

흰쥐 hepatocyte에서 알파 및 베타 아드레날린 수용체의 자극에 의한 글리코겐분해에 있어서 칼슘과 니페디핀의 작용

이 영 희 · 김 준 겸 · 김 미 영

중앙대학교 약학대학

(Received December 5, 1988)

Effects of calcium and calcium antagonist nifedipine on the glycogenolysis induced by the stimulation of alpha- and beta-adrenergic receptors in rat hepatocytes

Young Hee Lee, Joon-Kyum Kim and Mie Young Kim

College of Pharmacy, Chung-Ang University, Seoul, 151-756

Abstract—The effects of calcium and calcium antagonist, nifedipine on the adrenergic receptor-stimulated glycogenolysis were investigated in isolated rat hepatocytes. The hepatic glycogenolysis induced by alpha-adrenergic receptor stimulation depended on calcium ions, and beta-adrenergic activation was unrelated to calcium ions. Nifedipine decreased the alpha-adrenergic agonist-induced glucose release significantly and the decrease was depended on calcium ions. The glucose release induced by beta-adrenergic agonist was not inhibited by nifedipine.

흰쥐의 간에서 알파 및 베타 아드레날린 수용체가 글리코겐 분해의 조절에 관여한다는 것은 널리 알려져 있다.^{1,2)} 베타 아드레날린 수용체의 자극에 의한 글리코겐분해 작용은 adenylate cyclase의 활성화로 인한 c-AMP의 증가에 의하여 glycogen phosphorylase를 활성화 함으로써 촉진된다.^{3,4)} 반면에 알파-1 아드레날린 수용체에 의한 효과는 c-AMP계와는 무관하며 세포내의 칼슘이온 농도의 증가에 의하여 일어난다고 알려져 있다.⁵⁻⁷⁾ 알파-1 수용체가 자극이 되면 세포막에 존재하는 인지질인 phosphatidyl inositol 4,5-bisphosphate가 분해되어 diacylglycerol과 inositol 1,4,5-triphosphate가 생성되며,⁸⁾ inositol 1,4,5-triphosphate에 의하여 세포내에 저장되어 있던 칼슘이온이 유리되거나 세포외액에 존재하던 칼슘이온이 세포막을 통하여 유입되어 세포내의 증가된 칼슘이온이 이차전령으로 작용함으로써 글리코겐의 분해가 촉진된다.^{5,9,10)} 알파-1 수용체의 자극에 의한 초기의 작용에는 세

포내에서 유리되는 칼슘이온이 관여하며, 증가된 세포내의 칼슘이온의 농도를 계속 유지하기 위하여 세포막을 통한 칼슘의 유입이 일어난다고 한다.¹¹⁻¹³⁾

일반적으로 칼슘이온이 관여하는 알파-1 아드레날린 수용체의 작용은 베타 수용체의 자극에 의한 세포내 c-AMP의 생성과는 무관한 것으로 알려져 있다.^{14,15)} 그러나 최근의 연구결과에 의하면 c-AMP와 칼슘 매개체 사이에는 어느 정도의 상호 관련성이 있다고 한다. 즉 글루카곤이나 베타 효능제에 의하여 세포내 칼슘이온의 농도가 증가되며¹⁶⁾, 칼슘활성 호르몬인 vasopressin과 angiotensin II가 글루카곤에 의하여 증가된 세포내 c-AMP의 생성을 억제한다고 보고되어 있다.¹⁷⁻¹⁹⁾ 또한 알파-아드레날린 효능제와 글루카곤이 세포내로의 칼슘의 유입에 상승효과를 나타내며, 이는 세포내 c-AMP의 증가에 기인한다고 밝혀져 있다.

이와 같이 세포내의 칼슘이온의 농도가 알파

아드레날린 수용체의 작용 뿐만 아니라 베타 수용체의 자극에 의한 효과에도 영향을 미치고 있다는 여러 연구결과에 따라서 본 연구에서는 흰쥐의 hepatocyte에서 칼슘길항제인 니페디핀을 사용하여 알파 및 베타 아드레날린 수용체의 작용에 관여하는 칼슘의 작용에 대한 연구를 시도하였다.

