大韓獸醫學會誌(2000) 第40卷 第2號
Korean J Vet Res(2000) 40(2) : 291~299

심장에서 세포내 Mg^{2+} 농도 의존적 Mg^{2+} 유리

백성수 · 김상진 · 김진상

전북대학교 수의과대학

(2000년 5월 6일 게재승인)

Intracellular Mg^{2+} concentration dependent Mg^{2+} release in the hearts

Sung-soo Baek, Shang-jin Kim, Jin-shang Kim

College of Veterinary Medicine, Chonbuk National University

(Accepted by May 6, 2000)

Abstract : Magnesium (Mg^{2+}) transport across the plasma membrane of cardiac myocytes appears to be under hormonal control. Repeated stimulations with adrenergic or histaminergic agonist produced a progressive decrease in Mg^{2+} efflux from hearts. Thus we hypothesized that the Mg^{2+} efflux may be resulted from a down-regulation of receptors or from a depletion of Mg^{2+} from intracellular pool(s) in the hearts. In the present study, the regulation of Mg^{2+} homeostasis by receptor stimulation was studied in perfused rat and guinea pig hearts.

The successive short addition of norepinephrine (NE) to rat and guinea pig, and of histamine (HT) to perfused guinea pig hearts induced a progressive decrease in Mg^{2+} efflux. These Mg^{2+} effluxes were blocked by propranolol or ranitidine, respectively. These decrease in Mg^{2+} efflux were inhibited by sodium cyanide (NaCN), which increases intracellular Mg^{2+} ($[Mg^{2+}]_i$) levels. When NE (or HT) was added after HT (or NE), this efflux was also decreased in the guinea pig hearts. In the rat hearts and myocytes, HT did not stimulate Mg^{2+} efflux. But NE produced a large Mg^{2+} efflux after stimulation with HT. 8-(4-Chlorophenylthio)-adenosine cAMP (cAMP), like NE and HT, also induced a progressive decrease in Mg^{2+} efflux in guinea pig hearts. This effect was inhibited by NaCN. These data provide evidence that the progressive decrease in receptor-stimulated Mg^{2+} efflux is considered to be due to a decrease in $[Mg^{2+}]_i$ levels rather than receptor down-regulation.

Key words : magnesium, histamine, intracellular Mg^{2+}, norepinephrine, heart.

Address reprint requests to Dr. Jin-shang Kim, Department of Pharmacology, College of Veterinary Medicine, Chonbuk National University, Chonju 561-756, Republic of Korea. Tel : (82) (652)270-2554.

서 론

최근 생체내에서 Mg^{2+}의 생리적 또는 화학적 역할의 중요성 만큼 Mg^{2+}의 조절기전이 중요한 연구분야로 대두되고 있다. 그 예로 심장 세포막[1], 간 세포막[2,3] 및 기타 포유류 세포막[4,5]에서 다양한 호르몬 또는 신경전달물질 등에 의한 Mg^{2+} 유동효과를 보고하였다. Ca^{2+} 또는 Na^{+}과 같은 양이온에 의해 Mg^{2+}이 조절[1,6-8]될 수 있지만 수용체를 자극하는 신경전달물질에 의하여 세포막을 경유한 Mg^{2+}의 유동이 조절된다. 특히 심장이나 간에서 Mg^{2+} 유출이 β-adrenergic(β-ARs)[2,9], histaminergic(HRs)[10] 및 dopaminergic[11] 수용체 자극에 의해서 일어나는데 이는 세포내 cAMP 증가로 일어나며 이 cAMP가 세포막 Na^{+}-Mg^{2+} 교환기를 자극한 결과[4,7,12,13]로 해석하고 있다.

생체나 세포내에서 Mg^{2+} 조절기전에 대한 연구를 수행하는데 있어서 Mg^{2+} 유동은 많은 요인에 의하여 영향받을 수 있다. 특히 수용체를 자극하는 호르몬에 의한 Mg^{2+} 조절기전에 있어서 수용체 수나 약물에 대한 친화성 변동에 따른 수용체의 up-regulation(상향조절) down-regulation(하향조절)을 고려해야할 뿐만 아니라 신호전달체계의 변동 또는 신호전달계에 의해 지배받는 이온조절계의 변동도 고려해야 하기 때문이다. 수용체 하향조절은 지속적 또는 반복적 자극시 일어나기 때문에 관류조직 또는 세포에서 일시적 실험결과만을 관찰해야 하는 한계점이 대두되고 있다. 오래전 관류심장에서 반복적으로 NE을 관류했을 때 점차적으로 Mg^{2+} 유리가 감소함을 관찰하고 이는 수용체의 하향조절이나 $[Mg^{2+}]_i$ 농도감소에 의한 결과일 것으로 추측했을 뿐 이를 확인하지 않았다[9]. 최근 저자 등도 cAMP를 증가시킬 수 있는 수용체를 반복적으로 자극할 때 위와 같은 결과를 관찰하고 이를 규명해야 할 필요성을 고려하였다. 따라서 이 연구에서 반복적인 수용체(HRs, β-ARs) 자극시 점차적인 Mg^{2+} 유리감소가 수용체의 하향조절에 의한 결과인지 아니면 $[Mg^{2+}]_i$ 농도감소에 의한 결과인지를 밝히기 위하여 다음과 같은 조건하에서 실험을 실시하였다.

첫째, 흰쥐와 기니픽 심장 및 심근세포에 HRs 또는 ARs 분포가 다름으로 이 효현제들의 투여에 따른 Mg^{2+} 유리 변동 및 차이를 관찰하였고 둘째, 상기 두 수용체는 공통적으로 cAMP를 증가시키는 신경전달물질이라는 사실[2,14-16]을 조건으로 NE(또는 HT) 투여후 HT(또는 NE)를 투여하여 위 결과와 비교하였다. 셋째, 세포내 ATP 결핍은 세포내 유리형 Mg^{2+}을 증가시킬 수 있기 때문에 NaCN으로 유리형 Mg^{2+}을 증가시킨 후 NE나 HT를 투여하여 그 전후를 비교하였고 끝으로 수용체 하향조절과 관계없는 cAMP의 반복적인 관류효과를 상기와 같은 방법으로 관찰하였다.

