

## 쥐 흉부대동맥 수축에 미치는 모노- 및 디메틸아르기닌의 영향

박연호 · 박선미 · 김용기 · 이향우<sup>#</sup>

성균관대학교 약학대학

(Received February 26, 1993)

### *In vitro* Effects of Mono- and Dimethylarginines on the Contractility of Rat Thoracic Aorta

Youn Ho Park, Sun Mee Park, Yong Kee Kim and Hyang Woo Lee<sup>#</sup>

Department of Biochemistry, College of Pharmacy, Sung Kyun Kwan University, Suwon 440-746, Korea

**Abstract**—In order to study the functions of vascular endothelial nitric oxide(NO) generating system, we examined the effects of monomethylarginine(MMA) and dimethylarginine(DMA)(asym., sym.), arginine analogues, on modulation of vascular tone. Also, the concentrations of endogenous arginine and MMA were measured by HPLC in rat aortic tissues.

The results were as follows.

1. The maximum relaxation induced by Ach ( $1.5 \times 10^{-6}$ M) was 80% of the contractility of rings of rat aorta induced by phenylephrine and L-Arg causes endothelium-dependent relaxation of the aorta precontracted with phenylephrine and these relaxation were concentration-dependent.

2. Endothelium-dependent contractility of rings of rat aorta induced by MMA (100  $\mu$ M), DMA (asym., 100  $\mu$ M) and DMA (sym., 100  $\mu$ M) were 25.5%, 27.5% and 16.5% of that induced by phenylephrine respectively.

3. The relaxation of rat aortic ring induced by L-Arg was inhibited by MMA, DMA(asym.) and DMA(sym.). The degrees of inhibition induced by MMA, DMA(asym.) and DMA(sym.) were 45.7%, 37.1% and 18.3%, respectively.

4. The endogenous arginine and monomethylarginine contents in rat aorta were 83 pmoles/mg wet tissue, and 34.9 pmoles/mg wet tissue. After stimulation with Ach, the concentrations of L-Arg and MMA were significantly decreased.

These results suggest that there are the strong relationships between the endogenous L-Arg and methylated arginines and NO-generating system.

**Keywords** □ Nitric oxide, EDRF, Arginine, Monomethylarginine, Dimethylarginine (asym., sym.).

Nitric Oxide(NO)는 생리적 수용액에서 6~10초의 짧은 반감기를 갖는 매우 불안정한 화합물로 모든 생체 조직내에서 L-arginine으로 부터 citrulline을 형성하는 과정에서 생성되며 endothelial cell, macrophage, liver cell (Kupffer cell), EMT-6 adenocarcinoma cell, neutrophils, brain 등 다양한 cell type에서 발견되었다. 이러한 NO의 생체 내 작용을 대별하면

macrophage 또는 phagocyte 등에서 cytotoxic 효과,<sup>2,4)</sup> 뇌에서 neurotransmitters로의 작용<sup>3,1)</sup> 그리고 혈관 endothelial cell에서의 혈관 이완작용<sup>14)</sup> 등이 보고되고 있다.

Hibbs 등이 endotoxin, bacterial cell wall의 lipopolysaccharide, tumor necrosis factor,<sup>1)</sup>  $\gamma$ -interferone과 같은 cytokine에 의해 활성화된 macrophage 내에서 NO 및 NO synthase 활성도를 확인하여 mac-

<sup>#</sup>본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로.

rophage의 암 발육억제 및 박테리아 사멸효과가 NO와 관련성이 있음을 밝혔다.<sup>2)</sup> 또한 NO 유사물질의 방출은 macrophage뿐만 아니라 peritoneal neutrophils,<sup>3)</sup> human neutrophil,<sup>4)</sup> phagocyte 등의 염증 반응에 관여하는 세포에서 생성된다는 것을 확인하였으며, 이 외 EMT-6 adenocarcinoma cells,<sup>5)</sup> hepatic kupffer cell<sup>6)</sup>에서도 NO가 생성된다고 보고하였다.

Cerebellar neuron culture<sup>7)</sup>와 brain extract<sup>8)</sup>로부터 NO의 생성이 확인된 이래 뇌내의 NO는 cGMP level의 항진과 관련하여 nonadrenergic, noncholinergic transmitter로서 작용하여 장관의 이완에도 관여한다고 한다.<sup>32)</sup>

혈관내 endothelial cell에서 유리되는 물질인 endothelium derived relaxing factor(EDRF)<sup>11)</sup>는 acetylcholine, bradykinin 등에 의한 혈관 이완작용, 혈소판 응집 억제작용<sup>12)</sup> 관련되는 물질로 Palmer 등에 의해 NO임이 밝혀졌다.<sup>13)</sup> Ach 등의 약물에 의해 혈관 endothelial cell내 Ca<sup>2+</sup>의 농도가 증가하여 NO synthase가 활성화되고 L-Arg으로부터 NO가 합성되며<sup>9)</sup> 생성된 NO는 이웃한 혈관 평활근내로 확산되어 guanylate cyclase를 활성화시킨다. 이 효소의 작용으로 cGMP를 증가시키고 혈관 평활근내의 Ca<sup>2+</sup> 농도가 저하되므로 혈관이 이완된다고 보고되었다.<sup>14)</sup>

