

## D型氨基酸氧化酶活性对于 D-硝基精氨酸手性转化的影响\*

辛艳飞 周向军\*\* 王永祥\*\*

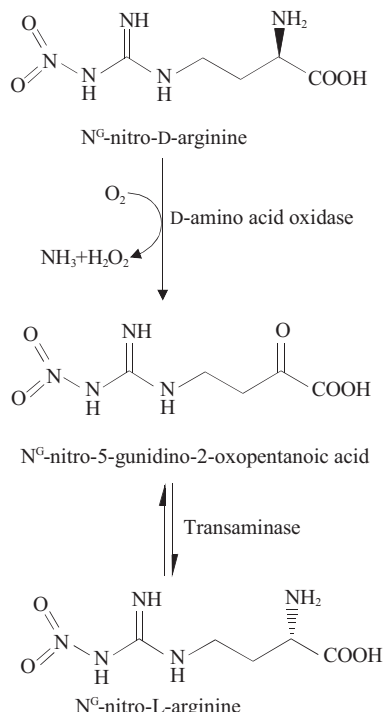
(上海交通大学药学院分子药理实验室, 上海 200030)

**摘要** D-硝基精氨酸(D-NNA)可在大鼠体内发生手性转化生成其L型异构体,即L-NNA,后者可抑制一氧化氮合酶活性,减少一氧化氮生成,升高动脉血压.研究了D型氨基酸氧化酶(DAAO)在D-NNA手性转化中的作用及DAAO对不同(包括已报道在体内可发生手性转化的)D型氨基酸的选择活性.体内实验显示,DAAO的选择性抑制剂苯甲酸钠(400 mg/kg)或肌酐(400 mg/kg)均可在不同程度上抑制D-NNA升压作用,进一步研究发现,肾脏或肝脏DAAO酶液在外加DAAO后可提高D-NNA的手性转化约2倍,表明DAAO对于D-NNA在体内的手性转化是必需的.DAAO酶液对可在体内发生手性转化且转化率相似(30%~50%)的D型氨基酸(D-Phe, D-Leu和D-NNA)的选择性表现出显著差异( $K_{cat}/K_m$ 相差可达约15倍左右),这从另一方面表明体内D-硝基精氨酸氧化是其发生手性转化的前提条件但非决定因素.

**关键词** D-硝基精氨酸, D型氨基酸氧化酶, D型氨基酸, 手性转化

**学科分类号** R969.1, Q554+.4

前期研究表明,D-硝基精氨酸( $N^G$ -nitro-D-arginine, D-NNA)在体内可发生手性转化,生成L型对映异构体.L-硝基精氨酸( $N^G$ -nitro-L-arginine,



**Fig. 1** The proposed pathway of two-step conversion of D-NNA to L-NNA

L-NNA)作为一氧化氮合酶抑制剂,可减少一氧化氮生成,升高实验动物血压<sup>[1,2]</sup>.但体内D-NNA手性转化的分子机制尚不明确.我们的前期试验证实,D-NNA的手性转化主要集中在肾脏<sup>[2~4]</sup>,同时,资料表明,D-氨基酸氧化酶(D-amino acid oxidase, DAAO, EC 1.4.3.3)可催化D-氨基酸生成相应的 $\alpha$ -酮酸,在哺乳动物体内主要分布于肾脏<sup>[5]</sup>.因此我们推测D-NNA手性转化通路为:首先D-NNA在DAAO作用下生成相应的 $\alpha$ -酮酸,随后 $\alpha$ -酮酸在特定的转氨酶作用下生成L-NNA,如图1所示.由于生命体内只合成L型氨基酸,所以 $\alpha$ -酮酸在转氨酶作用下只能生成L型氨基酸,这也解释了D-NNA的单向手性转化现象.

本实验目的在于考察DAAO在D-NNA手性转化中的作用,并初步探索了D型氨基酸手性转化的选择性.

\*国家自然科学基金资助项目(30472052),科技部国家“十五”重大科技攻关专项基金资助项目(2003AA2Z347A),上海市科委技术平台建设基金资助项目(04DZ19214).

\*\*通讯联系人.