재료 및 방법

심장적출 및 관류액 채취 : 흰쥐(Sprague-Dawley, 230~270g)와 기니픽(370~450g)을 두부타격후 심장을 적출하여 4℃의 산소포화 영양액(NaCl 120, KCl 3, $CaCl_2$ 1.2, $MgCl_2$ 1.2, KH_2PO_4 1.2, glucose 10, $NaHCO_3$ 12와 HEPES 10mM, 95% O_2 : 5% CO_2, pH 7.3)으로 혈액 등을 제거한 다음 영양액이 관류되고 있는 관류 system(Langendorff open system)의 연결관에 심장의 대동맥을 삽입하여 결찰하였다. 고정후 37℃ 상기 영양액을 10ml/min 속도로 20분간 관류시킨 다음 관류액을 Mg^{2+} free 영양액으로 대치하여 공급하였다. Mg^{2+} free 영양액을 관류시킨 20분 후부터(Fig에서 1분으로 표시하였음) 관류된 영양액을 1분 간격으로 채취하였고, 약물은 관류액 채취 10분 후부터 관류용액에 적정농도로 첨가하여 약 5~10분간 관류시켰다.

심근세포 분리 및 배양액 채취 : 심근세포 분리는 De Young *et al*[17]의 collagenase 소화방법을 개선하여 다음과 같이 실시하였다. 흰쥐와 기니픽을 두부타격한 후 심장을 적출한 다음, 적출심장의 대사를 감소시키기 위해 저온(4℃)의 산소포화 Joklik buffer로 혈액을 제거한 후 대동맥을 관류 system의 cannula에 현수하였다. 관류액은 95% O_2 : 5% CO_2로 포화된 Joklik buffer(11.1g/l Joklik membrane powder, glucose 10, $NaHCO_3$ 12mM, pH 7.2~7.3, 37℃) 였다. 현수된 심장에 Joklik buffer를 약 5분간 관류하면서 기타 조직을 제거하고 심장 및 혈관 등에서 혈액이 제거되고 안정되면 collagenase를 첨가한(100IU/ml) Joklik buffer를 심장의 소화상태를 확인하면서 20~35분 동안 재관류하였다. Ca^{2+}-tolerant 세포를 얻기 위하여 소화시키는 동안 25μM Ca^{2+}을 첨가하였다. Langendorff cannula로부터 소화된 심장을 분리하여 bovine serum albumin(BSA, 10mg/ml)과 0.25mM $CaCl_2$이 첨가된 Joklik buffer와 collagenase buffer를 혼합한 용액내에서 절제한 심장을 조심스럽게 흔들면서 심근세포를 분리하였다. 분리

한 심근세포는 BSA(10 mg/ml)와 0.25mM $CaCl_2$가 첨가된 Joklik buffer에 부유시킨 후 심근세포의 부유액을 250μm nylon-gauze로 여과하고 3회 세척하였다. 분리된 세포는 상온에 60분동안 방치하면서 안정시켰고 방치동안 10분 간격으로 0.25mM $CaCl_2$을 4회 첨가하여 buffer 내 최종 Ca^{2+} 농도가 1.25mM이 되도록 하였다. 심근세포를 현미경하에서 관찰하여 70% 이상의 세포가 전형적인 막대모양으로 관찰될 때 실험에 사용하였다. 실험을 시작하기 직전 관류심장에서 사용된 관류 영양액으로 3회 세척후 다시 상기 영양액에서 Mg^{2+}이 제거된 Mg^{2+} free 영양액으로 3회 세척을 실시하였고, 실험은 심근세포가 부유된 10ml의 Mg^{2+} free 영양액을 시험관에 분주하여 교반기가 장착된 항온수조(37℃)에서 실시하였다. 심근세포가 부유된 각 시험관을 대조군 및 약물투여군으로 구분하여 항온수조에서 약 3분간 preincubation 하여 시험관내의 심근세포를 안정시켰다. 각 시험관에서 세포 부유액을 2ml 취하여 원침후 그 상층액만을 얻어 실험의 대조액으로 사용하였다(결과에서 0 min으로 표기). 대조액을 얻은 후 즉시 약물을 적정농도가 되도록 하여 시험관에 첨가하였고 5, 10분 간격으로 2ml씩 2회 세포 부유액을 취하여 원침후 상층액을 얻어 실험액으로 하였다. 남은 심근세포는 냉동(-70℃) 보관하였다. Mg^{2+}의 농도분석이 끝난 후 세포를 용해하여 Lowry 방법으로 protein을 분석하였으며 각 시험관내에 500μg protein/ml가 되도록 하였고 분리 심근세포에서 유리된 Mg^{2+}의 농도는 nmol/10^6 cells로 표기하였다.

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

사용약물 및 통계처리 : HT, NE 및 NaCN은 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA)로 부터 Cl-cAMP(8-(4-chlorophenylthio)-cAMP)는 Research Biochemicals International (Natick, MA, USA)로부터 collagenase는 Worthington Biochemical Corp.(Freehold, NJ, USA)으로부터 구입하여 사용하였다. 실험성적은 mean±SEM으로 나타냈고 각 군간의 유의성은 Student's *t*-test에 의해 검정하였다.

