

## 선천성 고혈압 흰쥐에 있어서 혈압반응에 대한 Enalapril의 영향

대구가톨릭병원 내과 및 경북대학교 의과대학 약리학교실\*

허형호 · 손의동 · 김중영 · 배정동

=Abstract=

### Influence of Enalapril on Blood Pressure in Spontaneously Hypertensive Rats

Hyoungho Huh, M.D., Uy Dong Son, Ph. D.,\*

Choong Young Kim, D.M. Sc.,\* Jyung Dong Bae, M.D.,

*Department of Internal Medicine, Daegu Catholic Hospital*

*\*Department of Pharmacology, School of Medicine, Kyungpook National University*

We aimed to evaluate the long term treatment of enalapril on the vascular response in the isolated aorta, and in anesthetized or pithed spontaneously hypertensive rats(SHR).

In the isolated aorta, the increase in tension provoked by addition of KCl 16.7mM was attenuated by enalapril treatment (3mg/kg/day for 6 weeks), whereas the increment by addition of NE 0.1μM tension was not influenced. The frequency-dependent vasoconstriction induced by electrical field stimulation of aorta was also attenuated by enalapril treatment. In pithed SHR, the frequency-related hypertension provoked by electrical stimulation(10sec, 1ms with 40V) of sympathetic preganglionic nerve was also attenuated by enalapril treatment. Neither dose-related vasorelaxation by acetylcholine addition in the aorta nor decrease of DBP by intravenously(i.v.)-injected acetylcholine was altered by enalapril treatment. However, β<sub>2</sub>-agonist, salbutamol-induced vasorelaxation in enalapril-treated group, was more remarkable than that in control group. The hypotension by i.v.-but not by intracerebroventricularly-injected salbutamol strengthened by enalapril treatment.

These results suggest that the suppression of development of hypertension by enalapril treatment may result from the reduction of adrenergic neurotransmission and activity to voltage dependent calcium channel by acting on vascular smooth muscle itself.

**KEY WORDS :** SHR · Enalapril · Hypertension.

서 론

Angiotensin I converting enzyme(ACE)는 체내

에 여러 부위에 분포하고 있고 물리화학적 성상이나 아미노산 배열에 있어서 서로 차이가 있음이 보고되었다<sup>1-4)</sup>. 또한 ACE에 의하여 생성되는 내

인성 angiotensin I의 역할을 봉쇄하였을 때 교감신경계 자극에 의한 심장이나 혈관계 반응성을 억제된다는 보고가 있다<sup>6,7)</sup>.

또한 ACE 억제제는 압수용체 억제하므로써 유발된 고혈압을 방지시킬 수 있으며<sup>8)</sup>, 선천성 고혈압 흰쥐(SHR)에서는 calcium 효현제 투여에 의한 수축반응을 낮출 수 있지만<sup>9)</sup>, 부신피질 홀몬제인 deoxycorticosterone acetate를 장기투여하여 유발된 고혈압에는 효과가 없음<sup>10)</sup>을 미루어 보아서, 고혈압을 억제시키는 기전은 고혈압 유발 기전에 따라 ACE효과가 다르게 작용함을 보여주고 있다. 그리고 ACE 억제제의 장기투여로 선천성 고혈압 흰쥐의 고혈압을 억제할 수 있지만, 급성 투여로는 영향이 없음이 보고되었다<sup>11)</sup>. 이는 ACE의 장기투여의 작용기전이 급성투여에 의해서 나타나는 기전과는 다르다는 것을 시사하고 있다.

따라서 본 실험에서는 ACE 억제제인 enalapril을 생후 6주부터 장기 처치하여 고혈압 형성 억제 유무를 관찰하고, vitro나 vivo 실험에서 혈관수축제와 이완제를 투여하나, 전기자극에 의한 혈관 반응성을 비교 관찰하였다.