周向军, Tel: 021-62932136, E-mail: joezhou@sjtu.edu.cn

王永祥, Tel: 021-62933406, E-mail: yxwang@sjtu.edu.cn

收稿日期: 2005-07-28, 接受日期: 2005-08-31

## 1 材料和方法

### 1.1 药物和主要试剂

D-NNA, D-亮氨酸(D-Leu), D-丙氨酸(D-Ala), D-苯丙氨酸(D-Phe)和D-精氨酸(D-Arg)(吉尔生化上海有限公司, 上海); D-硝基精氨酸甲酯(N<sup>G</sup>-monomethyl-L-arginine, D-NAME)(Bachem, 美国); L-NNA和天门冬氨酰苯丙氨酸甲酯(aspartame)(Acros, 比利时); 猪肾(pk) DAAO(Sigma, 美国); 其余试剂均为国产分析纯。

### 1.2 仪器与设备

RM6420 四道生理仪(成都仪器厂), 毛细管电泳仪(capillary electrochromatography, CEC)(美国通微分析技术有限公司), C<sub>18</sub>反相毛细管柱(75 μm × 25 cm)(上海通微分析技术有限公司)。

### 1.3 动物

SD大鼠, ♂, 250~350 g, 购自中国科学院动物中心。

### 1.4 DAAO抑制剂苯甲酸钠与肌酐对D-NNA升压作用的影响

SD大鼠给予戊巴比妥钠(65 mg/kg, ip)麻醉。在右上缘大腹股沟切口, 分离股动静脉。实施股动静脉插管术(聚乙烯PE50管, 美国Becton Dickinson公司), 右股动脉插管用于测定血压, 右股静脉插管用于给药, PE50管经背部皮下从颈背部引出, 缝合切口。术后大鼠独笼饲养, 恢复24 h<sup>[6]</sup>。

插管大鼠随机分为5组, 动脉插管连接RM6420四道生理仪记录血压, 待血压基线达到平稳, 分别静脉给药。D-NNA对照组( $n=3$ ), iv 5%葡萄糖注射液(4 ml/kg) 20 min后, iv D-NNA(32 mg/kg); 肌酐对照组( $n=3$ ), iv 肌酐(400 mg/kg) 20 min后, iv 5%葡萄糖注射液(4 ml/kg); 肌酐组( $n=6$ ), iv 肌酐(400 mg/kg) 20 min后, iv D-NNA(32 mg/kg)<sup>[7]</sup>; 苯甲酸钠对照组( $n=3$ ), iv 苯甲酸钠(400 mg/kg) 20 min后, iv 5%葡萄糖注射液(4 ml/kg); 苯甲酸钠组( $n=6$ ), iv 苯甲酸钠(400 mg/kg) 20 min后, iv D-NNA(32 mg/kg)<sup>[8]</sup>。第二次给药后检测血压1 h。全部试验过程大鼠在饲养笼内保持自由活动状态。

### 1.5 大鼠肾脏组织DAAO酶液的制备

大鼠断头处死, 收集血液制备血浆。手术分离肾、肝、心和肺脏等, 置4℃生理盐水洗净。每1 g组织置于3 ml Tris-HCl缓冲液(pH 8.2)中,

1 000 r/min, 匀浆15 min。匀浆液1 500 r/min, 离心10 min。上清液对相同的缓冲液透析过夜, 即得粗组织酶液<sup>[9]</sup>。应用Folin-酚试剂法进行蛋白质定量, 以牛血清白蛋白作为标准。

### 1.6 DAAO酶液对D-NNA的转化

制得的组织匀浆100 μl和等体积25 mmol/L D-NNA(溶于Tris-HCl缓冲液)于37℃, 700 r/min摇床孵育30 min。加pkDAAO组反应体系与上相同, 但用100 μl pkDAAO(9.8 U/ml)酶液代替其中的Tris-HCl缓冲液。孵育完成后, 100 μl反应液加10倍体积甲醇/丙酮(1:1)沉淀蛋白质, 10 000 r/min, 离心15 min。上清液用离心浓缩仪挥干, 用500 μl醋酸缓冲液(pH 5.0)溶解为样品液。应用CEC手性配体交换法进行匀浆中D/L-NNA的检测<sup>[2, 10]</sup>。流动相为醋酸缓冲液(pH 5.0), 含有2 mmol/L aspartame, 1 mmol/L Cu<sup>2+</sup>, 5%甲醇, 进样量10 nL, 检测波长280 nm, D-NNA与L-NNA血药浓度通过0.025 mmol/L至0.75 mmol/L标准曲线( $r^2>0.98$ )求得。

