

압력과부하에 의한 좌심실 비후와 섬유화의 발생에 있어 Angiotensin II Type 1A Receptor-Mediated Signaling의 역할

충북대학교 의과대학 내과학교실

김영화 · 손주희 · 박해남 · 권진숙 · 배장환 · 황경국 · 김동운 · 조명찬

Role of Angiotensin II Type 1A Receptor-Mediated Signaling in the Development of Pressure Overload-Induced Left Ventricular Hypertrophy and Fibrosis

Young-Hwa Kim, MS, Ju-Hee Son, DVM, Hainan Piao, MD, Jin-Sook Kwon, DVM,
Jang-Whan Bae, MD, Kyung-Kuk Hwang, MD, Dong-Woon Kim, MD and Myeong-Chan Cho, MD
Department of Internal Medicine, College of Medicine, Chungbuk National University, Cheongju, Korea

ABSTRACT

Background and Objectives : The roles of angiotensin II (Ang II) in the regulation of heart function under normal and pathological conditions have been well documented, with its biological actions mainly mediated via the Ang II type 1A receptor (AT_{1A}R). Since the inhibition of the renin-angiotensin system can prevent or regress left ventricular hypertrophy (LVH) with hypertension, AT_{1A}R-mediated signaling is considered one of the important transcriptional pathways in the development of cardiac hypertrophy. **Subjects and Methods :** To address whether AT_{1A}R-mediated signaling plays an important role in the development of pressure overload-induced LVH and fibrosis, the physiological, biochemical, hemodynamic and histopathological parameters were evaluated before and after transverse aortic constriction (TAC) in wild-type (WT) and AT_{1A}R knockout (KO) mice. **Results :** Although the LV systolic pressure (83.2 ± 10.0 mmHg, n=5) of the KO mice was lower than that (90.0 ± 5.0 mmHg, n=7) of the WT mice, there was no difference in the increase in the LV systolic pressure between the WT and KO mice (WT, 42.0 mmHg; KO, 41.8 mmHg). Also, there was no difference between the baseline LV-to-body weight (LVW/BW) ratio between the two groups (WT, 3.10 ± 0.21 mg/g; KO 3.04 ± 0.21 mg/g). Two weeks after TAC, the degree of increase in the LVW/BW ratio was markedly increased in both the WT (4.17 ± 0.28 mg/g, n=9) and KO mice (4.16 ± 0.43 mg/g, n=8), which were almost identical (WT, 34.5%; KO, 36.8%). There were no significant differences in the LV end-diastolic pressure, LV+dP/dt_{max}, and heart rate between the two groups. The ERK44/42 and p38-MAPK activities in the LV were markedly increased by TAC in both groups, but that of JNK was not. Interstitial and perivascular fibrosis developed in both groups following TAC. However, the degree of increased fibrosis was significantly attenuated in the KO mice. **Conclusion :** These results suggest AT_{1A}R-mediated signaling is not indispensable for the development of pressure overload-induced LVH, and provides new insights into the development of novel therapeutic strategies for cardiac hypertrophy. (Korean Circulation J 2006;36:626-634)

KEY WORDS : Ventricular hypertrophy ; Fibrosis ; Renin-angiotensin system.

논문접수일 : 2006년 7월 24일

심사완료일 : 2006년 9월 4일

교신저자 : 조명찬, 361-711 충북 청주시 흥덕구 개신동 62 충북대학교 의과대학 내과학교실

전화 : (043) 269-6356 · 전송 : (043) 272-3252 · E-mail : mccho@cbnu.ac.kr

서 론

Renin-angiotensin system(RAS)은 심비후의 발생과 유지 및 심부전의 병태생리에 매우 중요한 역할을 한다.^{1,2)} 임상에서 심비후의 발생을 예방하고 이미 발생한 비후의 퇴행을 유발시키기 위해 angiotensin converting enzyme억제제(ACE inhibitor)나 angiotensin receptor blocker(ARB)가 사용되고 있다.³⁾ RAS에 관련된 물질 중 가장 강력한 혈관수축물질이며 분열촉진물질(mitogen)인 angiotensin II (Ang II)의 세포내 신호전달은 Ang II receptor를 통하여 이루어지며 그 중 Ang II type 1A receptor(AT₁A R)가 Ang II의 심혈관계 작용을 매개한다고 알려져 있으나,⁴⁻⁷⁾ Ichiki 등⁸⁾은 Ang II type 2 receptor(AT₂R) 또한 심혈관계의 조절에 관여한다고 보고하고 있다.

최근 유전적으로 형질을 변환시킨 동물을 통하여 RAS의 심혈관계에 대한 역할이 많이 규명되기는 하였으나 아직까지 완전히 밝혀지지는 않았다.⁹⁾ AT₁A R 유전자의 과발현 마우스(AT₁A R TG mouse)는 서맥과 부정맥 및 심방의 비후를 나타내나¹⁰⁾ AT₁A R 유전자를 완전 결핍시킨 마우스(AT₁A R KO mouse)는 저혈압, 심실중격결손 및 신장의 형태이상(dysmorphic kidney), renin-producing cell의 비후 등의 표현형을 보여 AT₁A R의 역할은 혈관수축, 알도스테론 분비, 혈관과 심장 및 신장의 비후, 세포 성장, 카테콜라민 분비 등인 것으로 알려져 있다.¹¹⁾ 심비후나 심근경색의 발생 등에 의해 AT₁A R 유전자의 발현이 증가(up-regulation)¹²⁾ 되나 심부전의 경우에는 AT₁A R의 발현은 감소(down-regulation)된다.¹³⁾

AT₂R 유전자의 과발현 마우스(AT₂R TG mouse)는 심박수의 감소(negative chronotropic effect), 혈관저항의 감소, Ang II에 대한 압력상승 효과의 감약 등이 있으며,¹⁴⁾ AT₂R 유전자를 완전 결핍시킨 마우스(AT₂R KO mouse)는 혈압의 상승, Ang II에 대한 압력상승 효과의 상승, 요관의 이상발달 등의 표현형을 보여 AT₂R의 역할은 voltage-gated I_k/I_{to} K⁺ channel activation, T-type Ca²⁺ channel inhibition, 성장억제, 세포자멸사(apoptosis), 혈관확장 등으로 알려져 있다.^{8,15)}

현재까지의 연구결과를 종합하면 고혈압과 심비후에 AT₁A R 유전자의 다형성이 관여하고 있으며, Ang II receptor-mediated signaling pathway가 심혈관계의 발달과 기능의 유지 및 심비후와 심근의 섬유화 발생에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다. 본 연구에서는 이 사실이 압력과부하로 유발된 좌심실 비후에서도 적용되는지를 확인하기 위하여 AT₁A R를 매개로 하는 Ang II의 작용이 완전히 제거된 AT₁A R KO mouse에서 횡행대동맥 부분결찰(transverse aortic constriction, TAC)로 좌심실에 혈액역학적 압력과부하를 유발시켜 TAC 전·후의 압력차 발생이나 좌심실 비후 및 섬유화가 발생하는지를 확인하고자 하였다. 또한, TAC을 통해 발

생되는 좌심실의 구조와 기능 및 유전자 발현의 변화도 분석하여 심비후에 관여하는 해부병리학적 및 생화학적 변화를 분석하고 심비후의 다른 발생기전에 대해서도 고찰하고자 하였다.