결 과

심장에서 HT 또는 NE 반복관류에 의한 Mg^{2+} 유리변동 : 기니픽(Fig 1A)과 흰쥐(Fig 1B) 관류심장에 HT(10-6 M) 및 NE(10-5 M)을 각각 20분 간격으로 5분간씩 3회 관류한 결과, 관류를 반복함에 따라 점차적으로 Mg^{2+} 유리가 감소됨을 관찰하였다. 기니픽(Fig 2A) 또는 흰쥐(Fig 2B) 관류심장에서 NE 또는 HT에 의한 Mg^{2+} 유리효과는 β-ARs 길항제인 propranolol(3×10^{-6}M)이나 H_2-HRs 길항제인 ranitidine(10^{-5}M)에 의하여 차단되었다. NE 역시 기니픽 관류심장에서 흰쥐 관류심장에서처럼 비슷한 효과가 나타났다(자료 미제시). 이와같은 Mg^{2+} 유리가 H_2-HRs 및 β-ARs를 경유한 효과임을 추측할 수 있기 때문에 점진적인 Mg^{2+} 유리감소 효과가 하향조절에 의한 결과인지, 아니면 관류심장 $[Mg^{2+}]_i$ 농도감소에 의한 결과인지를 의심케 하였다.

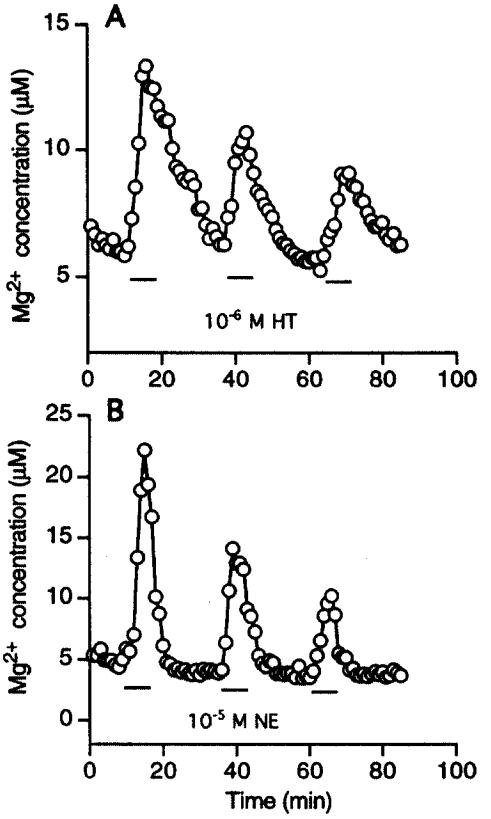

Fig 1. Effects of repeated stimulation with HT or NE on Mg^{2+} efflux in perfused guinea pig (A) and rat (B) hearts. Where indicated, HT (10^{-6}M, A) or NE (10^{-5}M, B)was added to the perfusing medium. One typical experiment of four both for HT and NE-stimulated hearts is shown.

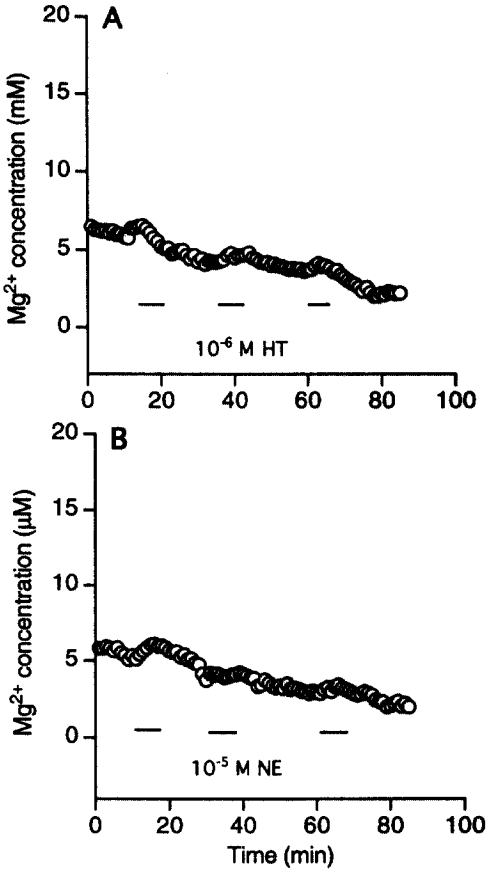

Fig 2. Inhibitory effects of H_2 or β-blocking agent on the HT- or NE-stimulated efflux of Mg^{2+} in guinea pig (A) and rat (B) hearts. Where indicated, HT or NE was added in the presence of ranitidine (10^{-5}M, A) or propranolol (3×10^{-6}M, B). Experimental conditions were similar to those described in Fig 1 legend. These figures represents a typical experiment out of three each for the chemical stimulation.

