

안지오텐신II가 cGMP특이성 Phosphodiesterase 효소 유전자 발현에 미치는 영향

연세대학교 의과대학 순환기내과학교실,¹ University of Rochester, NY, US²

김동수¹ · 홍범기¹ · 권혁문¹ · 김동연¹ · 조윤희¹ · 윤세정¹ · 김현승¹ · Chen Yan²

Effect of Angiotensin II on Gene Expression of cGMP-Specific Phosphodiesterases

Dongsoo Kim, MD¹, Bum Kee Hong, MD¹, Hyuck Moon Kwon, MD¹, Dong Yun Kim, MD¹, Yoon Hyung Cho, MD¹, Se Jung Yoon, MD¹, Hyun-Seung Kim, MD¹ and Chen Yan, PhD²

¹Cardiology Division, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

²Center for Cardiovascular Research, University of Rochester, NY, US

ABSTRACT

Background and Objectives : Angiotensin II (Ang II) opposes the actions of nitric oxide (NO). A balance between Ang II and NO is critical for the maintenance of normal vessel tone, and is dependent on the intracellular cGMP level. We examined the effect of Ang II treatment on cGMP-hydrolyzing phosphodiesterases (PDEs), such as PDE1 and PDE5, the two major cGMP-hydrolyzing PDEs present in rat aortic vascular smooth muscle cells (VSMCs). We also investigated whether the Ang II signaling pathway affects the expression of the cGMP-hydrolyzing PDEs gene. **Materials and Methods** : VSMCs from Sprague-Dawley rats were incubated. Relative quantitative RT-PCR was performed for quantitation of PDE1A1, PDE5A1 mRNA expression a following in vitro Ang II treatment, and also done after pretreatment with inhibitors of the Ang II type1 (AT1) receptor, protein kinase C (PKC), mitogen activated protein kinase kinase (MEK) 1/2 and janus kinase 2 (JAK2) to investigate the effect of the Ang II signaling pathway on PDE1A1, PDE5A1 gene expression. Western blot analyses were performed to evaluate the changes of PDE1A1 and PDE5A1 protein level following treatment with Ang II. **Results** : Ang II (400 nM) increased the PDE1A1 and the PDE5A1 mRNA expression by 2.4 and 2.3-fold, respectively, 1 hour after treatment. Ang II also increased the protein level 2 hours after treatment. Inductions of PDE1A1 and PDE5A1 mRNA were blocked by the AT1 receptor inhibitors, PKC, MEK 1/2 and JAK2. **Conclusion** : In vitro Ang II treatment upregulates the PDE1A1, PDE5A1 gene expressions and the protein levels. The PKC, MEK1/2 and JAK2 signaling pathways were essential for the Ang II-mediated PDEs gene regulation. These findings may suggest that Ang II antagonizes NO actions through the upregulation of cGMP-hydrolyzing PDEs gene expressions. (*Korean Circulation J* 2003;33(2):130-138)

KEY WORDS : Angiotensin II ; 3', 5'-cyclic-GMP phosphodiesterase ; Muscle, smooth, vascular ; Gene expression.

