

## 신성 고혈압 흰쥐의 초기단계에서 내피 의존적인 혈관반응의 변화

김주원 · 김학림 · 박조영 · 염지현 · 라현오 · 이영욱 · 안형수\* · 손의동 · 허인회#

중앙대학교 동덕여대, \*약학대학 약물학교실

(Received October 1, 1999)

## The Alteration of Endothelium-Dependent Vascular Response at Early Stage of 1K1C Renal Hypertensive Rats

Ju Won Kim, Hak Lim Kim, Jo Young Park, Ji Hyoun Youm, Hyen O La,  
Young Wook Lee, Hyung Soo Ahn\*, Uy Dong Sohn and In Hoi Huh#

Department of Pharmacology, College of Pharmacy, Chung Ang University and  
Dong Duck Womens University, \*Seoul 156-756, Korea

**Abstract** — We investigated whether endothelium-derived NO and endothelin-1 might result in the enhanced vasoconstriction induced by administration of norepinephrine (NE) at the early stage of one-kidney, one-clip (1K1C) renal hypertensive rats. We also studied the relation ship of renin-angiotensin system (RAS) using rat aorta in this hypothesis. L-NMMA (30  $\mu$ M) and L-NAME (30  $\mu$ M) enhanced vasoconstriction induced by NE in thoracic aorta of control rats. However angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitor didn't. The aorta of 1K1C rats showed a significantly exaggerated contractile response to NE as compared with control rats. Rubbing the endothelium abolished this difference. Ach and SNP-induced vasorelaxation show no significant difference between 1K1C and control rats. The treatment of phosphoramidon (10  $\mu$ M) and oral administration of captopril (0.05, w/v%) abolished the exaggerated contractile response to NE at early stage of 1K1C rats. These results suggest that the increase of contractile response at the early phase in 1K1C rat is partially involved in the activation of ACE.

**Keywords** □ L-NMMA, L-NAME, phosphoramidon, captopril, hypertension.

Renin-Angiotensin System(RAS)과 내피에서 유래되는 혈관에 대한 활성을 갖는 물질들은 심혈관계의 조절에 있어서 중요한 인자들이다. 내피는 endothelium-derived relaxing factor(EDRF)<sup>1,2)</sup>와 prostacyclin<sup>3)</sup>과 같은 혈관확장인자 뿐만 아니라 prostaglandin H<sub>2</sub>/thromboxane A<sub>2</sub> 그리고 endothelin-1(ET-1)과 같은 혈관수축인자를 유리한다.<sup>4-6)</sup>

EDRF는 내피로부터 유래하며 혈관 평활근으로 유리되어 혈관을 이완시키는 작용을 갖는다. EDRF는

최근에 nitric oxide(NO)와 동일한 것으로 생각되고 있으며, NO는 L-arginine으로부터 nitric oxide synthase(NOS)라는 효소에 의해 L-citrulline과 함께 생성된다.<sup>1,7-9)</sup>

NO는 평활근의 이완에 관여하는 soluble guanylate cyclase를 활성화하여 결과적으로 평활근의 myosin light chain의 인산화를 억제하여 혈관의 이완 효과를 나타낸다. 이러한 NO는 L-arginine 뿐 아니라 외인성 NO donor인 sodium nitroprusside, glyceryl nitrate 등에 의해서도 생성된다.<sup>10)</sup>

내피로부터 생성/유리되는 NO는 외부의 자극 없이도 끊임없이 생성/유리되는 것으로 알려져 있으며,<sup>11,12)</sup>

# 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로  
(전화) 02-820-5614 (팩스) 02-826-8752

이러한 basal intrinsic NO는 혈관수축물질과 생리적인 길항관계로서 고혈압을 유발하는 자극에 대하여 억제제로서 작용하는 것으로 보인다.

L-arginine의 guanidino nitrogen 중 하나에 구조적인 변화를 준  $N^G$ -monomethyl-L-arginine(L-NMMA),  $N^G$ -nitro-L-arginine(L-NOARG),  $N^G$ -nitro-L-arginine methyl ester(L-NAME)등이 유도되었으며, 이들은 NOS에 상경적인 억제작용을 보인다.<sup>12,13</sup> 이들 물질들은 *in vitro*에서 내피 의존적인 혈관이완을 억제하고, *in vivo*에서 강력한 혈압상승을 보여, NO가 전신 혈압 조절에 중요한 역할을 가진다는 것을 증명해 준다.<sup>14</sup>

21개의 아미노산으로 이루어진 혈관 수축성 peptides인 endothelin(ET)은 본래 배양된 흉곽 대동맥의 내피세포에서 처음 발견되었으며,<sup>4</sup> adrenal gland 나 astrocyte등의 다른 조직에서도 존재하는 것으로 알려졌다. ET family는 ET-1, ET-2, ET-3라 불리는 3개의 이성체와 *Atractaspis engaddensis*의 독으로부터 분리한 동일형의 4개의 peptides로 이루어진다.