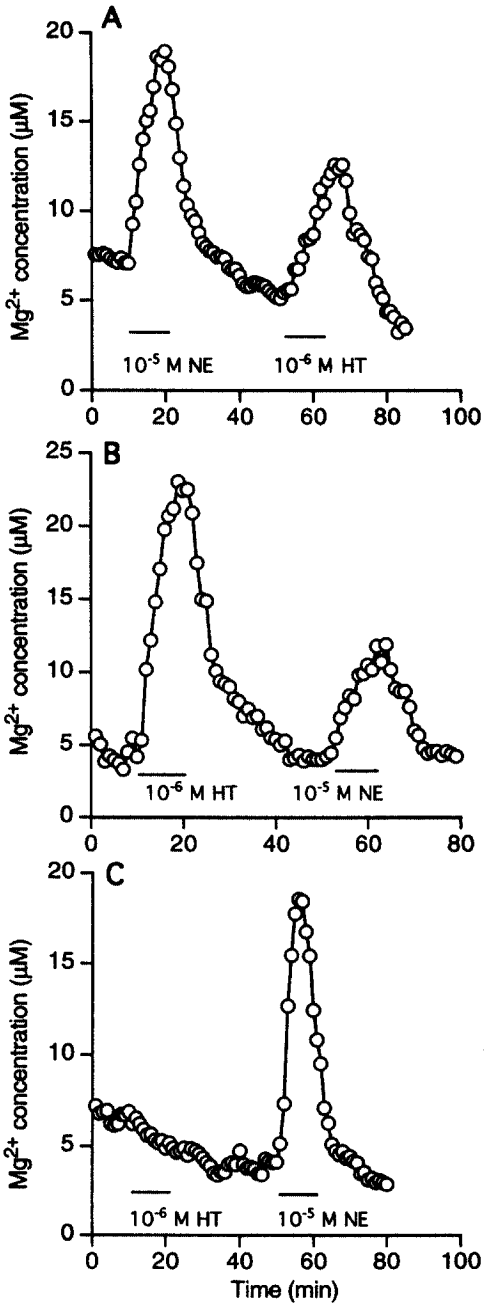

Fig 3. Effects of repeated stimulation with HT or NE after addition of NE (or HT) on Mg^{2+} efflux in perfused guinea pig hearts (A, B) and in rat (C). Experimental conditions were similar to those described in Fig 1 legend. These figures represents a typical experimental out of four each for the chemical stimulation.

심장에서 HT(또는 NE) 관류후 NE(또는 HT) 관류에 의한 Mg^{2+} 유리변동 : H_2-HRs 또는 β-ARs 자극에 의한 생리적 반응은 결국 cAMP 증가에 의한 공통적 결과이다. 따라서 Fig 1에서 나타난 의문을 해결하기 위한 방법으로 상기 두 수용체 자극은 cAMP를 증가시킨다는 사실을 전제로 하여 NE 관류후 HT를 관류하거나 HT 관류후 NE를 관류하여 반복된 cAMP 증가에 의한 Mg^{2+} 유리결과를 관찰하였다. 두 다른 약물을 10분간씩 20분 간격으로 관류한 결과 기니픽 심장에서 반복관류에 의한 Mg^{2+} 유리가 감소되었다(Fig 3A, B). 그러나 흰쥐 관류심장에서는 10^{-6}M HT에 의해 Mg^{2+} 유리효과가 나타나지

않은 반면 30분후 10^{-5}M NE를 관류한 결과 초기관류와 같은 양상으로 Mg^{2+}이 유리되었다(Fig 3C).

심근세포에서 HT에 의한 Mg^{2+} 유리효과 : Fig 3(panel C)는 흰쥐에서 HT에 의해 Mg^{2+}가 유리되지 않음을 나타냈다. 흰쥐 심장세포에 HRs 존재여부는 확실히 밝혀져 있지 않으나 기니픽과 흰쥐 심장에서 HT에 의한 Mg^{2+} 유리여부를 재확인하였다. 기니픽 심근세포(Fig 4A)에서는 HT 투여후 시간에 따라 Mg^{2+} 유리효과가 나타났으나 흰쥐 심근세포(Fig 4B)에서는 HT에 의하여 Mg^{2+} 유리가 변동되지 않아 관류심장(Fig 3)에서 나타난 결과와 유사하였다.

심장에서 NaCN이 HT 및 NE의 반복관류에 의한 Mg^{2+} 유리에 미치는 영향 : 상기 결과에서 추측한 바와 같이 반복된 H_2-HRs 또는 β-ARs 자극은 $[Mg^{2+}]_i$ 농도를 감소시킴을 알 수 있다. 이를 확인하기 위하여 HT 또는 NE 관류후 NaCN로 $[Mg^{2+}]_i$을 증가시키고 HT 또는 NE를 2차 관류하였다. NaCN은 세포내 ATP를 고갈시키기 때문에 ATP와 결합되었던 Mg^{2+}가 유리됨으로써 Mg^{2+}이 증가된다는 연구결과가 많다. 기니픽(Fig 5A) 및 흰쥐(5B) 관류심장에서 HT 또는 NE를 1차 관류한 후 1 mM NaCN 존재하에서 HT 또는 NE를 2차 관류하였을 때

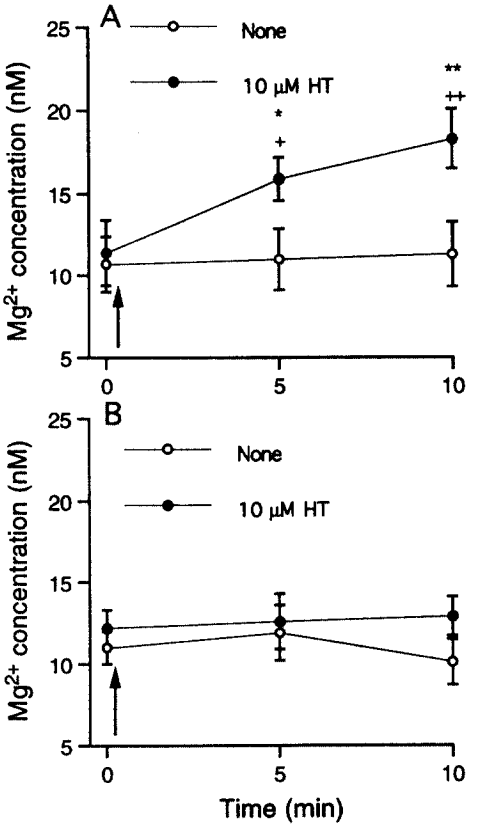

Fig 4. Stimulatory effects of HT(●) on Mg^{2+} release in isolated ventricular myocytes of guinea pig (A) ad rat (B). Myocytes were incubated, at a concentration of 500μg protein/ml, in the same medium without $MgCl_2$. After 5 minutes of equilibration, myocytes were stimulated by adding histamine (10^{-6}M). Arrow indicates the time of treatment of histamine. Data are mean±SEM of 8 different experiments. *p < 0.05, **p < 0.01 vs. 0 min; +p < 0.05, ++p < 0.01 vs. corresponding the time of control.

