

## 기니픽 심장에서 histamine H<sub>2</sub>-수용체 자극에 의한 Mg<sup>2+</sup> 유리에 대한 phosphodiesterase 억제제의 효과

강형섭·김진상

전북대학교 수의과대학  
(2000년 8월 4일 게재승인)

### Regulation of histamine H<sub>2</sub>-receptor mediated Mg<sup>2+</sup> release by phosphodiesterase inhibitors in the guinea pig hearts

Hyung-sub Kang, Jin-shang Kim

*College of Veterinary Medicine, Chonbuk National University*

(Accepted by Aug 7, 2000)

**Abstract** : Several recent studies demonstrate that receptor-mediated cAMP (adenosine 3',5'-monophosphate) production evokes marked change in magnesium (Mg<sup>2+</sup>) homeostasis. The effects of dimaprit or/and phosphodiesterase (PDE) inhibitors on the Mg<sup>2+</sup> release from perfused guinea pig heart and collagenase-dispersed myocytes was studied to clarify an association of H<sub>2</sub>-histaminergic receptor-mediated Mg<sup>2+</sup> regulation with intracellular cAMP-degradation system.

Mg<sup>2+</sup> efflux was stimulated in perfused hearts and myocytes by IBMX (3-isobutyl-1-methyl-xanthine), a calmodulin-sensitive PDE inhibitor, but not by RO 20-1724(4-(3-butoxy-4-methoxy-benzyl)-2-imidazolidinone) or papaverine, cAMP-specific PDE inhibitors. Mg<sup>2+</sup> efflux was also be induced by dimaprit, a H<sub>2</sub>-agonist. Mg<sup>2+</sup> effluxes induced by dimaprit were augmented by the presence of the PDE inhibitors. The augmentation of dimaprit-induced Mg<sup>2+</sup> effluxes by the PDE inhibitors were inhibited by ranitidine, a H<sub>2</sub>-antagonist, and imipramine, a Na<sup>+</sup>-Mg<sup>2+</sup> exchange inhibitor, in perfused hearts and myocytes and were also inhibited by amiloride in perfused hearts. These results suggest that the H<sub>2</sub>-stimulated Mg<sup>2+</sup> effluxes from guinea pig heart can be regulated by the cytosolic nonspecific-dependent PDE systems and that it is induced by the Na<sup>+</sup>-Mg<sup>2+</sup> exchanger stimulation.

**Key words** : magnesium, dimaprit, phosphodiesterase, cAMP, heart.

---

이 논문은 2000년도 전북대학교 부설 생체안전성연구소 학술연구비의 일부 지원으로 이루어졌음(CNU-BSRI, No. 2000-01A).

Address reprint requests to Dr. Jin-shang Kim, Department of Pharmacology, College of Veterinary Medicine, Chonbuk National University, Chonju 561-756, Republic of Korea. E mail : kimjs@chonbuk.ac.kr

## 서 론

기능적으로  $Mg^{2+}$ 은 생체에서 필수적인 이온으로 잘 알려져 있는데 이 이온의 조절기전에 대한 연구는 아직 미비하다.  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$  또는  $K^+$  처럼 이온통로나 교환기와 같은 이온조절계에 의해서 조절될 수 있을 것으로 추측되나 아직 잘 규명되어 있지 않았다. 최근 몇몇 연구자들에 의하여 밝혀지고 있는  $Na^+$ - $Mg^{2+}$  교환기는  $Mg^{2+}$ 의 중요한 조절계로 인정<sup>1-4</sup>되고 있지만 이에 대한 반론<sup>5-8</sup>도 있다. 최근 연구자들은  $Na^+$ - $Mg^{2+}$  교환기가 호르몬 또는 수용체 자극물질 등에 의해서 작동할 수 있다는 결과에 유념하고 있다. 즉, 조직 및 세포에서  $\beta$ -adrenergic<sup>9-12</sup> 또는 histaminergic<sup>13</sup> 수용체 자극에 의해서 세포내  $Mg^{2+}$ 이 세포외로 유리될 수 있는데 이는 cAMP 증가<sup>9,10,13</sup>에 의한  $Na^+$ - $Mg^{2+}$  교환기의 활성화에 의한 결과<sup>14-16</sup>로 알려져 있다. 역시 직접적으로 세포막을 통과할 수 있는 cAMP 적용에 의해서도  $Mg^{2+}$ 이 세포외로 유리되고 mitochondria 내로부터  $Mg^{2+}$  유리를 촉진한다고 한다<sup>9-14,17,18</sup>. 이와 대조적으로 muscarinic, vasopressin 또는 dopaminergic 수용체 자극은 세포내 cAMP를 감소시키거나 protein kinase C를 활성화시켜 세포내로의  $Mg^{2+}$  유입을 촉진한다<sup>9,10,19,20</sup>고 한다. 따라서 cAMP를 조절할 수 있는 모든 생체기전은  $Mg^{2+}$ 을 조절할 수 있다고 사료되기 때문에 세포내 cAMP 조절인자는  $Mg^{2+}$  조절에 중요하다. 상기와 같은 신호전달체계에 있어서 cAMP 증가 외에 다음과 같은 cAMP 불활성화 억제에 의해서도 세포내 cAMP 농도는 증가될 수 있다<sup>21</sup>. cAMP나 cGMP(guanosine 3',5'-monophosphate)가 AMP나 GMP로 불활성화 되는 단계에서 크게 다섯가지 cyclic nucleotide phosphodiesterase (CN PDE)가 관여한다<sup>21</sup>. 이들 중 calmodulin-의존성 PDE와 cAMP-선택적 PDE가 세포내 cAMP 농도조절에 직접적으로 관여한다<sup>21</sup>. 따라서 직접적인 PDE 억제는 cAMP 농도를 증가시킬 수 있고, cAMP 농도를 증가시키는 약물이나 수용체 자극은 상기 여러 종류의 CN PDE 중 어떠한 특정 경로와 관련된 cAMP 조절계에 의해  $Mg^{2+}$ 이 조절될 수 있을 것이다. Scarpa *et al*<sup>22</sup>은 흰쥐 간에서  $\beta$ -adrenergic 수용체 자극에 의한  $Mg^{2+}$  유리효과가 calmodulin-의존성 CN PDE 활성화에 의해 억제됨을 보고하여  $Mg^{2+}$ 이 특정경로의 cAMP에 의해 조절될 수 있음을 시사하였다. 이 연구에서는  $H_2$ -histaminergic 수용체

