

## Captopril에 의한 폐동맥 내피세포중 활성형 Angiotensin 전환효소의 변화

安炯洙\*

동덕여자대학교 약학대학

(Received October 23, 1992)

### Effects of Captopril on the Active Angiotensin Converting Enzyme at the Pulmonary Endothelial Cells

Hyung Soo Ann\*

College of Pharmacy, Dongduk Women's University, Seoul 136-714, Korea

**Abstract**—The effect of captopril on the lung angiotensin converting enzyme (ACE) was investigated after 3 weeks oral administration (120~160 mg/kg/day) through drinking water in Sprague-Dawley rats. On the <sup>125</sup>I-351A, an ACE inhibitor, binding assay in the isolated perused lungs, the number of ACE molecules at the intrapulmonary endothelial cell surface was significantly decreased ( $p < 0.001$ ), and recovered to the normal level 7 days after discontinuation of captopril treatment. Intrapulmonary conversion ratio of AI to AII was also significantly decreased ( $p < 0.05$ ) in the isolated perused lungs. Bolus intravenous injection of angiotensin I did not showed pressor response in the both of systemic and pulmonary blood pressure of the anesthetized rats. ACE activity of the lung homogenates was also significantly reduced. These data consistently indicate the decrease of functionally active ACE molecule at the pulmonary artery after chronic captopril treatment. However, serum ACE activity was increased three fold in captopril treated rats compared to the normal rats. So, these results suggest that the functionally active ACE molecule at the pulmonary artery was still inhibited, which is directly associated with the antihypertensive effects, even if the total angiotensin converting enzyme induction was resulted after chronic captopril treatment.

**Keywords** □ Captopril, angiotensin converting enzyme, pulmonary endothelial cell.

Angiotensin converting enzyme 억제제인 captopril은 여러종류의 고혈압 실험모델에서 강력한 혈압강화작용이 입증되었으며,<sup>1-3)</sup> 이러한 혈압강화 효과의 작용기전은 angiotensin II의 생성억제, bradykinin의 불활성화 억제, prostaglandin의 생성, 교감신경의 흥분 억제 등이 복합적으로 작용하여 말초 세동맥의 저항을 감소시킴으로 혈압강화작용을 초래하는 것으로 제시되고 있다.<sup>4)</sup> 이러한 효과는 결국 angiotensin converting enzyme의 억제에 의한 renin-angioten-

sin계의 억제에 의한 2차적인 결과이다. 따라서 angiotensin converting enzyme에 대한 억제효과가 가장 직접적인 작용 기전으로 고려되어 왔다. 그러나 최근에 captopril 등의 angiotensin converting enzyme 억제제를 3주일 이상 연속적으로 처치시에 흰쥐의 혈청 및 폐조직에서 angiotensin converting enzyme activity가 오히려 증가된다는 효소유도의 결과가 보고되었다.<sup>5-7)</sup> 그러나, 이러한 혈청 및 조직중의 angiotensin converting enzyme activity의 증가에도 불구하고, 외인성의 angiotensin I에 의한 승압반응은 여전히 억제되고 있다.<sup>8)</sup> 또한 Fyhrquist<sup>9)</sup> 등도 spontaneously

\*본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로.

hypertensive rat에게 captopril을 연용시 혈청과 폐 조직중에서 angiotensin converting enzyme activity의 증가가 나타났으나, 혈압강하효과는 지속된다고 보고하였다. 이렇듯 angiotensin converting enzyme activity와 억제제의 혈압강하작용 사이에 일치되지 않는 결과는 다른 혈압강하의 작용기전을 가지고 있을지도 모른다는 가설을 제시해 준다. 그러나 한편 폐조직내에서의 angiotensin converting enzyme activity의 측정치는 혈액의 혼입 등으로 실제적인 폐동맥내의 내피세포에 존재하는 angiotensin converting enzyme activity와는 차이가 있을 수 있다. 이에 본 연구에서는 폐의 관류장치를 이용하여 angiotensin converting enzyme과 1:1로 분자결합을 하는  $^{125}\text{I}$ -351A를 관류시켜 조직에 대한 결합시험을 실시함으로써 폐동맥 내피세포의 표면상에 존재하는 활성형의 angiotensin converting enzyme의 분자수 변화를 직접 측정하고자 하였다.  $^{125}\text{I}$ -351A(MS & D Co. U.S.A.)는 lisinopril의 p-hydroxybenzamide 유도체로서 폐동맥의 내피세포막에서 angiotensin converting enzyme에 대해 매우 높은 친화성을 지녀 안정된 결합을 나타내는 반면에 비특이적 결합은 매우 낮은 새로운 angiotensin converting enzyme 억제제이다.<sup>10-11)</sup>

### 實驗方法

**實驗動物**— 체중 약 220g의 Spraque-Dawley계 숫컷 흰쥐를 사용하여 captopril(Squib Co., U.S.A.)을 1 mg/ml의 농도로 식수중에 용해하여 21일 동안 자유롭게 섭취토록 하였다. 흰쥐 1마리당 하루에 약 30~40 ml의 식수를 마셨으므로 captopril은 약 120~160 mg/kg/day의 용량으로 경구투여한 결과이다. 대조군에는 captopril이 용해되지 않은 식수를 자유롭게 섭취토록 하였다.