실험 방법

실험동물—150~170g의 Sprague-Dawley계 흰쥐 암컷을 동일한 조건하에서 10일 이상 고형사료와 식수를 충분히 공급한 후에 사용하였다.

시약—(-)-Epinephrine bitartrate, L-phenylephrine·HCl, DL-isoproterenol·HCl, Collagenase Type IV, Bovine serum albumin, EDTA, EGTA는 Sigma Chemical Company에서 구입하였고 Nifedipine은 한국 Bayer, Glucose-E reagent는 日本 國際試藥의 제품을 사용하였다. 그외의 시약은 시중에서 구입할 수 있는 최고 순도의 것을 사용하였다.

Hepatocyte의 분리—Berry등²⁰⁾의 방법을 개선한 Seglen²¹⁾의 방법에 의하여 세포를 분리하였다. 간을 1mM EGTA를 함유하는 Ca²⁺-free Krebs-Henseleit완충액 (pH, 7.6; NaCl, 120mM; KCl, 5mM; KH₂PO₄, 1.2mM; MgSO₄, 1.2mM; NaHCO₃, 25mM)으로 5분간 관류 시킨후 간을 적출하여 2.5mM CaCl₂, 0.02% collagenase를 함유한 완충액 80ml를 사용하여 유속 40ml/min로 8~10분간 재순환 방법으로 관류하였다. 간을 완충액에서 부드럽게 흔들어 세포가 완전히 분리되게 하고 원심분리(50×g, 1min)와 여과과정을 반복 실시하여 불순물을 제거한 후 2.5% BSA가 함유된 완충액에 분산시켜 30분간 전배양 하였다. 실험에 사용한 모든 액은 95% O₂—5% CO₂가스로 포화시켰다.

세포 생존률은 trypan blue exclusion test에 의하여 판정하였으며 세포 생존률이 90%가 넘는 세포 액만을 사용하였다.

플라스틱 시험관에 세포액 490μl(약 30mg wet weight)을 가하고 효능제 10μl를 가하여 95%

O₂—5% CO₂를 계속 포화시키면서 40분간 배양하였다. 배양액을 원심분리하여 부유액 100μl를 취하여 Glucose oxidase-peroxidase 방법에 의하여 글루코오스의 양을 측정하였다.

실험 결과

페닐에프린과 이소프로테레놀에 의한 글루코오스 유리에 대한 칼슘의 영향—라트에서 분리한 hepatocyte에 있어서 페닐에프린 및 이소프로테레놀은 칼슘(2.5mM)의 존재하에서 글루코오스의 유리를 증가시켰으며, 이소프로테레놀에 의한 베타 수용체의 작용이 페닐에프린에 의한 알파 수용체의 작용보다 크게 나타났다(Fig. 1) 페닐에프린과 이소프로테레놀을 같은 농도로 동시에 가했을 때 각 효능제에 의한 효과보다 증가 되었으나 상승적인 작용은 나타나지 않았다. 칼슘이 존재하지 않을 때 페닐에프린의 경우 칼슘이 존재할 때 보다 글루코오스의 생성이 유의성 있게 감소되었으나 이소프로테레놀의 작용은 전혀 억제되지 않았다(Fig. 1). 두 효능제를 동시에 가했을 때 생성된 글루코오스의 양은 페닐에프린 단독으로 가했을 때와 거의 차이가 없

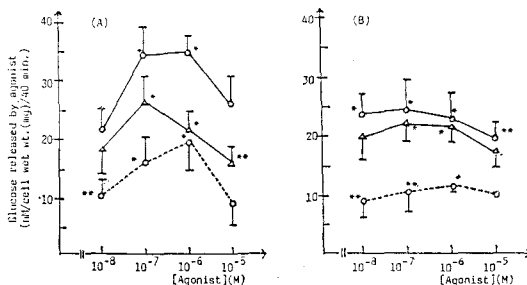


Fig. 1—Effects of alpha- and beta-adrenergic agonists on the hepatic glycogenolysis in Calcium-contained (A) and Calcium-depleted (B) hepatocytes. (○—○) phenylephrine, (△—△) isoproterenol, (□—□) combination of same concentration of phe. and iso. values are means±S.E.M. of duplicate incubation from three separate experiments. Significantly different from the basal glucose release (*p<0.01, **p<0.05)

었다.

