

새로운 혈관이완제인 GS-389의 이완작용 기전에 관한 연구

경상대학교 의과대학 생체물리학연구소, 소아과학교실, 약리학교실*

서울대학교 의과대학 소아과학교실**

염명걸 · 장기철* · 윤용수**

= Abstract =

A Study of Vascular Relaxation Mechanism of GS-389, a New Potent Vasodilator

Myung Kul Yum, M.D., Ki Churl Chang, Ph.D.,* Yong Soo Yun, M.D.**

*Institute of Biophysics for Medicine, Department of Pediatrics, Pharmacology,**

Gyeongsang National University, College of Medicine, Chinju, Korea

*Department of Pediatrics, Seoul National University, College of Medicine,***

Seoul, Korea

The mechanism of vasodilating effect of GS-389, 1-(4'-methoxybenzyl)-6,7 -dimethoxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline hydrochloride, a possible cyclic GMP specific phosphodiesterase inhibitor, on rat and mouse thoracic aorta ring has been investigated. GS-389 relaxed rat and mouse thoracic aorta precontracted with phenylephrine and high K^+ (60mM) in concentration dependent manner. Presence or absence of endothelium did not alter the relaxing effects of it. GS-389 inhibited Ca^{2+} -induced contraction of the high K^+ or 1 μ M phenylephrine. Initial phasic contraction induced by phenylephrine and caffeine in Ca^{2+} free solution was inhibited by GS-389. Methylene blue pretreatment suppressed relaxation effect of GS-389. Relaxation by isoproterenol or sodium nitroprusside and by acetylcholine in endothelium preserved aorta was potentiated by concurrent administration of GS-389. GS-389 inhibited phenylephrine-induced phosphatidylinositol hydrolysis. It is suggested that inhibition of phosphoinositide turnover associated with elevated cyclic nucleotide by GS-389 may be the possible vascular relaxation mechanism of it.

서 론

혈관이완제는 여러 심혈관질환 즉 고혈압, 협심증, 심부전등의 치료에 빼놓을 수 없는 중요한 약물이 아닐 수 없다. 생리적으로 혈관 이완에 중요한 역할을 하는 물질의 하나는 내피세포로부터

분비되는 endothelium dependent relaxing factor(EDRF)를 들 수 있다¹⁾. 이러한 혈관이완 물질의 상당수는 평활근세포내의 cyclic AMP(c-AMP) 또는 cyclic GMP(c-GMP)등 cyclic nucleotide를 상승시켜 혈관이완을 유발한다. 국소호르몬인 EDRF는 nitric oxide로 알려져있고 이는 선구 물질인 endo-

ogenous l-arginine으로 부터 EDRF 합성효소(synthetase)에 의해 합성되며²⁾³⁾⁴⁾ 세포내의 용해성 guanylate cyclase의 heme과 작용하여 이 효소를 활성화 시키면 c-GMP가 증가되어 결국 근육이 이완 된다는 것이 밝혀져 있다. Sodium nitropruside (SNP)등의 니트로 화합물 계통의 혈관 이완제들도 생체내에서 nitric oxide를 유리시키고 이는 다시 c-GMP를 증가 시켜 혈관이 이완되며⁵⁾⁶⁾ 또한 isoproterenol이나 forskolin등의 약물은 adenylate cyclase를 활성화 시키므로 세포내 c-AMP가 증가되어 혈관을 이완시킨다. 이와같이 혈관 이완에 중요한 cyclic nucleotides는 ATP또는 GTP로 부터 각각 adenylate cyclase와 guanylate cyclase의 활성화로부터 생성되지만 생성된 cyclic nucleotides는 phosphodiesterase에 의해 5'-AMP 또는 5'-GMP로 분해되어 그 효력이 상실된다. 따라서 cyclic nucleotide를 생성하게 하는 작용도 중요하지만 이에 못지 않게 cyclic nucleotide의 분해를 억제하는 것도 혈관이완제로서 사용될 수 있을 것이다. 이와같은 효과를 가진

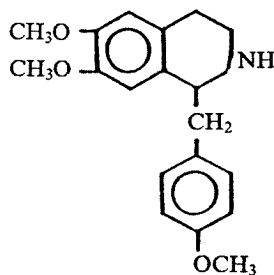
약물들이 phosphodiesterase inhibitor(PDEI)인데 여기에는 비특이적이며 고전적인 papaverine을 비롯하여 최근에는 cyclic nucleotide에 선택적으로 작용하는 억제 약물의 개발이 활발히 진행 중이다⁷⁾.

Isoquinoline 및 tetrahydroisoquinoline(THI)계 화합물은 천연에 존재하는 약리학적으로 중요한 chemical group 중의 하나로서 isoquinoline 고리 화합물이 천연에 존재하는 것이 처음 밝혀진 것은 아편계 알칼로이드인 papaverine의 발견이다. 그 이후 여러 종류의 THI 계통의 천연 알칼로이드들이 밝혀지고 있으며⁸⁾⁹⁾ 이들 또한 다양한 약리 작용을 나타내고 있다. 보다 강력하고 선택적으로 작용하는 약물의 개발을 위해 THI구조의 변형이 시도되고 있다¹⁰⁾. 그 중 trimetoquinolol은 중등도의 기관지천식에 유효한 THI계 약물로 기관지에 선택적으로 작용하는 β 교감신경성 약물이다¹¹⁾. 또 다른 THI계로서 강심 및 혈관 이완 작용을 가진 천연의 약물은 부자의 뿌리로 부터 추출한 higenamine¹²⁾¹³⁾¹⁴⁾을 들 수 있다. Trimetoquinolol이나 higenamine은 catechol 핵을 가지고 있는 catecholamine 이므로 β 교감신경성 약물로서 작

용하지만 catechol 구조를 변형시키면 PDEI로서 작용 가능성이 높아지는 경향이다.

구조 활성 관계의 연구에 의하면 THI의 6,7-dimethoxy기는 phosphodiesterase 억제에 필수적이며 활성도를 증가 시키는데 있어서 1-phenyl 또는 1-benzyl 기의 치환이 필요하다. 최근 연구 개발 동향은 isoquinoline을 중합시킨 bisbenzylisoquinoline 계열과¹⁵⁾ THI의 구조 변경에 관한 연구가 활발히 진행 중이다. 비록 papaverine은 임상적으로 널리 사용되지는 않지만 약리학적 연구의 도구로서는 없어서는 안될 중요한 약물로 인식되고 있는 PDEI의 prototype 이므로 THI 골격을 유지하면서 비 catechol 핵을 가지는 papaverine 계통의 일련의 화합물을 합성하여 혈관에 대한 반응을 살펴 본 결과 GS-389 즉 1-(4'-methoxybenzyl)-6,7-dimethoxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline hydrochloride가 우수한 효과를 나타내었다(Fig. 1). 또한 예비 실험에서 GS-389가 혈관 평활근을 강력하게 이완시켰지만 심장에 심박 촉진이나 심근 수축력 증강 작용이 없었던 것은 이물질이 c-GMP specific PDE에 선택적으로 작용할 것을 의미하는 흥미로운 사실이었다.

따라서 본 연구에서는 새로운 PDEI 개발의 일환으로 THI계 화합물인 GS-389의 1) 수용체에 의한 수축에 대한 효과, 2) 탈분극에 의한 수축에 대한 효과, 3) cyclic nucleotide를 증가시키는 것



GS-389

	C	H	N
Calculated	62.78	7.08	3.85
Found	62.60	7.10	3.96

Fig. 1. Chemical structure of GS-389, [1-(4'-methoxybenzyl)-6, 7- dimethoxy-1, 2, 3, 4-tetrahydroisoquinoline hydrochloride].

으로 알려진 다른 약물과의 상호작용, 4) EDRF와의 관계, 5) phosphoinositides(PI) 대사에 미치는 영향을 살펴으로써 혈관 이완 작용기전을 밝히고자 한다.

연구 방법

1. 혈관 절편의 준비

경남 진주 소재 가축 위생연구소로부터 공급 받은 웅성 Balb/c 계 mouse(20~25g)와 Sprague-Dawley 계 Rat(250~300g)의 두부를 강타하여 실신시키고 가능한한 빨리 흉부 대동맥(thoracic aorta)을 적출하여 Krebs 용액(조성 mM: NaCl 118.5, KCl 4.74, NaHCO₃ 1.18, MgSO₄ 1.18, CaCl₂ 2.5, glucose 10, EDTA 0.1)에 옮겼다. 95% O₂-5% CO₂가 연속 주입되는 가운데 혈관 주변의 연조직과 지방등을 제거하였고 특히 내피세포가 손상을 입지 않도록 각별히 주의하여 다루었다. 흉부 대동맥의 크기는 약 2.5mm 정도 크기로 일정하게 자를 수 있도록 특별히 고안된 장치를 사용하여 절제하였다. 일부 실험에서는 내피세포를 일부러 제거하기 위하여 숨이나 주사 바늘로서 내벽을 긁어내었고 내피세포가 제거되었는지의 확인은 Acetylcholine 10⁻⁵M 넣었을 때 이완이 일어나지 않으면 성공적으로 제거된 것으로 하였다.

