

# 안지오텐신 II 유발 고혈압에서 Endothelin, 이노호르몬, 산화질소계의 발현 변화

배은희<sup>1</sup>, 김창성<sup>1</sup>, 최준석<sup>1</sup>, 마성권<sup>1</sup>, 이종은<sup>2</sup>, 김수완<sup>1</sup>

전남대학교 의과대학<sup>1</sup> 내과학교실, <sup>2</sup>생리학교실

## Altered Regulation of Endothelin, Atrial Natriuretic Peptide, and Nitric Oxide Systems in Angiotensin II-induced Hypertension

Eun Hui Bae, MD<sup>1</sup>, Chang Seong Kim, MD<sup>1</sup>, Joon Seok Choi, MD<sup>1</sup>, Seong Kwon Ma, MD<sup>1</sup>,  
Jong Un Lee, MD<sup>2</sup>, Soo Wan Kim, MD<sup>1</sup>

Departments of <sup>1</sup>Internal Medicine, <sup>2</sup>Physiology, Chonnam National University Medical School, Gwangju, Korea

### ABSTRACT

**Background:** The present study aimed to determine the changes of endothelin (ET), nitric oxide, and atrial natriuretic peptide (ANP) systems in the kidney and aorta in angiotensin (Ang) II-induced hypertension. **Methods:** Male Sprague-Dawley rats were used. Ang II (100 ng•min<sup>-1</sup>•kg<sup>-1</sup>) was infused through entire time course. Fourteen days after beginning the regimen, aorta and kidney were taken. The protein expression of nitric oxide synthase (NOS) was determined by semiquantitative immunoblotting. The mRNA expression of components of ET, NOS, ANP system was determined by real-time polymerase chain reaction. **Results:** Hypertension was developed in the experimental group. mRNA expression of ET-1 in the aorta and kidney was increased. The protein expression of endothelial NOS (eNOS) was decreased in the aorta, while that of inducible NOS and neuronal NOS remained unaltered. mRNA expression of ANP, natriuretic peptide type (NPR)-A, and NPR-C was not changed in the aorta. **Conclusions:** Based on these results, it seems that in Ang II-induced hypertensive rats, increased expression of ET-1 in the aorta and kidney, and decreased eNOS expression in the aorta contribute to the pathogenesis of hypertension.

(J Korean Soc Hypertens 2012;18(4):146-153)

**Key Words:** Angiotensin II; Endothelins; Atrial natriuretic peptide; Nitric oxide; Aorta

### 서론

안지오텐신 II를 지속적으로 주입하게 되면 점진적으로 고혈압이 발생됨은 잘 알려져 있다.<sup>1,2)</sup> Endothelin-1도 고

혈압 발생에 중요한 역할을 함이 잘 알려져 있는데, 이는 강력한 혈관수축물질로서 평활근세포의 분열에도 관여하며, 혈압을 유지하는데 결정적 역할을 한다.<sup>3)</sup> 신장에서도 endothelin-1 유전자와 단백질 발현이 신병증과정에서 증가하고, 길항제를 사용하였을 때 신질환의 진행이 약화됨이 보고되고 있다. 이러한 결과들은 endothelin-1이 신장질환의 발생의 병인기전에 중요한 역할을 할 것을 시사하고

논문접수일: 2012.8.16, 수정완료일: 2012.9.12, 게재승인일: 2012.9.26

교신저자: 김수완

주소: 광주시 동구 제봉로 42 전남대학교 의과대학 전남대학교병원 신장내과

Tel: 062) 220-6271, Fax: 062)225-8578

E-mail: skimw@chonnam.ac.kr

있다.<sup>4)</sup> 그러나, 안지오텐신 II 유발 고혈압 흰쥐의 신장이나 혈관에서 endothelin-1의 역할은 잘 알려져 있지 않다.

실험동물모델에서 보면, 안지오텐신 II에 의해 유발된 혈관수축은 혈관이완인자에 의해서 약화된다.<sup>1,5)</sup> 이러한 물질들 중에서 산화질소와 이노호르몬계가 강력한 혈관이완물질로 잘 알려져 있다.<sup>6)</sup> 산화질소는 산화질소 합성 효소(nitric oxide synthase, NOS)에 의해 생성되는데 인체에는 세 종류의 NOS가 존재하는데, endothelial NOS (eNOS), neuronal NOS (nNOS), inducible NOS (iNOS)가 있다.<sup>7)</sup> 이러한 산화질소는 신장기능의 생리적 조절에 중요한 역할을 한다. 기본적으로 염분배설과 이뇨에 관여하지만 산화질소의 전구체인 L-arginine을 허혈 신장에 전처치하면 신 손상을 줄일 수 있다.<sup>8)</sup> 또한 만성신질환에서 보면 고혈압이 NOS 내재적 억제인자인 dimethylarginine의 혈장 농도와 밀접한 연관관계가 있다.<sup>9)</sup> 즉 산화질소의 감소는 혈압을 상승시키고, 증가는 혈압증가에 대한 보상기전으로 작용하게 된다.<sup>10)</sup> 그러나 안지오텐신 II 유발 고혈압에서 각각의 NOS의 역할에 대해서는 잘 알려져 있지 않다.

