

흰쥐의 심장과 심근세포에서 cyclic AMP에 의한 Mg^{2+} 유리조절

강형섭 · 김진상 · 강창원 · 이호일

전북대학교 생체안전성연구소
(1999년 1월 7일 접수)

Regulation of Mg^{2+} efflux by cAMP in perfused rat heart and isolated ventricular myocytes

Hyung-sub Kang, Jin-shang Kim, Chang-won Kang, Ho-il Lee

Bio-Safety Research Institute, Chonbuk National University

(Received Jan 7, 1999)

Abstract : Although it has been reported that hormones or chemicals, which increase in intracellular cAMP, produced Mg^{2+} release from the heart, it is not well characterized whether a specific Mg^{2+} exchanger is involved in cAMP-induced Mg^{2+} efflux in the mammalian hearts. In this work, we studied the relationship between the increase in intracellular cAMP and ion transport system on Mg^{2+} regulation in the perfused rat heart and isolated myocytes. The Mg^{2+} content in the perfusate and supernatant were measured by atomic absorption spectrophotometer. The addition of membrane permeable cAMP analogue to the perfused hearts and myocytes induced a Mg^{2+} efflux in the dose dependent manners. Mg^{2+} efflux was stimulated by cAMP modulators (forskolin, IBMX and Ro20-1724) in the perfused hearts and myocytes. cAMP-induced Mg^{2+} efflux was inhibited by H_7 , benzamil or imipramine in the perfused hearts and myocytes, but not by EIPA.

We confirmed that a significant Mg^{2+} efflux was induced by an increase in intracellular cAMP in the hearts and myocytes. The cAMP-induced increase of Mg^{2+} efflux in the hearts may be involved in ion transport system (Na^+ - Ca^{2+} and Na^+ - Mg^{2+} exchanger).

Key words : cAMP, Na^+ - Ca^{2+} exchange, Na^+ - Mg^{2+} exchange, heart.

이 논문은 1997년 학술진흥재단의 공모과제 연구비에 의하여 연구되었음.

Address reprint requests to Dr. Ho-il Lee, Bio-Safety Research Institute, Chonbuk National University, Chonju 561-576, Republic of Korea.

서 론

생체내 Mg^{2+} 은 일반적으로 kinase, phosphatase 및 synthetase 등을 활성화시키며¹ glycolysis, 지방 가수분해, DNA 합성 및 인산화의 조절인자이며 세포의 에너지 대사를 조절하는 역할을 하므로² 세포내 Mg^{2+} 의 변동은 심장 등 많은 조직 및 세포에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다³. 특히 임상적으로 심근경색이나 심실 fibrillation과 같은 심맥관계 질환이 hypomagnesemia와 관련되고⁴ Mg^{2+} 이 충분히 함유된 경수(hard water)를 식수로 사용하는 지역에서 거주하는 사람들은 허혈성 심장질환이나 심장병에 관련된 사망율이 현저히 감소했다는 보고가 있다⁵. 따라서 심장세포내 Mg^{2+} 이 결핍되거나 특정질환이나 약물에 의해 세포내 Mg^{2+} 변동이 유발된다면 이는 심장기능의 변화를 초래한다고 할 수 있다. 이와같이 Mg^{2+} 은 심장질환과 기능에 매우 밀접하게 관련되므로 그 기능에 대한 연구는 비교적 활발히 되어 있으나 세포내 Mg^{2+} 항상성을 포함한 조절기전은 물론 호르몬 및 신경전달물질 등에 의한 심장세포내 Mg^{2+} 조절기전에 대해서는 잘 알려져 있지 않다.

최근까지 Mg^{2+} 의 조절에 대한 연구에 대해 살펴보면 흰쥐의 심장세포에서 protein kinase C(PKC)의 활성화가 Mg^{2+} 의 유리를 감소시키는 즉, 세포내로 Mg^{2+} 을 유입시키는 경향을 나타낸다고 하였으나⁶⁻⁹ Hwang *et al*¹⁰은 기니피크 심장에서 phenylephrine이 Mg^{2+} 의 유리를 증가시킨다는 상반된 보고를 하였다. 호르몬 자극에 의해 심장과 심근세포에서 세포내 총 Mg^{2+} 의 20% 정도가 수분내에 유출되는데 이는 세포막의 β -수용체를 경유한 세포내 cAMP 농도의 증가에 의한 결과라고 하였으나⁷ norepinephrine 자극이 Mg^{2+} 의 유리증가를 일으키지 않는다는 서로 상이한 결과도 보고되어 있다¹¹. 최근 Kang *et al*¹²은 기니피크 심장에서 histamine이 세포내 cAMP 농도를 증가시킴으로서 Mg^{2+} 의 유리를 증가시킨다고 보고하는 등 심장에서 cAMP는 Mg^{2+} 의 유리를 조절하는 것으로 알려져 있으나 세포내 cAMP 증가에 의한 Mg^{2+} 유리증가와 세포막에 존재하는 이온교환기와의 관계에 대해서는 잘 알려져 있지 않다.

