

血管紧张素转换酶的结构功能及相关抑制剂

赵钰岚, 许传莲

浙江理工大学生命科学学院, 杭州 310018

摘要: 血管紧张素转化酶(angiotensin converting enzyme, ACE, EC 3.4.15.1)是一种位于细胞膜上, 依赖锌离子的羧二肽酶, 催化水解十肽血管紧张素 I 羧基末端两个氨基酸, 生成具有血管收缩作用的八肽血管紧张素 II。ACE 在血压调节系统 renin - angiotensin system (RAS 系统)中具有重要作用, 从 ACE 的结构功能、基因多态性及其抑制剂等方面进行了详细综述。发现体细胞 ACE 两个活性中心催化血管紧张素 I 和缓激肽的机制不同, 因此以体细胞 ACE 单个活性中心为靶点的研究, 将会为研制开发副作用更少, 安全性更高的 ACE 抑制剂提供新的途径。

关键词: 血管紧张素转化酶, 结构功能, 基因多态性, 抑制剂

Structure and Function of Angiotensin Converting Enzyme and Its Inhibitors

Yulan Zhao, and Chuanlian Xu

College of Life Sciences, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China

Abstract: Angiotensin converting enzyme (ACE, EC 3.4.15.1) is a membrane-bound, zinc dependent dipeptidase that catalyzes the conversion of the decapeptide angiotensin I to the potent vasopressor octapeptide angiotensin II, by removing two C-terminal amino acids. ACE is well known as a key part of the renin angiotensin system that regulates blood pressure, and its inhibitors have potential for the treatment of hypertension. This paper reviewed the characteristics of ACE in aspects of its structure-function relationship, gene polymorphism and inhibitor development. In particular, the catalytic mechanisms of the two active sites of somatic ACE in the cleavage of angiotensin I and bradykin are different. Therefore, it would likely provide a new way for exploiting novel ACE inhibitors with fewer side-effects by specifically-targeting the individual active sites of somatic ACE.

Keywords: angiotensin converting enzyme, structure and function, gene polymorphism, inhibitor

血管紧张素转化酶(angiotensin converting enzyme, ACE, EC 3.4.15.1)是一种哺乳动物组织中普遍存在的 Zn^{2+} 依赖型羧二肽酶, 为膜整合的单链糖蛋白。通过肾素-血管紧张素系统 RAS(rennin-angiotensin system)和激肽释放酶-激肽系统, ACE 对血压、电解质和体液平衡、心血管系统发育和结构重塑起重要调节作用, 而其抑制剂已成功地作为治疗高血压的一线药物应

用于临床。近年来, 人们已寻找和研制出了一系列新的 ACE 抑制药, 如 Captopril, Enalapril, Lisinopril 等。虽然这些药物经临床应用都有较好的降压效果, 但长期服用这些合成药物, 会出现一定的毒副作用, 如干咳, 性欲减退等。为研究高安全性的天然降压药物筛选工作, 需要对 ACE 的性质有更深入的了解。本文将对 ACE 的结构功能、基因多态性及其抑

Received: May 21, 2007; Accepted: July 10, 2007

Corresponding author: Chuanlian Xu. Tel: +86-571-86843566; Fax: +86-571-86843335; E-mail: chuanlianxu@163.com

制剂等方面的研究进展做较为详尽的介绍。

1 ACE 的结构与功能

1.1 ACE 的分子结构

人体内 ACE 以三种形式存在, 它们是同一个基因的不同剪接产物。异构体 1 在各种组织中普遍存在, 称为体细胞 ACE(somatic ACE, sACE), 含有 1306 个氨基酸残基。异构体 2 和异构体 3 表达于睾丸组织和成熟的精子细胞中, 称为睾丸 ACE(testic ACE, tACE), 分别含有 732 个氨基酸残基和 739 个氨基酸残基。