2. 등장성 수축력의 기록

기계적인 수축력의 기록은 10ml 들이의 37°C로 연속 공급되는 magnus chamber에 흉부동맥 고리(ring)를 tungsten wire로 고정된 장치에 한쪽 끝은 고정되게 다른 쪽 끝은 transducer (F-60 또는 FT-03)에 연결하여 등장성 수축력을 Physiograph (Mark IV) 및 Grass Model 79E physiograph의 pen recorder를 사용하여 기록하였다. 안정 상태의 긴장도(resting tension)는 1g으로 하였고 약 90분간 평형이 되도록 방치한 후 실험하였다.

2-1. 수용체를 통한 혈관 수축에 대한 GS-386의 효과

95% O₂-5% CO₂가 연속 주입되는 Krebs 용액이 담겨있는 chamber에 α 1-adrenergic agonist인 phenylephrine(PE) 10⁻⁶ M 을 첨가하여 혈관 수축을 관찰하고 최대 수축에 도달하면 GS-389를

누적적으로 증가시켜 나타나는 반응으로 부터 log용량-반응 곡선을 그린다. 이곡선으로 부터 최대 이완의 50%를 나타내는 농도를(IC₅₀) 구하여 낸다.

2-2. 탈분극에 의한 혈관 수축에 대한 GS-389의 효과

2-1 항에서 언급한 내용과 동일한 방법으로 혈관 조직을 제작한 후 95% O₂-5% CO₂가 연속 주입되는 Krebs 용액(조성 mM: NaCl 118.5, KCl 4.74, NaHCO₃ 1.18, MgSO₄ 1.18, CaCl₂ 2.5, glucose 10, EDTA 0.1) 이 담겨 있는 10ml 용량 들이의 magnus chamber에 60mM의 KCl을 첨가하여 혈관 수축을 일으키고 최대 수축에 도달하면 GS-389를 누적적으로 증가시켜 이로 부터 log용량-반응 곡선을 그린다.

2-3. Calcium free media에서 Ca²⁺에 의한 혈관 수축에 대한 GS-389의 효과

2-1 항에서 설명한 바와 같은 방법으로 혈관 조직을 준비한 후 Ca²⁺-free media에서 Ca²⁺를 증가 시키면서 수축 반응을 확인하고 GS-389를 Ca²⁺ 첨가 하기 10분전에 투여 하여 Ca²⁺에 의한 수축 반응의 영향을 관찰한다.

2-4. Ca²⁺-Free media 에서 PE 및 high potassium에 의한 혈관 수축에 대한 GS-389의 효과

PE등과 같은 α 1-agonist는 혈관 수축에 있어서 세포내 저장하고 있는 Ca²⁺을 이용하여 phasic contraction을 일으키고 세포 내외의 Ca²⁺이 뒤이어 일어나는 tonic contraction에 관여되는 것으로 알려져 있다. 한편 KCl에 의한 수축은 세포외액의 Ca²⁺만을 이용하는 것으로 알려져 있으므로 이와 같이 서로 다른 Ca²⁺의 자원을 이용하는 수축 반응에 대한 GS-389의 효과를 확인한다.

2-5. Saponin 처리

화학적으로 세포막을 파괴시키기 위하여 saponin (25 μ g/ml)을 medium 내에 20분 이상 노출시켰다. 세포내 저장소로 부터 Ca²⁺ 유리에 대한 GS 389의 효과를 보기 위하여 Ca²⁺ free 용액에 혈관을 20~30분간 방치 시킨후 25mM의 caffeine과

10^{-6} M의 PE를 첨가하였고 GS-389(10^{-5} M, 3×10^{-5} M)는 약물 처리 10분 전에 처리 하였다.

3. EDRF의 작용 증강 및 cyclic nucleotide증가 약물과 상승 작용 여부에 대한 GS-386의 효과

내피세포가 보존되어 있는 혈관과 내피세포를 파괴시킨 혈관에 대하여 GS-389가 EDRF의 유리 촉진 또는 EDRF의 작용을 증가 시키는가를 확인 하기 위하여 용량-반응 곡선을 구하여 IC_{50} 의 차이가 나는지를 확인한다. 또한 EDRF를 유리시키는 약물인 acetylcholine과 동시 투여 또는 GS-389를 미리 투여 했을 때 그 이완작용이 증강 되는지를 확인하고 아울러 EDRF의 최종 작용은 c-GMP의 증가에 의하는 것이므로 c-GMP를 증가시키는 SNP와도 상호작용에 의해 그 효과가 증강되는지를 확인한다. 한편 c-GMP는 혈소판에서 c-GMP inhibited phosphodiesterase에 작용하여 c-AMP를 증가시킨다고 하며¹⁶⁾ 이 c-GMP inhibited phosphodiesterase는 혈관을 포함하여 여러 조직에 다량 함유되어 있다¹⁷⁾. 따라서 c-AMP를 증가 시키는

약물과도 GS-389가 증강 작용이 있는지를 확인 하기 위하여 Isoproterenol 과의 상호 작용을 검색하였다.

4. PI 대사에 대한 GS-389의 효과

cyclic nucleotide의 증가 약물은 cyclic nucleotide-dependent protein kinase를 활성화시켜 궁극적으로 각각 상응하는 단백질을 인산화시켜 다양한 작용을 나타낸다. 혈관 이완작용을 이러한 관점에서 추구하기 위하여 $\alpha 1$ -agonist에 의한 PI turnover가 촉진되는데 이에 대한 GS-389의 효과를 확인 하기 위하여 혈관(rat) 조직을 일정한 크기로 자른후 Krebs 용액(95% $O_2 \sim 5\%$ CO_2)에서 1 시간 동안 $37^\circ C$ 로 preincubation 시킨 후 $8 \mu Ci/ml$ 의 3H -inositol을 넣고 3시간 더 incubation 시킨다. 이 조직을 flask에 옮기고 inositol monophosphate 억제제인 $LiCl(10mM)$ 을 첨가하고 GS-389 및 SNP등의 약물을 10~20분간 전처리 하고 PE에 의한 phosphatidyl inositide 대사를 상기의 억제 약물 존재시와 존재하지 않을 때를 대조로 하여 비교 분석한다. 반응시킨 조직을 액화질소에 미리

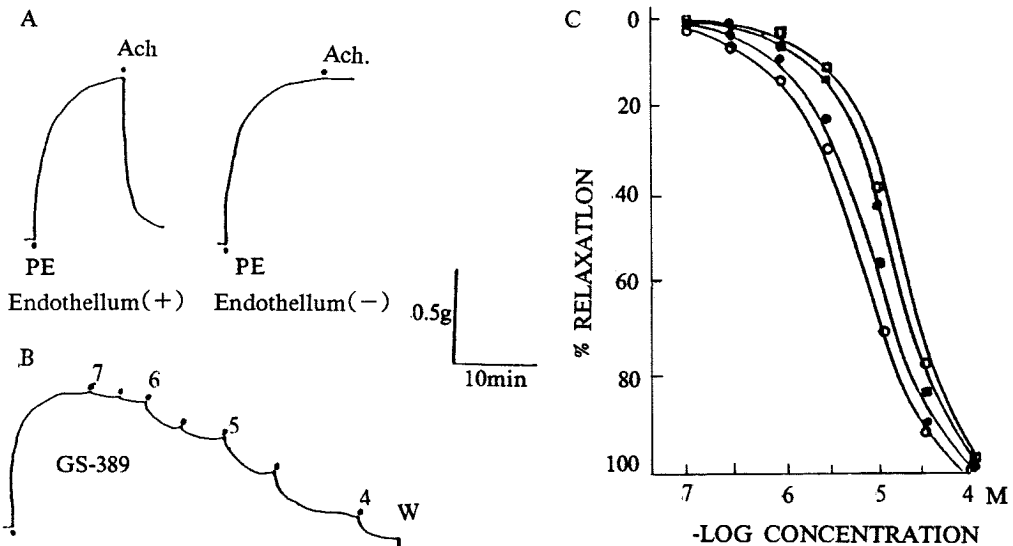


Fig. 2. Effects of GS-389 in phenylephrine(PE, $1\mu M$) induced contraction in mouse thoracic aorta. Absence or presence of endothelium can be assessed by acetylcholine(Ach, $10\mu M$)(A) and tracing of effect of GS-389 on PE-induced contraction (B) Concentration response curves of GS-389 (●, ○) and papaverine (□, ■) on PE-induced contraction of rat and mouse thoracic aorta(C). Each point represents the mean value of 3 different preparations. ●—●—● rat thoracic aorta. ○—○—○ : mouse thoracic aorta. ■—■—■ : endothelium intact mouse thoracic aorta. □—□—□ : endothelium rubbed mouse thoracic aorta.