따라서 본 실험에서는 흰쥐의 심장에서 cAMP에 의한 Mg^{2+} 의 유리증가 효과를 확인하고 이러한 작용에 미치는 이온교환기의 영향에 대해서 알아보고자 본 연구를

실시하였다.

재료 및 방법

심장의 적출 및 관류액의 채취 : 흰쥐(Male Sprague-Dawley rats, 200~250g)를 두부타격 후 심장을 적출하여 4℃의 산소 포화 영양액(95% O_2 : 5% CO_2 , pH 7.3)에서 혈액 등을 제거한 다음 영양액이 관류되고 있는 관류 system(Langendorff open system)의 연결관에 심장의 대동맥을 삽입하여 결찰하였다. 고정후 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℃, 95% O_2 : 5% CO_2 및 pH 7.3)을 10ml/min 속도로 20분간 관류시킨 다음 관류액을 Mg^{2+} free 영양액으로 대체하여 공급하였다. Mg^{2+} free 영양액을 관류시킨 20분 후부터 심장을 관류한 영양액을 1분 간격으로 채취하였고 시료채취 10분 후부터 약물을 관류용액에 적정농도가 되도록 첨가하여 약 10분간 관류시켰으며 약물의 관류시간은 조건에 따라 변동시켰다.

심근세포 분리 및 배양액의 채취 : 심근세포의 분리는 Young *et al*¹³의 collagenase 소화방법을 개선하여 다음과 같이 실시하였다. 흰쥐를 두부타격 후 심장을 적출하였고 적출심장의 대사속도를 가능한 감소시키기 위해 저온(4℃)의 산소포화 Joklik buffer로 세척한 후, 절제된 대동맥을 관류 system의 cannula에 삽입 결찰하였다. 현수된 심장에 Joklik buffer(11.1g/l Joklik membrane powder, glucose 10, $NaHCO_3$ 12mM, 95% O_2 : 5% CO_2 pH 7.2~7.3, 37℃)로 약 5분간 관류하였고 심장에 혈액 등이 제거되고 안정되면 collagenase를 첨가(100IU/ml)하고 심장의 상태를 확인하면서 20~35분 동안 재관류(Close system)를 계속하였다. 소화된 심장을 관류 system에서 분리하여 bovine serum albumin(BSA, 10mg/ml)과 0.25mM $CaCl_2$ 가 첨가된 Joklik buffer와 collagenase buffer를 1:1로 혼합한 용액내에서 심근세포를 분리하였다. BSA(10mg/ml)와 0.25mM $CaCl_2$ 가 첨가된 Joklik buffer에 분리된 심근세포를 부유시킨 후 심근세포의 부유액을 250 μ m Nylon-gauze로 여과하였고 같은 buffer로 3회 반복 세척하였다. 분리된 세포는 상온에 60분 동안 방치하면서 안정시켰고 buffer 내 최종 Ca^{2+} 농도가 1.25mM이 되도록 10분 간격으로 0.25mM $CaCl_2$ 를 4회 첨가하였으며 심근세포를 현미경하에서 관찰하여 70% 이상의 세포가 전형적인 rod-shape을 보일 때 실험을 실시하였다. 실험을 시작하기 직전에 관

류심장에서 사용된 관류영양액으로 3회 세척 후 다시 상기 영양액에서 Mg^{2+} 이 제거된 Mg^{2+} free 영양액으로 3회 세척하였고, 실험은 심근세포가 부유된 10ml의 Mg^{2+} free 영양액을 시험관에 분주하여 교반기가 장착된 항온수조(37°C)에서 실시하였다. 심근세포가 부유된 각 시험관을 대조군 및 약물투여군으로 구분하여 항온수조에서 약 3분간 preincubation하여 시험관내의 심근세포를 안정시켰다. 각 시험관에서 세포 부유액을 2ml 취하여 원침한 후 그 상층액만을 얻어 실험의 대조액으로 하였다(결과에서 0 min으로 표기). 대조액을 취한 후 즉시 시험관에 약물을 적정농도가 되도록 첨가하였고 5, 10분 간격으로 2ml씩 2회 세포 부유액을 취하여 원침하고 상층액을 얻어 실험액으로 하였다. 침전된 심근세포는 -70°C의 deep freezer(Operon, Korea)에 보관하면서 세포를 용해하여 각 시험관내 500 μ g protein/ml가 되도록 하고 Lowry method를 이용하여 단백질 분석을 하였으며 분리 심근세포에서의 유리된 Mg^{2+} 의 농도는 nM/ 10^6 cells로 표기하였다.

시료의 Mg^{2+} 농도측정: 상기의 방법에 의해 얻은 심장관류액 및 심근세포 배양액의 Mg^{2+} 농도는 atomic absorption spectrophotometer(Analab 9200A)를 이용하여 파장 285.2nm에서 측정하였다.

