

L-arginine 투여와 훈련이 SHR의 심혈관 반응과 면역력에 미치는 영향

곽 이 섭*

동의대학교 레저스포츠학과

Received July 29, 2005 / Accepted August 19, 2005

Combined Effect of Exercise and L-arginine Supplementation on Cardiovascular and Immune Responses in SHR. Yi-Sub Kawk*. *Department of Leisure and Sports Science, Donggeui University, 995 Eomgwangno, Busanjin-gu, Busan 614-714, Korea* – The purpose of this study is to investigate the combined effect of L-arginine supplementation and regular physical exercise on HR, BP, eNOS and Macrophage activation using SHR. To examine the differences among HR, BP, eNOS, and Macrophage activity levels, normotensive Wistar-Kyoto rats were used as a control. Thirty two male rats (six weeks old) were divided into four groups; eight WKY control (WKYC), eight SHR control (SHRC), eight SHR supplemented with L-arginine (SHRA), and eight SHR trained and supplemented with L-arginine (SHRTA). Obtained results were as follows: In the heart and blood pressure, there was significant differences among the four groups ($p < .05$) compare to SHRC. In the eNOS levels, there was significant differences among the four groups ($p < .05$) compare to SHRC. In the macrophage activity, there was significant differences among the four groups ($p < .05$) compare to SHRC. In conclusion, For the SHRC group, the level of eNOS is higher than that of WKYC, and we can expect tissue damage caused by toxic free radical. However, this can be stabilized by the L-arginine supplementation and regular physical training, we can also conclude regular aerobic training decrease cardiovascular stress caused by stabled macrophage activity. Therefore, we can trace it is the effect of training in SHR.

Key words – SHR, L-arginine, eNOS, Macrophage

본태성 고혈압은 심혈관 질환, 뇌혈관 질환, 신장 질환 등 병리학적인 위험성이 있는 것으로 알려져 있으며, 이는 혈관의 수축과 이완의 조절을 담당하는 내피세포의 구조적 기능과 지질성분의 불균형, 과 인슐린 혈증, 글루코스 내성 등이 직접적인 작용을 하는 것으로 알려져 있다[1]. 또한 과도한 유리지의 생성으로 인한 세포손상이 혈압의 상승을 유도한다는 연구결과도 보고되어[2], 많은 요인들이 복합적으로 작용하여 일어나는 것으로 생각된다. 결국 고혈압은 혈관질환으로 나타나고, 혈관질환은 면역력과 높은 연관성이 있지만 결국, 운동 활동이 고혈압 및 면역력에 직접적인 영향을 미치는 것으로 알려져 왔다[3,4]. 운동 활동은 인체에 많은 영향력을 미치며 가장 중요한 작용 중 하나로 혈관의 조절력을 증가시키고, 혈액순환을 촉진하는 등 혈관의 기능을 증가시키는 것을 들 수 있다[5,6]. 한편, 혈관내피세포의 기능에 필수적인 역할을 하는 nitric oxide (NO)는 혈압의 상승을 억제하며, 혈관확장 뿐만 아니라 운동수행력의 증가도 가져온다고 보고되고 있다[7]. nitric oxide synthase NOS에는 3가지 동종형이 있는데, 그 중 endothelial NOS (eNOS)에 의해 생성되는 NO는 혈관내피의 백혈구 및 혈소판 응집을 억제하는 작용과 근육세포를 이완시켜 혈관을 확장하는 작용을 가지고 있어, 적절한 긴장도 유지 및 혈 행을 유지하는데 도

