

개의 관상동맥에서 Mg^{++} 결핍에 의한 혈관 확장반응의 기전

안 형 수

동덕여자대학교 약학대학
(Received December 5, 1988)

Mechanism of Endothelium dependent Relaxation induced by Mg^{++} -deficiency in isolated Canine Coronary Arteries

Hyung Soo Ann

College of Pharmacy, Dong Duck Women's University, Seoul 136-714, Korea

Abstract—We have recently reported that Mg^{++} -deficiency showed endothelium dependent relaxation in isolated canine coronary arteries precontracted with $PGF_{2\alpha}$. To differentiate the release of EDRF or PGI_2 from the endothelium cells as the cause of vasorelaxation by Mg^{++} -deficiency, effects of several inhibitors of arachidonic acid metabolism on the relaxation by Mg^{++} -deficiency were evaluated and also compared with that of acetylcholine. Ibuprofen and tranilcypromine ($10\mu M$), an inhibitor of cyclo-oxygenase and PGI_2 synthetase, respectively, did not effect on Mg^{++} -free induced vasorelaxation. Pretreatment of quinacrine ($10\mu M$), an inhibitor of phospholipase A_2 and also Ca^{++} uptake, blocked vasorelaxation by Mg^{++} -free. But trifluoperazine ($10\mu M$), which is about as potent as quinacrine in the inhibition of Ca^{++} uptake, did not effect on Mg^{++} -deficiency induced vasorelaxation. NDGA ($10\mu M$), an inhibitor of lipoxygenase, completely restored Mg^{++} -free induced vasorelaxation, even though pretreatment of that was not blocked which might be due to the characteristics of vasorelaxation of NDGA itself. Pretreatment of methylene blue ($10\mu M$), which is known as a inhibitor of EDRF through the blocking effect of guanylate cyclase, completely blocked vasorelaxation by Mg^{++} -free as well as acetylcholine ($0.1\mu M$). Acetylcholine-induced dose response curve was also antagonized by pretreatment of quinacrine ($10\mu M$), but not by ibuprofen, tranilcypromine and NDGA.

These results appear to suggest that Mg^{++} -free induced vasorelaxation was mediated by the release of EDRF through the activation of phospholipase A_2 and noncyclo-oxygenase on arachidonate metabolism.

Ann 등¹⁾은 prostaglandin $F_{2\alpha}$ (이하 “ $PGF_{2\alpha}$ ”로 표기)로 사전에 수축시킨 개의 관상동맥에서 Mg^{++} 결핍시 내피세포 의존성의 이완반응을 초래함을 기보고하였으며, 그 기전은 이미 알려진 바와 같이 혈관의 반응성에 있어 Ca^{++} 과 Mg^{++} 사이의 상호 길항작용에 기인되어 혈관의 내피세포에 대한 Ca^{++} 의 투과성증가 때문인 것으로 고려된다.²⁾ Ku 등³⁾은 Mg^{++} 결핍에 의한 이완반응이 dichlorobenzamil에 의해 차단되므로 이때 내피세포내로 Ca^{++} 의 유입통로는 Na^+/Ca^{++} exchange를 통해서 이루어진다고 보고하였다. 또한 이때의 이완반응이 기존의 “내피세포 유래 이완인자”(Endothelium-derived Relaxing Factor; 이하 “EDRF”로 표기) 억제제로 알려진 hemoglobin에 의해 차단되므로 Mg^{++} 결핍에 의한 내피세포 의존성의 혈관 확장반

응은 EDRF의 유리에 의한 것으로 제시하였다. 그러나 내피세포내에서 Ca^{++} 의 유입에 의해 매개되는 혈관 확장물질에는 EDRF 뿐만 아니라 prostacycline(이하 “ PGI_2 ”로 표기)도⁴⁻⁶⁾ 있다. 그러나 이들이 혈관평활근을 확장시키는 작용기전과 억제제들에 있어서는 서로 차이가 있다.

즉, EDRF는 평활근 세포막에서 guanylate cyclase를 자극하므로서 이완반응을 초래하며, 동물의 중 및 혈관의 종류에 관계없이 이완반응을 초래한다.⁷⁾ 또한 EDRF는 반감기가 6초 정도의 불안정한 물질로서 화학적 본질은 아직까지 정확히 규명되지 못하였으나, phospholipase A_2 억제제인 quinacrine, p-bromophencacyl bromide 등에 의해 그리고 lipoxygenase 억제제인 nordihydroguaiaretic acid(이하 “NDGA”로 표기), 5, 8,

11, 14-eicosatetraenoic acid (ETYA) 등에 의해 EDRF 유리에 의한 이완반응이 차단되므로 일부 phospholipid로부터 유리된 arachidonic acid의 lipoxygenase 산화물중 불안정한 중간체인 hydroperoxide나 free radical이 EDRF일 것이라고 제시되어 왔으며,⁸⁾ 그밖에도 aldehyde, nitric oxide 등이 EDRF의 후보로서 논의되고 있다.⁹⁾

이에 반해 PGI₂는 평활근 세포막에서 adenylate cyclase를 자극하므로서 이완반응을 초래하며, 동물의 종 및 혈관의 종류에 따라 선택적으로 혈관확장을 나타낸다.⁷⁾ 또한 이때의 이완반응은 cyclo-oxygenase 억제제인 indomethacin, aspirin 등에 의해 억제되므로서 PGI₂는 arachidonic acid의 cyclo-oxygenase 산화물에 속하는 prostaglandin류의 일종으로 알려져 있다. 따라서 Mg⁺⁺ 결핍에 의한 내피세포 의존성의 이완반응이 PGI₂의 유리에 의한 것인지 또는 EDRF의 유리에 의한 것인지를 보다 확실하게 규명코자 본 실험을 실시하였다.