**$^{125}\text{I}$ -351A 結合實驗**— 정상적인 흰쥐인 대조군과 3주간 captopril을 투여한 흰쥐를 사용하여 pentobarbital sodium(50 mg/kg, i.p.)로 마취시켰다. 기관지내로 15 G의 끝이 무딘 바늘을 삽입시킨 후, 호흡계(Harvard rodent respirator)를 사용하여 tidal volume; 1 ml/100g, rate; 60회/min, end expiratory pressure; 2.5 cm H<sub>2</sub>O의 조건으로 인공호흡시켰다. 복부를 절개하고 복부대동맥을 절개하여 치사시켰다. 이어서 흉곽을 절개하고 16 G의 끝이 무딘 cannula를 우심

실로부터 폐동맥내로 삽입한 후 좌심방을 절개하였다. 폐는 peristaltic pump를 사용하여 3% albumin과 5 mM glucose가 함유된 Krebs-Ringer bicarbonate buffer(pH 7.4)를 12 ml/min의 속도로 관류시켰다.<sup>12)</sup> 혈액을 완전히 제거시킨 후, 폐를 切除하여 perfusion chamber내에 현수하였다. 폐동맥압과 기도내의 압력을 계속 측정함으로써 폐부종의 생성여부를 관찰하였다.<sup>13)</sup> 약 5분간 안정화시킨 후,  $^{125}\text{I}$ -351A을  $9 \times 10^5$  cpm(specific activity; 약 900 Ci/mmol)을 폐동맥 cannula내로 200  $\mu\text{l}$ 의 용적으로 15초 동안에 주입하였다. 90초 동안의 폐관류액을 15초 간격으로 회수하고, 이어서 폐를 perfusion chamber내로부터 꺼내어 좌측폐만 切除한 후, 6 ml buffer 용액과 함께 homogenizer를 사용하여 균질화시킨 후  $\gamma$ -counter로 방사능치를 측정하였다. 폐혈관내의 활성형 angiotensin converting enzyme의 함량은 다음 식으로 계산하였다.

$$\% = \frac{\text{폐조직중 cpm}}{\text{폐조직중 cpm} + \text{관류액중 cpm}} \times 100$$

또한 좌측폐에 결합된 총  $^{125}\text{I}$ -351A의 함량 및 폐조직의 단위무게(g)당 결합된  $^{125}\text{I}$ -351A의 함량으로 나타내었다.

또한, captopril을 투여중지 후, 1, 3, 7일간의 휴식기간을 준 후에도 앞의 약물투여 직후와 동일한 실험을 실시하여 활성형 angiotensin converting enzyme 분자의 회복여부를 측정하였다.

**$^{125}\text{I}$ -AI의  $^{125}\text{I}$ -AII로의 轉換**— 위와같이 3주간 captopril을 투여한 흰쥐 및 정상대조군의 흰쥐를 사용하여  $^{125}\text{I}$ -AI이  $^{125}\text{I}$ -AII로 전환되는 비율을 Jackson<sup>14)</sup> 등의 방법에 따라 측정하였다. 즉, 위의  $^{125}\text{I}$ -351A 결합실험에서와 같은 방법으로 폐를 현수시킨 후,  $^{125}\text{I}$ -AI 0.21  $\mu\text{Ci}$ (160 fmol)를 폐동맥의 cannula내로 1회 주입하였다. 1분 동안의 폐관류액을 8-hydroxyquinoline과 EDTA를 미리 가하고 냉장 보관시켰던 tube로 취하였다.  $^{125}\text{I}$ -AI,  $^{125}\text{I}$ -AII 및 다른  $^{125}\text{I}$ -대사산물을 고압전류 여지 전기영동법(high voltage paper electrophoresis method)에 의해 전환비율을 측정하였다. 즉, 폐관류액 150  $\mu\text{l}$ 를 whatman 3 mm paper에 점적하고, pyridine-acetate buffer(pH 3.6)에서 90분 동안 4000 V로 전기영동하였다. 여지를 1 mm 간격으로 잘라 counting tube에 넣고 방사능치를  $\mu$ -counter로 측정하였다. Angiotensin I이 angiotensin II로의

전환비율은 다음식으로 계산하였다.

$$\% = \frac{AII}{AI + AII + \text{metabolites}} \times 100$$

비특이적 결합을 측정하기 위해  $^{125}\text{I}$ -AI 단독 뿐만 아니라, AI 1 mol과  $^{124}\text{I}$ -AI을 병용투여하여 동일한 실험을 실시하였다.