움이 된다[8]. 최근 운동으로 인한 훈련이 고혈압 환자의 인슐린 반응과 글루코스 내성을 향상시키고, 혈압을 정상수준에 근접하도록 하는데 도움을 준다는 사실이 보고되었고[9], 장기간의 유산소 훈련이 신체의 항산화 능력을 향상시킴으로 지질과산화 감소에 영향을 미친다고 하였으며, NOS 활성의 증가로 혈압이 개선된다는 연구결과들이 밝혀졌다[10,11]. 이는 규칙적인 운동이 NO 생성경로를 활성화함으로 상승된 혈압을 감소하는 것으로 여겨진다. NO는 L-arginine, NADPH, 분자산소 등 여러 가지 요인들에 의해 NOS로부터 합성되어 지는데[12], 현재 외인성 L-arginine 투여의 체내 NO 생성효과에 대한 의견이 분분하고, 고혈압으로 인한 심혈관계 손상 상태에서 운동 중 반응하는 eNOS에 대한 반응과 지질과산화 및 대식세포의 활성정도를 함께 비교분석한 연구는 없었다. 따라서 본 연구는 같은 계열의 WKY 8마리와 SHR 24마리를 대상으로 규칙적인 훈련과 L-arginine 투여가 심혈관계 및 면역계에 미치는 영향을 분석하고자 한다.

재료 및 방법

실험동물

본 연구의 실험대상은 Spontaneously Hypertensive Rat (SHR) 24마리와 대조군으로서 Wistar-Koyto Rat (WKY) 8마리를 대상으로 크게, 정상군 (WKYC, $n=8$), 고혈압 통제군 (SHRC, $n=8$), 고혈압 투여군 (SHRA, $n=8$) 및 고혈압 훈련 투

*Corresponding author

Tel : +82-51-890-2213, Fax : +82-51-890-2643

E-mail : ysk2003@deu.ac.kr

여군(SHRTA, n=8)으로 분류하였으며, 실험동물의 분류와 특성은 <표. 1>에 나타나 있다.

사육, 훈련 및 투여방법

실험동물의 사육실 내부는 온도 22±2℃, 습도 50±5%, 소음(40~50 Phon이하) 및 조명(12시간 명/암)이 자동적으로 유지되도록 하였으며, 무균음료 및 멸균사료를 자유롭게 섭취시켰다. 훈련군으로 분류된 모든 실험동물은 1주간의 수영 적응훈련기간을 가진 후 적응여부를 가려, 9주간 주당 5일씩 60분간 수영훈련을 실시하였다. 사용된 풀은 70×70×60 cm 규격을 사용하였으며, 수온은 실험동물이 수영을 하기에 적당한 25~27℃를 유지하였다. 투여군으로 분류된 그룹은 Sigma chemical社(美)의 L-arginine을 무균 음료에 2% 농도로 용해하여 ad-libitum 방법으로 투여하였다.

체중, 심박수 및 혈압의 측정

체중은 일정한 시간에 CAS社(韓)의 Computing scale 체중계를 이용하여 측정하였으며, 식이섭취에 의한 체중 변화를 막기 위해 체중 측정 1시간 전에 사료와 음료의 섭취를 제한하였다.

심박수 및 혈압의 측정은 Muromachi kikai社(日)의 BP Monitor MK-1100을 사용하였다. 체중에 맞는 크기의 코팅 플라스틱 홀더(animal holder)를 선택하여, 몸체를 씌우고 움직임이 없도록 고정시켰으며, 고정된 실험동물은 35℃로 유지되는 플라스틱 চে임버에서 최대한 안정을 취할 수 있게 한 후, 측정기에 홀더를 고정시킨 다음, 꼬리에 커프를 연결시켜 측정을 하였다. 측정은 총 6회로 하였으며, 최고치와 최저치를 소거한 후, 4개 결과의 평균치를 자동 계산하였다.

혈액 및 조직채취

본 실험의 부검은 수영훈련으로 인한 일시적으로 운동 효과를 배제하기 위해, 훈련군의 경우 훈련종료 48시간 경과 후에 실시하였고, 사료는 부검 12시간 전에 공급을 중단하였지만, 음수는 계속 제공하였다. 실험동물들은 동물 수술실 도착 후, 충분한 안정을 취한 뒤 마취제 에틸에테르를 이용하여 마취시킨 후, 복부를 절개하여 대동맥에서 채혈하였다. 채혈 후 간 조직 0.5 g을 채취하였고, 훈련군 역시 안정을 취한 뒤 같은 방법으로 채취하였다.

