+}$  측정은 아직까

지 다른 여러방법보다 ion-선택적 미세전극을 이용한 방법이 정확하다고 한다<sup>33</sup>. 그러나 세포외 측, 관류된 용액 내에서  $Mg^{2+}$  농도는 AA에 의한 측정법이 정확하다<sup>22</sup>.

**심근세포 분리방법 및  $Mg^{2+}$  측정** : 심근세포의 분리는 De Young *et al*<sup>34</sup>의 collagenase 소화방법을 개선하여 다음과 같이 실시하였다. 체중 300g 내외의 guinea-pig를 두부타격 후 즉시 흉강을 절개하여 대동맥의 길이가 최대한 길게 되도록 신속히 심장을 적출하였다. 적출심장의 대사속도를 가능한 감소시키기 위해 저온의 heparin이 첨가되고 충분히 산소로 포화된  $Ca^{2+}$ -Joklik buffer로 빠른 시간내 세척하면서 대동맥의 길이가 5mm 이상 되도록 절개한다. 절개된 대동맥을 open Langendorff system의 cannula에 삽입하여 현수하고 결찰후 폐와 심낭 등의 조직을 조심스럽게 제거하였다. 관류액은  $Ca^{2+}$ -Joklik buffer로 11.1g/l Joklik membrane powder(Sigma), 10mM glucose, 12mM  $NaHCO_3$ , 0.5mM  $CaCl_2$ , 95%  $O_2$ , 5%  $CO_2$ , pH 7.3~7.4, 온도는 37℃이다. Buffer내 pH는 항상 일정하게 유지되도록 pH 조절하면서 관류를 실시하였다. 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 관류하였다.  $Ca^{2+}$ -free Joklik buffer의 관류가 끝나면 collagenase buffer(collagenase 10mg/30ml  $Ca^{2+}$ -free Joklik buffer, Worthington)로 심장의 상태를 확인하면서 30~35분 동안 관류액을 재관류시키면서 소화시켰다.  $Ca^{2+}$ -tolerant 심장세포를 만들기 위하여 collagenase buffer로 소화시키는 동안 약 30분째 0.5mM  $Ca^{2+}$ 을 첨가하여 관류시켰다.

Collagenase buffer로 관류가 끝나면 0.5mM  $Ca^{2+}$ -trypsin collagenase buffer(trypsin 10mg/30ml,  $Ca^{2+}$ -Joklik buffer, Sigma)로 10~15분 관류시켰다. 0.5mM  $Ca^{2+}$ -trypsin collagenase buffer로 관류시키는 동안 약 5분째 0.5mM  $Ca^{2+}$  더 첨가하여 관류액내  $Ca^{2+}$  농도를 1mM이 되도록 하여 관류시켰다. 육안적으로 심장의 상태가 옅은 pink색을 띄고 표면에서 끈적한 점도가 느껴질 때 1.2mM  $Ca^{2+}$ -Joklik buffer로 5분간 심장을 세척하고, 1.2mM  $Ca^{2+}$ - $Mg^{2+}$  buffer로 5분간 관류시킨 후  $Mg^{2+}$  free-1.2mM  $Ca^{2+}$  buffer로 약 10분간 관류시켰다.  $Mg^{2+}$  free-1.2mM  $Ca^{2+}$  buffer의 조성은 120mM NaCl, 3mM KCl, 1.2mM  $CaCl_2$ , 1.2mM  $KH_2PO_4$ , 10mM glucose, 12mM  $NaHCO_3$  및 10mM HEPES,  $O_2$  :  $CO_2$ 는 95% : 5%, pH 7.3~7.4, 온도는 37℃이다.

관류가 끝나면 심방근과 심실근을 각각 완전히 분리

하여 BSA(100mg/10ml  $Mg^{2+}$  free-1.2mM  $Ca^{2+}$  buffer, Sigma)가 첨가된 buffer에서 심근세포를 분리한 다음, 심근세포의 부유액을 250 $\mu$ m Nylon-guaze를 이용하여 여과하였다. 분리한 세포는 상온에 30~60분 방치하여 안정화시킨 후 세포의 생존율을 현미경하에서 검정하여 세포의 형태가 전형적인 rod-shape을 하고 있는 것으로 70% 이상의 세포생존율이 있을 때 세포 계산기를 이용하여  $10^5$  세포( $10^5$  cells/ml)를 배양하여 실험을 실시하였다.

실험은  $10^5$  세포가 배양된 1ml의  $Mg^{2+}$  free-1.2mM  $Ca^{2+}$  buffer를 시험관에 대조군 및 약물투여군으로 분주하여 교반기가 장착된 warming bath에서 각각의 시험관을 5, 10, 15분동안 배양후 그 상층액만을 얻어서 AA로  $Mg^{2+}$ 의 농도를 측정하였다.

**사용약물** : Phenylephrine, methoxamine, atenolol, propranolol, phorbol 12-myristate 13-acetate(PMA),  $H_7$  dihydrochloride, verapamil, HEPES, trypsin, heparine, lidocaine (이상 Sigma), prazosin, staurosporine, diacylglycerol kinase inhibitor(R59022), chelerythrine,  $W_7$  hydrochloride, nifedipine, ryanodine, Bay K 8644, caffeine, cyclopiazonic acid, calcimycin(A23187)(이상 RBI), collagenase (Worthington Biochemical Corporation).

**통계처리** : 실험성적은 Mean $\pm$ SD으로 나타내었고, 각 군간의 유의성 검정은 Student's *t*-test 분석을 이용하였다.

## 결 과

심근에서 관류액내  $Mg^{2+}$  농도에 따른 수축력 변동과 관류심장에서  $Mg^{2+}$ -free 관류액에 의한 좌심실 압력변동 : Fig 1은 우심실에서 적출한 기니픽 유두근을 1Hz로 자극하면서  $Mg^{2+}$ -free(좌측 panel) 또는 1.1mM  $Mg^{2+}$ (우측 panel) 영양액이 수축력에 미치는 영향을 관찰한 결과이다. 1.2mM  $Mg^{2+}$  영양액을 관류하면서 수축력이 일정해진 후  $Mg^{2+}$ -free 영양액을 투여한 결과 현저한 수축력 증가효과를 나타냈고, 1.1mM  $Mg^{2+}$  영양액으로 전환시켜 관류하였을 때 수축력이 감소되어 나타났다. 관류심장의 좌심실에서  $Mg^{2+}$ -free 영양액에 의해 현저한 심박수 증가(자료 제시하지 않음) 및 좌심실 압력증가를 보여(panel B) 심근수축력 증가효과를 확인할 수 있었다.