자극에 의한  $Mg^{2+}$  유리효과와 관련된 유리기전을 규명하고 또한 선택적 PDE와의 관계를 규명하기 위하여 histamine에 비교적 민감하게 반응하는 기니픽 심장에서 선택적 CN PDE 억제제 및  $Mg^{2+}$  유리 억제제의 효과 및 상호작용을 관찰하였다.

## 재료 및 방법

심장적출 및 관류액 채취 : 기니픽(370-450g)을 두부 타격후 심장을 적출하여 4℃의 산소 포화영양액(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 system)의 연결관에 심장의 대동맥을 삽입하여 관찰하였다. 고정후 37℃ 상기 영양액을 분당 10ml 속도로 20분간 관류시킨 다음 관류액을  $Mg^{2+}$  free 영양액으로 대체하여 공급하였다. 0mM  $Mg^{2+}$  영양액을 관류시킨 20분 후부터(Fig에서 1분으로 표시) 관류된 영양액을 1분 간격으로 채취하였고, 약물은 관류액 채취 10분 후부터 관류용액에 적정 농도로 첨가하여 약 10분간 관류시켰다.

심근세포 분리 및 배양액 채취 : 심근세포 분리는 De Young *et al*<sup>23</sup>의 collagenase 소화방법을 개선하여 다음과 같이 실시하였다. 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%  $CO_2$ 로 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 collagenase가 첨가된(100IU/ml) Joklik buffer를 심장의 소화상태에 따라 20-35분 동안 재관류하였다.  $Ca^{2+}$ -저항성 세포를 얻기 위하여 소화시키는 동안 25 $\mu$ M  $CaCl_2$ 를 첨가하였다. Langendorff cannula로부터 소화된 심장을 분리하여 bovine serum albumin(BSA, 10mg/ml)과 0.25mM  $CaCl_2$ 가 첨가된 Joklik buffer와 collagenase buffer를 혼합한 용액내에서 절제한 심장을 조심스럽게 흔들면서 심근세포를 분리하였다. 분리한 심근세포는 BSA (10mg/ml)와 0.25mM  $CaCl_2$ 가 첨가된 Joklik buffer에 부유시킨 후 심근세포의 부유액을 250 $\mu$ m nylon-gauze로 여과

하고 3회 세척하였다. 분리된 세포는 상온에 60분동안 방치하면서 안정시켰고 방치동안 10분 간격으로 0.25 mM CaCl<sub>2</sub>를 4회 첨가하여 buffer내 최종 Ca<sup>2+</sup> 농도가 1.25 mM이 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<sup>2+</sup>이 제거된 Mg<sup>2+</sup> free 영양액으로 3회 세척을 실시하였고, 실험은 심근세포가 부유된 10ml의 0mM Mg<sup>2+</sup> 영양액을 시험관에 분주하여 교반기가 장착된 항온수조(37°C)에서 실시하였다. 심근세포가 부유된 각 시험관을 대조군 및 약물투여군으로 구분하여 항온수조에서 약 3분간 배양하여 시험관내의 심근세포를 안정시켰다. 각 시험관에서 세포 부유액을 2ml 취하여 원침후 그 상층액만을 얻어 실험의 대조액으로 사용하였다(결과에서 시간 0분으로 표기). 대조액을 얻은 후 즉시 약물을 적정농도가 되도록 하여 시험관에 첨가하였고 5, 10분 간격으로 2ml씩 2회 세포 부유액을 취하여 원침후 상층액을 얻어 실험액으로 하였다. Mg<sup>2+</sup>의 농도분석이 끝난 후 세포를 용해하여 Lowry 방법으로 protein을 분석하였으며 각 시험관내에 세포수는 ml당 protein 300µg이 되도록 하였고 분리 심근세포에서 유리된 Mg<sup>2+</sup>의 농도는 nmol/10<sup>6</sup> cells로 표기하였다.

