

흰쥐에서 ATP 결핍에 의한 혈중 Mg^{2+} 농도조절

김상진 · 백성수 · 심소연 · 오성숙 · 김진상

전북대학교 수의과대학
(2000년 4월 15일 게재승인)

Regulation of circulating Mg^{2+} concentration in rats by ATP depletion

Shang-jin Kim, Sung-soo Baek, So-yeon Shim, Sung-suck Oh, Jin-shang Kim

College of Veterinary Medicine, Chonbuk National University

(Accepted by Apr 15, 2000)

Abstract : Since intracellular free Mg^{2+} ($[Mg^{2+}]_i$) appears to be tightly regulated following cellular energy depletion, we hypothesized that the increase in $[Mg^{2+}]_i$ would result in Mg^{2+} extrusion into circulation. Extracellular Mg^{2+} contents ($[Mg^{2+}]_o$) were measured in rat erythrocytes, the perfused heart and liver, and plasma in the anesthetized rat. Animals were injected intraperitoneally with sodium nitrite ($NaNO_2$) and plasma Mg^{2+} was measured after the injection and then 10 and 20 minutes later. An increase in circulating (plasma) Mg^{2+} ($[Mg^{2+}]_c$) and methemoglobin was observed in animals injected with $NaNO_2$ (30 mg/Kg). The time course of the effects demonstrated that $[Mg^{2+}]_c$ and methemoglobin continued to increase 10 minutes after the $NaNO_2$ injection. Under these conditions, there was a sustained increase in $[Mg^{2+}]_c$, but not in methemoglobin, which was inhibited by pretreatment with potassium cyanide (KCN, 4 mg/Kg), indicating that an increase in $[Mg^{2+}]_c$ was accompanied by ATP depletion. Injection of rotenone (0.9 mg/Kg) or 2,4-dinitrophenol (15 mg/Kg) also induced an increase in $[Mg^{2+}]_c$. Reduced respiration rate from 100/min to 10/min during 30 minutes also caused a time-dependent rise in $[Mg^{2+}]_c$. These increase in $[Mg^{2+}]_c$ were inhibited by pretreatment with KCN. In addition, ATP depletion by $NaNO_2$ or KCN sustainedly increased the $[Mg^{2+}]_o$ in rat erythrocytes. Mg^{2+} efflux was stimulated by KCN in the perfused heart and liver, but not by $NaNO_2$. These results suggest that the activation of Mg^{2+} effluxes into the circulation is directly dependent on the ATP depletion-induced increase in $[Mg^{2+}]_i$ and heart, liver and erythrocytes have a major pool of Mg^{2+} that can be mobilized upon cellular energy state.

Key words : magnesium, ATP depletion, sodium nitrite, erythrocytes.

유리형 $[Mg^{2+}]_i$ 은 심장기능에 중요한 조절자이며¹⁻⁴ Mg^{2+} 은 심장 sarcoplasmic reticulum(SR)에서 Ca^{2+} 유리를 조절한다³. 특히 심장질환이 Mg^{2+} 농도감소와 관련⁵되며 저산소증이나 허혈은 ATP 결핍, 세포내 또는 mitochondria내 Ca^{2+} 증가, 세포막 지질 파괴 및 자유 radical을 형성함으로써 세포손상을 일으킨다^{6,7}. 저산소증이나 허혈이 직접적으로 세포손상을 일으킬 수 있지만 ATP 결핍에 의한 유리형 $[Mg^{2+}]_i$ 이 증가하여 세포밖으로 Mg^{2+} 이 유출된다면 이는 $[Mg^{2+}]_i$ 농도감소에 의한 Ca^{2+} 의 작용이 강화되어 세포손상이 일어날 가능성도 크다. 대부분의 $[Mg^{2+}]_i$ 은 다른 adenine nucleotide나 inorganic phosphate보다 ATP와 결합력이 더 크기 때문⁸에 생체내 ATP 감소는 $[Mg^{2+}]_i$ 농도를 크게 변동시켜 생체의 생리적 기능에 영향을 미친다. 따라서 $[Mg^{2+}]_i$ 와 $[Mg^{2+}]_o$ 농도는 심장질환의 지표가 될 만큼 중요하다.

저산소증시 ATP 결핍은 ATP 의존성 이온전달계를 억제하여 세포내 이온농도를 변동시키거나 세포막의 투과성을 변형시킬 수 있다. 여러 조직 및 세포에서 ATP 결핍으로 $[Mg^{2+}]_i$ 농도증가가 관찰되었다는 보고^{6,9}는 많지만 세포외로의 유출에 대한 보고가 없을 뿐만 아니라 최근 화학물질에 의한 저산소증시 $[Mg^{2+}]_o$ 농도증가가 methemoglobin(Met-Hb) 혈증과 관련¹⁰되고 $[Mg^{2+}]_o$ 농도가 호르몬 자극(수용체 경유)에 의해 증가되어¹¹ 조직 및 세포에서 Mg^{2+} 농도가 증가되었을 때 호르몬 자극에 의해 더 많은 Mg^{2+} 이 유리될 수 있다는 결과^{12,13}를 뒷받침하였다. 또한 생체에서 ATP 결핍에 의한 $[Mg^{2+}]_o$ 농도증가는 조직 또는 세포로부터 Mg^{2+} 의 유리와 일치할 수 있기 때문에 ATP를 변동시킬 수 있는 생리적 조건에 따라 세포내·외의 Mg^{2+} 이 조절될 수 있다. 따라서 유리형 $[Mg^{2+}]_i$ 이 ATP 결핍으로 증가한다는 연구보고^{7,9}와 대사 억제 또는 저산소증시 $[Mg^{2+}]_o$ 이 증가되었다는 보고¹⁰를 근거로 ATP 결핍에 의한 $[Mg^{2+}]_o$ 증가 사실을 증명하고 ATP 결핍시 Mg^{2+} 이 유리될 수 있는 부위를 알아보고자 하였다. 따라서 *in vivo* 상태의 흰쥐에서 순환 혈액내 Mg^{2+} ($[Mg^{2+}]_c$) 유리에 대한 Met-Hb 혈증 또는 hypoxia와 산화적 인산화 억제의 관계를 규명하고 적혈구 및 관류심장과 간에서 ATP 결핍시 Mg^{2+} 농도변동에 대해 알아보기 위하여 이 연구를 실시하였다.