### 1.7 肾DAAO酶液对D-NNA的选择活性

应用D'Aniello法通过测定α-酮酸量确定肾组织DAAO酶液对不同D-氨基酸的选择活性<sup>[9]</sup>。在0~200 mmol/L间(D-Ala, D-Arg和D-NAME)或0~150 mmol/L间(D-Leu和D-Phe)底物浓度分别设置为7个梯度浓度; D-NNA在0~50 mmol/L间设置为5个梯度浓度。反应体系与DAAO酶液的活性检测中所述相同, 终止反应。酶液100 μl和同体积的底物(溶于Tris-HCl缓冲液)于37℃, 700 r/min摇床孵育, 在孵育后1 min或5 min后, 加入100 μl 25%三氯醋酸终止反应。取出100 μl反应液和等体积的2,4-二硝基间苯酚(1 mmol/L, 溶于1 mol/L HCl)于37℃反应10 min, 加1.5 mol/L NaOH溶液200 μl, 37℃反应10 min, 445 nm处测定吸光度。在空白对照中, 组织酶液在加底物之前加热变性。α-酮酸的量通过丙酮酸在相同反应条件下以吸收值和浓度所作标准曲线求得。1个酶活单位被定义为在此反应条件下, 一定量的酶蛋白每分钟生成的α-酮酸量。每个浓度测定3次, 标准差在3%~5%。按Lineweaver-Burk法作图, 求K<sub>m</sub>和V<sub>max</sub>值<sup>[11]</sup>。

### 1.8 统计学处理

实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 双侧 $t$ 检验进行组间显著性分析。

## 2 结 果

### 2.1 DAAO 抑制剂拮抗 D-NNA 所致大鼠升压反应

苯甲酸钠和肌酐为 DAAO 的选择性抑制剂<sup>[6,7]</sup>, 实验考察了这两个抑制剂对 D-NNA 在大鼠体内升压作用的影响. 图 2a 显示, 在整个实验过程中, 苯甲酸钠对照组大鼠在 iv 给予苯甲酸钠(400 mg/kg) 20 min 后, iv 给予的 5%葡萄糖(4 ml/kg), 大鼠动脉血压基本维持不变. D-NNA 对照组大鼠在 20 min 内先后给予 5%葡萄糖和 D-NNA (32 mg/kg), 平均动脉压(mean arterial pressure, MAP) 逐步升高, 并在给药后 50 min,  $\Delta$ MAP 升高达到峰值( $4.9 \pm 0.4$ ) kPa. 而 400 mg/kg 苯甲酸钠则完全 ( $P < 0.05$ ,

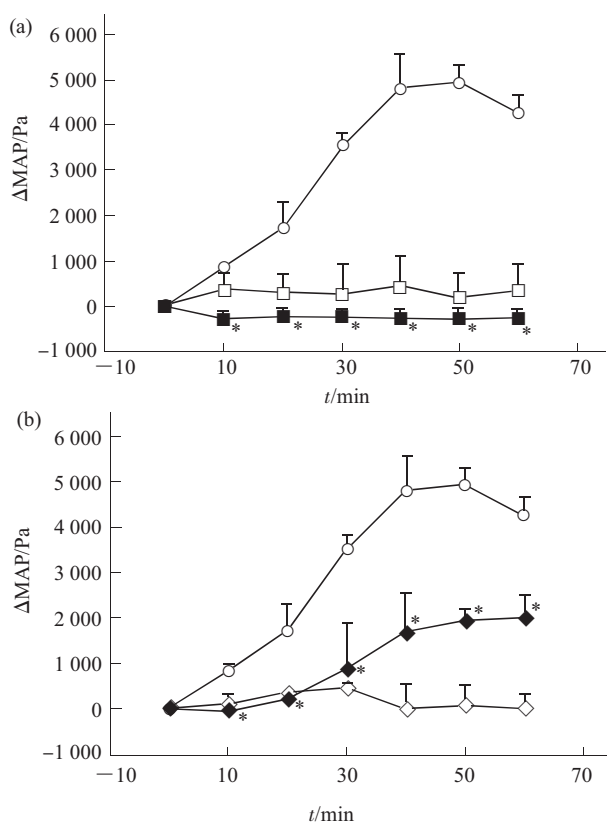


Fig. 2 Effects of benzoate (400 mg/kg, a) and creatinine (400 mg/kg, b), selective inhibitors of D-amino acid oxidase (DAAO), on increments in mean arterial pressure ( $\Delta$ MAP) elicited by i.v. bolus injection of N<sup>G</sup>-nitro-D-arginine (D-NNA, 32 mg/kg) in conscious rats