페닐에프린과 이소프로테레놀에 의한 글루코오스 유리에 대한 니페디핀의 작용—니페디핀은 페닐에프린에 의한 글루코오스의 생성을 현저하게 억제하였으며 농도—의존적인 효과를 나타내었다(Fig. 2, 3). 이소프로테레놀의 작용에는 거의 영향을 미치지 않았다. 페닐에프린과

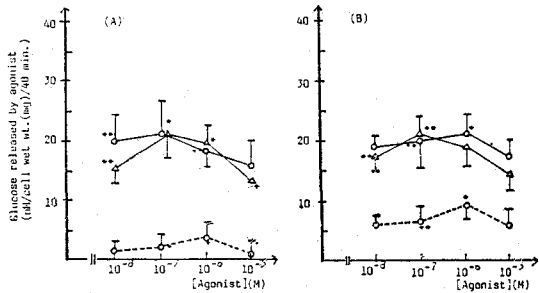


Fig. 2—Effect of nifedipine on the glycogenolytic action of alpha- and beta-adrenergic agonists in calcium-contained (A) and calcium-depleted (B) hepatocytes. Nifedipine ($10^{-5}M$) was added 10min before the addition of agonists. (o...o) phenylephrine (Δ-Δ) isoproterenol (o-o) combination of same concentration of phe. and iso.

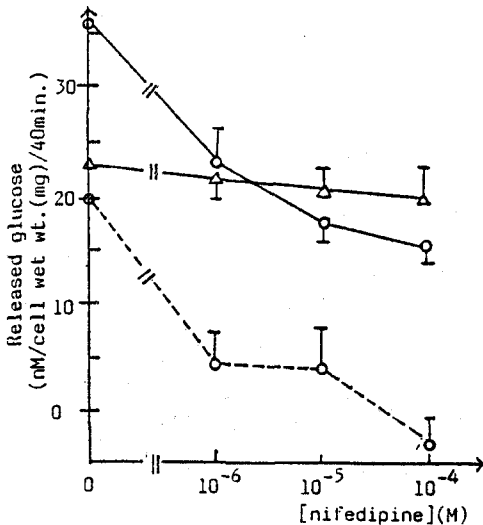


Fig. 3—Dose-response curve of nifedipine on the effects of alpha- and beta-adrenergic agonists in calcium-contained hepatocytes. (o...o) phenylephrine ($10^{-6}M$) (Δ-Δ) isoproterenol ($10^{-6}M$) (o-o) phe. ($10^{-6}M$) + iso. ($10^{-6}M$)

이소프로테레놀의 동시 사용시 니페디핀의 억제 효과는 각 효능제 단독 사용의 경우와 비슷하게 나타났다. 칼슘이 존재하지 않을 때 페닐에프린에 대한 니페디핀의 억제 효과는 현저히 감소되었으나 이소프로테레놀의 작용에는 영향이 없었다(Fig. 2).

효능제에 의한 글루코오스 유리에 있어서 길항제의 작용—알파 길항제인 프라조신과 베타 길항제인 프로프라놀롤은 알파 효능제와 베타 효능제에 대하여 각각 선택적으로 농도—의존적인 억제 작용을 나타내었으며 프라조신과 프로프라놀롤의 작용 모두 칼슘의 존재에 의하여 큰 영향을 받지 않았다(Fig. 4).