담귀 냉각시킨 forcep으로 급속 냉동시키고 10% TCA를 넣어 균질화(glass-glass homogenizer)시킨 후 3,000g으로 15분간 원심분리시킨 후 상층액을 물-포화 ether로 (2ml×5회) 추출하여 TCA를 제거한 후 anion exchange column (Dowex 1×-8, formate form, 200~400 mesh)에 붓고 증류수로 여러번 수세하고 0.1 M formic acid와 0.2, 0.4 및 1M의 ammonium formate 혼합액으로 추출하면 inositol monophosphate(IP₁), inositol bisphosphate(IP₂) 및 inositol trisphosphate(IP₃)가 차례로 elution 된다. 이 추출액 8ml에 10ml의 scintillation cocktail을 넣어 count하였다¹⁸⁾.

5. 통계 처리

대조군과 약물처리군 사이에 통계적 유의성 검정은 student t-test에 의하여 산출하였고 $p < 0.05$ 이하인 경우 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다.

연구결과

GS-389의 이완작용이 내피세포-의존성인지 혹은 SNP등과 같이 내피세포의 존재 유무에 관계 없는지를 알아 보기 위하여 혈관조직을 내피세포가 상하지 않도록 한 그룹과 내피세포를 손상시킨 그룹으로 나누어 PE으로 수축시킨 후 GS-389의 이완 효과를 관찰하였다. 내피세포가 잘 보존되었는지의 여부는 acetylcholine 10^{-6} M에 의해 확인하였다(Fig. 2A). GS-389는 내피세포의 유무에 관계 없이 혈관이완을 시켰으며 mouse와 rat에서도 같은 현상을 보였다(Fig. 2).

60mM KCl로 근육을 수축시키고 각각 이완 작용기전이 서로 다른 약물을 사용하여 GS-389와 비교하였다(Fig. 3). 60mM KCl로 수축시키고 최대 수축에 이르렀을 때 verapamil 10^{-7} M, SNP 10^{-7} 및 GS-389 10^{-5} M을 투여하여 본 결과 verapamil의 이완 발현이 가장 신속하였고 그 다음이 SNP, GS-389 순이었다. 이것은 high potassium에 의한 수축은 세포외액의 Ca^{2+} 을 이용하는 것을 반영하는 것으로서 Ca^{2+} 길항제인 verapamil이 가장 강하였다. GS-389의 이완 발현은 완만하며 지속시간이 긴 것이 특징이었다.

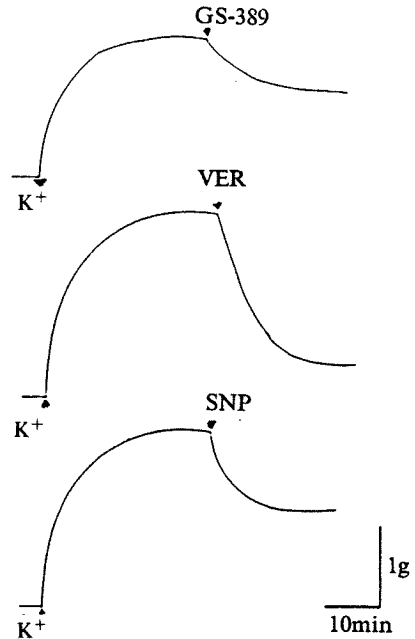


Fig. 3. Relaxation pattern of different type of agonist on 60mM potassium chloride induced contraction of rat thoracic aorta ring preparations.

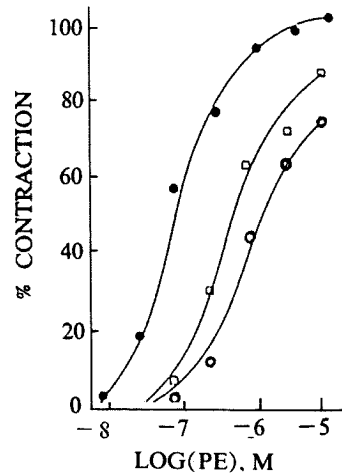


Fig. 4. Effects of GS-389 10 uM (□), 30 uM (○) on phenylephrine (●) induced contraction in rat thoracic aorta. Data represent mean of 7 to 10 preparations.

혈관 수축에 있어서 서로 다른 기전, 즉 수용체를 경유하여 수축을 일으키는 반응과 수용체를 경유하지 않는 단순 탈분극에 의한 수축 반응에 대하여 GS-389의 효과를 확인하였다(Fig. 4, 5). 한편 대조로서 verapamil의 효과도 관찰하였다.

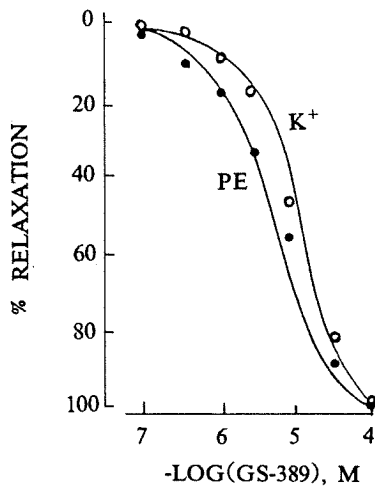


Fig. 5. Concentration response curves of GS-389 on contraction evoked by 60mM potassium(K^+) (\bigcirc) or 1 μ M phenylephrine(PE, \bullet) in smooth muscle rings of rat thoracic aorta.

결과 high K^+ 수축에 대한 이완 효과를 pIC_{50} 로 나타내면 verapamil, GS-389가 각각 7.41 ± 0.12 ($n=6$), 4.82 ± 0.22 ($n=6$)였고 반면 PE 수축에 의한 이완 효과는 각각 4.53 ± 0.11 ($n=6$), 5.24 ± 0.14 ($n=6$)로 결국 GS-389는 수용체를 경유하는 수축에 대해 강하게 억제하는 반면 verapamil은 막 전압의존성 수축에 대해 강한 억제를 보이고 있었다.

수축 반응에서 Ca^{2+} 의 역할은 매우 중요하다. 따라서 세포 내외의 Ca^{2+} 을 이용하는 것으로 알려진 PE과 세포외액의 Ca^{2+} 만을 이용하는 KCl을 사용하여 수축 반응에 대한 Ca^{2+} 의 영향을 확인하였다(Fig. 6).

0.01mM EGTA가 들어있는 Ca^{2+} free용액에 30분간 전처치한 후 PE를 첨가시 일시적인 수축 현상이 일어났으며 계속하여 Ca^{2+} 을 증가시키면 따라 수축도 증가 되었다. 한편 KCl에 의하여는 일시적인 수축현상을 나타나지 않았으나 계속하여

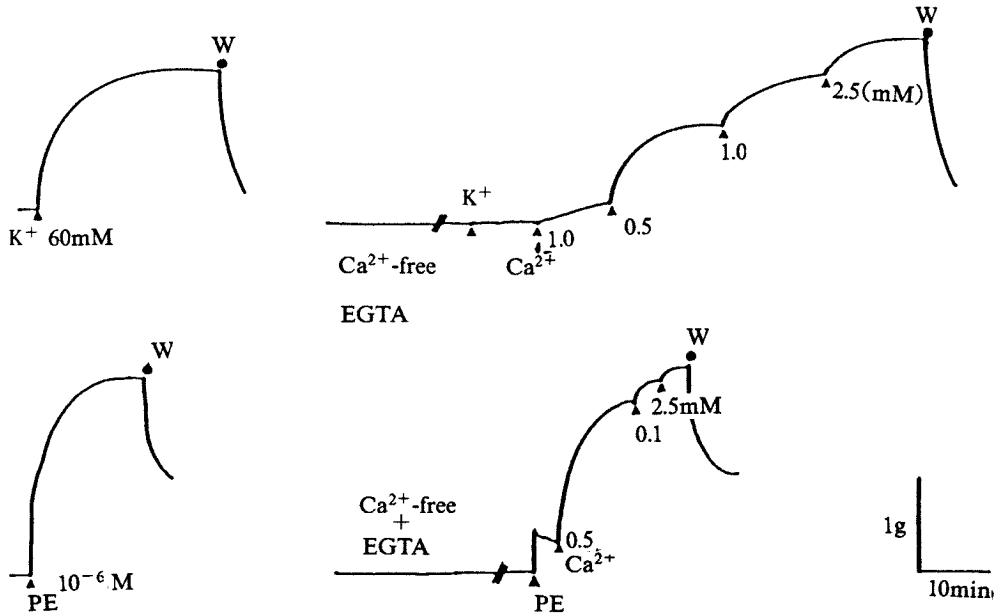


Fig. 6. Calcium induced contraction in potassium(60mM)-depolarized and phenylephrine(1 μ M) induced contraction on rat thoracic aorta ring. It is stressed that calcium induced contractions give greater magnitude in tension development than contractions evoked by potassium or phenylephrine in normal Krebs' solution. Phenylephrine not high K^+ caused phasic contraction in then absence of calcium ion.