흰쥐에서 혈액채취와 혈장분리 : 흰쥐(Sprague-Dawley, 200~250g)를 실험 90분전에 pentobarbital sodium(30mg/kg)을 복강내 투여하여 마취하고 약 30분동안 안정시킨 후 대퇴동맥에 cannula를 삽입하여 반복적인 채혈이 용이하도록 하였다. Cannula에 heparin(1000IU/ml)이 함유된 생리식염수를 채워서 혈액응고를 억제하였다. 원활한 산소공급을 위해 trachea에 catheter를 삽입하고 rodent ventilator(Harvard, USA)로 호흡수 및 호흡량 등을 조절하였으며, 약물은 대퇴정맥이나 복강내로 투여하였다. 채혈은 약물투여 10분 전부터 실시하여 매 10분 간격으로 실시하였으며(약물투여 시간은 실험결과에서 0 min으로 표기), 약물투여전 채취한 혈액을 대조액으로 사용하였다.

약 0.3ml를 채혈하여 일부(약 200 μ l)는 Met-Hb의 측정에 사용하였으며 나머지는 즉시 heparin(1000IU/ml)을 가한 eppendorff centrifuge tube(1.5ml)에 담아 14,000rpm으로 5분간 원침하여 혈장을 얻었다. 얻은 혈장 50 μ l를 1.5 ml의 10% nitric acid 용액에 혼합하여 10분간 실온에서 방치한 후 침전(1,500rpm, 10분)시켜 혈장내의 protein 등을 제거하고 상층액을 취하였다.

심장적출 및 관류액 채취 : 흰쥐를 두부타격후 심장을 적출하여 4 $^{\circ}$ C의 산소 포화영양액(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 $^{\circ}$ C, 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(Fig에서 1분으로 표시하였음) 관류된 영양액을 1분 간격으로 채취하였고 약물은 관류액 채취 10분 후부터 관류용액에 적정농도로 첨가하여 약 10분간 관류시켰으며 약물의 관류시간은 조건에 따라 변동시켰다.

적혈구 배양 및 약물처리 : 마취한 흰쥐에서 약 5ml 가량의 혈액을 채취하여 1,000g에서 10분간 원심분리하여 적혈구를 얻었다. 적혈구는 150mM KCl 용액으로 2회 세척한 후에 적혈구 20%가 되도록 KCl- $MgCl_2$ 영양액

(140mM KCl, 50mM sucrose, 5mM glucose, 30mM HEPES-Tris, 1.2mM MgCl₂, 37°C, pH 7.4, 95% O₂, 5% CO₂)을 첨가하여 30분간 배양하였다. 배양후 1% BSA를 첨가하고 동일조건하에서 10분간 배양하였다. 배양된 적혈구 5ml를 취하여 sucrose 영양액(350mM sucrose, 5mM glucose, 30mM HEPES-Tris)으로 2~3회 세척(3,000rpm, 10분)하였다. 그 후 시험관에 적혈구가 10%로 부유될 수 있도록 sucrose 영양액을 첨가하여 10ml이 되도록 하여 배양하였다. 지속적으로 배양이 되고 있는 시험관으로부터 적혈구를 각각 1ml씩 3분 간격으로 취하고 약물은 배양후 3분부터 투여하였다. 배양액은 10,000rpm에서 2분간 원심분리 후 상층액 1.5ml를 취하여 sucrose 영양액으로 총량이 3ml이 되도록 희석하여 Mg²⁺를 측정하였다.

시료에서 Mg²⁺ 농도 측정 : 상기의 방법에 의해 채취한 상층액 및 관류액내 Mg²⁺ 농도는 atomic absorption spectrophotometer(AnaLab 9200A, Korea)를 이용하여 파장 285.2 nm에서 측정하였다.

혈중 Met-Hb 측정 : Met-Hb 측정은 Evelyn과 Malloy¹⁴의 방법에 의해서, 채혈된 200 μl의 혈액을 5% PBS 9.8 ml에 가하여 잘 혼합하고 이 혼합액을 편의상 각각 A액 그리고 B 액으로 5ml씩 나눴다. A액과 2.5% K₃Fe(CN)₆ 용액을 20 μl 첨가한 B액에서 spectrophotometer(Milton Roy, USA)를 이용하여 630nm에서 흡광도를 측정하였으며, 이 값들을 각각 A₁ 및 B₁이라고 하였다. A₁ 및 B₁ 액에 각각 20 μl의 2% KCN을 가하여 잘 혼합한 후 30분간 실온에 방치한 후 이 용액들을 같은 방법으로 흡광도를 측정하여 이 값들을 A₂ 및 B₂라고 하였다. 이렇게 측정된 흡광도를 Met-Hb(%) = A₁-A₂/B₁-B₂ × 100의 공식에서 Met-Hb 농도를 산출하였다.