## 실험 방법

고혈압 확인 및 실험군 : 본실험은 12주된 웅성인 SHR을 사용하여 실험하였는데, 생후 6주부터 한군은 enalapril을 처치한 군으로 분리하여서 하루체중 kg당 3mg정도를 6주 동안 식수에 타서 자유롭게 먹도록 하였고, 한군은 대조군으로 식수를 자유롭게 먹였고, 성장과정중의 두군간에는 체중이나 식이 섭취량에는 차이가 없었다. SHR의 고혈압 발현 유무는 electrospingmograph coupler를 사용하여(Narco Biosystems) 꼬리동맥의 수축기 혈압을 관찰하여 확인하였다.

적출한 대동맥 실험 : SHR을 목을 잘라 즉사시켜, 흉부 대동맥을 적출하여 조심스럽게 결체조직을 제거하고 4mm의 길이로 ring절편을 만들었다. 이것을 Magnus 관내의 Krebs-Henseleit 용액 중에 현수시키고 혼합가스(95% O<sub>2</sub>와 5% CO<sub>2</sub>)를 계속하여 공급하고 용액의 온도는 37°C로 유지시켰다. Krebs-Henseleit용액 조성은 다음과 같다. NaCl, 115.0; KCL, 4.7' CaCl<sub>2</sub>, 2.5; MgCl, 1.2; Na-

HCO<sub>3</sub>, 25.0; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.2; dextrose, 10.0(mM). 이어서 1gm의 기저장력하에서 120분동안 안정화시킨후 수축반응을 force displacement transducer (Narco Biosystems, Myograph F-60)를 사용하여 physiograph상에 기록하였다(Narco Biosystems, MK IV-PH. 먼저 KCl이나 Noradrenaline 투여로 야기되는 수축반응을 관찰하였다. 그리고 endothelin 존재하에서 acetylcholine이나 salbutamol 측정량을 투여로 야기되는 이완반응을 비교관찰하였다. 전기적인 자극은 stimulator(Narco Biosystems, Model SI-10)를 사용하여 80V로 50ms로 10초 동안 2, 5, 10, 20 HZ로 실시하였다.

생체내 실험 : Urethane 마취(1g/kg)하에서 좌측 경동맥을 혈압측정을 위해서 경정맥은 약물 주입을 위해서 각각 polyethylene tube를 삽입하였다. 혈압은 pressure transducer를 사용하여, 심박동수는 tachograph를 사용하여 그 변화를 측정하여 polygraph(Grass Co., 79E)상아에 묘기하였다. 측뇌실내로 약물 투여를 위해서 stereotaxic instrument (David Co.)를 사용하여 손등<sup>12)</sup>에 의한 방법을 따랐다. 말초적인 효과를 관찰하기위해서 Gillespie등<sup>13)</sup>에 의한 방법을 사용하였는데 강철봉을 사용하여 안와와 대공을 통하여 천추위까지 밀어넣어 휘저어서 중추를 파괴하였다. 즉시 인공호흡기(Narco Biosystems, V5kg)로 100g 당 1ml, 분당 40~50회 정도 인공호흡을 행하였다. 30분 안정화시간을 척수부위에 교감신경유출을 증가시키기 위해서 전기자극(Narco Biosystems, SI-10)을 40V로 1ms, 10초 동안 실시하여 혈압반응을 비교 관찰하였다.

데이터분석 : 각 측정치는 평균치±평균오차로 나타내었으며, SPSS/PC<sup>+</sup> Program를 사용하여 두군간의 Student's t-test나 용량반응 곡선의 차이는 MANOVA(multiple analysys of variance) test로 P값이 0.05 이하인 경우를 유의성이 있는 것으로 판단하였다.

약물 : Endothlin(Peninsula), d-tubocurarine (Sigma), Salbutamol(Sigma), acetylcholine(Sigma), norepinerphrine bitartrate(Sigma)를 사용하였고, Enalapril은 Choongwae회사로 부터 기증 받았다.