이를 위해 PGI₂의 합성을 억제하는 ibuprofen과 tranlycypromine을 전처치 또는 후처치하였으며, EDRF의 생성을 억제하는 것으로 알려진 quina-crine, NDGA 및 EDRF의 작용을 억제하는 methylene blue를 전처치 또는 후처치시 Mg⁺⁺ 결핍에 의한 이완반응에 미치는 영향을 검토하였다. 또한 이들 약물의 차단효과를 기존의 대표적인 EDRF 유리에 의한 혈관확장제인 acetylcholine에 대해서도 검토하므로서 Mg⁺⁺ 결핍에 의한 이완반응과 비교하였다.

실험방법

체중 20-30 kg의 Mongrel 종 개에게 pentobarbital sodium (30 mg/kg)을 heparin (20,000U)과 혼합한 후 대퇴정맥에 주사하여 마취시켰다. 흉곽을 개방하고 심장을 절개하여 신속히 꺼낸 후 Krebs-Henseleit 생리용액(조성; NaCl, 118; KCl, 4.8; KH₂PO₄, 1.0; MgSO₄·7H₂O, 1.2; NaHCO₃, 27.2; CaCl₂, 1.75; glucose, 11.1; Na₂ EDTA, 0.03 mM)을 관류시켜 혈액을 제거하였다. 외부직경 1.5-2.5 mm의 관상동맥을 분리하여 현미경하에서 혈관내에 손상이 가지 않도록

하면서 주위조직을 깨끗이 제거하였다. 약 5 mm 정도 길이의 혈관고리를 만들어 기 보고된 Ku 등³⁾의 방법에 따라 Krebs-Henseleit 생리용액을 함유한 10 ml용 organ bath내에 신속히 현수하였다. 즉, 37°C를 유지하고 95% O₂-5% CO₂ 혼합가스를 포화시킨 생리용액중에서 혈관조직의 한쪽은 organ bath내에 고정하고 다른쪽은 force displacement transducer (Grass FT. 03C)에 연결하여 isometric tension 변화를 physiograph (Grass model 7C)상에 기록하였다. 실험 시작하기 전 90 분 동안 혈관을 안정화시켰다. 우선 Mg⁺⁺ 결핍에 의한 혈관 수축 및 이완반응을 확인하기 위해 PGF_{2α} 1 μM을 가하여 수축을 일으킨 후 정상적인 Krebs-Henseleit 생리용액중의 MgSO₄ 1.2 mM 대신에 Na₂SO₄ 1.2 mM을 함유한 'Mg⁺⁺ 결핍 Krebs-Henseleit 생리용액'(조성; NaCl, 118; KCl, 4.6; NaHCO₃, 27.2; Na₂SO₄, 1.2; KH₂PO₄, 1.2; CaCl₂, 1.75; glucose, 11.1; Na₂ EDTA, 0.03 mM)으로 바꾸어 가하여 이완반응을 확인하였다. 세척 후 약 40분간 휴식시킨 후 동일한 혈관을 사용하여 나무막대로 혈관 내면을 부드럽게 비벼주므로서 내피세포를 제거하고 이어서 역시 'Mg⁺⁺ 결핍 Krebs-Henseleit 생리용액'을 처치하여 혈관 수축반응을 확인하였다.

이때 내피세포의 제거 여부는 acetylcholine 0.1 μM을 가할 때 이완반응이 나타나지 않으므로서 확인하였다. 또한 내피세포가 존재하는 새로운 혈관으로 Mg⁺⁺ 결핍에 의한 이완반응을 40분 간격으로 휴식시키면서 3회 연속적으로 반복 실험하였다.

이어서 PGI 생성 억제제인 ibuprofen 또는 tranlycypromine을 전처치 및 후처치한 뒤 위와 동일한 방법으로 Mg⁺⁺ 결핍실험을 하였다. 또한 EDRF 억제제로 알려진 quinacrine, NDGA, methylene blue를 비롯하여, Ca⁺⁺ uptake 차단제인 trifluoperazine을 전처치 및 후처치하여 Mg⁺⁺ 결핍실험을 하였다.

한편, acetylcholine에 의한 내피세포 의존성 이완반응에 대해서도 상기 약물들의 영향을 검토하므로서 Mg⁺⁺ 결핍에 의한 이완반응 기전과 비교하였다.

약물; PGF_{2α}, ibuprofen, tranlycypromine, quinacrine, trifluoperazine, NDGA, methylene

blue, acetylcholine iodide 등의 시약은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO)으로부터 구입하여 사용하였다. Acetylcholine iodide는 sodium acetate buffer (pH 4.0)에 용해하여 4°C로 저장한 후 사용하였으며, 기타 시약은 용시조제하였다.

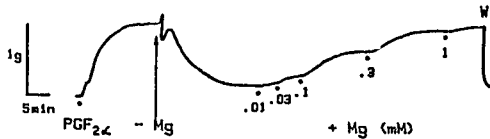
통계처리; 모든 수치들은 means±S. E. M.로 나타내었다. 각 실험군은 2마리의 다른 개에서 얻은 6-12개의 다른 혈관을 사용하였다. 통계처리는 unpaired student's t test로 실시하였다.

결 과

개의 내피세포가 손상되지 않은 관상동맥을 PGF_{2α} 1μM로 처치하여 약 1g 정도 tension의 수축을 시킨 후, 'Mg⁺⁺ 결핍 Krebs-Henseleit 생리용액'을 작용시켰을 때 서서히 혈관 확장반응을 나타내었으며 약 20분 후 최대로 확장되어 원래 수축시에 비해 80±9%의 이완을 초래하였다. 이완반응이 완전히 초래된 후에 MgCl₂를 용량별로 투여하였을 때 1mM 농도에서 거의 원래의 tension 수준으로 회복되므로서 Mg⁺⁺ 결핍에 기인된 이완반응이었음을 확인하였다.