分子量为 149.723 kD 的 sACE 在结构上由 N 端信号肽(1-30 aa)、两个同源的催化活性中心(N-catalytic domain 和 C-catalytic domain)、亲脂跨膜区(1257-1276 aa)和细胞内结构域组成。膜外侧第 1232 个氨基酸残基处存在一个金属分泌酶的酶切位点, 酶切后失去 C 末端的 ACE 分泌进入血浆, 成为可溶状态, 因此根据它们的存在状态又分为组织型 ACE(tissue ACE)和血浆型 ACE(plasma ACE)。组织型 ACE 通过跨膜结构域锚定在组织细胞膜上, 而血浆型 ACE 又被称为可溶性 ACE(soluble ACE)。与 sACE 不同的是, tACE 只含有单个催化活性中心, 其中异构体 2 分子量为 80.073 kD, N 端信号肽为(1-31 aa), 除了信号肽与 N 端稍有差异, 从第 68 个氨基酸残基开始, 其氨基酸序列与 sACE 完全相同^[1,2]。异构体 3 分子量为 83.989 kD, N 端序列与异构体 2 完全相同, 但第 657 个氨基酸开始由于移码带来 C 端有所差异。

1.2 ACE 的 mRNA 选择性剪切

ACE 转录子分子上的差异根源于同一个基因不同剪切方式和终止位点。编码 ACE 的基因位于染色体 17 q23 座位, 约 21 kb, 由 26 个外显子和 25 个内含子组成, 其表达产物 sACE 和 tACE 是同一个基因选择不同启动子转录表达的结果^[3], 它们导致 ACE 在 N 端的不同。sACE 的启动子在第一个外显子的 5' 上游, 由此翻译外显子 1~12 和 14~26。tACE 的启动子存在于第 12 号内含子中, 翻译外显子 13~26。除了启动子不同, 这个基因的终止密码子下游还具有两个选择性多聚腺嘌呤位点, 两者相距 628 bp, tACE 使用前一个多聚腺嘌呤位点, sACE 使用后一个多聚腺嘌呤位点^[4]。从 ACE 基因结构分析, sACE

两个催化活性中心无论在序列上还是外显子组成上, 都十分相似(分别为外显子 4~11 和 17~24), 都含有一个供锌离子结合的保守序列(HEGMH), 因此推测它们来源于同一个基因片段的复制^[5,6]。

1.3 ACE 的组织分布

Harmer *et al*(2002)通过定量 RT-PCR 发现 ACE 存在于被检测的 72 种组织中, 在回肠、空肠、十二指肠、睾丸、肺、肺血管和前列腺中具有高量表达。sACE 在人体绝大部分组织中均有表达。而 tACE 只在睾丸中发现, 并受激素调控, 只在青春期表达。sACE 与 tACE 是同一个基因在不同组织特定发育阶段的表达产物, 显然, ACE 的组织特异性和时序特异性暗示着它们行使特定生物学功能^[7]。

1.4 ACE 的生物学功能

在 Zn^{2+} 存在的条件下, ACE 水解十肽血管紧张素 I(angiotensin I, Ang I)中 Phe⁸-His⁹ 之间的肽键, 产生八肽血管紧张素 II(Ang II)和羧基端的二肽 His-Leu。血管紧张素 II 是目前研究发现最强的收缩血管物质之一, 作用于血管紧张素受体 1, 收缩血管平滑肌, 刺激醛固酮分泌, 促进人体肾脏对 Na^{+} 、 K^{+} 重吸收, 引起钠贮量和血容量的增加, 从而导致血压升高, 对于心脏具有正性肌力作用和变时作用; 同时, ACE 还水解血管舒张剂-缓激肽羧基末端两个氨基酸, 钝化其扩张血管的生物活性, 被称为激肽水解酶 2。除了底物血管紧张素 I 和缓激肽外, ACE 还可以水解多种血管活性肽, 如脑啡肽、P 物质、神经降压素等, 体外实验证明其能水解 Alzheimer 症中过量表达的淀粉样蛋白^[8]。

Kondoh *et al*(2005)在研究睾丸生殖细胞中的 tACE 时, 发现 ACE 除了具有肽酶活性外, 还具有水解糖苷键释放 GPI 锚定蛋白的糖苷酶活性, 被认为是 GPI 锚定蛋白的释放因子。敲除 ACE 基因的精子会因此失去与卵子结合的能力^[9]。

2 ACE 的基因多态性与疾病

最近研究发现 ACE 基因型 *ID/DD* 与心血管疾病的发生和发展有着密切联系。ACE 的基因多态性涉及靠近 3' 端第 16 号内含子中的一个 287 bp Alu 重复序列的插入/缺失(*I/D*), 与循环系统中的血浆 ACE 浓度水平有关, *DD* 基因型的血浆 ACE 活性约是 *II* 基因型的两倍, 因此, ACE 多态性被认为与高血压、