이와 같이 생체내에서 다양한 작용을 나타내는 NO는 NO synthase 억제제로 알려진 L-monomethylarginine, L-nitroarginine<sup>10)</sup>에 의해 생성이 억제되며, macrophage에서 암 발육 억제 및 박테리아의 사멸 효과를 차단하며 뇌내 cGMP의 항진을 억제함은 물론 혈관이완 작용도 억제<sup>15)</sup>된다고 한다. 특히 혈관이완 차단의 예로는 토끼 흉부 대동맥에서 Ach에 의한 혈관이완 억제,<sup>15)</sup> guinea pig 폐동맥에서 tension의 증가,<sup>16)</sup> 적출된 토끼동맥의 혈압의 증가,<sup>17)</sup> guinea pig의 관상혈류압의 증가,<sup>18)</sup> L-NMMA의 정맥투여시 평균 혈압의 상승,<sup>19)</sup> blood flow의 감소<sup>20)</sup> 등의 약리적 실험결과가 보고되었다. 이러한 NO synthase 억제제에 의한 차단효과는 L-Arg에 의해 반전되는 가역적인 성질을 나타내며 광학 특이적으로 L-체만이 억제작용을 나타내는 특이성을 가진다.<sup>15)</sup>

이러한 연구를 바탕으로 하여 본 실험에서는 혈관내 NO 생성기전의 기초연구로 arginine과 methylated amino acid인 monomethylarginine(MMA), dimethylarginine(DMA, sym, asym.)의 혈관에 대한 작용을

검색하였으며 혈관이완시 L-arginine의 대사 및 MMA의 존재여부와 MMA이 혈관내 수축 또는 이완의 조절인자로서의 가능성이 있는지 알아보고자 혈관내 Arg과 MMA의 함량을 HPLC system을 이용하여 조사하였다.

## 실험방법

### 실험동물

체중 250~300g의 Sprague-Dawley계의 흰쥐를 암수구별없이 동물실에서 일정기간 사육한 후 실험에 사용하였다.

### 시약

Phenylephrine(Sigma), Acetylcholine Bromide(Sigma), N<sup>G</sup>-monomethyl-L-arginine(Bachem), N<sup>G</sup>, N<sup>G</sup>-dimethyl-L-arginine di-(p-hydroxyazobenzene-p'-sulfonate) salt(Bachem), N<sup>G</sup>, N<sup>G</sup>-dimethyl-L-arginine di-(p-hydroxyazobenzene-p'-sulfonate) salt(Sigma), L-Arginine(Sigma.), Sodium acetate, trihydrate(Sigma), Triethylamine(Aldrich), Phenylisothiocyanate(Pierce), Dowex 50W H<sup>+</sup> form cation exchanger(Sigma) 기타의 시약은 시판 특급시약을 사용하였다.

### 기기

EEG & Polygraph Data recording system (GRASS MODEL 79E, GRASS, U.S.A.), Isotemp Refrigerated Circulator (Model 910, Fischer, U.S.A.), 95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub> air tank, HPLC (501 Solvent delivery system, 486 Tunable Absorbance detector, U6K universal injector, Waters, U.S.A.) Freeze dryer(Labconco, U.S.A.) 등을 사용하였다.

### 약물 처치시 혈관의 변화측정

실험직전에 흰 쥐를 단두 치사시켜 thoracic aorta를 취한 후 미리 95% O<sub>2</sub>가스와 5% CO<sub>2</sub>가스로 포화시킨 Krebs bicarbonate buffer (pH 7.4, 37°C) 용액<sup>21)</sup>에서 지방조직과 결합조직, 혈액을 제거하였으며 혈관을 약 7~8 mm로 잘라 사용하였다.

미리 95% O<sub>2</sub>가스와 5% CO<sub>2</sub> 가스로 포화시킨 Krebs bicarbonate buffer (pH 7.4) 용액의 10 ml organ bath에 혈관을 넣고 glass hook에 건 다음 transducer에 연결시킨 후 GRASS MODEL 79E EEG & Polygraph Data Recording System으로 측정하였다.

먼저 조직과 medium내가 평형이 되도록 60분 정도 preincubation한 후 각 약물로 처치하여 20분간 incubation시의 혈관의 변화를 관찰하였다. Phenylephrine 750 nM을 가하여 혈관을 수축시킨 후 acetylcholine  $1.5 \times 10^{-6}$  M을 가하여 Ach에 의한 약물작용을 살펴 보고 L-arginine을 organ bath내 총농도가  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-2}$  M일때의 효과를 관찰하였다.

**차단제로 전처치시 혈관의 변화 측정**

Organ bath 내 혈관을 60분동안 preincubation한 후 전처치 약물 MMA, DMA(asym.), DMA(sym.)을 30  $\mu$ M, 100  $\mu$ M을 가하고 30분간 전처치 하여 incubation한 후 phenylephrine으로 혈관을 수축시키고 L-arginine  $10^{-3}$  M 처치하여 incubation 시켰을 때의 혈관의 변화를 관찰하였다.

**혈관조직 L-Arginine, Monomethylarginine의 정량**

**1) 조직처리<sup>22)</sup>**

**i) 정상상태** - 실험직전에 흰 쥐를 단두 치사시켜 thoracic aorta를 취한 후 미리 95% O<sub>2</sub>가스와 5% CO<sub>2</sub>가스로 포화시킨 Krebs bicarbonate buffer (pH 7.4) 용액에서 지방조직과 결합조직, 혈액을 제거하고 혈관의 무게를 잰 후 50% ethanol을 4 ml 정도 가한 후 glass-glass homogenizer로 연마하였다. Homogenate를 12,000×g에서 10분간 원심분리하여 상등액을 얻었다.