고 활

흰쥐에서 분리한 hepatocyte에 있어서 기질을 첨가하지 않고 유리된 글루코오스는 글리코겐의 분해에 의하여 생성된 것이라 할 수 있다.^{22,23} 그림 1에서 나타난 바와 같이 페닐에프린 및 이소프로테레놀에 의하여 글루코오스의 유리가 증가되었으며 이소프로테레놀에 의한 효과가 큰 것으로 나타났다. 일반적으로 흰쥐의 성별, 연령에 따라서 간의 아드레날린 수용체의 종류 및 분포가 달라지며, 수컷보다는 암컷, 그리고 어린 것일수록 베타 아드레날린 수용체의 분포가 많다고 보고된 바 있다.^{23,24} 본 실험에서는 150g 정도의 미성숙 암컷 흰쥐를 사용하였으므로 이소프로테레놀에 의한 효과가 더 크게 나타났다고 할 수 있다. 알파 수용체의 자극에 의한 글루코오스의 유리는 칼슘의 존재시만 현저하게 증가되며(Fig. 1) 칼슘이 존재하지 않을 때는 그 효과가 유의성 있게 감소되었다. 또한 칼슘길항제인 니페디핀에 의하여 글루코오스의 양은 거의 기초량 정도로 감소되었으며 이러한 작용은 칼슘의 존재하에서만 나타났다(Fig. 2). 따라서 페닐에프린에 의한 글리코겐분해 촉진 작용에 있어서 세포내로의 칼슘의 유입이 중요한 역할을 한다는 것을 알 수 있다. 이소프로테레놀의 작용은 칼슘의 존재에 영향을 받지 않았으며 니페디핀에 의해서도 억제를 받지 않는 것으로 나

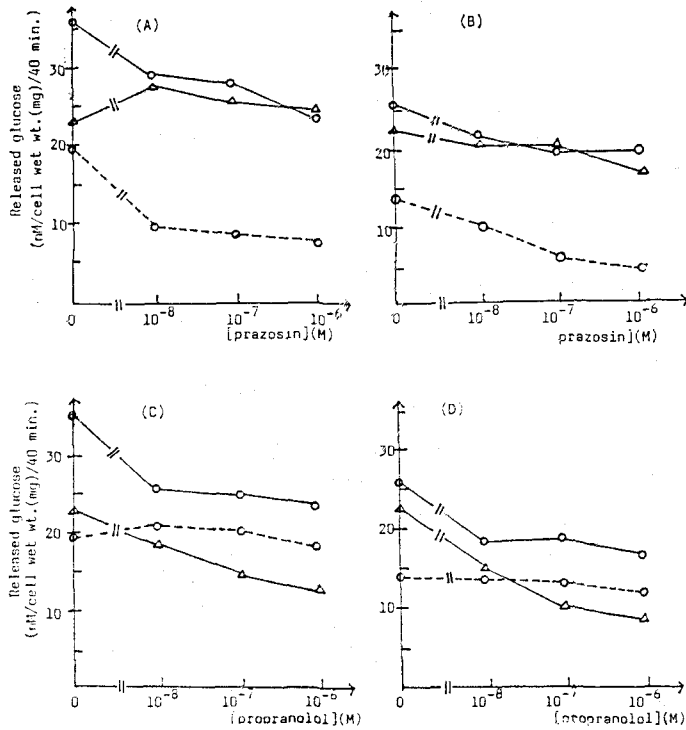


Fig. 4—Effects of alpha- and beta-adrenergic antagonists on the glycogenolysis induced by adrenergic agonists in calcium-contained (A, C) and calcium-depleted (B, D) hepatocytes. (o···o) phenylephrine, (Δ-Δ) isoproterenol (o-o) combination of same concentration of phe. and iso.