대상 및 방법

대 상

AT₁A R KO mouse는 미국 University of North Carolina at Chapel Hill 의과대학 병리학교실의 Oliver Smithies 교수로부터 분양받아 이 형질전환마우스를 유지 관리하고 있는 한국생명공학연구원 오구택 박사로부터 제공받았다. AT₁A R KO mouse와 wild-type(WT) mouse는 유전적으로 같은 배경(C57B6)을 가지는 마우스로 하였으며, 실험동물은 물과 사료를 자유롭게 공급받았다.

방 법

Angiotensin II에 의한 좌심실의 혈액역학적 변화

WT mouse와 AT₁A R KO mouse는 마취에 의한 심기능의 효과를 최소화하기 위해 avertin으로 마취를 한 후 오른쪽 경동맥에 압력측정을 위한 1.4F high-fidelity micromanometer catheter(Millar Instruments, USA)를 삽입하고 조심스럽게 전진시켜 상행대동맥을 거쳐 좌심실에 삽입하여 좌심실의 압력곡선이 나오면 그 상태에서 유지시켰다. 오른쪽 목정맥(jugular vein)에 PE50 catheter를 삽입하여 처음 3분간 안정을 시킨 후 30초간의 시간 간격으로 Ang II(Sigma, USA)를 0.1, 1.0, 10, 20 g/kg의 농도로 투여하면서 좌심실 압력과 심박수를 50 mm/sec의 속도로 기록하였다.

압력과부하로 유발된 좌심실 비후모델의 혈액역학적 변화

12주된 수놈 WT mouse와 AT₁A R KO mouse를 대상으로 ketamine과 xylazine을 복강 내로 투여하여 마취시킨 후 기관내삽관을 하고 소동물 인공호흡기(Harvard rodent ventilator Model 683, USA)에 연결시켜 양압 인공호흡을 실시하였다. 일회호흡량은 0.2~0.3 cc로 유지하고 분당 호흡수는 100~110회로 하며 이후 모든 수술은 수술현미경(dissecting microscope) 하에서 이루어지며 미세수술기법을 이용하였다.

현미경하에서 좌측 두 번째 늑간 부위에 작은 구멍을 만들고 박리하여 특별히 제작된 구멍이 있는 microcurette으로 좌우 경동맥 중간의 횡행대동맥을 위로 떠올린 후 microcurette 구멍에 7-0 black silk를 끼운 후 빼내었다. 짧은 26G blunt needle을 횡행대동맥 위에 올려 놓고 7-0 black silk로 완전 결찰시킨 후 26G blunt needle을 빨리 제거하면 횡행대동맥의 부분결찰에 의한 좌심실의 압력과 부하가 발생하게 되고(Fig. 1), 2주 후에는 동심성 좌심실

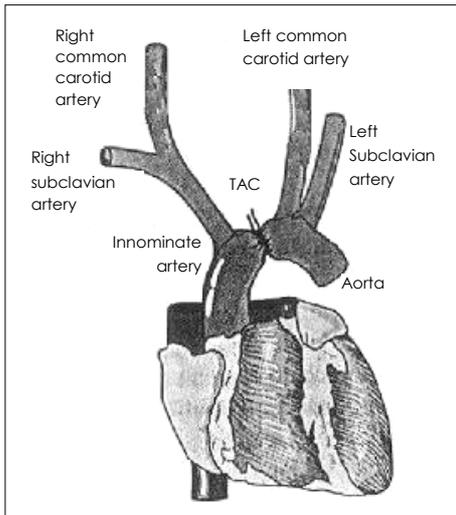


Fig. 1. Schematic illustration of the mouse model of LV hypertrophy. Pressure overload-induced LV hypertrophy was generated by the transverse aortic constriction (TAC).

비후가 발생하는 모델이 형성되었다.¹⁶⁻¹⁸⁾

실험 동물을 TAC 수술 2주 후에 다시 마취한 후 인공호흡시키고 오른쪽 경동맥에 압력측정을 위한 1.4F high-fidelity micromanometer catheter(Millar Instruments, USA)를 삽입하고 좌심실의 압력곡선이 나올 때까지 조심스럽게 전진시켰다. 좌심실의 수축력 지표인 좌심실압의 일차미분값(LV+dP/dt_{max})과 좌심실말압(left ventricular end-diastolic pressure, LVEDP) 및 좌심실 수축기압(left ventricular systolic pressure, LVSP)을 측정하였으며 심박수는 압력곡선으로 구하였다. TAC 전후의 압력차를 확인하기 위해 좌측 경동맥이나 우측 고동맥(femoral artery)에 삽관하여 혈압을 측정하였으며, 상해대동맥과의 압력차를 계산하였다.

압력과부하에 의한 좌심실 비후에서 Angiotensin II 수용체 아형의 발현 변화

정상적으로 좌심실에서 AT_{1A}R mRNA와 AT₂R mRNA의 농도는 매우 낮게 존재하므로 WT mouse와 AT_{1A}R KO mouse에서 TAC 후의 AT_{1A}R와 AT₂R의 유전자의 발현정도의 차이를 RT-PCR을 통해 비교하였다. 혈액학 인자들의 측정이 모두 끝난 후 실험동물에서 심장을 적출하여 좌심실만 분리한 후 Trizol(Invitrogen, USA)로 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA 4 μg으로 first-strand cDNA synthesis kit (Amersham Biosciences, UK)를 이용하여 cDNA를 만들어 RT-PCR에 이용하였다. 대조용 유전자로는 β-actin을 사용하여 동일한 양의 cDNA임을 보여주었다. AT_{1A}R KO mouse에서 RT-PCR로 AT_{1A}R 유전자의 완전 결핍을 먼저 확인하였고, 양 군에서 압력과부하에 의한 AT_{1A}R와 AT₂R의 유전자의 발현정도를 비교하였으며 분석에 사용된 oligonucleotide primer는 다음과 같았다.