반면에 내피세포가 손상된 혈관에서는 Mg⁺⁺의 결핍시 약 1.2±0.2g 정도의 수축반응을 나타내었

A. Intact Endothelium



B. Disrupted Endothelium

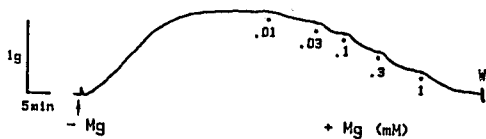
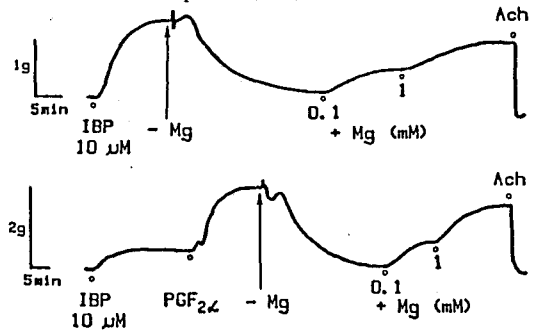


Fig. 1—Typical tracings of Mg⁺⁺-deficiency induced dual vascular effects in isolated canine coronary arteries with intact or disrupted endothelium. (A) Mg⁺⁺-deficiency induced vasorelaxations in PGE_{2α} 1μM-precontracted, endothelium-intact coronary arteries. (B) Mg⁺⁺-deficiency resulted vasoconstrictions in endothelium disrupted coronary arteries.

으며, 이것은 KCl 70mM에 의한 최대 수축반응의 약 25%에 해당하는 수준이었다. 역시 이 수축반응도 후에 다시 MgCl₂를 첨가시 용량 의존적으로 이완되어 원래의 tension 수준으로 회복되므로서 수축반응이 Mg⁺⁺ 결핍에 기인되었음을 확인하였다 (Fig. 1).

Prostaglandins 생성 억제제인 ibuprofen 10 μm로 전처리한 경우에는 Mg⁺⁺ 결핍에 의한 이완반응이 영향을 받지 않았다. 이 경우 PGF_{2α} 1μM로 미리 수축을 시키거나 또는 PGF_{2α}로 미리 수축을 시키지 않고 ibuprofen만을 단독 투여하므로서

A. Effects of Ibuprofen (IBP)



B. Effects of Tranlycypromine (TCP)

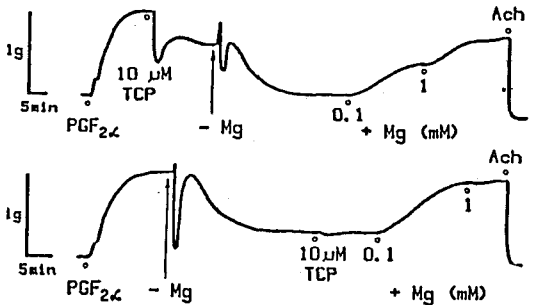


Fig. 2—Typical tracings of the effects of ibuprofen or tranlycypromine on vasorelaxation by Mg⁺⁺-deficiency in canine coronary arteries with intact endothelium.

(A) Mg⁺⁺-deficiency induced vasorelaxation on basal tension (top) and on contractions induced by PGF_{2α} 1μM (bottom) in the presence of 10 μM ibuprofen.

(B) Pretreatment of 10 μM tranlycypromine did not inhibit vasorelaxant effects of Mg⁺⁺-deficiency (top) and addition of tranlycypromine following Mg⁺⁺-removal also did not reverse the latter vasorelaxant effect (bottom).

Ach indicates the addition of acetylcholine 0.1 μM.

초래된 자발적인 수축의 경우에 있어서도 모두 Mg^{++} 결핍에 의해 이완반응을 초래하였다. 또한 PGI_2 생성 억제제인 tranlycypromine의 전처치시 Mg^{++} 결핍은 영향을 받지않고 그대로 이완반응을 초래하였으며, Mg^{++} 결핍에 의해 이완이 이미 초래된 후에 tranlycypromine $10 \mu M$ 을 후처치한 경우에도 회복되지 않고 Mg^{++} 결핍에 의한 이완반응이 그대로 유지되었다(Fig. 2).

한편, EDRF 억제제인 quinacrine $10 \mu M$ 로 전처치한 경우 Mg^{++} 결핍에 의해 이완반응이 차단되었으며, $MgCl_2$ 를 다시 첨가시에도 수축반응을 나

타내지 않았다. 또한 quinacrine $10 \mu M$ 을 Mg^{++} 결핍에 의한 이완반응이 초래된 후에 처치한 경우에 있어서도 원래의 tension 수준으로 서서히 회복되므로서 억제효과를 나타내었다.

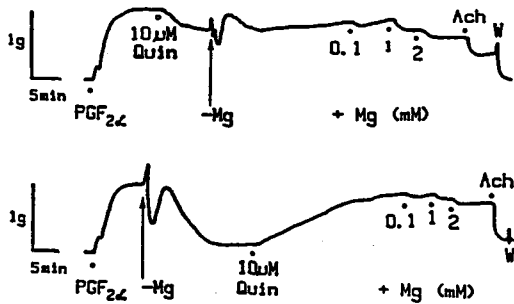
그러나 trifluoperazine $10 \mu M$ 로 전처치 및 후처치한 경우에는 각각 Mg^{++} 결핍에 의한 이완반응이 그대로 나타내므로서 억제효과를 나타내지 않았으며, $MgCl_2$ 0.1 및 1mM을 각각 첨가시에도 점차 원래의 tension으로 회복되므로서 Mg^{++} 결핍에 의한 이완반응이 trifluoperazine에 의해 영향을 받지 않았음을 나타내었다(Fig. 3).

