

L-Arginine의 흰쥐 적출심근보호 효과에 관한 연구

이인성* · 이헌재**

=Abstract=

Study on Myocardial Protective Effect of L-arginine

In Sung Lee, M.D.*, Hyeon Jae Lee, M.D.**

The results about the myocardial protection effects of the nitric oxide precursor L-arginine upon reperfusion injury after ischemia are diverse. These diversities may be model dependent. Experiments were designed and performed to investigate myocardial protection effects according to the concentration of L-arginine. The isolated rat hearts were subjected in a 30 minutes of normothermic ischemia and reperfused for 30 minutes with reperfusate containing 0,1,2,3,4 mM/L L-arginine. After 30 minutes of reperfusion, group with 1 and 2 mM/L L-arginine showed a trend of better recovery in left ventricular systolic function(left ventricular developed pressure, positive maximum dP/dt), diastolic function(negative maximum dP/dt) and coronary flow compared to control group(reperfusate with no L-arginine). Recovery was impaired with a higher concentration, and at 4 mM/L L-arginine recovery was worse than control(p < 0.05). These results suggest that optimal concentration of L-arginine is important for the recovery of myocardial and endothelial function after ischemia and reperfusion.

(Korean J Thorac Cardiovasc Surg 1996; 29: 1076-80)

Key words: 1. Myocardial protection
2. L-arginine

서 론

관상혈관내피는 L-arginine이 L-citrulline으로 전환되는 과정에 내피유발확장인자(Endothelium-derived relaxing factor)인 일산화질소를 생성분비한다¹⁾. 일산화질소는 혈관확장을 유발하고 혈소판의 응집과 백혈구의 유착을 방지하며, 산소자유라디칼을 중화시키는 작용을 한다²⁻⁴⁾. 심근허혈후 재관류시에는 심근기능의 장애외에도 관상혈관의 기능장애가 발생하는데⁵⁾ 이로 인한 일산화질소의 감소는 심근기능회복을 저하시키는 원인이 된다⁶⁾. 따라서

재관류시 전구물질인 L-arginine을 투여하여 일산화질소를 증가시킴으로써 심근기능회복을 촉진시키는 연구가 진행되고 있다. Takeshi 등⁷⁾은 일산화질소의 전구물질인 L-arginine이 심근허혈후 재관류시 심근기능 회복을 향상시키며 이러한 효과는 일산화질소의 증가에 의해 나타난다고 하였다. 그러나 Matheis 등⁸⁾은 일산화질소가 과산화질소와 과산화기를 생성하여 재관류시 심근손상을 악화시키는 재산소화손상(Reoxygenation injury)을 유발한다고 보고하고 Takeuchi 등⁹⁾은 L-arginine의 투여로 재관류시 심근수축력이 저하된다고 보고하였다. 이와같이 심근기능

* 고려대학교 부속 안암병원 흉부외과

** 인천 중앙길병원 심장센터 흉부외과

† 본 논문은 1995년도 고려대학교 의료원 생명과학연구소 연구비 지원에 의함

논문접수일 : 96년 6월 3일 심사통과일 : 96년 7월 26일

책임저자 : 이인성, (136-075) 서울특별시 성북구 안암동 5가 126-1. Tel.(02) 920-5308, 5436 Fax.(02) 928-8793

에 미치는 L-arginine의 영향이 다르게 보고되는 것은 각 연구마다 실험조건이 다르기 때문에 나타날 수 있다고 생각되어, 저자들은 실험조건중 L-arginine의 농도에 의해 발생할 수 있는 심근기능 회복의 차이를 알아보려고 하였다. 본 연구는 란겐돌프 관류장치에 연결된 흰쥐 적출심장을 허혈에 노출시킨후 재관류시 농도를 달리하는 L-arginine을 공급하여 심근기능과 관상관류량 회복을 관찰, 비교분석하였다.