사용약물 및 통계처리 : Rotenone, 2,4-dinitrophenol(2,4-D), potassium cyanide(KCN), heparin 및 sodium nitrite(NaNO₂) 등을 Sigma Co.로부터 구입하여 사용하였다. 실험성적은 Mean ± SEM으로 나타냈고, 각 군간의 유의성 검정은 Student's *t*-test에 의해 분석하였다.

결 과

NaNO₂ 및 KCN이 [Mg²⁺]_c 농도에 미치는 영향 : NaNO₂는 methemoglobin 혈증을 일으켜 저산소증에 의한 ATP 결핍을 초래하며 KCN 역시 전자전달계를 억제하여 산화적 인산화 억제(state 3 respiration)로 ATP 결핍을

일으킨다. Fig 1에서 보는 바와 같이 NaNO₂(30mg/kg)를 복강주사했을 때 시간에 따라 [Mg²⁺]_c 농도가 현저히 증가하였고 이러한 증가효과가 KCN(4mg/kg) 전처치에 의하여 차단되었다. KCN 자체에 의해서도 [Mg²⁺]_c 농도는 증가(자료 미제시)하였다는 결과에 의하면 KCN 전처치에 의해 이미 ATP가 결핍되었기 때문에 NaNO₂에 의해서 더 이상의 Mg²⁺ 유리가 되지 않았으므로 추측된다.

KCN이 NaNO₂에 의한 Met-Hb 혈증에 미치는 영향 : NaNO₂(30mg/kg)를 투여했을 때 시간에 따라 Met-Hb가 현저히 증가하였고 이러한 NaNO₂에 의한 Met-Hb 증가효과는 KCN에 의해 영향을 받지 않았다(Table 1). 따라서 Fig 1에서 보는 바와 같이 NaNO₂에 의한 [Mg²⁺]_c 농도 증가는 Met-Hb 혈증에 의한 결과이며 KCN은 Met-Hb 혈증에 영향을 미치지 않고 단지 ATP를 결핍시켜 Mg²⁺ 유리에 영향을 미치는 것으로 추측된다.

산화적 인산화 억제제에 의한 Mg²⁺ 유리효과에 미치는 KCN의 영향 : 또 하나의 전자 전달억제제인 rotenone이나 짙플림제인 2,4-D에 의한 [Mg²⁺]_c 증가에 대한 KCN의 효과를 관찰하였다. Rotenone(900μg/Kg, I.P.) 역시 [Mg²⁺]_c 농도를 증가시켰으며 이러한 증가효과가 4mg KCN 전처치에 의하여 억제되었다(Fig 2). 또한 2,4-D(15mg/Kg)

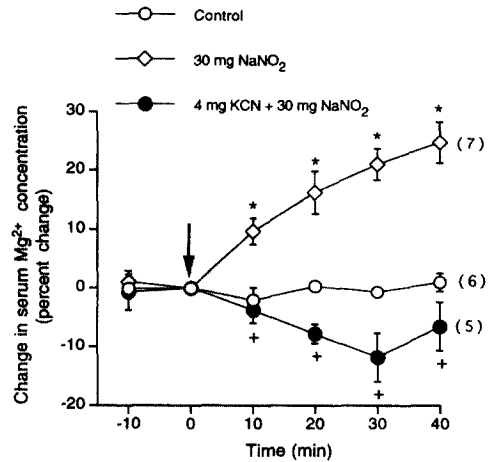


Fig 1. Changes in [Mg²⁺]_c induced by injection of sodium nitrite in the absence (◇) or presence (●) of potassium cyanide (KCN) pretreatment (I.P.). Arrow indicates the time of injection of sodium nitrite (NaNO₂, I.P.). The number in parenthesis are experimental numbers. Data are expressed as mean ± SEM. *Significant difference (p < 0.05) from 0 minute values. *Significant difference (p < 0.01) from corresponding values with the 30mg NaNO₂ time points.

Table 1. Influences of potassium cyanide (KCN) on the sodium nitrite (NaNO_2)-induced methemoglobinemia in the anesthetized rats

Agents	Methemoglobin concentration (%)					
	Time (min after NaNO_2 injection)					
	-10	0	10	20	30	40
Control	3.65±0.42	3.83±0.43	3.98±0.61	4.33±0.55	4.24±0.50	3.99±0.64
30mg NaNO_2	3.32±0.13	3.40±0.16	9.89±1.95*	14.05±13.1**	19.42±1.61**	22.42±1.99**
4mg KCN+ 30mg NaNO_2	3.14±0.19	3.63±0.17	9.83±1.49	13.46±1.59	18.27±2.02	21.43±2.14

Data are expressed as mean±SEM. Significant difference(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$) from corresponding values with the control time points.