또한 NDGA $10 \mu M$ 의 전처치에 의해서는 Mg^{++} 결핍에 의한 이완반응이 영향을 받지않았으나, 이완반응 후에 $MgCl_2$ 를 2mM까지 다시 첨가시에도 원래의 tension으로 완전히 회복되지 않음으로서 NDGA 전처치시에도 나타난 이완반응은 NDGA 자체의 이완반응에 기인되었음을 제시해 주었다.

한편 Mg^{++} 결핍에 의해 이미 이완반응이 초래된 후 NDGA $10 \mu M$ 을 후처치한 경우에는 신속히 수축되어 원래의 tension으로 회복되었으며 $MgCl_2$ 를 다시 첨가시에도 이완을 초래하지 않으므로서 NDGA에 의해 Mg^{++} 결핍에 의한 이완반응이 결핍되었음을 알 수 있었다(Fig. 4).

더구나 Mg^{++} 결핍실험을 여러번 반복하여 더이

A. Effects of Quinocrine (Quin)



B. Effects of Trifluoperazine (TFP)

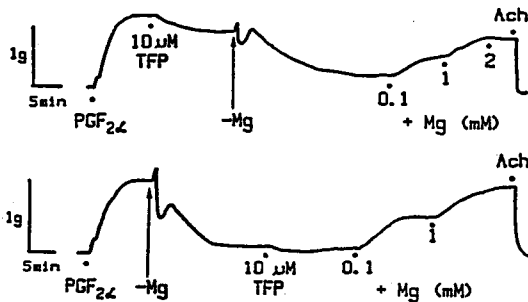


Fig. 3—Typical tracings of the effects of quinacrine or trifluoperazine on vasorelaxation by Mg^{++} -deficiency in $PGF_{2\alpha}$ $1 \mu M$ -precontracted, endothelium intact rings of canine coronary arteries.

(A) Pretreatment of $10 \mu M$ quinacrine abolished Mg^{++} -deficiency induced vasorelaxant response (top), while addition of quinacrine following Mg^{++} removal resulted in a complete reversal of the latter vasorelaxant effect (bottom).

(B) Pretreatment of $10 \mu M$ trifluoperazine failed to inhibit Mg^{++} -deficiency induced vasorelaxation (top) and addition of trifluoperazine following Mg^{++} -removal also did not reverse the latter vasorelaxant effect (bottom).

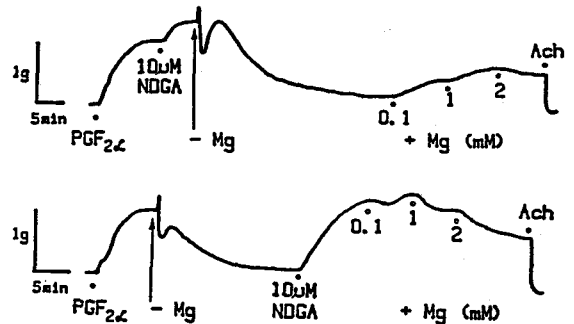


Fig. 4—Typical tracings of the effects of nordihydroguaiaretic acid (NDGA) on Mg^{++} deficiency-induced vasorelaxation in $PGF_{2\alpha}$ $1 \mu M$ -precontracted, endothelium-intact rings of canine coronary arteries. Pretreatment of NDGA did not block the vasorelaxation by Mg^{++} -deficiency, but subsequent recovery with the re-addition of Mg^{++} was significantly attenuated (top). Addition of NDGA following Mg^{++} -removal completely reversed the latter vasorelaxant effect (bottom).

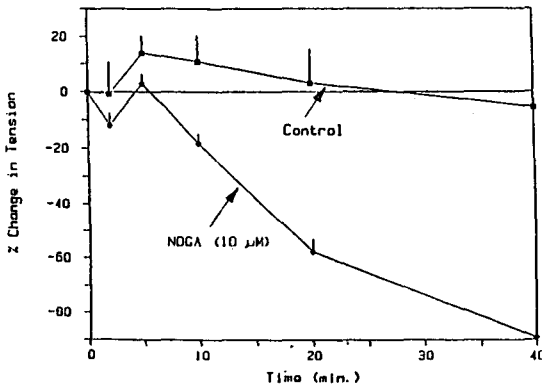


Fig. 5—Pretreatment of $10 \mu M$ NDGA before Mg^{++} removal was still resulted vasorelaxation in coronary arteries which were desensitized after three times repeated Mg^{++} -deficiency test (see Fig. 8). The magnitude of Mg^{++} -deficiency induced vasorelaxant effects were normalized as percent change from the initial $PGF_{2\alpha} 1 \mu M$ -induced contraction. Each data point represents the mean of 6 separate coronary preparations. Vertical lines denote the standard error of the mean (SEM).

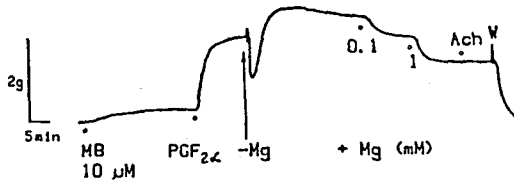


Fig. 6—Typical tracings of the effects of methylene blue on Mg^{++} -deficiency induced vasorelaxation in $PGF_{2\alpha} 1 \mu M$ -precontracted, endothelium-intact rings of canine coronary arteries. Methylene blue $10 \mu M$ was added to bath chambers for 40 minutes before Mg^{++} -removal. The tracing is illustrated that pretreatment of methylene blue completely abolished the relaxant effects of Mg^{++} -deficiency and acetylcholine $0.1 \mu M$.