혈압조절기전으로 이노호르몬계의 중요성에 대한 많은 연구가 인간과 동물모델에서 이루어져 있다. 생쥐모델에서 심방이노호르몬 유전자를 제거하면 고염식에 대한 반응성이 증가하여 혈압이 상승된다.<sup>11)</sup> 또한 심방이노호르몬을 과도하게 발현시킨 쥐에서는 수축기혈압을 20–30 mm Hg 정도 감소시킬 수 있음이 보고되었다.<sup>12)</sup> 따라서, 심방이노호르몬은 나트륨배설 및 혈관이완의 효과로 고혈압 발생에 길항작용을 한다고 할 수 있다. 이러한 심방이노호르몬은 심장뿐 아니라 다른 장기에서도 발견되고 있다.<sup>13)</sup> 심부전 환자에서 심방이노호르몬의 변화를 보면 혈장에서보다 심장 이외의 기관에서 심방이노호르몬의 발현 정도가 질환과 밀접히 관계가 있어,<sup>14)</sup> 이러한 결과들은 심방 이외의 조직에서의 심방이노호르몬의 정도가 병적 상황에서 보다 중요한 역할을 하고 있음을 시사한다.<sup>15)</sup> 그러나 이에 대한 연구는 잘 이루어져 있지 않다. 따라서 본 연구자들은 안지오텐신 II 유발 고혈압에서 혈압증가의 기전에 관여하는 endothelin, 산화질소 및, 이노

호르몬계의 역할을 규명하고자 하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 실험방법

실험재료는 체중 180–200 g의 Sprague-Dawley 수컷을 사용하였다. 이 동물실험은 전남대학교 의과대학 윤리위원회 승인을 받아 진행되었다. 실험군에서 14일 동안 안지오텐신 II (Sigma, St. Louis, MO, USA)를 주입하기 위해 ketamine (90 mg/kg)과 xylazine (10 mg/kg) 마취하에 osmotic minipumps (Alzet model 2002; Alza Co., Palo Alto, CA, USA)을 피하에 삽입하여, 안지오텐신 II (100 ng•min<sup>-1</sup>•kg<sup>-1</sup> subcutaneously for 14 days) 또는 링거액(vehicle)만을 주입한 두 군으로 나누어 실험을 진행하였다.<sup>16)</sup> 쥐들은 마지막 삼일 동안 대사상자에 유지하였다. 실험 당일 쥐들은 마취하지 않은 상태에서 단두한 후 혈액을 채취하였다. 이어 즉시 대동맥과 신장을 채취하여 실험에 사용하였다.

### 2. 단백질 분리 및 전기영동

박리한 대동맥과 신장조직을 250 mM sucrose, 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid, 0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.6)가 들어 있는 용액 내에서 균질화하였다. 큰 조직 부스러기와 핵 조각을 제거하기 위하여 1,000 g, 4°C에서 15분간 원심분리하였다. 조직 균질액의 단백질 농도는 표준시료로 알부민을 이용한 bicinchoninic acid 측정 kit (BioRad, Hercules, CA, USA)를 사용하여 측정하였다. 모든 시료는 sodium dodecyl sulfate를 포함한 완충액에서 65°C, 15분간 녹여 동일한 최종 농도를 갖도록 하고 -20°C에 보관하였다. 첫 번째 젤을 Coomassie blue로 염색하여 동일한 양의 단백질이 실렸는지 확인하였다.

Western blot분석을 위하여 각각 5 µg을 9–12% polyacrylamide resolving gel과 5% polyacrylamide stacking gel로 이루어진 비연속성계(Xcell II Mini-Cell; Novex, San Diego, CA, USA)에서 전기영동하여 크기에 따라 분

류하였다. 그런 다음 단백을 Novex blot module을 이용하여 전기영동(360 mA, 3시간)하여 nitrocellulose membrane에 옮겼다. 이 막을 Tween-20이 들어 있는 Tris-based saline buffer (TBST)로 씻고 1시간 동안 TBST에 용해시킨 5% 무지방 건조 우유용액(nonfat dried milk in Tris-buffered saline NFM/TBS)에서 차단하고, 2% NFM/TBS 내에서 affinity-purified anti-mouse polyclonal eNOS, iNOS와 nNOS (1:2,500; Transduction Laboratories, Lexington, KY, USA)를 상온에서 1시간 동안 부치하였다. 이어서 막을 2% NFM/TBS에서 2시간 동안 horseradish peroxidase-labeled goat anti-mouse immunoglobulin G (1:1,000)와 함께 부치하였다. 막을 TBST로 다시 4회 세척하고 enhanced chemiluminescence (Amersham, Little Chalfont, UK)용액에서 10분간 반응시킨 후 Image Reader (LAS-3000 imaging system; Fuji Photo Film, Kanagawa, Japan)에 의해 확인하였다.