AT_{1A}R: 5'-CGAGTCCCGCGAATTCA-3'

5'-TTCACAGGCTTGAG-3'
 AT₂R: 5'-TTGCTGCCACCAGCAGAAAC-3'
 5'-GTGTGGGCCTCCAAACC-3'
 β-actin: 5'-AACCGTGAAAAGATGACCCAG-3'
 5'-CTCCTGCTTGCTGATCCACAT-3'

압력과부하에 의한 좌심실 비후에서 Mitogen-activated protein kinase(MAPK) pathway의 변화

Extracellular signal-regulated kinase(ERK44/42), p38-MAPK, c-Jun N-terminal kinase(JNK)의 발현량의 변화를 알아보기 위해 실험동물로부터 심장을 적출한 즉시 증류수와 함께 분쇄하여 원심분리한 후 상층액을 제거하고 남은 침전물(pellet)에 약 10배의 solubilization buffer를 넣고 4℃에서 1시간 방치하였다. 이것을 원심 분리하여 상층액을 모아 실험에 사용하였다. 단백질 농도를 측정하여 30 μg에 sample buffer를 넣고 95℃에서 5분간 처리 후, miniature gel apparatus(Mini-protein, Bio-Rad Labs, USA)을 이용하여 10% SDS-polyacrylamide gel에 전기영동시켰다. 그 후 polyvinylidene fluoride(PVDF)에 electrotransfer (120 volts, 90분) 시켰다. 비특이적인 단백질 결합을 방지하고자 blocking buffer(5% skim milk) 용액에 PVDF membrane을 넣고 4℃에서 하룻밤을 방치한 후 익일에 일차 항체(anti-mouse phospho-erk1/2, anti-rabbit erk1/2, anti-rabbit phospho-p38-MAPKs, anti-rabbit p38-MAPKs, anti-rabbit phospho-JNKs, anti-rabbit JNKs, Cell signaling, USA)를 blocking buffer에 1 : 1000으로 희석한 후 실온에서 60분간 방치하였다. TBS(0.1% tween-20)로 세척(5분, 3회)한 후 이차 항체(anti-mouse, anti-rabbit Ig, horseradish peroxidase linked whole antibody, Cell signaling, USA)를 blocking buffer에 1 : 1000으로 희석한 후 실온에서 60분간 방치하였다. TBS(0.1% tween-20)로 세척(5분, 3회)한 후, enhanced chemiluminescence(ECL-kit, Amersham, UK)를 1분간 처리하여 X-ray 필름에 1분간 감광시켜 발현정도를 확인하였다.

압력과부하에 의한 좌심실 비후정도의 비교와 조직병리학적 검사

혈액학적 분석이 끝난 후 심장을 적출하여 전체 심장의 무게를 잰 후 각각의 심방과 심실로 나누어 무게를 재고 조직 검사를 위해 고정하였으며, 일부는 액체 질소에 snap freeze 시킨 후, 나중에 생화학적 및 분자생물학적 검사를 실시하였다. 좌심실 비후정도를 비교하기 위해 심장과 좌심실 무게는 체중으로 표준화시켰다.

조직병리학적 변화를 보기 위하여 심장을 10% 포르말린으로 24시간 고정한 후 파라핀에 포매한 후 이 표본을 4 μm 두께로 cross section하여 슬라이드에 붙여 염색하였다. 심장은 종단면과 횡단면으로 잘라 H&E 염색과 Massons Trichrome 염색을 실시하였고, 심근의 간질조직과 혈관 주

위 조직의 섬유화 정도를 정량화하기 위하여 Sirius-red F3BA 염색을 시행하였다. 100배의 현미경하에서 컴퓨터를 이용하여 각각의 슬라이드에서 무작위로 5개 부위를 취한 다음 영상분석기(Image Analyzer, IMT, USA)로 섬유화의 정도를 정량화하였다.

통계처리

모든 자료의 값은 평균±표준편차로 표시하였으며 유의성은 paired Student *t*-test를 통해 검증하였고, p 값이 0.05 미만인 경우를 통계적으로 의미가 있는 것으로 하였다.

결 과

압력과부하에 의한 좌심실 비후에서 angiotensin II 수용체 아형의 발현 변화

본 실험에 사용한 AT_{1A}R KO mouse의 유전자형(genotype)을 확인하기 위해 RT-PCR로 심장의 AT_{1A}R mRNA의 발현 여부로 확인한 결과 AT_{1A}R KO mouse에서는 AT_{1A}R mRNA가 발현되지 않았다. 심장의 AT₂R mRNA의 발현은 AT_{1A}R 유전자를 배아 때 부터 완전히 제거하더라도 대조군 심장의 AT₂R mRNA 발현과 유의한 차이를 보이지 않았다. 이

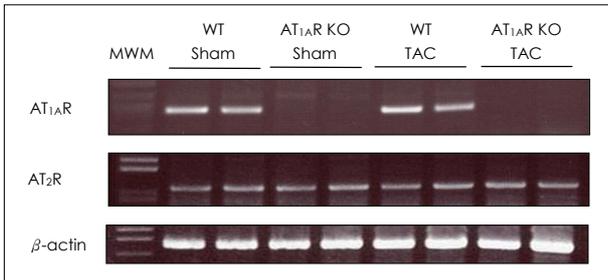


Fig. 2. Expression level of AT_{1A}R and AT₂R mRNA in the hypertrophied LV which was induced by pressure overloading. LV: left ventricular, AT_{1A}R: angiotensin receptor type 1A, AT₂R: angiotensin receptor type 2A, MWM: molecular weight marker, WT: wild type mice, KO: knockout mice, TAC: transverse aortic constriction.

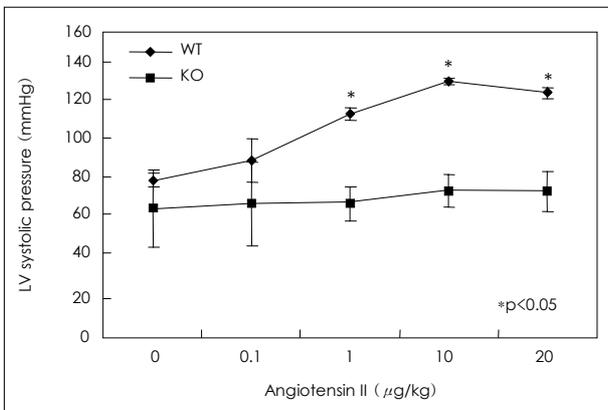


Fig. 3. Serial changes of LV systolic pressure by the incremental infusion of angiotensin II via right jugular vein. LV: left ventricular, WT: wild type mice, KO: knockout mice.

결과는 Ang II가 작용을 나타내기 위해 결합하는 주된 수용체인 AT_{1A}R가 없거나 밀도가 감소하면 Ang II의 다른 수용체인 AT₂R가 보상적으로 발현이 증가할 것으로 예상되었으나 이외는 달리 AT₂R mRNA 발현에 영향을 미치지 못하였다.