표 1. Animals (mean±SD)

그룹	마리(n)	주령(week)	체중(g)
WKYC	8	6	120.6±8.13
SHRC	8	6	118.3±8.34
SHRA	8	6	121.2±6.78
SHRTA	8	6	117.7±10.23

WKYC: WKY Control, SHRC: SHR Control, SHRA: SHR supplemented with L-arginine, SHRTA: SHR Trained and supplemented with L-arginine

분석방법

우선 eNOS는 R&D社(美)의 eNOS Quantikine Immunoassay kit를 사용하여, Hewlette Packard社(美)의 Elisa를 이용한 UV법으로 분석하였다. 간세포를 slide glass를 이용하여 균질화시킨 다음, 300×g의 속도로 5분간 원심분리 후, lysis buffer (세포 1×10⁶/ml 당 1 ml의 buffer 용액)에 넣고, 2~8℃에서 1시간 동안 방치하였다. Microcoatingplate strips에 100 μl의 희석 시약, 표준시약과 모든 검체를 분주하고, 세척한 다음, 각 well에 200 μl의 conjugate를 넣고, 다시 세척한 후, 각 well에 200 μl의 substrate solution을 넣고, 실온에서 빛이 차단된 채로 30분간 배양시켰다. 배양 후 50 μl의 stop solution을 넣은 다음, 흡광도 450 nm에서 분석하였다. 대식세포 분석은 Pharmingen社(美)의 R-PE anti-rat Macrophage Subset monoclonal antibody를 사용하였다. 이 항체는 affinity chromatography에 의해 조직의 상층(supernatant)으로부터 분리하여 정제된 것으로 최적의 상태조건에서 R-PE와 결합되어 4℃에 보관하여 사용하였다. 분리한 혈액을 헤파린 처리된 용기에 보관한 후, Lysis buffer 2 ml을 넣어 5분간 반응시킨 다음, 원심분리 하였다(1500 RPM, 10 min, 4℃). 원심 분리 후 pellet을 RPMI 1640으로 2번 washing 한 다음 림프구 100 μl와 m Ab 10 μl를 혼합하여 37℃, 5% CO₂ 항온 항습기에서 20분간 배양 하였다. 반응시킨 샘플에서 대식세포의 활성화를 보기 위해 Becton dickinson社(美)의 유세포 분석기(FACscan)를 이용하여 측정하였고, 측정된 값의 정확한 분석을 위하여 Window Multiple Document Interface for Flow Cytometry (win MDI) software ver. 2.8을 이용하였으며, mean fluorescence index 값을 이용하였다.

자료처리

본 실험의 결과는 SPSS 통계 package를 이용하여 기술통계량을 산출하였고, 그룹간의 심박수, 혈압, eNOS 및 대식세포의 변화형태 비교를 위해 일원 분산분석법(One-way ANOVA)을 이용하여 분석하였으며, 사후 비교는 DUNCAN의 사후 검증법으로 검증하였다(p<.05).

결과 및 고찰

실험조건에 따른 심박수와 혈압의 변화

실험조건에 따른 심박수와 혈압의 차이는 <표. 2>에 나타나 있다. <표. 2>에 나타나 있듯이, 심박수의 변화는 고혈압 통제군에 비하여 고혈압 투여 군과 고혈압 훈련 투여군이 현저하게 감소하여 통계적으로도 유의한 차이를 나타내었다(p<.05). 특히 고혈압 훈련 투여군에서 가장 큰 감소를 보여 큰 효과를 나타내었지만 통제군의 값으로 회복되지는 않았다. 한편 실험조건에 따른 수축기 혈압은 고혈압 통제군에 비하여 고혈압 투여군과 고혈압 훈련 투여군이 현저하게 감소하