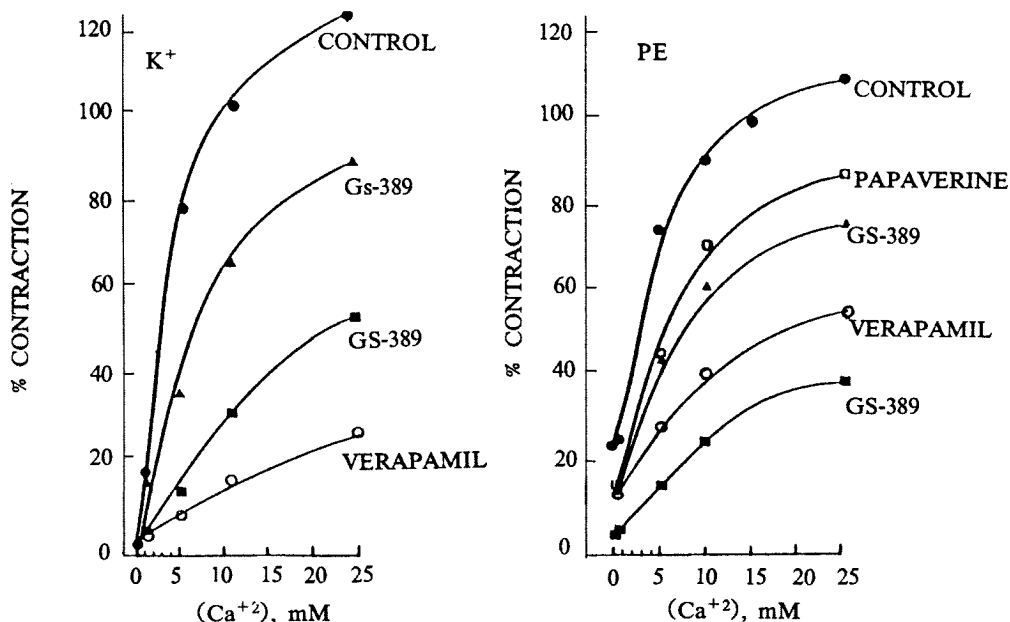


Fig. 7. Effects of GS-389 10 μ M(\blacktriangle), 30 μ M(\blacksquare), verapamil 30 nM(\circ) and papaverine 3 μ M(\square) on calcium induced contraction in potassium(60mM)-depolarized contraction and phenylephrine(1 μ M)-induced contraction on rat thoracic aorta ring. Contractions evoked by high K^+ (60mM) or PE(1 μ M) in normal Krebs' solution was taken as 100%. 30 μ M of GS-389 completely abolished PE-induced phasic contraction in the absence of calcium ion.

Ca^{2+} 을 증가시킴에 따라 수축도 증가되었다.

GS-389가 Ca^{2+} influx에 영향을 주는가를 더욱 확인하기 위하여 Ca^{2+} -free 용액에서 PE 및 KCl 처리한 조직에 Ca^{2+} 증가에 따른 수축에 대하여 Ca^{2+} 길항제인 verapamil과 PDEI인 papaverine을 대조로 하여 GS-389의 효과를 비교하였다(Fig. 7). GS-389는 용량의존적으로 Ca^{2+} 에 의한 수축을 억제시켰다.

K^+ 유도에 의한 Ca^{2+} 증가에 따른 수축 반응에 대하여 억제하는 그 potency는 verapamil($\times 10^{-5}$ M) $>$ GS-389(10^{-5} M) 순이었으나 phenylephrine 유도에 의한 Ca^{2+} 증가에 따른 수축 반응에는 GS-389(3×10^{-5} M) $>$ verapamil $>$ GS-389(10^{-5} M) $>$ papaverine(3×10^{-5} M) 순이었다. 이것은 GS-389가 수축 반응에 필요한 Ca^{2+} 의 이용을 방해하는 결과로서 생각되며 특히 3×10^{-5} M의 GS-389 처리시 PE에 의한 초기 수축이 억제됨은 세포내 저장된 Ca^{2+} 의 이용 또한 억제할 가능성을 암시한다. 한편 이들 약물에 대하여 GS-389의 potency가 차이가 나는 것은 수축을 일으키는 기전이

서로 다른 약물을 사용했기 때문으로 추측된다.

세포내 저장된 Ca^{2+} 을 이용하여 수축을 일으키는 약물로서 caffeine이 많이 이용되고 있다. 세포내 저장된 Ca^{2+} 이용을 GS-389가 억제하는지를 더욱 명백히 하기 위하여 saponin 25ug/ml 처리로 세포막을 파괴시킨후 Ca^{2+} free 용액으로 배양액을 바꾼 후 20~30분 후에 caffeine에 의한 수축을 유도하였다(Fig. 8). 이 수축에 대하여 GS-389의 효과를 확인하기 위하여 GS-389를 10분간 전처리한 후 PE 및 caffeine에 의한 수축을 야기시켰을 때 그 수축 정도가 줄어들었고 GS-389의 농도가 증가할수록 거의 완전한 수축억제를 나타내었다.

상기에서 살펴 본 바와 같이 GS-389는 Ca^{2+} 의 homeostasis에 변형을 초래하여 그 이완 작용이 있음을 확인하였다. 그러나 Ca^{2+} 의 이용이 verapamil 등과 같이 1차적으로 직접 관여할 수도 있으나 c-AMP나 GMP가 증가 됨으로 2차적으로 Ca^{2+} 의 영향을 받을 수도 있음을 생각할 때 GS-389의 작용기전의 이러한 2차적 영향을 배제할 수 없으므로

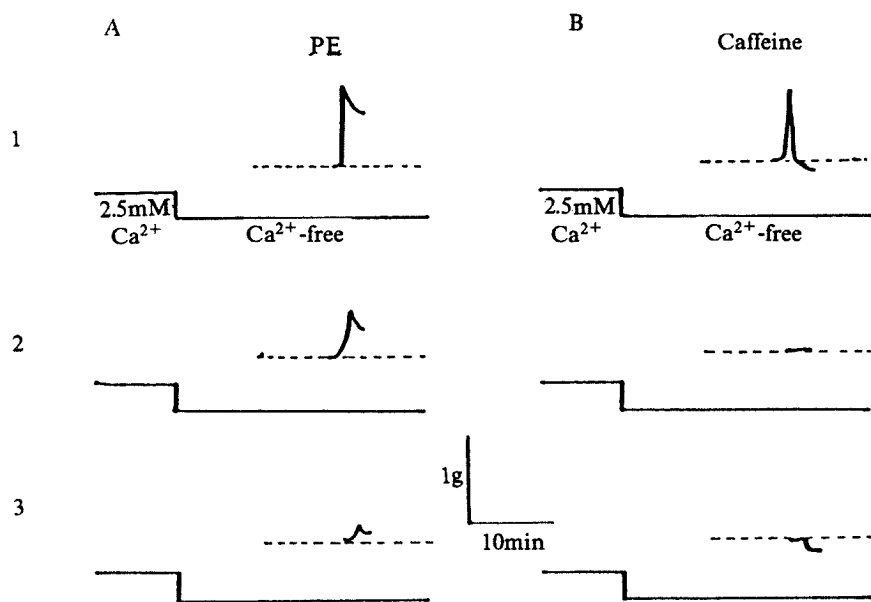


Fig. 8. Effects of GS-389 1 μ M, 10 μ M on phenylephrine(A) and caffeine(B) induced contractions of chemically skinned rat thoracic aorta in Ca-free solution containing 0.01mM EGTA. A-1. Phenylephrine(1 μ M) induced phasic contraction A-2 ; 1 μ M of GS-389 pretreatment significantly inhibited PE induced contraction. A-3 ; 10 μ M of GS-389 pretreatment affected more. B-1 ; Caffeine(25mM) also induced phasic contraction, which was abolished with pretreatment of GS-389 1 μ M(B-2) and 10 μ M (B-3).