## 성 적

적출 대동맥에서 KCl이나 norepinephrine 첨가에 의한 수축반응에 대한 enalapril 영향

그림1에 표시된 것처럼, 대조군과 enalapril 처치군(6주동안 하루kg 당 3mg)의 확장기 혈압과

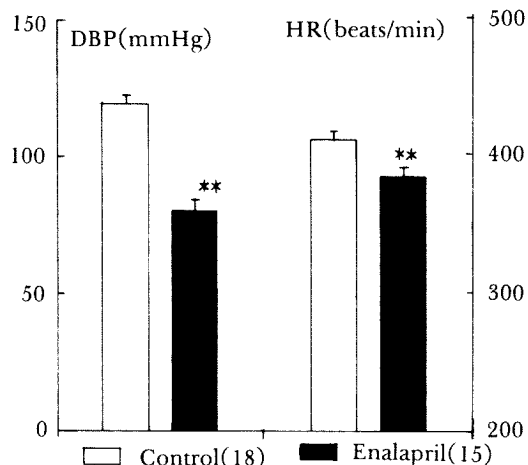
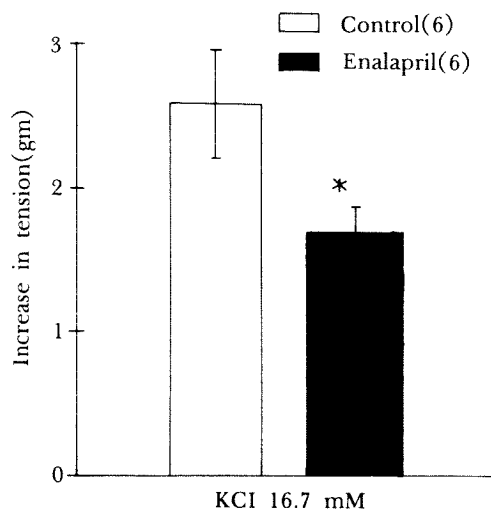


Fig. 1. Resting value of diastolic blood pressure (DBP) and heart rates (HR) in SHR. Enalapril was treated for 6 weeks via tap water (3mg/kg/day). Parentheses indicate experiment cases. Vertical bars mean  $\pm$  S.E. \*\*:  $P < 0.01$  (singnificantly different from control).



심박동수를 비교하였을 시, (확장기 혈압이  $115.9 \pm 3.4$ 에서  $80.2 \pm 3.2$ 로, 심박수는  $410.7 \pm 6.5$ 에서  $383.7 \pm 7.1$ 로 enalapril 처치군에서 감소되어진 상태였다. 그런데 norepinephrine  $\mu$ M 첨가에 의한 혈관 수축반응은 enalapril에 의해서 변화되지 않았으나, KCl 16.7mM투여에 의한 수축반응은 enalapril처치군에서 감소되었다(그림 2). 그림에는 표시되지 아니하였으나 내피세포 제거 시에도 상기한 결과와 같은 경향을 나타내었다.

적출한 대동맥 및 뇌척수 제거한 SHR에서 전기적인 자극반응에 대한 enalapril의 영향.

적출대동맥에 전기적인 자극을 (10sec, 50ms with 80V)가할때 자극빈도수 증가에 따라 장력증가 반응이 나타났는 데(그림 3의 좌측), enalapril 처치군이 대조군에 비하여 현저히 감소되었다( $P < 0.01$ ). 뇌척수제거 환경에서도 척수자극으로(10s, 1ms with 40V)교감신경성 유출 증가에 의한 혈압 상승반응이 대조군에 비하여 enalapril 처치군이 현저히 감소되었다(그림 3의 우측).