논문접수일 : 2002년 8월 26일

수정논문접수일 : 2002년 10월 25일

심사완료일 : 2002년 12월 5일

교신저자 : 김동수, 135-270 서울 강남구 도곡동 146-92 연세대학교 의과대학 부속 영동세브란스병원 순환기내과학교실

전화 : (02) 3497-3336 · 전송 : (02) 3463-3882 · E-mail : kim0426@yumc.yonsei.ac.kr

서론

순환기 질환 중 매우 흔한 빈도를 차지하는 고혈압과 허혈성 심장질환은 주로 동맥경화 및 혈관 이완기능 장애에 기인한다. 이러한 혈관, 특히 동맥의 생리적 조절에 관여하는 요인들 중 혈관 이완 물질과 수축 물질간의 균형은 매우 중요하다. 이 균형이 깨어질 때 여러 병적인 환경이 야기된다. 혈관 평활근의 수축은 세포내 유리 Ca^{2+} 농도에 의해 조절되는데 혈관 수축 물질(Ang II, endothelin-1, norepinephrine 등)은 세포내 Ca^{2+} 농도를 증가 시키며 Ca^{2+} 농도가 증가 되면 myosin 인산화 작용에 의해 혈관은 수축한다.¹⁾ 반면 혈관 이완을 매개하는 대표적 기전인 NO/cGMP의 경로는 혈관 수축 물질의 작용을 길항하게 되는데 그 작용 기전은 매우 다양하다.²⁾ 혈관 수축 물질 중 Ang II는 체내 renin-angiotensin system(RAS)의 주요 산물로서 염분과 수분, 혈압 균형에 매우 중요한 역할을 한다. 또한 Ang II는 혈관 평활근 세포의 성장을 촉진시키며,^{3,4)} 염증 반응을 매개하는 phospholipase A2, NAD (P)H oxidase 생성에 관여하고^{5,6)} MAPK, PKC, JAK2 등의 신호 전달 체계를 자극하여⁷⁾ *c-fos*, *c-jun*과 같은 proto-oncogene의 발현을 증가시킨다.⁸⁾ 이외에도 Ang II는 phosphoinositide hydrolysis, ion influx등 혈관의 다양한 생리적 기능을 조절한다고 알려져 있다.^{9,10)} 한편 혈관의 이완을 조절하는 기전 중 NO/cGMP의 역할이 매우 중요하다는 것은 이미 잘 알려져 있다. 다양한 체내, 체외 물질에 의해 분비된 NO는 soluble guanylyl cyclase(sGC)를 활성화 시켜 cGMP 생성을 촉진 하게 한다.^{11,12)} 이렇게 생성된 cGMP는 sarcoplasmic reticulum으로 부터의 Ca^{2+} 유리를 억제하고 세포 외부의 Ca^{2+} 투과성을 떨어뜨려 세포내 Ca^{2+} 농도를 감소시킴으로써 혈관을 확장시킨다.¹³⁾ 이 같은 혈관 이완에 관여하는 cGMP 수치를 조절하는 효소들 중

생성에 관여하는 sGC와 분해를 담당하는 PDEs의 역할은 매우 중요하다. Second messenger의 역할을 하는 cyclic nucleotides인 cAMP, cGMP를 분해하는 PDEs는 이미 30종류 이상의 isoforms이 보고되어 있으며 현재까지 9개의 families로 분류 되어있다. 이중 4개의 PDE families가 포유류의 혈관에 분포한다고 알려져 있는데, Ca^{2+} /CaM-stimulated PDE(PDE1), cGMP-inhibited PDE preferentially hydrolyzing cAMP(PDE3), cAMP-specific PDE hydrolyzing cAMP(PDE4), cGMP-specific PDE hydrolyzing cGMP(PDE5) 등이다(Table 1).¹⁴⁻¹⁶⁾ 이중 PDE1은 세포내 Ca^{2+} 농도가 증가될 때(혈관내 Ang II, NE, KCl 등의 농도 증가시) 그 활성도가 증가되어 cGMP를 분해하여 혈관을 수축시키는 주요 PDE 이며^{17,18,20)} 반면에 PDE5는 안정 시 cGMP를 분해하는 PDE로서 PDE5의 길항제인 sildenafil(viagra)은 발기 부전증의 치료제로서 널리 알려져 있다.¹⁹⁾ 상기 PDE1과 PDE5가 포유 동물의 혈관에 분포하는 PDE families중 대다수를 차지하는 주요 isoforms 임은 이미 보고된 바 있다.²¹⁾ 저자 등은 이미 NO/cGMP 생성을 촉진시키는 nitrate 치료 중 그 효과를 상쇄시키는 내성(tolerance) 발생시 PDE1A1 유전자 발현이 증가된다는 보고를 한 바 있다.¹⁸⁾ 이 같은 혈관 이완작용에 관여하는 NO/cGMP 경로에 대해서는 이미 많은 보고가 있으나 혈관 수축물질 특히 RAS의 산물로서 광범위한 작용을 나타내는 Ang II와 NO/cGMP 경로 사이의 관계에 관해서는 알려진 바가 극히 드물다.