Human ET-1 gene의 primary translation product는 prepropeptide라 불리며 212개의 아미노산으로 구성된다. 이 prepropeptide는 dibasic amino acid endopeptidase와 carboxypeptidase에 의해 37-41개의 아미노산으로 이루어진 big ET-1으로 변화한 후, endothelin converting enzyme이란 효소의 작용으로 ET-1으로 활성화된다.

Thrombin, arginine vasopressin, epinephrine, angiotensin II, A23187 및 phorbol esters 등은 endothelin mRNA의 발현을 촉진하여 배양된 내피세포에서 ET의 유리를 증가시킨다.<sup>4,15,16</sup> ET-1은 그 생리학적인 활성이 매우 강력하며, 또 다양한 것으로 알려져 있는데 특히 혈관의 tone과 평활근 증식에 강력한 조절인자로 알려져 있다. 그러므로 ET-1의 생합성 조절의 변화는 심혈관계 질환에 중요한 원인이 될 것으로 보인다.

ET생성을 촉진하는 물질 중에서 angiotensin II (Ang II)는 고혈압에 있어서 특히 주목을 받는데 이는 순환 또는 혈관에서의 RAS가 고혈압의 병인에 깊이 관여하기 때문이다.<sup>17</sup> 이러한 Ang II는 흰쥐의 경동맥에서 내피가 존재할 경우 그 수축이 감소하는데, 이는 내피의 AT1 수용체에 의한 NO의 유리의 증가에 의

한 것으로 보고 되었다.<sup>18</sup>

한편 자발적 고혈압 쥐(SHR)의 perfused mesenteric resistance arteries에서, Ang II(100 nmol/L)의 short-term application은 ET-1의 local vascular production을 증가시켜서 NE에 의한 혈관수축을 증대시키는 것으로 보고 되었다.<sup>19</sup> 대부분의 경우 순환하는 ET-1의 양은 매우 적기 때문에 이러한 효과증대기전은 생리적, 또는 병태생리적으로 대단히 중요할 것으로 생각된다.

임상 및 고혈압 동물모델에서 NE이나 vasopressin과 같은 vasoconstrictor에 대한 혈관의 반응성이 증가하는 것으로 관찰되었는데,<sup>20-22</sup> Folkow등은 그 원인으로 혈관 벽의 비후나 증막(medial)의 비후로 인하여 혈관 벽과 내강의 비가 증가하기 때문이라고 하였다.<sup>23</sup> 그러나 다른 연구에 의하면 그러한 기전만으로는 설명이 완전하지는 않은 것으로 보고 되었다. Prewitt등은 one-kidney one-clip renal hypertensive rat(1K1C RHR)에서는 내강의 감소에도 불구하고 혈관 벽은 비후하지 않았으며,<sup>24</sup> 다른 연구에 의하면 신동맥의 협착을 유발한 토끼에 있어서도 고혈압의 발현 이전에 NE에 대한 감수성의 증가 및 혈관수축반응의 증가가 일어난다고 보고하였다.<sup>20,21</sup>

이에 본 연구는 1K1C RHR의 초기 단계에서 나타나는 NE에 대한 수축 반응의 증가가 내피 의존적인 반응인지 확인하였고, Ach와 SNP에 의한 이완반응의 변화 여부를 확인하였다. 또한 내피에서 유도된 인자와의 관련성을 NOS 및 ET와 관련된 상경적 길항체들을 사용하여 연구하였다. 마지막으로 이러한 반응성의 변화와 RAS의 활성화와의 관계를 Angiotensin Converting Enzyme(ACE) 억제제인 captopril을 사용하여 확인하였다.

## 실험방법

### 시약

(-)-Arterenol([1]-Norepinephrine) hydrochloride, acetylcholine chloride,  $N^G$ -monomethyl-L-arginine,  $N^G$ -nitro-L-arginine methyl ester, phosphoramidon, sodium nitroprusside, thiopental sodium, atropine sulfate, Pentobarbital, phenylephrine hydrochloride, captopril 및 기초 시약은 Sigma(St Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

**실험 동물**

Sprague-Dawley계 흰쥐 암컷을 사용하였으며, 대한 실험동물센터(Korea)에서 구입하였다. 항온 항습(20±1°C, 55±3°C)의 조건 하에서 사육하였으며, 물과 사료는 제한하지 않았다. 실험시 흰쥐의 체중은 180~250 g이었다.