\* denotes statistically significant ( $P < 0.05$ ) difference from respective control values in the group of the vehicle + D-NNA. (a)  $\circ-\circ$ : D-NNA control;  $\square-\square$ : Benzoate control;  $\blacksquare-\blacksquare$ : Benzoate+D-NNA. (b)  $\circ-\circ$ : D-NNA control;  $\diamond-\diamond$ : Creatinine control;  $\blacklozenge-\blacklozenge$ : Creatinine+D-NNA ( $n = 3 \sim 6$  in each group).

与 D-NNA 对照组相比) 抑制大鼠体内 D-NNA 所致的升压作用, 在监测的 60 min 内, 大鼠  $\Delta$ MAP 维持在( $-0.3 \pm 0.1$ ) kPa, 未见显著升高. 苯甲酸钠组与 D-NNA 对照组比较, 给药 10 min 后各时间点 MAP 变化均有统计学意义( $P < 0.05$ ).

图 2b 中, 肌酐对照组的  $\Delta$ MAP- 时间曲线显示肌酐(400 mg/kg) 并不影响大鼠 MAP. 但 400 mg/kg 肌酐亦使 D-NNA 引起的大鼠 MAP 升高幅度显著 ( $P < 0.05$ , 与 D-NNA 对照组相比) 降低, 其抑制程度约为相同剂量苯甲酸钠抑制作用的 60%~70%.

### 2.2 各组织 DAAO 酶液中 D-NNA 的手性转化活性

孵育液中的 D-NNA 或 L-NNA 通过 CEC 手性配体交换法检测. 结果显示, 在 30 min 或 60 min 内, 单独的 pkDAAO (4.9 U/ml) 酶液可代谢 D-NNA (12.5 mmol/L) 约 46% 或 73%, 但没有生成 L-NNA. 表 1 显示, 在 30 min 内, 肾或肝组织酶液分别代谢 48% 或 34% 的 D-NNA, 但在 D-NNA 与心、肺组织酶液或血浆等的孵育液中未见 D-NNA 显著性减少, 这与已报道的大鼠体内 DAAO 活性分布相一致<sup>[9]</sup>. 同时 L-NNA 的生成也仅在肾或肝组织酶液和 D-NNA 的孵育液中检出 (分别为 8% 和 3%). 在相同的孵育体系中加入 pkDAAO 后, 30 min 内各组织酶液对于 D-NNA 的代谢均增加, 其中心、肺组织酶液或血浆等体系中的 D-NNA 代谢增加有统计学意义. 而且 pkDAAO 的加入也使肾或肝组织酶液孵育液中的 L-NNA 生成显著 ( $P < 0.05$ , 与不加 pkDAAO 组相比), 增加约 2 倍, 但不增加心、肺组织酶液或血浆等体系中的 L-NNA 生成率. 结果表明, 参与 D-NNA 手性转化的完整酶系主要存在于肾脏和肝脏.

### 2.3 肾 DAAO 酶液对 D 型氨基酸的选择

肾组织 DAAO 酶液对不同 D 型氨基酸的选择活性通过测定氧化生成  $\alpha$ - 酮酸确定<sup>[9]</sup>. 结果表明, 肾 DAAO 粗酶液对于 D-Phe 的氧化活性最强, 而对 D-NNA 的代谢活性约为对 D-Phe 的 7%, 但 1~5 min 内的检测未能考察出 DAAO 对于 D-NNA 衍生物 D-Arg 与 D-NAME 的活性. 实验发现, 粗酶液在实验设计蛋白质浓度 (约 10 g/L), D 型氨基酸浓度为 25 mmol/L 时, 孵育时间在 30 min 内, 氨基酸呈线性消除, 而 DAAO 对 D-Arg 或 D-NAME 的氧化反应速率约为对 D-NNA 的 40% 或 60% 左右.