따라서 본 연구에서, 저자 등은 백서 대동맥 혈관 평활근 세포에서 Ang II의 투여가 cGMP-hydrolyzing PDEs(PDE1A1과 PDE5A1)에 미치는 영향 및 proto-oncogene 생성에 관여하는Ang II의 신호 전달체계가 PDE1A1과 PDE5A1 유전자 발현에 미치는 영향에 대해 알아보고자 하였다.

Table 1. Major PDE isoforms present in rat VSMC

Families	Isoforms	Substrates	Regulators
PDE1	PDE1A1	cGMP>>cAMP	Ca^{+2} stimulated
PDE3	PDE3A1, PDE3B1	cAMP	cGMP inhibited
PDE4	Multiple isoforms	CAMP	
PDE5	PDE5A1	cGMP	cGMP binding

* : PDE1A1 hydrolyzes cGMP at much higher affinity than cAMP. PDE : phosphodiesterase, cGMP : cyclic guanosin-3',5'monophosphate, cAMP : cyclic adenosine-3',5'monophosphate¹⁸⁾

재료 및 방법

백서 대동맥 평활근 세포 배양 :

혈관 평활근 세포는 Sprague-Dawley 백서(BW 250 ~350 g, Charles Liver Lab. Wilmington, MA, US)의 대동맥으로 부터 추출하여 10% fetal bovine serum /Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DM-EM)에서 배양하여 얻었다. Passage 7-11의 백서 대동맥 평활근 세포를 100 mm dishes에 배양하여 70%의 밀도에 도달 후 48시간 동안 serum-starvation하여 세포 성장을 억제 시킨 후 Ang II 400 nM(Sigma St. Louis, MO, US)를 시간 대별로(30분, 1시간, 2시간, 4시간, 8시간, 12시간, 24시간)투여한다. 또한 Ang II의 신호 전달 체계가 PDEs 유전자 발현에 미치는 영향을 알아보기 위하여, 성장 억제된 평활근 세포에 AT1 수용체 길항제인 losartan 10 uM(gift from Merck, Whitehouse Station, NJ, US)을 30분간 전처리 하고 또한 다른 평활근 세포에는 PKC, JAK2, MEK1/2 신호 전달 경로 각각의 길항제인 calphostin C, AG490, PD098059(Calbiochem, San Diego, CA, US)을 용량별 선 실험 후 선정하여 각각 100 nM 1시간, 50 uM 30분, 10 uM으로 30분간 전처리한 후 Ang II를 1시간 동안 투여한 뒤 relative quantitative RT-PCR을 시행하여 PDE1A1과 PDE5A1 mRNA발현 양상을 확인함으로써 Ang II의 주요 신호전달 체계가 PDE1A1과 PDE5A1유전자 발현에 미치는 영향에 대해 알아보았다.

Western blot analysis

배양된 백서 대동맥 평활근 세포로부터 lysis buffer 600 uL (50 mM beta-glycerophosphate, pH7.3, 1.5 mM EGTA, 0.1 mM Na₃VO₄, 1 mM DTT, 10 ug/mL aprotinin, 5 ug/mL pepstatin, 20 ug/mL leupeptin, 1 mM benzamidin)로 추출하여 dounce homogenization한 후 6x sample buffer를 섞고 5분간 boiling하여 단백질을 추출한 후 SDS-polyacrylamide gel(8% acrylamide/0.2% bisacrylamide)에 점적하여 전기 영동한다. 분리된 단백질을 nitrocellulose 막에 이동시킨 뒤 PDE1A1과 PDE5A1 특이 항체로 각각 immunostaining 한다. 면역반응은 HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG과 HRP-luminescent

substrate mixture를 사용하여 enhanced chemiluminescence로 확인하여 Ang II 투여 후 PDE1-A1과 PDE5A1의 시간대별 단백질 변동을 확인한다.¹⁸⁾²¹⁾²³⁾ 세포 단백질 농도는 Bradford 방법에 준해 측정한다.²²⁾

Relative quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR)