**시약 조제**

영양액은 Krebs' solution을 사용하였으며 조성은 다음과 같다. (단위 mM): NaCl 118, KCl 4.8, CaCl<sub>2</sub> 2.5, MgSO<sub>4</sub> 1.2, NaHCO<sub>3</sub> 24, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2, glucose 11. 실험시 NaCl, KCl, MgSO<sub>4</sub>, NaHCO<sub>3</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, glucose는 10배의 stock solution으로 조제하여 Krebs' solution 2l 조제시 stock solution 200 ml를 취하여 증류수로 희석하여 사용하였고, 여기에 2 M CaCl<sub>2</sub> 2.5 ml를 가하여 최종 농도가 2.5 mM이 되도록 하였다. 1N HCl로 pH를 7.4로 조정하여 실험하였다.

Pentobarbital sodium 및 thiopental, atropine은 생리 식염수에 녹여 사용하였고, L-NMMA, L-NAME, Ach, phenylephrine(PE), arginine, phosphoramidon 등은 모두 증류수에 녹여 사용하였다.

**수축기 혈압의 측정**

흰쥐를 마취하지 않은 상태로 온도조절상자(temperature controller box)내에서 30분간 안정화시킨 뒤 tail-cuff method를 사용하여 수축기 혈압 및 심박수를 측정하였다.

**One-kidney, one-clip renal hypertensive rats의 수술**

흰쥐를 atropine sulfate(1 mg/kg i.p.)으로 전처리했다. 15분간 안정화시킨 후, pentobarbital sodium (40 mg/kg i.p.)으로 마취하고 흰쥐의 양 옆선을 절개하여 우측 신장은 동맥을 결찰한 후 적출하고, 좌측 신장의 artery에는 clipping을 하여 stenosis를 유발했다. 대조 군에서는 clipping을 제외한 동일한 수술을 행했다. 수술 후 48시간이 경과하면 흉곽 대동맥을 적출하여 실험했다. 수술 후 물과 사료는 자유롭게 섭취토록 하였으며, ACE 억제제 투여 군은 식수에 0.05 w/v%의 captopril을 용해하여 섭취토록 하였다.

**흉곽 대동맥의 적출**

흰쥐를 thiopental sodium(50 mg/kg i.p.) 마취하고, 개복한 다음, 하대 정맥을 절단하여 사혈시키고, 즉시 개흉하여 심장과 함께 흉곽 대동맥을 적출하였다. 적출한 혈관은 37°C으로 유지된 Krebs' solution 속에서 산소를 공급하며, 지방 조직과 결합 조직을 제거하여 길이 3~5 mm 정도의 ring으로 절단하였다. 이 ring을 28G needle hook에 걸어 organ bath 내의 Krebs' solution 속에서 hook holder와 force displacement transducer의 고리 사이에 현수 하였다. Organ bath 내에는 Krebs' solution을 15 ml씩 채우고, organ bath 외벽의 water jacket을 통해 circulator로 37°C을 유지시켰으며, medical oxygen(95% O<sub>2</sub>+5% CO<sub>2</sub>)을 송기 시켰다.

**수축, 이완 반응 측정**

Arterial ring에 2g의 resting tension이 주어지도록 base line을 조정하고 2 cm/g tension으로 반응하도록 sensitivity를 조정한 다음, 15분마다 Krebs' solution으로 세척하면서 60분 동안 평형을 이루도록 조정하였다. 수축 실험에서는 평형을 이룬 ring을 100 mM KCl로 수축시킨 후 Krebs' solution으로 세척하고, 다시 30분간 평형을 이루도록 한 후 실험하였다. 이완을 측정하는 실험에서는 평형을 이룬 ring을 10~7 M PE으로 수축시킨 후 이완제를 가하였다. 실험 결과는 force displacement transducer를 low-level D.C. pre-amplifier에 연결하여 isometric tension의 변화를 polygraph로 기록하여 혈관의 수축, 이완 반응을 기록하였다.

L-NMMA와 L-NAME 처리 군에서는 NE처리 10분전에 전처리 하였다. Phosphoramidon처리 군에서는 NE처리 30분전에 처리하였다.

**통계 처리**

NE에 의한 수축 실험 결과는 100 mM KCl에 대한 % 수축으로 나타내었다. 이완 반응에서는 10<sup>-7</sup> M PE으로 전수축시킨 후 혈관 이완 물질을 가하여 PE 수축에 대한 % 이완반응으로 나타내었다. 결과는 mean±SEM으로 표시하였다. pD<sub>2</sub>는 pharmacological calculation system을 사용하여 계산하였으며 유의성의 판정에는 Student's t-test와 ANOVA를 사용하였으며,

ANOVA에서는  $P < 0.05$ 를 통계학적 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

### 실험결과 및 고찰

Table I은 control rats와 1K1C, 그리고 ACE inhibitor인 captopril을 투여한 세 군의 체중과 tail-cuff method를 이용하여 측정한 수축기 혈압과 심박수를 요약한 것이다. 흉곽 대동맥을 적출하기 직전 측정된 흰쥐의 체중은 군간에 유의성 있는 차이는 보이지 않았다. 수축기 혈압은 1K1C 군에서 신동맥 협착 수술 후 48시간이 지난 후에는 약간의 상승이 관찰되었다. 이러한 수축기 혈압의 상승은 captopril 투여 군에서는 소실되었다. 1K1C 및 captopril 투여군 모두에서 심박수의 변화는 관찰되지 않았다.

