

ACE 저해활성 측정

이승은[†] · 송진 · 성낙술

작물과학원

I. 서 언

산업화된 국가의 국민은 동물성 지방과 육류, 고열량식의 과다섭취 그리고 채소, 과일과 같은 비타민과 식이섬유 공급원의 섭취 부족으로 인해 여러 가지 퇴행성 성인병에 노출되고 있다. 대표적인 성인병의 하나인 순환기계 질환 특히 심장발작은 2000-2002년 통계에 의하면 우리나라 사망원인 2순위 질환의 주요원인이며 따라서 이에 대한 예방과 치료대책이 필요하다.

ACE(angiotensin I converting enzyme[EC 3.4.15.1])는 혈관과 신장의 근위세뇨관 내피, 심장, 폐, 활성화된 대식세포, 뇌조직 등에서 발견되는 dicarboxy peptidase(Lapointe & Rouleau, 2002)로서 포유류의 혈압 및 수분균형 조절기구인 renin-angiotensin system(RAS)에서 중요한 역할을 한다(Esther *et al.*, 1997). ACE는 RAS system에서 renin에 의해 angiotensinogen으로부터 활성화된 angiotensin I을 angiotensin II로 전환시키는 데, angiotensin II는 계속하여 부신, 혈관평활근세포, 신장, 심장 등에 존재하는 4종의 AT receptor에 작용하며 그 중 AT₁ receptor는 혈관수축, aldosterone과 vasopressin의 방출, 세뇨관의 나트륨 흡수, 신장으로의 혈류량 감소 등을 유발함으로써 심혈관, 신장 및 중추에서 여러 가지 병변을 가져온다(Unger, 2002). 한편 ACE는 kallikrein-kinin system(KKS)에서 B₂ receptor를 통해 혈관확장의 촉진, 혈소판의 흡착 및 평활근세포증식의 저해 기능을 하는 bradykinin을 불활성화하기도 한다(Murphey *et al.*, 2003). 결국 이러한 ACE의 RAS 및 KKS에서의 작용으로 심혈관계에 여러 문제를 유발시키므로 ACE의 작용에 대한 저해물질인 ACE inhibitor는 고혈압뿐만 아니라 만성신장병, 동맥경화, 심장발작과 그로 인한 사망 등을 효과적으로 감소시킬 수 있으며 이러한 효과는 여러 임상실험결과가 뒷받침하고 있다(Thurman *et al.*, 2003; Bakris, 2001).

따라서 국내외의 많은 연구자들에 의한 심혈관 질환 치료제 연구가 이루어지고 있으며 그 중에서도 고혈압 유발과 심장발작을 감소시킬 수 있고 다른 약물에 비해 부작용이 적은 ACE inhibitor 탐색연구가 활발하다(Mark & Davis, 2000).

ACE inhibitory activity의 in vitro 탐색법은 분광광도계를 이용한 Cushman & Cheung의 방법(1971)이나 이를 변형한 방법이 보편적으로 사용되고 있으며 일부 HPLC를 이용한 방법(Meng *et al.*, 1995)이 사용되고 있다.

[†]Corresponding author: (Phone) +82-31-290-6836 (E-mail) lse1003@rda.go.kr

II. 분석방법(Cushman & Cheung의 방법)

1. 원리

기질인 hippuryl-L-histidyl-L-leucine(Hip-His-leu)에 ACE가 작용하여 생성되는 hippuric acid(마노산)를 흡광도로써 정량할 수 있는 데 반응액 중에 ACE inhibitor(시료)가 존재하면 생성되는 hippuric acid의 양은 상대적으로 적을 것이므로 ACE inhibitor가 존재하지 않을 때의 흡광도에 대해 저해율을 산출할 수 있다.

2. 장치 및 기구

- 1) Spectrophotometer(228 nm에서 측정 가능한 것)
- 2) Water bath(37°C)
- 3) 원심분리기(3,000 rpm)
- 4) Vortex mixer
- 5) Dry block bath(혹은 원심농축기)

3. 시약 및 조제법

- 1) 완충액 : 0.05 M $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 135 mL과 0.2 M H_3BO_3 165 mL을 혼합한 후 pH 8.3으로 조정한다.
- 2) 기질용액 : 0.161 g의 Hip-His-Leu(Sigma 제)과 0.70 g의 NaCl을 상기의 완충액 30 mL에 녹이고 pH 8.3으로 조정한다.(이때 기질의 최종농도는 12.5 mM, NaCl의 최종농도는 0.4 M이 된다)
- 3) ACE 용액 : 액체질소 중에서 1 g의 rabbit lung acetone powder(Sigma 제)에 상기의 완충액 10 mL을 가해 균질화시킨 후 12,000 rpm에서 30분간 원심분리하여 상등액을 사용한다. (ACE의 효소단위는 60 mU/mL)
- 4) 1N HCl 용액