또한, 실험중 폐부중 생성여부를 확인하고자 현수가 끝난 폐는 꺼내어 여지로 압착시킨 후 wet 상태에서의 무게와  $80^\circ\text{C}$  에서 72시간 건조시킨 후 dry 상태의 무게를 칭량하여 그 비율을 측정하였다.

**AI 靜脈注射時 昇壓反應**—3주간 captopril을 투여한 흰쥐 및 전상 대조군의 흰쥐를 사용하여 pentobarbital sodium(50 mg/kg, i.p.)으로 마취시킨 후, 기관지를 cannulation하고 호흡계로 인공호흡시켰다. Heparin 이 첨가된 saline 용액으로 채운 polyethylene 10 및 50 크기의 cannula를 좌측 대퇴동맥에 삽입하여 끝이 복부대동맥에 도달하도록 한 후, 다른 쪽의 cannula 끝은 pressure transducer에 연결하여 Grass model TD polygraph를 통해 동맥 혈압의 변화를 관찰하였다. 또한 흉곽을 절개하여 cannula를 우심실을 통해 폐동맥내로 삽입하고, 역시 polygraph를 통해 폐동맥 압의 변화를 측정하였다. AI은 대퇴정맥내로 0.3 ml/kg의 용적으로 10, 30, 100, 300, 1000 mg/kg을 각각 15분 간격으로 주사하고, 전신성 대동맥압 및 폐동맥압의 변화를 측정하였다.

**血清 및 肺組織중 ACE activity**—3주간 captopril을 투여한 흰쥐 및 정상대조군의 흰쥐를 사용하여 斷首한 후, 채혈하였다. 이어서 폐동맥내로 cold-saline을 관류시켜 혈액을 제거한 뒤, 폐를 切除하였다. 폐의 무게를 칭량한 후, phosphate buffer(pH 8.3) 10배의 용적을 사용하여 균질화 시켰다. 20,000 rpm에서 30분간 원심분리하여 상등액을 취하였다. 이어서 Cushman & Chung<sup>15)</sup>의 방법에 따라 L-hippuryl-L-histidyl-L-leucine을 기질로 사용하여 혈청 및 폐조직중의 ACE activity를 측정하였다. 또한, angiotensin converting enzyme의 변화가 특이적인 변화인지 여부를 확인하고자, lactic acid dehydrogenase(LDH) 및 glucose-6-phosphate hydrogenase의 activity를 진단용 kit를 사용하여 spectrophotometry method로 측정하였다. 이때 단백질 함량은 Lowry<sup>16)</sup>법으로 측정하였다.

**통계처리**— 실험결과는 mean  $\pm$  SEM으로 나타내었

으며, unpaired student's t-test를 사용하여 유의성 검정을 하였다.

## 結 果

**$^{125}\text{I}$ -351A 結合實驗**—Captopril을 3주간 경구투여한 흰쥐의 폐동맥에 있어  $^{125}\text{I}$ -351A의 결합율은  $43.6 \pm 0.6\%$ 로서 대조군 흰쥐 폐동맥의 결합율인  $55.6 \pm 1.5\%$ 에 비해 유의성있게( $p < 0.001$ ) 감소되었다(Table I).  $^{125}\text{I}$ -351A의 폐동맥 내피세포내 결합량을 흰쥐당 또는 폐조직 무게당으로 나타낸 경우에도 모두 유의성있게 대조군에 비해 감소되었다.  $^{125}\text{I}$ -351A의 폐혈관내 결합율은 captopril의 투여를 정지한 후 1일 뒤에도 대조군에 비해 유의성있게 감소되었으나( $p < 0.05$ ), 3일 뒤에는 대조군에 비해 유의성있는 차이가 없어졌으며, 7일간 휴식 후에는 대조군과 같이 정상으로 회복되었다. 즉, captopril 투여 직후부터 3주간의 투여 후 1주일간의 휴식기간을 갖는 동안에 있어 angiotensin converting enzyme 억제제인  $^{125}\text{I}$ -351A의 결합량은 대조군에 비해 결코 증가되지 않았다. 비특이적 결합을 알아보기 위해 폐관류액중에  $^{125}\text{I}$ -351A와 동시에 enalaprilat  $10^{-4}\text{M}$ 을 가하여 결합실험을 실시한 바, 주입한  $^{125}\text{I}$ -351A의 1.5%만이 폐조직중에서 측정되었고 나머지 98.5%는 관류액중에서 회수되었다. 이러한 결과는  $^{125}\text{I}$ -351A가 폐혈관내에서 거의 대부분이 특이적 결합을 하고 있음에 나타낸다.