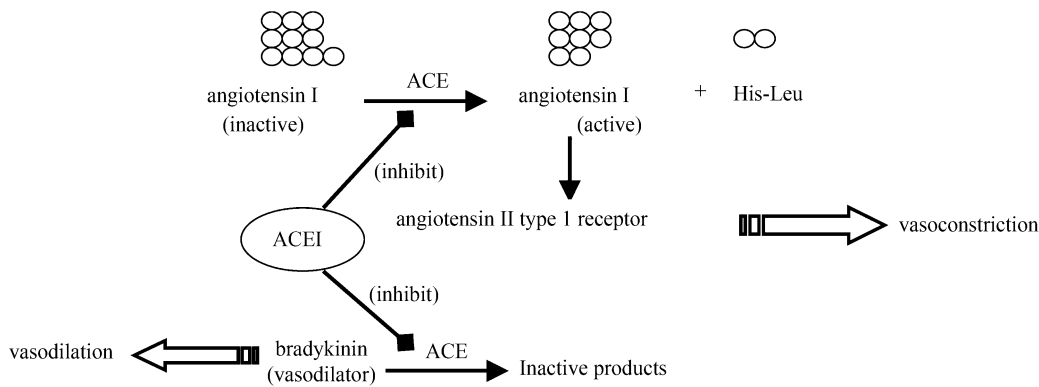


图 1 血管紧张素转化酶及其抑制剂在 RAS 系统中的作用

Fig. 1 The role of ACE and its inhibitor in the renin-angiotensin system

ACE: angiotensin converting enzyme

ACEI: angiotensin converting enzyme inhibitor

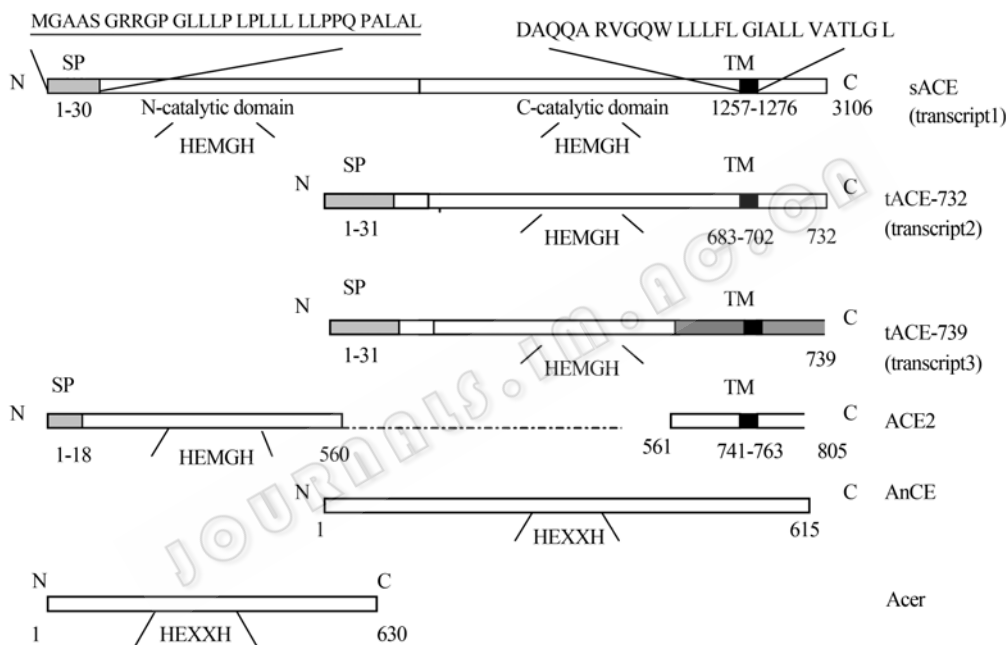


图 2 人 sACE, tACE, ACE2, 果蝇 AnCE 和 Acer 结构示意图

Fig. 2 Schematic drawing of human somatic ACE, testis ACE, ACE2, *Drosophila* AnCE, and *Drosophila* Acer

The sequence of tACE is identical to that of the C-domain of sACE, except for its first 36 residues. Human sACE and tACE-732 have the same carboxy-terminal transmembrane and cytosolic sequences, while tACE-732 and tACE-739 have the same amine-terminal and a distinct transmembrane and cytosolic sequences. None of the *Drosophila* AnCE and Acer has a membrane-anchoring sequence. The carboxyl end of ACE2 is homologous to collectin, a nonzymatic protein associated with renal injury. N: amine-terminus; C: carboxy -terminus; SP: signal peptide; TM: transmembrane domain; HEMGH: the locations of the active-site zinc-binding motif; HEXXH: the locations of the active-site zinc-binding motif