WT mouse와 AT_{1A}R KO mouse 모두에서 TAC으로 심장에 압력과부하를 가하여 좌심실비후를 유발시키더라도 AT_{1A}R mRNA와 AT₂R mRNA의 발현에는 유의한 변화를 일으키지는 못하였다(Fig. 2).

AT_{1A}R KO mouse와 WT mouse에서 Angiotensin II 주입에 따른 혈역학적 변화

AT_{1A}R를 매개로 하는 Ang II의 작용이 완전히 제거된 AT_{1A}R KO mouse에서의 Ang II 주입으로 인한 혈역학적 변화를 알아보기 위하여 0.1, 1.0, 10, 20 µg/kg의 Ang II를 30초 간격으로 목정맥을 통해 주입하면서 좌심실 압력과 심박수의 변화를 관찰한 결과, WT mouse에서는 Ang II 주입에 의해 급격한 혈압과 심박수의 상승효과가 농도의 존적으로 보였으나 AT_{1A}R KO mouse에서는 AT_{1A}R 수용체가 없어 Ang II의 작용이 완전히 차단되어 있으므로 예상한 대로 Ang II 주입에 따른 혈압과 심박수의 상승효과가 거의 없었으며(Fig. 3), 이러한 미미한 혈압의 상승은 정맥으로 Ang II가 포함된 생리적식염수의 반복주입으로 인한 용적증가에 따른 혈압 상승으로 추정되었다.

횡행대동맥 결찰로 인한 압력과부하 좌심실 비후모델의 혈역학적인 변화

12주령 AT_{1A}R KO mouse의 LVSP(83.2±10.0 mmHg, n=8)는 같은 주령의WT mouse의 LVSP(90.0±5.0 mmHg, n=9)보다 평균 6.8 mmHg 정도 낮았다. 7-0 black silk 로 횡행대동맥을 결찰하는 순간 WT mouse(n=2)와 AT_{1A}R KO mouse(n=2)의 상행대동맥 최대수축기압은 150~160 mmHg 까지 상승하였고 5~10분 이내에 130~140 mmHg 정도에서 안정되었다.

TAC으로 좌심실에 압력과부하를 유발시키고 2주가 경과한 후에 우측 경동맥으로 1.4F Millar catheter를 삽입하여 LVSP, LV +dP/dtmax, LVEDP를 측정하였고, 좌측 경동맥이나 우측 고동맥으로는 동맥압을 측정하여 TAC 전후의 압력차를 비교하였다. WT mouse(n=9)에서 TAC 2주 후의 LVSP는 132.0±8.4 mmHg로 TAC에 의해 LVSP의 평균 증가값은 42.0 mmHg이었으며, AT_{1A}R KO mouse(n=8)에서는 TAC 후의 LVSP는 125.0±9.6 mmHg로 LVSP의 평균 증가값이 41.8 mmHg로 두 군 간의 유의한 차이가 없었다. 또한 LVEDP, LV +dP/dtmax와 심박수도 두 군 간에 유의한 차이가 없었다.

TAC 2주 후에 WT mouse(n=9)의 LV weight/BW(LVW/BW) ratio는 3.10±0.21 mg/g에서 4.17±0.28 mg/g으로,

AT₁A_R KO mouse(n=8)의 LVW/BW ratio는 3.04±0.21 mg/g에서 4.16±0.43 mg/g으로 두 군 모두에서 현저한 증가를 보였으며, 좌심실 비후의 정도도 두 군이 유사하였다(LVW/BW ratio의 변화: WT, 34.5%; AT₁A_R KO 36.8% 증가). Heart weight/body weight(HW/BW)의 변화도 같은 소견을 보였다(Table 1).

이로써 AT₁A_R를 대개로 하는 Ang II의 작용이 완전히 제거된 AT₁A_R KO mouse는 WT mouse에 비해 기저 LVSP가 다소 낮기는 하지만 TAC으로 혈액학적 압력과부하를 유발시켰을 때에도 WT mouse와 같은 정도의 유의한 압력차가 발생하여 2주간 잘 유지됨이 확인되었고, 압력과부하에 의한

좌심실의 비후도 WT mouse와 같은 수준으로 발생하였다.

압력과부하 좌심실 비후모델에서 MAPK의 변화

AT₁A_R KO mouse의 심근에서 측정된 MAPK 활성도는 WT mouse의 심근과 차이를 보이지 않았다. WT mouse와 AT₁A_R KO mouse에서 압력과부하로 좌심실 비후를 유도하였을 때 MAPK 활성도의 변화를 알아보려고 immunoblotting을 한 결과 ERK1/2와 p38-MAPK는 두 군 모두에서 TAC에 의해 활성도가 유의하게 증가하였다. 그 중 phospho-ERK1/2의 활성도는 AT₁A_R KO mouse에 비해 WT mouse에서 유의하게 증가되어 있었다. JNK는 TAC으로 좌심실에 압력

Table 1. Comparison of physiological and hemodynamic parameters in WT mouse and AT₁A_R KO mouse

	WT mouse		AT ₁ A _R KO mouse	
	Sham (n=9)	TAC (n=9)	Sham (n=5)	TAC (n=8)
BW (g)	25.3±1.4	28.1±2.9*	20.8±1.7	24.5±1.3*
HW/BW (mg/g)	4.08±0.26	5.36±0.55*	3.87±0.2	5.36±0.79*
LVW/BW (mg/g)	3.10±0.21	4.17±0.28*	3.04±0.21	4.16±0.43*
LVSP (mmHg)	90.0±5.0	132.0±8.4*	83.2±10.0	125.0±9.6*
LVEDP (mmHg)	13.2±3.0	12.8±1.3	11.8±1.8	14.3±3.6
LV+dp/dtmax	2.7±0.3	5.6±0.7*	2.8±0.3	5.1±0.7*
LV-dp/dtmin	2.7±0.4	5.2±0.4*	2.8±0.3	4.5±0.9*
HR (/min)	374.0±100.4	360.0±106.8	420.0±94.9	397.5±94.5

Value are mean ± SEM. *: p<0.05 vs baseline. TAC: transverse aortic constriction, BW: body weight, HW: heart weight, LVW: left ventricular weight, LVSP: LV systolic pressure, LVEDP: LV end-diastolic pressure, HR: heart rate, KO: knockout mice, WT: wild type mice