**$^{125}\text{I}$ -AI의  $^{125}\text{I}$ -AII로의 轉換**—현수된 흰쥐의 폐혈관내에서  $^{125}\text{I}$ -AI의  $^{125}\text{I}$ -AII로의 전환율은 Table II와 같다. 즉, captopril을 3주간 경구투여한 경우에 angiotensin I이 angiotensin II로의 전환율은  $58.4 \pm 4.3\%$ 로서 대조군의 전환율인  $72.6 \pm 3.3\%$ 에 비해 유의성있게( $p < 0.05$ ) 낮았다. 한편  $^{125}\text{I}$ -AI의 총 결합을 알아보기 위해  $^{125}\text{I}$ -AI과 동시에 angiotensin I 1 nmol을 함께 가했을 때, captopril 투여군과 정상의 대조군에 있어 angiotensin II로 전환율은 각각  $63.3 \pm 4.0\%$ 와  $72.5 \pm 1.6\%$ 로서  $^{125}\text{I}$ -AI 단독처치시와 유사한 결과를 나타내었다. 이러한 결과는 angiotensin II로의 전환이 특이적 반응으로 이루어지고 있음을 제시한다. 이때, angiotensin I의 대사산물인  $^{125}\text{I}$ -tyrosine metabolite의 함량은 모두 4% 이하이었다.

한편, captopril 투여군에 있어 현수한 폐동맥압은  $15.4 \pm 1.0$  mmHg였으며, 대조군에 있어서도  $15.4 \pm 0.5$

**Table I**—Effect of captopril on intrapulmonary binding activity of 125I-351A (ACE inhibitor) in isolated perfused rat lungs after 3 weeks oral treatment. 125I-351A binding activity was measured at 0, 1, 3 and 7 days after discontinuation of captopril treatment.

Control	Captopril-0 <sup>a</sup>	Captopril-1	Captopril-3	Captopril-7
	% ( $\frac{\text{cpm in lung}}{\text{cpm in lung + effluent}}$ ) <sup>b</sup>			
55.6 ± 1.5	43.6 ± 0.6***	48.3 ± 1.3*	49.8 ± 1.9	53.7 ± 1.2
	pg 351A lung			
34.6 ± 0.8	27.4 ± 0.6***	32.2 ± 0.9	30.9 ± 0.9*	34.2 ± 0.9
	pg 351A g lung			
29.9 ± 0.6	26.0 ± 0.6*	31.2 ± 1.6	29.0 ± 1.2	30.6 ± 1.4

<sup>a</sup>; The number represents resting days after captopril withdrawal.

<sup>b</sup>; Intrapulmonary binding activity of 125I-351A, which correlated with intravascular ACE content, was expressed as ratio of 125I-351A binding in lung tissue to that in lung tissue plus in effluent.

Each value represents the mean ± S.E. (n=6-7).

\*p<0.05, \*\*\*p<0.001, Significantly different from control.

**Table II**—Effect of captopril on percent conversion of 125I-AI to 125I-AII in isolated perfused rat lungs after 3 weeks oral treatment. 125I-AI alone and 125I-AI plus 1 nmol of unlabeled AI were injected as a bolus into pulmonary artery

		Control	Captopril
125I-AI	Tyrosine	3.0 ± 0.2%	3.9 ± 0.2%*
	AI	24.3 ± 3.3	37.9 ± 4.0*
	AII	72.6 ± 3.3	58.4 ± 4.3*
125I-AI +	Tyrosine	3.5 ± 0.2	3.8 ± 0.2*
	AI	23.9 ± 1.5	33.1 ± 3.9*
	AI (1 nmol)	72.5 ± 1.6	63.3 ± 4.0*

Each value represents the mean ± S.E. (n=9).

\*p<0.05 Significantly different from control.

mmHg로서 유사하였다(Table III). 그러나, angiotensin I 1 nmol을 병용하여 처치한 경우에 있어 폐동맥압의 증가치는 captopril을 투여한 군에 있어서는 36 ± 3% 증가(+5.3 ± 0.3 mmHg)하는데 반해, 대조군의 경우에 있어서는 53 ± 6% 증가(8.5 ± 1.2 mmHg)로서 captopril을 처치한 경우에 있어 폐동맥압의 증가가 유의성있게(p<0.05) 낮았다. 이러한 결과는 captopril을 처치시 angiotensin converting enzyme의 억제효과에 의해 혈관 수축물질인 angiotensin II의 생성이 억제됨으로써 폐동맥압의 승압반응이 억제되

**Table III**—Effect of captopril on body weight, lung weight and pulmonary perfusion change in isolated perfused rat lungs

	unit	Control	Captopril
Body wt.	g	319 ± 11	297 ± 5
Lung dry wt.	mg	249 ± 14	247 ± 13
Ratio of wet/dry wt. in lung		5.95 ± 0.09	5.88 ± 0.13
Perfusion pressure (pp)	mmHg	15.4 ± 0.5	15.4 ± 1.0
Increase in PP <sup>a</sup> after injection of AI(1 nmol)	mmHg	8.5 ± 1.2	5.3 ± 0.3*

<sup>a</sup>; PP represents pulmonary pressure

Each value represents the mean ± S.E. (n=9).