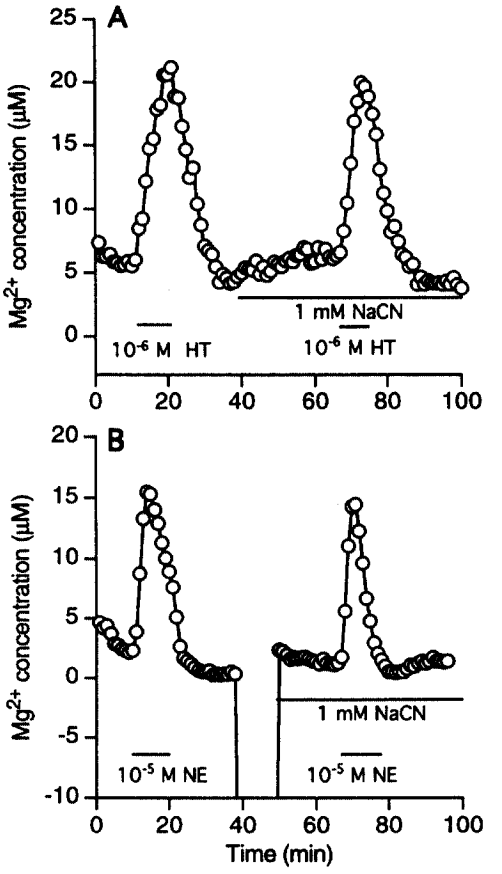

Fig 5. Effects of repeated stimulation with HT or NE in the presence of NaCN on Mg^{2+} efflux in perfused guinea pig (A) or rat (B) hearts. Where indicated, HT (10^{-6}M) or NE (10^{-5}M) was added in the absence or presence of NaCN (1mM). These figures represents a typical experiment out of four to five each for the chemical stimulation.

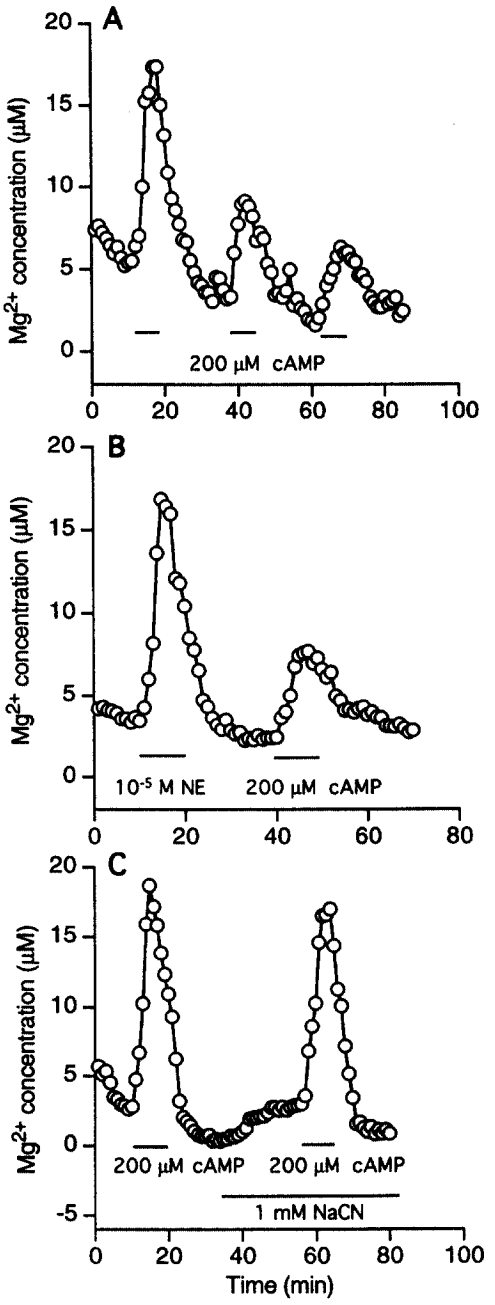

Fig 6. Effects of repeated stimulation with cAMP (A), cAMP after addition of NE (B), or cAMP in the presence of NaCN (C) on Mg^{2+} efflux in perfused guinea pig hearts. Where indicated, cAMP (2×10^{-4}M), NE (10^{-5}M) or NaCN (1mM) was added to the perfusing medium. Experimental conditions were similar to those described in Fig 5 legend. These figures represents a typical experiment out of four to five each for the chemical stimulation.

Mg^{2+} 유리는 1차 관류한 결과와 유사하게 나타났다. 즉, ATP 고갈에 의한 유리형 Mg^{2+} 증가시는 수용체 자극에 의한 Mg^{2+} 유리가 많았다.

심장에서 cAMP 반복관류 및 이에 대한 NaCN의 효과 : 상기에서 언급한 두 수용체는 공통적으로 cAMP를 증가시킨다. 따라서 cAMP의 반복된 관류효과 및 NE 관류후 2차적 cAMP 관류효과를 관찰하였다. 200μM cAMP 역시 HT나 NE처럼 반복관류에 의해 Mg^{2+} 유리가 점진적으로 감소하였고 Mg^{2+} 유리가 NE 관류후 cAMP 관류하였을 때 역시 현저히 감소되었다(Fig 6A, B). 또한 1 mM NaCN 존재하에서 2차적으로 cAMP를 관류했을 때 Mg^{2+} 유리정도가 HT나 NE처럼 1차 처치와 유사한 정도로 나타났다.