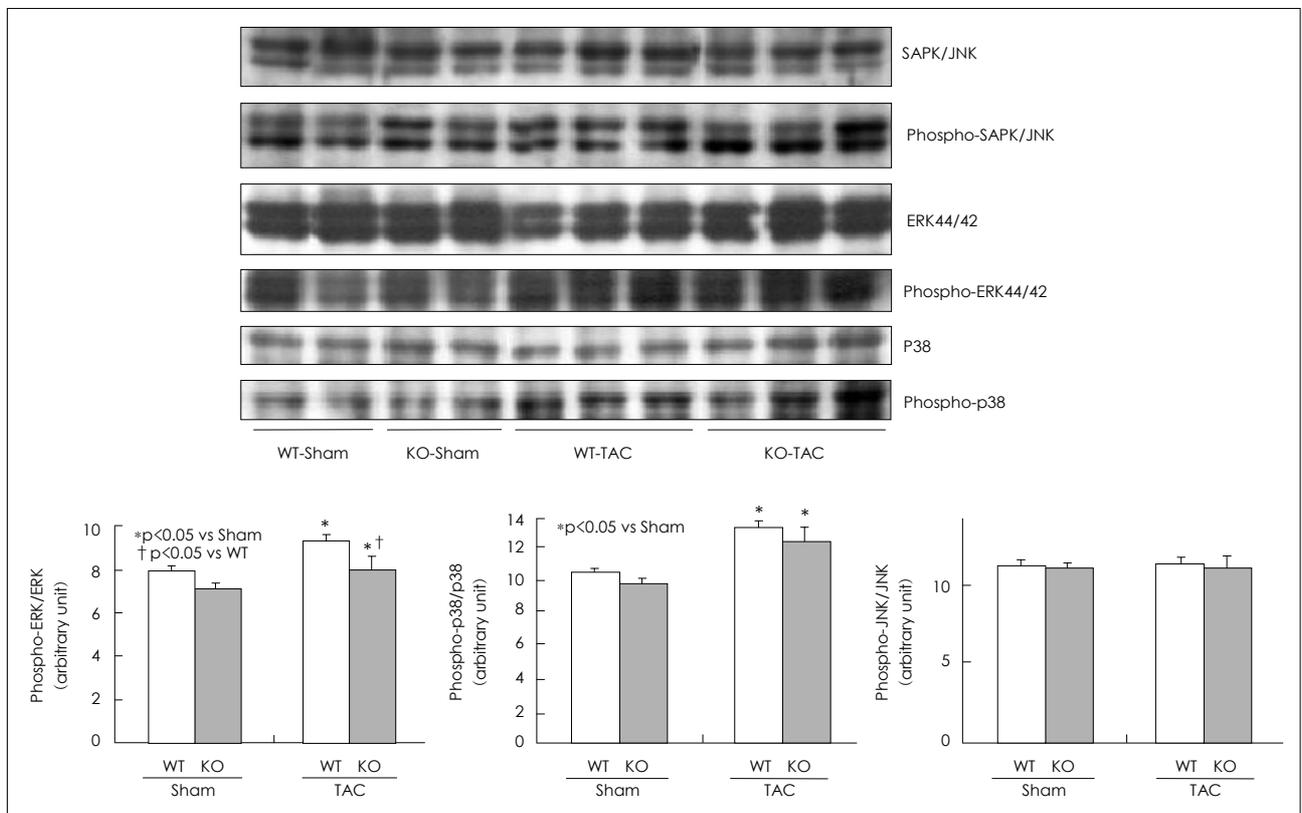


Fig. 4. Activation of MAPKs in the hypertrophied LV which was induced by pressure overloading. SAPK/JNK: stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase, TAC: transverse aortic constriction, ERK44/42: extracellular signal-regulated kinase 44/42.

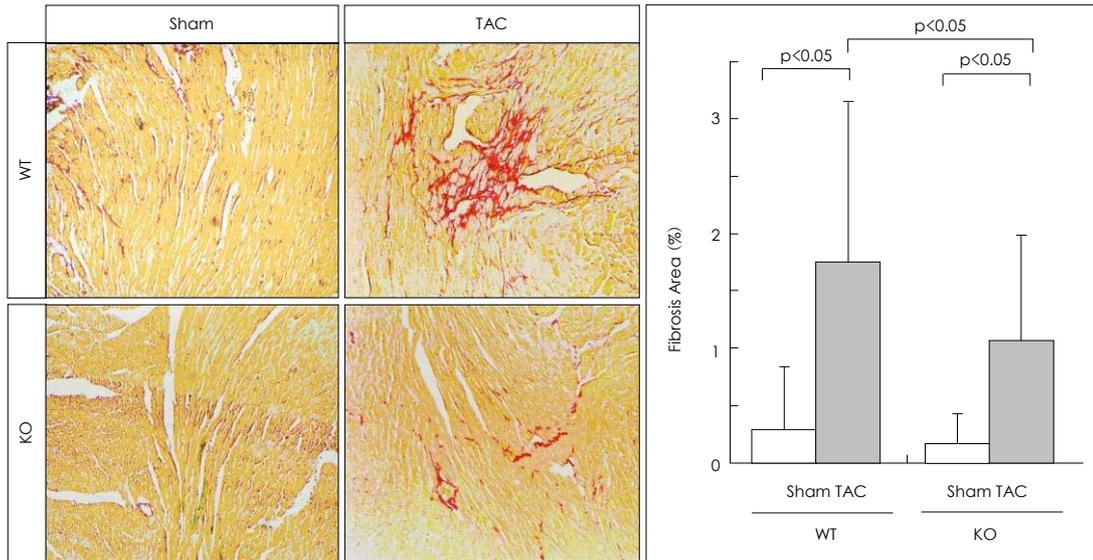


Fig. 5. Interstitial and perivascular fibrosis was not remarkable in the hypertrophied LV of AT1AR KO mouse which was induced by pressure overloading. TAC: transverse aortic constriction, WT: wild type mice, KO: knockout mice.

과부하를 가하더라도 두 군 모두에서 기저치에 비해 활성화도의 차이를 보이지 않았다(Fig. 4).

압력과부하에 의한 좌심실비후의 조직병리학적 변화

Sirius-red F3BA 염색을 한 심장 절편을 관찰하고 섬유화 정도를 영상분석기로 정량화한 결과 WT mouse의 심장 간질 조직의 섬유화 정도는 전체 심실면적의 $0.28 \pm 0.55\%$ 를 차지하였으며 AT1AR KO mouse의 섬유화 정도는 $0.17 \pm 0.26\%$ 로 미미하였다. 압력과부하로 좌심실비후를 유발한 경우 WT mouse의 심장 간질조직에서의 섬유화 정도는 전체 심실면적의 $1.74 \pm 1.41\%$ 로 기저치에 비해 유의하게 증가하였으며, AT1AR KO mouse도 섬유화 정도가 $1.07 \pm 0.91\%$ 로 유의하게 증가하였다(Fig. 5). 그러나 TAC에 의한 압력과부하시 AT1AR KO mouse의 섬유화의 정도는 WT mouse에 비해 유의하게 적었다. 또한 혈관주위의 섬유화도 같은 소견을 보였다(data not shown).