\*p<0.05 Significantly different from control.

있음을 나타낸다.

**AI靜脈注射時 昇壓反應**—Captopril을 3주간 투여한 흰쥐 및 대조군의 흰쥐에게 마취상태하 angiotensin I을 정맥주사시 초래된 전신혈압 및 폐동맥압의 변화는 Fig. 1과 같이 captopril 투여군에 있어 승압반응이 대조군에 비해 유의성있게(p<0.01) 낮았다. 즉, captopril을 3주간 투여한 군에 있어서의 angiotensin I 주사전 전신 동맥압과 폐동맥압은 각각 98.0 ± 9.6 mmHg와 18.6 ± 1.6 mmHg였으며, 대조군에 있어서는 각각 117.7 ± 8.1 mmHg와 18.7 ± 0.8 mmHg로서 서로 간에 유의성있는 차이가 없었다. 또한, 심박수의 변

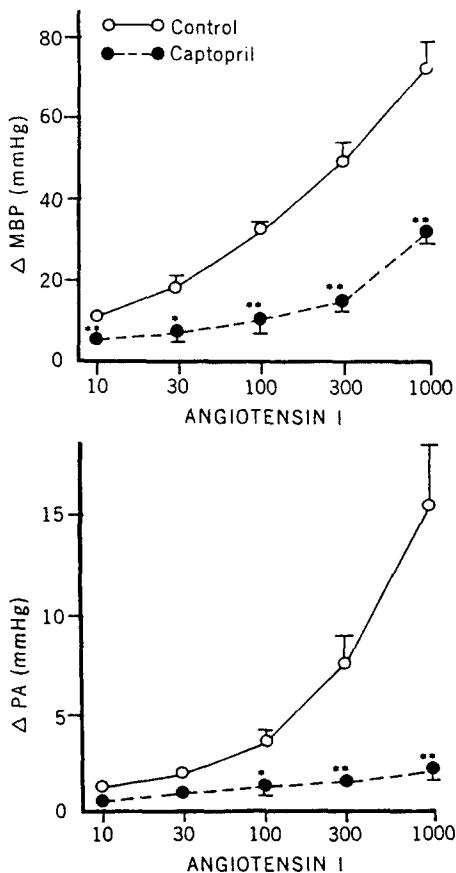
**Table IV**—Effects of captopril on several enzyme activities in serum and lung tissue of rats after 3 weeks captopril treatment

	sample	unit	Control	Captopril
ACE	serum	nmol/ml/min	70.9±9.9	186±17.5***
	lung	nmol/min/mg protein	60.2±6.1	37.1±2.9**
LDH	serum	U/l	294.7±25.6	234.9±19.8
	lung	U/g protein	953.3±67.6	1160.9±46.7
G-6-PDH <sup>a</sup>	blood	U/l	1649±115	1579±110
	lung	U/g protein	85.9±9.4	69.2±4.2

<sup>a</sup>; G-6-PDH represents glucose-6-phosphate dehydrogenase

Each value represents the mean±S.E. (n=8–10).

\*\* p<0.01, \*\*\* <0.001, Significantly different from control.



**Fig. 1**—Effect of captopril on the pressor response of i.v. administered AI in systemic arterial pressure (upper panel) and pulmonary pressure (lower panel) in anesthetised rats.

Each value represents the mean±S.E. (nn=5–6).

\* p<0.05, \*\* p<0.01, Significantly different from control.

화에 있어서도 captopril 투여시  $396 \pm 10$  beats/min 였으며, 대조군에 있어서는  $412 \pm 10$  beats/min로서 역시 유의성 있는 차이가 없었다. 이것은 captopril이 정상적인 흰쥐에게 투여시에는 전신혈압 및 폐동맥 압에 뚜렷한 영향이 없음을 제시한다. 그러나 외인성으로 주입한 angiotensin I 10, 30, 100, 300, 1000 ng/kg 에 대한 전신혈압의 승압반응은 captopril 투여군에 있어 대조군에 비해 모두 유의성있게 억제되었다. 또한, 앞의 적출 현수한 폐를 사용한 실험에서 angiotensin I 관류시 승압반응이 억제되는 것과 마찬가지로, 본 생체실험에서도 역시 captopril 투여군에 있어서도 외인성의 angiotensin I 100, 300, 1000 ng/kg 주사시 초래되는 승압반응이 대조군에 비해 유의성 있게 억제되었다. 이러한 결과는 captopril을 3주간 투여시 활성형의 폐동맥내 angiotensin converting enzyme이 여전히 억제되어 있음을 제시한다.