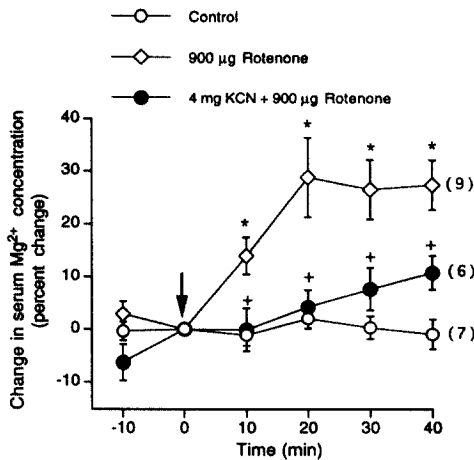


Fig 2. Changes in $[\text{Mg}^{2+}]_c$ induced by injection of rotenone in the absence (\diamond) or presence (\bullet) of KCN pretreatment (I.P.). Other legends are the same as in Fig 1. *Significant difference ($p < 0.05$) from 0 minute values. *Significant difference ($p < 0.05$) from corresponding values with the 900 μg rotenone time points.

도 $[\text{Mg}^{2+}]_c$ 농도를 시간에 따라 증가시켰으며 이러한 증가효과가 KCN의 전처치에 의하여 억제되었다(Fig 3).

KCN이 호흡수 감소에 의한 $(\text{Mg}^{2+})_c$ 농도증가에 미치는 영향 : 마취한 흰쥐에 직접적으로 호흡수를 감소시킬 때 $[\text{Mg}^{2+}]_c$ 농도는 유의성 있게 증가하였고 다시 정상 호흡수로 전환하였을 때 $[\text{Mg}^{2+}]_c$ 농도는 회복되었다. 이러한 호흡량 감소에 의한 $[\text{Mg}^{2+}]_c$ 농도증가 효과가 KCN(4mg/Kg) 전처치에 의하여 현저히 억제되었다(Fig 4). 따라서 상기 모든 결과에 의하면 ATP를 결핍시킬 수 있는 모든 조건으로 $[\text{Mg}^{2+}]_c$ 농도가 증가할 수 있다고 사료된다.

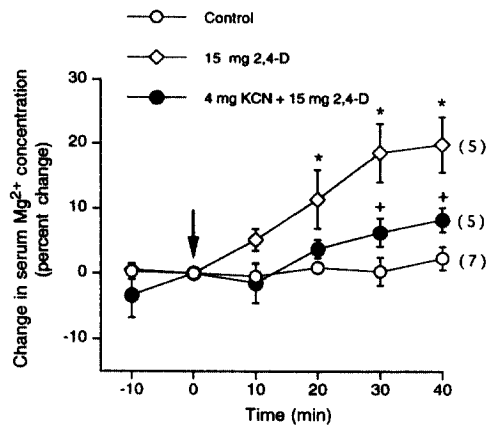


Fig 3. Changes in $[\text{Mg}^{2+}]_c$ induced by injection of 2,4-D in the absence (\diamond) or presence (\bullet) of KCN pretreatment (I.P.). Other legends are the same as in Fig 1. *Significant difference ($p < 0.05$) from 0 minute values. *Significant difference ($p < 0.05$) from corresponding values with the 15mg 2,4-D time points.

흰쥐 적혈구에서 NaNO_2 와 KCN이 Mg^{2+} 유리에 미치는 영향 : 시험관내에서 흰쥐 적혈구에 NaNO_2 및 KCN을 처치하였을 때 배양액내 Mg^{2+} 농도는 현저히 증가하였으며(Fig 5), 이 실험후 적혈구를 nitric acid(10%)로 파괴하여 적혈구내 총 Mg^{2+} 농도를 측정한 결과 시간에 따라 감소하였음을 관찰(자료 미제시)하여 상기 두 약물에 의하여 Mg^{2+} 이 유리됨을 관찰하였다.

관류심장 및 간에서 KCN 또는 NaNO_2 가 Mg^{2+} 유리에 미치는 영향 : 생체에서 ATP 감소에 의해서 증가된 $[\text{Mg}^{2+}]_c$ 은 각종 장기로부터 유리될 수 있다. Fig 5에서 처럼 적혈구로부터 유리될 수 있고, 심장 및 간과 같은 실질장

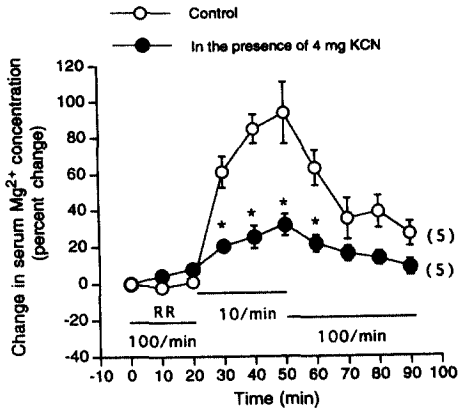


Fig 4. Changes in $[Mg^{2+}]_e$ induced by respiratory hypoxia in the absence (\diamond) or presence (\bullet) of KCN pretreatment (I.P.). Respiratory rate(RR) was reduced at 20 min from 100/min to 10/min and returned to 100/min at 50/min in the anesthetized rat. The number of parenthesis are experimental numbers. Data was expressed as mean \pm SEM. *Significant difference ($p < 0.05$) from corresponding values with the control time points.