Acetylcholine이나 salbutamol처치에 의한 혈관 이완 반응에 대한 enalapril 영향

강력한 혈관 수축제인 endothelin 1.5nM 존재 하에서, acetylcholine 축적용량투여에 의한 혈관 이완반응의 곡선이 enalapril 투여군이나 대조군에서 차이가 없었다(그림 4의 좌측). 마취된 상

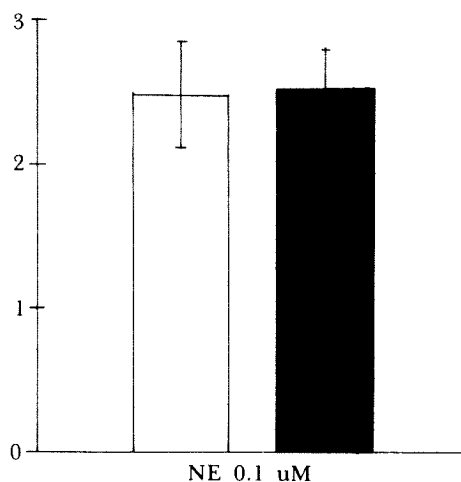


Fig. 2. Increase in tension(g) by KCl or norepinephrine addition in aorta of SHR. Parentheses refer to numbers of rats. \*:  $p < 0.05$  (significantly different from control).

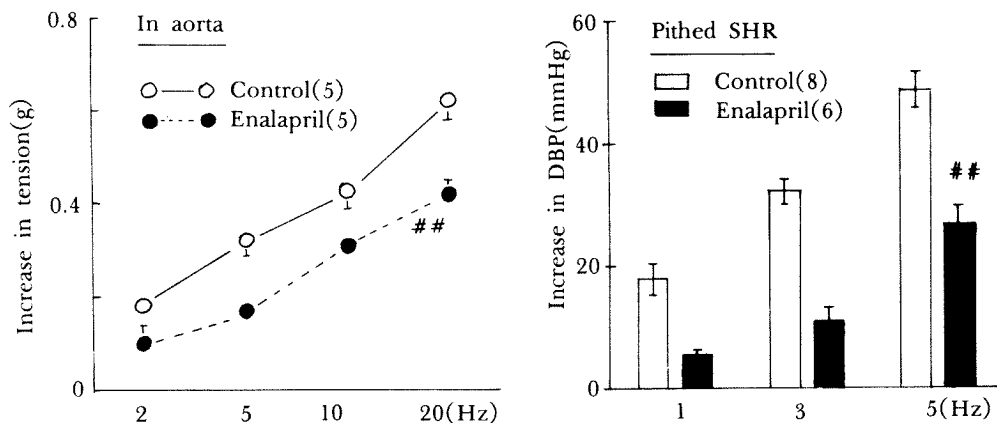


Fig. 3. Influence of enalapril on the increase in tension by electrical field stimulation(EFS' left) in aorta and hypertension by sympathetic stimulation(right) in pithed SHR. Frequency-dependent increase in tension was produced by EFS for 10sec, 50 ms with 80 V, and frequency-dependent hypertension provoked by stimulation of sympathetic outflow for sec, 1 ms with 40 V. ##'  $p < 0.01$  by MNOVA test(diferent from control curve).