고 찰

$[Mg^{2+}]_i$은 핵, mitochondria, 내형질 및 근질 세망 등에 존재하며[18] 세포질내 Mg^{2+}을 포함한 총 $[Mg^{2+}]_i$ 농도는 5~20mM 정도로 연구자 또는 동물별 조직에 따라 많은 차이를 보이고 있다[19]. 세포질내 총 Mg^{2+} 농도의 약 5% 정도만이 유리형으로 존재하고 주로 ATP와 결합되어 있어[20] 이 결합형 Mg^{2+}과 세포기능에 필요한 유리형 Mg^{2+}과의 평형이 유지되고 있다[21]. 만약 저산소증과 같은 병적상태에서는 유리형 Mg^{2+}가 현저히 증가할 수 있으며[22,23], 이 유리형 Mg^{2+}이 상기와 같은 세포 구성성분으로 재분포되거나 세포막을 통해 유리될 수 있다[3,9]. 특히 약물이나 신경호르몬 등으로 수용체를 자극할 경우 신호전달체계에 의한 Mg^{2+} 유리기전이 몇몇 연구자에 의하여 밝혀지고 있다[1,2,5,9]. 이들 연구중 반복적인 수용체 자극시 점차적으로 Mg^{2+} 유리가 감소됨을 관찰하였으나 그 원인을 규명하지 못했다. 따라서 그 원인을 규명하기 위해서는 다음 사항을 고려해야 할 것이다. 수용체를 지속적으로 자극할 경우 세포막의 수용체 수가 줄거나 친화성이 감소되는 하향조절[24,25]에 의하여 생체를 보호한다. 따라서 연구에 있어서 이를 실험목적으로 활용하기도 하지만 실험결과에 있어서 주의하여야 할 사항이다. 이 연구에서도 기니픽과 흰쥐 심장을 반복적으로 HRs 또는 ARs를 자극했을 때 점차적으로 Mg^{2+} 유리가 감소(Fig 1)된 바와 같이 오래전 이러한 현상을 관찰하고 이러한 현상을 수용체의 하향조절 또는 $[Mg^{2+}]_i$ 농도감소에 의한 결과일 것으로 추측하였다. 따라서 이 연구에서

ARs가 존재하는 기니픽과 흰쥐 심장과 HRs가 존재하는 흰쥐 심장에서 NE 또는 HT에 의한 점진적인 Mg^{2+} 유리 감소를 확인하고, 연속된 수용체 자극에 의한 Mg^{2+} 유리 감소 효과가 수용체의 하향조절에 의한 결과인지 아니면 $[Mg^{2+}]_i$ 농도감소에 의한 결과인지를 확인하고자 하였다.

약물에 의한 저 Mg^{2+} 혈증[26,27], 질병에 의한 저 Mg^{2+} 혈증시 임상적 치료약물로 Mg^{2+}이 적용[28]될 수 있고, 심장질환과 Mg^{2+}과의 관계가 밀접하다는 보고[22,23]에 의하면 생체내 Mg^{2+}도 다른 이온처럼 조절계에 의해 조절되고 있음을 암시하고 있다. Mg^{2+} 조절기전에 대해서는 다른 Na^+, Ca^{2+} 및 K^+과 같은 양이온처럼 잘 알려져 있지 않지만 신경전달물질이나 호르몬 등에 의하여 Na^+-Mg^{2+} 교환계에 의해서 조절될 수 있음이 밝혀지고 있다. 그 중 Maguire[28]는 receptor-adenylate cyclase complex에 대한 Mg^{2+}의 역할은 물론 호르몬에 의한 $[Mg^{2+}]_i$ 농도조절 가능성을 제시한 후 β-ARs를 경유한 cAMP 활성으로 세포외로의 Mg^{2+} 유출 및 세포내 재분포가 이루어진다[3,9]고 밝혔고, cAMP를 감소시키는 약물에 의해서는 세포내로의 Mg^{2+} 유입이 촉진된다[3,5,9]고 하였다. 또한 최근 β-ARs 및 adenylate cyclase 자극으로 $[Mg^{2+}]_i$ 농도가 감소됨을 보고[30]하였고, H_2-HRs를 경유한 cAMP 활성화에 의해서 Mg^{2+}이 유리[10]되어 상기 수용체들을 경유한 cAMP 활성화로 Mg^{2+}이 유출될 수 있다는 보고를 뒷받침하였다. 따라서 이 연구에서는 이를 근거로 세포내 cAMP를 증가시켜 생리적 반응을 나타내는 상기 두 수용체 자극에 의한 Mg^{2+} 유리현상을 관찰하였다. 기니픽에는 HRs가 분포되어 이를 자극할 때 cAMP를 증가[31]시킬 수 있기 때문에 심장에 1차 자극으로 Mg^{2+}이 현저히 유리되었으나 반복된 처치로 점차적으로 유리가 감소되었고(Fig 1A), 같은 기전으로 cAMP를 활성화시키는 NE[14,15] 역시 흰쥐 심장에서 유사한 결과를 보였다(Fig 1B). 이러한 점진적 감소는 상기에서 언급한 바와 같이 수용체의 하향조절 또는 $[Mg^{2+}]_i$의 감소에 의한 결과일 것이다. 이를 확인하기 위하여 수용체는 다르지만 공통적으로 cAMP를 활성화시키는 두 약물의 효과를 하나의 기니픽 심장에서 연속적으로 관찰하였다. NE 관류후 HT을 관류하거나 HT 관류후 NE을 관류할 경우에도 Mg^{2+} 유리는 1차 관류할 때보다 감소되었다(Fig 3A, B). 이와같이 비슷한 신호전달계(cAMP 증가)를 경유하는 각각 다른 수용체를 반복 자극할 경우에도 Mg^{2+} 유리가 점차적으로 감소하였기 때문에 수용체 하향조절에 의한 결과가 아닐 가능성이 크다. 즉, 수용체 하향조절에 의한 유리감소 현상이라고 한다면 연속된 각각의 수용체 자극시 Mg^{2+} 유리는 감소되지 않아야 한다. 추가적으로 NE 관류후 2차적으로 HT을 관류하거나 HT 관류후 2차적으로 NE을 관류할 경우에 2차적으로 관류하는 약물이 1차적으로 관류한 약물과의 수용체 친화성에 따른 반응이 달라 점진적인 감소현상처럼 관찰될 수 있다. 그래서 2차적으로 관류하는 약물의 농도를 가능한 한 증가시켜 관류시켜도 1차적 약물관류시킬 때와 비슷한 정도의 Mg^{2+} 유리효과가 나타나지 않았다(자료 미제시). 또한 두 수용체 모두 cAMP를 활성화시키기 때문에 cAMP 활성화 감소에 의한 결과일 수 있으나 직접적으로 cAMP 활성화는 측정하지 못했다. $[Mg^{2+}]_i$ 농도의 감소에 의한 결과인지를 알아보기 위하여 1차적으로 HT 또는 NE 관류후 NaCN 존재하에서 반복된 두 약물의 효과를 관찰하였다. 세포내에 존재하는 90% 이상의 Mg^{2+}이 ATP와 결합하고 있기 때문에[20] 세포독성학적으로 세포내 ATP가 감소되는 상태 즉, ischemia, hypoxia 및 cyanide와 같은 화학적 대사억제시 세포내 유리형 Mg^{2+}이 증가[22,23]될 수 있다는 보고를 근거로, 이 실험에서 NaCN에 의하여 세포내 유리형 Mg^{2+}이 증가될 것으로 간주하고 NaCN 존재하에서 반복된 상기 두 약물의 효과를 관찰한 결과 초기 1차 관류시와 비슷하게 Mg^{2+}이 유리되었다(Fig 5). 따라서 수용체 반복자극에 의한 Mg^{2+} 유리감소는 세포내 유리형 Mg^{2+}의 감소에 의한 결과로 사료된다. 이 결과는 흰쥐 sublingual acini 세포내에서 인위적으로 세포외 Mg^{2+} 농도를 높인 경우 높이지 않은 경우보다 세포외로의 Mg^{2+} 유리가 더 현저했다는 보고[13]를 뒷받침하고 있다. 그러나 세포내 유리형 Mg^{2+} 재분포는 빠르게 이루어질 수 있다는 보고[3,32]에 의하면 세포 구성성분으로부터 유래될 수 있지만 이 연구에서는 수용체 자극에 의한 세포밖으로 유리된 유리형 Mg^{2+}은 NaCN에 의하여 증가하였기 때문에 세포질내 Mg^{2+}-복합체로부터 유래되었을 가능성이 크다. 추가적으로 흰쥐 심장에서는 HT에 의해서 Mg^{2+}이 유리되지 않았으나 2차적으로 NE 관류에 의하여 기니픽에서 1차 관류시 Mg^{2+} 유리처럼 현저하게 Mg^{2+}이 유리되었다(Fig 3C). 이는 흰쥐 심장에 HT 수용체가 분포되어 있지 않다는 보고[33]에 의해 설명될 수 있다. HT의 효과를 심장세포에서 관찰한 결과 관류심장에서 처럼 흰쥐에서는 HT에 의해 Mg^{2+}이 유리되지 않았다(Fig 4). 또한 수용체를 경유하지