**ii) Acetylcholine 전처리 상태** - 상기와 같은 방법으로 얻은 혈관을 미리 95% O<sub>2</sub>가스와 5% CO<sub>2</sub>가스로 포화시킨 Krebs bicarbonate buffer (pH 7.4) 용액의 10 ml organ bath에 넣은 후 bath내 농도가  $1.5 \times 10^{-6}$  M이 되도록 Ach을 가하여 30분 동안 incubation한다. Incubation종료 후 혈관의 무게를 재고, 50% ethanol을 4 ml 정도 가한 후 glass-glass homogenizer로 연마한다. Homogenate를 12,000×g에서 10분간 원심분리하여 상등액을 얻었다.

**2) 염기성 아미노산 분획의 조제<sup>23)</sup>**

혈관 조직을 연마하여 원심분리한 후 얻은 상등액을 Dowex 50 W 양이온 교환수지 column (0.8×5 cm, Dowex 50 W H<sup>+</sup> form, 100~200 mesh)에 가하고, acidic amino acid를 제거하기 위하여 50 ml의 water로 washing한 후 25 ml의 2 M ammonium hydroxide로 용출하여 받은 염기성 아미노산 분획을 70°C에서 감압 농축하였다. 얻어진 잔사를 소량의 증류수에 녹여 eppendorf tube에 옮긴 후 동결건조하였다.

**3) 염기성 아미노산 분획의 재건조 및 유도체화 과정**

Ethanol, Mili-Q water, triethylamine을 각각 2 : 2 : 1(v/v)의 비율로 혼합한 재건조 시약 50  $\mu$ l를 건조시킨 염기성 아미노산 분획에 가하고 동결 건조한 후 ethanol, Mili-Q water, triethylamine, phenylisothiocyanate를 각각 7 : 1 : 1 : 1(v/v)의 비율로 혼합한 유도체 시약을 건조시킨 염기성 아미노산 분획에 가하여 반응시킨 후 건조하였다. Diluent 200  $\mu$ l를 가하고 0.45  $\mu$ m filter unit를 사용하여 여과한 후 HPLC 정량에 이용하였다.

**HPLC 분석조건 및 정량방법**

Column은 silica base의 picotag column을 이용하였으며 이동상으로 Eluent A와 B의 gradient system 조건에서 실시하였다. Detector는 UV absorbance detector(269 nm)를 사용하였으며 온도조건은 35°C 이었고 a.u.f.s.는 0.01이었다. Injection volumn은 10  $\mu$ l이었으며 Arg과 MMA의 농도는 표준 Arg과 MMA의 pmole에 대한 peak area의 관계로 검량선을 작성하여 구하였다. Arg과 MMA peak의 확인은 일정량의 standard를 sample에 혼합한 후 injection하여 peak retention time의 유사성과 peak area의 변화를 비교하여 확인하였다.

solvent 조건과 gradient program은 다음과 같다.

Solvent A: 0.14 M Sodium acetate trihydrate  
 Triethylamine 0.05%  
 Mili-Q water 1 L  
 pH 6.4 with phosphoric acid  
 resulting buffer : acetonitrile=94 : 6

Solvent B: 60% Acetonitrile

**Gradient program**

Time	flow	%A	%B	curve
0	1.0	100	0	*
10.0	1.0	54	46	5
10.5	1.0	0	100	6
11.0	1.5	0	100	6
14.0	1.5	0	100	6
14.5	1.5	100	0	6
20.5	1.5	100	0	6
21.0	1.0	100	0	6

Temperature: 35°C  
 Injection volumn: 10 µl  
 Detector: UV absorbance detector (269 nm)

**실험결과**

**Ach.과 각농도별 L-Arg 처치시 혈관의 변화**—Organ bath내 phenylephrine 750 nM을 가하여 혈관을 수축시킨 후 Ach( $1.5 \times 10^{-6}$ M)에 의하여 80% 정도로 이완되었으며 L-Arg을 organ bath 내 총농도가  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-2}$ M이 되도록 처치하였을 때 10%에서 40% 정도로 혈관의 이완정도가 점차 증가하는 경향을 나타내며 모든 농도에서 유의성있는 data를 얻었다.(Table I, Fig. 1).

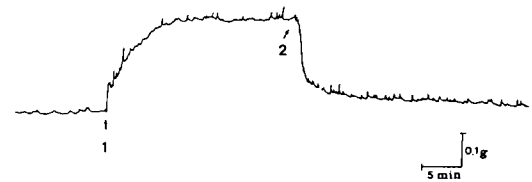
**MMA과 DMA(asym., sym.)의 전처치시 혈관의 변화**—Organ bath내 혈관에 MMA 또는 DMA약물을 각각 30분간 전처치하고 phenylephrine(750 nM)을 처치하였을 때 혈관의 수축률의 증가는 MMA 전처치시 30 µM, 100 µM에서 15.6%, 25.5% 증가하였으며 DMA(asym.)을 전처치하였을 때 30 µM, 100 µM에서 15.0%, 27.5% 수축률을 증가시켜 유사한 정도의 효과를 나타내었다. 그러나 DMA(sym.)은 30 µM에서 12.3%, 16.5%로 약간 낮은 수축 증가폭을 나타내었다 (Table II, Fig. 2, Fig. 3).

**MMA와 DMA(asym., sym.)의 전처치시 L-Arg에 의한 혈관의 변화**—Organ bath내 혈관에 MMA 또는 DMA 약물을 각각 30분간 전처치하고 phenylephrine (750 nM)을 처치한 후 L-Arg( $10^{-3}$ M)을 가하였을 때 L-Arg에 의해 35% 정도의 혈관이완 작용이 나타남에

비해 MMA, DMA의 전처치시 MMA 30 µM, 100 µM에서 23.2%, 19.0%로 혈관이완 작용이 저하됨을 보이며 DMA(asym.) 30 µM, 100 µM에서 26.6, 22.0%, DMA(sym.) 30 µM, 100 µM에서 30.0%, 28.6% 정도 이완률을 보여 Arg에 의한 혈관이완 효과가 둔화되는 경향을 보였다. 즉 혈관이완 억제효과는 MMA>DMA (asym.)>DMA(sym.) 순으로 작용강도를 보였다(Table III, Fig. 4).