### 3. RNA 추출 및 reverse transcription polymerase chain reaction 분석

대동맥과 신장은 Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)로 균질화하였다. RNA는 chloroform을 사용하여 추출하였고, isopropanol을 사용하여 침전시키고 나서 70% ethanol로 씻어 주었다. 마지막으로 멸균수에 RNA를 녹였다. RNA 농도는 흡광도 260 nm (Ultraspec 2,000; Pharmacia Biotech, Cambridge, UK)에서 정량하였다. 이 뉴호르몬계 mRNA의 발현은 real-time polymerase chain reaction (PCR)법으로 측정하였다. cDNA는 total RNA 5 µg을 사용하여 oligo (dT) primer와 superscript reverse transcriptase II (Invitrogen)를 이용하여 역전사시켜 만들었다. 만들어진 cDNA는 Smart Cycler II System (Cepheid, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 증폭시키고 SYBR Green으로 확인하였다. 각각의 PCR 반응물은 10 µM forward primer, 10 µM reverse primer, 2X SYBR Green Premix Ex Taq (Takara Bio Inc., Otsu, Japan), 0.5 µL cDNA, H<sub>2</sub>O를 섞어 최종 20 µL로 만들었다. PCR Rotor-Gene 3000 Detector System (Corbette Research, Mortlake,

Australia)을 사용하여 실시하였다. Primer는 이전 문헌에 따라 준비하였다.<sup>17)</sup> PCR 단계는 다음과 같이 실시하였다. 즉, 1) 95°C에서 5분, 2) 95°C에서 20초, 3) 58–62°C 사이에서 20초(optimized for each primer pair), 4) 72°C에서 30초, 5) 85°C에서 6초로 하여 SYBR Green을 확인하였다. 2단계부터 5단계를 64 cycle 반복하였고, 녹는 점 곡선을 만들기 위해 마지막 cycle은 60°C에서 90°C로 온도를 올렸다. 반응 후 데이터는 Corbett Research Software로 분석하였다. 상대적인 critical threshold values는 4번 반복하여 glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase로 평준화한 다음 유전자 발현 계산에 사용하였다.

### 4. 통계처리

실험성적은 mean ± standard error of mean으로 표시하였으며, 유의성 검정은 unpaired t-test를 사용하였다.

## 결 과

### 1. 혈압변화와 장기의 무게

안지오텐신 II 유발 고혈압 흰쥐에서 유의하게 혈압이 증가되었다. 두 군 간의 몸무게에 통계학적 차이는 없었으며 고혈압 흰쥐에서 사구체여과율이 감소하였다(Table 1).

### 2. Endothelin계의 변화

안지오텐신 II 유발 고혈압 흰쥐의 대동맥과 신장에서 endothelin-1의 mRNA 발현이 현저히 증가했다. 수용체인 endothelin receptor type A (ETAR)와 endothelin receptor type B는 두 군 간의 발현의 차이를 보이지 않았다(Fig. 1).

Table 1. Changes of functional data and blood pressure

	Control (n = 6)	Experimental (n = 6)
Body weight (g)	250.2 ± 8.2	240.2 ± 14.9
Blood pressure (mm Hg)	122.5 ± 3.0	175.4 ± 31.2*
Urine output (mL/day)	14.8 ± 2.8	13.5 ± 3.0
Glomerular filtration rate (mL/min)	2.32 ± 0.5	1.48 ± 0.35*

\*p < 0.05.