고 찰

Renin-angiotensin system(RAS)은 생체내의 전해질, 수액 조절에 중요한 역할을 하고, 혈관의 긴장도에 영향을 미쳐 혈압의 조절에도 중요하며, AT1A수용체를 통한 Ang II가 고혈압과 심비후에 결정적인 역할을 하는 것으로 알려져 있다.⁴⁻⁷⁾ 본 연구에서는 AT1AR KO mouse를 이용하여 압력과부하에 의한 좌심실 비후와 섬유화에 있어 AT1AR의 역할을 명확히 하고자 하였다. 또한 Ang II receptor-mediated signaling pathway가 압력과부하에 의한 좌심실 비후에 필수적인 신호전달계가 아니라면 RAS 이외의 다른 발생기전에 대해서도 알아보려고 하였다.

많은 고혈압 동물 모델이 있지만, 사람의 고혈압을 연구할 수 있는 완벽한 모델은 없다. Baker 등¹⁹⁾과 Linz 등²⁰⁾은 복부대동맥의 부분 결찰에 의한 압력과부하는 RAS의 활성화에 의해 심비후를 일으킨다고 보고하면서 좌심실 비후의 발생과 진행을 설명하는 신호전달계의 해석상에 문제점이 생길 수 있다고 하였다.²¹⁾²⁰⁾ 본 연구에서 이용한 동물 모델이 AT1AR KO mouse이며 연구의 목적이 압력과부하에 의한 좌심실비후에 AT1AR의 역할 규명임을 감안할 때 RAS의 활성화에 영향을 받지 않는 압력과부하 좌심실비후 모델을 이용하여야 결과의 해석에 제약을 받지 않는다. 따라서 본 연구에서는 횡행 대동맥의 부분 결찰(TAC)로 좌심실에 순수한 압력과부하를 가한 동물모델을 사용하였다. 이 모델은 고혈압의 많은 요인 중에서 압력의 효과만을 비교적 분리하여 실험할 수 있다는 장점이 있으며, 압력과부하를 해소할 수도 있어 이에 따른 회복에 관한 연구도 할 수 있다. 또한 갑작스런 혈압상승이 일어나는 상황에 대한 좋은 모델이 될 수도 있다. 이러한 이유로 횡행 대동맥 결찰로 인한 좌심실 비후는 심비후를 연구하기 위해 많이 사용되고 있으며,¹⁶⁾²¹⁻²³⁾ 압력과부하에 의한 좌심실비후에 AT1AR의 역할을 조사하기 위해서도 적합한 모델이라고 여겨진다. TAC을 하면 좌심실에 30~40 mmHg 정도의 압력과부하를 가해지며, 1~2주 후의 심장 무게는 35% 정도 증가하고, atrial natriuretic factor와 β -myosin heavy chain의 발현은 증가하나 sarco(endo)plasmic reticulum Ca^{2+} ATPase의 활성화도는 감소한다고 보고되어져 있고²¹⁻²³⁾ 본 연구에서도 같은 결과를 보였다.

본 연구에 이용한 실험동물이 AT1A 수용체가 완전히 제거되었음을 확인하기 위해 RT-PCR로 AT1AR mRNA가 발현되지 않음을 확인하였고, WT mouse와 달리 Ang II의 정

맥주입에 의한 혈압과 심박수의 변화가 거의 없음을 확인하였다. AT_{1A}R가 없으면 AT₂R의 발현이 증가할 것으로 예상되었으나 이와는 달리 AT₂R mRNA 발현에 영향을 미치지 못하였다. Ang II의 또 다른 수용체인 AT_{1B}R의 발현은 확인하지 않아 변화를 알 수 없으나 AT_{1B}R KO mouse의 심혈관계 표현형은 거의 없으며 혈압도 정상인 점을 고려할 때 AT_{1B}R는 심혈관계에 중요한 역할을 담당하지 않는 것으로 생각된다.

압력과부하로 인한 좌심실 비후의 정도를 HW/BW ratio와 LVW/BW ratio로 분석하였을 때 WT mouse와 AT_{1A}R KO mouse 모두에서 증가한 결과를 보였으며 이러한 실험 결과는 급성 압력과부하를 유발한 AT_{1A}R KO mouse에서 좌심실 비후가 발생하였다는 Harada 등²⁴⁾의 결과와 일치하였다. AT_{1A}R KO mouse에서는 AT_{1A}R가 전혀 작동하지 않음에도 불구하고 TAC을 유발할 당시 뿐만 아니라 2주 후까지도 AT_{1A}R의 존재와 관계없이 혈압이 상승한다는 결과를 얻을 수 있어 TAC에 의한 초기 혈압상승과 이의 유지 및 좌심실 비후에 AT_{1A}R-mediated signaling은 필수 불가결한 요인이 아님을 보여주었다. 따라서 압력과부하에 의한 좌심실 비후의 발생에 있어 AT_{1A}R-independent signaling pathway에 대한 연구가 이루어져야 함을 시사하며 본 연구에서는 심비후 초기와 심부전으로의 이행에 있어 중요한 역할을 하리라고 생각되는 MAPK pathway에 대해 알아보았다.

WT mouse와 AT_{1A}R KO mouse에서 압력과부하로 좌심실비후를 유도하였을 때 MAPK 중 ERK1/2와 p38-MAPK는 두 군에서 TAC에 의해 활성도가 유의하게 증가하였으나, JNK는 TAC으로 좌심실에 압력과부하를 가하더라도 변화를 보이지 않아 MAPK pathway도 AT_{1A}R KO mouse에서 압력과부하에 의한 좌심실비후를 일으키는 신호전달의 전부가 아닌 것으로 생각되었다. 실제로 심비후와 심부전에 관여하는 신호전달체계는 많으며 서로 복잡하게 얽혀 있어서 규명하기가 매우 힘들지만 최근에 유전적으로 형질을 변환시킨 동물들을 이용하여 밝혀진 신호전달체계를 살펴 보면 MAPK pathway 외에 gp130 pathway와 JAK-STAT, Ras나 Rho 같은 small G protein, Gq와 protein kinase C, Ca²⁺/calmodulin dependent phosphatase인 calcineurin과 NFAT, Ca²⁺/calmodulin dependent protein kinase 등이 알려져 있다.¹⁶⁾²⁵⁻²⁷⁾ AT_{1A}R KO mouse에서 압력과부하로 좌심실비후가 유도되는 기전을 규명하기 위해 이 많은 신호전달체계를 모두 다 확인하기는 쉽지 않으나 cDNA microarray 같은 gene chip을 이용하여 게놈 상에 존재하는 모든 유전자의 발현패턴을 분석(gene expression profiling)함으로써 심비후의 새로운 신호전달경로와 병태생리 기전들을 찾아낼 수 있을 것으로 기대된다.¹⁸⁾