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

사용약물 및 통계처리 : RO 20-1724 및 imipramine은 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA)로부터 dimaprit, amiloride, ranitidine, IBMX 및 papaverine은 Research Biochemicals International(RBI, 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

관류심장과 심근세포에서 PDE 억제제에 의한 Mg<sup>2+</sup> 유리효과 : PDE에 의하여 cAMP는 AMP로 불활성화됨으로 PDE 억제제에 의한 세포내 cAMP는 증가할 것이

다. Mg<sup>2+</sup> 유리에 대한 PDE 억제제 자체 영향을 관찰하기 위하여 관류심장과 심근세포에서 PDE 억제제 효과를 각각 관찰하였다. 관류심장에서 calmodulin-선택적 PDE 억제제인 10µM IBMX에 의하여 Mg<sup>2+</sup> 유리효과가 나타났으나 cAMP-선택적 PDE 억제제인 20µM RO 20-1724와 10µM papaverine은 Mg<sup>2+</sup>을 유리시키지 못했다(Fig 1A).

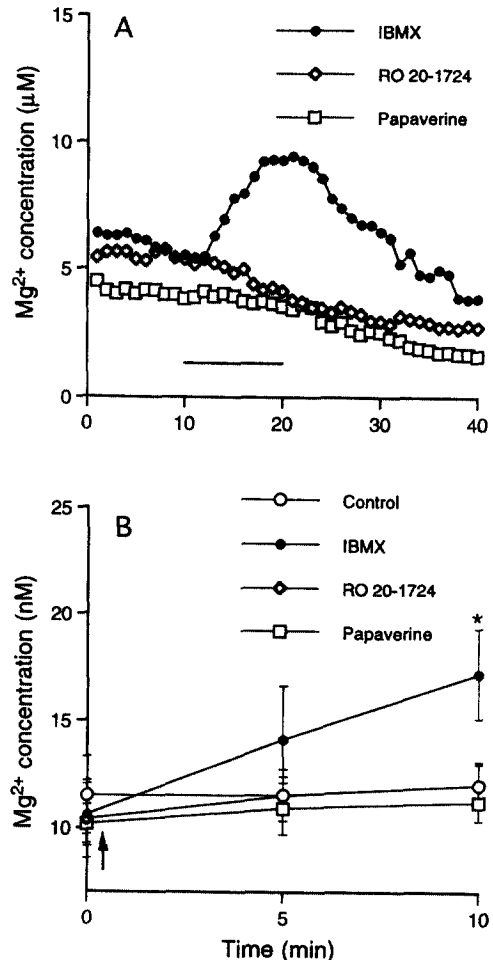


Fig 1. Effects of PDE inhibitors, IBMX, RO 20-1724 or papaverine on Mg<sup>2+</sup> efflux in the perfused guinea pig hearts (A) and isolated myocytes (B). The indicated bar show the period that the hearts were perfused with PDE inhibitors (10µM IBMX, 20µM RO 20-1724, or 10µM papaverine). This figure represents a typical experiment out of four each for PDE inhibitors (A). Where indicated (arrow), 20µM IBMX, 50µM RO 20-1724 or 20µM papaverine was added to a suspension of isolated myocytes. Data are means±SEM of six different preparations (B). \*p<0.01 vs. control.

RO 20-1724나 papaverine은 농도증가에 의해서도  $Mg^{2+}$ 을 유리시키지 못했다(자료 미제시). 역시 심근세포에서도 관류심장에서와 유사한 효과가 관찰되었다(Fig 1B).

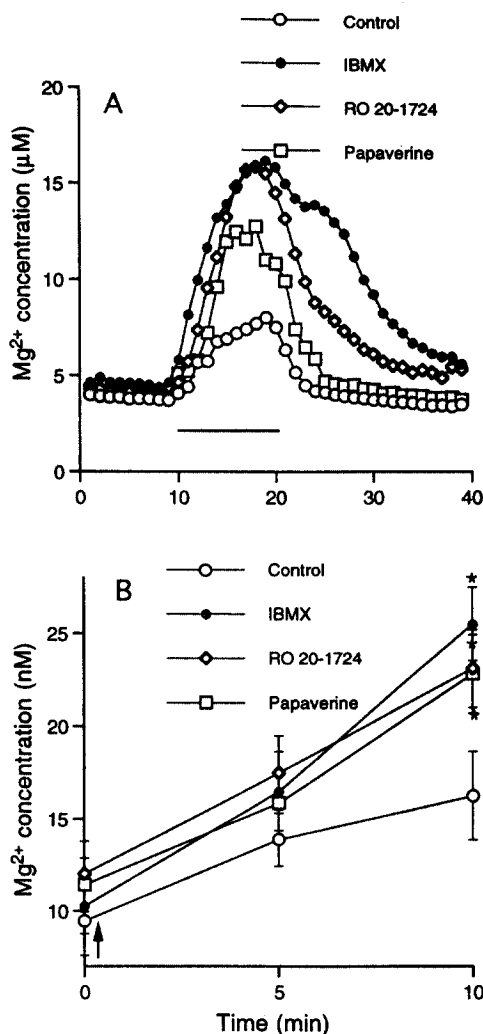


Fig 2. Potentiation of dimaprit-induced  $Mg^{2+}$  efflux by PDE inhibitors in perfused hearts (A) and isolated myocytes (B). The indicated bar show the period that the hearts were perfused with  $10\mu M$  dimaprit in the absence ( $\circ$ ) and in the presence ( $\bullet$ ,  $\diamond$ ,  $\square$ ) of PDE inhibitors. Samples were collected from 5 minutes after PDE inhibitors were added to the buffer. This figure represents a typical experiment out of the three to five each for the dimaprit stimulation (A). Where indicated (arrow),  $20\mu M$  dimaprit was added in the absence ( $\circ$ ) and in the presence of IBMX ( $\bullet$ ), RO 20-1724 ( $\diamond$ ), or papaverine ( $\square$ ). Data are means  $\pm$  SEM of five different preparations (B). \* $p < 0.01$  vs. control(dimaprit alone).