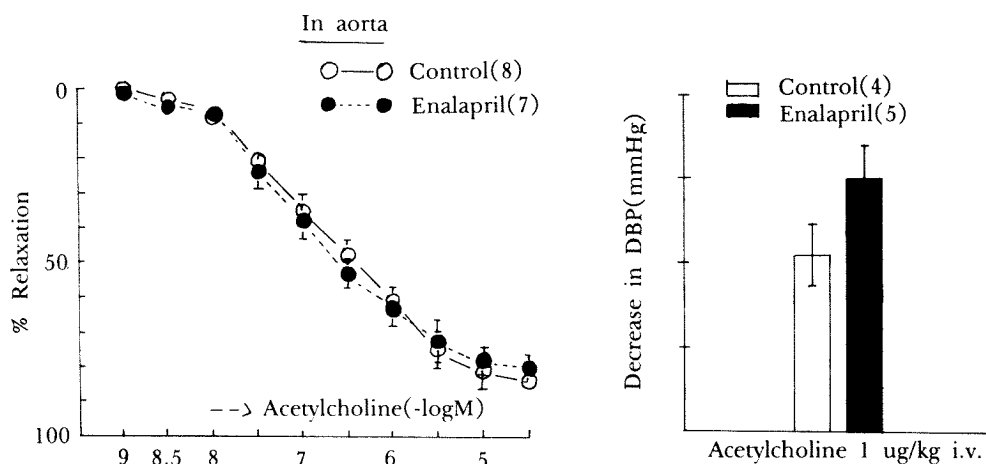


Fig. 4. Cumulative concentration-response curve on the relaxation of aorta(left) in the presence of endothelin and hypotension(right) by acetylcholine in the SHR. Vertical bars indicates mean  $\pm$  S.E. Parentheses refer to numbers of rats. The administration of each dose was left until the response reached a plateau before addition of subsequent acetylcholine.

태에서 정맥내로 acetylcholine을 주사 하여 나타나는 확장기혈압 감소작용도 두군간에 차이가 없었다(그림 4의 우측).

그렇지만 대동맥실험에서  $\beta$ -효현제인 salbutamol 투여에 의한 이완반응의 곡선이 enalapril 투여군에서의 곡선의 경사가 심하여 이완작용이 현

저하였음을 알 수 있었다(그림 5의 좌측). 생체내 실험에서 salbutamol을 측뇌실내로 투여하였을 경우는 두군간에 차이가 없었으며, 정맥투여하였을 경우 enalapril 처치군에서 혈압하강이 현저하였다(그림 5의 우측).

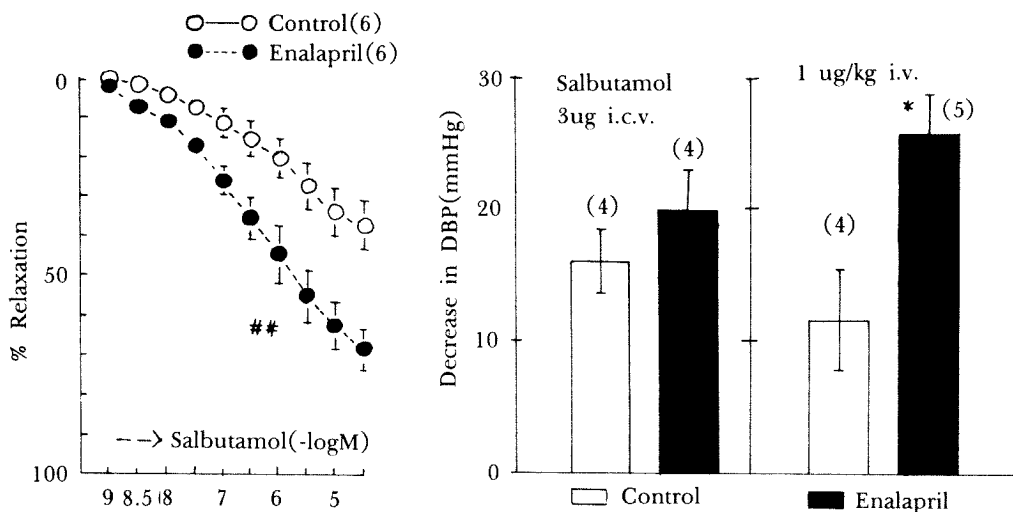


Fig. 5. Cumulative concentration-response curve on the relaxation of aorta(left) in the presence of endothelin and hypotension(right) by salbutamol in SHR. Vertical bars indicates mean±S.E. parentheses refers to numbers of rats. The administration of each dose was left until the response reached a plateau before addition of subsequent salbutamol (left). Decrease in DBP was provoked by intravenously(i.v.) or intracerebroventricularly(i.c.v.)-injected salbutamol(right). ##;  $p < 0.01$  by MNOVA test(different from control curve). \*;  $p < 0.05$ (different from control).

## 고 찰

본 실험에서 ACE억제제인 enalapril처치로 SHR의 고혈압형성을 봉쇄할 수 있었고, 투약중지후의 급단현상은 천천히 일어났다. 이 점은  $\beta$ -봉쇄제나 다른 혈관이완제들은 투약중지 후에 빠른 시간 내에 고혈압의 상태로 회복되었음을 볼 때에<sup>14,15)</sup>, ACE 억제제는 이와는 다르게 혈압하강효과가 오래 지속 됨을 제시 해 준다.