배양된 백서 대동맥 평활근 세포로부터 RNeasy Mini Kit(Quiagen, US)을 이용하여 total RNA를 추출한다. SuperScript Preamplification System(GIBCO BRL, Rockville, MD, US)을 이용하여 first strand cDNA를 만든다. 요약하면 추출된 RNA 5 ug와 kit 내의 random hexamer(50 ng/mL), 10 mM dNTP, DEPC-treated water를 혼합하여 65°C에서 5분, 0°C에서 1분간 기다린다. 그후 2 uL RT buffer, 25 mM MgCl₂ 4 uL, 0.1 M DTT 2 uL, ribonuclease inhibitor 1 uL를 mix 한 후 25°C에서 2분 간 보관 후 SuperScript RT 1uL(50 units)을 섞은 후 25°C 10분, 42°C로 50분, 70°C에서 5분간 보관 후 냉각시킨다. 1 uL의 RNase H를 첨가 후 internal control로서 18S ribosomal RNA(18S rRNA, Ambion, Austin, TX, US)를 이용하여 PCR을 시행한다. PDE1A1 specific primer(sense ; 5'-AAG ATG ACT GGA GGG ATC TTC G-3', antisense ; 5'-GAA AAT GGA AGC CCT AAT TCA GC-3')와 PDE5A1 specific primer(sense ; 5'-GAG CAG CAG TCA TTG CAA GTA ATT CTG-3', antisense ; 5'-GCA AAG CAA ACT TCT GAT GCA GTG CGT-3)를 이용하여 각각 281-bp와 335-bp PCR 산물을 얻었다. PCR cycles 횟수는 PCR products를 cycles 횟수 중 순차적으로 추출하여 densitometric analysis 후 선형 범위 내의 안정성 있는 횟수를 선정하였다. mRNA의 상대적인 정량 분석을 위하여 사용한 18S rRNA의 primer : competitor의 적정 비율은 선 실험 후 경험적으로 결정한다. 이렇게 얻어진 PCR 산물을 2% agarose gel에 점적하여 전기 영동하고 ethidium bromide로 염색 후 U.V. 광선 하에서 감광하여 densitometry software(NIH image 1.60)를 이용하여 18S rRNA에 대한 PDE1A1과 PDE5A1 band density의 상대적인 ratio를 정량 분석한다.

분석 및 통계

실험 수치는 $\text{mean} \pm \text{SEM}$ 으로 표시하고 Student's t-test로 검정하였다. $p < 0.05$ 를 통계적으로 유의하다고 판단하였다.