대상 및 방법

실험대상 및 장치

실험대상으로는 40마리의 Sprague Dawley계 흰쥐(체중 250~350 gm)를 사용하였다. 실험동물은 재관류시 관류액에 첨가한 L-arginine의 농도에 따라 I군(1mM/L, n=8), II군(2mM/L, n=8), III군(3mM/L, n=8), IV군(4mM/L, n=8)과 L-arginine을 첨가하지 않은 Control군(n=8)으로 분류하였다. 실험장치는 란겐돌프 정압형 관류장치를, 관류액은 Krebs-Henseleit 완충액을 사용하였다. 실험과정중 온도는 37.5°C로 일정하게 유지하였다.

마취 및 실험 Protocol

마취를 위해 Thiopental Sodium(50mg/Kg)과 관상동맥의 혈전형성 방지를 위해 Heparin 300 unit를 복강내 주사하였다. 박동중의 심장을 적출하여 관류장치에 연결한 후 30분간 Krebs-Henseleit 완충액을 100 cmH₂O의 압력으로 관상관류시켜 평형기를 가졌다. 평형기 20분에 캐놀라에 연결된 Latex 풍선을 좌심실을 통해 좌심실내에 삽입하였다. 캐놀라를 압력변환기(pressure transducer, GRASS p23XL)에 연결하여 Polygraphy(GRASS, model 79)를 통해 좌심실압을 측정하였다. 좌심실의 등용적조건(isovolumic condition)을 유지하기 위해 방추주사기(spindle syringe)로 풍선의 용적을 조절하였는데 이때 등용적조건에서 좌심실 발생압(developed pressure of left ventricle)이 최적으로 나타나도록 좌심실 이완기 압력이 10mmHg로 되게 풍선용적을 조절하였다. 본 실험에서는 실험중 실험조건에 관계없이 자발적으로 나타나는 수축기압, 이완기압의 변화를 보정하면서 좌심실 수축기능을 평가하기 위해, 수축기압과 이완기압의 차이인 좌심실 발생압을 측정하였다. 평형기 30분에는 심박동수, 좌심실 발생압(수축기압-이완기압), 좌심실압의 최대 순간 증가율(+dP/dtmax)과 감소율(-dP/dtmax) 및 관상관류량을 측정하였다. 이때 심박동수의 차이에 의한 실험 결과의 차이를

줄이고자 심박동수가 분당 180회 미만인 적출심장은 실험대상에서 제외하였다. 평형기 30분의 기준 측정치를 측정 한 후 관상관류액의 주입을 차단하여 30분간의 심근허혈을 유발하였고 허혈중 온도는 37.5°C를 유지하였다. 허혈기 후에는 실험군의 분류에 따라 각 농도의 L-arginine이 첨가된 관류액으로 재관류하면서 재관류 20분에 Latex 풍선을 좌심실에 재삽입하고 허혈 전과 동일한 용적으로 조절하였다. 재관류 30분에 좌심실 발생압, 좌심실압의 최대 순간 증가율과 감소율 및 관상관류량을 측정하고 실험을 종료하였다.

결과 분석

심근의 수축기능을 나타내는 지표로 좌심실 발생압, 좌심실압의 최대 순간 증가율을 측정하였고 심근의 이완기능을 나타내는 지표로 좌심실압의 최대 순간 감소율을 측정하였다. 1분간 관상정맥동에서 나오는 관류액을 받아 관상관류량을 측정하였다. 이상의 지표들을 평형기 30분과 재관류 30분에 측정하여, 재관류 30분의 측정치를 평형기 30분의 기준치에 대한 백분율로 구하여 심근기능과 관상관류량의 회복률로 나타냈다. 각 측정값은 평균±표준오차로 표시하였다. one-way ANOVA 검사로 전체 군간의 회복률을 비교하였고 군간에 유의한 차이가 있는 경우 다중비교로 각군 사이의 회복률을 비교하였다. P값이 0.05 이하인 경우 유의한 차이가 있는 것으로 처리하였다.