상 Mg^{++} 결핍에 의해 이완을 초래하지 않는 혈관에 있어서도 NDGA $10 \mu M$ 를 전처치시에는 Mg^{++} 결핍에 의해 이완반응이 초래되므로서 NDGA 자체의 이완반응을 확인하였다(Fig. 5).

Methylene blue $10 \mu M$ 를 전처치한 경우에는 Mg^{++} 결핍에 의한 이완반응이 차단되었다. 이것은 acetylcholine의 경우에서도 마찬가지로 단독투여시 100%의 이완반응을 나타내던 $0.1 \mu M$ 농도에서조차도 전혀 이완반응을 초래하지 않았다(Fig. 6).

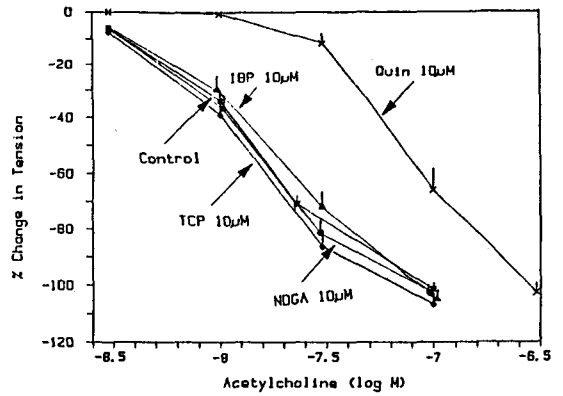


Fig. 7—Effects of ibuprofen, tranlycypromine, quinacrine and NDGA on acetylcholine induced vasorelaxation in isolated canine coronary arteries with intact endothelium. Relaxation is expressed as percentage of decrease in submaximal tone elicited by $PGF_{2\alpha} 1 \mu M$. Each data point represents the mean of 8 coronary artery preparations. Vertical lines denote the standard error of the mean (SEM). The values obtained by acetylcholine were significantly different from control values ($p < 0.001$) only for the pretreatment of quinacrine.

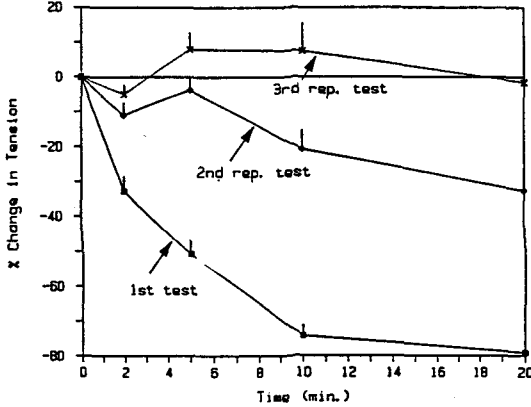
또한 acetylcholine의 용량반응곡선으로 나타낸 이완반응은 quinacrine으로 전처치시 유의성있게 억제되었으나($p < 0.005$), ibuprofen, tranlycypromine, NDGA로 전처치시에는 영향이 없었다(Fig. 7).

Mg^{++} 결핍에 의한 이완반응을 동일한 혈관으로 반복실험한 결과 이완반응은 점차 감소하여 세번째 반복실험시에는 거의 이완반응이 초래되지 않았다.

반면에, acetylcholine에 의한 이완반응은 Mg^{++} 결핍에 의한 이완반응보다 비교적 신속하게 나타나며 $0.1 \mu M$ 에서 100% 이완반응을 나타내었다. 또한 acetylcholine에 의한 이완반응을 3회에 걸쳐 반복실험시 Mg^{++} 결핍과는 달리 이완반응이 약화되지 않았다(Fig. 8).

고 찰

$PGF_{2\alpha}$ 로 사전에 수축시킨 개의 관상동맥에서 Mg^{++} 결핍시 내피세포 의존성의 이완반응을 초래한다는 것은 Ann 등¹¹⁾의 기 보고내용과 일치하는 것이다. 즉 내피세포가 존재시에는 이완반응을 초래한

A. Effects of Repeated Mg^{++} Deficiency Test

B. Effects of Repeated Acetylcholine Test

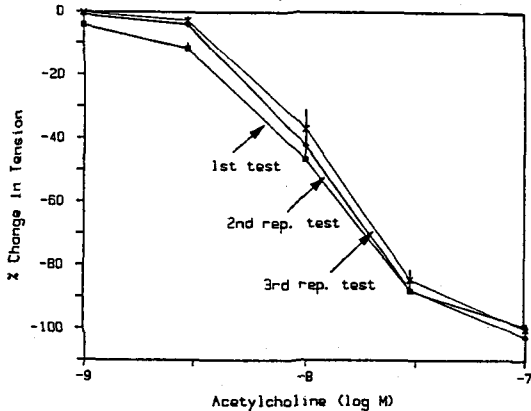


Fig. 8—Effects of repeated Mg^{++} -deficiency (top) and acetylcholine (bottom) test in $PGF_{2\alpha}$ $1\mu M$ -precontracted, endothelium-intact rings of canine coronary arteries. Vasorelaxation responses of Mg^{++} -deficiency were progressively decreased with repeated Mg^{++} -deficiency tests, whereas those of acetylcholine were not. Each data point represents the mean of 12 separate coronary artery preparations. Vertical lines denote the standard error of the mean (SEM).