관류심장과 심근세포에서  $H_2$ -수용체 자극시 PDE 억제에 의한  $Mg^{2+}$  유리효과 강화 : 관류심장에서  $H_2$ -수용체 선택적 효현제인  $10\mu M$  dimaprit는 유의한  $Mg^{2+}$  유리를 일으켰으며, 이 유리효과가  $10\mu M$  IBMX,  $20\mu M$  RO 20-1724 및  $10\mu M$  papaverine 존재하에서 강화되었다. 또

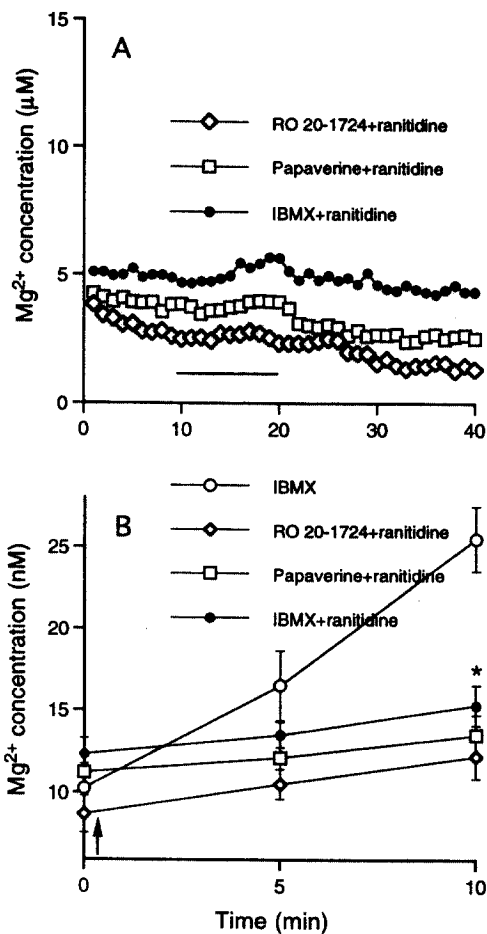


Fig 3. Influences of ranitidine on the PDE inhibitor-induced potentiation of dimaprit-induced  $Mg^{2+}$ -efflux in perfused hearts (A) and isolated myocytes (B). The indicated bar show the period that the hearts were perfused with  $10\mu M$  dimaprit in the presence of PDE inhibitors and ranitidine. This figure represents a typical experiment out of four each for the chemical stimulation (A). In the absence ( $\circ$ ) or presence ( $\bullet$ ,  $\diamond$ ,  $\square$ ) of  $10\mu M$  ranitidine,  $20\mu M$  dimaprit was added, where indicated (arrow), in the presence of IBMX ( $\bullet$ ), RO 20-1724 ( $\diamond$ ), or papaverine ( $\square$ ). Data are means  $\pm$  SEM of five different preparations (B). \* $p < 0.001$  vs. corresponding value with dimaprit alone in the presence of IBMX ( $\circ$ ).

한 IBMX나 RO 20-1724 존재하에서 dimaprit에 의하여  $Mg^{2+}$ 이 유리되는 시간 또한 연장되어 더욱 강화된 효과가 나타났다(Fig 2A). 역시 심근세포에서도 관류심장에서 나타난 효과처럼 모든 PDE 억제제(20 $\mu$ M IBMX, 50

$\mu$ M RO 20-1724 또는 20 $\mu$ M papaverine)는 dimaprit에 의한  $Mg^{2+}$  유리효과를 강화시켰다(Fig 2B).

관류심장과 심근세포에서 PDE 억제제의  $Mg^{2+}$  유리 강화효과에 대한 ranitidine의 영향: PDE 억제제 존재하에서 dimaprit에 의한  $H_2$ -수용체 자극시  $Mg^{2+}$  유리효과 강화가  $H_2$ -수용체를 경유한 결과인지를 확인하기 위하여 관류심장과 심근세포에서  $H_2$ -수용체 길항제인 ranitidine의 효과를 관찰하였다. 10 $\mu$ M ranitidine은 관류심장에서 PDE 억제제에 의한 dimaprit의  $Mg^{2+}$  유리 강화효과를 현저하게 차단하였으며(Fig 3A), 심근세포에서도 20  $\mu$ M ranitidine은 관류심장에서의 유사하게 강화효과를 차단하였다(Fig 3B).