결 과

1. 체중,평형기 30분 기준 측정치(Baseline Measurement)

마취전 측정된 체중과 평형기 30분에 측정된 각 기준 측정치는 실험군간에 유의한 차이가 없었다(Table 1).

2. 좌심실 발생압(developed pressure of left ventricle)

재관류시 투여한 L-arginine의 농도에 따라 재관류 30분의 좌심실 발생압 회복률은 유의한 차이를 보였다(p=0.002, Table 2). L-arginine을 1mM/L과 2mM/L의 농도로 투여한 I군,II군의 회복률은 각각 101±7%, 103±13%로 평형기 30분의 허혈전 측정치와 비슷한 좌심실 발생압을 보였고 Control군의 76±11% 보다 높은 회복률을 보였다. III군은 회복률이 감소하여 74±14%로 Control군과 비슷하였으며, IV군은 37±11%로 대조군보다 유의하게 낮은 회복률을 보였다(p<0.05).

Table 1. Body weight and Baseline Measurements

Variable	Group					p-value ^b
	Control	I	II	III	IV	
Weight(gm)	259±14	258±10	238±10	236±11	266±11	0.25
Heart rate(beat/min)	265±9	266±8	256±3	257±11	248±6	0.49
DP(mmHg)	43±4	46±4	44±3	41±4	41±3	0.82
+dp/dt _{max} (mmHg/s)	1056±49	1025±79	1009±79	983±56	1069±42	0.83
-dp/dt _{max} (mmHg/s)	684±32	635±43	630±31	636±45	709±45	0.53
CF(mL/min)	10.1±0.7	10.0±1.0	10.2±1.6	11.4±1.2	12.0±1.0	0.64

^a Data are shown as mean±S. E. M. ; ^b one-way ANOVA test

DP = developed pressure of left ventricle ; +dP/dt_{max} = maximum peak positive

rate of change of left ventricular pressure ; -dP/dt_{max} = maximum peak negative rate of change of left ventricular pressure ; CF = coronary flow

Table 2. Percent recovery of Myocardial Function and Coronary Flow

Variable	Group					p-value ^b
	Control	I	II	III	IV	
DP(mmHg)	76±11	101±7	103±13	74±14	37±11 ^c	0.002
+dP/dt _{max} (mmHg/s)	92±17	129±10	111±21	83±16	35±8 ^c	0.002
-dP/dt _{max} (mmHg/s)	83±17	122±11	112±26	72±15	27±6 ^c	0.003
CF(mL/min)	84±5	103±8	94±8	89±13	54±7 ^c	0.004

^a Data are shown as mean±S. E. M. ; ^b one-way ANOVA test

^c p<0.05 versus Control

DP = developed pressure of left ventricle ; +dP/dt_{max} = maximum peak positive

rate of change of left ventricular pressure ; -dP/dt_{max} = maximum peak negative rate of change of left ventricular pressure ; CF = coronary flow

3. 좌심실압 최대 순간 증가율(+dP/dt_{max})

재관류시 투여한 L-arginine의 농도에 따라 재관류 30분에 측정된 각군의 좌심실압 최대 순간 증가율의 회복률은 유의한 차이를 보였다(p=0.002, Table 2). L-arginine을 1mM/L과 2mM/L의 농도로 투여한 I군과 II군에서는 129±10%, 111±21%로 허혈전보다 높은 좌심실압 최대 순간 증가율을 보였고 Control군의 92±17% 보다 높은 회복률을 나타냈다. 농도 3 mM/L 이상의 군에서는 Control군보다 회복률이 감소하였으며 특히 IV군에서는 35±8%로 유의하게 낮은 회복률을 보였다(p<0.05).