**Table 1 Disappearance-rate of N<sup>G</sup>-nitro-D-arginine (D-NNA) or production-rate of N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine (L-NNA) after D-NNA (12.5 mmol/L) incubated with a variety of tissue homogenates with or without addition of D-amino acid oxidase (DAAO, 4.9 U/ml)**

| Tissue  | Disappearance-Rate (%) of D-NNA |                    | Production-Rate (%) of L-NNA |                    |
|---------|---------------------------------|--------------------|------------------------------|--------------------|
|         | Homogenates only                | Homogenates + DAAO | Homogenates only             | Homogenates + DAAO |
| Buffer  | —                               | 45.98 ± 2.44       | —                            | 1.22 ± 0.23        |
| Kidneys | 48.10 ± 4.26                    | 54.02 ± 5.72       | 8.17 ± 2.74                  | 16.29 ± 1.32*      |
| Liver   | 33.98 ± 4.94                    | 43.16 ± 8.18       | 3.39 ± 0.45                  | 9.38 ± 2.55*       |
| Heart   | -0.95 ± 1.68                    | 51.17 ± 4.87*      | 1.74 ± 0.90                  | 1.69 ± 0.43        |
| Lungs   | 2.41 ± 1.21                     | 48.60 ± 4.92*      | 1.85 ± 0.17                  | 1.79 ± 0.45        |
| Plasma  | -1.56 ± 3.71                    | 52.69 ± 6.27*      | 2.19 ± 0.59                  | 1.48 ± 0.26        |

\* denotes statistically significance ( $P < 0.05$ ) compared with respective homogenate only groups.  $n = 3$  in each group.

**Table 2 Apparent kinetic parameters of crude DAAO solution from the rat kidney**

| Substrate | $K_m/\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ | $V_{\max}$ | $K_{\text{cat}}/K_m$ | $V^*$ |
|-----------|---------------------------------------|------------|----------------------|-------|
| D-Ala     | 9.15 ± 0.69                           | 100        | 78                   | 100   |
| D-NNA     | 26.53 ± 5.03                          | 11         | 7                    | 10    |
| D-Phe     | 5.22 ± 0.26                           | 72         | 100                  | 94    |
| D-Leu     | 6.81 ± 1.16                           | 47         | 50                   | 46    |
| D-Arg     | ND                                    | ND         | ND                   | 4     |
| D-NAME    | ND                                    | ND         | ND                   | 6     |

\* Data are expressed as percentage (%) of the specific activity of crude DAAO solution on D-Ala. ND: not detected.  $n = 4$ .

### 3 讨 论

越来越多的实验证实, 部分 D 型氨基酸可在生物体内发生手性转化生成相应的 L 型异构体, 例如 D-Leu 在大鼠体内(30%)<sup>[12]</sup>、D-Phe 在人体内(33%)<sup>[13]</sup>和 D-NNA 在大鼠体内(50%)<sup>[10]</sup>均可发生手性转化. 结合我们前期试验结果: 肾脏是 D-NNA 在大鼠体内手性转化的主要器官, 同时鉴于 DAAO 的体内分布和代谢特性, 我们推测体内 D 型氨基酸的手性转化主要是在 DAAO 和转氨酶的作用下通过两步反应实现的.

本实验发现, DAAO 的选择性抑制剂苯甲酸钠<sup>[6]</sup>和肌酐<sup>[7]</sup>可在不同程度上抑制 D-NNA 在清醒大鼠体内的升压作用, 这说明 DAAO 对于 D-NNA 在体内体现类似于 L-NNA 的升压活性是必需的. 更进一步, 体外实验发现, 外加 pkDAAO(4.9 U/ml)后, 肾或肝粗酶液(蛋白质含量约 10 g/L)中 D-NNA (12.5 mmol/L)到 L-NNA 的手性转化率可提高 2 倍左右. 综上所述, 可以推断 DAAO 参与了 D-NNA 的手性转化. 这与已证实的 DAAO 参与了 D-Leu 的体内手性转化相一致<sup>[14]</sup>.