#### Control rats 에 있어서 NOS 억제제인 L-NMMA 와 L-NAME 및 ECE 억제제인 phosphoramidon 이 NE에 의한 혈관수축반응에 미치는 영향

NE ( $10^{-4}$ ~ $1 \mu\text{M}$ )에 의한 arterial ring의 수축에 있어서 L-NMMA( $30 \mu\text{M}$ )와 L-NAME( $30 \mu\text{M}$ )는 10분전에, phosphoramidon( $10 \mu\text{M}$ )은 30분전에 전 처리한 결과 Fig. 1과 같은 용량-반응 곡선을 얻을 수 있었다.

NE는 교감신경 효능 약으로서 혈관평활근의  $\alpha_1$  수

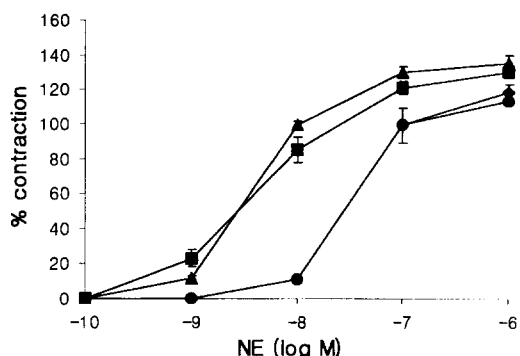


Fig. 1 – Dose-response curves show the effect of NOS inhibition and ECE inhibition on norepinephrine induced vasoconstriction in control rats. (◆), control; (■), L-NMMA  $30 \mu\text{M}$ ; (▲), L-NAME  $30 \mu\text{M}$ ; (●), phosphoramidon  $1 \times 10^{-5} \text{M}$ . Error bars are SEM.

용체에 작용하여 PLC를 활성화시켜서  $\text{IP}_3$ 와 DAG의 증가로 세포내 유리  $\text{Ca}^{2+}$ 의 농도를 증가시켜서 혈관 수축반응을 나타낸다.

NOS inhibitor인 L-NMMA는 rat의 내피에서 basal NO의 생성을 억제하는 물질로서<sup>25)</sup> NE에 의한 혈관 수축의 반응성 및 수축력을 유의성 있게 증가시켰다 (Table II). L-NAME는 basal NO뿐만 아니라 agonist에 의한 NO의 생성도 억제하는 비특이적인 억제제로서<sup>26)</sup> L-NMMA와 마찬가지로 NE에 의한 혈관 수축

Table I – Body weight, systolic blood pressure, and heart rate in control and 1K1C renal hypertensive rats, before and 48 hours after renal artery stenosis.

	Body weight, g		Systolic BP, mmHg		Heart Rate, bpm	
	48h	Start	48h	Start	48h	Start
Control	217±10	144±3	146±3*	326±4	330±4	330±4
1K1C	215±5	144±3	161±6 <sup>#</sup>	334±5	330±6	330±6
Control+captopril	231±6	143±8	138±5	330±8	335±5	335±5
1K1C+captopril	238±3	135±5	138±3	325±5	325±5	325±5

BP indicates blood pressure; bpm, beats per minute; start, time at which renal artery stenosis or sham operation was performed; 48h, 48 hours after renal artery stenosis; control, sham-operated rats; 1K1C, one-kidney, one-clip renal hypertensive rats. Values are mean ± SEM. \* $P < 0.05$  vs 1K1C; <sup>#</sup> $P < 0.05$  vs start. (by t-test).

Table II – Norepinephrine-induced vasoconstriction in control rats

Group	pD <sub>2</sub>	Max Const, % vs KCl
Control	6.85±0.07	120±4
Control+L-NMMA ( $3 \times 10^{-5} \text{M}$ )	7.32±0.04**	130±2*
Control+L-NAME ( $3 \times 10^{-5} \text{M}$ )	7.35±0.05**	136±5*
Control+phosphoramidon ( $1 \times 10^{-5} \text{M}$ )	6.94±0.01	116±1

pD<sub>2</sub> indicates the negative logarithm of half-maximal constriction; Max Const, maximal constriction of aortic strips; L-NMMA, N<sup>G</sup>-monomethyl-L-arginine; L-NAME, N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine methyl ester. Values are mean ± SEM. \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  vs control (by t-test)