심근에서  $Mg^{2+}$  농도에 따른  $\alpha_1$ -adrenoceptor( $\alpha_1$ -AR) 자극에 의한 수축력 변동 : Table 1은 모든 실험에서

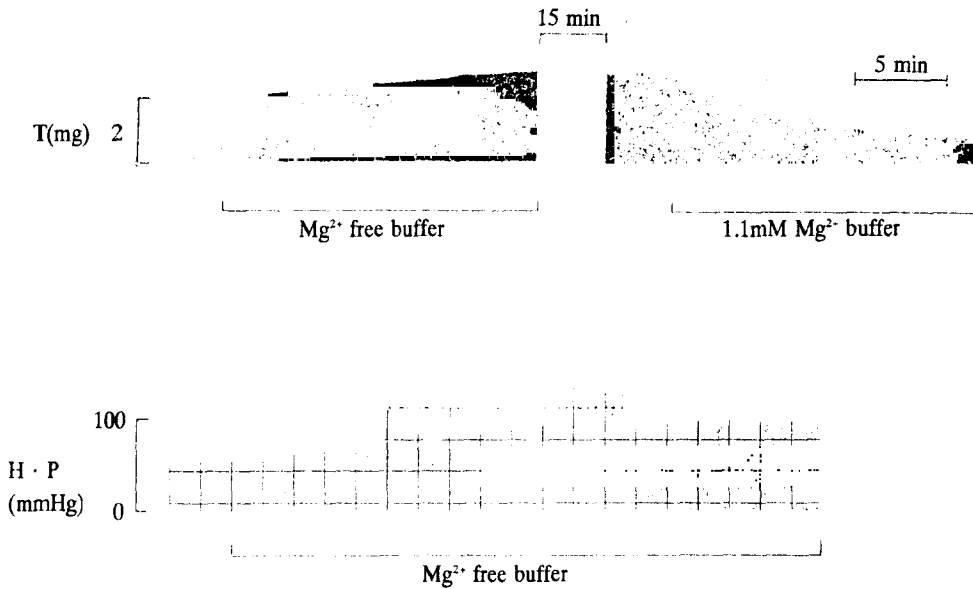


Fig 1. Effect of Mg<sup>2+</sup> free buffer(upper left panel) or normal buffer(upper right panel) on the twitch force in guinea pig heart papillary muscle. Guinea pig papillary muscle was driven at 1Hz. Effects of Mg<sup>2+</sup> free buffer on the heart pressure(H.P) in the Langen-

Table 1. Effects of Mg<sup>2+</sup> free and mM Mg<sup>2+</sup> on the maximum positive inotropic responses elicited by 10<sup>-5</sup>M phenylephrine i isolated rat papillary muscle

Exp. No.	Mg <sup>2+</sup> free (% increase)	2.0mM Mg <sup>2+</sup> (% increase)	p*
1	220	140	
2	188	142	
3	180	155	
4	153	126	
5	152	127	
6	170	135	
7	165	145	
8	217	168	
Mean ± SD	180.6 ± 26.4	148.0 ± 13.4	0.002

P\* as compared with 2.0mM Mg<sup>2+</sup>.

PE에 의한 수축력 증가효과를 나타낸 것으로 2.0mM Mg<sup>2+</sup> 존재하에서 PE는 148%의 수축력 증가효과를 나타낸 반면 Mg<sup>2+</sup>-free 영양액 하에서는 매우 유의한 181%의 수축력 증가효과를 나타냈다. Fig 1에서 Mg<sup>2+</sup>-free 영양액에 의해서 수축력 증가 및 심실압력 증가현상을 관찰하였기 때문에 세포내 Mg<sup>2+</sup> 변동은 심근 수축력 변동에

큰 영향을 미칠 것으로 본다. 관류심장에서 Mg<sup>2+</sup> 변동에 미치는 phenylephrine의 영향 : Table 1에서 α<sub>1</sub>-AR 자극시 수축력 증가기전으로 Mg<sup>2+</sup>가 관여될 수 있음을 추측할 수 있으나 Mg<sup>2+</sup>와의 관련기전은 단지 새로운 연구분야로 제시하였고, 본 연구에서는 α<sub>1</sub>-AR 자극에 의한 Mg<sup>2+</sup> 변동기전을 밝히는 데 중점을 두었다. 모든 실험결과의 그림에서 관류된 영양액을 취하기 시작한 점을 1분으로 표기하였고, 약물처치는 적절량을 관류용액에 직접 희석하고 관류하여 약물의 효과를 관찰하였다. 또 다른 심장에서 상기한 비슷한 조건을 유지하면서 관류액을 취하기 시작한 후 10분부터 10<sup>-5</sup>M PE를 영양액에 혼합하여 10분간 관류시킨 결과, β-AR 길항제인 propranolol이나 atenolol 존재하에서 PE 또는 methoxamine의 효과를 관찰한 결과 현저한 Mg<sup>2+</sup> 유리가 일어나 이 Mg<sup>2+</sup> 유리가 α<sub>1</sub>-AR를 경유한 효과임을 알 수 있었다(Fig 2). 또한 α<sub>1</sub>-AR 자극은 심박수 증가를 초래하기 때문에 심박수 증가에 의한 Mg<sup>2+</sup> 변동이 일어날 수 있다. 또한 심박수를 변동시키면서 Mg<sup>2+</sup> 유동을 관찰한 결과 심박수 변동에 의해서는 Mg<sup>2+</sup> 유동이 일어나지 않았다<sup>22</sup>. 그리고 β-AR 자극효과를 배제하기 위하여 이하 모든 실험은 β-AR 차단제인 atenolol(10

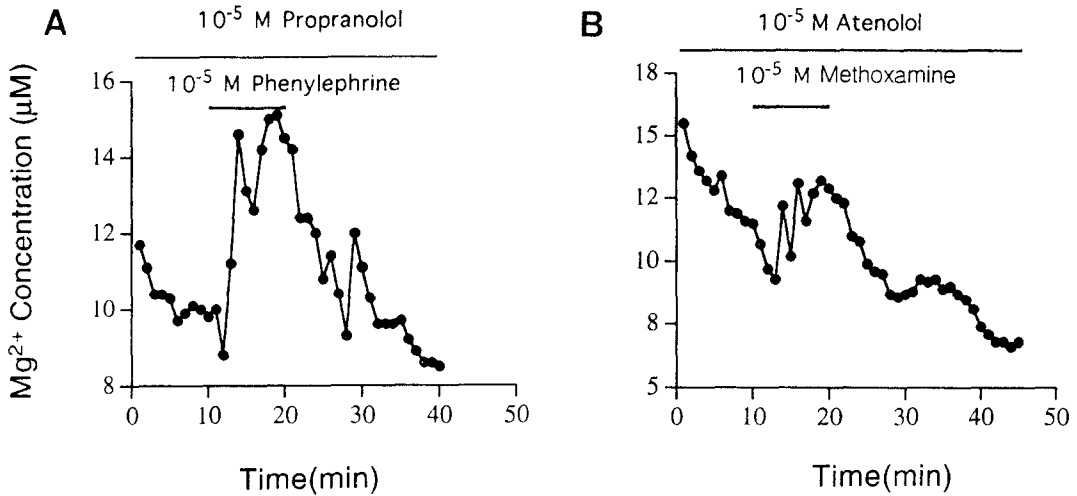


Fig 2. Effects of  $10^{-5}$ M phenylephrine and  $10^{-5}$ M methoxamine in the presence of  $10^{-5}$ M propranolol(A) and  $10^{-5}$ M atenolol(B) on  $Mg^{2+}$  release by in perfused guinea pig heart.

$5$ M) 존재하에서 실시하였다. 분리 심근세포( $10^5$ cells/ml)를 5, 10, 15분간 배양하여  $Mg^{2+}$ 의 농도를 측정할 때 대조군에서의  $Mg^{2+}$  농도는 큰 변동이 없었으나  $10^{-5}$ M PE를 처치한 군에서는 시간의존적으로  $Mg^{2+}$  농도가 증가되는 경향을 보였다(Table 2).