적출한 혈관에서 KCl로 야기되는 수축반응에는 enalapril 처치로 영향을 받으나 norepinephrine 첨가에 의한 수축반응에는 영향이 없었다. 이 사실은 calcium influx가 SHR에서 현저히 증가되어 있으며<sup>16)</sup>, 혈관 평활근에서 세포질 내 calcium 농도가 정상보다는 SHR이나 고혈압 환자에서 높아져 있으며<sup>17,18)</sup>, ACE 억제제에 의한 SHR에서의 평활근의 긴장도 감소는 voltage-dependent calcium channel의 활성화를 저해하여 세포내 calcium 농도가 감소되어 있음에 기인한다고<sup>9,19)</sup>하였는데,

이로 미루어 enalapril은 NE투여에 의한 receptor operated calcium channel 보다는 KCl에 의한 세포막 탈분극에 더욱 민감하게 작용하여 voltage-dependent calcium channel의 기능을 저해시키거나 channel 수를 감소시킬 가능성도 있다고 본다.

전기적인 자극에 의한 적출 대동맥의 수축반응이 enalapril 처치로 약화된 것은 아마도 enalapril이 시냅스전막에서의 교감신경성 신경전달과정에도 영향을 미친것으로 판단되어 질 수 있는데, 이점은 desipramine 투여에 의하여 나타나는 norepinephrine의 neuronal uptake 저해 효과가 고혈압 상태에서는 항진될 수 있는 보고<sup>20,21)</sup>가 있음을 미루어 neuronal uptake과정에서 영향이 있을 가능성이 있는데 이점은 추후연구가 뒤따라야 할 것으로 생각된다. SHR보다는 정상쥐에서  $\alpha_2$ -수용체 흥분으로 매개되는 내인성 음성 되먹이 기전(negative feed back mechanism)이 더 현저하였고<sup>22)</sup> 이러한  $\alpha$ -수용체 매개에 의한 autoinhibition의 약화가 cadmium 장기노출시 야기되는 고혈압상태에서도 나타났다는<sup>23)</sup>는 보고로 미루어, 뇌척수 제거 흰쥐에

있어서도 척수자극으로 교감신경성 유출도 증가시킨 상태에서 enalapril 처치로 혈압상승반응이 약화되었음은, 고혈압 상태에서는 norepinephrine 유리에 대한 자가조절기능이 억제된 결과로 추측되어진다. 한편 기저 혈압치가 대조군과 enalapril 투여군에서 현격한 차이를 보여주고 있기 때문에 enalapril이 말초저항을 저해하였을 가능성을 배제할 수 없다. 그렇지만, 현 단계에서 enalapril의 혈압반응성의 저하가 말초저항성의 감소작용과  $\alpha$  2-수용체의 친화력이나 효능과의 관계를 직접설명하기에는 곤란하다. 이 점은 더 연구가 뒷받침되어야 할 것으로 판단되었다.

Acetylcholine에 의한 혈관이완 효과는 내피세포에서 유리되는 EDRF(endothelium-derived relaxation factor)에 의한다고 알려져 왔다<sup>24)</sup>. EDRF를 유리시키는 다른 약물들은 정상보다는 고혈압상태에서는 혈압하강작용이 약하였음을 나타냈다<sup>25, 26)</sup>. 그러나 본 실험에서 enalapril 투여로 acetylcholine에 의한 혈관이완 효과에는 영향을 주지 않은 것은 enalapril이 혈관 내막에는 영향이 없었던 것으로 보여진다. 이와는 달리  $\beta_2$ -효현제인 salbutamol에 의한 혈관이완효과는 enalapril 처치로 더욱 현저하였다. 이 점은 고혈압상태에서는 혈관계에  $\beta_2$ -수용체의 감수성이 약화되었음을 보여주고 있으나, 측뇌실내로 투여시는 변화가 없는 것으로 보아서 enalapril의 작용점은 충추보다 말초 혈관 부위에 작용함을 알 수 있다.