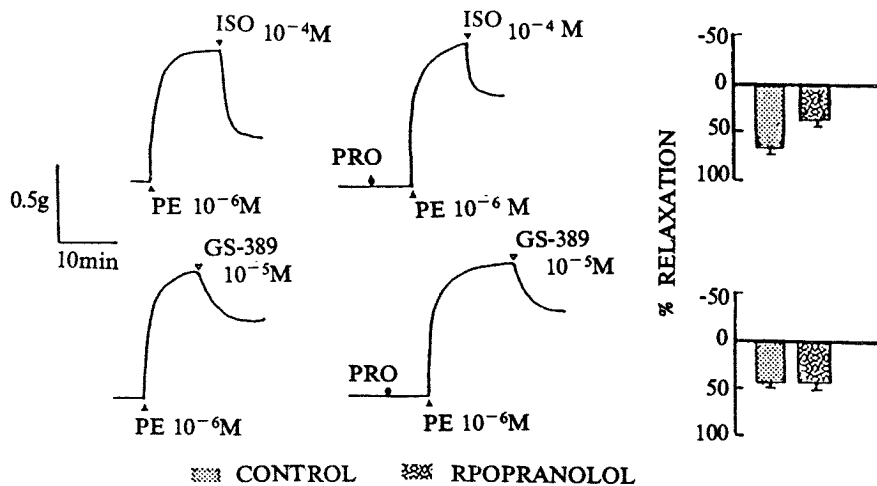


Fig. 9. Effects of propranolol (1 μ M) on isoproterenol(ISO, 100 μ M)-induced relaxation and GS-389 (10 μ M) induced relaxation on phenylephrine(PE 1 μ M) evoked contraction in mouse thoracic aorta. Right side of tracing is summary of data, which represent mean \pm SEM of at least 3 preparations.

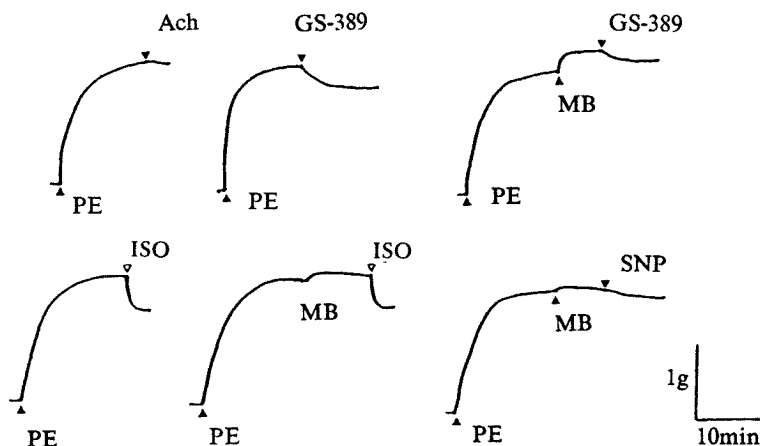


Fig. 10. Effects of methylene blue (10 μ M) on GS-389 (10 μ M), isoproterenol (ISO, 100 μ M) and sodium nitroprusside (SNP, 10 nM) induced relaxation in mouse endothelium rubbed thoracic aorta.

PE에 의한 수축에 대하여 β -agonist인 isoproterenol을 대조로 사용하여 propranolol 전처치에 의한 혈관 이완 효과에 영향이 있는지를 확인하였다(Fig 9). Isoproterenol 10^{-4} M은 약 68%의 이완을 나타내었으나 propranolol 10^{-6} M 전처치로 인하여 그 이완이 약 35% 감소하였다. 그러나 GS-389는 propranolol에 의하여 전혀 영향을 받지 않았다. 따라서 GS-389는 적어도 베타수용체를 통하여 나타나는 현상이 아님을 알 수 있다.

c-AMP를 통한 기전이 아님을 확인하였고 그렇다면 c-GMP와의 관련성을 확인하기 위하여 methylene blue 10^{-6} M을 전처치하여 GS-389와 c-GMP와 관련이 없는 isoproterenol을 비교 검토하였다. Fig. 10에서와 같이 methylene blue 전처치에 의하여 GS-389의 이완 작용이 억제되었으며 SNP 10^{-9} M의 효과도 억제 되었으나 isoproterenol에 의한 이완에는 변화가 없었다. 이상의 사실은 GS-389가 c-GMP와 관련이 있을 것임을 암시하는 결

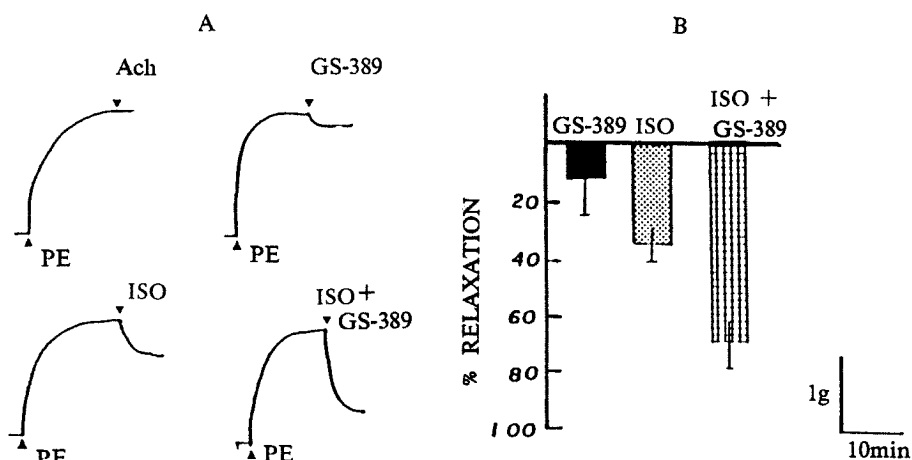


Fig. 11. Potentiation effects of cyclic AMP mediated action of GS-389 in mouse thoracic aorta. A ; Tracing of relaxation of GS-389(1 μ M), isoproterenol(1 μ M) and simultaneous administration of both agonists against phenylephrine(1 μ M) induced contraction in mouse endothelium rubbed aorta. B ; Simultaneous addition with GS-389 potentiated isoproterenol action of relaxation against phenylephrine evoked contraction. Data represent mean \pm SEM of 6 preparations.

과이다.

c-AMP를 증가 시키는 isoproterenol과 c-GMP를 증가시키는 SNP와 GS-389가 상승 작용을 일으키는지를 살펴 보았다. Fig. 11에서와 같이 c-AMP를 상승시키는 isoproterenol 10^{-6} M과 GS-389 10^{-6} M을 동시 투여시에 각각의 이완의 함보다 더 강한 이완을 나타내었다. 한편 c-GMP를 상승시키는 SNP 3×10^{-9} M과 동시 투여시에도 강한 상승 작용을 나타내었다(Fig. 12). EDRF를 통해 세포내 c-GMP를상승시켜 혈관 이완을 하는 Ach의 효과도 GS-389에 의해 강화되었다(Table 1).

이상에서와 같이 GS-389의 PE에 의한 세포내 Ca^{2+} 이용 억제 및 cyclic nucleotide와의 상승 작용등을 PI turnover와 관련하여 더욱 그 작용 기전을 규명하고자 하여 PE에 의한 PI turnover에 GS-389와 SNP의 효과를 Rapoport¹⁸⁾등의 방법에 의하여 살펴본 결과 Fig. 13에서와 같이 GS-389와 SNP는 inositol monophosphate의 감소를 가져왔다. 이상의 결과는 GS-389의 작용 기전의 일부는 적어도 cyclic nucleotide를 매개로 한 PI turnover의 억제임을 알 수있다.

Table 1. Effects of GS-389 on endothelium dependent relaxation on acetylcholine in rat thoracic aorta

Treatment	pIC ₅₀ ± SEM	N
Control(Ach. alone)	7.17± 0.21	3
Ach.+GS-389 ^a	7.28± 0.08	3
Ach.+GS-389 ^b	7.47± 0.06	3

*Significantly different from control(p<0.05)

a : GS-389 1 μM, b : GS-389 10 μM

고 안

본 연구에서는 1-(4'-methoxybenzyl)-6,7-dimethoxy-1,2,3,4- tetrahydroisoquinoline (GS-389)의 혈관 이완 작용 기전을 밝히기 위하여 근육 수축을 일으키는데 중요한 역할을 담당하는 Ca^{2+} 의 이용을 서로 달리하는 2 가지 방법을 시도하였다.