사용약물: Forskolin, HEPES, Joklik membrane powder, bovine serum albumin(BSA) 등은 Sigma(USA)로부터 8-(4-chlorophenylthio)-cAMP, 8-bromo-cAMP, 3-isobutyl-1-methylxanthine(IBMX), Ro20-1724, 5-(N-ethyl-N-isopropyl)-amiloride (EIPA), benzamil, H₂-dihydrochloride 및 imipramine은 RBI (USA)로부터 collagenase는 Worthington(USA)으로부터 구입하였다.

통계처리: 실험성적은 Mean \pm SEM으로 나타냈고 각 구간간의 유의성은 Student's *t*-test에 의해 검정하였다.

결 과

관류심장 및 분리 심근세포에서 Mg^{2+} 유리에 미치는 membrane permeable cAMP analogue의 영향: Fig 1A는 흰쥐 관류심장에 Mg^{2+} free 영양액을 관류시킨 후 20분부터(그림에서 1분으로 표시하였음) 관류액을 1분 간격으로 40분간 취하여 AA로 Mg^{2+} 농도를 측정된 결과로써 5회의 실험 중 전형적인 한 예이다. Mg^{2+} free 영양액을 관류하기 때문에 세포내(또는 세포와 세포사이의

Mg^{2+} 이 유리되어 Fig 1A에서 보는 바와 같이 시간에 따라 일정한 감소곡선을 나타냈고 관류 후 30-40분에 관류액내 Mg^{2+} 농도는 최저치인 $10\pm 3\mu$ M를 나타냈다. 상기의 조건을 유지하면서 관류액을 취하기 10분째 세포막에 투과성이 있는 cAMP analogue(2×10^{-4} M)를 관류액에 혼합하여 10분간 관류시킨 결과 흰쥐 관류심장에서 현저한 심박수 증가(자료 제시치 않음)와 함께 Fig 1A에

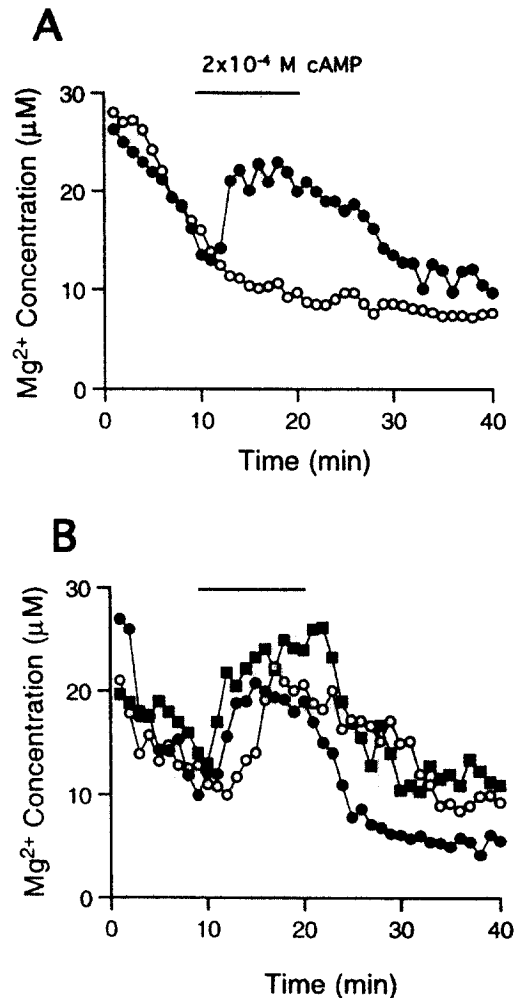


Fig 1. Mg^{2+} release in control(A, \circ) and after addition(A, \bullet) of 2×10^{-4} M 8-Cl-cAMP, and effects of 10^{-5} M forskolin(B, \blacksquare), 10^{-5} M IBMX(B, \bullet) or 2×10^{-5} M Ro20-1724(B, \circ) on Mg^{2+} release in perfused rat hearts. The indicated bars show the period that the hearts were perfused with the chemicals. One typical experiment out of four hearts, each for control, 8-Cl-cAMP-, forskolin-, IBMX- and Ro20-1724-stimulated hearts is shown.

서와 같이 뚜렷한 Mg^{2+} 유리의 증가효과를 나타냈으며 분리 심근세포에서도 cAMP의 농도에 의존적으로 Mg^{2+} 유리 증가효과를 나타냈다(Table 1).