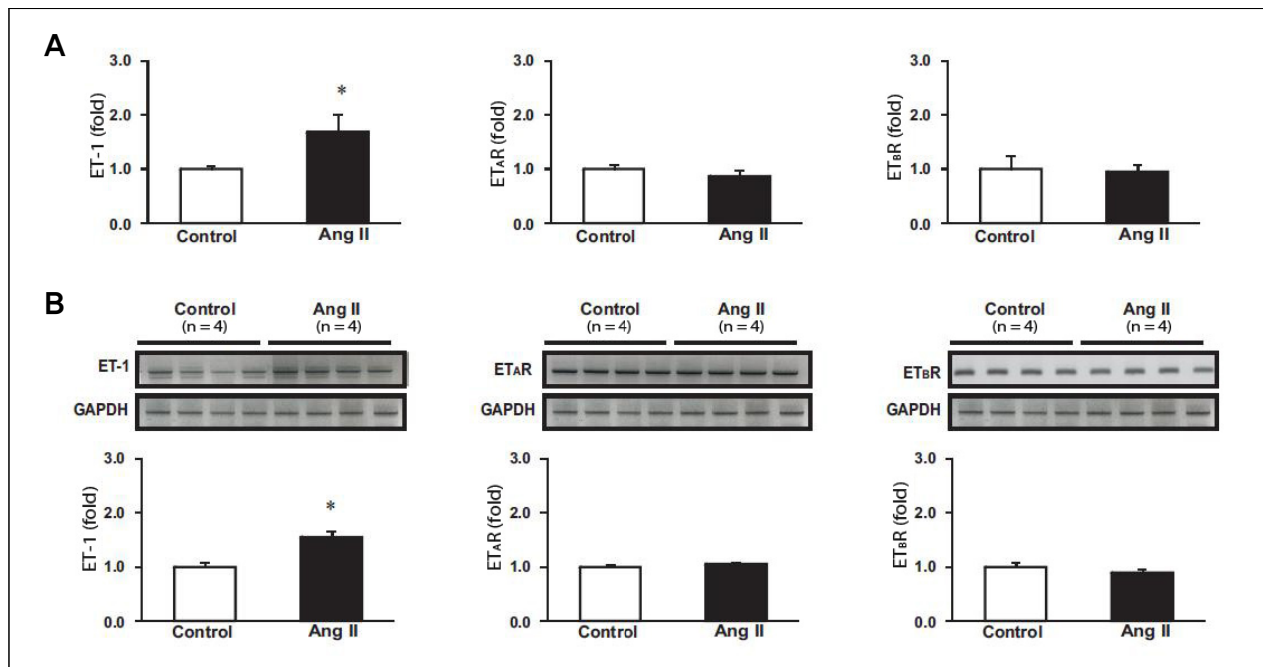


Fig. 1. The mRNA expression of endothelin-1 (ET-1), endothelin receptor type A (ETAR) and type B (ETBR) in aorta (A) and kidney (B). Fluorographs show ethidium bromide stained agarose gels containing reverse transcription-polymerase chain reaction (PCR) products, and columns show real-time PCR data representing control and angiotensin (Ang) II-induced hypertensive groups. \* $p < 0.05$  compared with control.

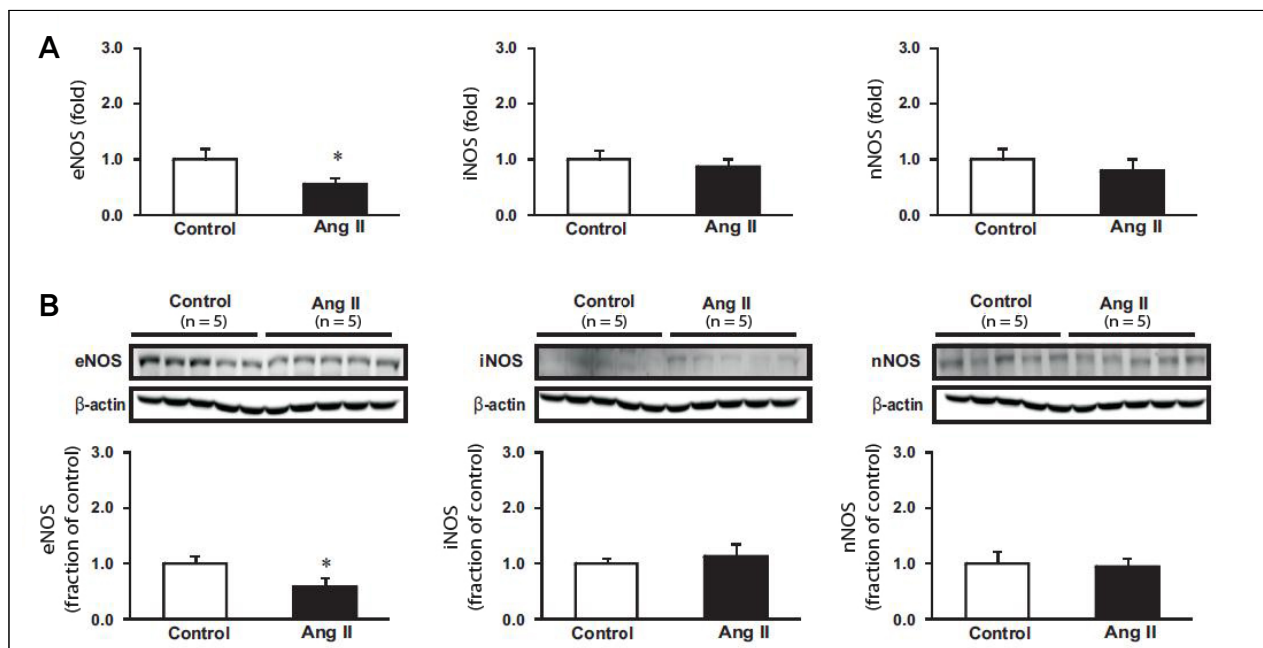


Fig. 2. The mRNA expression (A) and semiquantitative immunoblotting (B) of endothelial nitric oxide synthase (eNOS), inducible NOS (iNOS), and neuronal NOS (nNOS) in the aorta. Ang, angiotensin. \* $p < 0.05$  compared with control.