첫째는 수용체를 통한 수축으로서 세포내 저장되어 있는 Ca^{2+} 과 세포외액의 Ca^{2+} 을 모두 이용하는 α1-수용체를 PE으로 자극하여 혈관 수축을 일으키고 그 수축에 대한 GS-389의 효과를 확인 하기 위하여 GS-389를 누적적으로 가하였을 때

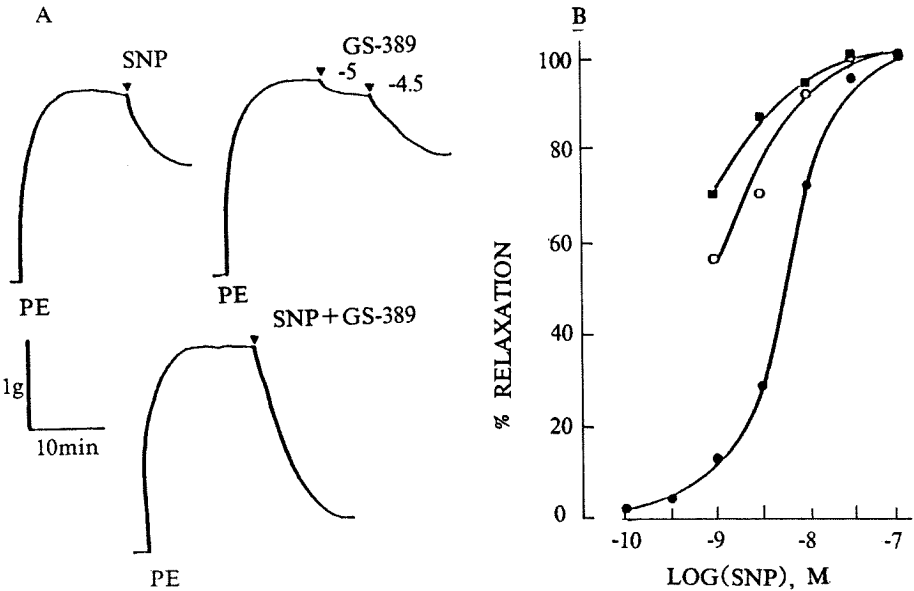


Fig. 12. Potentiation effects of cyclic GMP mediated action of GS-389 in rat thoracic aorta (A) and concentration response curve of sodium nitroprusside (SNP) induced relaxation(B). Preincubation with different concentration of GS-389(○ : 10 μM, ■ : 30 μM) shifted the concentration response curve of SNP to the left. Data represent mean of 5 to 6 different preparations.

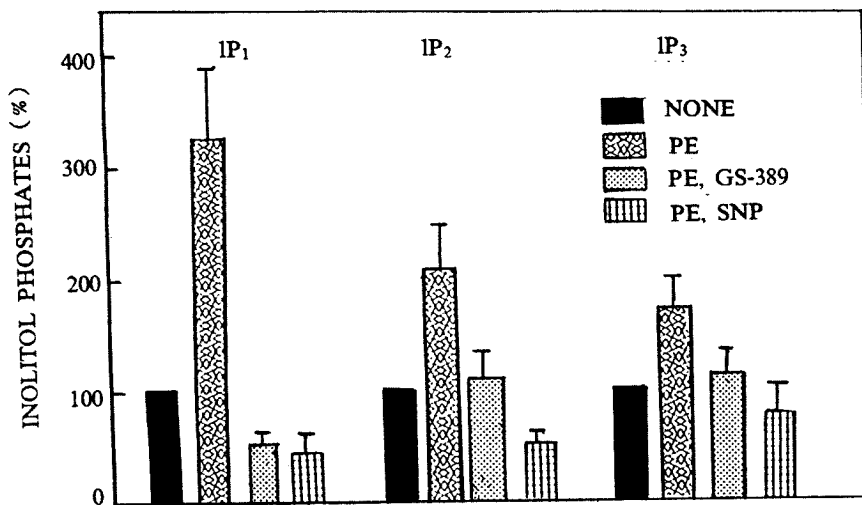


Fig. 13. Effects of GS-389 (30 μ M) and sodium nitroprusside (0.1 μ M) on phosphatidyl inositol hydrolysis induced by phenylephrine (1 μ M). Tissues were incubated in Krebs' solution containing 8 μ Ci/ml 3 H-inositol for 5 hrs. Values given are percent increase or decrease as taken basal level 100% and represent means \pm SEM of 3 to 5 determinations.

용량 의존적으로 혈관을 이완시켰다. Rat와 mouse의 경우 IC_{50} 가 각각 5.7×10^{-6} M, 8.3×10^{-6} M로서 거의 유사하였다. 둘째로 근 수축에 있어서 단지 세포외액의 Ca^{2+} 만을 이용하는 소위 탈분극에 의한 수축 반응에 GS-389의 효과를 알아보기 위하여 60mM의 KCl로 수축 시킨 후 GS-389를 누적적으로 가하였을 때 PE과 마찬가지로 용량의존적으로 혈관이 이완되었다. 그러나 PE에 의한 수축의 억제 보다는 GS-389의 효과가 덜 민감하였다.

한편 Ca^{2+} 길항제인 verapamil은 PE에 의한 수축 보다 high K^+ 에 의한 수축을 2.6배 강력하게 억제하였다. 이러한 사실은 GS-389의 작용이 전형적인 Ca^{2+} 길항제와 그 작용기전이 다르다는 것을 암시할 수 있다.

PE는 막전압의존성 및 수용체를 통한 Ca^{2+} 의 유입을 활성화 시키고 또한 세포내 저장된 Ca^{2+} 을 유리 시키므로써 세포막을 탈분극 시켜 초기 수축(phasic contraction)과 뒤 이은 강직성 수축(tonic contraction)을 일으키는 것으로 잘 알려져 있다. 후기의 수축은 Ca^{2+} free용액에서는 나타나지 않는다. 그러나 초기 수축은 일어나는 것으로 알려지고 있는데 이것은 PE이 세포내 저장되어 있는 Ca^{2+} 을 유리하기 때문으로 생각된다. PE은 세포

내외액의 Ca^{2+} 을, high K^+ 은 세포외액의 Ca^{2+} 을 근 수축에 이용한다는 사실을 더욱 확인 하기 위하여 Ca^{2+} 이 전혀 들어 있지 않은 상태에서 PE과 60mM KCl을 첨가하여 수축 반응을 살피고 아울러 Ca^{2+} 을 점차적으로 증가시킬 때 일어나는 수축에 대하여 GS-389의 효과를 확인하여 보았다. GS-389는 PE에 의한 수축을 non-competitive 양상으로 억제(Fig. 4)시켰으며 Fig. 8에서 보는 바와 같이 세포외액에 Ca^{2+} 이 없는 상태에서 PE는 신속한 phasic contraction을 보이는 반면 high K^+ 에 의하여는 이러한 수축은 확인할 수 없었으나 계속하여 Ca^{2+} 을 점차 증가 시킴에 따라 수축력은 점차 회복되었으며 이러한 조건하에서의 최대 수축력은 normal Krebs 시의 그것 보다 장력의 크기가 일반적으로 크게 나타났다. GS-389, verapamil 및 papaverine은 Fig. 7에서와 같이 GS-389는 용량의존적으로 각각의 효능약물에 의해 유도되고 Ca^{2+} 증가에 의한 수축을 억제하였으며 high K^+ 에 의한 수축력 억제 정도는 verapamil $> 30 \mu$ M GS-389 $> 10 \mu$ M GS-389 순이었으나 PE에 의한 수축력 억제 정도는 다르게 나타났다. 즉 GS-389 30 μ M이 가장 강력하게 억제하였다. 이것은 아마도 두가지 효능약물이 수축을 일으키는데 Ca^{2+} 을 이용하는 기전이 다르기 때문으로 생각된다. 이러한 작용

기전을 더욱 자세히 알아 보기 위하여 Ca^{2+} free 용액에서 PE에 의한 초기 수축에 GS-389가 어떻게 반응하는지를 확인하여 본 결과 GS-389는 PE에 의한 초기 수축을 억제 하였다(Fig. 8). 이 사실은 GS-389가 어떤 기전인지는 확실치 않지만 세포내의 Ca^{2+} 이용을 방해한다는 것을 암시한다.