표 2. Effect of regular exercise and L-arginine supplementation on Heart rate (b/min) and Blood pressure (mmHg) changes (mean±SD) in SHR

그 룹	HR(b/min)	SBP(mmHg)	DBP(mmHg)
WKYC	346.25±17.45*	130.38±4.78*	85.13±3.31*
SHRC	460.63±13.20	215.25±9.05	142.88±4.82
SHRA	410.50±13.50*	189.25±7.07*	143.0±4.0
SHRTA	392.38±14.27*	180.0±5.50*	135.8±3.73*

WKYC: WKY Control, SHRC: SHR Control, SHRA: SHR supplemented with L-arginine, SHRTA: SHR Trained and supplemented with L-arginine

* $p < .05$, compare to SHRC

여 통계적으로도 유의한 차이를 나타내었다($p < .05$). 역시 고혈압 투여군에 비해 고혈압 훈련 투여군이 혈압의 감소에 가장 큰 효과를 보였지만 통제군의 값으로 완전히 회복하지 않았다. 이완기 혈압은 고혈압 통제군에 비하여 고혈압 투여군에서 변화를 보이지 않았고, 고혈압 훈련 투여군에서는 통계적으로 유의하게 감소하였다($p < .05$). 본 실험결과, 고혈압 통제군의 심박수와 혈압은 통제군과 비교하여 유의하게 높게 나타났다. 이는 혈관내피세포의 정상기능이 훼손됨으로 투과성 막으로의 기능이 상실되고, 혈관내막(intima)내 변형된 지단백의 생성으로 혈관직경이 좁아져, 고혈압 증세가 나타난 것을 의미한다. 하지만 L-arginine 투여와 규칙적인 훈련은 심박수와 혈압을 유의하게 낮추며, 비록 이 수치가 통제군의 수치는 아니더라도 심혈관계 스트레스 감소에 긍정적인 영향을 미치는 것으로 생각되며, NO 생성기전의 활성화와 맥락을 같이 하는 것으로 여겨진다. 이러한 결과는 109명의 여성을 대상으로 규칙적인 운동이 혈압강하 효과가 있었다는 최근의 연구결과를[13] 반영하는 것으로 보이며, 운동의 혈압강하 효과는 일반인 뿐만 아니라 고혈압군에서도 효과가 있음을 확인할 수 있었다.

실험조건에 따른 간조직의 eNOS 활성 변화

실험조건에 따른 간 조직의 eNOS 활성변화는 <표. 3>에 나타나 있다. <표. 3>에 나타나 있듯이, eNOS는 고혈압 통제군에 비해 고혈압 투여군에서 약 2배 정도의 큰 감소를 보였고, 고혈압 훈련 투여군에서도 역시 큰 감소를 보여 통계적으로 유의한 차이를 나타내었다($p < .05$). 특히 고혈압 투여 훈련군의 eNOS는 거의 통제군의 수치 가까이 회복을 보여 고혈압 실험동물에게 L-arginine 투여와 규칙적인 훈련이 큰 효과를 보이는 것으로 나타났다. 본 실험결과 고혈압 통제군의 eNOS 활성은 통제군과 비교하여 유의하게 높은 수치를 보였고, L-arginine 투여로 상당한 수치의 감소를 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 고혈압의 경우 내피세포의 기능장애로 NO 생성기전이 훼손되었지만[12,13], L-arginine 투여와 훈련에 따라, NO와 연관된 구조적 변화를 통하여 혈관수용이 향상 되었으며, 동시에 NO와 endothelin 수준이 감소되

표 3. Effect of regular exercise and L-arginine supplementation on eNOS (pg/dl) and Macrophages in SHR (mean±SD)