결 과

Ang II 투여에 의한 PDE1A1과 PDE5A1 유전자 발현 양상

배양된 백서 대동맥 평활근 세포에 Ang II (400 nM) 투여 후 PDE1A1과 PDE5A1 mRNA 발현은 각각 1

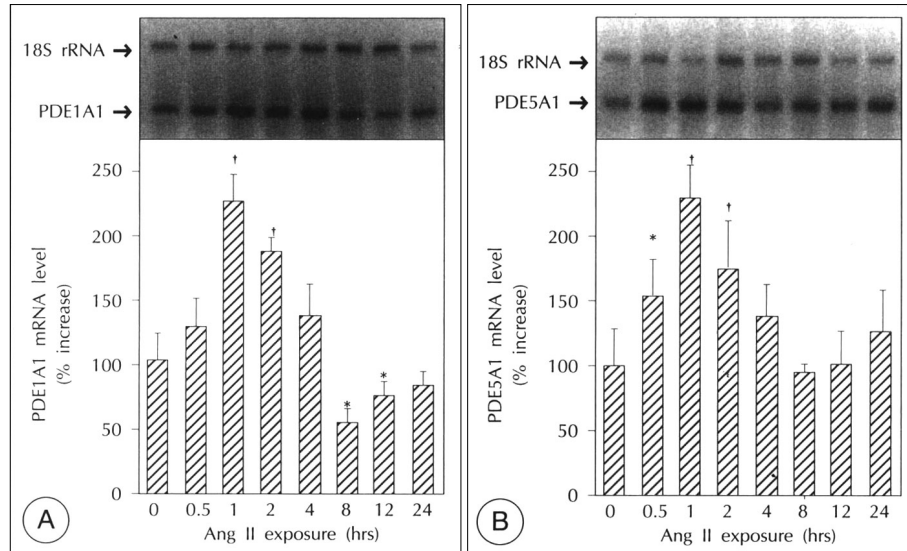


Fig. 1. Time courses of PDE1A1 & PDE5A1 mRNA induction by Ang II (400 nM) treatment in rat aortic VSMC (8 experiments respectively, representative figures). mRNA levels of PDE1A1 (A) and PDE5A1 (B) were measured by relative quantitative RT-PCR. 18S rRNA was used as an internal control. Summary data were normalized to control (treatment with vehicle), which was arbitrarily set at 100% for each experiment. *: $p < 0.05$, †: $p < 0.01$ compared with time 0. Ang II: angiotensin II, VSMCs: vascular smooth muscle cells, PDE: phosphodiesterase, RT-PCR: reverse transcription polymerase chain reaction, 18S rRNA: 18S ribosomal ribonucleic acid.

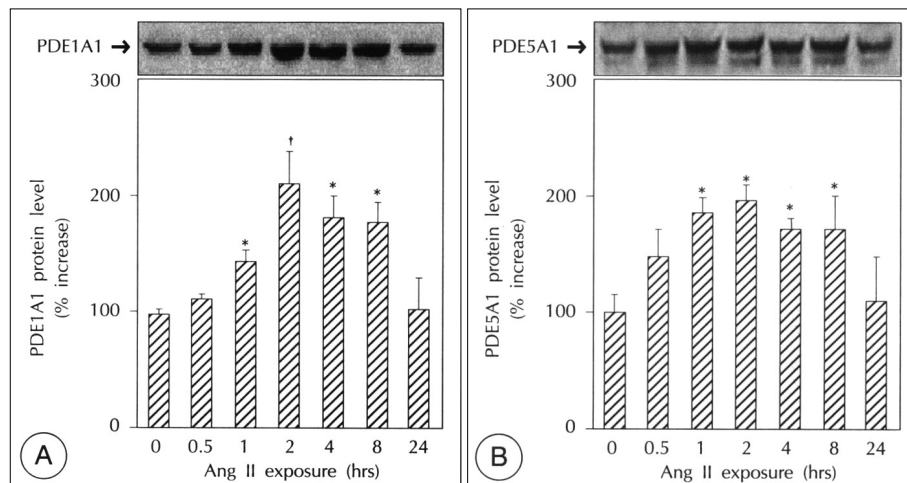


Fig. 2. Time courses of PDE1A1 and PDE5A1 protein expressions by Ang II (400 nM) treatment in rat aortic VSMC (5,4 experiments respectively, representative figures). Protein levels of PDE1A1 (A) and PDE5A1 (B) were measured by western blot analysis. Summary data were normalized to time 0, which was arbitrarily set at 100% for each experiment. *: $p < 0.05$, †: $p < 0.01$ compared with time 0.

시간째에 최대 약 2.4배, 2.3배의 증가 소견을 보이다가 PDE1A1의 경우 8시간째 부터 치료 전 보다 오히려 감소 되는 양상을 보이다가(Fig. 1A) 24시간째에는 치료 전 수치로 회복됨을 알 수 있었으며 PDE5A1의 경우는 치료 전에 비해 뚜렷한 감소 소견 없이 4시간째에 치료 전 정도로 회복되었다(Fig. 1B).

Western blot analysis

PDE1A1과 PDE5A1 유전자 발현의 증가가 단백질 발현의 증가와 연관되는지를 알아보기 위하여 시행한 western blot analysis에서 PDE1A1과 PDE5A1 단백질 변동은 각각 2시간 째에 최대 증가 소견을 보이다가 24시간 경과 후에는 치료 전 수준으로 회복되었

다. PDE1A1과 PDE5A1단백질의 발현 양상은 서로 비슷하였으며 최대 단백질 발현 증가는 최대 유전자 발현과 유사한 시간차를 보이며 증가된 소견을 관찰할 수 있었다(Fig. 2A, B).