心血管疾病、左心室肥厚、心肌梗塞、糖尿病肾病等相关联，是许多心血管疾病的风险因子^[10]。缺失了 Alu 序列的等位基因 D 与高血压等心血管疾病之间的相关性在非-美、中国、日本、孟加拉国和土耳其地区人群中得到了证实，同时还受人群背景的差异、生活环境等因素的影响。Morshed *et al* (2002) 研究孟加拉国高血压人群与 I/D 基因多态性发现：

在三个不同的基因型中，DD 基因型具有最大值的平均收缩压和平均舒张压，II 基因型的平均收缩压和平均舒张压最小($P<0.01$)。这种多态性与高血压的联系还具有性别差异性，DD 基因型与男性高血压患者的联系要比 DD 基因型与女性患者的联系更为紧密，可能是女性体内的雌性激素在对抗高血压方面具有保护作用，并且这种性别差异在年轻个体中较年长

个体显著^[10, 11]。ACE 能够降解缓激肽并钝化其活性, 而缓激肽能够刺激表皮细胞产生组织血纤维蛋白溶酶原激活剂(tPA), 大量研究表明, ACE 抑制剂因为能够保留缓激肽对 tPA 的刺激, 从而减少心肌梗塞的发生。因此在 I/D 多态性与冠状动脉血栓形成的研究中证实, DD 基因型因具有较高水平 ACE 活性, 能够抑制缓激肽诱导 tPA 释放, 较易诱发血栓形成和心肌梗塞^[12, 13]。

3 M2 家族

ACE 高度同源的结构域显示它们来源于同一个祖先基因。目前, 在黑猩猩、牛、兔、小鼠、鸡、金鱼、电鳗、家蝇、蚊子、骚扰血蝇、家蚕、黑腹果蝇以及黄单胞菌和沙雷菌等其他物种中均发现了此 ACE-like 蛋白酶的存在。ACE 和其这些同源物组成了 M2 糖锌家族。黑腹果蝇(*D.melanogaster*)中发现一个 615 个氨基酸残基组成的 ACE-like 蛋白(AnCE)。其催化活性和人 sACE 的 C-结构域具有类似的性质。Acer 是在黑腹果蝇中找到的第二个与 ACE 相关的蛋白酶, 而其催化活性与人 sACE 的 N-结构域更加类似。与 sACE 不同的是, AnCE 和 Acer 是单结构域酶分子, 没有羧基端锚定于细胞膜上的疏水性氨基酸序列, 属于分泌型胞外酶。Acer 和 AnCE 具有不同的生理功能先后表达于黑腹果蝇蛹的发育过程。此后, 在果蝇 2 号染色体 *Adh* 区域又找到 4 个 ACE-like 基因。可见 AnCE 和 Acer 更能反映出同时存在于原肢类和后口类的祖先基因结构, 进一步表明哺乳动物 ACE 的基因复制先于系统分支^[7, 14, 15]。

在人体内, 最近找到第一个与人 ACE 同源的酶, 被命名为 ACE2 或 ACEH。ACE2 是一个 805 个氨基酸残基组成的 Zn^{2+} 依赖型羧肽酶, 由一个 N 端疏水信号肽(aa1-18)、一个催化活性中心(aa147-555)和一个亲脂跨膜区(aa740-763)组成, 近膜外侧具有酶切位点, 可分泌出游离的胞外酶。氨基酸序列比对中, ACE2 与 ACE 的两个活性中心具有 42% 相同性和 61% 相似性; 与 tACE 有 33% 的氨基酸完全相同。ACE2 的表达具有组织特异性, 仅在心脏、肾和睾丸中有表达; 主要分布于冠状动脉内皮细胞、血管平滑肌细胞肾小管上皮细胞。ACE2 水解 Ang I 羧基末端的 Leu 生成 Ang1-9 或 Ang II 羧基末端的 Phe 生