$\alpha_1$ -AR 자극에 의한  $Mg^{2+}$  변동에 미치는 prazosin의 영향 : PE에 의한  $Mg^{2+}$  변동이  $\alpha_1$ -AR 자극을 경유한 효과인가를 확인하기 위하여  $\beta$ -AR 길항제인 atenolol( $10^{-5}$ M)과  $\alpha_1$ -AR 길항제인 prazosin( $3 \times 10^{-6}$ M) 존재하에서 PE의 효과를 관찰한 바, prazosin은 PE에 의한  $Mg^{2+}$  유리 증가효과를 차단하였고, 분리 심근배양액에서 PE에 의한

$Mg^{2+}$  유리 증가효과 역시 prazosin에 의해 차단되었다(Table 2). 이로써 PE에 의한  $Mg^{2+}$  유리가  $\alpha_1$ -AR를 경유한 효과임을 확인할 수 있었다.

$Mg^{2+}$  변동에 미치는 PMA, diacylglycerol(DAG) kinase inhibitor의 영향 :  $\alpha_1$ -AR 자극시 신호전달 경로는 DAG와  $IP_3$ 라는 두 2nd messenger를 경유하기 때문에  $\alpha_1$ -AR 자극에 의한  $Mg^{2+}$  유동과 2nd messenger의 경로를 알아보기 위하여 우선 DAG 경로를 경유한 효과를 관찰하였다. PKC 활성을 유발시키는 phorbol 12-myristate 13-acetate(PMA)와 diacylglycerol kinase를 억제하여 세포내 DAG를 증가시키는 DAG kinase inhibitor(R59022)에<sup>41</sup> 의

Table 2.  $Mg^{2+}$  release and uptake by myocytes after activation of  $\alpha_1$ -adrenoceptor or protein kinase C

Agent	Incubation time(min)		
	5	10	15
	Extracellular $Mg^{2+}$ content(nmol $Mg^{2+}$ /10 <sup>5</sup> 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 + $3 \times 10^{-6}$ M Prazosine	51.30 ± 1.32	50.48 ± 2.48*	51.22 ± 1.37**
$10^{-6}$ M PMA	47.25 ± 1.30	45.25 ± 0.64	40.35 ± 0.66
$10^{-6}$ M R59022	46.78 ± 1.54	42.00 ± 2.06	39.52 ± 1.25

Values are mean ± SEM of 4 different preparations. Significantly different from control group : \*p < 0.05, \*\*p < 0.01. Significantly different from PE group : \*p < 0.01, \*\*p < 0.005.

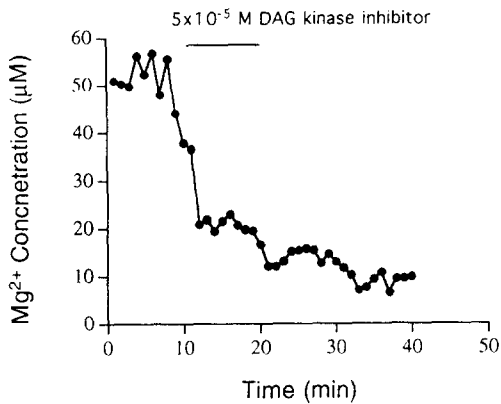


Fig 3. Effects of  $5 \times 10^{-5}$  M R59022, DAG kinase inhibitor, on  $Mg^{2+}$  release in perfused guinea pig heart.

한  $Mg^{2+}$  유리 변동효과를 관찰하였다. 직접적인 PKC 활성화 또는 세포내 DAG 증가(Fig 3)에 의해서  $Mg^{2+}$  유입(또는  $Mg^{2+}$ 의 세포외로의 유리억제)이 관찰되었다. 또한 PMA에 의한  $Mg^{2+}$  유입효과가 선택적 PKC 억제제인 staurosporine에 의해서 차단되었다. 따라서 PE에 의한  $Mg^{2+}$  유입(또는 유리억제)효과가 PKC를 경유한 효과임을 추측할 수 있었다.

PKC 억제제 존재하에서  $Mg^{2+}$  변동에 미치는  $\alpha_1$ -AR 자극효과 : Fig 3에서 PKC 활성화 또는 세포내 DAG 증가는  $Mg^{2+}$ 을 유리시키기 보다는 유입시키는 효과를 보였기 때문에  $\alpha_1$ -AR 자극시  $Mg^{2+}$  유리 증가효과는 PKC를 경유하지 않음을 간접적으로 추측할 수 있다. 이를 확인하기 위하여 PKC 억제제인 chelerythrine, staurosporine 및 H, 존재하에서 PE의 효과를 관찰하였다(Fig 4). 모든 PKC 억제제 존재하에서 PE에 의해서  $Mg^{2+}$  유리효과가 관찰되었다. 따라서  $\alpha_1$ -AR 자극에 의한  $Mg^{2+}$  유입은 DAG 증가에 의한 PKC 활성화에 의해서 일어날 수 있다.

PMA 존재하에서  $Mg^{2+}$  변동에 미치는 PE의 영향과 각종 약물에 의한 PE 효과억제 : 이전 결과들에서는 PE에 의한  $Mg^{2+}$  유리 증가효과가 경미하게 나타났다. 그러나 Fig 5의 panel A에서 보는 바와 같이 PKC 활성화체인 PMA 존재하에서 PE의 효과가 강화됨을 확인할 수 있었다. 이와같이 PMA에 의해서 PE의  $Mg^{2+}$  유리효과가 강화된 기전에 대한 새로운 사실은 새로운 연구방향으로 제시할 수 있지만 아마도 PKC 활성화에 의한  $Ca^{2+}$  활성화도 증가시  $\alpha_1$ -AR 자극의 결과이거나 또는 이미 PKC가

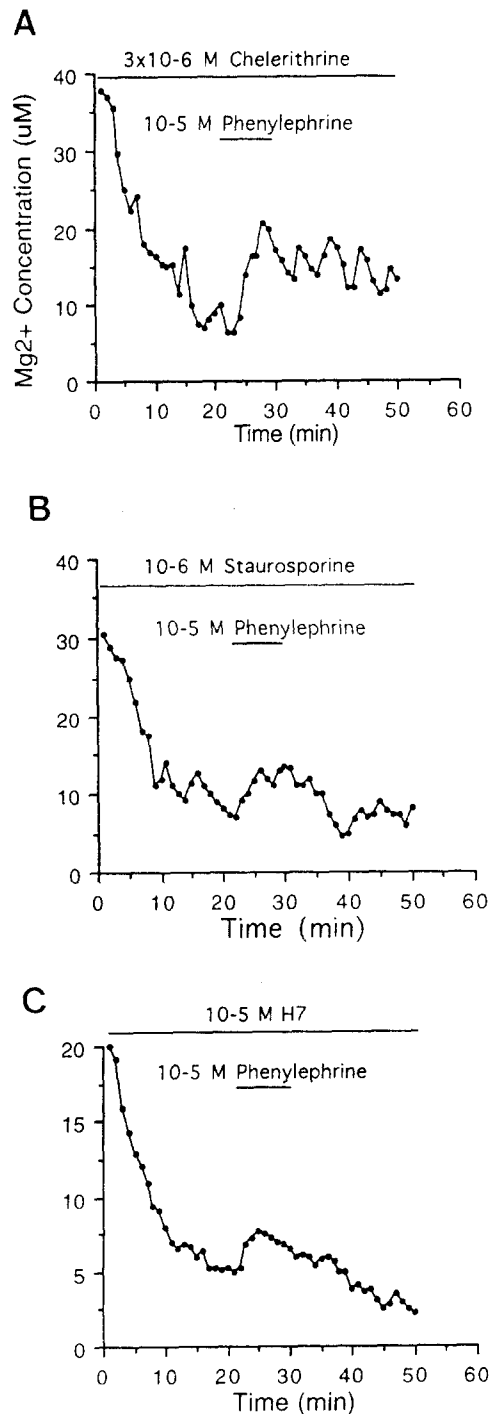


Fig 4. Effects of  $10^{-5}$  M phenylephrine in the presence of  $10^{-5}$  M chelerythrine(A),  $10^{-7}$  M staurosporine(B) and  $10^{-5}$  M H7(C) on  $Mg^{2+}$  release by in perfused guinea pig heart.