위 사실을 종합하여 볼 때, enalapril을 생후 6주부터 장기간 처치한 결과 고혈압 발현을 저해하였는데, 이는 혈관 내막 부위보다는 평활근세포 level에 작용하여 voltage dependent calcium channel활성화와 교감신경성 신경전달을 약화에 의하여 야기되었다고 사료되었다.

## 요 약

선천성 고혈압 흰쥐(SHR)에서의 혈압 및 적출 대동맥 반응에 미치는 enalapril장기처치의 영향을 검토하였다.

적출한 대동맥에서 KCl 첨가에 의한 수축반응이 enalapril 처치(하루 kg당 3mg용량으로 6주간)로 약화했으나 norepinephrine 첨가에 의한 수축반

응에는 영향이 없었다. 대동맥의 전기적인 반응에 의한 혈관 수축반응이 enalapril 처치로 약화되었다. 뇌척수 제거 흰쥐에서도, 교감신경성 유출증가로 인한 혈압 상승효과가 enalapril 처치로 약화되었다. Acetylcholine 정맥주사에 의한 혈압 하강효과나 대동맥에서의 축적용량으로 첨가에 의한 혈관이완 효과가 두군 간에는 차이가 없었다. 그렇지만  $\beta_2$ -수용체 효현제인 salbutamol 정맥주사에 의한 혈압 하강효과나 대동맥에서의 축적용량 투여에 의한 혈관이완 효과는 대조군에 비해서 enalapril 처치군에서 더욱 현저하였다.

이상의 결과로 미루어보아서 enalapril은 혈관 평활근세포에 작용하여 voltage-dependent calcium channel활성화와 교감성 신경전달을 감소시키는 데에 의해서 SHR의 고혈압 발현을 억제할 수 있다고 사료된다.

## References

- 1) Strittmatter SM, Thiele EA, Kapiloff MS and Snyder SH : A rat brain isozyme of angiotensin converting enzyme. *J Biol Chem* 260 : 9825, 1985
- 2) Bernstein KE, Martin BM, Bernstein EA, Striker L and Striker G : The isolation of angiotensin converting enzyme cDNA. *J Biol Chem* 260 : 9825, 1988
- 3) Jackson B, Cubela RB, Sakaguchi K and Johnston CI : Characterization of angiotensin converting enzyme (ACE) in the testis and assessment of the in-vivo effects of the angiotensin converting enzyme inhibitor, perindopril. *Endocrinology* 123 : 50, 1988
- 4) Johnston CI, Fabris B, Yamada H, Mendelsohn FAO, Cubela R, Sivell D and Jacken B : Comparative studies of tissue inhibition by angiotensin converting enzyme inhibitors. *J Hypert* 7(suppl 5) : S11, 1989
- 5) Unger T, Badoer E, Ganten D, Lang RE and Retting R : Brain angiotensin : pathway and pharmacology. *Circulation* 77(suppl 1) : 140, 1988
- 6) Antonaccio MJ and Kerwin L : Pre- and postjunctional inhibition of vascular sympathetic function by captopril in SHR. *Hypertension* 3(suppl 1) : 154, 1981
- 7) Xiang JZ, Scholkens BA, Ganten D and Unger T : Effect of sympathetetic nerve stimulation are