成 ANG1-7。生成的 ANG1-9 又可在 ACE 作用下水解羧基末端两个氨基酸产生具有血管舒张作用的 ANG1-7^[16]。因此 ANG1-9 又是 ACE 的选择性抑制剂, 调节 ACE 的血管收缩作用。除了 Ang I 和 Ang II, ACE2 的底物还可以是神经降压素, kinetensin, des-Arg 缓激肽。但是不能水解缓激肽和 Hip-His-Leu 三肽。ACE2 与 ACE 具有不同的底物选择性, ACE2 不能被 ACE 抑制剂如 captopril, lisinopril 或者 enalaprilat 抑制活性, 它们在复杂而精致的体内调控中具有不同的生理功能。ACE2 的基因定位于 Xp22, 具有性别特异性, 暗示 RAS 和心血管生理中表现的性别差异可能与 ACE2 有关^[17]。

ACE2 一直被认为在心血管生理调节中发挥重要作用, 最近鉴定出 ACE2 还是 SARS 病毒感染细胞的膜受体, 阻断 SARS 病毒的 S 蛋白与 ACE2 受体结合, 就能抑制 SARS 病毒的感染^[18]。SARS 冠状病毒 SARS-CoV 要感染细胞, 必须依赖于其 S 蛋白(spike protein)吸附到细胞膜表面, 而细胞膜表面的 ACE2 正是 SARS-CoV 的功能性受体, 促进了病毒蛋白的融合过程。只要能吸附 ACE2 的抗体或化合物, 可溶性的 ACE2, 都能抑制病毒的感染。Lang *et al* (2006)的研究发现干扰素 γ 和白细胞介素-4 能下调 Vero E6 的 ACE2 受体表达。Ho *et al* (2006)筛选了 312 味中草药发现, 大黄素能抑制 S 蛋白和 Vero E6 上 ACE2 的相互作用^[19, 20]。

4 ACE 抑制剂(ACE inhibitor, ACEI)

血管紧张素转换酶已成为降血压药物筛选的靶点。有几种蛇毒对 ACE 有良好的抑制作用。9 肽化合物(SQ20881)具有明显的降压作用, 但其只能注射, 口服无效, 药用价值受到很大的限制。由于 ACE 与羧肽酶 A 具有高级结构相似性, 而 L-苄基琥珀酸是羧肽酶 A 的强抑制剂, 设计了 ACE 抑制剂的分子模型——琥珀酰氨基酸。考虑到已经发现的 ACE 天然多肽抑制剂(如蛇毒)中, C-端氨基酸都是脯氨酸, 所以, 琥珀酰脯氨酸作为第一个目标化合物被合成并对它的生理活性进行了系统的研究。随后, 又对该化合物的结构作了进一步的改造和修饰, 最终发现了一种比较理想的非多肽类口服抗高血压新药卡托普利, 在此结构基础上, 进一步合成两种口服抗高血压新药依那普利和赖诺普利^[21, 22]。

ACEI 能抑制心肌、肾脏、血管壁上的 ACE 活性,除了降压,还具有抑制心肌和血管肥厚的作用,显著改善慢性心力衰竭患者的自主神经活性及自主性平衡,这种作用在日间时段尤为明显。最初作为血管扩张剂的 ACEI,还可能与其抑制内分泌,心脏组织旁分泌和自分泌有关,从而抑制心肌和细胞肥厚和减弱心肌纤维化,改善心室重塑。因此 ACEI 已不再仅仅被当作降压药使用,而是广泛用于治疗心血管系统、泌尿系统、内分泌系统的多种疾病。许多研究证实,长期使用这类药可明显改善心脏病人的心功能,减少多种肾脏病人的尿蛋白,延缓肾功能衰竭的发生,提高病人生活质量,延长病人的生命期限^[23-25]。