관류심장과 심근세포에서 PDE 억제제의  $Mg^{2+}$  유리 강화효과에 대한 imipramine과 amiloride의 영향: 상기 결과에 의하여  $H_2$ -수용체 자극은 calmodulin-선택적 PDE와 cAMP-선택적 PDE 경로와 관련된 cAMP 조절에 의한  $Mg^{2+}$  유리효과를 나타낼 수 있을 것으로 추측된다. 이러한 효과가 어떠한  $Mg^{2+}$  유리기전과 관련되어 있는가를 확인하기 위하여  $Na^+$ - $Mg^{2+}$  교환기 억제제인 imipramine과 amiloride의 영향을 관찰하였다. 관류심장에서 10 $\mu$ M imipramine과 10 $\mu$ M amiloride는 PDE 억제제에 의

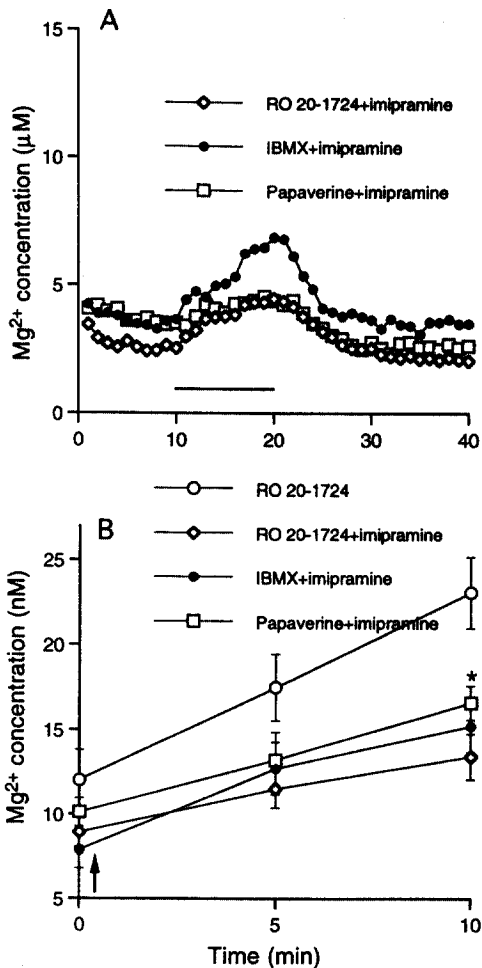


Fig 4. Influence of imipramine on the PDE inhibitor-induced potentiation of dimaprit-induced  $Mg^{2+}$ -efflux in perfused hearts (A) and isolated myocytes (B). The indicated bar show the period that the hearts were perfused with 10 $\mu$ M dimaprit in the presence of PDE inhibitors and imipramine. This figure represents a typical experiment out of five each for the chemical stimulation (A). In the absence ( $\circ$ ) or presence ( $\bullet$ ,  $\diamond$ ,  $\square$ ) of 10 $\mu$ M imipramine, 20 $\mu$ M dimaprit was added, where indicated (arrow), in the presence of IBMX ( $\bullet$ ), RO 20-1724 ( $\diamond$ ), or papaverine ( $\square$ ). Data are means $\pm$ SEM of four different preparations (B). \* $p$ <0.005 vs. corresponding value with dimaprit alone in the presence of RO 20-1724.

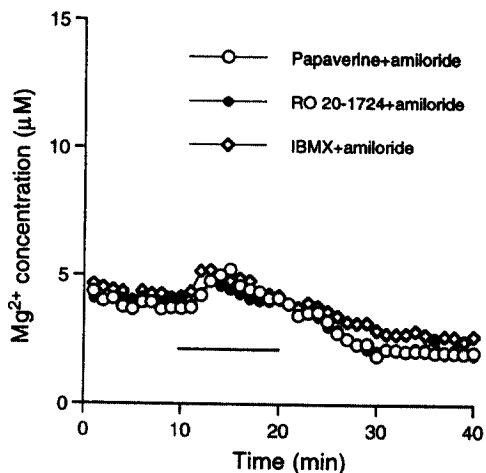


Fig 5. Influences of amiloride on the PDE inhibitor-induced potentiation of dimaprit-induced  $Mg^{2+}$ -efflux in the perfused guinea pig hearts. Where indicated, 10 $\mu$ M dimaprit was added to the perfusate in the presence of PDE inhibitors and 10 $\mu$ M amiloride, a non-selective  $Na^+$ - $Mg^{2+}$  exchange inhibitor. This figure represents a typical experiment out of six each for the chemical stimulation.

한 dimaprit의  $Mg^{2+}$  유리 강화효과를 현저하게 차단하였고(Fig 4A, 5), 심근세포에서도 10 $\mu$ M imipramine은 관류 심장에서와 유사하게 강화효과를 차단하였다(Fig 4B).

## 고 찰

cAMP 및 cGMP는 신호전달계에서 몇몇 수용체 자극 시 고유의 생리학적 반응을 일으키는 중요한 2차 신호전달자이다. 그리고 이 전달자들은 고유의 기능을 발휘하고 세포막 또는 세포내에 있는 CN PDE에 의하여 불활성화된다<sup>21</sup>. 지금까지 알려진 대표적인 CN PDE는 I, II, III, IV 및 V로 이를 각각  $Ca^{2+}$ /calmodulin-활성 CN PDE, cGMP-활성 CN PDE, cGMP-억제성 cAMP PDE, cAMP-선택적 PDE 및 cGMP-선택적 PDE라고 한다<sup>24</sup>. 이들 중 PDE II와 V는 cGMP 결합부를 갖고 있기 때문에 세포내 cGMP 가수분해와 관련되어 있고 아직 약리학적으로 활성제 또는 억제제에 대하여 잘 알려져 있지 않았다<sup>21</sup>. 또한 PDE III는 심장 기능을 변동시킬 수 있고 이 억제제들이 다양하게 개발되어 심장병 치료에 응용<sup>25</sup>되고 있지만 이 PDE 억제제들은 PDE 억제효과를 갖고 있기 보다는 다른 작용을 갖고 있고 심장의 PDE III에 선택적이지 않다<sup>26</sup>. 그리고 PDE III는 cGMP에 의존적으로 cAMP 가수분해를 억제함으로써 cAMP와의 관련성이 약리학적으로 매우 복잡하다<sup>21</sup>. 이들 PDE II, III 및 V를 제외한 I와 IV는 cAMP를 불활성화시키는 전형적인 PDE로 많은 세포나 조직에서 그 기능 및 이들 억제제가 밝혀졌다<sup>21</sup>. 즉, methylxanthine 유도체들은 대표적인 CN PDE 억제제로서 주로  $Ca^{2+}$ /calmodulin-의존성 CN PDE 억제제로 잘 알려져 있다<sup>21</sup>. 따라서 이 논문에서는 PDE I 및 IV 억제제에 의한  $Mg^{2+}$  유리효과와  $H_2$ -수용체 자극에 의한 cAMP 활성화시 이들 억제제에 의한 cAMP 불활성에 따른  $Mg^{2+}$  유리정도를 비교하고자 하였다.