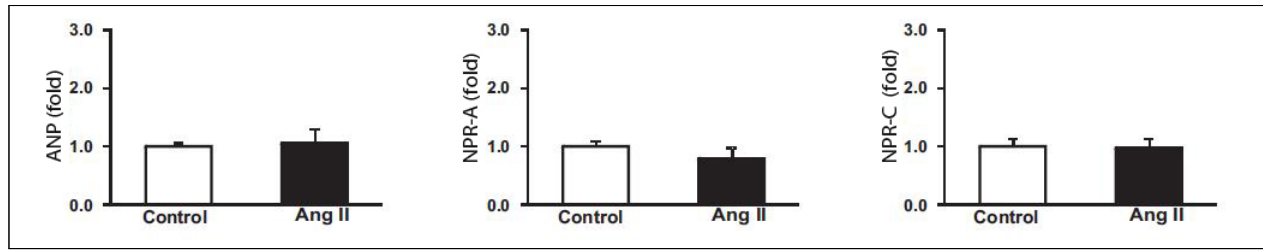


Fig. 3. The mRNA expression of atrial natriuretic peptide (ANP), natriuretic peptide receptor (NPR)-A and NPR-C in the aorta. Ang, angiotensin.

### 3. 산화질소계의 변화

안지오텐신 II 유발 고혈압 흰쥐의 대동맥에서 eNOS의 mRNA 및 단백 발현이 현저히 감소했다. 하지만 iNOS 및 nNOS 발현은 두 군 간 유의한 차이를 보이지 않았다 (Fig. 2).

### 4. 이뇨호르몬계의 변화

안지오텐신 II 유발 고혈압 흰쥐의 대동맥에서 심방이뇨호르몬과 그 수용체 natriuretic peptide type A (NPR-A) 및 natriuretic peptide type C (NPR-C)의 mRNA 발현은 두 군 간에 유의한 차이를 보이지 않았다(Fig. 3).

## 고 찰

레닌-안지오텐신-알도스테론계의 활성화와 더불어 증가된 endothelin계의 활성화는 고혈압 발생뿐 아니라 이로 인한 표적장기 손상에 상승작용을 한다고 알려져 있다.<sup>18,19)</sup> 또한, endothelin계에서 표적장기 손상은 주로 A형 수용체(ETAR)를 통해 이루어짐이 보고되고 있다.<sup>20)</sup> 이러한 증거로 기존에 5/6 신 절제 Ren-2 고혈압 쥐에 A형 수용체 차단제를 사용하였더니 혈압감소와 표적장기 보호효과가 있었다.<sup>21)</sup> 그러나 안지오텐신 II 유발 고혈압 흰쥐의 대동맥과 신장에서 endothelin계의 발현 변화 정도를 조사한 본 연구에서는 endothelin-1의 발현은 대동맥과 신장에서 모두 증가하였지만, A형 수용체는 대동맥과 신장 모두에서 실험군과 대조군 간에 차이를 보이지 않았다. 신장은 endothelin을 합성 분비하는 자신만의 endothelin계를 가지고 autocrine나 paracrine으로 기능을 나

타낸다.<sup>22,23)</sup> Endothelin계는 염증반응, 조직섬유화, 반응성 산소종(reactive oxygen species)과도 관계가 있는데, 특히 이전 보고에 의하면 안지오텐신 II를 주입했을 때 반응성 산소종의 생성이 증가하고 이는 endothelin-1 합성을 유발하였다.<sup>24)</sup> 따라서, 본 연구에서도 안지오텐신 II 유발 고혈압 흰쥐의 대동맥 및 신장 endothelin-1 발현증가에 기인한 endothelin 합성증가는 혈관수축 및 고혈압 발생의 병인으로 작용할 것으로 사료된다.