ACEI 不但能减轻 Ang II 引起的血管收缩,同时也抑制了缓激肽等多种底物的水解,使体内缓激肽含量升高,产生干咳等不良反应^[26,27]。目前针对单个活性中心的专一性抑制剂研究可望解决这个问题。RXP407 是 sACE N-结构域的专一性抑制剂,研究发现它可使血浆中天然干细胞调节剂 Ac-D-K-P 的浓度升高,这表明 Ac-D-K-P 为 N-结构域所催化水解, sACE 的两个活性中心存在不同的催化能力^[28]。Georgiadis *et al* (2003)在研究 sACE 两个活性中心催化 Ang I 和缓激肽水解能力时设计了针对 C-结构域的专一性抑制剂 RXPA380。对于缓激肽,无论是组织 ACE 还是血浆 ACE,同时使用 RXP407 和 RXPA380 抑制两个活性中心,出现了最大保留值,抑制其中任何一个活性中心,仅出现一半的保留值,可见, sACE 的两个活性中心都参与了缓激肽的水解,并且两种形式的 ACE 表现一致。对于 Ang I,情况有所不同,要完全阻断循环系统中血浆 ACE 对 Ang I 水解,必须同时抑制其两个活性中心。选择性抑制组织 ACE 的 N-结构域,不影响对 Ang I 水解,选择性抑制其 C-结构域,则可完全阻断 Ang I 的水解。这表明,血浆 sACE 两个活性中心都参与了 Ang I 水解,而组织 sACE 中参与 Ang I 水解的主要是 C-结构域,用 ACE 的 C-结构域抑制剂即可有效调节血压过高现象。不同形式的 sACE(血浆型 ACE 和组织型 ACE),两个催化活性中心显示了不同的催化能力和底物选择性,膜整合 ACE 和血浆 ACE 在活性功能上遵循不同的机制^[27]。Van Esh *et al* (2005)研究证实了 ACE C-结构域抑制剂即可有效阻断 Ang II 引起的血

管收缩,至此为筛选更高安全性的降压药物 ACE 抑制剂提供新方向^[29]。C-结构域专一性抑制剂可有效抑制 Ang II 的生成,又不完全抑制缓激肽的降解,稳定缓激肽浓度,减轻不良反应,是副作用更小,安全性更高的治疗心血管疾病的药物,为新一代药物结构设计指出了新的研究方向。

5 结语与展望

肾素-血管紧张素系统在心脑血管系统的重要作用受到越来越多的关注,血管紧张素转化酶的抑制剂也一直作为治疗高血压,心力衰竭的一线药物。随着新的成员不断发现,机理的研究越来越深入,从最早的肽类抑制剂,到后来的合成小分子,现在的专一性结构域抑制剂,以及目前正在寻找的天然药物抑制剂,我们设想从天然药物及中药中,筛选具有专一性结构域抑制活性的先导化合物,抑制 ACE 的 C-结构域,同时尽可能减少毒副作用,这将为高血压心血管疾病的治疗带来新的希望。

REFERENCES

- [1] De Mello WC. Angiotensin converting enzyme and the arrhythmogenic action of angiotensin I: cardiac cell membrane as a site of angiotensin I conversion. *Regulatory Peptides*, 2004, **121**: 83-88.
- [2] Coates D. The angiotensin converting enzyme (ACE). *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 2003, **35**: 769-773.
- [3] Hubert C, Houot AM, Corvol P, *et al*. Structure of the angiotensin I-converting enzyme gene: two alternate promoters correspond to evolutionary steps of a duplicated gene. *Journal of Biological Chemistry*, 1991, **266**: 15377-15383.
- [4] Thekkumkara TJ, Livingston III WS, Kumar RC, *et al*. Use of alternative polyadenylation sites for tissue-specific transcription of two angiotensin-converting enzyme mRNAs. *Nucleic Acids Research*, 1992, **20**(4): 683-687.
- [5] Ehlers MRW, Fox EA, Strydom DJ, *et al*. Molecular cloning of human testicular angiotensin-converting enzyme: the testis isozyme is identical to the C-terminal half of endothelial angiotensin-converting enzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1989, **86**: 774-7745.
- [6] Kumar RS, Kusari J, Roy QII SN, *et al*. Structure of testicular angiotensin-converting enzyme. *Journal of Biological Chemistry*, 1989, **264**(28): 16754-16758.
- [7] Riordan JF. Angiotensin-I-converting enzyme and its relatives. *Genome Biology*, 2003, **4**(8): 225.