그 룹	eNOS(pg/dl)	Macrophage
WKYC	346.25±17.45*	130.38±4.78*
SHRC	460.63±13.20	215.25±9.05
SHRA	410.50±13.50*	189.25±7.07*
SHRTA	392.38±14.27*	180.0±5.50*

WKYC: WKY Control, SHRC: SHR Control, SHRA: SHR supplemented with L-arginine, SHRTA: SHR Trained and supplemented with L-arginine

* $p < .05$, compare to SHRC

는 것을 확인할 수 있었다. 이는 NO의 두 가지 작용효과로서, NO 농도가 낮으면 채널의 산화적 활성을 억제하며, 반대로 높으면 채널 오픈과 단백질의 산화적 변형을 자극하는 것으로 사료된다. 즉, 높은 수준의 NO는 골격근에 존재하는 하나, 혹은 그 이상의 산화-환원 민감성 단백질의 기능을 변화시킴으로써 근육의 수축기능 즉, 칼슘 분비 채널을 변형시키게 된다. 따라서, NO는 저 농도 시 채널에 항산화적 역할을 발휘할 것이며, 고농도에선 산화적 효과가 나타나리라 본다. 다른 원인은 혈관 수축요인인 endothelin과 이완요인인 NO의 상호작용을 규명한 선행연구에서[14] 찾을 수 있는데, 고혈압 상태에서 endothelin 수준은 상당히 높으며, 부수적으로 NO 수준도 상승된다고 하였다.

결국, L-arginine 투여와 훈련은 eNOS 활성 수준을 정상화하여 고혈압을 치료하는데 효과가 있었다는 선행연구들[8,15]을 잘 반영하는 것으로 나타났다.

실험조건에 따른 대식세포 활성변화

실험조건에 따른 혈액 내 대식세포 활성변화는 <표. 3>에 나타나 있다. <표. 3>에 나타나 있듯이, 대식세포는 고혈압 통제군에 비해 고혈압 투여군에서 통계적으로 유의한 감소를 나타내었고, 특히 고혈압 훈련 투여군에서 현저한 감소를 보여 거의 통제군에 가까운 수치로 회복됨을 알 수 있었다($p < .05$). 본 연구결과 고혈압군에서 대식세포의 활성이 가장 높았는데, 이는 선행연구와 일치하는 것으로[4] 임상적인 질환이 있는 경우, 항산화 방어기전이 손상됨으로 프리라디칼에 의해서 산화적으로 변형된 LDL과 같은 산화물이 부수적으로 생성되고, 산화된 LDL에 대한 대식세포의 식균작용이 왕성하게 일어나는 것을 의미한다. 규칙적인 훈련을 함으로 지질성분의 프로파일은 개선되어 HDL이 증가함으로 지질과산화가 억제되고, 대식세포의 활성이 안정화됨을 확인할 수 있다.

요 약

본 연구는 Wistar-Koyto Rat과 Spontaneously Hypertensive Rat을 대상으로 10주간의 L-arginine 투여와 규칙적인 수영 훈련을 하였을 때, 심박수, 혈압, 간조직의 eNOS 활성 및 대

식세포의 활성수준을 비교분석하여 고혈압 질환상태에서 심혈관계 및 eNOS 수준에 대한 L-arginine 투여와 훈련의 효과를 규명하는데 목적이 있었다. 결과적으로 고혈압 통계군의 심박수, 혈압, eNOS, 및 대식세포의 활성은 정상군에 비해 현저하게 높은 수치를 보였는데, 이는 고혈압으로 인한 혈관내피세포 손상으로 산화질소 생성기전에 불안정을 초래하여 심혈관계에 부정적인 영향을 주었을 것으로 해석한다. 하지만 L-arginine 투여와 규칙적인 수영훈련은 심박수, 혈압 및 eNOS 수준을 안정 수준으로 회복하였고, 대식세포의 활성 역시 안정화함으로 심혈관계에 긍정적인 영향력을 미치는 것으로 나타났다.