산화질소 합성억제제는 동맥에서 내피혈관수축, 혈류감소를 일으킬 뿐만 아니라 생체 내에서 정맥 내 주입하거나 경구 투여하면 고혈압을 유발하는데, 이는 심혈관계가 지속적인 산화질소 의존 혈관완상태에 있음을 의미한다.<sup>25)</sup> NOS의 억제가 기본적으로 혈관의 구경을 감소시킬 뿐 아니라 안지오텐신 II에 대한 혈관수축효과를 증가시킨다고 알려져 있는데,<sup>26)</sup> 이는 산화질소가 안지오텐신의 혈관수축에 길항작용을 하고 있음을 시사한다. NOS를 억제한 후 안지오텐신 II를 혈관으로 주입한 개모델에서 보면 신혈류가 크게 감소하나 그렇지 않은 경우 즉 정상적으로 산화질소 생성이 가능한 경우에는 혈류감소가 나타나지 않는다.<sup>27)</sup> 또한 고용량(10 ug/kg/min)의 산화질소 합성억제제인, NG-nitro-L-arginine methylseter 주입은 산화질소 합성억제에 의한 항나트륨 배설효과를 극복하여 전신 혈압 및 요 중 염분배설을 증가시켰다. 한편 산화질소 합성억제에 의한 전신 및 신장효과의 일부분은 산화질소작용의 차단이 아니라 조직 내 산화질소 농도가 낮아졌을 때 저명해진 안지오텐신 II의 작용증가에 기인한다는 보고도 있다.<sup>28,29)</sup> eNOS 유전자는 주로 혈관내피세포에서 발현되며, 사람 혈관내피세포에서 산화질소 생산은 저산소혈증에 의해 억제되었으며, 이와 더불어 eNOS의

mRNA 또한 40–60% 감소되었다.<sup>30)</sup> 따라서 본 연구에서 안지오텐신 II 유발 고혈압 대동맥에서 eNOS 단백질 발현이 감소하였는데, 이것은 안지오텐신 II 유발 고혈압 흰쥐에서 고혈압 발생의 원인기전으로 작용했을 것으로 생각된다.

고혈압의 원인질환에 관계없이 혈압의 상승은 혈장이 노호르몬의 농도를 증가시킨다.<sup>31,32)</sup> 또한 고혈압 흰쥐에 심방이노호르몬을 주입하면 혈장 레닌 농도감소와 더불어 혈압을 감소시킨다.<sup>33)</sup> 그러나, 심방 확장이나 심장으로 가는 신경이 제거된 개모델에서는 증가된 혈장이노호르몬은 염분배설을 촉진시키지 않는다.<sup>34)</sup> 또한, 생리식염수를 주입한 후 측정된 이노호르몬의 정도와 염분배설과의 관계도 밀접한 관계를 보이지 않는다.<sup>35)</sup> 이러한 결과들은 순환하는 혈장이노호르몬보다는 국소적으로 존재하는 이노호르몬 정도가 나트륨 항상성에 더 중요한 역할을 하고 있음을 시사한다. 최근 저자들의 보고에 의하면 안지오텐신 II 유발 고혈압 흰쥐에서 신장의 국소 이노호르몬의 발현이 증가되어 있었고 이는 안지오텐신 II에 의해 유발된 고혈압에 대한 보상기전으로 요 중 나트륨과 수분배설 증가에 관여할 것으로 생각된다.<sup>36)</sup> 이노호르몬의 수용체 중에 type A (NPR-A)가 심방이노호르몬과 뇌이노호르몬(brain natriuretic peptide), type B (NPR-B)는 C-형 이노호르몬(C type natriuretic peptide)에 친화력이 높다. 심방이노호르몬은 또한 신장, 폐, 뇌, 심장에서 제거되는데, 주로 neutral endopeptidase에 의해 분해되거나 type C (NPR-C)에 결합되어 제거된다.<sup>37)</sup> 최근 저자들의 안지오텐신 II 유발 고혈압 신장에서 atrial natriuretic peptide (ANP) 합성증가가 고혈압에 대한 보상기전으로 작용할 것이라는 보고와는 달리,<sup>33)</sup> 대동맥에서 ANP 발현은 유의한 차이를 보이지 않았는데, 이는 각 조직 간의 조절기전의 차이로 생각된다.

결론적으로 안지오텐신 II 유발 고혈압 모델의 대동맥과 신장에서 endothelin-1의 mRNA 발현증가와 대동맥에서 eNOS 발현감소가 고혈압 발생 병인에 관여하였을 것으로 생각된다.

## 요 약

**연구배경:** Endothelin은 대표적인 혈관수축물질이며, 산

화질소와 심방 나트륨 이노 펩티드(atrial natriuretic peptide)는 대표적인 혈관이완물질이다. 안지오텐신 II 유발 고혈압 모델에서 신장과 대동맥에서 이런 물질들이 국소적으로 어떻게 조절되는지 규명하고자 하였다.

**방법:** Sprague-Dawley 흰쥐를 사용하였으며, 안지오텐신 II (100 ng·min<sup>-1</sup>·kg<sup>-1</sup>)를 오스모틱 미니펌프를 사용하여 14일간 지속적으로 주입하였다. 실험 당일 혈압을 측정하였으며, 산화질소 합성효소의 발현 정도는 반정량적 면역노블롯법(immunoblotting)으로 평가하였다. Endothelin계와 이노호르몬계는 real-time polymerase chain reaction을 이용하여 발현 정도를 평가하였다.