않고 직접적으로 세포내 cAMP를 증가시킬 수 있는 한 방법으로 세포막을 통과할 수 있는 cAMP의 반복된 관류에 의해서도 Mg^{2+} 유리는 점차적으로 감소되었고, NE 관류후 cAMP에 의해서도 Mg^{2+} 유리는 감소하였다. 이러한 Mg^{2+} 유리감소가 NaCN 존재하에서는 회복되었다(Fig 6). 이러한 감소결과는 수용체 반복자극시 세포밖으로 유리될 수 있는 세포내 유리형 Mg^{2+} 농도의존적이라는 상기 결과를 뒷받침한다. 그러나 cAMP 활성화 변동 또는 ATP 결핍에 의한 세포막 이온조절계의 변동에 의한 결과도 간과할 수 없기 때문에 이에 대한 연구가 필요하다고 사료된다.

결 론

심장 세포막을 경유한 Mg^{2+} 유동이 호르몬에 의해서 조절될 수 있는데 ARs 또는 HRs를 반복적으로 자극할 경우 Mg^{2+} 유리가 점차적으로 감소한다. 따라서 우리는 이러한 Mg^{2+} 유리의 감소가 수용체 하향조절에 의한 결과이거나 심장 $[Mg^{2+}]_i$ 농도감소에 의한 결과로 가정하고, 관류 흰쥐와 기니픽 심장에서 수용체 자극에 의한 Mg^{2+} 조절에 대하여 연구하였다. 흰쥐나 기니픽 관류심장에 NE나 HT를 반복관류했을 때 Mg^{2+} 유리가 반복함에 따라 점차적으로 감소하였다. 이러한 Mg^{2+} 유리효과는 ARs나 HRs 길항제로 각각 차단되었다. NE나 HT 반복관류에 의한 Mg^{2+} 유리감소 효과가 $[Mg^{2+}]_i$ 농도를 높이는 NaCN 존재하에서 억제되었다. 그리고 기니픽 심장에서, NE(또는 HT) 관류후 HT(또는 NE)을 관류했을 때도 역시 Mg^{2+} 유리는 감소되었다. 그러나 흰쥐 심장 및 심근세포에서, HT은 Mg^{2+}을 유리시키지 못했고 HT 자극후 NE 관류는 현저하게 Mg^{2+}을 유리시켰다. 세포막을 통과할 수 있는 cAMP 역시 NE나 HT처럼 반복된 관류에 의하여 Mg^{2+} 유리가 점차적으로 감소하였고, 이러한 효과가 NaCN에 의하여 차단되었다. 이러한 결과들에 의하면 수용체 자극에 의한 점차적인 Mg^{2+} 유리감소는 수용체의 하향조절에 의한 결과가 아니고 $[Mg^{2+}]_i$ 농도감소에 의한 결과로 사료된다.