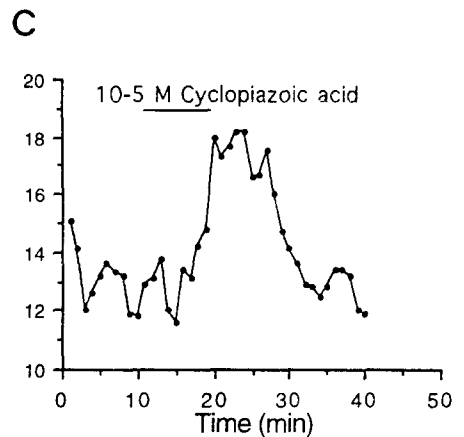
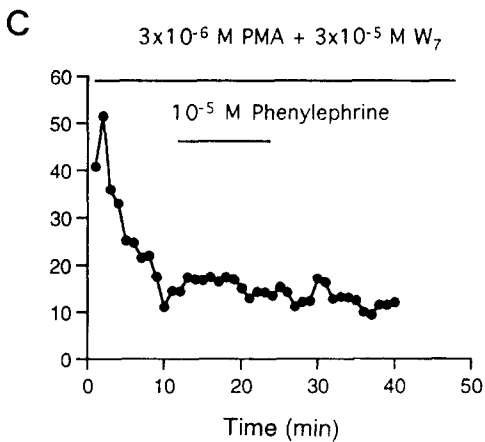
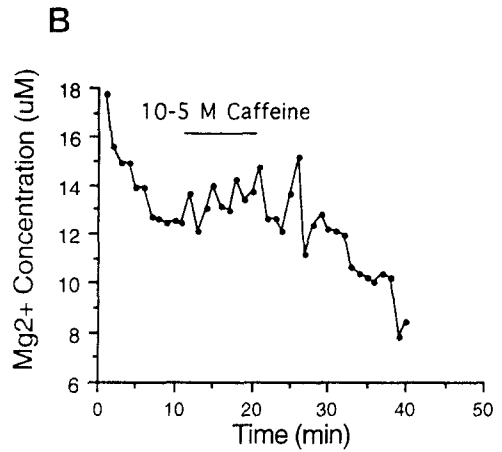
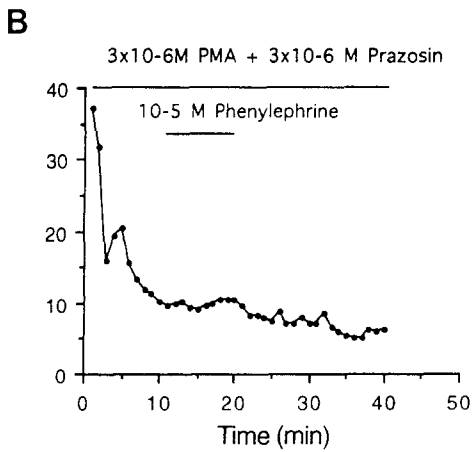
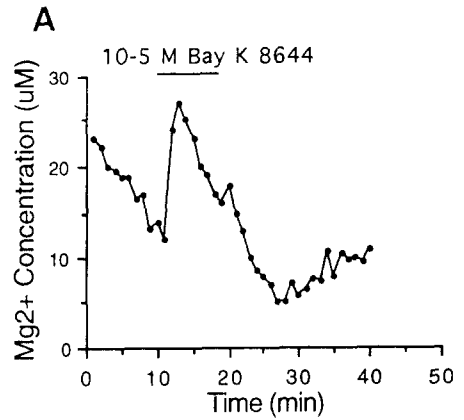
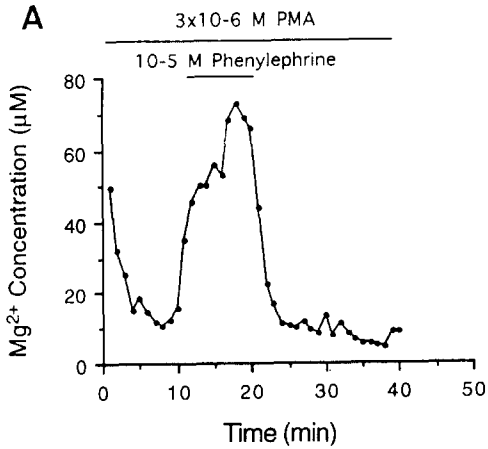


Fig 5. Effects of  $10^{-5}$ M phenylephrine in the presence of  $3 \times 10^{-6}$ M PMA(A),  $3 \times 10^{-6}$ M PMA +  $3 \times 10^{-6}$ M prazosine(B) and  $3 \times 10^{-6}$ M PMA +  $3 \times 10^{-5}$ M W<sub>7</sub> on Mg<sup>2+</sup> release in perfused guinea pig heart.

Fig 6. Effects of  $10^{-5}$ M Bay K 8644(A),  $10^{-5}$ M caffeine(B) and  $10^{-5}$ M cyclopiazonic acid(C) on Mg<sup>2+</sup> release in perfused guinea pig heart.



활성화되었기 때문에 또다른 경로인 IP<sub>3</sub> 자극효과만이 나타나 Mg<sup>2+</sup> 유리가 강화된 것으로 추측하였다. 본 연구에서는 Mg<sup>2+</sup> 유리경로를 밝히는데 중점을 두고 뚜렷한 Mg<sup>2+</sup> 유리효과에 대한 몇몇 약물의 효과를 관찰하였다. 첫째, 이 강화효과 역시 α<sub>1</sub>-AR 자극결과인지를 확인하기 위하여 α<sub>1</sub>-AR 길항제인 prazosin과 PMA 존재하에서 PE의 효과를 관찰한 결과 PE에 의한 Mg<sup>2+</sup> 유리효과가 panel A에 비해 현저히 차단되어 이 강화효과 역시 α<sub>1</sub>-AR를 경유한 효과임을 알 수 있었다(panel B). 둘째, PMA와 calmodulin 길항제인 W<sub>7</sub> 존재하에서도 PE에 의한 Mg<sup>2+</sup> 유리효과가 panel A에 비해 현저히 억제되어 이 강화효과가 calmodulin과 관련된 IP<sub>3</sub> 경로를 경유한 결과임을 암시하고 있다.