타났다. 이와 같은 결과는 c-AMP에 의한 hepatocyte에서의 글리코겐 분해가 칼슘길항제인 verapamil ($10^{-4}M$)이나 diltiazem ($10^{-4}M$)에 의하여 억제되지 않았다는 Blackmore 등²⁵⁾의 결과와 일치하나 perfused liver에서 c-AMP 및 글루카곤에 의한 글리코겐분해가 같은 농도의 verapamil 및 diltiazem에 의하여 억제되었다는 보고²⁶⁾와는 상반된 결과이다. Hepatocyte와 perfused liver에서의 실험결과의 차이에 대한 이유를 명확하게 설명하기 어려우나 Kimura 등^{22,27)}은 hepatocyte를 분리하는 과정에서 세포막의 변화의 가능성을 제시한 바 있다.

최근의 연구결과에 의하면 c-AMP의 증가에 의하여 작용을 나타내는 글루카곤은 세포내 칼슘의 이동을 촉진하는 호르몬인 vasopressin 및 angiotensin II에 의한 세포내 칼슘의 유입을 상승적으로 증가시킨다고 알려져 있다.^{19,28)} 따라

서 본 실험에서 각각 다른 기전에 의하여 글리코겐분해를 촉진하는 두종의 호르몬이 동시에 작용했을 때 글리코겐의 분해가 상승적으로 증가하는가를 알아 보기 위하여 페닐에프린과 이소프로테레놀을 동시에 사용하여 생성된 글루코오스의 양 및 이에 대한 니페디핀의 억제작용을 보았다. 유리된 글루코오스의 양은 증가되었으나 상가적으로 나타났다. 이러한 상가적인 증가가 베타 수용체를 통한 c-AMP에 의한 경로와 알파 수용체에 의한 Ca^{2+} 이 각각 독립적으로 작용하여 나타난 것인지 아니면 c-AMP에 의한 세포내의 Ca^{2+} 이온의 상승적 증가에 의하여 나타난 것인지 알아보기 위하여 칼슘길항제인 니페디핀을 사용한 결과 Fig. 2에서 나타난 바와 같이 니페디핀은 베타 효능제인 이소프로테레놀의 작용에는 전혀 영향을 미치지 않았으며 페닐에프린 단독 및 베타 효능제와 알파 효능제를 동시에

사용했을 때 글루코오스의 유리가 현저하게 억제되었다. 이때 억제된 정도는 두 경우 유의성 있는 차이를 나타내지 않았다. 따라서 알파 수용체와 베타 수용체의 글리코겐분해에 대한 작용은 동시에 자극되었을 경우에도 자기 독립적인 기전에 의하여 일어나며 칼슘은 단지 알파 수용체에 의한 작용에만 관여하며 베타 효능제의 작용과는 무관하다고 할 수 있겠다.

흰쥐의 hepatocyte의 글리코겐 분해에 있어서 칼슘의 작용과 칼슘길항제와의 관련성에 있어서 verapamil이 알파 효능제의 작용을 억제하며 이는 세포막을 통한 칼슘의 유입을 억제하는 것이 아니라 프라조신과 같은 알파 길항제와 같이 동일한 알파 수용체에 대해 직접적으로 억제작용을 나타낸다고 보고된 바 있다.²⁵⁾ 본 연구에서 칼슘길항제 니페디핀의 작용은 칼슘의 존재에 따라서 현저한 변화를 나타내었으나 알파 길항제인 프라조신의 경우에는 Fig. 4에 나타난 바와 같이 칼슘의 존재유무에 영향을 받지 않는다는 사실을 알 수 있다. 따라서 니페디핀은 아드레날린 효능제 중에서 단지 알파 효능제에 의한 작용만을 억제하며 그 작용기전은 알파 길항제와는 다르며, 세포내 칼슘이동과 직접 관련이 있다고 할 수 있다.

결 론

1) Ca^{2+} 은 수용체의 자극이 있는 흰쥐 hepatocyte에서 유리되는 글루코오스의 기초량(basal glucose release)에 크게 영향을 미쳤다.

2) Ca^{2+} 은 알파-수용체 자극으로 유리되는 글루코오스의 양에는 크게 영향을 미쳤으나 베타-수용체의 자극에 의한 작용에는 영향을 미치지 않았다.