AT1 수용체 억제제 전 처치 후의 유전자 발현 양상

AT1 수용체 억제제인 losartan, irbesartan(data not shown)을 전처치 한 결과 Ang II에 의한 PDE1A1과 PDE5A1 유전자 발현증가가 유의하게 억제 되었는데(Fig. 3A, B) 이는 백서 대동맥 혈관 평활근 세포의 PDE1A1과 PDE5A1 유전자 발현이 AT1 수용체에 의해 매개 됨을 시사한다.

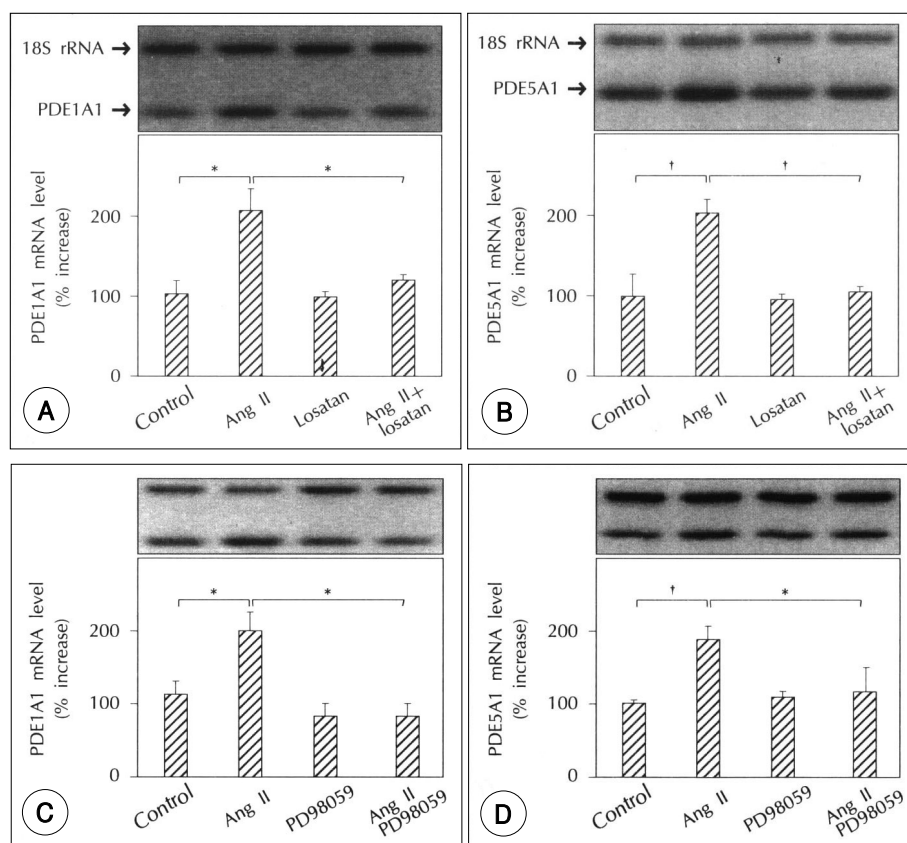


Fig. 3. Roles of AT1 receptor and MAPK on Ang II-induced PDE1A1 and PDE5A1 mRNA expression. Effects of inhibition of AT1 receptor and MAPK activity by losartan and PD98059 on PDE1A1 (A,C) and PDE5A1 (B,D) mRNA expression. Growth-arrested rat aortic VSMCs were pretreated with the AT1 receptor blocker losartan (10 uM) and MEK1/2 kinase inhibitor PD98059 (10 uM) for 30 min followed by 400 nM Ang II stimulation for 1 hour. *: $p < 0.05$, †: $p < 0.01$ compared with control. AT1: angiotensin II type 1, MAPK: mitogen-activated protein kinase, MEK: mitogen-activated protein kinase kinase.