관류심장 및 분리 심근세포에서 Mg^{2+} 유리에 미치는 adenylate cyclase 활성제 및 phosphodiesterase 억제제의 영향 : Fig 1A와 몇몇 연구자들의 결과^{7,12}에서 세포내 cAMP의 농도변동이 Mg^{2+} 조절에 중요한 역할을 하는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 직접적으로 adenylate

Table 1. Effects of cAMP on Mg^{2+} release in the rat isolated myocytes

Agent	Extracellular Mg^{2+} content(nmol/million cells)		
	Incubation time(min after addition)		
	0	5	10
None	11.0±1.3	11.9±1.6	10.3±1.5
$3 \times 10^{-5}M$ cAMP	12.1±1.5	13.1±1.4	15.0±1.2*
$10^{-4}M$ cAMP	11.2±1.4	15.9±1.3*	18.7±1.6*
$3 \times 10^{-4}M$ cAMP	13.1±1.2	19.4±1.1***	28.7±1.7***

Data are mean±SEM of 10 experiments for control and of 3 experiments for $3 \times 10^{-5}M$, $10^{-4}M$ and $3 \times 10^{-4}M$ cAMP-treated isolated myocytes, respectively. Dispersed myocytes were incubated at 500µg protein/ml in the Mg^{2+} free buffer. After stabilization for 3 min, the chemicals were added to the medium and samples were collected supernatant at 0, 5, 10 min. This indicated 0 min meant that the supernatant collected before chemicals treatment. *p < 0.05, **p < 0.01, vs. 0 min; †p < 0.05, ††p < 0.01 vs. corresponding the time of control.

Table 2. Effects of Br-cAMP, forskolin, IBMX and Ro20-1724 on Mg^{2+} release in the rat isolated myocytes

Agent	Extracellular Mg^{2+} content(nmol/million cells)		
	Incubation time(min after addition)		
	0	5	10
None	10.3±1.2	10.8±1.4	9.2±1.8
$10^{-4}M$ Br-cAMP	11.2±1.1	15.9±1.4*	16.7±1.6*
$5 \times 10^{-5}M$ Forskolin	11.8±1.4	15.7±2.0**	19.6±1.1***
$3 \times 10^{-5}M$ IBMX	11.3±1.3	13.0±1.8	13.8±1.6
$10^{-4}M$ Ro20-1724	11.3±0.7	12.7±1.3	15.0±1.1*

Data are mean±SEM of 8 experiments for control and of 4 experiments for intracellular cAMP modulators-treated isolated myocytes, respectively. *p < 0.05, **p < 0.01, vs. 0 min; †p < 0.05, ††p < 0.01, vs. corresponding the time of control.

cyclase를 활성화하여 세포내 cAMP를 증가시킬 수 있는 forskolin($10^{-5}M$), 세포내 cAMP의 AMP로의 전환을 억제하는 phosphodiesterase 억제제인 IBMX($10^{-5}M$) 및 Ro20-1724($2 \times 10^{-5}M$)를 10분간 처치한 결과 관류심장에서 현저한 Mg^{2+} 유리의 증가를 일으켰으며(Fig 1B), 또한 분리 심근세포에서도 forskolin, IBMX, Ro20-1724 및 Br-cAMP은 Mg^{2+} 유리의 증가효과를 나타냈다(Table 2).

관류심장 및 분리 심근세포에서 cAMP에 의한 Mg^{2+} 유리 증가효과에 미치는 이온교환기의 영향 : 흰쥐의 관류심장과 분리 심근세포에서 cAMP analogue에 의한 Mg^{2+} 유리 증가효과에 미치는 세포내 H^+ 의 영향을 알아보기

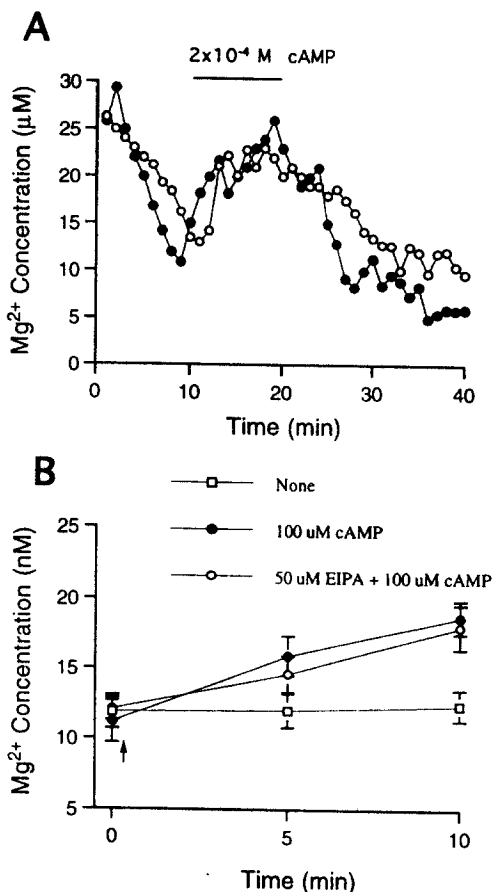


Fig 2. Effects of $10^{-5}M$ EIPA (○) on cAMP (●)-induced Mg^{2+} release in perfused rat hearts (A) and isolated myocytes (B). One typical experiment out of five hearts is shown (A). Where the indicated in the figure, cAMP was added and data are mean±SEM of 7 experiments for control and 5 experiments for drug-treated myocytes, respectively (B).