반면에 내피세포가 손상시에는 수축반응을 초래하였다. Ku 등³⁾은 내피세포 존재시 Mg^{++} 결핍에 의한 이완반응은 내피세포막에서 Na^+/Ca^{++} exchange를 통한 Ca^{++} 의 유입 때문이며 내피세포 손상시 Mg^{++} 결핍에 의한 수축반응은 평활근 세포막에서 voltage dependent Ca^{++} channel을 통한 Ca^{++} 유입의 증가 때문이라고 보고하였다. 또한 Mg^{++} 결핍에 의한 이완반응이 기존의 EDRF 억제제인 hemoglobin, dichlorobenzamil 등에 의해 차단되

므로, Mg^{++} 결핍에 의한 내피세포 의존성의 이완반응은 EDRF의 유리에 의해서라고 제시하였다. 그러나, 전에 Altura 등^{10,11)}은 개의 관상동맥에서 Mg^{++} 결핍시 수축반응이 초래된다고만 보고하였을 뿐 이완반응을 발견하지 못하였었다. 이것은 실험조각상의 문제로 인해 내피세포가 손상된 혈관으로부터 얻어진 결과로 추정되며, 1980년 Furchgott 등⁸⁾에 의해서 보고된 바와 같이 내피세포의 존재여부가 혈관의 수축 및 이완반응에 있어 중요한 역할을 한다는 것을 인식하지 못한 때문일 것이다.

한편 내피세포내에서는 혈관 확장물질인 EDRF 뿐만 아니라 PGI_2 도 또한 유리될 수 있으므로¹²⁾ Mg^{++} 결핍에 의한 내피세포 의존성의 이완반응이 PGI_2 에 의한 것인지 또는 EDRF에 의한 것인지를 보다 규명코자 PGI_2 의 합성을 억제하는 ibuprofen과 tranlycypromine을 전처치 또는 후처치하였으며, EDRF의 생성을 억제하는 것으로 알려진 quinacrine, NDGA 그리고 EDRF의 작용을 억제하는 methylene blue를 전처치 또는 후처치하여 Mg^{++} 결핍에 의한 이완반응에 미치는 영향을 검토하였다. 이렇게 arachidonic acid 대사과정의 차단제들을 전처치 또는 후처치한 것은 PGI_2 와 EDRF가 모두 arachidonic acid의 대사물이기 때문이다. 즉, PGI_2 는 phospholipid로부터 유리된 arachidonic acid의 cyclo-oxygenase와 PGI_2 synthetase 대사산물이며,¹³⁾ EDRF는 아직까지 화학적 본질이 뚜렷하게 규명되지는 못했으나 arachidonic acid의 lipoxigenase 산화물중 불안정한 중간체인 hydroperoxide나 free radical일 것이라고 제시되어 왔다.^{8,14)}

따라서 Mg^{++} 결핍에 의한 이완반응이 PGI_2 에 의한 것인가를 확인하기 위해 cyclo-oxygenase 억제제인 ibuprofen¹⁵⁾과 PGI_2 synthetase 억제제인 tranlycypromine¹⁶⁾으로 전처치 또는 후처치를 한 바 영향이 없으므로 Mg^{++} 결핍에 의한 이완반응의 원인물질은 PGI_2 가 아님을 확인하였다. 이에 반해 기존의 EDRF 억제제로 알려져 왔으며, phospholipid로부터 arachidonic acid 합성에 관여되는 phospholipase A_2 억제제인¹⁷⁾ 동시에 Ca^{++} uptake 차단작용을^{18,19)} 지닌 quinacrine을 전처치 또는 후처치한 바 모두 억제효과를 나타내었다. 이때 나타난 억제효과가 quinacrine의 phos-

pholipase A_2 억제작용 때문인지 또는 Ca^{++} uptake 차단작용 때문인지를 규명하기 위해 quinacrine과 유사하게 Ca^{++} uptake 차단작용을 지닌 trifluoperazine으로 전처치 및 후처치하였다. Quinacrine과 trifluoperazine은 흰쥐의 대뇌피질 synaptosomes에서 탈분극(고 K^+)시 초래되는 Ca^{++} influx를 억제한다고 하였다.¹⁹⁾ 따라서 이들은 voltage dependent Ca^{++} channel을 통한 Ca^{++} 의 유입을 억제하는 것으로 고려된다. 그런데 앞에서 설명한 바와 같이 Mg^{++} 결핍시 내피세포막을 통한 Ca^{++} 의 유입은 voltage dependent Ca^{++} channel이 아니라 Na^+/Ca^{++} exchange를 통해서 이루어진다.³⁾ 그럼에도 불구하고 quinacrine은 Mg^{++} 결핍에 의한 내피세포 의존성의 이완반응을 억제하였으나 trifluoperazine은 영향이 없었다. 따라서 quinacrine의 차단효과는 탈분극시의 Ca^{++} uptake 차단효과 때문이 아니라 다른 효과인 phosphodiesterase A_2 억제효과에 기인된 것으로 고려된다. 이를 뒷받침해주는 다른 근거는 quina-crine과 trifluoperazine의 흰쥐 뇌에서 cal-modulin에 의해 자극된 phosphodiesterase에 대한 억제효과를 비교시 quinacrine이 trifluoperazine보다 5배 더 크다고 보고되었기 때문이다.¹⁹⁾