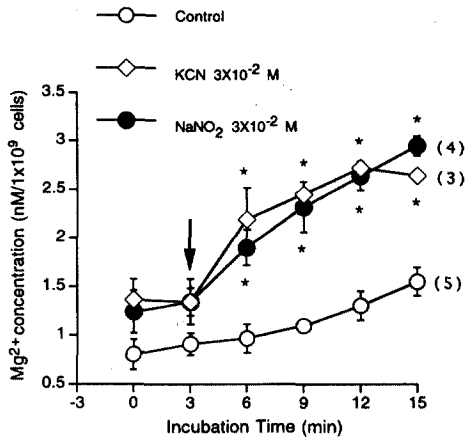


Fig 5. Changes in $[Mg^{2+}]_e$ induced by administration of potassium cyanide (\diamond) or sodium nitrite (\bullet) of incubated rate erythrocytes. Data are expressed as mean \pm SEM. *Significant difference ($p < 0.01$) from corresponding values with the control time points.

기로부터 유리될 수 있다. Fig 6(panel A)에서 보는 바와 같이 관류심장과 간에서 2mg KCN에 의하여 Mg^{2+} 이 유리되었음을 관찰할 수 있었다. 그러나 관류심장과 간에서 $NaNO_2$ 자체에 의하여 Mg^{2+} 유리는 일어나지 않았다 (Fig 6B). 따라서 $NaNO_2$ 는 단지 혈액이나 생체에서 Met-

Hb 혈중을 일으켜 ATP를 결핍시킴으로써 Mg^{2+} 을 유리시킬 수 있음을 알 수 있다.

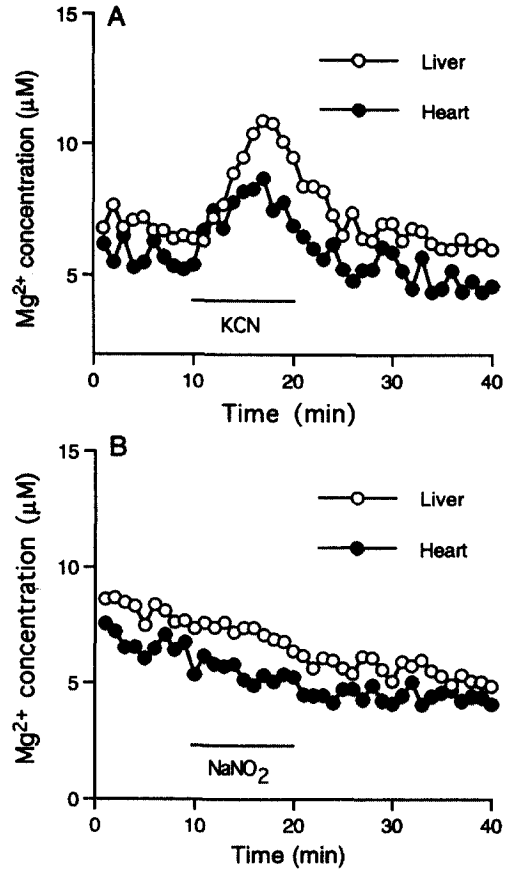


Fig 6. Effects of KCN ($3 \times 10^{-2} M$, A), $NaNO_2$ ($3 \times 10^{-2} M$, B) on Mg^{2+} release in the perfused rat heart (\bullet) and liver (\circ). The heart and liver were perfused with the KCN or $NaNO_2$. One experiment typical of three to five both for the KCN and $NaNO_2$ stimulated hearts and livers is shown.

고 찰

고농도 Mg^{2+} 은 항 부정맥제로 작용할 수 있다는 보고¹⁵와 ischemia시 세포내 Ca^{2+} 의 증가로 부정맥이 발생되며 심근경색 및 허혈심장에서 $[Mg^{2+}]_e$ 을 증가시켰을 때 부정맥을 억제하고¹⁶⁻¹⁸, Mg^{2+} 는 Ca^{2+} 에 대해 길항제로 작용할 수 있다는 보고로 미루어 보아 세포내 유리형 Mg^{2+} 의 증가는 세포내 Ca^{2+} 증가에 대해 길항작용을 할 수 있다. 그래서 ischemia 및 hypoxia시 유리형 $[Mg^{2+}]_e$ 의 증가

는 초기에 부정맥을 억제하여 심근세포 및 심장을 보호할 수 있는 기전으로 추측된다. 이러한 세포내에 존재하는 90% 이상의 Mg^{2+} 이 ATP와 결합하고 있기 때문에⁸ 세포독성학적으로 세포내 ATP가 감소되는 상태 즉, ischemia, hypoxia 및 cyanide와 같은 화학적 대사억제시 유리형 $[Mg^{2+}]_i$ 가 증가될 수 있다^{6,7,9}. 많은 Mg^{2+} 이 세포질 및 소기관에서 ATP와 결합하고 있기 때문에 ATP 감소시 유리형 Mg^{2+} 이 증가될 수 있어 최근 저자 등¹⁰은 소기관내 또는 세포밖으로 Mg^{2+} 이 재분포될 수 있음을 추론하고 화학적 대사억제 또는 호흡억제에 의한 $[Mg^{2+}]_i$ 농도증가를 보고한 바 있다. 세포내 cytochrome oxidase를 억제하는 cyanide 중독시 세포내 ATP는 현저히 감소할 것이고 유리형 $[Mg^{2+}]_i$ 은 증가될 것이다. 세포독성에 의한 ATP 감소가 유리형 $[Mg^{2+}]_i$ 을 현저히 증가시켰고 유리형 Mg^{2+} 은 결합형 Mg^{2+} 보다 세포막 통과가 잘되어 $[Mg^{2+}]_i$ 을 증가시킬 것이다. 이 실험에서 유리형 $[Mg^{2+}]_i$ 을 측정할 수 없었으나 ischemic 심장에서 31P NMR spectroscopy를 이용하여 ATP 감소를 확인한 바 있고⁶, 최근 Kim과 Scarpa¹⁹는 NaCN 투여 1분 이내에 약 80%의 ATP가 감소되어 유리형 $[Mg^{2+}]_i$ 이 증가되고 이러한 유리형 Mg^{2+} 의 증가는 호르몬 자극에 의해 세포외로 유리될 수 있다고 하였다. 따라서 ATP 결핍에 의한 $[Mg^{2+}]_i$ 농도증가 현상을 증명하고 ATP 결핍시 혈중으로 유리되는 부위를 확인하고자 하였다.