위하여 $\text{Na}^+\text{-H}^+$ 교환기 선택적인 억제제인 EIPA(10^{-5}M) 존재하에 cAMP($2 \times 10^{-4}\text{M}$) 처리한 결과 EIPA는 cAMP에 의한 Mg^{2+} 유리 증가효과에 영향을 미치지 못하였다 (Fig 2). 그러나 $\text{Na}^+\text{-Mg}^{2+}$ 교환기 억제제인 imipramine(10^{-5}M)과 $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ 교환기 억제제인 benzamil(10^{-5}M)은 cAMP에 의한 Mg^{2+} 유리 증가효과를 현저히 억제하였다(Fig 3).

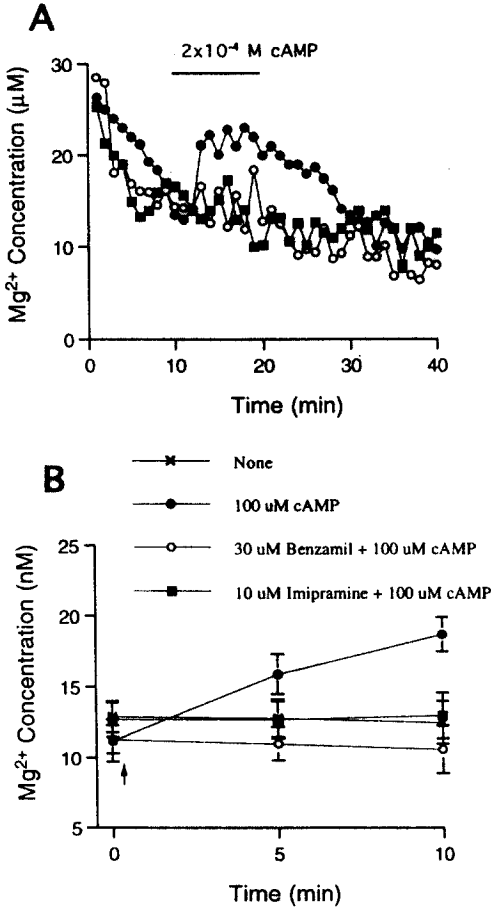


Fig 3. Effects of imipramine (■) or benzamil (○) on cAMP (●)-induced Mg^{2+} release in perfused rat hearts (A) and isolated myocytes (B). One typical experiment out of four hearts is shown (A). Where the indicated in the figure, cAMP was added and data are mean \pm SEM of 6 experiments for control and 4 experiments for drug-treated myocytes, respectively (B).

최근 ascite cell에서 protein kinase inhibitor인 H_7 이 Na^+ -dependent한 Mg^{2+} efflux에 관여한다는 보고¹⁴가 있어 H_7 (10^{-5}M) 전처리 후 cAMP에 의한 Mg^{2+} 유리변동을 관찰

한 바 H_7 은 cAMP에 의한 Mg^{2+} 유리 증가효과를 완전히 차단하였다(Fig 4).

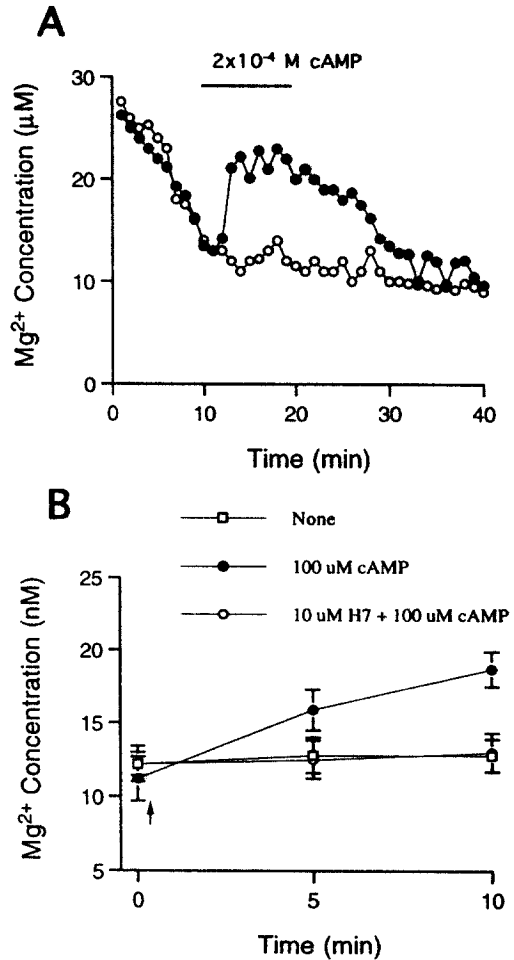


Fig 4. Effects of 10^{-5}M H_7 (○) on cAMP(●)-induced Mg^{2+} release in perfused rat hearts (A) and isolated myocytes (B). One typical experiment out of four hearts is shown (A). Where the indicated in the figure, cAMP was added and data are mean \pm SEM of 7 experiments for control and 4 experiments for drug-treated myocytes, respectively (B).