또한 lipoxygenase 억제작용을 지닌 NDGA²⁰⁾로 전처치시에는 Mg^{++} 결핍에 의한 이완반응에 영향이 없었으나, 후처치시에는 가역적으로 원래의 tension 수준으로 신속히 회복되었다. 그러나 NDGA 자체가 EDRF를 유리하는 이완효과를 지닌 것으로 알려져 있으며²¹⁾ 본 실험결과에서도 나타난 바와 같이 Mg^{++} 결핍의 반복실험에 의해 더이상 이완되지 않는 혈관에서도 NDGA의 전처치에 의해 이완을 초래하였음을 고려해 볼 때, Mg^{++} 결핍에 의한 이완반응에 NDGA의 전처치가 효과가 없었음은 NDGA 자체의 이완작용에 기인된 때문으로 고려된다. Mg^{++} 결핍에 의한 이완반응이 PGI_2 가 아니라 EDRF의 유리에 의한 것임을 입증한 또 다른 증거는 methylene blue의 전처치시 Mg^{++} 결핍에 의한 이완반응이 억제되었다는 것이다. 즉, EDRF의 유리에 의한 혈관 이완반응은 평활근 세포막의 guanylate cyclase를 자극하므로써 c-GMP의 증가에 기인되는 반면, PGI_2 의 유리에 의한 이완반응은 adenylate cyclase의 자극에 의한 c-AMP의 증

가에 기인된다는 것으로 알려져 있으므로²²⁾ guanylate cyclase 억제제인 methylene blue²³⁾의 전처치에 의한 억제효과는 EDRF가 이완물질로 작용하였음을 지지해 준다. 이러한 Mg^{++} 결핍에 의한 이완반응에 대한 EDRF 억제제인 quinacrine, NDGA, methylene blue 등의 억제효과는 비록 동물의 종 및 혈관의 종류에 따라 차이가 있기는 하지만 EDRF 유리에 의한 혈관확장제들로 알려진 acetylcholine, calcium ionophore A28137, thrombin, histamine, ATP 등에서의 억제효과와 유사하다. 즉 acetylcholine에 의한 이완반응도 Mg^{++} 결핍시의 이완반응에서와 같이 quinacrine, methylene blue의 전처치에 의해서는 억제되었으나, ibuprofen, tranlycypromine, NDGA의 전처치에 의해서는 영향이 없었다. 그러나 Mg^{++} 결핍에 의한 이완반응은 반복실험시 점차 감소되어 세번째에는 거의 이완을 초래하지 않았으나, acetylcholine에 의한 이완반응은 세번째의 반복실험에서도 거의 재현성을 나타내므로써 차이점을 나타내었다. 물론 이 원인이 Mg^{++} 결핍실험시 이완되는데 걸린 시간이 acetylcholine의 실험에서 보다 길었기 때문에 유리될 EDRF의 결핍이 초래된 때문인지, 또는 내피세포의 손상 정도에 대한 Mg^{++} 결핍시의 민감성이 크기 때문인지 여부는 뚜렷치 않다. 즉, 예를 들면 Mg^{++} 결핍시에는 대부분의 내피세포가 EDRF를 유리하므로써 보다 빨리 결핍되어 반복실험시 민감성이 떨어지는 반면에 acetylcholine의 경우에는 일부의 내피세포에서만 이 EDRF를 유리할 경우 보다 느리게 민감성이 감소될 수 있다는 가설이다.²⁵⁾

물론 기존의 EDRF 유리에 의한 혈관확장제중에서 thrombin 등은 일부 효소의 기질유리에 의해 작용하므로써 반복실험시 Mg^{++} 결핍시와 같이 점차 이완반응이 감소되는 것으로 알려진 경우도 있다.²⁶⁾

위의 결과를 종합하여 보면 개의 관상동맥에서 Mg^{++} 결핍에 의한 내피세포 의존성의 이완반응은 Mg^{++} 결핍에 의해 내피세포내 Ca^{++} 의 유입증가, phospholipase A_2 의 유리증가, arachidonate의 유리, EDRF의 합성, 평활근세포에서 guanylate cyclase의 활성화의 순서를 거쳐 결국 혈관 평활근의 이완반응이 초래하게 된 것이다.

결 론

개의 관상동맥에서 Mg^{++} 결핍시 초래된 내피세포 의존성의 이완반응은 기존의 EDRF 억제제인 quinaquine(phospholipase A_2 억제제) 및 NDGA(lipoxygenase 억제제) 및 methylene blue(guanylate cyclase 억제제)에 의해서는 차단되었으나, PGI_2 생성을 억제하는 ibuprofen(cyclo-oxygenase 억제제) 및 tranilcypromine(PGI_2 synthetase 억제제)에 의해서는 영향을 받지 않았다. 또한, 이 결과는 기존의 EDRF 유리에 의한 혈관확장제인 acetylcholine과도 유사하므로서 Mg^{++} 결핍에 의한 내피세포 의존성의 이완반응은 내피세포로부터 PGI_2 의 유리에 의해서가 아니라 EDRF의 유리에 의한 것임을 입증하였다.

그러나 acetylcholine에 의한 이완반응에서와는 달리 반복실험시 Mg^{++} 결핍에 의한 이완반응은 점차 약화되어 재현성이 쉽게 없어지므로서 차이점을 나타내었다.

감사의 말씀

이 논문은 1987년도 문교부 학술연구조성비 지원에 의해 이루어졌으며, 이에 감사드립니다.

문 헌

- 1) Ann, H.S. and Ku, D.D.: Magnesium inhibits basal release of endothelium-derived relaxing factor in canine coronary arteries. *Eur. J. Pharmacol.* **130**, 353 (1986).
- 2) Turlapathy, P.D.M.V. and Altura, B.M.: Extracellular magnesium ions control calcium exchange and content of vascular smooth muscle. *Eur. J. Pharmacol.* **52**, 421 (1978).
- 3) Ku, D.D. and Ann, H.S.: Magnesium deficiency produces endothelium-dependent vasorelaxation in canine coronary arteries. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **241**, 961 (1987).
- 4) Weksler, B.B., Marcus, A.J., Jaffe, E.A.: Synthesis of prostaglandin I_2 (prostacycline) by cultured human and bovine endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **74**, 3922 (1977).