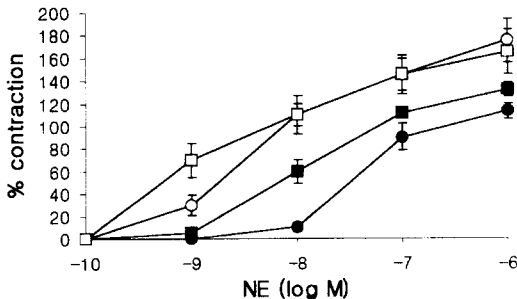
의 반응성 및 수축력을 유의성 있게 증가시켰다. 이러한 결과는 자극제가 없는 상태에서 끊임없이 내피에서 유리되는 basal NO가 내인성 혈관 수축물질에 대한 생리적인 길항제로 작용하여 고혈압을 유발하는 자극에 대한 억제제로 작용한다는 보고와 일치한다.<sup>27)</sup>

Endothelin을 활성화시키는 효소로 알려진 ECE의 억제제인 phosphoramidon을 전처치한 결과 이 물질은 control rats의 aortic ring의 NE에 의한 수축에 영향이 없는 것으로 나타났다. 이는 Yasuaki<sup>19)</sup> 등의 보고와 일치하는 결과로서 ET-1이 정상 흰쥐의 흉곽 대동맥에서는 NE에 의한 혈관수축에 관여하지 않음을 의미한다.

**1K1C rats의 NE에 대한 혈관수축반응의 변화**

1K1C rats의 흉곽 대동맥을 적출하여 NE에 대한 용량-반응 곡선을 구한 결과 1K1C rats의 aortic ring에서 NE에 의한 수축반응이 control rats에 비하여 유의성 있게 증가함을 관찰할 수 있었다(Fig. 2, Table III)( $P < 0.05$  by ANOVA). 또한 control rats의 내피를 제거한 혈관을 실험한 결과 NE에 의한 용량-반응 곡선을 좌측으로 이동시켜서 유의성 있는 수축의 증가를 보였다( $P < 0.05$  by ANOVA). 1K1C rats의 aortic ring의 내피를 제거한 결과도 control rats와 동일한 결과를 얻을 수 있었다. 그러나 이러한 내피의 제거는 1K1C rats와 control rats에서 NE에 의한 혈관수축반응의 차이를 소실시켰다.

이러한 결과는 여러 동물 모델의 고혈압에서 NE, vasopressin과 같은 혈관수축물질에 대한 혈관의 반응성 및 수축력이 증가한다는 종래의 보고와 일치하는



**Fig. 2** – Dose-response curves show the effect of endothelium removal (rubbed) on norepinephrine-induced vasoconstriction in one-kidney, one-clip (1K1C) and control rats. (●), control + intact; (■), 1K1C + intact; (○), control + rubbed; (□), 1K1C + rubbed.

**Table III** – Norepinephrine-induced vasoconstriction in 1K1C rats and control rats

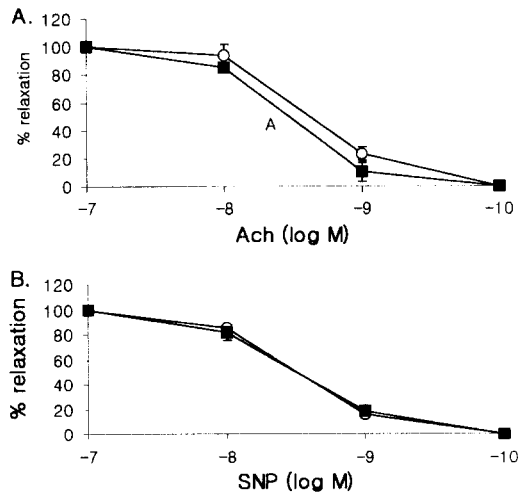
Experiment	pD <sub>2</sub>	Max Const, % vs KCl
Effect of endothelial removal		
Control	6.85 ± 0.07	120 ± 4
1K1C	7.29 ± 0.02	130 ± 3**
Control+rubbed	7.25 ± 0.13	164 ± 9**
1K1C+rubbed	7.28 ± 0.13	160 ± 12**
Effect of L-NAME(3 × 10 <sup>-5</sup> M)		
Control+L-NAME	7.35 ± 0.05**	136 ± 5**
1K1C+L-NAME	7.53 ± 0.09**#	163 ± 5**#
Effect of phosphoramidon(1 × 10 <sup>-5</sup> M)		
Control+phosphoramidon	6.94 ± 0.01	116 ± 1
1K1C+phosphoramidon	7.09 ± 0.02#	121 ± 2#

pD<sub>2</sub> indicates the negative logarithm of half-maximal constriction; Max Const, maximal constriction of aortic strips; rubbed, endothelium removal; L-NAME, N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine methyl ester. Values are mean ± SEM. \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$  vs control; # $p < 0.05$  vs 1K1C

것이며,<sup>20,21)</sup> 또한 이러한 변화가 내피 의존적인 변화임을 확인할 수 있었다.