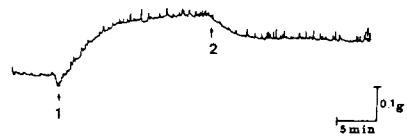
**Thoracic aorta내 L-Arg과 MMA의 함량과 Ach 처치시 농도의 변화**—Thoracic aorta 조직내의 L-Arg과 MMA의 함량은 normal일 때 Arg은 83.1 pmole/mg wet tissue이고, MMA는 34.9 pmole/mg wet tissue이었다. Ach의 처치에 의해서 Arg은 48.3 pmole/mg wet tissue, MMA은 13.3 pmole/mg wet tissue이었다. Ach의 처치에 의해서 Arg은 48.3 pmole/mg wet tissue, MMA은 13.3 pmole/mg wet tissue로 Arg, MMA모두 유의성있게 감소하였다(Ta-

a) Relaxation by Ach.



1. Phenylephrine 750 nM      2. Ach  $1.5 \times 10^{-6}$  M

b) Relaxation by L-Arg.



1. Phenylephrine 750 nM      2. L-Arg  $10^{-3}$  M

**Table I**—Relaxation of rings of thoracic aorta by a various concentrations of arginine.(% of Phenylephrine control)

	Concentration (M)	Relaxation (%)
Ach	$1.5 \times 10^{-6}$ M	$79.0 \pm 12.7$ ***
L-Arg	$1.0 \times 10^{-6}$ M	$9.8 \pm 1.4$ *
	$1.0 \times 10^{-5}$ M	$17.8 \pm 4.0$ **
	$1.0 \times 10^{-4}$ M	$23.0 \pm 4.0$ **
	$1.0 \times 10^{-3}$ M	$35.0 \pm 2.3$ ***
	$1.0 \times 10^{-2}$ M	$38.0 \pm 7.0$ **

Each value represents the Mean  $\pm$  S.E., n=8  
 Significantly different from control  
 \*: P<0.05, \*\*: P<0.01, \*\*\*: P<0.001

**Fig. 1**—Representative biological responses of rat aortic rings precontracted with phenylephrine. Isolated rings of endothelium-intact thoracic aorta were precontracted with phenylephrine (750 nM), and challenged with L-arginine( $10^{-3}$  M).

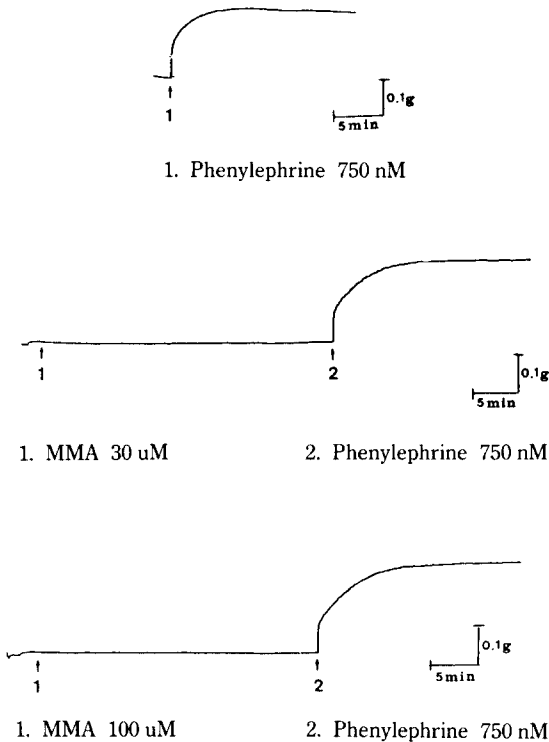
**Table II**—Effects of pretreatments with MMA and DMA on contractility of rings of rat thoracic aorta by phenylephrine

	Concentration ( $\mu\text{M}$ )	Contraction (%)
Phenylephrine	750 nM	100
MMA	30	115.6 $\pm$ 2.3***
	100	125.5 $\pm$ 2.7***
DMA(asym.)	30	115.0 $\pm$ 3.0***
	100	127.5 $\pm$ 6.8***
DMA(sym.)	30	112.3 $\pm$ 4.5*
	100	116.5 $\pm$ 6.0

Each value represents the Mean  $\pm$  S.E., n=10

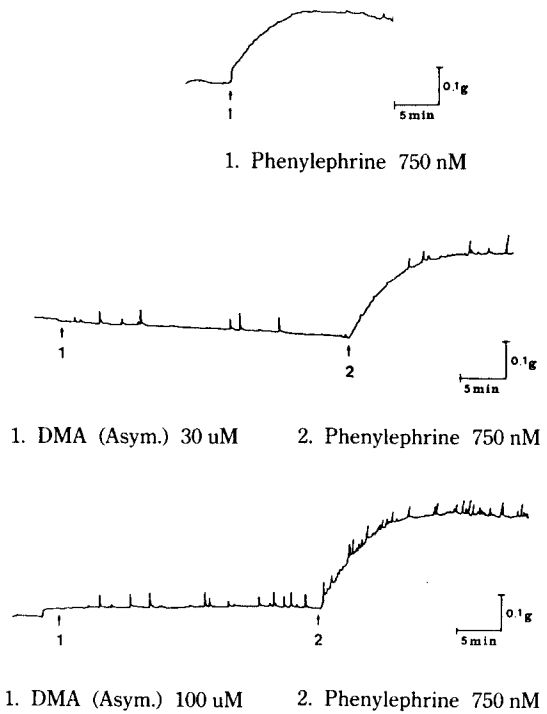
Significantly different from control

\*: P<0.05, \*\*: P<0.01, \*\*\*: P<0.001



**Fig. 2**—Effects of MMA on the contractility of rat aortic rings by phenylephrine.

Isolated rings of the thoracic aorta were preincubated with MMA(30  $\mu\text{M}$  or 100  $\mu\text{M}$ ) for 30 min. at 37°C and treated with phenylephrine (750 nM).