**血清 및 肺組織중의 ACE activity**—3주간 captopril을 투여한 흰쥐 및 정상적인 대조군 흰쥐의 혈청 및 폐조직중 angiotensin converting enzyme activity 및 기타의 다른 효소인 lactic acid dehydrogenase와 glucose-6-phosphate dehydrogenase의 효소 활성치를 Table IV에 나타내었다. 즉, 혈청중의 angiotensin converting enzyme activity는 captopril 투여군에 있어 대조군보다 약 3배나 증가되는 효소유도효과를 나타내었다. 그러나, 폐조직중에서의 angiotensin converting enzyme activity는 대조군에 비해 여전히 유의성있게(p<0.01) 낮았다.

한편, lactic acid dehydrogenase와 glucose-6-phosphate dehydrogenase의 효소활성은 captopril 투여군과 대조군에 있어 유의성있는 차이가 없었다. 이

러한 결과는 captopril 투여시 초래되는 angiotensin converting enzyme activity의 변화가 특이적 결과임을 나타낸다.

### 考 察

Captopril은 대표적인 angiotensin converting enzyme 억제제로서 enalapril 및 Hoe 498 등과는 달리 조직 및 혈청중에서 angiotensin converting enzyme과 가역적인 결합을 함으로써 보다 쉽게 떨어질 수 있으므로 본 실험에 사용하였다. 또한 생체내에서 angiotensin I의 angiotensin II로의 전환은 주로 폐혈관내의 내피세포막에 존재하는 converting enzyme에 의해 초래되므로 폐혈관의 관류실험 및 폐동맥압의 변화 및 폐조직에서의 angiotensin converting enzyme 변화를 중심으로 측정하였다.

$^{125}\text{I}$ -351A의 결합실험은 angiotensin converting enzyme의 효소활성 측정실험결과는 달리 불활성의 그리고 면역학적으로 교차반응할 수 있는 angiotensin converting enzyme 분자는 측정하지 않는다.<sup>17)</sup> 또한 angiotensin converting enzyme 분자와 1:1로 결합하기 때문에 억제제인 351A의 결합량은 곧 효소의 분자수로 환산될 수 있다. 폐혈관내의  $^{125}\text{I}$ -351A의 결합실험을 captopril 투여 중지 후 0, 1, 3, 7일 후에도 각각 실시함으로써 활성형 angiotensin converting enzyme 분자의 많은 수가 captopril에 의해 점유됨으로써 captopril 투여한 흰쥐의 폐조직중 효소의 농도가 허위로 낮아질 가능성을 제거하였다. 만일 captopril에 의해 허위로 가려졌던 활성형의 angiotensin converting enzyme 분자가 captopril 투여중지시 captopril이 떨어져 나감으로써 기 보고된<sup>5-9)</sup> 바와 같이 효소유도의 효과에 의해 폐조직중 활성형 angiotensin converting enzyme의 분자수도 증가될 것으로 예측했다. 그러나, 본 실험결과는 3주간 투여 직후에 유의성있게 감소되어졌으며, 7일간의 휴약기간에도 불구하고, 서서히 정상치로 회복되었을 뿐, 증가를 가져 오지는 않았다.

한편,  $^{125}\text{I}$ -AI의 전환을 직접적으로 측정하는 실험에 있어서도 captopril을 투여한 군에 있어 억제된 결과를 나타냄으로써 angiotensin converting enzyme의 많은 부분이 captopril과 결합하고 있음을 제시하였으며, 효소유도의 결과는 나타나지 않았다. 또한 생체내에서

모든 활성형의 angiotensin converting enzyme을 간접적으로 나타내는 외인성 angiotensin I에 의한 승압반응이 captopril 투여군의 경우 대조군에 비해 억제됨으로써 본 실험에 사용된 captopril 용량은 angiotensin converting enzyme의 억제에 충분한 용량이었음을 제시해 준다. 기 문헌상 보고된<sup>18)</sup> 바에 의하면 흰쥐의 식수중 0.2 mg/ml 이하의 농도로 용해시에는 효소유도가 나타나지 않는다고 하였는데, 본 실험에서는 1 mg/ml의 농도로서 5배의 고농도를 사용하였다.

한편, 이때 폐동맥압의 변화에 있어 정상 흰쥐에게 captopril을 3주간 투여시에는 변화가 없었으나, in vivo 및 in situ 실험에 있어 외인성의 angiotensin I에 의한 승압반응은 유의성있게 억제하였다. 이러한 결과는 captopril이 연속투여시에 폐고혈압을 억제할 수 있다는 기 임상보고와 일치되는 결과이다<sup>19)</sup>.