3) 니페디핀은 칼슘의 존재시 알파-효능제에 의한 글리코겐분해를 농도 의존성으로 억제하였으나 칼슘이 존재하지 않을 때는 억제효과가 나타나지 않았다.

4) 이소프로테레놀에 의한 글리코겐분해는 니페디핀에 의하여 억제되지 않았다.

5) 알파-수용체와 베타-수용체의 동시 자극에

의한 글리코겐분해에 대한 니페디핀의 억제작용은 알파-수용체만을 자극했을 때와 별다른 차이가 없는 것으로 보아 베타-효능제에 의한 글리코겐분해는 세포내 칼슘과 관련이 없는 것으로 사료된다.

6) 알파 및 베타-효능제의 작용에 대한 각 길항제의 억제 효과는 농도 의존성으로 나타났으며 칼슘의 존재 유무에 유의성 있는 차이는 나타나지 않았다.

감사의 말씀—이 논문은 1987년도 교내학술연구비에 의하여 연구되었으며 이에 감사 드립니다.

문 헌

- 1) Morgan, N.G., Shuman, E.A., Exton, J.H. and Blackmore, P.F.: Stimulation of hepatic glycogenolysis by α_1 - and β_2 -adrenergic agonists J. Biol. Chem. 257, 13907-13910 (1982).
- 2) Exton, J.H. and Park, C.R.: Control of gluconeogenesis in liver; Effects of glucagon, catecholamines and adenosin 3',5'-monophosphate on gluconeogenesis in the perfused rat liver. J. Biol. Chem. 243, 4189-4196 (1968).
- 3) Rall, T.W.: Role of adenosine 3',5'-monophosphate (cyclic-AMP) in activation of catecholamines. Pharmacol. Rev. 24, 399-410 (1972).
- 4) Greengard, P.: Phosphorylated proteins as physiological effects. Sci. 199, 146-152 (1978).
- 5) Kunos, G.: The hepatic α_1 -adrenoceptor. TIPS 380-383 (1984).
- 6) Kneer, N.M., Wagner, M.J. and Lardy, H.A.: Regulation by calcium of hormonal effects on gluconeogenesis. J. Biol. Chem. 254, 12160-12168 (1979).
- 7) Blackmore, P.F., Dehaye, J.P. and Exton, J.H.: Studies on α -adrenergic activation of hepatic glucose output; The role of mitochondrial calcium release in α -adrenergic activation of phosphorylase in perfused rat liver. J. Biol. Chem. 254, 6945-6950 (1979).
- 8) Tolbert, E.M., White, A.C., Aspry, K., Cutts, J. and Fain, J.N.: Stimulation by vasopressin