**내피 의존적인 혈관반응의 변화에 대한 EDRF 및 endothelin과의 관련성**

PE(10<sup>-7</sup>M)으로 수축시킨 control과 1K1C rats의 aortic ring에 NO의 유리를 자극하는 agonist인 Ach (10<sup>-9</sup>~10<sup>-6</sup> M)을 점진적으로 가한 결과 Fig. 3-A와



**Fig. 3** – Relaxation response curves show no significant difference between 1K1C and control rats in vaso-relaxation by (A) acetylcholine and (B) sodium nitroprusside (SNP). (○), Control; (■), 1K1C.

같은 결과를 얻을 수 있었다. Fig. 3-A에서 알 수 있듯이 Ach에 의한 혈관의 이완반응은 1K1C과 control rats간에 차이를 보이지 않았다.

또한 외인성 NO donor로 작용하는 sodium nitroprusside(SNP)을 점진적으로( $10^{-9}$ ~ $10^{-7}$  M) 가한 결과, SNP도 Ach와 마찬가지로 군간의 유의성 있는 차이를 보이지 않았다(Fig. 3-B). 이러한 결과는 고혈압 쥐에서 내피 의존적인 이완반응이 감소한다는 보고와는 상반되는 것으로서<sup>28,29</sup> 약간의 혈압 상승이 관찰되는 1K1C rats의 초기 단계에서는 Ach, SNP에 의한 혈관의 이완이 변화하지 않음을 의미한다.

1K1C rats의 혈관반응의 변화가 EDRF와 관련이 없음을 제시하는 앞의 실험을 확인하기 위해 NOS 억제제인 L-NAME에 의해 1K1C과 control rats간에 NE에 의한 수축반응의 차이가 소실되는지를 실험한 결과 Fig. 4와 같은 결과를 얻을 수 있었다. NE처리 10분전에 전 처리한 L-NAME는 control rats와 마찬가지로 1K1C rats의 NE에 대한 용량-반응 곡선을 좌측으로 이동시키고, 혈관의 반응성과 수축력을 증가시켰다(Table III). 그러나 L-NAME 처리 군이 control rats와 1K1C rats에 있어서 유의성 있는 차이가 있음을 알 수 있었다( $P < 0.05$  by ANOVA). 이는 1K1C rats에서의 반응성의 증가 및 수축력의 증가가 NO에 의한 것이 아님을 간접적으로 증명하는 것이다.

1K1C rats의 NE에 대한 반응성의 변화와 ET-1과의 관련성을 확인하기 위해 phosphoramidon( $1 \times 10^{-5}$  M)을 전처리한 결과 Fig. 5와 같이 1K1C rats의 aortic ring에서 관찰된 NE에 대한 반응성의 증가와 수축력의 증가는 phosphoramidon처리 군에서는 소실

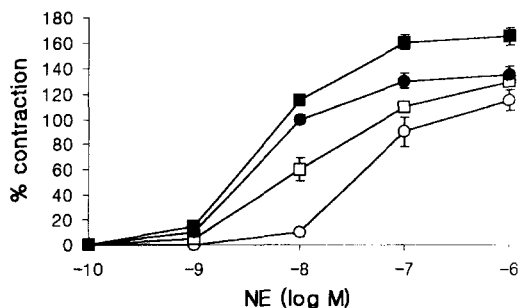


Fig. 4 – Dose-response curves show the effect of L-NAME ( $3 \times 10^{-5}$  M) on norepinephrine(NE) induced vasoconstriction in 1K1C and control rats. (○), control; (□), 1K1C; (●), control+L-NAME; (■), 1K1C+L-NAME.

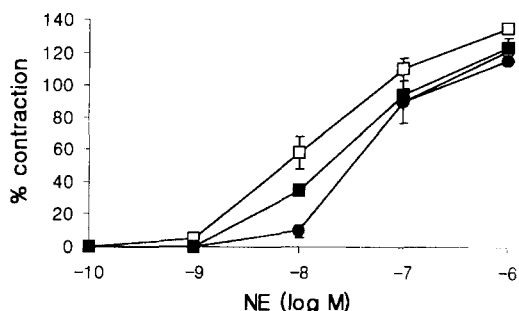


Fig. 5 – Dose-response curves show the effect of phosphoramidon ( $1 \times 10^{-5}$  M) on the potentiation of control+phosphoramidon; (■), 1K1C+phosphoramidon.

됨을 알 수 있었다. 이는 다른 고혈압 모델에서 보고된 바<sup>19</sup>와 같이 1K1C rats의 초기단계에서 관찰되는 NE에 대한 혈관 반응의 증가 및 수축력의 증가에 ET-1이 관여함을 의미한다.

#### 내피 의존적인 혈관반응의 변화에 대한 renin-angiotensin system 과의 관련성

위의 2번 실험에서 나타난 1K1C rats의 혈관반응의 변화와 RAS과의 관련성을 확인하기 위해 renal artery stenosis를 유발한 rats와 control rats에 48시간동안 captopril(0.05, w/v%)을 식수에 용해하여 자유롭게 섭취토록 한 후 흉곽 대동맥을 적출하여 실험한 결과 Fig. 6과 같은 결과를 얻을 수 있었다.