**Fig. 3**—Effects of DMA(asym.) on the contractility of rat aortic rings by phenylephrine.

Isolated rings of the thoracic aorta were preincubated with DMA (asym., 30  $\mu\text{M}$  or 100  $\mu\text{M}$ ) for 30 min at 37°C and treated with phenylephrine(750 nM).

**Table III**—Effect of arginine on the contractility of rat aortic rings pretreated with MMA or DMA

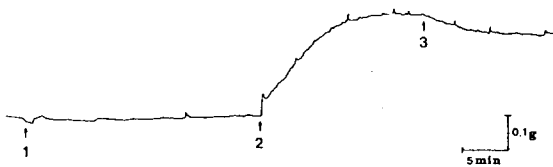
	Concentration ( $\mu\text{M}$ )	Relaxation	
		% of Phenylephrine	% of Arg
MMA	0	35.0 $\pm$ 2.3	100.0
	30	23.2 $\pm$ 6.0*	66.3
	100	19.0 $\pm$ 4.0**	54.3
DMA (asym.)	0	35.0 $\pm$ 2.3	100.0
	30	26.6 $\pm$ 4.5*	76.0
	100	22.0 $\pm$ 5.0*	62.9
DMA (sym.)	0	35.0 $\pm$ 2.3	100.0
	30	30.0 $\pm$ 6.0	85.7
	100	28.6 $\pm$ 6.5	81.7

Each value represents the Mean  $\pm$  S.E., n=12

Significantly different from control

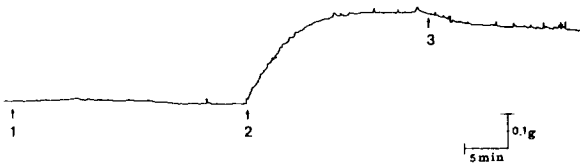
\*: P<0.05, \*\*: P<0.01

## a) Relaxation by L-Arg after pretreatment with MMA.



1. MMA 100  $\mu$ M 2. Phenylephrine 750 nM 3. L-Arg  $10^{-3}$  M

## b) Relaxation by L-Arg after pretreatment with DMA.



1. DMA 100  $\mu$ M 2. Phenylephrine 750 nM 3. L-Arg  $10^{-3}$  M

**Fig. 4**—Effect of arginine on the contractility of rat aortic rings pretreated with MMA or DMA (asym.)

The aortic rings were preincubated with MMA (100  $\mu$ M) or DMA (asym., 100  $\mu$ M) for 30 min at 37°C. Then the preincubated aortic rings were contracted with phenylephrine and the degree of relaxation by L-Arg( $10^{-3}$ M) was observed.

**Table IV**—Contents of endogenous Arg and MMA in rat aortic tissues

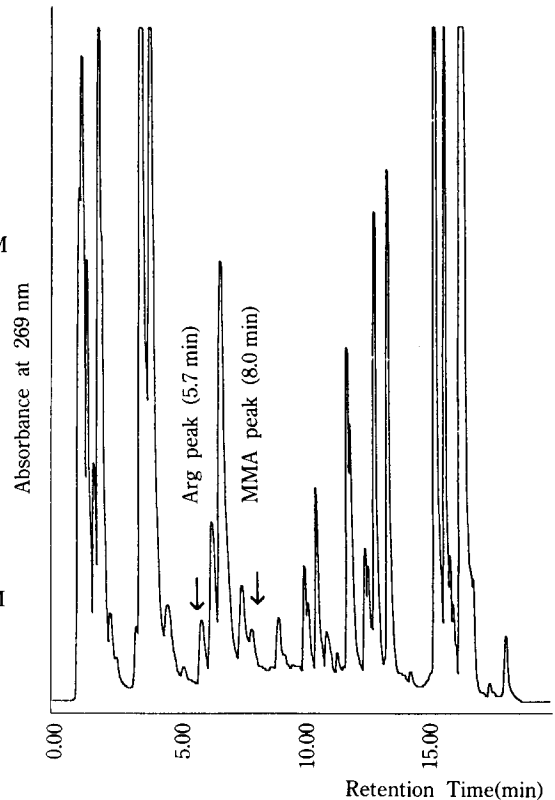
	content (pmoles/mg wet tissue)	
	Arg	MMA
Normal	83.1 $\pm$ 7.2	34.9 $\pm$ 5.1
Ach treatment	48.3 $\pm$ 3.3**	13.3 $\pm$ 2.1**

Each value represents the Mean  $\pm$  S.E., n=5

Significantly different from control

\*\* : P<0.01

ble IV). Fig. 5는 rat thoracic aorta를 실험방법에서 기술한 방법과 같은 방법으로 HPLC sample preparation을 거친 후 Arg 500 pmole/10  $\mu$ l, MMA 500 pmole/10  $\mu$ l를 각각 가하여 Arg, MMA peak를 확인하였다. Arg peak의 retention time은 약 5.7 min이며, MMA peak의 retention time은 약 8.0 min이었다.