4. 실험과정

- 1) 반응액의 조성 : 2.0 mL크기의 vial에 표 1에 나타낸 각 반응액을 만든다.
- 2) 각 반응액을 혼합한 후 37°C의 water bath에서 30분간 반응시킨다.
- 3) Sample 및 control에 1N HCl 250 μL 를 첨가하여 반응을 정지시킨다.
(SB와 CB의 반응액은 반응 전에 미리 첨가하였으므로 생략한다)
- 4) 1.5 mL의 ethylacetate를 첨가한 후 충분히(5분 이상) vortex한다.
- 5) 3,000 rpm에서 15분간 원심분리를 실시한다.
- 6) 상등액 0.5 mL을 취해서 Dry block bath에서, 90°C 1시간(혹은 120°C, 15분)동안

표 1. 반응액의 조성

반응물	반응물의 첨가량 (μL)			
	Sample (S)	Control (C)	Sample blank (SB)	Control blank (CB)
시료 (또는 용매)	시료 50 μL	용매 50 μL	시료 50 μL	용매 50 μL
기질	100 μL	100 μL	100 μL	100 μL
ACE 용액	100 μL	100 μL	100 μL	100 μL
1N HCl 용액	0	0	250 μL	250 μL

ethylacetate를 제거한다(혹은 원심농축기를 사용한다).

- 7) 남은 잔유물을 1.5 mL의 증류수에 1시간 동안 완전히 녹인다.
- 8) 228 nm의 파장에서 흡광도를 측정한다.

5. 계산

$$\text{저해율(\%)} = \frac{(A_c - A_{cb}) - (A_s - A_{sb})}{(A_c - A_{cb})} \times 100$$

(A_c , control의 흡광도; A_{cb} , control blank의 흡광도; A_s , sample의 흡광도; A_{sb} , sample blank의 흡광도)

시료의 ACE 저해율이 50%인 때의 농도를 IC_{50} 으로 나타낼 수 있다. 이를 위해서는 여러 농도에서의 저해율을 산출한 후 농도와 저해율간의 방정식을 구한 후 저해율 50%일 때의 시료 농도를 산술적으로 구하면 된다.

6. 비고

- 1) Control의 경우 시료대신에 시료를 용해하는 데 사용된 용매를 첨가하도록 하였는 데 이는 시료에 따라 용해 가능한 용매가 다를 수 있기 때문이며 따라서 시료가 아닌 용매만으로 나타날 수 있는 흡광도 감소를 고려하여야 할 것이기 때문이다.
- 2) 위에 나타낸 sample blank나 control blank는 대개 생략해도 상관없으나 시료자체가 분석과장에서 높은 흡광도를 가질 경우에는 감안하여 계산하는 것이 더 타당할 것이다.

7. 결과

서론에서 언급한 바와 같이 국내외의 많은 연구자들이 식물자원, 버섯 및 두류와 그 발효식품 등을 비롯한 다양한 자원으로부터 ACE 저해물질을 탐색하고 있다(Hasen *et al.*, 1995; Noh & Song, 2001; Lee *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 1999; Shin *et al.*, 1995). 대표적인 ACE 저해제로는 Captopril이 있으며 이외에도 Quinapril, Enalapril, Lisinopril, Trandolapril, Perindopril,

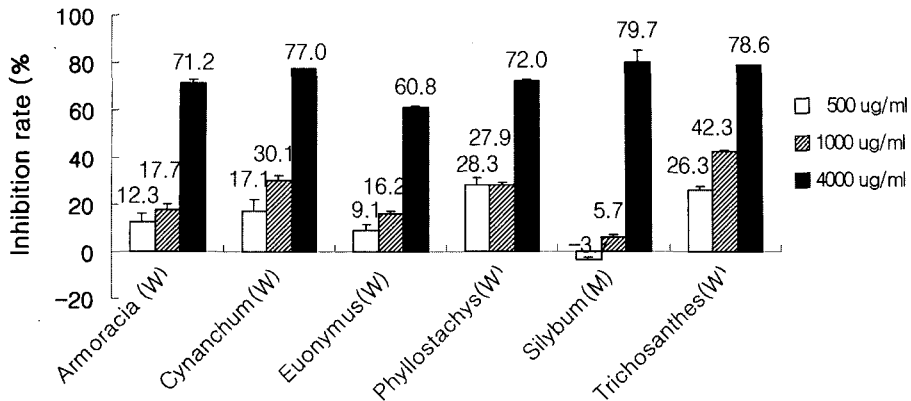


Fig. 1. Inhibitory activity on angiotensin converting enzyme of methanol (M) and aqueous (W) extracts prepared from some medicinal plants at final concentration of 500, 1000 and 4000 µg/ml. (출처, 한국약용작물학회지 12 : 73-78)