实验结果进一步表明, DAAO 对于 D-Leu、D-Phe 和 D-NNA 等可在体内发生手性转化的氨基

酸表现出不同的选择性, 其中 DAAO 对 D-Phe 的专一性约为 D-NNA 的 15 倍, 对 D-Leu 的专一性约为 D-NNA 的 7 倍, 但是 D-Phe、D-Leu 和 D-NNA 在体内表现出相似的手性转化率. 另一方面值得注意的是, DAAO 对于与 D-NNA 结构类似的 D-Arg 和 D-NAME, 表现出略低于 D-NNA 的选择活性, 但早期实验显示, 在大鼠体内 D-Arg 不能(而 L-Arg 可以)拮抗由 L-NNA 引起的升压作用(这表明在体内 D-Arg 无显著的手性转化现象)<sup>[15]</sup>. 同时 D-NAME 在体内的升压活性也仅为 L-NAME 的 3% 左右<sup>[16]</sup>, 和报道的 D 型氨基酸的 30%~50%的手性转化率相差甚远. 而于 D-Ala 这个大多数 DAAO 的最适底物在体内却无手性转化现象<sup>[17]</sup>. 综合这些结果可推知: a. DAAO 对于不同 D 型氨基酸的选择性不能直接决定 D 型氨基酸在体内是否发生手性转化及转化率. b. 参与手性转化的第二步反应的(可能不同的)转氨酶对 D 型氨基酸生成的  $\alpha$ -酮酸表现出不同的选择活性可能决定了手性转化的转化率. c. D 型氨基酸、氧化生成的  $\alpha$ -酮酸及其 L 型对映体的分子特性和理化性质的差异也应是造成手性转化率不同的原因之一.

本实验结果初步证实了 DAAO 参与 D-NNA 体内手性转化的假说, 为了证实我们提出的 D-NNA 两步手性转化通路, 我们正在对相关的转氨酶进行研究. 由于体内 D 型氨基酸手性转化的普遍性, 我们也在着手进行 DAAO、D 型氨基酸特性与转氨酶三者之间的关系, 最终将揭示体内 D 型氨基酸的手性转化规律及意义.