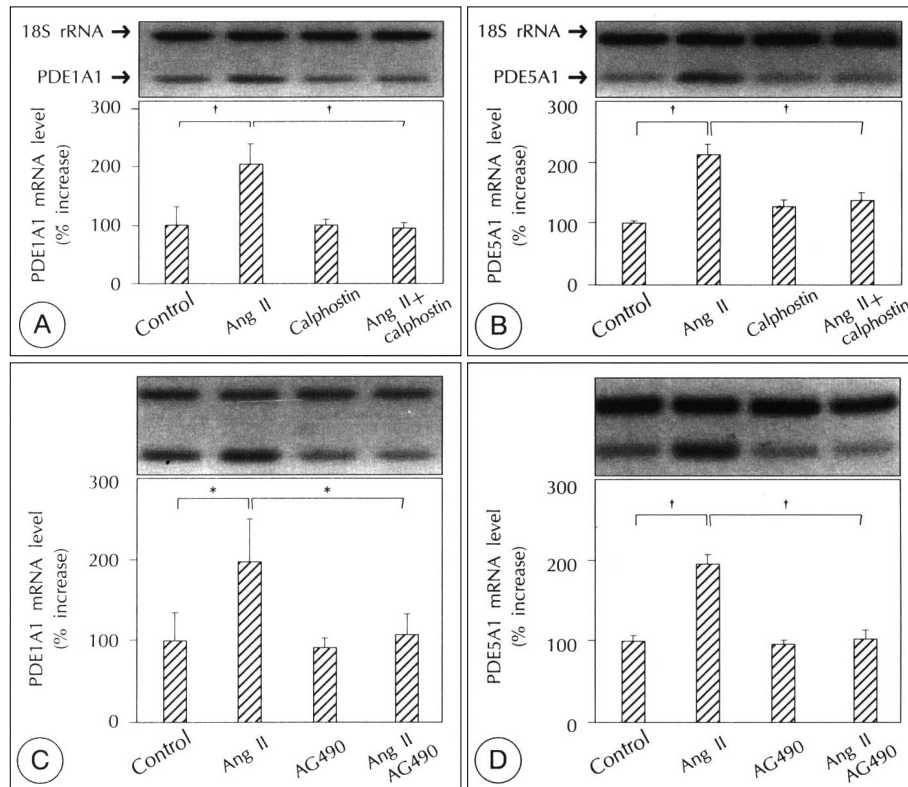


Fig. 4. Roles of PKC and JAK2 on Ang II-induced PDE1A1 and PDE5A1 mRNA expression. Effects of inhibition of PKC and JAK2 activity by calphostin C and AG490 on PDE1A1 (A,C) and PDE5A1 (B, D) mRNA expression. Growth-arrested rat aortic VSMCs were pretreated with PKC inhibitor calphostin C (100 nM) for 1 hr and AG490 (50 μ M) for 30 min followed by 400 nM Ang II stimulation for 1 hour. *: $p < 0.05$, †: $p < 0.01$ compared with control. PKC : protein kinase C, JAK : janus kinase.

Ang II의 신호 전달 체계중 MAPK, PKC, JAK2가 PDE1A1 & PDE5A1 유전자 발현에 미치는 영향

Mitogen-activated protein kinase (MAPK) 활성이 Ang II에 의한 PDE1A1과 PDE5A1 유전자 발현과 관련 있는지를 확인하기 위해 전처치한 MEK1/2 억제제 PD098059는 Ang II에 의한 유전자 발현 증가를 유의하게 억제함을 알 수 있었고 (Fig. 3C, D) PKC, JAK2 각각의 억제제인 calphostin C, AG490 전처치 시에도 비슷한 소견을 얻을 수 있었다 (Fig. 4). 이상의 결과로 MAPK, PKC, JAK2 신호 전달계가 PDE1A1과 PDE5A1 유전자 발현에 관여 함을 알 수 있었다.