참고 문헌

- Sainani, G. S. and Maru, V. G. 2004. Role of endothelial cell dysfunction in essential hypertension. *J. Assoc. Physicians. India.* **52**, 966-969.
- Zanetti, M., d'Uscio, L. V., Peterson, T. E., Katusic, Z. S. and O'Brien, T. 2004. Analysis of superoxide anion production in tissue. *Methods Mol. Med.* **108**, 65-72.
- Moe, I. T., Hoven, H., Hetland, E. V., Rognmo, O. and Slordahl, S. A. 2005. Endothelial function in highly endurance-trained and sedentary, healthy young woman. *Vasc. Med.* **10(2)**, 97-102.
- Yamamoto, K., Ikeda, U. and Shimada, K. 2003. Role of mechanical stress in monocytes/macrophages: implications for atherosclerosis. *Curr. Vasc. Pharmacol.* **1(3)**, 315-319.
- Choudhury, A. and Lip, G. Y. 2005. Exercise and hypertension. *J. Hum. Hypertens.* **19(8)**, 585-587.
- Stewart, K. J., Bacher, A. C., Turner, K. L., Fleg, J. L., Hees, P. S., Shapiro, E. P., Tayback, M. and Ouyang, P. 2005. Effect of exercise on blood pressure in older persons: a randomized controlled trial. *Arch. Intern. Med.* **11;165(7)**, 756-762.
- Hsieh, N. K., Wang, J. Y., Liu, J. C., Wang, S. D. and Chen, H. I. 2004. Nitric oxide inhibition accelerates hypertension and induces perivascular inflammation in rats. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **31(4)**, 212-218.
- Simko, F., Luptak, I., Matuskova, J., Krajcovicova, K., Sumbalova, Z., Kucharska, J., Gvozdjakova, A., Simko, J., Babal, P., Pechanova, O. and Bernatova, I. L-arginine fails to protect against myocardial remodelling in L-NAME-induced hypertension. *Eur. J. Clin. Invest.* **35(6)**, 362-368.
- Hwu, C. M., Hsiao, C. F., Kuo, S. W., Wu, K. D., Ting, C. T., Quertermous, T., Rodriguez, B., Chen, I., Grove, J., Chen, P. Y. and Hoo, L. T. 2004. Physical inactivity is an important lifestyle determinant of insulin resistance in hypertensive patients. *Blood press.* **13(6)**, 355-361.
- Baster, T. and Baster-Brooks, C. 2005. Exercise and hypertension. *Aust. Fam. physician.* **34(6)**, 419-424.
- Scheen, A. J. and Giet, D. 2005. Prevention of type 2 diabetes: a new public health challenge. *Rev. Med. Liege.* **60(5-6)**, 383-390.
- Chang, C. C., Huang, H. C., Wang, S. S., Lee, F. Y., Chang, F. Y., Lin, H. C., Hou, M. C. and Lee, S. D. 2005. Involvement of constitutive nitric oxide synthase in the portal-systemic collaterals of portal hypertensive rats. *J. Chin. Med. Assoc.* **68(6)**, 245-249.
- Brennan, P., Pescatello, L. S., Bohannon, R. W., Marschke, L., Murphy, M., Coble, D. and Hasson, S. 2005. Time spent moving is related to systolic blood pressure among older women. *Prev. Cardiol.* **8(3)**, 160-164.
- Llorens, S., Salazar, F. J. and Nava, E. 2005. Assessment of the nitric oxide system in the heart, aorta and kidney of aged Wistar-Kyoto and spontaneously hypertensive rats. *J. Hypertens.* **23(8)**, 1507-1514.
- Bolad, I. and Delafontaine, P. 2005. Endothelial dysfunction: its role in hypertensive coronary disease. *Curr. Opin. Cardiol.* **20(4)**, 270-274.