세포막을 투과하여 세포내 cAMP를 증가시킬 수 있는 cAMP 유사화합물은 물론 세포내 cAMP를 증가시킬 수 있는 수용체 자극약물은 여러 세포나 조직에서  $Mg^{2+}$  유리를 일으킬 수 있다는 보고<sup>9-14,17,18</sup>에 의하여 cAMP에 의해 세포내  $Mg^{2+}$  농도가 조절될 수 있음을 알 수 있다. 이와같이 세포내 cAMP 농도 조절기전 이외에 활성형 cAMP를 AMP로 불활성화 됨을 억제하여도 세포내 cAMP는 증가될 수 있기 때문에 이 cAMP 증가에 의하여 세포내  $Mg^{2+}$ 이 세포외로 유리될 수 있을 것으로 추측된다.

즉, 관련 PDE를 억제하면 cAMP 불활성화가 억제되어 세포내 cAMP는 증가될 수 있다<sup>21</sup>. 지금까지 알려진 다양한 CN PDE 억제제 중 cAMP 불활성 억제와 관련된 PDE 억제제로 IBMX, caffeine 및 theophylline과 같은 PDE I 선택적 억제제와 RO 20-1724나 papaverine와 같은 PDE IV 선택적 억제제 등이 있다<sup>21</sup>. 이 연구에서 이 두 종류의 대표적인 선택적 억제제 중 IBMX는 관류심장 및 분리심근에서 그 자체에 의하여  $Mg^{2+}$ 을 유리시켰으나 RO 20-1724나 papaverine는 자체에 의하여는  $Mg^{2+}$  유리에 영향을 미치지 못했다. 이와같은 결과에 의하여 심장에서 cAMP 불활성에 의하여  $Mg^{2+}$ 이 조절될 수 있는데 이 중  $Ca^{2+}$ /calmodulin-의존성 PDE 경로와 관련된 cAMP는  $Mg^{2+}$  유리에 직접적으로 관련되어 있음을 알 수 있다. 그러나 RO 20-1724나 papaverine 자체는  $Mg^{2+}$  유리에 영향을 미치지 않아 cAMP 생성단계와 불활성화 단계중 어느 한 경로가  $Mg^{2+}$  유리에 관련되어 있을 것으로 추측된다.

감상선에서 감상선 호르몬 분비조절에 대한 muscarinic- 또는  $\alpha_1$ -adrenergic 수용체 자극시 cAMP 농도조절에  $Ca^{2+}$ /calmodulin-의존성 PDE 또는  $Ca^{2+}$  의존성 기전이 관련되어 있다는 보고<sup>27,28</sup>는 많지만 심장에서 선택적 CN PDE에 의해 조절되는 cAMP에 의해  $Mg^{2+}$ 이 조절된다는 보고는 아직 없다. 단지  $\alpha$ -,  $\beta$ -수용체 자극시 간 조직으로부터  $Mg^{2+}$ 이 유리되는데 이들중  $\beta$ -수용체 자극에 의한  $Mg^{2+}$  유리효과가  $Ca^{2+}$ /calmodulin-의존성 PDE 활성제인 insulin에 의하여 억제되므로  $Ca^{2+}$ /calmodulin-의존성 PDE에 의해 불활성화되는 cAMP 경로에 의하여  $Mg^{2+}$  유리가 일어날 수 있음을 시사<sup>22</sup>하여 비특이적 PDE와 관련된다는 이 연구결과와는 약간 차이가 있다. 그러나 기니피크 심장에서  $H_2$ -수용체 자극시  $Mg^{2+}$  유리효과는 insulin에 의하여 차단되지 않아(자료 미제시) 상기 결과와 상반되었다. 이는 insulin의 동물 또는 조직에 대한 특이성의 차이로 추측할 수 있다. 또한 insulin이 직접적으로 세포막  $Mg^{2+}$  유리기전을 억제할 수 있는 효과와 세포내  $Mg^{2+}$  재분포에 직접적으로 영향을 미칠 수 있음을 고려해야 한다고 하였다<sup>22</sup>.  $H_2$ -수용체 자극에 의한 adenylate cyclase 활성화로 cAMP가 활성화된다<sup>29</sup>. 이 cAMP 활성화로  $Mg^{2+}$ 이 유리될 수 있기 때문에  $H_2$ -수용체 자극시  $Mg^{2+}$  유리현상이 어떤 특정 PDE와 관련되어 있는가를 확인하기 위하여 상기 두 선택적 PDE 억제제 존재하에서 dimaprit에 의한  $Mg^{2+}$  유리효과를 관찰하였다. IBMX 존재하에서  $H_2$ -수용체를 자극하면  $Mg^{2+}$  유리효과가 강