고 찰

Mg^{2+} 은 생체내에 필수적인 이온으로써 많은 생리적 역할을 담당하고 있으므로 세포내 Mg^{2+} 의 기능 및 역할에 대한 연구는 활발히 진행되었으나^{1-3,15-18} 생체내 Mg^{2+} 의 항상성 유지 및 조절기전에 대해서는 연구가 진행

중이다. 몇몇 연구자들에 의해 giant cell, bacteria 및 닭 적혈구 등에서 Mg^{2+} 농도 조절기전에 대한 연구보고는 있지만¹⁹⁻²¹ 포유동물의 심장 및 심근세포에서 cAMP에 의한 Mg^{2+} 유리 변동에 미치는 세포막에 존재하는 이온 조절계의 영향에 대해서는 보고된 바 없다.

세포내 cAMP 조절물질에 의한 Mg^{2+} 유리조절 : Nor-epinephrine과 같은 약물은 세포막에 존재하는 수용체를 경유하여 세포내 cAMP를 증가시킴으로써 Mg^{2+} 유리 증가효과를 나타낼 수 있지만 cAMP 증가효과는 수용체 자극 이외의 다른 경로를 경유해서도 나타날 수 있다. 따라서 심장에서 어떠한 경로를 경유하든지 세포내 cAMP 농도를 증가시킨다면 Mg^{2+} 유리 증가효과가 나타날 것으로 생각되어 첫째, 세포막에 작용하여 직접적으로 adenylate cyclase를 활성화시키는 forskolin을 처치한 결과 현저한 Mg^{2+} 유리 증가효과를 나타냈으며 역시 adenylate cyclase를 억제하는 carbachol은 Mg^{2+} 유리 증가효과를 감소시키는 즉, 유입되는 경향을 나타냈다¹³. 둘째, 세포내 생성된 cAMP를 AMP로의 전환을 억제하는 것으로 이는 세포내 존재하는 phosphodiesterase를 억제하여 나타날 수 있으므로 phosphodiesterase 억제제인 IBMX 또는 Ro20-1724를 처치한 결과 forskolin의 효과와 유사하게 Mg^{2+} 유리 증가효과를 나타냈다(Fig 1B, Table 2). 셋째, 세포막을 직접 통과할 수 있는 Cl-cAMP 처치는 관류심장이나 분리 심근세포 모두에서 Mg^{2+} 유리 증가효과를 나타냄을 관찰하여(Fig 1A, Table 1), β -수용체 자극에 의한 세포내 cAMP 증가가 Mg^{2+} 유리 증가효과를 나타낸다는 Romani *et al*⁷의 보고에서와 같이 본 실험에서도 세포내 cAMP는 Mg^{2+} 유리에 중요한 조절자임을 확인할 수 있었다.

Mg^{2+} 유리에 미치는 Na^+-H^+ , Na^+-Ca^{2+} 및 Na^+-Mg^{2+} 교환기의 영향 : 생체내의 이온변동은 서로 다른 이온들의 변동과 밀접한 상관관계가 있기 때문에 Mg^{2+} 유리 변동 효과에 미치는 다른 이온들의 변동 또한 중요할 것으로 생각되었다. 실제로 H^+ , Na^+ 및 Ca^{2+} 등의 변동은 세포내 Mg^{2+} 수송을 조절하여 세포의 대사를 조절하는 것으로 알려져 있어^{1-3,7,15} cAMP analogue에 의한 Mg^{2+} 유리 증가효과에 미치는 다른 이온변동과의 상호관계를 규명하고자 하였다.

심근세포내 pH 변동은 세포내 다른 이온의 변동을 초래할 수 있다²²⁻²⁴. 즉, 심근세포의 대사에 의해 생성되는 H^+ 이온은 세포내 acidosis를 일으키는데 정상적인 세포

에서 Na^+ 이온이 유입되어 H^+ 이온이 세포밖으로 유출됨으로써 세포내 pH가 조절된다²⁹. 닭의 배양 심근세포에서 세포내 pH는 세포내 유리형 Mg^{2+} 을 조절하며³¹ 또한 Wolf *et al*²³은 Ehrlich ascites tumor cells에서 Mg^{2+} 유리가 비선택적 Na^+-H^+ 교환기 억제제인 amiloride에 의해서 억제되었다고 보고한 바 있어 Mg^{2+} 유리와 세포내 pH 변동은 상호 밀접한 관계가 있을 것으로 추측하였다. 따라서 본 연구에서 흰쥐의 심장에 Na^+-H^+ 교환기 선택적인 억제제인 EIPA를 전처치하여 세포내 acidosis를 일으킨 후 cAMP를 처치한 바 EIPA는 cAMP에 의한 Mg^{2+} 유리 증가효과에 영향을 미치지 못하였다(Fig 2). 이와같은 결과는 ascite tumor cells에서 amiloride에 의한 Mg^{2+} 유리 억제효과와는 상이한데 이는 조직의 차이에 따른 결과로 생각되나 본 연구로써는 이를 확인할 수는 없었다.