- and α -catecholamines of phosphatidyl inositol formation in isolated rat liver parenchymal cells. *J. Biol. Chem.* **255**, 1938-1944 (1980).
- 9) Fain, N.J. and Garcia-Sainz, J.A.: Role of phosphatidyl inositol turnover in alpha-1 and of adenylate cyclase inhibition in alpha-2 effects of catecholamines. *Life Sci.* **26**, 1183-1197 (1980).
 - 10) Hutson, N.J., Brumley, F.T., Assimakopoulos, F.D., Harper, S.C. and Exton, J.H.: Studies on the α -adrenergic activation of hepatic phosphorylase and gluconeogenesis and inactivation of glycogen synthase in isolated rat liver parenchymal cells. *J. Biol. Chem.* **251**, 5200-5208 (1976).
 - 11) Reinhart, P.H., Taylor, W.M. and Bygrane, F.L.: The contribution of both extracellular and intracellular calcium to the action of α -adrenergic agonists in perfused rat liver. *Biochem. J.* **220**, 35-42 (1982).
 - 12) Charest, R., Prpic, V., Exton, J.H. and Blackmore, P.F.: Stimulation of inositol triphosphate formation in hepatocytes by vasopressin, adrenaline and angiotensin II and its relationship to changes in cytosolic free Ca^{2+} . *Biochem. J.* **227**, 79-90 (1985).
 - 13) Morgan, N.G., Blackmore, P.F. and Exton, J.H.: Modulation of the α_1 -adrenergic control of hepatocyte calcium redistribution by increases in cyclic-AMP. *J. Biol. Chem.* **258**, 5110-5116 (1983).
 - 14) Blackmore, P.F., Brumley, F.T., Marks, J.L. and Exton, J.H.: Studies on α -adrenergic activation of hepatic glucose output; Relationship between α -adrenergic stimulation of calcium efflux and activation of phosphorylase in isolated rat liver parenchymal cells. *J. Biol. Chem.* **253**, 4851-4858 (1978).
 - 15) Assimakopoulos, F.D., Blackmore, P.F. and Exton, J.H.: Studies of the interaction between glucagon and α -adrenergic agonists in the control of hepatic glucose output. *J. Biol. Chem.* **257**, 3759-3765 (1982).
 - 16) Charest, R., Blackmore, P.F., Berthon, B. and Exton, J.H.: Changes in free cytosolic Ca^{2+} in hepatocytes following α_1 -adrenergic stimulation. *J. Biol. Chem.* **258**, 8769-8773 (1983).
 - 17) Crane, J.K., Campanile, C.P. and Garrison, J.C.: The hepatic angiotensin II receptor.; Effect of guanine nucleotides and interaction with cyclic-AMP production. *J. Biol. Chem.* **257**, 4959-4965 (1982).
 - 18) Keppens, S. and Wulf, H.D.: Vasopressin and angiotensin control the activity of liver phosphodiesterase. *Biochem. J.* **222**, 277-280 (1984).
 - 19) Mauger, J.P., Poggioli, J. and Claret, M.: Synergistic Stimulation of the Ca^{2+} -influx in rat hepatocytes by glucagon and the Ca^{2+} -linked hormones vasopressin and angiotensin II. *J. Biol. Chem.* **260**, 11635-11642 (1985).
 - 20) Berry, M.N. and Friend, D.S.: High yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells. *J. Cell Biol.* **43**, 506-520 (1969).
 - 21) Seglen, P.O.: Preparation of isolated rat liver cells. *Methods Cell Biol.* **13**, 29-83 (1976).
 - 22) Kimura, S., Mutsumoto, T., Tada, R., Ogata, E. and Abe, K.: Inhibition by calcium channel blockers of the glycogenolytic effect of glucagon in perfused rat liver. *Acta. Endocrinol.* **99**, 559-566 (1982).
 - 23) Studer, P.K. and Andre, B.B.: Difference between male and female rats in the regulation of hepatic glycogenolysis. *J. Biol. Chem.* **257**, 7987-7993 (1982).
 - 24) Morgan, N.G., Blackmore, P.F. and Exton, J.H.: Age-related change in the control of hepatic cyclic-AMP levels by α_1 - and β_2 -adrenergic receptors in male rats. *J. Biol. Chem.* **258**, 5103-5109 (1983).
 - 25) Blackmore, P.F., El-Refai, M.F. and Exton, J.H.: α -adrenergic blockade and inhibition of A23187 mediated Ca^{2+} -uptake by the calcium antagonist verapamil in rat liver cells. *Mol. Pharmacol.* **15**, 598-606 (1978).
 - 26) Saikawa, T., Nagamoto, Y. and Arita, M.: Electrophysiologic effect of diltiazem, a new slow channel inhibition on canine cardiac fibers. *Jpn. Heart J.* **18**, 235-245 (1977).
 - 27) Kimura, S., Koide, Y., Tada, R., Abe, K. and

- Ogata, E.: Inhibitory effect of calcium channel blocker on α -adrenergic activation of glycogenolysis and calcium efflux in perfused rat liver. *Endocrinol. Jpn.* 28, 69-78 (1981).
- 28) Poggioli, J., Manger, J.P. and Claret, M.: Effect of cyclic AMP-dependent hormones on the Ca^{2+} -influx and polyphosphoinositide metabolism in isolated rat hepatocytes. *Biochem. J.* 235, 663-669 (1986).