Mg<sup>2+</sup> 유리에 미치는 Ca<sup>2+</sup> modulator들의 영향 : 상기 실험에서 α<sub>1</sub>-AR 자극에 의한 Mg<sup>2+</sup> 유리 증가효과가 calmodulin 길항제인 W<sub>7</sub>에 의해서 차단되었기 때문에 Mg<sup>2+</sup> 유리 증가효과가 Ca<sup>2+</sup>와 밀접한 관련이 있을 것으로 추측되었고, PE에 의한 Mg<sup>2+</sup> 유리 증가효과 역시 nifedipine과 같은 Ca<sup>2+</sup> 통로차단제에 의하여 억제되었기 때문에 Mg<sup>2+</sup> 유리 증가효과는 α<sub>1</sub>-AR 자극에 의한 Ca<sup>2+</sup>의 변동에 의해 조절될 것으로 보인다. 따라서 다음과 같이 Ca<sup>2+</sup> modulator들 자체에 의한 Mg<sup>2+</sup> 변동효과에 대하여 관찰하였다. Ca<sup>2+</sup> 통로활성제인 Bay K 8644, 세포내 저장소로부터 Ca<sup>2+</sup>을 유리시켜 세포내 Ca<sup>2+</sup>을 증가시키는 caffeine 및 sarcoplasmic reticulum(SR)이나 endoplasmic reticulum(ER)에서 Ca<sup>2+</sup>-ATPase를 억제하여 세포내 Ca<sup>2+</sup>을 증가시키는 cyclopiazonic acid 등 모두 Mg<sup>2+</sup> 유리를 촉진시켰다(Fig 6). 또한 세포내 Ca<sup>2+</sup>을 올리기 위하여 많이 응용되는 calcimycin(A23187, Ca<sup>2+</sup> ionophore) 역시 Mg<sup>2+</sup> 유리 증가를 현저하게 일으켰으며, A23187의 농도에 의존적으로 Mg<sup>2+</sup> 유리 증가효과가 나타났고(자료 제시하지 않음), Ca<sup>2+</sup> modulator들중 가장 뚜렷하게 Mg<sup>2+</sup> 유리를 촉진시켰다. 그러나 이와같은 A23187에 의한 Mg<sup>2+</sup> 유리효과가 calmodulin 길항제인 W<sub>7</sub>에 의해서 현저히 차단됨을 관찰할 수 있었다(자료 제시하지 않음).

한편 상기 실험과는 대조적으로 세포내 Ca<sup>2+</sup>을 감소시키는 약물 즉, Ca<sup>2+</sup> 통로차단제인 verapamil과 nifedipine 및 SR로부터 Ca<sup>2+</sup> 유리차단제인 ryanodine은 현저한 Mg<sup>2+</sup> 유리억제(또는 유입) 효과를 보여 Mg<sup>2+</sup> 유리에 Ca<sup>2+</sup>이 관여하고 있음을 입증하고 있다(Fig 7).

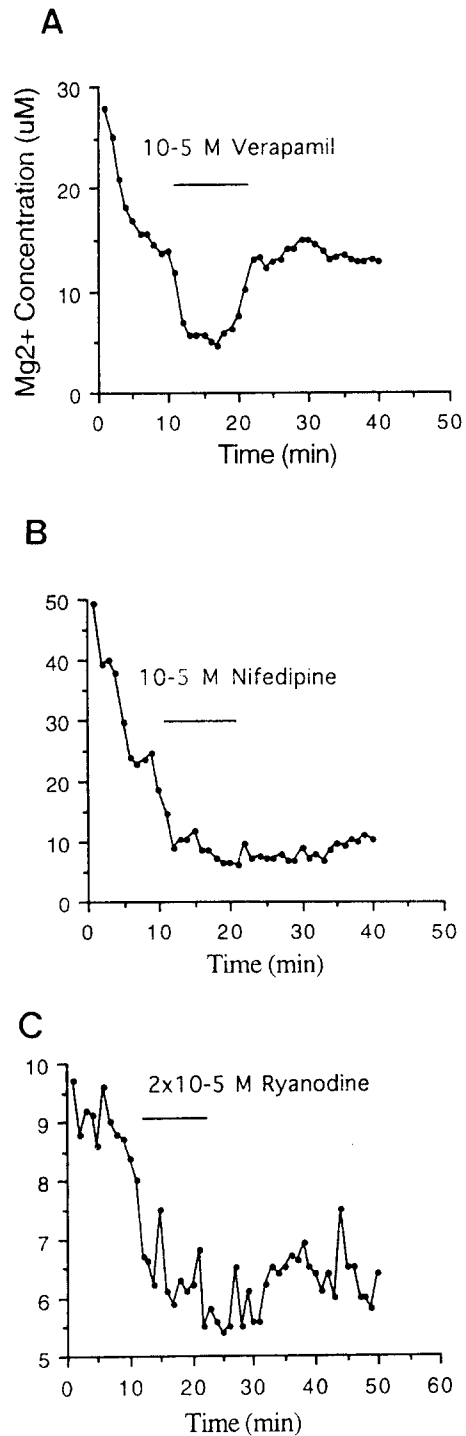


Fig 7. Effect of 10<sup>-5</sup>M verapamil(A), 10<sup>-5</sup>M nifedipine(B) and 2x10<sup>-5</sup>M ryanodine (C) on Mg<sup>2+</sup> release in perfused guinea pig heart.

## 고 찰

Mg<sup>2+</sup>는 포유동물의 생체내에 가장 많이 존재하는 이온중의 하나로 생물학적 작용 및 생리학적 역할은 잘 알려진 반면 포유동물 세포내에서의 조절에 대해서는 잘 알려져 있지 않다<sup>1-6,11</sup>. Giant cell, bacteria 및 적혈구에서 Mg<sup>2+</sup> 농도 조절기전에 대해서는 보고된 바 있지만<sup>9,19,21</sup> 포유동물의 심장 및 심장세포에서  $\alpha_1$ -AR 자극에 의한 Mg<sup>2+</sup>의 조절기전에 대해서는 전혀 보고된 바 없으며, 최근 심장에서  $\alpha_1$ -AR의 자극에 대한 심박수 및 수축력 증가 등에 대한 연구가 많이 진행되고 있는데  $\alpha_1$ -AR 자극은  $\beta$ -adrenoceptor 자극과는 달리 심박수의 변동없이 심근의 수축력을 증가시키는 것으로 알려져 중요한 심근 수축력 강화제로써 대두된 바 있고, 임상적으로 부정맥과 같은 심장질환의 원인과 치료를 위하여  $\alpha_1$ -AR의 작용기전 및 그 차단제의 활용이 높아지므로써<sup>15</sup>  $\alpha_1$ -AR를 경유한 세포내 이온수송계나 이온농도에 변동이 초래될 수 있다면 심장기능에도 영향을 미칠 것으로 생각되어  $\alpha_1$ -AR 자극에 의한 Mg<sup>2+</sup>의 변동을 관찰하고자 하였다. 모델의 재현성과 정확성을 확인하기 위하여 심장관류모델에 Mg<sup>2+</sup>-free buffer를 관류한 결과 현저한 수축력 증가는 Mg<sup>2+</sup>은 Ca<sup>2+</sup>에 대한 길항작용이 있기 때문에 심근수축력 감소 및 부정맥 치료에 효과적이라는 이전의 보고와 일치하였다.