심근세포에는 Mg^{2+} 의 투과성이 있음은 분명하지만 그 경로에 대해서는 잘 알려져 있지 않고 다른 세포에서 몇 가지 예가 보고되어 있다. Mg^{2+} 의 교환은 세포막을 통한 다른 이온과의 전위차에 의해 이루어진다. 즉, Mg^{2+} 유입이 Na^+ 통로차단제인 tetrodotoxin이나 lidocaine 등에 의해 억제되고²⁶ Mg^{2+} 의 변동은 Na^+ 전위차에 의해 Na^+-Mg^{2+} 교환기를 통하여 이루어진다고 알려져 있다¹³. Squid axon에서 Mg^{2+} 의 변동이 Na^+-Mg^{2+} 교환기를 경유한 1:1의 교환이 세포내 Na^+ 에 의존적이며²⁷ 맥관 평활근에서 Mg^{2+} 의 변동에 대한 믿을 만한 수송체로 Na^+-Mg^{2+} 교환기를 제시하였다²¹. Gunther *et al*^{28,29}은 닭 적혈구에서 Na^+-Mg^{2+} 교환기를 동정하여 세포내로 2개의 Na^+ 유입에 따른 세포외로 1개의 Mg^{2+} 유출로 Na^+-Mg^{2+} 교환기의 역할을 규명하였으나 심장세포에서는 잘 알려져 있지 않다. 닭 적혈구 및 Ehrlich Ascites Tumor Cells¹⁴에서 보여준 Na^+-Mg^{2+} 교환기 등^{28,29}과 유사한 작용기가 심장세포에도 존재할 수 있을 것으로 추측하여 Na^+-Mg^{2+} 교환기 억제제로 알려진 imipramine 존재하에 cAMP analogue를 처치한 바 Mg^{2+} 유리 증가효과가 현저히 억제됨을 보여(Fig 3) Mg^{2+} 을 조절할 수 있는 교환기가 심장세포에도 존재하리라 생각되나 본 실험으로써 Mg^{2+} 교환기를 확인하기는 어렵다. 또한 cAMP analogue에 Mg^{2+} 유리효과는 Na^+-Ca^{2+} 교환기 억제제인 benzamil에 의해 억제되었고(Fig 3), ascite cell에서 protein kinase 억제제인 H₂에 의해 Na^+ -의존적인 Mg^{2+} 유출이 억제되며 cAMP는 Na^+-Mg^{2+} 교환기의 인산화에 의해 Mg^{2+} 유리 증가효과를 나타낸다고 보고된 바 있어¹⁴ cAMP analogue에 의한 Mg^{2+}

유리에 미치는 H_2 효과를 관찰한 바 H_2 은 Mg^{2+} 유리 증가효과를 차단하므로써(Fig 4) 심장에도 ascite cell과 유사한 Mg^{2+} 교환기와 같은 이온전달계가 존재하여 이에 대한 인산화 억제에 의한 효과로 추측되나 본 실험으로는 직접적으로 Mg^{2+} 교환기를 확인할 수 없어 이에 대한 연구는 더욱 진행되어야 할 것으로 생각된다.

이상의 결과로 심장에서 Mg^{2+} 조절인자로 cAMP가 중요한 역할을 하고 있음을 확인할 수 있었으며 세포내 cAMP 증가에 의한 Mg^{2+} 유리에 이온교환기들이 관여하고 있음을 알 수 있었다.

결 론

흰쥐의 관류심장과 심근세포에서 cAMP에 의한 Mg^{2+} 유리의 증가기전을 밝히기 위하여 심장관류액 및 심근세포 배양액내의 Mg^{2+} 농도를 AA로 측정 한 바 아래와 같은 결과를 얻었다.

흰쥐 심장에서 cAMP 및 세포내 cAMP 조절물질(forskolin, IBMX 및 Ro20-1724)은 Mg^{2+} 유리를 증가시켰으며 cAMP에 의한 Mg^{2+} 유리 증가효과는 Na^+-Ca^{2+} exchanger 억제제인 benzamil, Na^+-Mg^{2+} exchanger 억제제인 imipramine 및 PKA 억제제인 H_2 에 의해 억제되었으나 Na^+-H^+ exchanger 억제제인 EIPA는 영향을 미치지 못하였다.