**Fig. 5**—Identification of Arg and MMA in normal rat aortic tissue.

## 고 찰

혈관 내 존재하는 EDRF는 Nitric oxide로 밝혀졌으며<sup>13)</sup> L-Arg으로 부터<sup>14)</sup> NO synthase의 촉매작용으로 생성되며 그 작용은 cGMP의 상승으로 혈관이완 작용,<sup>11)</sup> 혈소판 응집 억제작용에 관여한다<sup>12)</sup>고 보고되었다. 이 외 N-치환 arginine-포함 화합물로 L-BAEE (N<sup>a</sup>-benzoyl-L-arginine ethyl ester),<sup>24)</sup> L-homoarginine, L-amino guanidino butric acid도 endothelium-dependent 혈관이완<sup>22)</sup>을 나타내며 MMA에 의한 혈관 수축 증가율을 감소시킨다고 한다.

본 실험에서는 Arg을 농도별로 처치하였을 때 혈관의 변화를 고찰한 결과 100  $\mu$ M 농도하에서 최대 이완율은 약 8~10% 정도의 이완율이 나타난다는 Ree 등의 보고에 비해  $10^{-4}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-2}$ M일 때 23, 35, 38%로 비교적 고농도하에서 혈관이완 작용이

뚜렷이 나타나는 것으로 보아 외부에서 가하여 준 Arg이 혈관이완 효과가 있음을 알 수 있었다. 또한 생체 조직내의 Arg의 함량에 비해 혈관이완 약물인 Ach의 처치후 생체내 Arg의 함량이 유의성 있게 감소함으로 Ach에 의한 NO의 방출시 기질로 Arg이 이용된 것으로 추측된다.

최근 L-Arg 유사체인 MMA은 혈관 endothelial cell에서 NO의 합성을 억제하며,<sup>15)</sup> 마취된 토끼와 guinea pig의 동맥압을 증가시키고<sup>18)</sup> 흰 쥐에서의 혈류를 감소시키는 등의 작용이 보고되었다. 또한 NO synthase 억제제로서 N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine도 rabbit aorta의 이완을 억제한다고 밝혀졌으며<sup>26)</sup> 그 작용도 토끼의 혈압을 상승시키며,<sup>19)</sup> neutrophil에서 NO 혈성을 억제한다고 한다.<sup>27)</sup> 특히 mouse anococcygeus에서 non-adrenergic, non-cholinergic transmission (NANC)에서는 L-MMA보다 강력한 억제제로 작용한다는 보고도 있다.<sup>28)</sup> 이외 N<sup>a</sup>-butyloxycarbonyl- N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine,<sup>26)</sup> N-iminoethyl-L-ornithine<sup>29)</sup>도 혈관이완 작용에 대해 억제작용을 가지며 Canavanine도 최근 보고에 의하면 rat aorta에서 혈관이완을 억제한다고 보고되었다.<sup>15)</sup> Rees와 Palmer 등은 N<sup>G</sup>, N<sup>G</sup>-dimethyl-L-arginine, L-homoarginine, L- $\alpha$ -amino- $\beta$ -guanidino-propionic acid, L- $\alpha$ -amino- $\gamma$ -guanidinobutric acid, L-canavanine, L-argininamide, agmatin, 5-guanidinovaleric acid, L-citrullin, urea, L-arginine-methylester, L-arginineaspartate에 의해 혈관이완 작용이 나타나지 않는다고 보고하였으며,<sup>30)</sup> 단지 L-arginine methylester만이 MMA의 효과를 부분적으로 반전하는 효과만이 나타난다고 보고하였다.

본 실험에서는 MMA와 DMA(asym.), DMA(sym.)의 NO-generating system에서 혈관에 대한 작용을 살펴본 결과, MMA의 혈관에 대한 작용은 많은 다른 연구자들의 보고와 유사하게 phenylephrine의 혈관 수축율을 증대하며 Arg에 의한 혈관이완 작용을 억제하는 효과를 나타내므로 NO synthase 억제제임을 확인할 수 있었다. 반면 Rees와 Palmer의 주장과는 달리 본 실험에서는 DMA(asym.)도 MMA와 유사하게 Arg에 의한 혈관이완 작용을 억제하여 NO synthase inhibitor의 작용이 있음이 확인되었다. 그러나 DMA(sym.)는 MMA와 DMA(asym.)에 비하여 약한 혈관이완작용을 나타내었다. 이와 유사한 결과로서, 최근 Moncada 등은 DMA(asym.)가 human plasma내에서

NO synthase의 내인성 저해제로 존재<sup>33)</sup>한다는 사실을 확인하였고, 만성 신부전을 갖는 환자에서 DMA의 노배설양이 감소하여 plasma내에 축적됨으로서 고혈압의 원인이 될 수 있음을 보고하였다.<sup>34)</sup>

혈관내에는 Arg 뿐만 아니라 다양한 guanidino 화합물이 존재한다고 보고되어 있으며<sup>26)</sup> 특히 endothelial cell내에 많은 guanidino 화합물이 포함되어 있음이 알려져 있다. 그러므로 어떠한 guanidino 화합물이 존재하며, 이러한 guanidino 화합물이 혈관 수축 이완의 조절에 어떠한 역할을 하는지를 알아보기 위하여 methylated arginine 화합물이며 혈관이완 작용의 주요 저해제로 작용하고 있는 MMA의 생체내 존재 여부를 검색한 결과 MMA이 약 35 pmole/mg wet tissue 정도 존재하며 Ach처리시 유의성있는 함량감소의 변화를 나타내어 혈관이완시 조절매개물질로 작용하고 있음을 간접적으로 확인할 수 있었다. 즉 다양한 guanidino 화합물중 methylated된 MMA의 혈관내 존재를 알 수 있었으며 혈관 수축 및 이완을 조절하는 물질로 사료된다. 하지만 혈관내에 존재하는 MMA의 생성경로 및 정확한 작용기전에 대한 고찰이 이루어져야 할 것이다.