화되었다. 따라서 IBMX 자체에 의해서도  $Mg^{2+}$ 이 유리되었기 때문에 서로 다른  $Mg^{2+}$  저장소로부터 유리되었을 것으로 추측되고 이것이  $Ca^{2+}/calmodulin$ -의존성 cAMP에 의한 결과로 해석된다. 추가적으로 RO 20-1724나 papaverine는 IBMX처럼 직접적인  $Mg^{2+}$  유리효과는 나타나지 않았지만 이들 억제제 존재하에서도  $H_2$ -수용체 자극에 의한  $Mg^{2+}$  유리효과가 강화되었다. 따라서  $H_2$ -수용체 자극으로  $Mg^{2+}$ 가 유리됨을 확인하였고 이러한 유리효과에 상기 두 PDE-의존성 cAMP 경로가 관련되어 cAMP 활성화는 물론 cAMP 불활성화 단계조절에 의해서도  $Mg^{2+}$  유리 및 유입이 조절될 수 있음을 알 수 있다.

한편 여러 세포나 조직에서  $Mg^{2+}$  농도 조절기전으로  $Na^+-Mg^{2+}$  교환기가 관여한다는 것이 인정<sup>1-4,14-16</sup>되고 있는데 수용체 자극에 의한 cAMP 생성 또는 직접적인 cAMP의 농도증가에 의하여  $Na^+-Mg^{2+}$  교환기가 활성화되고<sup>14-16</sup>, ethanol에 의한  $Mg^{2+}$  유리효과도 이 교환기를 경유하여 나타나는 결과로 보고하였다<sup>30</sup>. 이들 연구에서 대부분 세포의  $Na^+$  농도조절<sup>31</sup>에 의한  $Mg^{2+}$  변동효과나  $Na^+-Mg^{2+}$  교환기 억제제로 알려진 imipramine나 amiloride에 의하여  $Mg^{2+}$  유리효과가 차단됨을 관찰하여 각종 자극이나 약물에 의한  $Na^+-Mg^{2+}$  교환기 활성화로  $Mg^{2+}$  농도가 조절된다고 하였다<sup>1-4,15-17,30</sup>. 본 연구에서도 사용된 모든 PDE 억제제 존재하에서  $H_2$ -수용체 자극에 의한  $Mg^{2+}$  유리 강화효과가 imipramine나 amiloride에 의하여 현저히 차단되어 이전 연구자들의 결과와 일치하였다. 따라서  $H_2$ -수용체 자극에 의하여 cAMP 농도가 증가하면  $Mg^{2+}$ 이 유리되며, 이  $Mg^{2+}$  유리효과는 비선택적 PDE에 의해서 조절될 수 있는 cAMP에 의해서 일어날 수 있고, 이러한  $Mg^{2+}$  유리효과가  $Na^+-Mg^{2+}$  교환기를 경유한 결과임을 알 수 있었다. 그러나 이 연구결과를 뒷받침할 수 있거나 비교할 수 있는 이전 연구가 없어 이 결과를 해석하기 어려우며, 이 연구에서 많은 종류의 PDE 억제제 중 소수의 대표적인 약물을 적용한 결과이며, 단지 관류심장과 심근세포에서 관찰한 결과이기 때문에 더 깊은 연구가 이뤄져야 한다고 사료된다.

## 결 론

최근 몇몇 연구에 의하면 수용체 자극에 의한 cAMP 증가는  $Mg^{2+}$  항상성에 변화를 준다고 하였다. 따라서 이 연구에서  $H_2$ -수용체를 경유한  $Mg^{2+}$  조절과 cAMP와의

관계를 명확히 하기 위하여 관류 기니픽 심장과 심근세포에서  $H_2$ -수용체 선택적 효현제와 몇몇 PDE 억제제의 영향을 관찰하였다.

관류심장과 분리 심근세포에서 세포외로의  $Mg^{2+}$  유리가  $Ca^{2+}/calmodulin$ -의존성 PDE 억제제인 IBMX에 의하여 일어났으나 cAMP-선택적 PDE 억제제인 RO 20-1724나 papaverine에 의해서는 일어나지 않았다.  $H_2$ -수용체 선택적 효현제인 dimaprit에 의하여  $Mg^{2+}$ 의 유리가 증가되었고, 이러한 유리효과가 상기 모든 PDE 억제제에 의하여 강화되었다. 관류심장과 분리 심근세포에서 dimaprit에 의한  $Mg^{2+}$  유리효과에 대한 PDE 억제제들의 강화효과는  $H_2$ -수용체 길항제인 ranitidine 및  $Na^+-Mg^{2+}$  교환기 억제제인 imipramine에 의하여 억제되었다. 또한 관류심장에서 이러한 강화효과가 amiloride에 의하여 억제되었다. 따라서 이와같은 결과에 의하면 기니픽 심장에서  $H_2$ -수용체 자극에 의한  $Mg^{2+}$  유리효과는 세포내 비선택적 PDE system에 의하여 매개되며  $Na^+-Mg^{2+}$  교환기를 경유한 효과로 판단된다.