- attenuated by the converting enzyme inhibitor HOE 409 in isolated rabbit hearts. *Clin Exp Hypertens* 6 : 1853, 1984
- 8) Longo VL, Farah VMM, Gutierrez MA and Krieger EM : Attenuation of neurogenic hypertension by chronic converting enzyme inhibition. *J Hypertension* 7(suppl 16) : S44, 1989
  - 9) Sada T, Koike H and Miyamoto M : Long-term inhibition of angiotensin converting enzyme suppresses calcium channel agonist-induced contraction of aorta in the hypertensive rats. *Hypertension*, 14 : 652, 1989
  - 10) Douglas BH, Langford HC and Mccaa RE : Response of mineralocorticoid hypertensive animals to an angiotensin I-converting enzyme inhibitor. *Proc Soc Exp Biol Med.* 161 : 86, 1979
  - 11) Laffan RJ, Goldberg ME, High JP, Schaeffer TR, Waugh MH and Rubin B : Antihypertensive activity in rats of SQ 14,255, an orally active inhibitor of angiotensin I-converting enzyme. *J Pharmacol Exp Ther* 204 : 281, 1978
  - 12) Sohn UD, Kim CY and Huh IH : Effect of imipramine or ECS  $\beta_1$  and  $\beta_2$  receptor sensitivity in the cardiovascular response of rats. *Arch Pharm Res* 12 : 282, 1989
  - 13) Gillespie JS, Marclaren A and Pollock D : A method of stimulating different segment of the autonomic outflow from the spinal column to various organs in the pithed cat and rats. *Br J Pharmacol* 40 : 257, 1970
  - 14) Nyborg N and Mulvany MJ : Lack of effect of antihypertensive treatment with felodipine on cardiovascular structure of young spontaneously hypertensive rats. *Cardiovasc Res* 19 : 528, 1985
  - 15) Christensen KL, Jespersen LT and Mulvany MJ : Development of blood pressure in spontaneously hypertensive after withdrawal of long-term treatment related to vascular structure. *J Hypertension* 7 : 83, 1989
  - 16) Dominiczak AF and Bohr DF : Vascular smooth muscle in hypertension. *J Hypert* 7(suppl 4) S 107, 1989
  - 17) Bruschi G, Bruschi ME, Caroppo M, Orlandini G, Spaggiari Mand Cavatorta A : Cytoplasmic free  $[Ca_2 +]$  is increased in the platelets of spontaneously hypertensive rats and essential hypertensive patients. *Clin Sci* 68 : 179, 1985
  - 18) Cooper RS, Shamsi N and Katz S : Intracellular calcium and sodium in hypertensive patients. *Hypertension* 9 : 224, 1987
  - 19) Sada T, Koike H, Ikeda M, Sato K, Ozaki H and Karaki H : Cytosolic free calcium of aorta in hypertensive rats. Chronic inhibition of angiotensin converting enzyme. *Hypertension* 16 : 245, 1990
  - 20) Dyke AC and Angus JA : Comparative assay of neuronal uptake and autoinhibitory feedback in guinea-pig and rat atria. *J Auto Pharmacol* 8 : 217, 1988
  - 21) Esler M, Jackman GP, Bobic A, Leonard P, Kelleher D, Skews H, Jennings G and Korner PI : Norepinephrine kinetics in essential hypertension. Defective neuronal uptake of norepinephrine in some patients. *Hypertension* 3 : 149, 1981
  - 22) de Jonge A, Santing PN, Timmermans, PBMWM and Van Zwieten, PA : Effect of age on the prejunctional  $\alpha$ -adrenoceptor-mediated feedback in the heart of spontaneously hypertensive rats and normotensive Wistar Kyoto rats : Evidence for a physiological role of prejunctional  $\alpha_2$ -adrenoceptors, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 323 : 33, 1983
  - 23) Hong KW, Rhim BY and Sohn UP : Chronic cadmium administration preferentially affects the responsiveness mediated by pre- and post-synaptic  $\alpha_2$ -adrenoceptor. *Kor J Pharmacol* 21 : 27-34, 1985
  - 24) Furchgott RJ, Zawadzki JV : The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 286 : 373, 1980
  - 25) Winquist RJ, Bunting PB, Vaskin, EP and Wallace, AA : Decreased endothelium-dependent relaxation in New Zealand genetic hypertensive rats. *J Hypertension* 2 : 541, 1984
  - 26) Lockette WE, Otsuha Y and Carretero OA : Endothelium-dependent relaxation in hypertension. *Hypertension* 7 : 843(abstract), 1985