Fosinopril, Benazepril, Imidapril 등이 있으나 다소의 부작용을 나타내는 것으로 보고되어 있다 (Mark & Davis, 2000). 따라서 계속하여 부작용이 적고 효과가 우수한 ACE 저해제 탐구노력이 필요하다. 참고로 Fig. 1에 나타낸 식물자원의 ACE 저해활성은 저자가 실험한 연구결과의 일부이다.

참고문헌

1. Bakris G. L. 2001. Angiotensin-converting enzyme inhibition to enhance vascular health-clinical and research models. *Am. J. Hypertension* 14 : 264S-269S.
2. Chushman D. W. and H. S. Cheung. 1971. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochem. Pharmacol.* 20(7) : 1637-1648.
3. Esther C. R., Jr. E. M. Marino, and K. E. Bernstein. 1997. The role of angiotensin-converting enzyme in blood pressure control, renal function, and male fertility. *Trends Endocrinol. Metab.* 8 : 181-186.
4. Hansen K., U. Nyman, U. W. Smitt, A. Adersen, L. Gudiksen, S. Rajasekharan, and P. Pushpangdan. 1995. In vitro screening of traditional medicines for anti-hypertensive effect based on inhibition of the angiotensin converting enzyme(ACE). *J. Ethnopharmacol.* 48 : 43-51.
5. Lapointe N. and J.L. Rouleau. 2002. Activation of vascular tissue angiotensin-converting enzyme(ACE) in heart failure. *J. Am. College of Cardiol.* 39(5) : 776-779.
6. Lee D. H., J. H. Kim, J. S. Park, Y. J. Choi, and J. S. Lee. Isolation and characterization of a novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide derived from the edible mushroom *Tricholoma giganteum*. *Peptides* 25 : 621-627.
7. Lee J. R., D. Y. Kwon, H. K. Shin, and C. B. Yang. 1999. Purification and identification of angiotensin-I converting enzyme inhibitory peptide from kidney bean protein hydrolyzate. *Food Sci. Biotechnol.* 8 : 172-178.

8. Mark K. S. and T. P. Davis. 2000. Stroke : development, prevention and treatment with peptidase inhibitors. *Peptides* 21 : 1965-1973.
9. Meng, Q. C., E. Balcells, L. D. Italia, J. Durand, and S. Oparil. 1995. Sensitive method for quantitation of angiotensin-converting enzyme(ACE) activity in tissue. *Biochem. Pharmacol.* 50(9) : 1445-1450.
10. Murphey L., D. Vaughan, and N. Brown. 2003. Contribution of bradykinin to the cardioprotective effects of ACE inhibitors. *European Heart J. Suppl.* 5(suppl. A) : A37-A41.
11. Noh H. and K. B. Song. 2001. Isolation of an angiotensin converting enzyme inhibitor from *Oenanthe javanica*. *Agric. Chem. Biotechnol.* 44 : 98-99.
12. Shin Z. I., C. W. Ahn, H. S. Nam, H. J. Lee, H. J. Lee, and T. H. Moon. 1995. Fractionation of angiotensin converting enzyme(ACE) inhibitory peptides from soybean paste. *Korean J. Food Sci. Technol.* 27 : 230-234.
13. Thurman J. M. and R. W. Schrier. 2003. Comparative effects of angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin receptor blockers on blood pressure and the kidney. *Am. J. Med.* 114 : 588-598.
14. Unger T. 2002. The role of the renin-angiotensin system in the development of cardiovascular disease. *Am. J. Cardiol.* 89(suppl) : 3A-10A.

Analysis of ACE Inhibitory Activity

Seung-Eun Lee[†] Jin Song and Nak-Sul Seong

*National Institute of Crop Science, R.D.A., Suwon 441-857, Korea
+82-31-290-6836, lse1003@rda.go.kr*