한편 쥐의 간에서 phenylephrine은 Mg<sup>2+</sup>의 유리를 일으킨다는 보고가 있으나<sup>30</sup> 쥐의 심장, 심근세포에서 PKC의 활성화는 세포내 Mg<sup>2+</sup>의 유입을 증가시킨다는 상반된 보고가 있어<sup>22-24</sup>,  $\alpha_1$ -AR의 신호전달계 작용에 따르면 PKC를 활성화하므로 phenylephrine에 의해 Mg<sup>2+</sup>의 변동이 유발된다면 기니피크 심장 및 심장세포에서도 Mg<sup>2+</sup> 유리의 증가보다는 유입되는 양상을 보여야 할 것이다. 그러나 본 연구의 실험에서 기니피크 심장 및 심장세포에서 phenylephrine은 Mg<sup>2+</sup> 유리증가 및 유입증가를 일으켰다. 이는 아마도 기니피크 심장에서 phenylephrine에 의한 Mg<sup>2+</sup>의 유리 증가효과는 신호전달계중 PKC 활성화와 또 다른 경로를 경유할 것으로 생각되었다. 즉, IP<sub>3</sub> 경로를 경유한 Mg<sup>2+</sup> 유리가 일어날 수 있음을 추측하였다. 또한 phenylephrine은  $\alpha_1$ -AR에 주요작용을 하지만  $\beta$ -adrenoceptor에도 영향을 미치지 때문에 본 연구에서는  $\beta$ -antagonist를 전처치한 후에 실험을 실시하였다. 역시 다른

$\alpha_1$ -agonist인 methoxamine에 의해서도 phenylephrine과 유사한 결과가 나타났으며, 이같은  $\alpha_1$ -agonist에 의한 Mg<sup>2+</sup> 유리 증가효과는  $\alpha_1$ -선택적 길항제인 prazosin 전처리에 의해 완전히 차단됨을 관찰하여, 관류 기니피크 심장 및 심근세포에서 phenylephrine에 의한 Mg<sup>2+</sup> 유리 증가효과는  $\alpha_1$ -AR에 선택적이며 직접적인 효과로 생각되었다.

Scarpa *et al*<sup>22</sup>은 쥐의 심장세포에서 protein kinase C (PKC) 활성화제인 TPA, PDBu 또는 PMA를 처치하였을 때 Mg<sup>2+</sup> 유리효과는 오히려 감소되는 경향을 보였다<sup>22-24</sup>. 즉, 세포내로 Mg<sup>2+</sup>의 유입되며 또한 S49 lymphoma cell에서 Mg<sup>2+</sup>의 유입은 세포내 cAMP의 증가가 아닌 PKC 활성화에 의해 유발된다고 하였다<sup>45</sup>. 그러나 다른 연구자에 의한 관류 간장모델에서는 phenylephrine에 의해 Mg<sup>2+</sup> 유리가 증가된다는 상반된 보고를 하였는데, 명백한 기전은 제시하지 못하고 단지 세포내 Ca<sup>2+</sup> 변화에 의한 조절이라고 추정한 바 있다. 따라서 본 연구의 기니피크 관류 심장모델에서 PKC 활성화제인 PMA를 처치한 바, Mg<sup>2+</sup> 유리효과가 역시 감소되었고, 분리 심근세포의 배양액에서도 관류심장의 결과와 유사한 Mg<sup>2+</sup>의 감소경향을 보였으며(Table 2), 또한 diacylglycerol kinase inhibitor인 R 59022를 처치하였을 때 역시 Mg<sup>2+</sup>의 유리효과는 감소되어 나타났다(Fig 3, Table 2). 반면 PKC를 억제하는 약물로 알려진 staurosporine은 Mg<sup>2+</sup>의 유리에 큰 영향을 미치지 못하였으며, 또다른 PKC inhibitor인 chelerythrine, staurosporine 및 H<sub>7</sub> 존재하에서 phenylephrine은 Mg<sup>2+</sup> 유리 증가효과를 일으킴으로 phenylephrine의  $\alpha_1$ -AR 자극에 의한 Mg<sup>2+</sup> 유리 증가효과는 PKC의 활성화 보다는 또다른 작용경로가 있을 것으로 추측케 하였다. 다른 경로로 IP<sub>3</sub>가 세포내 Ca<sup>2+</sup> level의 변동을 일으키거나 2nd messenger의 활성화에 의한 세포내 Ca<sup>2+</sup> 및 Na<sup>+</sup> 등과 같은 양이온의 변동을 초래하여, 이로 인하여 Mg<sup>2+</sup> 유리 증가 효과가 일어날 것으로 생각되었다.

Mg<sup>2+</sup>의 교환은 세포막을 통한 다른 이온과의 electrochemical gradient를 이용하여 다른 이온과 교환된다. 즉, Mg<sup>2+</sup> 전류가 Na<sup>+</sup> 통로차단제인 tetrodotoxin이나 lidocaine 등에 의해 억제되고<sup>38</sup>, Na<sup>+</sup>이나 Ca<sup>2+</sup>이 결여되면 Mg<sup>2+</sup>의 내향전류는 발생하지 않으며<sup>37</sup>, Mg<sup>2+</sup>의 변동은 Na<sup>+</sup> 전위차에 의해 Na<sup>+</sup>-Mg<sup>2+</sup> 교환기를 통하여 이루어진다고 보고하였다<sup>9</sup>. 최근 Gunther *et al*<sup>6</sup>은 chicken의 적혈구에서 Na<sup>+</sup>-Mg<sup>2+</sup> 교환기를 동정하여 2개의 Na<sup>+</sup> 유출에 따른 1개의 Mg<sup>2+</sup> 유입으로 Na<sup>+</sup>-Mg<sup>2+</sup> 교환기의 역할을 규

명하였으나<sup>32,39</sup>, 다른 세포에서는 잘 알려져 있지 않다. 비록 심장에서  $\text{Na}^+$ - $\text{Mg}^{2+}$  교환기에 대한 증거는 적지만 Fry *et al*<sup>40</sup>은 세포의  $\text{Mg}^{2+}$  농도가  $\text{Na}^+$ 에 의해 조절되어  $\text{Na}^+$ - $\text{Mg}^{2+}$  교환기에 의한 조절에 의하며, 이 기전은 이온의 전위차, coupling비 및 막전위에 따라  $\text{Mg}^{2+}$ 의 변동이 일어날 것이라고 하였다<sup>40</sup>. 본 연구자 등의 실험에서도 기니피크 심장에  $\text{Na}^+$  channel blocker인 tetrodotoxin, lidocaine 처치는  $\text{Mg}^{2+}$ 을 유입하는 결과를 보였으나,  $\text{Na}^+$  channel opener인 veratridine은  $\text{Mg}^{2+}$ 의 유리를 현저히 증가시켜, 세포의  $\text{Mg}^{2+}$ 의 농도는  $\text{Na}^+$  농도에 의존적임을 알 수 있었다. 또한 세포막 막전위의 변동은  $\text{Mg}^{2+}$ 의 유리를 조절할 수 있으며 막전위 변동시  $\alpha_1$ -AR 자극에 의한  $\text{Mg}^{2+}$  유리 증가효과에 변동을 일으킴을 알 수 있었다 (자료 제시하지 않음).