끝으로 in vitro 실험으로 직접 효소활성을 폐조직 및 혈청에서 측정하는 바, 폐조직에서는 captopril 투여군의 경우 억제효과를 여전히 나타내었으나, 다만 혈청중에서만은 효소의 활성이 대조군에 비해 증가됨으로써 효소유도 효과를 나타내었다.

이러한 결과는 captopril을 3주간 투여한 흰쥐의 폐를 사용한 in vitro, in situ, in vivo 실험에서 모두 일치되게 angiotensin converting enzyme의 억제를 나타내었으며, 투여를 중지한 후 1주일 뒤에는 정상으로 회복됨을 나타내었다. 따라서 기 문헌상에 보고된<sup>5-7)</sup> captopril을 연속투여시 폐조직중에서도 혈액과 마찬가지로 효소유도효과가 초래된다는 결과와는 일치되지 않는다. 이에 본 실험에서도 혈액에서의 angiotensin converting enzyme activity는 기 문헌상의 보고와 일치되게 약 3배 정도나 증가될 만큼 많은 효소유도 효과가 나타난 점을 고려해 볼 때, 기 실험조작상 폐조직내의 혈액을 완전히 제거하지 않은 상태에서 angiotensin converting enzyme activity를 측정하는 때문인 것으로 추정된다. 이를 제거하기 위해 본 실험에서는 폐를 먼저 cold-saline으로 관류시켜 완전히 혈액을 제거한 후 조직중의 효소를 측정하였다. 따라서, 혈액중의 angiotensin converting enzyme activity의 효소유도효과는 폐혈관내에서의 생성이 증가되었기 때문인 것으로 제시한 기 문헌상의 보고도<sup>5-7)</sup> 맞지 않는 것으로 사료된다. 그러나, 본 실험결과만으로는 혈액중의 효소유도가 어디에서 기인했는지

앞으로 계속 규명해야 할 문제점이며, 다만 분명한 것은 효소억제제인 captopril의 연속투여시 upregulation의 작용에 의해 효소가 혈액중에 증가된다는 것이다. 그러나 이러한 증가된 효소는 captopril의 혈압강화 작용과는 일치되지 않는 점을 고려해 볼 때, 비활성형이며, 폐혈관내 내피세포에 존재하는 angiotensin converting enzyme이 captopril의 혈압강화 작용과 일치되는 활성형의 효소로 고려된다.

결론적으로, 3주 동안 captopril을 경구투여한 흰쥐에 있어 폐혈관 내피세포에서 활성형 angiotensin converting enzyme의 분자수가 감소되며, 투여중지 후 7일 뒤야야 정상으로 회복된다. 반면에 혈액중에는 효소유도 효과에 의해 비활성형의 angiotensin converting enzyme activity의 증가를 초래한다. 따라서, captopril의 혈압강화작용은 혈액중의 비활성형 angiotensin converting enzyme의 억제효과에 기인된 것임을 제시한다.

## 結 論

Angiotensin converting enzyme 억제제인 연용시 폐혈관 내피세포막에 존재하는 활성형 ACE 분자수의 변화를 직접적으로 측정하고자 하였다.

생체내 실험으로 captopril을 120~160 mg/kg/day의 용량으로 3주간 경구투여한 흰쥐를 사용하여 마취상태하 angiotensin I을 1회 정맥주사시 전신동맥압 및 폐동맥압의 승압반응을 측정시 정상 흰쥐에 비해 억제되었다. 또한, 적출한 폐동맥내 관류실험에서도 angiotensin I을 주입시 역시 승압반응이 정상 흰쥐에 비해 억제되었다( $p < 0.05$ ). 한편, 적출한 폐동맥내  $^{125}\text{I}$ -AI을 주입시  $^{125}\text{I}$ -AII로의 전환율도 captopril을 투여한 흰쥐의 경우 정상 흰쥐에 비해 유의성있게 억제되었다( $p < 0.05$ ). 또한, ACE 억제제인  $^{125}\text{I}$ -351A의 직접적인 결합실험에서도 captopril을 투여한 흰쥐의 경우 정상 흰쥐에 비해 유의성있게 억제되었으므로( $p < 0.001$ ), 약물 투여중지 후 7일 뒤야야 정상치로 회복되었다. 끝으로, 시험관내 실험으로 captopril을 투여한 흰쥐의 폐조직에서 ACE activity를 측정시 정상 흰쥐에 비해 유의성있게 억제되었다( $p < 0.01$ ). 반면에, 혈청중의 ACE activity를 측정시 정상 흰쥐에 비해 약 3배나 증가되었다. 이상의 결과는 ACE 억제제인 captopril을 연용시 upregulation 작용에 의해 혈액중의 비활성형

ACE는 증가되지만, 활성을 나타내는 폐혈관 내피세포에 존재하는 ACE 분자수는 감소되며, 이것이 captopril에 의한 강압효과의 작용기전임을 제시한다.