## 참 고 문 헌

1. Murphy E, Freunderich CG, Liebermann M. Cellular magnesium and Na/Mg exchange in heart cells. *Ann Rev Physiol*, 53:273-287, 1991.
2. Blatter LA. Intracellular free magnesium in frog skeletal muscle studied with a new type of magnesium-selective microelectrode: interactions between magnesium and sodium in the regulation of [Mg]. *Eur J Physiol*, 416:238-246, 1990.
3. Flatman PW, Smith LM. Sodium-dependent magnesium uptake by ferret red cells. *J Physiol*, 443:217-230, 1991.
4. Gunzel D, Schlue WR. Sodium-magnesium antiport in Retzius neurones of the leech *Hirudo medicinalis*. *J Physiol*, 491(3):595-608, 1996.
5. Kennedy HJ. Intracellular  $Mg^{2+}$  regulation in voltage-clamped *Helix Aspersa* neurones measured with mag-fura-2 and  $Mg^{2+}$ -sensitive microelectrodes. *Exp Physiol*, 83:449-460, 1998.
6. Rotevatn S, Murphit E, Levy LA, et al. Cytosolic free magnesium concentration in cultured chick heart cells.

- Am J Physiol*, 257:C141~146, 1989.
7. Buri A, McGuigan JAS. Intracellular free magnesium and its regulation, studied in isolated ferret ventricular muscle with ion-selective microelectrode. *Exp Physiol*, 75:751-61, 1990.
  8. 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.
  9. Romani A, Scarpa A. Hormonal control of  $Mg^{2+}$  transport in the heart. *Nature*, 346: 841-844, 1990.
  10. Romani A, Scarpa A. Norepinephrine evokes a marked  $Mg^{2+}$  efflux from liver cells. *FEBS Lett*, 269:37-40, 1990.
  11. Keenan D, Romani A, Scarpa A. Differential regulation of circulating  $Mg^{2+}$  in the rat by  $\beta_1$ - and  $\beta_2$ -adrenergic receptor stimulation, *Circ Res*, 77:973-983, 1995.
  12. 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.
  13. Kang HS, Chang SE, Kang CW, *et al.* Effects of histamine  $H_2$ -receptor stimulation on  $Mg^{2+}$  efflux in perfused guinea pig heart. *Korean J Physiol Pharmacol*, 2:49-54, 1998.
  14. Wolf FI, Di Francesco A, Covacci V, Cittadini A. cAMP activates magnesium efflux via the  $Na^+/Mg^{2+}$  antiporter in ascites cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 202:1209-1214, 1994.
  15. Zhang GH, Melvin JE.  $Na^+$ -dependent release of  $Mg^{2+}$  from an intracellular pool in rat sublingual mucous acini. *J Biol Chem*, 271:29067-29072, 1996.
  16. 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.
  17. 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.
  18. 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.
  19. 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.
  20. 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.
  21. Thompson WJ. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: pharmacology, biochemistry and function. In Taylor CW, ed *Intracellular messengers*, 1st ed, Pergamon Press, Oxford:12. 287-313, 1993.
  22. Keenan D, Romani A, Scarpa A. Regulation of  $Mg^{2+}$  homeostasis by insulin in perfused rat livers and isolated hepatocytes. *FEBS Lett*, 395:41-244, 1996.
  23. 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.
  24. Beavo JA, Houslay MD. Multiple phosphodiesterase isozymes: background, nomenclature and implications. In: *Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases: Structure, Regulation and Drug Action*, Wiley, ed, New York: pp.3-15, 1990.
  25. Kenakin TP, Scott DL. A method to assess concomitant cardiac phosphodiesterase inhibition and positive inotropy. *J Cardiovasc. Pharmacol*, 10:658-666, 1987.
  26. O'Conner B, Silver PJ. Inhibition of guinea pig aortic sarcolemmal  $Ca^{2+}$ - $Mg^{2+}$  and cAMP phosphodiesterase activity by milrinone. *Drug Devl Res*, 19:435-442, 1990.
  27. Miot F, Dumont JE, Erneux C. The involvement of a calmodulin-dependent phosphodiesterase in the negative control of carbamylcholine on cyclic AMP levels in dog thyroid slices. *FEBS Lett*, 151:273-276, 1983.
  28. Oda Y, Tajima K, Mori-Tanaka M, *et al.*  $\alpha_1$ -Adrenergic regulation of thyrotropin-stimulated release of 3,5,3'-triiodothyronine and thyroxine from perfused mouse thyroid. *J Endocrinol Invest*, 14:867-873, 1991.
  29. McNeill JH. Histamine and heart. *Can J Physiol Pharmacol*, 62:720-726, 1984.
  30. Tessman PA, Romani A. Acute effect of EtOH on  $Mg^{2+}$



homeostasis in liver cells : evidence for the activation of an  $\text{Na}^+/\text{Mg}^{2+}$  exchanger. *Am J Physiol* , 275:G1106-1116, 1998.

31. Gunther T, Hollriegel V.  $\text{Na}^+$ - and anion-dependent  $\text{Mg}^{2+}$  influx in isolated hepatocytes. *Biochim Biophys Acta* , 1149:49-54, 1993.

---