세포질내 ATP는 Mg^{2+} 완충계 역할을 함으로 총 ATP 농도변동은 $[Mg^{2+}]_i$ 농도에 영향을 미칠 것이다. 특히 심장세포에서 높은 ATP 농도 때문에 $[Mg^{2+}]_i$ 이 완충된다고 한다²⁰. 총 ATP 농도감소가 ischemia나 hypoxia에서 일어나며 Mg^{2+} 결합감소로 $[Mg^{2+}]_i$ 농도증가 요인이 된다²¹. 즉, 세포호흡의 억제는 유리형 $[Mg^{2+}]_i$ 의 증가를 일으키고 이러한 유리형 Mg^{2+} 의 증가는 세포외로의 Mg^{2+} 유동에 관여하는 것으로 알려져 있어 세포호흡의 억제와 $[Mg^{2+}]_i$ 농도와 관계를 규명할 필요가 있다. 실험적으로 mitochondria에서 세포질내로의 Mg^{2+} -ATP²의 유동이 $[Mg^{2+}]_i$ 농도를 증가시킬 수 있음을 보고한 바 있다^{13,22}. 그러나 ATP는 단지 $[Mg^{2+}]_i$ 농도변동을 초래하는 한정된 한 기구일 뿐이다. 다른 세포막 수송계, mitochondria에 의한 유입/유리 및 SR에 의한 유리/유입 같은 기구도 고려해야 하기 때문이다. ATP 생성기구인 mitochondria는 $[Mg^{2+}]_i$ 의 주요 저장소로 알려져 있다. 심장과 간 mitochondria에서 단백질 mg당 20~30mM 정도라고 한다²³.

그래서 mitochondria는 Mg^{2+} 를 세포 소기관에 저장하거나 유리시킬 수 있어서 기질내 유리형 Mg^{2+} 농도는 Mg^{2+} 유동에 따라 달라질 수 있다²⁴. 또한 H^+ 농도차나 막전위가 FCCP(carbonyl cyanide p-trifluoromethoxyphenylhydrazone) 또는 다른 짝폴립체에 의하여 없어졌을 때 mitochondria 내 Mg^{2+} 농도가 농축된다는 보고²⁵에 의하여 mitochondria Mg^{2+} 전달을 위한 proton 역할의 중요성이 강조되었다. 역시 간세포²⁵나 sublingual mucous acini²⁶에서 FCCP로 산화적 인산화 억제시 세포질내 유리형 Mg^{2+} 이 증가한다는 사실은 mitochondria의 Mg^{2+} 항상성을 위한 막전위의 중요성을 말해준다. Romani *et al*²²도 역시 cAMP에 의해 흰쥐 간과 심장 mitochondria에서 rotenone 존재하에서 Mg^{2+} 을 유리시키고 Mg^{2+} 이 제거된 실험용액에 mitochondria를 배양했을 때 Mg^{2+} 유리가 일어난다고 하여 주요 Mg^{2+} 저장소임을 확인하였다. 역시 atractyloside와 같은 adenine nucleotide translocase 억제제에 의해서 Mg^{2+} 유리가 억제되어 mitochondria에서 Mg^{2+} 유출에 ADP/ATP carrier의 관련성을 보고하였다¹³. 이러한 상기 결과들을 종합하면 ATP 생산 및 농도는 생체내 Mg^{2+} 조절에 직접적으로 관련됨을 알 수 있다. 이 연구에서는 $NaNO_2$, rotenone, 2,4-D, 및 호흡억제에 의한 $[Mg^{2+}]_i$ 농도증가 효과가 있어서 상기 모든 상태는 궁극적으로 ATP 결핍을 일으킬 수 있음을 고려할 때 ATP와 Mg^{2+} 조절과의 관계는 밀접하며, 상기 조건에 의한 $[Mg^{2+}]_i$ 농도증가가 KCN 존재하에서 억제됨을 보여 KCN과 상기 조건들이 모두 같은 기전에 의하여 Mg^{2+} 를 조절하고 있음을 알 수 있다. 즉, KCN으로 ATP를 고갈시킨 상태에서 반복된 ATP 고갈은 Mg^{2+} 을 유리시키지 않아 상기 모든 조건에 의한 Mg^{2+} 유리는 ATP 고갈에 의함을 알 수 있다.