## 感謝의 글

本 論文은 1991年度 教育部 學術研究助成費에 의하여 研究되었습니다.

## 文 獻

- 1) Laffan, J. R., Coldberg, M. E., High, J. P., Schaeffer, T. R., Waugh, M. G. and Rubin B.: Antihypertensive activity in rats of SQ-14, 225, an orally active inhibitor of angiotensin I converting enzyme. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **204**, 281 (1978).
- 2) Yamamoto, K., Funae, Y., Komori, T., Abe, Y., Okahara, T. and Iso, T.: Pharmacological studies on a new converting enzyme inhibitor (YS-980). *Prophylactic approach to hypertensive disease*. Raven Press, New York. 353 (1979).
- 3) Komori, T. and Yamamoto, K.: Effects of YS-980, and orally active converting enzyme inhibitor, on blood pressure in normotensive and hypertensive rats. *Jpn. J. Pharmacol.* **31**, 401 (1981).
- 4) Komori, T., Takada, T. Funae, Y. and Yamamoto, K.: Effects of converting enzyme inhibitors on renin-angiotensin system in normal rats. *Osaka City Medical.* **30**, 17 (1984).
- 5) Forslund, T., Fyhrquist, F., Gornhagen-Riska, C. and Tikkanen, I.: Induction of angiotensin converting enzyme with the ACE inhibitory compound MK 421 in rat lung. *European J. Pharmacol.* **80**, 121 (1982).
- 6) Unger, T., Schull, B., Rascher, W., Lang, E. and Ganten, D.: Selective activation of the converting enzyme inhibitor MK 421 and comparison of its active diacid form with captopril in different tissues of the rat. *Biochem. Pharmacol.* **31**, 3063 (1982).
- 7) Unger, T., Ganten, D., Lang, R. E. and Scholkens, B. A.: Persistent tissue converting enzyme inhibition following chronic treatment with Hoe 498 and MK 421 in spontaneously hypertensive rats. *J. Ca-*

- rdiovasc. Pharmacol.* **7**, 36 (1985).
- 8) Kokubu, T., Ueda, E., Ono, M., Kawabe, T., Hayashi, Y. and Kan, T.: Effects of captopril (SQ 14,225) on the renin-angiotensin-aldosterone system in normal rats. *European J. Pharmacol.* **62**, 269 (1980).
  - 9) Fyhrquist, F., Forslund, T., Tikkanen, I. and Gronhagen-Riska, C.: Induction of angiotensin converting enzyme in rat lung with captopril (SQ 14,225). *European J. Pharmacol.* **57**, 473 (1980).
  - 10) Fyhrquist, F., Tikkanen, I., Gronhagen-Riska, C., Hortling, L. and Hichens, M.: Inhibitor binding assay for angiotensin converting enzyme. *Clin. Chem.* **30**, 696 (1984).
  - 11) Mendelsohn, F. A. O.: Localization of angiotensin converting enzyme in rat forebrain and other tissues by in vitro autoradiography using <sup>125</sup>I labeled MK 351A. *Clin. Exp. Pharm. Physiol.* **11**, 431 (1984).
  - 12) Steinberg, H., Greenwald, A., Moak, A. and Dos, D. K.: Depression of pulmonary 5-hydroxytryptamine uptake by metabolic inhibitors. *Am. J. Physiol.* **228**, 1298 (1975).
  - 13) Fisher, A. B., Didia, C. and Linask, J.: Perfusate composition and edema formation in isolated rat lungs. *Exp. Lung Res.* **12**, 241 (1981).
  - 14) Jackson, R. M., Narkates, J. and Oparil, S.: Impaired pulmonary conversion of angiotensin I to angiotensin II in rats exposed to chronic hypoxia. *J. Appl. Physiol.* **60**, 1121 (1986).
  - 15) Cushman, D. W. and Cheung, H. S.: Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochem. Pharmacol.* **20**, 1637 (1971).
  - 16) Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J.: Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265 (1951).
  - 17) Tikkanen, I., Fyhrquist, F. and Forslund, T.: Inhibitor binding assay of rat serum angiotensin converting enzyme. *Clin. Sci.* **67**, 237 (1984).
  - 18) Forslund, T.: Effect of time and dose on angiotensin converging enzyme during captopril treatment in the rat. *Acta pharmacol. et toxicol.* **52**, 201 (1983).
  - 19) Antonaccio, M. J.: Renin-angiotensin system, converting enzyme, and renin inhibitors. *Cardiovascular pharmacology*. Raven Press, New Yor. 3rd E., 201 (1990).