계태아 심장과 MDCK cell에서  $\text{Ca}^{2+}$  channel 억제제에 의해  $\text{Mg}^{2+}$ 의 수송경로가 차단되며<sup>46,47</sup>, 세포내  $\text{Mg}^{2+}$ 과  $\text{Ca}^{2+}$ 이 서로 밀접한 상호관계가 있다고 주장하였고<sup>48</sup>, 또한  $\text{Ca}^{2+}$  channel의 억제는  $\text{Mg}^{2+}$ 의 유입과 유출양자에 모두 관여한다는 보고가 있으며<sup>24</sup>,  $\text{Mg}^{2+}$ 는  $\text{Ca}^{2+}$  통로의 길항제로써 작용할 수 있기 때문에 세포내  $\text{Ca}^{2+}$  농도의 변동에 대한 완충작용은  $\text{Mg}^{2+}$ 에 의해 조절되어질 수 있다. 본 연구 (Fig 1, Table 1)에서도  $\text{Mg}^{2+}$ 을 제거한 영양액에서 심장의 압력과 심근수축력을 현저히 증가시킴을 관찰한 바,  $\text{Mg}^{2+}$ 이  $\text{Ca}^{2+}$ 과 길항하고 있음을 확인할 수 있었다. 임상적으로도 경수(hard water)를 섭취한 지역에서는 허혈성 심장질환<sup>8,9</sup>이나 심장병에 의한 사망률이 현저히 낮다는 보고가 있을 뿐만 아니라<sup>18</sup> 고농도의  $\text{Mg}^{2+}$ 은 허혈성 심장질환에 방어효과가 있는 것으로 알려져 있고<sup>10</sup>, 세포배양액내  $\text{Ca}^{2+}$ 을 다른 2가 양이온으로 대체하면  $\text{Mg}^{2+}$ 의 유리와 유입이 억제된다는 보고가 있어<sup>24</sup>, 세포내  $\text{Ca}^{2+}$ 을 조절할 수 있는  $\text{Ca}^{2+}$  channel blocker나  $\text{Ca}^{2+}$  ionophore를 처치한 후  $\text{Mg}^{2+}$ 의 변동을 관찰한 바(Fig 6,7),  $\text{Ca}^{2+}$  channel blocker인 nifedipine, verapamil은  $\text{Mg}^{2+}$ 의 유리 증가효과를 현저히 감소시켰으며,  $\text{Ca}^{2+}$  ionophore인 A23187와  $\text{Ca}^{2+}$  channel activator인 Bay K 8644는  $\text{Mg}^{2+}$  유리 효과를 현저히 증가시켰으며 A23187에 의한  $\text{Mg}^{2+}$  유리 증가효과가  $\text{Ca}^{2+}$  길항제에 의하여 현저히 차단됨을 관찰할 수 있었다. 이는 세포내  $\text{Ca}^{2+}$ 이 증가한다해도  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin kinase가 활성화되지 못하면  $\text{Ca}^{2+}$  증가에 의한  $\text{Mg}^{2+}$  유리가 억제됨을 추측할 수 있었다. 또한 세포내의  $\text{Ca}^{2+}$  저장소에서 유리된  $\text{Ca}^{2+}$ 과 세포밖에서 세포내

로 유입된  $\text{Ca}^{2+}$ 에 대한  $\text{Mg}^{2+}$  유리 증가효과에 대한 영향을 비교하고자 세포내  $\text{Ca}^{2+}$  저장소인 sarcoplasmic reticulum에서  $\text{Ca}^{2+}$  유리를 억제하는 ryanodine을 처치한 후  $\text{Mg}^{2+}$  유리효과를 관찰한 결과 ryanodine에 의해서  $\text{Mg}^{2+}$  유리 증가효과는 현저히 감소되었으며, ryanodine 존재하의 phenylephrine 역시  $\text{Mg}^{2+}$  유리 증가효과를 감소시켜 (자료 제시하지 않음) 세포내 저장소에서 유리되는  $\text{Ca}^{2+}$ 이나 세포밖에서 유입되는  $\text{Ca}^{2+}$ 이 직접적으로  $\text{Mg}^{2+}$ 의 유리에 영향을 미치는 것을 확인할 수 있었다. 상기한  $\text{Ca}^{2+}$  modulator와는 반대로  $\text{Ca}^{2+}$  유리억제 또는  $\text{Ca}^{2+}$  통로 차단제에 의해서는  $\text{Mg}^{2+}$  유리가 억제 또는 유입된 효과를 관찰하여  $\alpha_1$ -AR 자극에 의한  $\text{Mg}^{2+}$  유리 및 유입증가는 세포내  $\text{Ca}^{2+}$  농도에 의존적임을 확인할 수 있었다.

따라서 생체내  $\text{Mg}^{2+}$ 은 생리학적, 약리학적 및 생화학적으로 매우 중요한 역할을 하기 때문에  $\text{Mg}^{2+}$ 의 조절기전을 이해하는 것은 중요하므로 이에 대하여 보다 많은 연구가 수행되어야 할 것으로 생각된다.

## 결론

본 연구에서는 기니피크 관류심장과 심근세포에서  $\alpha_1$ -adrenoceptor 자극에 의한  $\text{Mg}^{2+}$  유동기전을 연구하였다. 관류심장으로부터의 관류액내 그리고 심근세포로부터 유리된  $\text{Mg}^{2+}$  농도는 atomic absorbance spectrophotometry를 이용하여 측정하였다.

관류액내  $\text{Mg}^{2+}$  제거는 심장 유두근의 수축력을 증가시켰고 역시 좌심실 내압을 증가시켰다. 역시 phenylephrine은  $\text{Mg}^{2+}$ 이 제거된 관류액내에서 심근수축력을 증가시켰다. Phenylephrine 및 methoxamine과 같은  $\alpha_1$ -효현제는 관류심장과 심근세포에서  $\text{Mg}^{2+}$ 을 유리시켰고, 이와같은 효과가  $\alpha_1$ -길항제인 prazosin으로 차단되었다. 또한 phenylephrine과 diacylglycerol kinase inhibitor인 R59022에 의해서  $\text{Mg}^{2+}$  유입이 일어났다. PKC 억제제 존재하에서 phenylephrine은 관류심장에서  $\text{Mg}^{2+}$ 을 유리시켰다. 또한 phenylephrine에 의한  $\text{Mg}^{2+}$ 의 유리는 PMA에 의하여 증가되었다. 이러한 PMA에 의한  $\text{Mg}^{2+}$ 의 유리증가 효과는 prazosine에 의해 차단되었다. 대조적으로 verapamil, nifedipine, ryanodine은 관류심장에서  $\text{Mg}^{2+}$ 을 유입시켰으나 심근세포에서는 영향을 나타내지 못하였다.  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin 억제제인 W<sub>7</sub>은 관류심장에서 phenylephrine에 의한  $\text{Mg}^{2+}$  유리를 완전히 차단하였다.

이상의 결과로  $\text{Mg}^{2+}$  변동은  $\alpha_1$ -adrenoceptor 자극에 기

인한 심장의 활동성에 관여하고 있으며, 기니픽 관류심장에서  $\alpha_1$ -adrenoceptor 자극은  $Mg^{2+}$ 을 유입시키거나 유리시킨다. 이러한 효과는 각각의 신호전달체계의 선택적인 경로를 경유한 반응으로 나타나며, 심장에서  $\alpha_1$ -adrenoceptor 자극에 의한  $Mg^{2+}$  유리감소는 PKC 활성화와 세포내  $Ca^{2+}$ 에 의존적인 것으로 사료된다.