대사억제에 의한 Mg^{2+} 의 조절기전에 대한 연구는 많지 않을 뿐만 아니라 *in vivo*에서 대사억제에 의한 $[Mg^{2+}]_i$ 의 농도변동에 대한 연구는 없었다. 생체내의 Mg^{2+} 의 재분배는 간^{12,27}, 심장^{13,28}, 적혈구²⁹ 및 췌장³⁰ 등의 세포막을 통하여 빠르게 이루어진다. 생체내에서 Mg^{2+} 의 항상성 조절에 대한 연구는 첫째, $[Mg^{2+}]_i$ 또는 세포내 소기관내의 Mg^{2+} 은 상호 서로의 전환이 빠르게 이루어지며 둘째, 세포막을 통한 Mg^{2+} 의 유동은 세포내·외가 서로 대조적인 양상을 나타낼 것이고 셋째, $[Mg^{2+}]_i$ 농도는 kidney의 여과에 의해 조절됨¹¹을 고려해야 하므로 ATP 결핍시 정량적으로 혈중으로 Mg^{2+} 의 유리 부위는 계산할 수 없으나 이 실험결과에 의하면 심장, 간과 같은 실질

기관이 ATP 감소시 $[Mg^{2+}]_i$ 농도조절에 주요 기관임을 알 수 있을 뿐 아니라 적혈구 역시 Mg^{2+} 유리 부위임을 확인하였다. ATP 결핍에 의해서 $[Mg^{2+}]_i$ 가 증가한다는 증거로 Table 1에서 보는 바와 같이 KCN이 $NaNO_2$ 에 의한 $[Mg^{2+}]_i$ 증가효과는 억제하였으나 Met-Hb 형성에는 영향을 미치지 않았다. 또한 $NaNO_2$ 에 의한 $[Mg^{2+}]_i$ 증가효과가 Met-Hb 혈중 치료제인 methylene blue로 억제되었다는 보고¹⁰에 의하여 Met-Hb 혈중에 의한 ATP 결핍으로 유리형 $[Mg^{2+}]_i$ 가 증가함으로써 세포내·외의 Mg^{2+} 농도차에 의하여 세포밖으로 유리됨으로써 $[Mg^{2+}]_i$ 농도가 증가하는 것으로 사료된다. 추가적으로 KCN은 *in vivo* 뿐만 아니라 관류심장과 간에서도 Mg^{2+} 유리효과를 보였으나 $NaNO_2$ 는 *in vivo*에서 $[Mg^{2+}]_i$ 농도를 증가시켰을 뿐 관류심장이나 간에서는 Mg^{2+} 을 유리시키지 않았다(Fig 6). 이는 Met-Hb 혈중에 의해서 Mg^{2+} 이 유리될 수 있다는 직접적인 증거이다. 호흡수의 감소 역시 $[Mg^{2+}]_i$ 증가효과를 나타냈다. 이는 ischemia, hypoxia시 세포내 유리형 Mg^{2+} 의 증가로^{7,31} 세포막을 통한 Mg^{2+} 유동이 증가하였거나 산소 공급억제 및 ATP 감소 등에 의한 세포의 구조적 변화에 기인될 가능성도 있음으로 이는 더 연구해야 할 필요가 있다.

결 론

유리형 $[Mg^{2+}]_i$ 조절이 세포의 에너지 결핍과 밀접하게 관련됨으로, 우리는 유리형 $[Mg^{2+}]_i$ 의 증가가 순환계 내로 Mg^{2+} 이 유출된 결과일 것이라고 생각하였다. 이를 증명하고자 마취 상태의 흰쥐에서 혈장 그리고 적혈구, 관류심장 및 간에서 $[Mg^{2+}]_i$ 농도를 측정하였다. 실험동물의 복강내로 $NaNO_2$ 를 투여하였고, $[Mg^{2+}]_i$ 은 약물투여 후 10~20분에 측정하였다. 실험동물에 30mg/Kg의 $NaNO_2$ 를 투여하면 투여 10분 후부터 $[Mg^{2+}]_i$ 과 Met-Hb의 증가를 관찰할 수 있었다. 같은 조건에서 $[Mg^{2+}]_i$ 의 증가효과는 4mg/Kg의 KCN의 전처치에 의해 억제되었으나 Met-Hb의 증가는 억제되지 않았다. 이러한 결과는 $[Mg^{2+}]_i$ 증가와 ATP 결핍이 동반됨을 의미한다. 또한 0.9mg/Kg rotenone 또는 15mg/Kg 2,4-dinitrophenol이 $[Mg^{2+}]_i$ 농도를 증가시켰다. 호흡수를 100/min에서 10/min으로 30분간 낮추었을 때 또한 시간의존적으로 $[Mg^{2+}]_i$ 농도가 증가하였다. 이러한 $[Mg^{2+}]_i$ 농도증가는 KCN의 전처치에 의해 억제되었다. 추가적으로 $NaNO_2$ 또는 KCN에 의하여

ATP를 결핍시키면 흰쥐의 적혈구에서 $[Mg^{2+}]_i$ 농도가 증가되었다. 관류심장과 간에서 KCN의 자극에 의해서는 Mg^{2+} 이 유리되었지만 $NaNO_2$ 에 의해서는 Mg^{2+} 이 유리되지 않았다. 상기 결과에 의하면 $[Mg^{2+}]_i$ 유리증가 효과는 Mg^{2+} 주요 저장소인 심장과 간 그리고 적혈구에서 직접적으로 ATP 결핍에 의해 유도된 유리형 $[Mg^{2+}]_i$ 증가에 의존적이며 세포의 에너지 상태에 따라 Mg^{2+} 이 이동될 수 있음을 의미한다.