4. 좌심실압 최대 순간 감소율(-dP/dt_{max})

재관류시 투여한 L-arginine의 농도에 따라 재관류 30분에 측정된 각군의 좌심실압 최대 순간 감소율의 회복률은 유의한 차이를 보였다(p=0.003, Table 2). L-arginine을 1mM/L과 2mM/L의 농도로 투여한 I군과 II군은 회복률이 122±11%, 112±26%로 허혈전보다 높은 좌심실압 최대 순간 감소율을 보였다. 농도 3mM/L 이상에서는

Control군보다 회복률이 감소하였으며 특히 IV군은 54±7%로 유의하게 낮은 회복률을 보였다(p<0.05).

5. 관상관류량(Coronary flow)

재관류시 투여한 L-arginine의 농도에 따라 재관류 30분에 측정된 각군의 관상관류량의 회복률은 유의한 차이를 보였다(p=0.004, Table 2). 농도 1mM/L과 2mM/L의 L-arginine을 투여한 I군, II군은 103±8%, 94±8%로 Control군의 84±5%보다 높은 회복률을 나타냈다. III군은 89±13%로 대조군과 비슷한 회복률을 보였고 IV군은 54±7%로 대조군보다 유의하게 낮은 회복률을 보였다(p<0.05).

고 찰

본 연구에서 일산화질소의 전구물질인 L-arginine이 재관류시 심근기능과 관상관류량 회복에 미치는 영향은 L-arginine의 투여농도에 따라 다르게 나타났다. 즉 1 mM/L와 2mM/L의 L-arginine을 투여한 군에서는 심근 수축기능의 지표인 좌심실 발생압, 좌심실압의 최대 순간 증

가율과 심근 이완기능의 지표인 좌심실압의 최대 순간 감소율, 그리고 관상관류량의 회복률이 L-arginine을 투여하지 않은 Control군보다 우수하였다. 그러나 L-arginine의 농도를 증가시킴에 따라 각 기능의 회복률이 감소하여 3 mM/L의 L-arginine을 투여한 군은 회복률이 Control군과 비슷하였고 4 mM/L에서는 유의하게 낮은 회복률을 보였다. L-arginine에 의해 나타나는 심근보호효과는 내피유발 확장자인 일산화질소의 생성과 관계가 있다. L-arginine은 일산화질소의 전구물질로, 내피세포에 존재하는 NADPH-의존성 효소인 일산화질소 생성효소(Nitric oxide Synthase)에 의해 아미노산 L-arginine이 L-citrulline으로 전환되는 과정에 일산화질소가 생성된다¹⁰⁾. 생성된 일산화질소는 혈관평활근으로 확산되어 3',5'-cyclic guanosine monophosphate(cGMP)를 증가시킴으로써 혈관확장작용을 나타내는데 특히 관상혈관의 확장에 의한 관상혈류량의 증가는 허혈기중 손상된 심근기능의 회복을 촉진시키는 역할을 한다¹¹⁾. 그러나 일산화질소가 심근보호작용을 나타내는 데는 관상혈류량의 증가 외에도 다른 기전들이 관계되는 것으로 알려져 있다. 허혈손상이 발생한 심근부위의 관상혈관에는 재관류시 중성구가 유착되고 활성화되는데 활성화된 중성구에서는 산소자유기가 다량 생성됨으로써 재관류시 심근손상을 더욱 악화시킨다. Bath 등¹²⁾, Kubes 등¹³⁾은 L-arginine에 의해 증가된 일산화질소가 중성구의 유착과 활성화를 방지하는 기능을 하며 이로 인하여 산소자유기의 생성이 감소됨으로써 심근보호작용을 나타낸다고 하였다. 또한 일산화질소는 매우 불안정한 자유기로 과산화기에 의해 불활성화된다. 재관류시 다량 생성되는 과산화기가 일산화질소를 불활성화시키는 반면 일산화질소는 과산화기를 중화시키는 효과를 나타냄으로써 과산화기에 의한 심근과 관상내피의 손상이 억제된다¹⁴⁾. 이러한 다양한 기전들을 통해 일산화질소는 재관류시 심근을 보호하는 것으로 알려져 있다. 그러나 Matheis 등⁸⁾은 재관류시 L-arginine의 투여에 의해 증가된 일산화질소가 세포내에서 과산화기와 작용하여 과산화질소와 Hydroxyl기를 생성함으로써 심근에 재산소화 손상(Reoxygenation injury)을 일으켜 심근회복에 좋지 않은 영향을 미칠 수 있다는 것을 제시하였다. 본 저자들은 심근허혈후 재관류시 심근기능에 미치는 L-arginine의 영향이 연구에 따라 다르게 보고되는 것이 각 연구의 실험조건이 다르기 때문에 나타날 수 있다고 생각되어, 실험조건중에서 L-arginine의 농도에 의해 발생할 수 있는 심근기능 회복의 차이를 알아보 고자 하였다. 본 연구에서 L-arginine을 2 mM/L이하의 농도로 투여한 군에서는 심근기능과 관상관류량의 회복이