**결과:** 실험군에서 고혈압이 유발되었으며, 신장의 사구체여과율이 감소하였다. Endothelin-1의 발현은 대동맥과 신장에서 모두 증가하였고, 그 수용체는 두 군 간에 발현 변화의 차이를 보이지 않았다. 혈관내피세포 산화질소 합성효소(endothelial nitric oxide synthase)의 단백질 발현이 대동맥에서 감소하였다. 반면 이노호르몬과 그 수용체는 두 군 간의 발현 변화의 차이를 보이지 않았다.

**결론:** 안지오텐신 II 유발 고혈압 모델의 대동맥과 신장에서 endothelin 1의 mRNA 발현증가와 대동맥에서 산화질소 합성효소의 발현감소가 고혈압의 유발에 관여하였을 것으로 생각된다.

## 감사의 글

이 연구는 2010년 대한고혈압학회 산학협동연구비 지원으로 이루어졌다.

**이해상충:** 해당사항 없음.

## References

1. Chin SY, Wang CT, Majid DS, Navar LG. Renoprotective effects of nitric oxide in angiotensin II-induced hypertension in the rat. *Am J Physiol.* 1998;274(5 Pt 2):F876-82.
2. Prieto-Carrasquero MC, Harrison-Bernard LM, Kobori H, Ozawa Y, Hering-Smith KS, Hamm LL, et al. Enhancement of collecting duct renin in angiotensin II-dependent hypertensive rats. *Hypertension.* 2004;44:223-9.

3. Miller RC, Pelton JT, Huggins JP. Endothelins: from receptors to medicine. *Trends Pharmacol Sci.* 1993;14:54-60.
4. Benigni A, Zola C, Corna D, Orisio S, Facchinetti D, Benati L, et al. Blocking both type A and B endothelin receptors in the kidney attenuates renal injury and prolongs survival in rats with remnant kidney. *Am J Kidney Dis.* 1996;27:416-23.
5. Sigmon DH, Beierwaltes WH. Influence of nitric oxide in the chronic phase of two-kidney, one clip renovascular hypertension. *Hypertension.* 1998;31:649-56.
6. Soares TJ, Coimbra TM, Martins AR, Pereira AG, Carnio EC, Branco LG, et al. Atrial natriuretic peptide and oxytocin induce natriuresis by release of cGMP. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96:278-83.
7. Kone BC. Nitric oxide in renal health and disease. *Am J Kidney Dis.* 1997;30:311-33.
8. Jerkic M, Varagic J, Jovovic D, Radujkovic-Kuburovic G, Nastic-Miric D, Adanja-Grubic G, et al. L-arginine reduces tubular cell injury in acute post-ischaemic renal failure. *Nephrol Dial Transplant.* 1999;14:1398-407.
9. Vallance P, Leone A, Calver A, Collier J, Moncada S. Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. *Lancet.* 1992;339:572-5.
10. Lee JU. Nitric oxide in the kidney: its physiological role and pathophysiological implications. *Electrolyte Blood Press.* 2008;6:27-34.
11. John SW, Kregel JH, Oliver PM, Hagaman JR, Hodgins JB, Pang SC, et al. Genetic decreases in atrial natriuretic peptide and salt-sensitive hypertension. *Science.* 1995;267:679-81.
12. Steinhilber ME, Cochrane KL, Field LJ. Hypotension in transgenic mice expressing atrial natriuretic factor fusion genes. *Hypertension.* 1990;16:301-7.
13. Arai H, Nakao K, Saito Y, Morii N, Sugawara A, Yamada T, et al. Augmented expression of atrial natriuretic polypeptide gene in ventricles of spontaneously hypertensive rats (SHR) and SHR-stroke prone. *Circ Res.* 1988;62:926-30.
14. Ding J, Thibault G, Gutkowska J, Garcia R, Karabatsos T, Jasmin G, et al. Cardiac and plasma atrial natriuretic factor in experimental congestive heart failure. *Endocrinology.* 1987;121:248-57.
15. Gutkowska J, Nemer M. Structure, expression, and function of atrial natriuretic factor in extraatrial tissues. *Endocr Rev.* 1989;10:519-36.
16. Lombardi D, Gordon KL, Polinsky P, Suga S, Schwartz SM, Johnson RJ. Salt-sensitive hypertension develops after short-term exposure to Angiotensin II. *Hypertension.* 1999;33:1013-9.
17. Bae EH, Kim IJ, Park JW, Ma SK, Choi KC, Lee JU, et al. Altered regulation of renin-angiotensin, endothelin and natriuretic peptide systems in rat kidney with chronic unilateral ureteral obstruction. *Urol Int.* 2007;79:170-6.
18. Kobori H, Nangaku M, Navar LG, Nishiyama A. The intra-renal renin-angiotensin system: from physiology to the pathobiology of hypertension and kidney disease. *Pharmacol Rev.* 2007;59:251-87.
19. Kohan DE, Rossi NF, Inscho EW, Pollock DM. Regulation of blood pressure and salt homeostasis by endothelin. *Physiol Rev.* 2011;91:1-77.
20. Barton M. Therapeutic potential of endothelin receptor antagonists for chronic proteinuric renal disease in humans. *Biochim Biophys Acta.* 2010;1802:1203-13.
21. Vaneckova I, Kujal P, Huskova Z, Vanourkova Z, Vernerova Z, Certikova Chabova V, et al. Effects of combined endothelin A receptor and renin-angiotensin system blockade on the course of end-organ damage in 5/6 nephrectomized Ren-2 hypertensive rats. *Kidney Blood Press Res.* 2012;35:382-92.
22. Xu D, Emoto N, Giaid A, Slaughter C, Kaw S, de Wit D, et al. ECE-1: a membrane-bound metalloprotease that catalyzes the proteolytic activation of big endothelin-1. *Cell.* 1994;78:473-85.
23. Nambi P, Pullen M, Wu HL, Aiyar N, Ohlstein EH, Edwards RM. Identification of endothelin receptor subtypes in human renal cortex and medulla using subtype-selective ligands. *Endocrinology.* 1992;131:1081-6.
24. Hsu YH, Chen JJ, Chang NC, Chen CH, Liu JC, Chen TH, et al. Role of reactive oxygen species-sensitive extracellular signal-regulated kinase pathway in angiotensin II-induced endothelin-1 gene expression in vascular endothelial cells. *J Vasc Res.* 2004;41:64-74.
25. Liu Y, Tsuchihashi T, Kagiya S, Matsumura K, Abe I, Fujishima M. Central and peripheral mechanisms involved in hypertension induced by chronic inhibition of nitric oxide synthase in rats. *J Hypertens.* 1998;16:1165-73.
26. Sigmon DH, Newman JM, Beierwaltes WH. Angiotensin II: endothelium-derived nitric oxide interaction in conscious rats. *J Am Soc Nephrol.* 1994;4:1675-82.
27. Majid DS, Nishiyama A, Jackson KE, Castillo A. Superoxide scavenging attenuates renal responses to ANG II during nitric