참 고 문 헌

1. 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.
2. Romani A, Scarpa A. Norepinephrine evokes a marked Mg^{2+} transport efflux from liver cells. *FEBS Lett*, 269: 37-40, 1989.
3. Romani A, Dowell EA, Scarpa A. Cyclic AMP-induced Mg^{2+} release from rat liver hepatocytes, permeabilized hepatocytes and isolated mitochondria. *J Biol Chem*, 266:24376-24384, 1991.
4. 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.
5. Zhang GH, Melvin JE. Intracellular Mg^{2+} movement during muscarinic stimulation : Mg^{2+} uptake by the intracellular Ca^{2+} store in rat sublingual mucous acini. *J Biol Chem*, 269:10352-10356, 1994.
6. Flatman PW, Smith LM. Sodium-dependent magnesium uptake by ferret red cells. *J Physiol*, 443:219-230, 1991.
7. Gunther T, Hollriegl V. Na^+- and anion-dependent Mg^{2+} influx in isolated hepatocytes. *Biochim Biophy Acta*, 1149:49-54, 1993.
8. Zhang GH, Melvin JE. Na^+-dependent release of Mg^{2+} from on intracellular pool in rat sublingual mucous acini. *J Biol Chem*, 271:29067-29072, 1996.
9. Romani A, Scarpa A. Hormonal control of Mg^{2+} transport in the heart. *Nature*, 346:841-844, 1990.
10. 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.
11. 강형섭, 김종식, 김진상. 흰쥐의 심장과 심근세포에서 dopaminergic 수용체 자극이 Mg^{2+} 조절에 미치는 영향. 대한수의학회지, 39:463-471, 1999.
12. Kim JS, Scarpa A. Regulation of magnesium release by cAMP during chemical hypoxia in the rat heart and isolated ventricular myocytes. *Kor J Physiol Pharmacol*, 3: 59-68, 1999.
13. Zhang GH, Melvin JE. Regulation by extracellular Na^+ of cytosolic Mg^{2+} concentration in Mg^{2+}-loaded rat sublingual acini. *FEBS Lett*, 371:52-56, 1995.

14. Zhou YY, Cheng H, Bogdanov KY, *et al*. Localized cAMP-dependent signaling mediates beta2-adrenergic modulation of cardiac excitation-contraction coupling. *Am J Physiol*, 273:1611-1618, 1997.
15. Ambler, Leite MF. Regulation of atrial natriuretic peptide secretion by alpha 1-adrenergic receptors : the role of different second messenger pathways. *J Mol Cell Cardiol*, 26:391-402, 1994.
16. Hattori Y, Gando S, Endou M, *et al*. Characterization of histamine receptors modulating inotropic and biochemical activities in rabbit left atria. *Eur J Pharmacol*, 196:29-36, 1991.
17. 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.
18. Gunther T. Functional compartmentation of intracellular magnesium. *Magnesium*, 5:53-59. 1986.
19. Romani A, Marfella C, Scarpa A. Cell magnesium transport and homeostasis : role of intracellular compartments. *Miner Electrolyte Metab*, 19:282-289, 1993.
20. Velesco D, Guynn RW, Oskarsson M, *et al*. The concentrations of free and bound magnesium in rat tissues. *J Biol Chem*, 248:4811-4819, 1973.
21. Garfinkel L, Garfinkel D. Calculation of free-Mg^{2+} concentration in adenosine 5'-triphosphate containing solutions *in vitro* and *in vivo*. *Biochemistry*, 23:3547-3552, 1984.
22. Murphy E, Steenbergen C, Levy LA, *et al*. Cytosolic free magnesium levels in ischemic rat heart. *J Biol Chem*, 264:5622-5627, 1989.
23. Headrick JP, Willis RJ. Cytosolic free magnesium in stimulated, hypoxic and underperfused rat heart. *J Mol Cell Cardiol*, 23:991-999, 1991.
24. Kulka PJ, Tryba M. Inotropic support of the critically ill patient. A review of the agents. *Drugs*, 45:654-667, 1993.
25. Andersson KE. Adrenergic mechanisms in congestive heart failure. *Acta Med Scand Suppl*, 707:37-44, 1986.
26. Lajer H, Daugaard G. Cisplatin and hypomagnesemia. *Cancer Treat Rev*, 25:47-58, 1999.
27. Wong NLM, Dirks JH. Cyclosporin-induced hypomagnesemia and renal magnesium wasting in rats. *Clinic Sci*, 75:509-514, 1988.
28. Tso EL, Barish RA. Magnesium : clinical considerations. *J Emerg Med*, 10:735-745, 1992.
29. Maguire ME. Hormone-sensitive magnesium transport and magnesium regulation of adenylate cyclase. *Trends Pharmacol Sci*, 5:73-77, 1984.
30. Watanabe J, Nakayama S, Matsubara T, *et al*. Regulation of intracellular free Mg^{2+} concentration in isolated rat hearts via beta-adrenergic and muscarinic receptors. *J Mol Cell Cardiol*, 30:2307-2318, 1998.
31. McNeill JH, Verma SC. Blocked by burimamide of the effects of histamine and histamine analogs on cardiac contractility, phosphorylase activation and cyclic adenosine monophosphate. *J Pharmacol Exp Ther*, 188: 180-188, 1974.
32. Romani A, Scarpa A. Regulation of cell magnesium. *Arch Biochem Biophys*, 298:1-12, 1992.
33. McNeill JH. Histamine and heart. *Can J Physiol Pharmacol*, 62:720-726, 1984.