참 고 문 헌

- Horie M, Irisawa H. Rectification of muscarinic K^+ current by magnesium in guinea pig atrial cells. *Am J Physiol*, 253:H210-214, 1987.
- Iseri LT, French JH. Magnesium: nature's physiological calcium blocker. *Am Heart J*, 108:188-193, 1984.
- Meissner G, Henderson JS. Rapid calcium release from sarcoplasmic reticulum vesicles is dependent on Ca^{2+} and is modulated by Mg^{2+} , adenine nucleotide, and calmodulin. *J Biol Chem*, 262:3065-3073, 1987.
- White RE, Hartzell HC. Magnesium ions in cardiac function: Regulation of channel and second messengers. *Biochem Pharmacol*, 38:859-867, 1989.
- Altura BM, Altura BT. New perspectives on the role of magnesium in the pathophysiology of the cardiovascular system. *Magnesium*, 4:226-244, 1985.
- 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.
- Murphy E, Steenbergen C, Levy LA, et al. Cytosolic free magnesium levels in ischemic rat heart. *J Biol Chem*, 264:5622-5627, 1989.
- Velesco D, Guynn RW, Oskarsson M, et al. The concentrations of free and bound magnesium in rat tissues. *J Biol Chemistry*, 248:4811-4819, 1973.
- Headrick JP, Willis RJ. Cytosolic free magnesium in stimulated, hypoxic and underperfused rat heart. *J Mol Cell Cardiol*, 23:991-999, 1991.
- 김종식, 김상진, 김진상. 흰쥐에서 대사작용 억제에 의한 혈중 Mg^{2+} 조절. 대한수의학회지, 39:70-76, 1999.

11. Keenan D, Romani A, Scarpa A. Differential regulation of circulating Mg^{2+} in the rat by β_1 - and β_2 -adrenergic receptor stimulation, *Circ Res*, 77:973-983, 1995.
12. 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.
13. 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.
14. Evelyn KA, Malloy HT. Microdetermination of oxyhaemoglobin in a single sample of blood. *J Biol Chem*, 126:655-662, 1938.
15. Schneider AJ, Murray WB, Mentzer SC, et al. "Helper": A critical events prompter for unexpected emergencies. *J Clin Monitor*, 11:358-364, 1995.
16. Tosaki A, Das DK. Extracellular Mg^{2+} manipulation prevents the proarrhythmic activity of cromakalim in ischemic/reperfused diabetic hearts. *J Pharmacol Exp Ther*, 282(1):309-17, 1997.
17. Yamamoto K, Bando S. Effects of verapamil and magnesium sulfate on electrophysiologic changes during acute myocardial ischemia and following reperfusion in dog: comparative effects of administration by intravenous and coronary sinus retroperfusion routes. *Angiology*, 47(6):557-68, 1996.
18. Prielipp RC, Butterworth JF, Roberts PR, et al. Magnesium antagonizes the actions of lysophosphatidyl choline (LPC) in myocardial cells: a possible mechanism for its antiarrhythmic effects. *Anesth Analg*, 80:1083-1087, 1995.
19. 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.
20. Luthi D, Gunzel D, McGuigan JAS. Mg -ATP binding: its modification by spermine, the relevance to cytosolic Mg^{2+} buffering, changes in the intracellular ionized Mg^{2+} concentration and the estimation of Mg^{2+} by ^{31}P -NMR. *Exp Physiol*, 84:231-52, 1999.
21. Allen DG, Orchard CH. Intracellular calcium concentration during hypoxia and metabolic inhibition in mammalian ventricular muscle. *J Physiol*, 339:107-122, 1983.
22. 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.
23. Akermann KEO. Inhibition and stimulation of respiration-linked Mg^{2+} efflux in rat heart mitochondria. *J Bioenerg Biomembr*, 13:133-139, 1981.
24. Corkey BE, Duszynski J, Rich TL, et al. Regulation of free and bound magnesium in rat hepatocytes and isolated mitochondria. *J Biol Chem*, 261:2567-2574, 1986.
25. Harman AW, Nieminen A, Lemasters JJ, et al. Cytosolic free magnesium, ATP and blebbing during chemical hypoxia in cultured rat hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 170:477-483, 1990.
26. Zhang GH, Melvin JE. Segretagogue-induced mobilization of an intracellular Mg^{2+} pool in rat sublingual mucous acini. *J Biol Chem*, 267:20721-20727, 1992.
27. Jakob A, Beckert J, Schottli G, et al. α_1 -Adrenergic stimulation causes Mg^{2+} release from perfused rat liver. *FEBS Lett*, 246:127-130, 1989.
28. Romani A, Scarpa A. Hormonal control of Mg^{2+} transport in the heart. *Nature*, 346:841-844, 1990.
29. Feray J, Garay R. Demonstration of a $Na^+ : Mg^{2+}$ exchange in human red cells by its sensitivity to tricyclic antidepressant drugs. *Naunyn-Shimied Arch Pharmacol*, 338:332-37, 1988.
30. Henquin JC, Tamagawa T, Nenquin M, et al. Glucose modulates Mg^{2+} fluxes in pancreatic islet cells. *Nature*, 301:73-74, 1983.
31. Garfinkel L, Altsculd RA, Garfinkel D. Magnesium in cardiac energy metabolism. *J Mol Cell Cardiol*, 18:1003-1013, 1986.