심비후는 주로 심근세포의 비후에 의해서 일어나지만 심근 간질조직과 혈관주변부위의 섬유화 증가에 의해서도 발

생된다. 2주 간의 압력과부하로 인한 좌심실의 조직학적인 변화에서 AT_{1A}R KO mouse는 WT mouse와 같이 심근 간질조직과 혈관주변부위의 섬유화 정도가 모두 증가하였다. 그러나 섬유화의 증가의 정도는 WT mouse에 비해 AT_{1A}R KO mouse에서 의미 있게 적게 발생하였다. 이는 AT_{1A}R의 부재로 Ang II의 작용이 적어 섬유화를 일으키는 중요한 원인 중 하나인 알도스테론의 분비량이 감소되었기 때문으로 생각할 수 있다. 하지만 최근의 연구에 의하면 혈관평활근 세포에서 AT₂R를 자극시키면 G α i를 통해 콜라겐 합성을 증가시키고,²⁸⁾ AT₂R KO mouse에서 Ang II 주입시 심비후가 발생하지 않고 심근 간질조직과 혈관주변부위에 섬유화가 잘 일어나지 않았다는 보고들²⁹⁾³⁰⁾을 종합하면 AT₂R가 심근의 비후와 섬유화에 중요한 역할을 담당하리라 판단되어 본 연구결과와는 다소 다른점이 있어 향후 압력과부하에 의한 심근의 섬유화에 관계되는 RAS의 연관성에 대한 추가적인 연구가 있어야 할 것으로 생각된다.

결론적으로 본 연구를 통해 심혈관계에 압력과부하를 가하였을 때 혈압의 상승과 유지 및 좌심실의 비후에 있어 Ang II receptor-mediated signaling pathway가 필수 불가결한 신호전달계가 아니고 MAPK 등을 포함한 AT_{1A}R-independent signaling pathway가 관여하고 있음을 시사하였다. 심비후는 심근세포의 비후와 더불어 심근 간질조직과 혈관주변부위의 섬유화가 증가하여 발생하는 데 AT_{1A}R KO mouse에서 압력과부하로 유발한 좌심실 비후는 섬유화 발생이 억제되어 RAS가 좌심실의 섬유화에는 관여함을 입증하였다. 본 연구에서 AT_{1A}R-independent signaling pathway에 대한 연구가 완전하게 이루어지지 않았지만, 상당한 기간과 복잡한 과정을 통하는 심비후의 원인 중 하나인 AT_{1A}R-independent signaling pathway의 이해를 하기 위해 꾸준한 연구가 뒤따라야 하겠으며 향후 압력과부하에 의한 심비후의 치료나 예방에 있어 새로운 전략이 필요함을 제시하였다.

요 약

배경 및 목적 :

Renin-angiotensin system의 억제는 고혈압을 가진 동물 모델과 임상에서 좌심실의 비후의 예방과 퇴행을 유발할 수 있으며, angiotensin II type 1A receptor(AT_{1A}R)-mediated signaling은 심비후의 진행에 중요한 전달 경로 중 하나로 알려져 있다. 그러나 최근에는 angiotensin II (Ang II)로 유발되는 고혈압에서 AT_{1A}R가 아니라 AT₂R가 심비후의 진행에 필수적이라는 보고도 있어 이에 대한 기전 연구가 보다 심도있게 이루어져야 한다. 본 연구에서는 wild-type(WT)과 AT_{1A}R knockout(KO) mouse에서 횡행대동맥의 부분결찰(transverse aortic constriction, TAC) 전·후의 좌심실의 구조와 기능 및 생화학적 변화를 평가하였다.

방 법 :

12주된 수놈 WT mouse와 AT_{1A}R KO mouse를 대상으로 Ang II에 의한 혈액학적 변화를 알아보고, TAC으로 압력 과부하 좌심실비후 모델을 만들었다. 압력과부하에 의한 좌심실 비후에서 Ang II 수용체 아형의 발현정도의 변화와 mitogen-activated protein kinase(MAPK) pathway의 변화를 알아보고 좌심실 비후정도의 비교와 조직병리학적 검사를 실시하였다.

결 과 :

Ang II를 정맥주입하여 좌심실압력과 심박수의 변화를 관찰한 결과, WT mouse에서는 급격한 혈압상승이 있었으나 KO mouse에서는 혈압상승효과가 거의 없었다($p < 0.05$). WT mouse와 KO mouse 모두에서 압력과부하에 의한 좌심실 비후에서 AT_{1A}R와 AT₂R 유전자의 발현정도에는 유의한 변화가 없었으며, MAPK 활성도의 변화를 알아본 결과 ERK44/42와 p38-MAPK는 두 군 모두에서 TAC에 의해 활성도가 증가하였으나 JNK는 두 군 모두에서 활성도의 차이가 없었다. AT_{1A}R KO mouse의 LV systolic pressure(83.2 ± 10.0 mmHg, $n=5$)는 WT mouse(90.0 ± 5.0 mmHg, $n=7$)보다 낮았지만, TAC에 의한 LV systolic pressure의 평균 증가값은 유사하였고(WT, 42.0 mmHg; KO, 41.8 mmHg), LV end-diastolic pressure, LV +dP/dtmax와 심박수는 두 군 간에 차이가 없었다. TAC 2주 후에 LV weight/BW ratio는 WT(4.17 ± 0.28 mg/g, $n=9$)뿐만 아니라 KO mouse(4.16 ± 0.43 mg/g, $n=8$)에서도 현저한 증가를 보였으며, 좌심실 비후의 정도도 두 군이 유사하였다(LV weight/BW ratio WT, 34.5%; KO 36.8% 증가). 압력과부하로 인한 좌심실의 조직학적인 변화에서 AT_{1A}R KO mouse는 WT mouse와 같이 심근 간질조직과 혈관주위조직의 섬유화의 정도가 모두 증가했다. 그러나 섬유화의 증가의 정도는 WT mouse에 비해 KO mouse에서 통계적으로 의미있게 적게 발생하였다.

결 론 :

이상의 결과를 종합하면 RAS는 심비후에 중요하기는 하나 압력과부하에 의한 좌심실 비후의 발생에 AT_{1A}R-mediated signaling이 꼭 필수불가결한 신호전달체계가 아님을 확인하였으며, 압력과부하에 의한 좌심실 비후시 나타나는 심근 간질조직과 혈관주위조직의 섬유화 발생은 AngII-mediated signaling이 관여함을 제시하였다.