- [8] Hu JG, Igarashi A, Kamata M, Nakagawa H. Angiotensin-converting enzyme degrades Alzheimer Amyloid β -Peptide (A β); rerards A β aggregation, deposition, fibril formation; and inhibits cytotoxicity. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, **276**(51): 47863–47868.
- [9] Kondoh G, Tojo H, Nakatani Y, *et al.* Angiotensin-converting enzyme is a GPI-anchored protein releasing factor crucial for fertilization. *Nature Medicine*, 2005, **11**: 160–166.
- [10] Morshed M, Khan H, Akhteruzzaman S. Association between Angiotensin I-converting enzyme gene polymorphism and hypertension in selected individuals of the Bangladeshi population. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2002, **35**: 25–254.
- [11] Agachan B, Isbir T, Yilmaz H, *et al.* Angiotensin converting enzyme I/D, Angiotensinogen T174M-M235T and angiotensin II type 1 receptor A1166C gene polymorphisms in Turkish hypertensive patients. *Experimental and Molecular medicine*, 2003, **35**(6): 545–549.
- [12] Ohira N, Matsumoto T, Tamaki S, *et al.* Angiotensin-converting enzyme insertion/deletion polymorphism modulates coronary release of tissue plasminogen activator in response to bradykinin. *Hypertens Research*, 2004, **27**(1): 39–45.
- [13] Iwai N, Tamaki S, Ohmichi N, *et al.* The II genotype of the angiotensin-converting enzyme gene delays the ouset of acute coronary syndromes. *Arterioscler Thromb Basc Biol*, 1997, **17**: 1730–1733.
- [14] Tipnis SR, Hooper NM, Hyde R, *et al.* A human homolog of angiotensin - converting enzyme. *Journal of Biological Chemistry*, 2000, **275**(43): 33238–33243.
- [15] Guo XQ, Mit K, Okano K, *et al.* Isolation and expression of the ecdysteroid -inducible angiotensin-converting enzyme-related gene in wing discs of *Bombyx mori*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2001, **31**: 97–103.
- [16] Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, *et al.* A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase(ACE2) converts angiotensin I to angiotensin1-9. *Circulation research*, 2000, **87**: 1–9.
- [17] Rice GI, Thomas DA, Grant PJ, *et al.* Evaluation of angiotensin-converting enzyme (ACE), its homologue ACE2 and neprilysin in angiotensin peptide metabolism. *Biochem J*, 2004, **383**: 45–51.
- [18] Li W, Moore MJ, Vasilieva N, *et al.* Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature*, 2003, **426**(6965): 450–454.
- [19] Lang AD, Osterhqus ADME, Haagmans BL. Interferon- and interlwukin-4 downregulate expression of the SARS coronavirus receptor ACE2 in Vero E6 cells. *Virology*, 2006, **6**(11): 1–8.
- [20] Ho TY, Wu SL, Chen JC, *et al.* Emodin blocks the SARS coronavirus spike protein and angiotensin-converting enzyme 2 interaction. *Antivirl Research*, 2006, **2103**: 1–10.
- [21] Bicket DP. Using ACE inhibitors appropriately. *American Family Physician*, 2002, **66**: 461–468.
- [22] Pagliaro P, Penna C. Rethinking the rennin-angiotensin system and its role in cardiovascular regulation. *Cardiovascular Drugs and Therapy*, 2005, **19**: 1977–1987.
- [23] Pitt B. ACE inhibitors in heart failure: prospects and limitations. *Cardiovascular Drugs and Therapy*, 1997, **11**: 285–290.
- [24] De Gusmao FMB, Becker C, Carvalho MHC, *et al.* Angiotensin II inhibition during myocardial ischemia-reperfusion in dogs: effects on leukocyte infiltration, nitric oxide synthase isoenzymes activity. *International Journal of Cardiology*, 2005, **100**: 363–370.
- [25] Francis J, Shun GW, Weiss MR, *et al.* Brain angiotensin-converting enzyme activity and autonomic regulation in heart failure. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 2004, **287**: 2138–2146.
- [26] Georgiadis D, Beau F, Czarny B, *et al.* Roles of two sites of somatic angiotensin-converting enzyme in the cleavage of angiotensin I and bradykinin: insight from selective inhibitors. *Circulation research*, 2003, **93**: 148–154.
- [27] Van Esch JHM, Tom B, Dive V, *et al.* Selective angiotensin-converting enzyme C-domain inhibition is sufficient to prevent angiotensin I-induced vasoconstriction. *Hypertension*, 2005, **45**: 120–125.
- [28] Junot C, Gonzales MF, Ezan E, *et al.* a selective inhibitor of the N-domain of angiotensin I-converting enzyme, blocks in vivo the degradation of hemoregulatory peptide acetyl-Ser-Asp-Lys-Pro with no effect on angiotensin I hydrolysis. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2001, **297**: 606–611.
- [29] Dive V, Cotton J, Yiotakis A, *et al.* RXP407, a phpsphinic peptide, is a potent inhibitor of angiotensin I converting enzyme able to differentiate between its two active sites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1999, **96**: 4330–4335.