Fig. 6에 나타난 바와 같이 ACE 억제제인 captopril을 renal artery stenosis 유발 후에 경구 투여 한 결과 1K1C rats에서 나타나는 NE에 대한 수축 반응의 증가에 유의성 있는 억제효과를 나타내었다

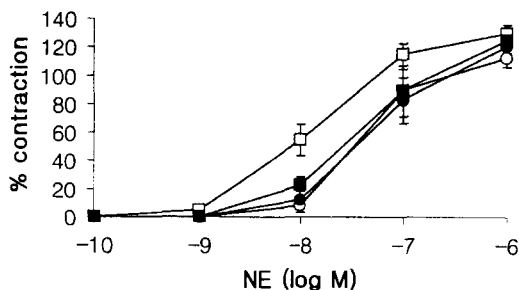


Fig. 6 – Dose-response curves show the effect of oral administration of captopril (0.05%) on norepinephrine (NE)-induced vasoconstriction in 1K1C and control rats. (○), control; (□), 1K1C; (●), control+captopril; (■), 1K1C+captopril.

**Table IV** – Norepinephrine-induced vasoconstriction treated with oral administration of captopril

Group	pD <sub>2</sub>	Max const, mg
Control	6.85±0.07	120±4
1K1C	7.29±0.02*	130±3*
Control+captopril	6.82±0.03	123±5
1K1C+captopril	6.94±0.13 <sup>#</sup>	127±2

pD<sub>2</sub> Indicates the negative logarithm of half-maximal constriction; Max Const, maximal constriction of aortic strips. Values are mean ± SEM. from 6 experiments \*P<0.05 vs. control; P<0.05 vs. 1K1C (by t-test).

(P<0.05 by ANOVA). 그리고 Table IV에서와 같이 1K1C rats의 pD<sub>2</sub>를 감소시켰으나 수축력에는 유의성 있는 차이를 보이지 않았다.

이상의 실험 결과에 의하여 1K1C rats의 초기단계에서 나타나는 혈관의 수축반응의 증가는 부분적으로 ACE의 활성화와 관련이 있다는 결론을 얻을 수 있었다.

**결 론**

Control rats와 1K1C rats에서 NE에 의한 수축에 대한 NOS 억제제와 ECE 억제제의 효과, Ach와 외인성 NO donor에 의한 혈관의 이완 반응의 변화를 살펴보고, 이에 대한 RAS와의 관계를 검색한 본 실험의 결과는 다음과 같다.

Control rats에서 흉곽 대동맥의 NE에 의한 수축은 NOS 억제제인 L-NMMA와 L-NAME에 의하여 반응성 및 수축력이 증가되었다. 그러나 ECE 억제제를 사용한 결과 이러한 변화는 관찰되지 않았다. 1K1C rats에서 NE에 의한 수축반응은 control rats에 비해 유의성 있는 차이를 보였으며, 이러한 차이는 내피의 제거에 의해 소실되었다. Ach와 NO donor drug인 SNP에 의한 혈관의 이완은 control rats와 1K1C rats간에 차이를 보이지 않았으며, NE에 의한 수축반응에서 L-NAME를 사용하여 수축반응을 증가 시킨 결과, control rats와 1K1C rats간에 유의성 있는 차이를 보였다. 1K1C rats에서 관찰되는 NE에 대한 수축반응의 증가는 phosphoramidon 전처리와 captopril의 경구투여로 소실되었다.

이상의 결과로 미루어보아 1K1C rat의 초기단계에서 나타나는 혈관의 수축반응증가는 부분적으로 ACE의 활성화와 관련이 있을 것으로 생각된다.