향상되었으나 투여농도를 증가시킴에 따라 회복률이 감소하여 4 mM/L의 농도에서는 Control군 보다 낮은 회복률을 보였다. L-arginine을 2 mM/L이하의 농도로 투여한 군에서는 허혈후 재관류시 재관류손상이 억제되면서 특히 심근세포의 수축과 이완속도가 증가되어 좌심실압 최대 순간 증가율과 최대 순간 감소율이 허혈기전보다도 증가하였을 것으로 생각된다. 한편 높은 농도의 L-arginine을 투여했을 때 나타나는 회복률의 감소가 실제로 Matheis 등⁸⁾의 보고와 같이 재산소화손상에 의한 것인지 아니면 L-arginine 자체의 영향에 의한 것인지는 본 실험을 통해서 확인할 수 없었다.

결 론

심근허혈후 재관류시 심근기능에 미치는 L-arginine의 영향이 연구에 따라 다르게 보고되고 있는데 이는 각 연구마다 실험조건이 다르기 때문에 나타날 수 있다고 생각되어, 저자들은 실험조건중 L-arginine의 농도에 의해 발생할 수 있는 심근기능 회복의 차이를 알아보 고자 하였다. 본 연구에서는 랫겐돌프 관류장치에 연결된 흰쥐 적출심장을 허혈에 노출시킨후 재관류시 농도를 달리하는 L-arginine을 공급하여 심근기능과 관상관류량 회복을 관찰, 비교분석하였다. 실험결과 L-arginine은 투여농도에 따라 심근기능과 관상관류량 회복에 미치는 영향이 다르게 나타났다. 즉 2 mM/L 이하 농도의 L-arginine은 심근기능과 관상관류량의 회복률이 우수하였다. 그러나 L-arginine의 농도를 증가 시킴에 따라 회복률이 감소하여 4 mM/L의 농도에서는 유의하게 낮은 회복률을 보였다. 이러한 연구결과를 통해 심근기능 및 관상관류량 회복을 향상시키기 위해서는 재관류시 L-arginine을 2 mM/L이하의 농도로 투여해야 하며, 그 이상 높은 농도의 L-arginine 투여시에 발생하는 회복률 저하의 기전에 관하여는 향후 연구가 필요할 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1989; 327 : 524-6
2. Furlong B, Henderson AH, Lewis MJ, Smith JA. Endothelium-derived relaxing factor inhibits in vitro platelet aggregation. *Br J Pharmacol* 1987; 90: 687-92
3. McCal T, Whittle BJR, Broughton-Smith NK, Moncada S. Inhibition of fMLP-induced aggregation of rabbit neutrophils by nitric oxide. *Br J Pharmacol* 1988; 95 : 517-22