- oxide synthase inhibition in anesthetized dogs. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2005;288:F412-9.
28. Ito S, Johnson CS, Carretero OA. Modulation of angiotensin II-induced vasoconstriction by endothelium-derived relaxing factor in the isolated microperfused rabbit afferent arteriole. *J Clin Invest.* 1991;87:1656-63.
29. De Nicola L, Blantz RC, Gabbai FB. Nitric oxide and angiotensin II. Glomerular and tubular interaction in the rat. *J Clin Invest.* 1992;89:1248-56.
30. McQuillan LP, Leung GK, Marsden PA, Kostyk SK, Kourembanas S. Hypoxia inhibits expression of eNOS via transcriptional and posttranscriptional mechanisms. *Am J Physiol.* 1994;267(5 Pt 2):H1921-7.
31. Granger JP, Blaine EH, Stacy DL, La Rock MJ. Effects of long-term increases in plasma ANP on angiotensin II-induced hypertension. *Am J Physiol.* 1990;258(5 Pt 2):H1427-31.
32. Roubert P, Lonchampt MO, Chabrier PE, Plas P, Goulin J, Braquet P. Down-regulation of atrial natriuretic factor receptors and correlation with cGMP stimulation in rat cultured vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1987;148:61-7.
33. Lee JU. Atrial natriuretic peptide attenuates the development of hypertension in 2-kidney, 1-clip goldblatt rats. *Korean J Physiol Pharmacol.* 1989;23:43-9.
34. Goetz KL, Wang BC, Geer PG, Leadley RJ Jr, Reinhardt HW. Atrial stretch increases sodium excretion independently of release of atrial peptides. *Am J Physiol.* 1986;250(5 Pt 2):R946-50.
35. Singer DR, Shore AC, Markandu ND, Buckley MG, Sagnella GA, MacGregor GA. Dissociation between plasma atrial natriuretic peptide levels and urinary sodium excretion after intravenous saline infusion in normal man. *Clin Sci (Lond).* 1987;73:285-9.
36. Bae EH, Ma SK, Lee J, Kim SW. Altered regulation of renal nitric oxide and atrial natriuretic peptide systems in angiotensin II-induced hypertension. *Regul Pept.* 2011;170:31-7.
37. Wilkins MR, Redondo J, Brown LA. The natriuretic-peptide family. *Lancet.* 1997;349:1307-10.