동일한 조건하에서 caffeine에 의한 초기 수축 역시 GS-389 전처치에 의하여 완전 봉쇄가 되었다. 이러한 사실은 GS-389가 세포내 저장되어 있는 Ca^{2+} 의 유리 억제의 가능성 또한 다른 기전을 통하여 세포내 저장된 Ca^{2+} 의 이용도를 떨어뜨릴 가능성 등을 생각해 볼 수 있다. 이러한 사실을 더욱 직접적으로 확인하기 위하여 saponin으로 세포막을 파괴시킨후 Ca^{2+} free 조건하에 caffeine에 의한 수축을 유도하였다. GS-389는 이 경우에도 caffeine에 의한 초기 수축을 억제하였다. 이러한 사실은 적어도 GS-389가 Ca^{2+} 이용을 방해하는 특징을 지니고 있음을 암시한다.

또한 PDEI들은 막전압의존성¹⁹⁾ 또는 수용체를 통한 Ca^{2+} 통로 혹은 세포내 저장된 Ca^{2+} 의 유리 억제를 통해 Ca^{2+} 이용을 감소시키므로써 근육 이완을 일으킨다고 하였다. 이러한 사실은 GS-389의 작용 기전이 PDEI의 가능성을 더욱 뒷받침 한다고 할 수 있다. 특히 강력한 비특이성 PDEI인 papaverine과 그 구조가 유사한 점과 Davis²⁰⁾등이 개발한 화합물 등도 PDEI 등에서 볼 수 있는 바와 같이 6,7-dimethoxy 기와 1-phenyl 또는 1-benzyl 기는 activity에 중요한 역할을 한다는 구조 활성화 관계 (structure activity relationship) 분석과도 잘 일치한다고 할 수 있다.

Martin²¹⁾ 등은 내피 세포에서는 스스로 EDRF가 유리되며 PDEI등도 이 EDRF의 작용을 증강시켜 내피 세포 의존성 이완 현상을 더욱 강화시킬 것이라고 제안하였다. 그러나 본 실험에서 GS-389는 그들이 제안한 내용과 일치하지 않았다. 또한 papaverine도 마찬가지로 내피세포 의존성 이완과 내피세포 비 의존성 이완을 구별할 수 없었다(Fig. 2). 현재 이 차이를 설명할 수는 없지만 이를 설명할 수 있을 가능성으로서 첫째 종의 차이를 들 수 있다. 그들은 Wister rat를 사용한 반면 저자는 Sprague-Dawley를 사용하였고 그들도 Rabbit에서는 PDEI의 내피세포 의존성과 비의존성 이완이

구별되는 부분이 rat보다는 약했고 특히 isobutylmethylxanthine(IBMX)로는 내피세포 의존성 분획을 확인할 수 없었다고 한다²¹⁾. 또 다른 가능성으로서는 GS-389가 그 들이 보고한 바와 같이 IBMX와 같은 성질을 갖고 있으므로 내피세포 의존성과 내피세포 비의존성 이완을 구별할 수 없을 가능성도 있다. 그러나 후자의 가능성은 희박하다. 왜냐하면 papaverine 도 역시 본 실험에서는 내피세포 의존성 이완과, 그들은 구별가능하다고 했지만, 비의존성 이완을 구별할 수 없었다.

EDRF는 종에 따라 차이가 있을 뿐만 아니라 같은 종이라도 혈관 종류에 따라서는 그 차이 또한 크다. 한편 mouse와 같은 작은 동물의 혈관을 사용하여 수축과 이완 등의 변화를 생화학적인 방법으로는 많이 연구되어 있지만 생리학적인 방법으로는 연구된 것은 매우 드문데 이는 너무 혈관이 작고 약하기 때문에 혈관 제작등의 문제가 있기 때문인가 한다. 저자들은 이러한 점을 감안하여 직경 0.1mm 정도의 가느다란 tungsten wire를 혈관의 내피세포 손상없이 생리 기록할 수 있는 장치를 고안하여 성공적으로 연구할 수 있었고 이 방법을 이용하면 rat의 신장동맥 등과 같이 미세형 혈관의 말초 저항과 관련된 혈관 질환의 연구에 이용될 수 있으리라 생각된다. 본 실험은 또한 Furchgott¹⁾등이 제창한 Acetylcholine에 의한 혈관 이완은 내피세포에 의존적이라는 가설이 mouse 혈관에도 적용될 수 있음을 확인할 수 있었고 이러한 사실로서 그들의 가설을 더욱 뒷받침 한다고 할 수 있다.

별도의 실험에서 GS-389는 심장에 대한 심근 수축력 증강 효과가 전혀 없었는데 이는 c-AMP와 관련되어 있지 않고 c-GMP와 관련이 있다는 것을 의미하는데 GS-389의 이완 작용을 더욱 확인하기 위하여 베타차단제인 propranolol을 사용하여 GS-389의 작용을 살펴 본 결과 GS-389에 의한 이완 작용은 mouse나 rat에 있어서 propranolol에 의하여 전혀 영향을 받지 않았다. 한편 대조로서 isoproterenol에 의한 이완은 약 30~35% 정도 억제되었다. 이러한 내용은 GS-389는 적어도 베타수용체를 통한 작용이 아님을 뒷받침하는 내용이다. 또한 guanylate cyclase 억제제인 methylene blue를 사용하여 GS-389의 이완 작용 기전을 더욱 명백히

하고자 시도하였다. Methylene blue 전처치에 의하여 GS-389의 이완 작용이 현저히 감소하였고 SNP의 이완 작용 역시 억제되었으나 isoproterenol에 의한 이완에서는 영향이 없었다. 더군다나 GS-389는 isoproterenol (mouse)에 의한 이완이나 SNP(rat)에 의한 이완은 전처치 하였을 때 또는 이들 약물과 동시에 투여시 그 이완 작용은 매우 증강되었다. 이러한 사실도 GS-389의 작용 기전이 cyclic nucleotide 중에서 특히 c-GMP와 관련이 있다고 생각된다. 이 가설을 더욱 뒷받침 하는 내용으로서 Acetylcholine에 의한 EDRF 유리에 대한 GS-389의 효과를 확인하였을 때 내피 세포가 보존되어 있는 mouse나 rat의 혈관에서 GS-389 (10 μ M 이상)는 Acetylcholine에 의한 이완 작용을 더욱 증강시켰다.

최근 Maurice¹⁶⁾ 등은 혈소판 기능 억제에 있어서 c-GMP의 분자 수준에서 역할의 중요성을 보고하였는데 즉 c-GMP는 혈소판에서 low Km c-AMP phosphodiesterase를 억제하므로써 c-AMP가 분해되는 것을 억제하는 성질이 있다는 것을 발표하였다. 한편 low Km c-AMP phosphodiesterase는 혈관을 포함하여 여러 세포에 존재하는 효소이다¹⁷⁾. 이러한 가능성이 mouse와 rat의 혈관에서도 적용된다면 isoproterenol에 의해 생겨난 c-AMP를 GS-389가 그 분해를 억제하여 작용을 증강시킬 수 있을 것으로 판단된다. 한편 cyclic nucleotide등은 그에 상당하는 protein kinase를 활성화시켜 어떤 특정 단백질을 활성화 시키므로써 그 작용이 나타난다²²⁾. 따라서 이 가능성을 검토하기 위하여 PE에 의한 PI turnover에 대한 GS-389와 SNP의 영향을 살펴 보았다. GS-389와 SNP는 PE에 의한 PI 가수분해를 억제시켰다(Fig. 13).

한편 Hirata²³⁾은 rat의 대동맥과 소의 대동맥 평활근 세포에서 cyclic nucleotide 특히 c-GMP가 guanine nucleotide regulatory protein (G-protein)의 활성화를 억제 시키므로 또는 G-protein과 phospholipase C의 상호 작용을 억제 하므로 PI 가수분해가 저해를 받을 것으로 보고 하였으며 c-GMP에 의한 이 억제 작용은 ATP의 존재에 전적으로 의존하므로 특정 단백질의 인산화 가능성을 배제하지 못 하였다. 따라서 본 실험에서는 그 가능성으로서 cyclic nucleotide가 증가하면 이에

상당하는 protein kinase가 활성화 되고 이 활성화된 protein kinase는 PI 가수 분해와 관련이 있는 단백질, 예컨대 phospholipase C, G-protein 또는 IP3 수용체 등을 인산화시켜 PI의 가수 분해를 억제시킬 것으로 생각된다. 향후 이 가능성에 대한 연구가 집중적으로 이루어져야 할 것으로 생각되며 본 실험에서 cyclic nucleotide를 측정하지 않았지만 GS-389가 c-GMP에 선택적으로 작용할런지는 이러한 system에서 cyclic nucleotide 양의 변화를 측정해 보아야 할 것으로 사료된다.