4. Furchigott RF, Vanhoutte PM. *Endothelium-derived relaxing and contracting factors*. FASEB J 1989; 3:2007-18
5. Kawata H, Sawatari K, Mayer JE Jr. *Evidence for the role of neutrophils in the reperfusion injury after cold cardioplegic ischemia in neonatal lambs*. J Thorac Cardiovasc Surg 1991; 103:908-18.
6. Hashimoto K, Paul JP, Hartzell VS, Raymond C. *Endothelial cell dysfunction after ischemic arrest and reperfusion: A possible mechanism of myocardial injury during reflow*. J Thorac Cardiovasc Surg 1991; 102:688-94
7. Hiramatsu T, Forbess JM, Miura T, Mayer JE, Jr. *Effect of L-arginine and L-NAME on recovery of neonatal lamb hearts after cold cardioplegic ischemia: Evidence for an important role for endothelial production of nitric oxide*. J Thorac Cardiovasc Surg 1995; 109:81-7
8. Matheis G, Sherman MP, Buckberg GD, et al. *Role of L-arginine-nitric oxide pathway in myocardial reoxygenation injury*. Am J Physiol 1992; 262:H616-20
9. Takeuchi K, Cao-Danh H, Glynn P, Simplaceanu E, McGowan FX, del Nido PJ. *Negative inotropic and metabolic effects of the nitric oxide precursors L-arginine: partial preservation by amiloride*. Surg Forum 1993; 44:264-6
10. Palmer RMJ, Ashton DS, Moncada S. *Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine*. Nature 1988; 333:664-6
11. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. *Nitric oxide: Physiology, Pathophysiology, and Pharmacology*. Pharmacol Reviews 1991; 43:109-42
12. Bath PMW, MacGregor GA. *Spontaneous nitric oxide donors inhibit monocyte chemotaxis and increase intracellular cGMP concentration*. J Vasc Res 1992; 29:170-5
13. Kubes P, Suzuki M, Granger N. *Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion*. Proc Natl Acad Sci USA 1991; 88:4651-5
14. Rubany GM, Ho EH, Canto EH, et al. *Cytoprotective function of nitric oxide: inactivation of superoxide radicals produced by human leukocytes*. Biochem Biophys Res Commun 1991; 181:1392-7

=국문초록=

허혈후 재관류시 일산화질소의 전구체인 L-arginine이 심근기능에 미치는 영향은 각 연구의 조건에 따라 일정하지 않다. 저자들은 L-arginine의 농도에 의한 심근보호효과의 차이를 알아보고자 본 연구를 시행하였다. 란겐돌프 관류장치하의 흰쥐 적출심장에 37.5°C에서 30분의 허혈과 30분의 재관류를 실시하면서 재관류시 관류액에 L-arginine을 첨가하여 농도를 1,2,3,4 mM/L로 하였고 대조군에는 L-arginine을 첨가하지 않았다. 허혈기 직전과 재관류 30분에 좌심실 수축기능(좌심실 발생압, 좌심실압 최대 순간 증가율), 이완기능(좌심실압 최대 순간 감소율)과 관상관류량을 측정하였다. L-arginine 농도가 1 mM/L, 2 mM/L인 실험군은 좌심실 발생압, 좌심실압 최대 순간증가율, 좌심실압 최대 순간감소율 및 관상관류량의 회복률이 대조군에 비해 통계적 유의성은 없었으나 우수한 경향을 보였다. 그러나 L-arginine의 농도가 증가함에 따라 회복률은 감소하여 4 mM/L 농도의 실험군은 대조군보다 유의하게 낮은 회복률을 보였다(p<0.05). 이러한 연구결과를 통해 심근허혈후 재관류시 심근기능 및 관상관류량 회복을 향상시키기 위해서는 L-arginine을 2mM/L이하의 농도로 투여해야 하며 향후 그 이상의 높은 농도에서 나타난 회복 저하에 관한 연구가 필요할 것으로 생각된다.