**致谢** 本实验所用 N<sup>G</sup>-L-硝基精氨酸和 D-硝基精氨酸甲酯由加拿大不列颠哥伦比亚大学药理系 Dr. Catherine C.Y. Pang 提供, 特此感谢.

## 参 考 文 献

- 1 Wang Q, Cwik M, Wright C J, *et al.* The *in vivo* unidirectional conversion of nitro-D-arginine to nitro-L-arginine. *J Pharmacol Exp Ther*, 1999, **288** (1): 270~274
- 2 辛艳飞, 程 熹, 王广基, 等. 肾脏是体内 N<sup>G</sup>-D- 硝基精氨酸单向手性转化的主要器官. 中国药理学通报, 2004, **20** (9): 989~993  
Xin Y F, Cheng X, Wang G J, *et al.* *Chin Pharmacol Bull*, 2004, **20** (9): 989~993
- 3 Cheng X, Wang, Y X, Pang C C. Biological activation of N<sup>G</sup>-nitro-D-arginine by kidney homogenate. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 1997, **356** (4): 495~499
- 4 Wang Y X, Cheng X, Pang C C. Bilateral kidney ligation abolishes pressor response to N<sup>G</sup>-nitro-D-arginine. *Eur J Pharmacol*, 1999, **366** (2~3): 175~179
- 5 Pilone M S. D-Amino acid oxidase: new findings. *Cell Mol Life Sci*, 2000, **57** (2): 1732~1747
- 6 Wang Y X, Poon C I, Pang C C. *In vitro* and *ex vivo* inhibitory effects of L- and D-enantiomers of N<sup>G</sup>-nitro-arginine on endothelium-dependent relaxation of rat aorta. *J Pharmacol Exp Ther*, 1993, **265** (3): 112~119
- 7 Nohara Y, Suzuki J, Kinoshita T, *et al.* Creatinine inhibits D-amino acid oxidase. *Nephron*, 2002, **91** (2): 281~285
- 8 Moses J, Siddiqui A, Silverman P B. Sodium benzoate differentially blocks circling induced by D- and L-dopa in the hemi-parkinsonian rat. *Neurosci Lett*, 1996, **218** (3): 145~148
- 9 Sarower M G, Matsui T, Abe H. Distribution and characteristics of D-amino acid and D-aspartate oxidases in fish tissues. *J Exp Zoolog Part A Comp Exp Biol*, 2003, **295** (2): 151~159
- 10 辛艳飞, 童 睿, 方 扬, 等. 大鼠体内硝基精氨酸的手性代谢动力学. 中国药理学通报, 2005, **21** (1): 38~41  
Xin Y F, Tong R, Fang Y, *et al.* *Chin Pharmacol Bull*, 2005, **21**(1): 38~41
- 11 宫钦嵌, 田世平. 荔枝果皮过氧化酶的纯化与性质研究. 生物化学与生物物理进展, 2002, **29** (6): 891~896  
Gong Q Q, Tian S P. *Prog Biochem Biophys*, 2002, **29**(6): 891~896
- 12 Hasegawa H, Matsukawa T, Shinohara Y, *et al.* Assessment of the metabolic chiral inversion of D-leucine in rat by gas chromatography-mass spectrometry combined with a stable isotope dilution analysis. *Drug Metab Dispos*, 2000, **28** (6): 920~924
- 13 Lehmann W D, Theobald N, Fischer R, *et al.* Stereospecificity of phenylalanine plasma kinetics and hydroxylation in man following oral application of a stable isotope-labelled pseudo-racemic mixture of L- and D-phenylalanine. *Clin Chim Acta*, 1993, **128** (2): 181~198
- 14 Hasegawa H, Matsukawa T, Shinohara Y, *et al.* Role of renal D-amino-acid oxidase in pharmacokinetics of D-leucine. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2004, **287** (1): 160~165
- 15 Wang Y X, Zhou T, Pang C C. Pressor effects of L and D enantiomers of N<sup>G</sup>-nitro-arginine in conscious rats are antagonized by L- but not D-arginine. *Eur J Pharmacol*, 1991, **200** (1): 77~81
- 16 Wang Y X, Poon C I, Yau L C, *et al.* The *in vivo* and *in vitro* vasoconstrictor effects of L and D enantiomers of N<sup>G</sup>-nitro-arginine methyl ester (NAME). *Can Fed Biol Soc*, 1992, **35** (1): 80
- 17 Dolle A. Metabolism of D- and L-[<sup>13</sup>C] alanine in rat liver detected by <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectroscopy *in vivo* and *in vitro*. *NMR Biomed*, 2000, **13** (2): 72~81

## Effects of D-Amino Acid Oxidase on Chiral Inversion of N<sup>G</sup>-nitro-D-arginine\*

XIN Yan-Fei, ZHOU Xiang-Jun\*\*, WANG Yong-Xiang\*\*

(Laboratory of Pharmacology, School of Pharmacy, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200030, China)

**Abstract** N<sup>G</sup>-nitro-D-arginine (D-NNA) produced pressor responses in rats by acting via chiral inversion into N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine (L-NNA), an inhibitor of nitro oxide synthase. The present investigation aimed to study the role of the D-amino acid oxidase (DAAO) in chiral inversion of D-NNA and the relationship between DAAO activities on various D-amino acids and their inversion rate. Benzoate (400 mg/kg) or creatinine (400 mg/kg), two inhibitors of DAAO, blocked D-NNA-induced pressor responses in rats. Furthermore, the addition of the pure DAAO significantly potentiates L-NNA production rate in kidney homogenates by approximately 2-folds. The *in vivo* and *in vitro* results suggested that DAAO plays an essential role in the pressor responses elicited by D-NNA. Moreover, crude DAAO solution from the kidney showed marked selection (the maximal ratio of  $K_{cat}/K_m$  was nearly 15 times) on different D-amino acids that exhibited similar chiral inversion rate *in vivo*, suggesting that other enzymes, such as transaminase, are also required for the entire process of D-NNA chiral inversion.

**Key words** N<sup>G</sup>-nitro-D-arginine (D-NNA), D-amino acid oxidase (DAAO), D-amino acids, chiral inversion

\*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (30472052), Key Research and Development Program (2003AA2Z347A) of The Ministry of Science and Technology of China, and Shanghai Platform Fund (04DZ19214).

\*\*Corresponding author .

ZHOU Xiang-Jun, Tel: 86-21-62932136, E-mail: joezhou@sjtu.edu.cn

WANG Yong-Xiang, Tel: 86-21-62933406, E-mail: yxwang@sjtu.edu.cn

Received: July 28, 2005 Accepted: August 31, 2005