## 참 고 문 헌

1. Grubbs RD, Maguire ME. Magnesium as a regulatory cation : Criteria and evaluation. *Magnesium*, 6:113-127, 1987.
2. White RE, Hartzell HC. Effect of intracellular free magnesium on calcium current in isolated cardiac myocytes. *Science*, 239:778-780, 1988.
3. 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.
4. White RE, Hartzell HC. Magnesium ions in cardiac function : Regulation of channel and second messengers. *Biochem Pharmacol*, 38:859-867, 1989.
5. Maguire ME. Hormone-sensitive magnesium transport and magnesium regulation of adenylate cyclase. *Trends Pharmacol Sci*, 5:73-77, 1984.
6. Gunther T. Functional compartmentation of intracellular magnesium. *Magnesium*, 5:53-59, 1986.
7. Altura BM, Altura BT. New perspectives on the role of magnesium in the pathophysiology of the cardiovascular system. *Magnesium*, 4:226-244, 1985.
8. Headrick JP, Willis RJ. Cytosolic free magnesium in stimulated, hypoxic and underperfused rat heart. *J Mol Cell Cardiol*, 23:991-999, 1991.
9. Murphy E, Steenbergen C, Levy LA, et al. Cytosolic free magnesium levels in ischemic rat heart. *J Biol Chem*, 264:5622-5627, 1989.
10. Rasnyssen HS, Norrgard P, Lindeneg O, et al. Intravenous magnesium in acute myocardial infarction. *Lancet*, 1:234-236, 1986.
11. Bersohn MM, Shine KI, Serman WD. Effects of increased magnesium on recovery from ischemia in rat and rabbit hearts. *Am J Physiol*, 242:H89-H93, 1982.
12. Kirkels JH, van Echteld CJA, Ruigrok TJ. Intracellular magnesium during myocardial ischemia and reperfusion : possible consequences for postischemic recovery. *J Mol Cell Cardiol*, 21:1209-1218, 1989.
13. Borchgrevink PC, Bergan AS, Bakoy OE, et al. Magnesium and reperfusion of ischemic rat heart as assessed by  $^{31}P$ -NMR. *Am J Physiol*, 256:H195-H204, 1989.
14. Ku DD, Ann HS. Magnesium deficiency produces endothelium-dependent vasorelaxation in canine coronary arteries. *J Pharmacol Exp Ther*, 241:961-966, 1987.
15. Altura BT, Altura BM. Endothelium-dependent relaxation in coronary arteries requires magnesium ions. *Br J Pharmacol*, 91:449-451, 1987.
16. Abraham AS, Eylath U, Weinstein M, et al. Serum magnesium levels in patients with acute myocardial infarction. *N Engl J Med*, 296:862-863, 1977.
17. Polimeni PI, Page E. Further observation on Mg transport in rat ventricular muscle. In: Recent Advances in Studies on Cardiac Structure and Metabolism(Ed. Dhalla NS), Vol. 4, pp. 217-231. University Park Press, Baltimore, 1972.
18. Anderson TW, Neri LC, Schreiber GB, et al. Ischemic heart disease, water hardness and myocardial magnesium. *Can Med Assoc J*, 113:203, 1975.
19. Snavely MD, Gravina SA, Cheung TBT, et al. Magnesium transport in Salmonella Typhimurium : Regulation of mgtA and mgtB expression. *J Biol Chem*, 266:824-829, 1991.
20. Murphy E, Freunderich CG, Liebermann M. Cellular magnesium and Na/Mg exchange in heart cells. *Annu Rev Physiol*, 53:273-287, 1991.
21. Shetty SS, Weiss GB. Alterations in Mg distribution and movements in rabbit aortic smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther*, 245:112-119, 1988.
22. Romani A, Scarpa A. Hormonal control of  $Mg^{2+}$  transport in the heart. *Nature*, 346:841-844, 1990.
23. 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.
24. 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.
  25. Bond M, Vadasz G, Somiyu AV, et al. Subcellular calcium and magnesium mobilization in rat liver stimulated *in vivo* with vasopressin and glucagon. *J Biol Chem*, 262:15630-15636, 1987.
  26. 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.
  27. Romani A, Dowell E. Cyclic AMP-induced  $Mg^{2+}$  release from rat liver hepatocytes, permeabilized hepatocytes and isolated mitochondria. *J Biol Chem*, 266:24376-24384, 1991.
  28. Romani A, Scarpa A. Norepinephrine evokes a marked  $Mg^{2+}$  efflux from liver cells. *FEBS Lett*, 269:37-40, 1989.
  29. 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  $\beta_1$ -adrenergic receptor interaction. *Cir Res*, 56:884-894, 1985.
  30. Jakob A, Beckert J, Schottli G, et al.  $\alpha_1$ -Adrenergic stimulation causes  $Mg^{2+}$  release from perfused rat liver. *FEBS Lett*, 246:127-130, 1989.
  31. Otani H, Hitomi, 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.
  32. Gunther T, Vormann J, Forster R. Regulation of intracellular magnesium by  $Mg^{2+}$  efflux. *Biochem Biophys Res Commun*, 119:124-131, 1984.
  33. Buri A, Chen S, Fry CH, et al. The regulation of intracellular  $Mg^{2+}$  in guinea-pig heart, studied with  $Mg^{2+}$ -selective microelectrodes and fluorochromes. *Exp Physiol*, 78:221-233, 1993.
  34. 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.
  35. Eckert R, Chad JE. Inactivation of Ca channels. *Prog Biophys Mol Biol*, 44:215-267, 1984.
  36. De Weer P. Axoplasmic free magnesium levels and magnesium extrusion from squid giant axon. *J Gen Physiol*, 68:159-178, 1976.
  37. Kohlhardt M, Haastert HP, Krause H. Evidence of non-specificity of the Ca channel in mammalian myocardial fibre membrane. Substitution of Ca by Sr, Ba or Mg as charge carriers. *Pflugers Arch*, 342:125-136, 1973.
  38. 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.
  39. 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.
  40. Fry CH. Measurement and control of intracellular magnesium ion concentration in guinea pig and ferret ventricular myocyte. *Magnesium*, 5:306-316, 1986.
  41. Didier DC, Peter R, Herman VB. R59022, a diacylglycerol kinase inhibitor, its effect on diacylglycerol and thrombin-induced C kinase activation in the intact platelet. *J Biological Chem*, 260:15762-15770, 1985.
  42. Peter D. Second messengers mediating activation of chloride current by intracellular GTP $\gamma$ S in bovine chromaffin cells. *J Physiol*, 436:725-738, 1991.
  43. 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*, 262:1638-1643, 1987.
  44. Micheal JB, Robin FI. Inositol triphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature*, 312:315-321, 1984.
  45. Grubbs RD, Wetherill CA, Kutscheke K, et al. Magnesium transport in murine S49 lymphoma cells: pharmacology and divalent cation selectivity. *Am J Physiol*, 248:C51-C57, 1985.
  46. 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.
47. Quamme GA, Dai LJ. Presence of a novel influx pathway for  $Mg^{2+}$  in MDCK cells. *Am J Physiol*, 259:C 521-C525, 1990.
48. Agus ZS, Kelepouris E, Dukes I, *et al*. Cytosolic magnesium modulates calcium channel activity in mammalian ventricular myocytes. *Am J Physiol*, 256:C 452-C455, 1989.
-