요 약

새로운 혈관이완제이며 phosphodiesterase 억제제인 GS-389, 1-(4'-methoxybenzyl)-6,7-dimethoxy-1,2,3,4-tetra hydroisoquinoline hydrochloride, 의 혈관 이완작용 기전을 밝히기 위하여 mouse와 rat의 흉부대동맥 절편 고리를 사용하여 생리학적 방법과 생화학적 방법을 시도하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1) GS-389는 혈관의 내피세포 유무에 관계없이 용량의존적으로 혈관을 이완시켰고 phenylephrine 10⁻⁶ M에 의한 수축에 대하여 rat 혈관에 대한 IC₅₀는 5.7 \times 10⁻⁶ M 이었고 mouse 혈관에 대하여는 8.3 \times 10⁻⁶ M로서 거의 유사하였다.

2) GS-389는 막전압의존성 (voltage dependent) 및 수용체 작용성 (receptor operated) Ca²⁺의 이용을 방해하여 근육이완 작용을 나타내었다.

3) GS-389의 이완 효과는 60mM KCl에 의한 수축에 대한 억제 보다 10⁻⁶ M phenylephrine에 의한 수축에 더욱 민감하였다. 즉 60mM KCl에 의한 수축에 대한 pIC₅₀는 4.82 \pm 0.22인데 비해 10⁻⁶ M phenylephrine에 의한 수축에 대한 pIC₅₀는 5.24 \pm 0.14 이었다.

4) 용량에 따른 GS-389 전처치는 phenylephrine에 의한 수축에 대하여 noncompetitive한 양상으로 억제하였다.

5) Ca²⁺에 의한 수축력 회복에 대해 GS-389는 용량의존적으로 억제 효과를 나타내었고 phenylephrine 유도에 대한 Ca²⁺ 증가에 따른 수축에 대한 억제 정도는 GS-389 (30 μ M) > verapamil (30 μ M) > GS-389 (10 μ M) > papaverine (3 μ M) 순이었으나

60mM KCl 유도에 의한 Ca^{2+} 증가에 따른 수축력에 대한 억제 정도는 verapamil (30 μM) > GS-389 (30 μM) > GS-389 (10 μM) 순이었다.

6) GS-389는 saponin 처리한 rat 혈관에 대해 phenylephrine 및 caffeine에 의한 일시적 수축을 용량의존적으로 억제하였다.

7) GS-389의 효과는 propranolol에 의하여 차단되지 않았으나 isoproterenol의 효과는 억제되었다.

8) Isoproterenol의 이완 작용은 GS-389에 의하여 더욱 증강되었다.

9) Isoproterenol의 이완 작용은 methylene blue에 의하여 영향이 없었으나 GS-389와 sodium nitroprusside의 이완 작용은 억제되었다.

10) Sodium nitroprusside의 이완 작용은 GS-389에 의하여 더욱 증강되었다.

11) Phenylephrine에 의한 phosphoinositide 가수분해를 GS-389와 sodium nitroprusside는 억제하였다.

12) GS-389는 내피세포가 보존된 혈관에서 EDRF의 작용을 증강시켰다.

이상의 결과를 종합해 볼 때 GS-389의 작용기전은 세포 내외의 Ca^{2+} 이온의 이용을 억제하며 이러한 작용은 cyclic nucleotide를 통한 작용임을 암시하며 특히 phosphoinositide turnover 억제에 의한 작용 가능성을 시사하였다. Phosphoinositide turnover와 관련된 어떤 단백질의 안산화에 의한지와 어떤 cyclic nucleotide에 선택적인지는 앞으로 계속 연구해야 할 과제로 생각된다.

References

- 1) Furchgott RF, Zawadzki JV : *The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine*. *Nature* 288 : 373, 1980
- 2) Sakuma I : *Identification of arginine as a precursor of endothelium derived relaxing factor*. *Proc Natl Acad Sci* 85 : 8664, 1988
- 3) Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA : *Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine*. *Biochem Pharmacol* 38 : 1709, 1989
- 4) Stuehr KJ, and Nathan CF : *Nitric oxide a macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells*. *J Exp Med* 169 : 1544, 1989
- 5) Ignarro : *Annual review of pharmacology and toxicology*. vol.30. Gerge CHO, Blaschke (eds) In. *biosynthesis and metabolism of endothelium derived nitric oxide*. pp535, 1990
- 6) Polson JB, Krzanowski JJ, Szentivanyi A : *Correlation between inhibition of cyclic GMP phosphodiesterase and relaxation of canine tracheal smooth muscle*. *Biochem Pharmacol* 34 : 1875, 1985
- 7) Yoshioka K, Takayanagi I, Hisayama T, Furukawa A : *Effects of a new positive inotropic agent with a vasodilatory action, 5-methyl-6-(4-pyridyl)-2H-1,4-thiazin-3(4H)-one(ZSY-27), on agonists induced contractions in the isolated rabbit thoracic aorta*. *J Pharmacobio-Dyn* 12 : 653, 1989
- 8) Ruppert D, Weithman KU : *HL725, an extremely potent inhibitor of platelet phosphodiesterase and induced platelet aggregation in vitro*. *Life Science* 31 : 2037, 1982
- 9) Ko FN, Chen IS, Wu SJ, Lee LG, Haung TF, and TCM : *Antiplatelet Effects of Cherythrine Chloride Isolated from Zanithoxylum Simulans*. *Biophysica Acta* 1052 : 360, 1990
- 10) Asoke M, Stephaen SN, Hebatalla MA, Sayed AA, Jane C, Douglas JS, DuanaDM, Dennis RF : *Effects of trimetoquinol analogs for antagonism of endoperoxide/thromboxan A2-mediated responses in human platelet and rat aorta*. *J Pharmacol Exp Ther* 232 : 1, 1985
- 11) Iwasawa Y, Kiyomoto A : *Studies on tetrahydroisoquinoline (THI) 1.bronchodilator activity and structure-activity relationship*. *Japanese J Pharmacol* 17 : 243, 1967
- 12) Kosuge T, Yokodam, Nagasawa M : *studies on cardiac principle in aconite roots I. Isolation and structural determinants of higenamine*. *Yakugaku Zasshi*. 98 : 1370, 1978
- 13) Park CW, Chang KC, Lim JK : *Effects of higenamine on isolated heart adernoreceptor of rabbit*. *Archiv Inter Pharmacodyn Ther* 267 : 279, 1984
- 14) Chang KC, Lim JK and Park CW : *Synthesis of higenamine and its cardiovascular effect in rabbit : Evidence for beta-adrenergic agonist* : *Kor J Pharmacol* 22 : 96, 1986
- 15) Sugimoto Y, Sugimura Y, and Yamada Y : *Biosyn-*

- thesis of bisbenzylisoquinoline alkaloids in cultured roots of Sephania Cepharantha. FEBS 273 : 82, 1990*
- 16) Maurice DH, Haslam RJ : *Molecular basis of the synergistic inhibition of platelet function by nitro-dilators and activators of adenylate cyclase : Inhibition of cyclic AMP breakdown by cGMP. Mol Pharmacol 37 : 671, 1990*
 - 17) Weishaar RE, Burrows SD, Kobylarz DC, Quade MM, Evans DE : *Multiple molecular forms of cyclic nucleotide phosphodiesterase in cardiac and smooth muscle and in platelets. Biochem. Pharmacol 85 : 787, 1986*
 - 18) Rapoport RM, Cornelius VG, Chang KC : *Inositol uptake in rat aorta. Life sci 46 : 1715, 1990*
 - 19) Fujioka FM : *Lack of causal relationship between the vasodilator effect of papaverine and cAMP production in the dog basilar artery. Br J Pharmacol 83 : 16, 1984*
 - 20) Davis CW, Walker KA : *1-(4-aminophenyl)isoquinoline derivatives potent inhibitors of calcium-independent and calcium-dependent phosphodiesterase from rat cerebral cortex. Biochem Pharmacol 33 : 1205, 1984*
 - 21) Martin W, Furchgott RF, Villani GM, Jothianandan D : *Phosphodiesterase inhibitors induce endothelium dependent relaxation of spontaneously released endothelium derived relaxing factor. J Pharmacol Exp Ther 237 : 539, 1986*
 - 22) Takai Y, Kikkawa U, Kaibuchi K, Nishizuka Y : *Membrane phospholipid metabolism and signal transduction for protein phosphorylation. Advances in Cyclic Nucleotide Research 18 : 119, 1984*
 - 23) Hirata M, Kohse KP, Chang CH, Ikebe T, Murad F : *Mechanism of cyclic GMP inhibition of inositol phosphate formation in rat aorta segments and cultured bovine aortic smooth muscle cells. J Biol Chem 265 : 1268, 1990*