## 결 론

본 실험에서는 nitric oxide 생성기전에 대한 기초 연구로써 Arg과 methylated amino acid인 MMA, DMA(sym, asym)의 혈관에 대한 작용을 검색하였으며, 혈관내 Arg과 MMA의 nitric oxide생성에 대한 연관성을 알아보고자 HPLC system을 이용하여 혈관 조직내 함량의 변화를 조사하였다.

1. Ach과 각농도별 L-Arg의 처치시 혈관의 변화 - Ach( $1.5 \times 10^{-6}$ M)에 의한 혈관이완율은 80% 정도이며 L-Arg을  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-2}$ M이 되도록 처치하였을 때 10%에서 40% 정도로 혈관의 이완정도가 점차 증가하는 경향을 나타내었다.

2. MMA와 DMA(asym., sym.)의 전처치시 phenylephrine의 혈관에 대한 영향 - 혈관에 MMA 또는 DMA약물을 전처치하였을 때 혈관의 수축율의 증가는 MMA 전처치시 30  $\mu$ M, 100  $\mu$ M일 때 15.6%, 25.5%로 증가하였으며, DMA(asym.)의 전처치시에는 30  $\mu$ M, 100  $\mu$ M일 때 15.0, 27.5%로 수축율을 증가시켜 MMA와 유사한 정도의 효과를 나타내었다. 그러나

DMA(sym.)은 30  $\mu$ M, 100  $\mu$ M일 때 12.3, 16.5%로 약간 낮은 수축 증가폭을 나타내었다.

**3. MMA와 DMA(asym., sym.)의 전처치시 L-Arg에 의한 혈관의 변화**—혈관에 MMA 또는 DMA 약물을 각각 30분간 전처치하고 phenylephrine을 처치한 후 L-Arg( $10^{-6}$ M)을 처치시 혈관의 이완 정도는 Arg의 이완 정도를 100% control로 하였을 때 각각 MMA 30  $\mu$ M, 100  $\mu$ M 전처치 시 66.3%, 54.3%의 이완율을 나타내며 DMA(asym.) 30  $\mu$ M, 100  $\mu$ M일 때 76.0%, 62.9%, DMA(sym.) 30  $\mu$ M, 100  $\mu$ M의 경우 85.7%, 81.7% 정도 이완되어 Arg에 의한 혈관이완 효과가 둔화되는 경향을 보인다. 즉 혈관이완 억제효과는 MMA>DMA(asym.)>DMA(sym.) 순으로 작용 강도를 보였다.

**4. Thoracic aorta내 L-Arg과 MMA의 함량과 Ach처치시 농도의 변화**—Thoracic aorta내의 L-Arg과 MMA의 함량은 normal일 때와 Ach을 처치하였을 때 함량의 변화를 본 결과 normal일 때 Arg은 83.1 pmole/mg wet tissue이고, MMA는 34.9 pmole/mg wet tissue이었다. Ach의 처치에 의해서 Arg, MMA 모두 유의성있게 감소하였다.

## 문 헌

- Keller, R., Bassett, S., Keist, R., Mulsch, A. and Klausner, S.: Induction of nitric oxide synthase is a necessary precondition for expression of tumor by activated macrophage. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **184**(3), 1364 (1992).
- Hibbs, J. B., Taintor, R. R., Vavrin, Z. and Rachlin, E. M.: Nitric Oxide; A cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **157**, 87 (1988).
- Rimele, T. J., Sturm, R. J., Adams, L. M., Henry, D. E. and Heaslip, R. J.: Interaction of neutrophils with vascular smooth muscle.; Identification of a neutrophil-derived relaxing factor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **245**, 102 (1988).
- Wright, C. D., Mulsch, A., Busse, R. and Osswald, H.: Generation of nitric oxide by human neutrophils. *Biochim. Biophys. Acta.* **160**, 813 (1988).
- Amber, I. J., Hibbs, J. B., Taintor, R. R. and Varrin, Z.: The L-Arginine-dependent effector mechanism is induced in murine adenocarcinoma cells by culture supernatant from cytotoxic activated macrophages. *J. Leucocytes Biol.*, **43**, 187 (1988).
- Billiar, T. R., Curran, R. D., Stuehr, D. J., West, M. A., Bentz, B. G. and Simmons, R. L.: An L-arginine-dependent mechanism mediates kupffer cell inhibition of hepatocyte protein synthesis in vitro. *J. Exp. Med.*, **169**, 1467 (1989).
- Garthwaite, J., Charles, S. L. and Chess-Williams, R.; Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intracellular messenger in the brain. *Nature*, **336**, 385 (1988).
- Radomski, M. W., Palmer, R. M. J. and Moncada, S.: An L-Arginine/nitric oxide pathway present in human platelet's regulates aggregation. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **87**, 5193 (1990).
- Palmer, R. M. J., Ashton, D. S. and Moncada, S.: Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature(Lond)*, **333**, 664(1988).
- Gross, S. S., Stuehr, D. J., Aisaka, K., Jaffe, E. A., Levi, R. and Griffith, D. W.: Macrophage and endothelial cell nitric oxide synthesis.; Cell-type selective inhibition by  $N^G$ -nitroarginine and  $N^G$ -methylarginine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **170**(1), 96 (1990).
- Furchgott, R. F.: The role of endothelium in the responses of vascular smooth muscle to drugs. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **24**, 175 (1984).
- Hogan, J. C., Lewis, M. J. and Henderson, A. H.: In vitro EDRF activity influences platelet function. *Br. J. Pharmacol.*, **94**, 1020 (1988).
- Moncada, S., Radomski, M. W. and Palmer, R. M. J.: Endothelium-derived relaxing factor; Identification as nitric oxide and roole in the control of vascular tone and platelet function. *Biochem. Pharmacol.*, **37**, 2495 (1988).
- Ignarro, L. G., Buga, G. M. Wood, K. S., Byrns, R. E. and chaudhuri, G.: Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **84**, 9265 (1987).
- Palmer, R. M. J., Rees, D. D., Ashton, D. S. and