- 5) Moncada, S., Herman, A.G., Higgs, E.A., Vane, J.R.: Differential formation of prostacyclin (PGI_2) by layers of the arterial wall. An explanation for the antithrombotic properties of vascular endothelium. *Throm. Res.* **11**, 323 (1977).
- 6) Taylor, G.W., Chappell, C.G., Frazer, C.E. and Itter, J.M.: Prostacyclin synthesis by vascular tissue. Effect of extracellular Ca^{++} . *Biochem. J.* **239**, 237 (1986).
- 7) Furchgott, R.F.: Role of endothelium in responses of vascular smooth muscle. *Circulation Res.* **53**, 557 (1983).
- 8) Furchgott, R.F. and Zawadzki, J.V.: The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature (Lond.)* **286**, 373 (1980).
- 8) Furchgott, R.F.: Role of endothelium in responses of vascular smooth muscle. *Circulation Res.* **53**, 557 (1983).
- 9) Greenberg, S. and Dlecke, F.P.J.: Endothelium-derived relaxing and contracting factors; New concepts and new findings. *Drug Dev. Res.* **12**, 131 (1988).
- 10) Altura, B.M. and Alutra, B.T.: Magnesium and vascular tone and reactivity. *Blood Vessels* **15**, 5 (1978).
- 11) Turlapathy, P.D.M.V. and Altura, B.M.: Magnesium deficiency produces spasm of coronary arteries: Relationship to etiology of sudden death ischemic heart disease. *Science (Wash, DC)* **208**, 198 (1980).
- 12) Moncada, S. and Vane, J.R.: Prostacyclin (PGI_2), the vascular wall and vasodilation. In: mechanism of vasodilation. edited by Vanhoutte, P.M. and Leusen, I. Basel: Karger, p. 107 (1978).
- 13) Dusting, G.J., Moncada, S. and Vane, J.R.: Prostacyclin (PGX) is the endogenous metabolite responsible for relaxation of coronary arteries induced by arachidonic acid. *Prostaglandins* **13**, 3 (1977).
- 14) Singer, H.A. and Peach, M.J.: Endothelium-dependent relaxation of rabbit aorta. I. Relaxation stimulated by arachidonic acid. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **226**, 790 (1983).
- 15) Higgs, G.A., Vane, J.R. Hart, F.D. and Wojtulewski, J.A.: Effects of anti-inflammatory drugs on prostaglandins in rheumatoid arthritis. In, Prostaglandin Synthetase Inhibitors. edited by Robinson, H.J. and Vane, J.R. Raven Press, New York, p. 165 (1974).

- 16) Hong, S.L., Carty, T. and Deykin, D.: Tranylcypro-
mine and 15-hydroperoxyarachidonate affect arachi-
donic acid release in addition to inhibition of prosta-
cyclin synthesis in calf aortic endothelial cells. *J.*
Biol. Chem. **255**, 9538 (1980).
- 17) Flower, R.J. and Blackwell, C.J.: The importance of
phospholipase A_2 in prostaglandin biosynthesis. *Bio-*
chem. Pharmacol. **25**, 285 (1975).
- 18) Lauffer, L., Weber, K. and Hucho, F.: Binding pro-
perties and ion permeability response after covalent
attachment of the local anaesthetic quinacrine. *Bio-*
chemica et Biophysica Acta, **587**, 42 (1979).
- 19) Baba, A., Ohta, A. and Iwata, H.: Inhibition by quin-
acrine of depolarization-induced acetylcholine re-
lease and calcium-influx in rat brain cortical synap-
tosomes. *J. Neurochem.* **40**, 1758 (1983).
- 20) Furchgott, R.F., Zawadzki, J.V., Jothianandan, D.
Cherry, P.D.: Nordihydroguaiaretic acid (NDGA)
and p-dibromoacetophenone (BPB) inhibit endothe-
lium-dependent relaxation of arteries by acetylcho-
line, bradykinin and A23187 (abstr). *Fed. Proc.* **41**,
1233 (1982).
- 21) Furchgott, R.F., Cherry, P.D. and Zawadzki, J.V.:
Endothelium dependent relaxation of arteries by ace-
tylcholine, bradykinin and other agents. In *Vascular*
Neuroeffector Mechanisms: 4th International Sym-
posium, edited by Bevan, J.A., Fujiwara, M., Max-
well, R.A., Mohri, K., Shibata, S. and Toda, N. New
York, Raven Press, p. 37 (1983).
- 22) Furchgott, R.F. and Jothianandan, D.: Relation of
cyclic GMP levels to endothelium-dependent relaxa-
tion by acetylcholine in rabbit aorta. (abstr). *Fed.*
Proc. **42**, 619 (1983).
- 23) Grutter, C.A., Kadowitz, P.J. and Ignarro, L.J.: Me-
thylene blue inhibits coronary arterial relaxation and
guanylate cyclase activation by nitroglycerin, so-
dium nitrite and amyl nitrite. *Can. J. Physiol. Phar-*
macol. **59**, 150 (1981).
- 24) Furchgott, R.F.: Role of endothelium in responses of
vascular smooth muscle to drugs. *Ann. Rev. Phar-*
macol. Toxic. **24**, 175 (1984).
- 25) Peach, M.J., Singer, H.A. and Loeb, A.L.: Mecha-
nisms of endothelium-dependent vascular smooth
muscle relaxation. *Biochem. Pharmacol.* **34**, 1867
(1985).
- 26) Ku, D.D.: Coronary vascular reactivity after acute
myocardial ischemia. *Science* **218**, 576 (1982).