**문 헌**

- 1) Furchgott, R. F and Zawadzki, J. V.: The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* **288**, 373 (1980).
- 2) Palmer, R. M. J., Ferrige, A. G. and Moncada, S.: Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* **327**, 524 (1987).
- 3) Moncada, S. and Vane, J. R.: Pharmacology and endogenous roles of prostaglandin endoperoxidase, thromboxane A<sub>2</sub> and prostacyclin. *Pharmacol. Rev.* **30**, 293 (1978).
- 4) Yanagisawa, M., Kurihara, H., Kimura, S., Tomobe, Y., Kobayashi, M., Mitsui, Y., Yazaki, Y., Goto, K. and Masaki T.: A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* **332**, 411 (1988).
- 5) Inoue, A., Yanagisawa, M., Kimura, S., Kasuya, Y., Miyachi, T., Goto, K. and Masaki T.: The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 2863 (1989).
- 6) Luscher, T. F, Boulanger, C. M., Dohi, Y. and Yang Z.: Endothelium-derived contraction factors. *Hypertension* **19**, 117 (1992).
- 7) Furchgott, R. F.: Role of endothelium in responses of vascular smooth muscle. *Circ. Res* **53**, 557 (1983).
- 8) Luscher, T. F.: Imbalance of endothelium-derived relaxing and contracting factors. *Am. J. Hypertens.* **3**, 317 (1990).
- 9) Luscher, T. F., Raji, L. and Vanhoutte, P. M.: Endothelium-dependent vascular responses in normotensive and hypertensive Dahl rats. *Hypertension* **9**, 157 (1987).
- 10) Anthony, R. B., Frederick, W., Flitney, D. and Lyn, H. W.: NO, nitrosonium ions, nitrosothiols and iron-nitrosyls in biology: a chemist's perspective. *TIPS* **16**, 18 (1995).
- 11) 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).
- 12) 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).
  - 13) Moore, P.K., Al-Swayeh, O.A., Chong, N.W.S., Evans, R. and Gibson, A.: N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine (L-NOARG), a novel L-arginine reversible inhibitor of endothelium-dependent vasodilation in vitro. *Br. J. Pharmacol.* **99**, 408 (1990).
  - 14) 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. USA* **86**, 3375 (1989).
  - 15) Schini, V. B., Hendrickson, H., Heublein, D. M., Burnett, J. C. Jr., Vanhoutte, P. M.: Thrombin enhances the release of endothelin-1 from cultured porcine aortic endothelial cells. *Eur. J. Pharmacol.* **165**, 333 (1989).
  - 16) Emori, T., Hirata, Y., Ohta, K., Shichiri, M. and Marumo, F.: Secretory mechanism of immunoreactive endothelin in cultured bovine endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **160**, 93 (1989).
  - 17) Dzau, V. J.: Multiple pathways of angiotensin production in blood vessel wall. Evidence, possibilities and hypotheses. *J. Hypertens.* **7**, 933 (1989).
  - 18) Chantal, M. B., Lidia, C. and Bernard, I. L.: Endothelial AT<sub>1</sub>-mediated release of nitric oxide decrease angiotensin II contractions rat carotid artery. *Hypertension* **26**, 752 (1995).
  - 19) Yasuaki, K., Alfred, W. A. H., Chantal, M. B., Fritz, R. B. and Thomas, F. L.: Endothelin stimulated by angiotensin II augments contractility of spontaneously hypertensive rat resistance arteries. *Hypertension* **19**, 131 (1992).
  - 20) Ichikawa, S., Johnson, J. A., Fowler, W. L. Jr., Payne, C. G., Kurz, K. D. and Keitzer, W. F.: Pressor responses to norepinephrine in rabbits with 3-day and 30-day renal artery stenosis. *Circ. Res.* **43**, 437 (1978).
  - 21) Johnson, J.A., Ichikawa, S., Kurz, K. D., Fowler, W. L. Jr. and Payne, C. G.: Pressor responses to vasopressin in rabbits with 3-day renal artery stenosis. *Am. J. Physiol.* **240**, H862 (1981).
  - 22) Berecek, K. H., Stocker, M. and Gross, F.: Changes in renal vascular reactivity at various stages of deoxycorticosterone hypertension in rats. *Circ. Res.* **46**, 619 (1980).
  - 23) Folkow, B., Hallback, M., Lundgren, Y., Sivertsson, R. and Weiss L.: Importance of adaptive changes in vascular design for establishment of primary hypertension, studied in man and in spontaneously hypertensive rats. *Circ. Res.* **32(suppl 1)**, I2 (1973).
  - 24) Prewitt, R. L., Chen, I. H. and Dowell, R. F.: Microvascular alterations in the one-kidney, one-clip renal hypertensive rats. *Am. J. Physiol.* **246**, H728 (1984).
  - 25) Frew, J. D., Paisley, K. and Martin, M.: Selective inhibition of basal but not agonist-stimulated activity of nitric oxide in rat aorta by N<sup>G</sup>-monomethyl-L-arginine. *Br. J. Pharmacol.* **110**, 1003 (1993).
  - 26) Randall, M. D. and Griffith, T. M.: Differential effects of L-arginine on the inhibition by N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine methyl ester of basal and agonist-stimulated EDRF activity. *Br. J. Pharmacol.* **104**, 743 (1992).
  - 27) Martin, W., Furchgott, R. F., Villani, G. M. and Jothianandan, D.: Depression of contractile responses in rat aorta by spontaneously released endothelium-derived relaxing factor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **237**, 529 (1986).
  - 28) Voorde, J. V. and Leusen, I.: Endothelium-dependent and independent relaxation of aortic rings from hypertensive rats. *Am. J. Physiol.* **250**, H711.
  - 29) Lockette, W., Otsuka, Y. and Carretero, O.: The loss of endothelium-dependent vascular relaxation in hypertension. *Hypertension* **8(suppl2)**, II61 (1986).