- Moncada, S.: L-Arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **153**, 1251 (1988).
- 16) Sakuma, L., Stuehr, D. J., Gross, S. S., Nathan, C. and Levi, R. endothelium-derived relaxing factor (EDRF). *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **85**, 8664 (1988).
- 17) Amezcua, J. L., Palmer, R. M. J., souza, B. M. and Moncada, S.: Nitric oxide synthesized from L-arginine regulates vascular tone in the coronary circulation of the rabbit. *Br. J. pharmacol.*, **97**, 1119 (1989).
- 18) Levi, R., Gross, S. S., Lamparter, B., Fasehun, O. A., Aisaka, K., Jaffe, E. A., Griffith, D. W. and Stuehr, D. J.: Evidence that L-arginine is the biosynthetic precursor of vascular and cardiac nitric oxide. In nitric oxide from L-arginine; a bioregulatory system, ed, Moncada, S., Higgs, E. A., pp. 257-265 Amsterdam; Elsevier. (1990).
- 19) Rees, D. D., Palmer, R. M. J. and Moncada, S.: Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **86**, 3375 (1989).
- 20) Gardiner, S. M., Compton, A. M., Bennett, T., Palmer, R. M. J. and Moncada, S.: Control of Regional blood flow by endothelium-derived nitric oxide. *Hypertension.*, **15**(5), 486 (1990).
- 21) Sreeharan, N., Jayakody, R. L., Senaratine, M. P. J., Thomson, A. B. R. and Kappagoda, C. T.: Endothelium-dependent relaxation and experimental atherosclerosis in the rabbit aorta. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **64**, 1451 (1986).
- 22) Thomas, G. and Ramwell, P. W.: Effects of guanidino compounds on the endothelium-derived relaxin factor inhibitor N<sup>G</sup>-monomethyl-L-arginine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **259**(2) 490 (1991).
- 23) McDermott, J. R.: Studies on the catabolism of N<sup>G</sup>-Monomethylarginine, N<sup>G</sup>, N<sup>G</sup>-Dimethylarginine, and N<sup>G</sup>, N<sup>G</sup>-Dimethylarginine in the rabbit. *Biochem. J.*, **154**, 179 (1976).
- 24) Farhat, M. Y., Ramwell, P. W. and Thomas, G.: Endothelium-mediated effects of N-substituted arginines on the isolated perfused rat kidney. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **255**, 473 (1990).
- 25) Watanabe, Y., Shindo, S. and Mori, A.: Developmental changes in guanidino compounds in mouse organ. In Guanidines, ed by Mori, A., Cohen B. D. and Koide H., pp 49-58 Plenum press, New York (1989).
- 26) Moore, P. K., al-Swayeh, O. A., Chong, N. W. S., Evans, R. A. and Gibson, A.: L-N<sup>G</sup>-nitroarginine (NOARG), a novel, L-arginine-reversible inhibitor of endothelium-dependent vasodilatation in vitro. *Br. J. Pharmacol.*, **99**, 408 (1990).
- 27) Marletta, M. A., Yoon, P. S., Iyengar, R., Leaf, C. D. and Wishnok, J. S.: Macrophage oxidation of L-arginine to nitrit and nitrate; Nitric oxide is an intermediate. *Biochemistry*, **27**, 8706 (1988).
- 28) Gibson, A., Mirzazadeh, S., al-Swayeh, O. A., Chong, N. W. S., Moore P. K.: L-N<sup>G</sup>-nitroarginine is a potent, L-arginine reversible inhibitor of NANC relaxations in the mouse anococcygeus. *Br. J. Pharmacol.*, Manchester, B. P. S., in press. (1989).
- 29) Rees, D. D., Palmer, R. M. J., Schulz, R., Hodson, H. F. and Moncada, S.: Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and invivo. *Br. J. Pharmacol.*, **101**, 746 (1990).
- 30) Rees, D. D., Palmer, R. M. J., Hodson, H. F. and Moncada, S.: A specific inhibitor of nitric oxide formation from L-arginine attenuates endothelium-dependent relaxation. *Br. J. Pharmacol.*, **96**, 418 (1989).
- 31) Drumond, G. I.: Cyclic GMP, cyclic nucleotides in the nervous system. pp 40-125 Ravan. Press New York (1984).
- 32) Bult, H.: Nitric oxide as an inhibitory non-adrenergic, non-cholinergic neurotransmitter. *Nature*, **345**, 346 (1990).
- 33) Vallance, P., Leone, A., Calver, A., Moncada, S.: Endogenous Dimethylarginine as an Inhibitor of Nitric Oxide Synthesis. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **20**(Suppl. 12), S60-S62, (1992).
- 34) Vallance, P., Leone, A., Calver, A., Moncada, S.: Accumulation of an endogenous inhibitor of Nitric Oxide Synthesis in Chronic Renal Failure. *Lancet*, **339**, 572-576, (1992).