중심 단어 : 좌심실 비후 ; 섬유화 ; 레닌-안지오텐신계.

이 논문은 2002년도 한국학술진흥재단 지방대육성지원사업(과제번호 KRF-2002-002-E00043)과 대한순환기학회 학술연구비의 지원에 의하여 연구되었음.

REFERENCES

- Baker KM, Aceto JF. Angiotensin II stimulation of protein synthesis and cell growth in chick heart cells. *Am J Physiol* 1990; 259:H610-8.
- Baker KM, Booz GW, Dostal DE. Cardiac actions of angiotensin II: role of an intracardiac renin-angiotensin system. *Annu Rev Physiol* 1992; 54:227-41.
- Everett AD, Tufro-McReddie A, Fisher A, Gometz A. Angiotensin receptor regulates cardiac hypertrophy and transforming growth factor-beta 1 expression. *Hypertension* 1994; 23:587-92.
- Llorens-Cortes C, Greenberg B, Huang HM, Corvol P. Tissue expression and regulation of type I angiotensin II receptor subtypes by quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis. *Hypertension* 1994; 24:538-48.
- Kitami Y, Okura T, Marumoto K, Wakamiya R, Hiwada K. Differential gene expression and regulation of type-I angiotensin II receptor subtypes in the rat. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 188:446-52.
- Inagami T, Guo DF, Kitami Y. Molecular biology of angiotensin II receptors: an overview. *J Hypertens Suppl* 1994; 12:S83-94.
- Timmermans PB, Wong PC, Chiu AT, et al. Angiotensin II receptor antagonists. *Pharmacol Rev* 1993; 45:205-51.
- Ichiki T, Labosky PA, Shiota C, et al. Effects on blood pressure and exploratory behavior of mouse lacking angiotensin II type-2 receptor. *Nature* 1995; 377:748-50.
- Cho MC. Genetically-engineered mice for the study of cardiovascular disease. *Korean Circ J* 1999; 29 (Suppl):I142-53.
- Hein L, Stevens ME, Barsh GS, Pratt RE, Kobilka BK, Dzau VJ. Overexpression of angiotensin AT1 receptor transgene in the mouse myocardium produces a lethal phenotype associated with myocyte hyperplasia and heart block. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94:6391-6.
- Matsubara H. Pathophysiological role of angiotensin II type 2 receptor in cardiovascular and renal diseases. *Circ Res* 1998; 83:1182-91.
- Lefroy D, Wharton J, Crake T, et al. Angiotensin II receptor expression after myocardial infarction. *Br Heart J* 1995; 73:P32.
- Haywood GA, Gullestad L, Katsuya T, et al. AT1 and AT2 angiotensin receptor gene expression in human heart failure. *Circulation* 1997; 95:1201-6.
- Hiroya M, Tatsuya K, Akira Y, et al. Cardiac-specific overexpression of angiotensin II AT2 receptor causes attenuated response to AT1 receptor-mediated pressor and chronotropic effects. *J Clin Invest* 1998; 101:527-35.
- Hein L, Barsh GS, Pratt RE, Dzau VJ, Kobilka BK. Behavioural and cardiovascular effects of disrupting the angiotensin II type-2 receptor gene in mouse. *Nature* 1995; 377:744-7.
- Piao H, Kwon JS, Lee HY, et al. Role of calcineurin-dependent signaling pathway on left ventricular hypertrophy induced by pressure overload. *Korean Circ J* 2001; 31:1159-70.
- Kwon JS, Lee SJ, Kim YG, et al. Effect of pressure overload and its recovery on vascular reactivity and remodeling of rat carotid artery. *Korean Circ J* 2003; 33:936-48.
- Cho MC. Gene Expression Profiling and Detection of Novel Genes using cDNA Microarray in the Cardiac Hypertrophy Models. *Korean J Intern Med* 2003; 63 (Suppl II):S343-50.
- Baker KM, Chernin MI, Wixson SK, Aceto JF. Renin-angiotensin system involvement in pressure-overload cardiac hypertrophy in rats. *Am J Physiol* 1990; 259:H324-32.
- Linz W, Schoelkens BA, Ganten D. Converting enzyme inhibitor specifically prevents development and induces the regression of cardiac hypertrophy in rats. *Clin Exp Hypertens A* 1989; 11:1325-50.
- Schunkert H, Dzau VJ, Tang SS, Hirsch AT, Apstein CS, Lorell BH. Increased rat cardiac angiotensin converting enzyme activity and mRNA expression in pressure overload left ventricular hypertrophy: effects on coronary resistance, contractility, and relaxation. *J Clin Invest* 1990; 86:1913-20.

- 22) Schunkert H, Jackson B, Tang SS, et al. *Distribution and functional significance of cardiac angiotensin converting enzyme in hypertrophied rat hearts. Circulation 1993;87:1328-39.*
- 23) Bruckschlegel G, Holmer SR, Jandeleit K, et al. *Blockade of the renin-angiotensin system in cardiac pressure-overload hypertrophy in rats. Hypertension 1995;25:250-9.*
- 24) Harada K, Komuro I, Shiojima I, et al. *Pressure overload induces cardiac hypertrophy in angiotensin II type 1a receptor knockout mouse. Circulation 1998;97:1952-9.*
- 25) Wang Y. *Signal transduction in cardiac hypertrophy-dissecting compensatory versus pathological pathways utilizing a transgenic approach. Curr Opin Pharmacol 2001;1:134-40.*
- 26) Faber MJ, Agnetti G, Bezstarosti K, et al. *Recent developments in proteomics: implications for the study of cardiac hypertrophy and failure. Cell Biochem Biophys 2006;44:11-29.*
- 27) Minamisawa S, Sato Y, Cho MC. *Calcium cycling proteins in heart failure, cardiomyopathy and arrhythmias. Exp Mol Med 2004;36:193-203.*
- 28) Mifune M, Sasamura H, Shimizu-Hirota R, Miyazaki H, Saruta T. *Angiotensin II type 2 receptors stimulate collagen synthesis in cultured vascular smooth muscle cells. Hypertension 2000;36:845-50.*
- 29) Senbonmatsu T, Ichihara S, Price E Jr, Gaffney FA, Inagami T. *Evidence for angiotensin II type 2 receptor-mediated cardiac myocyte enlargement during in vivo pressure overload. J Clin Invest 2000;106:R25-9.*
- 30) Ichihara S, Senbonmatsu T, Price E Jr, Ichiki T, Gaffney FA, Inagami T. *Angiotensin II type 2 receptor is essential for left ventricular hypertrophy and cardiac fibrosis in chronic angiotensin II-induced hypertension. Circulation 2001;104:346-51.*