이상의 결과를 종합하면 심장에서 cAMP는 Mg^{2+} 유리 증가효과를 나타내고 이러한 Mg^{2+} 유리 증가효과에 세포막 이온교환기(Na^+-Ca^{2+} 및 Na^+-Mg^{2+} exchanger)가 중요한 역할을 하는 것으로 생각된다.

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. Magnesium ions in cardiac function: Regulation of channel and second messengers. *Biochem Pharmacol*, 38:859-867, 1989.
3. White RE, Hartzell HC. Effect of intracellular free magnesium on calcium current in isolated cardiac myocytes. *Science*, 239:778-780, 1988.
4. Altura BM, Altura BT. New perspectives on the role of magnesium in the pathophysiology of the cardio-

- vascular system. *Magnesium*, 4:226-244, 1985.
5. Anderson TW, Neri LC, Schreiber GB, et al. Ischemic heart disease, water hardness and myocardial magnesium. *Can Med Assoc J*, 113:203, 1975.
6. Romani A, Scarpa A. Norepinephrine evokes a marked Mg^{2+} transport efflux from liver cells. *FEBS Lett*, 269:37-40, 1989.
7. Romani A, Scarpa A. Hormonal control of Mg^{2+} transport in the heart. *Nature*, 346:841-844, 1990.
8. 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.
9. 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.
10. Hwang SC, Kim SJ, Kang HS, et al. Effects of α_1 -adrenoceptor stimulation on Mg^{2+} release in perfused guinea pig heart. *Kor J Vet Res*, 36(2):327-335, 1996.
11. Altschuld R, Jung DW, Phyllips RM, et al. Evidence against norepinephrine-stimulated efflux of mitochondrial Mg^{2+} from intact cardiac myocytes. *Am J Physiol*, 266:H1103-11, 1994.
12. Kang HS, Chang SE, Kang CW, et al. Effects of histamine H_2 -receptor stimulation on Mg^{2+} efflux in perfused guinea pig heart. *Kor J Physiol Pharmacol*, 2:49-54, 1998.
13. 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.
14. Wolf FI, Francesco AD, Covacci V, et al. cAMP activates magnesium efflux via the Na^+/Mg^{2+} antiporter in ascites cells. *Biochem Biophys Res Comm*, 202:1209-1214, 1994.
15. 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.
16. Maguire ME. Hormone-sensitive magnesium transport and magnesium regulation of adenylate cyclase. *Trends Pharmacol Sci*, 5:73-77, 1984.
17. Gunther T. Functional compartmentation of intracellular

- magnesium. *Magnesium*, 5;53-59, 1986.
18. Bersohn MM, Shine KI, Sterman WD. Effects of increased magnesium on recovery from ischemia in rat and rabbit hearts. *Am J Physiol*, 242:H89-93, 1982.
 19. Murphy E, Steenbergen C, Levy LA, et al. Cytosolic free magnesium levels in ischemic rat heart. *J Biol Chem*, 264:5622-5627, 1989.
 20. Snavelly 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.
 21. Shetty SS, Weiss GB. Alterations in Mg²⁺ distribution and movements in rabbit aortic smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther*, 245:112-119, 1988.
 22. Faviato A, Pabiato F. Effects of pH on the myofilaments and the sarcoplasmic reticulum of skinned cells from cardiac and skeletal muscle. *J Physiol*, 276:233-255, 1978.
 23. Vaughan-Jones RD, Wu ML, Bountra C. Sodium hydrogen exchange and its role in contractility during acidosis in cardiac muscle. *Mol Cell Biochem*, 89:157-162, 1989.
 24. Vaughan-Jones RD, Eisner DA, Ladera WJ. The effects of intracellular Na⁺ on contraction and intracellular pH in mammalian cardiac muscle. *Adv Myocardiol*, 5: 313-330, 1985.
 25. Freudenrich CC, Murphy E, Levy LA, et al. Intracellular pH modulates cytosolic free magnesium in cultured chicken heart cells. *Am J Physiol*. 262:C 1024-C1030, 1992.
 26. Spah F, Fleckenstein A. Evidence of a new, preferentially Mg²⁺-carrying, transport system besides the fast Na⁺ and slow Ca²⁺ channels in the excited myocardial sarcolemma membrane. *J Mol Cell Cardiol*, 11:1109-1127, 1979.
 27. De Weer P. Axoplasmic free magnesium levels and magnesium extrusion from squid giant axon. *J Gen Physiol*, 68:159-178. 1976.
 28. Gunther T, Vormann J, Forster R. Regulation of intracellular magnesium by Mg²⁺ efflux. *Biochem Biophys Res Commun*, 119:124-131, 1984.
 29. Gunther T, Vormann J. Mg²⁺ efflux is accomplished by an amiloride-sensitive Na⁺/Mg²⁺ antiport. *Biochem Biophys Res Commun*, 131: 540-545, 1985.
-