고 찰

Ang II는 RAS의 주요 산물로서 심장 혈관계의 중요 역할을 한다. 혈관 평활근에서 Ang II의 기능은 주

로 AT1 수용체와 AT2 수용체를 통해 나타나며 대부분의 작용은 AT1 수용체에 의한다.²⁴⁾ Ang II의 신호 전달계는 복잡하여 phospholipase C (PLC)의 활성화에 의한 PKC 경로, MAPK cascade, *c-fos*나 *c-jun*과 같은 proto-oncogen은 물론 여러 종류의 tyrosine kinases의 활성화 등이 포함된다.⁷⁻⁹⁾²⁴⁾ 혈관 내의 Ang II와 NO/cGMP 경로는 여러 다양한 기전에 의해 서로 영향을 미치게 되는데 주로는 길항작용을 한다. Ang II는 강력한 혈관 수축제이며 혈관 평활근 세포의 성장을 촉진시키고 cytokine의 생성을 갖고 있다. 반면 NO는 내인성 혈관 이완물질로서 단순히 혈관 내피 의존형 이완작용 뿐 아니라 혈관 평활근 세포의 성장과 이동 억제, 염증물질의 생성 억제, 혈소판의 응집과 혈전 생성을 억제하여 고혈압의 완화, 동맥경화 및 급성 관동맥 증후군 방지에도 관여 한다고 알려져 있다.¹¹⁾¹²⁾²⁵⁾ NO의 작용은 cGMP의존형과 cGMP 비의존형으로 나뉘

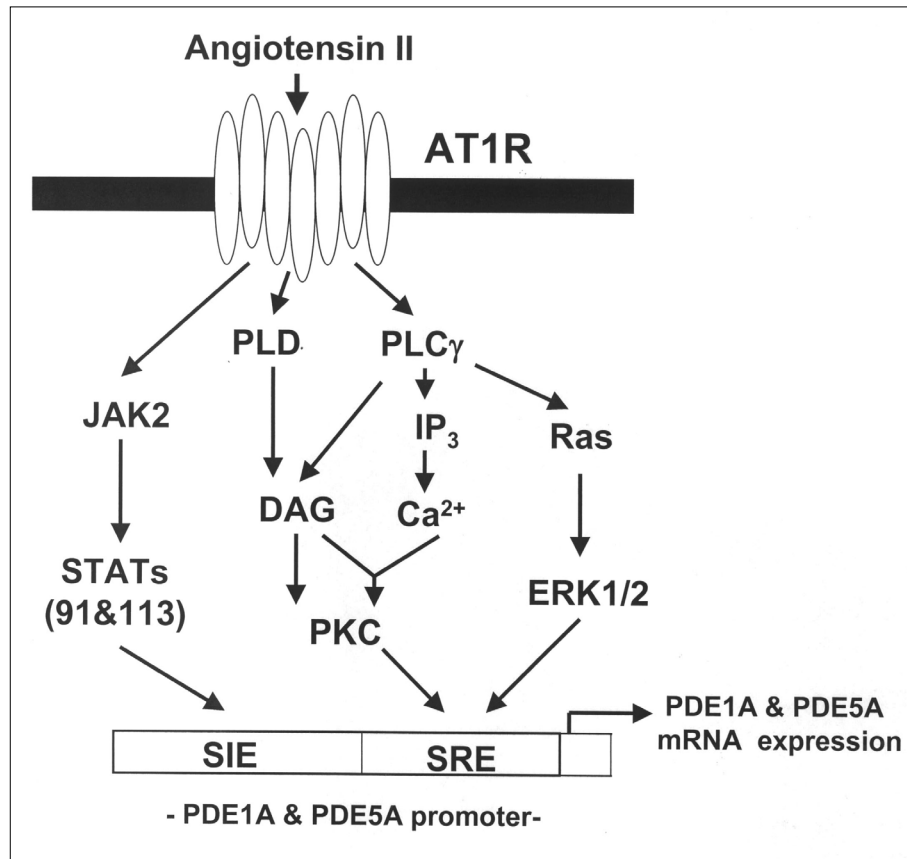


Fig. 5. Supposed effects of Ang II signaling pathway on PDE1A1 & PDE5A1 gene expression. AT1R : angiotensin II type 1 receptor, JAK2 : janus kinase 2, STAT : signal transducer and activator of transcription, PLD : phospholipase D, DAG : diacyl glycerol, PKC : protein kinase C, PLC γ : phospholipase C gamma, IP₃ : inositol triphosphate 3, ERK1/2 : extracellular signal-regulated kinase 1/2, SIE : sis-inducing factor element, SRE : serum response element.

는데 cGMP의존형의 경우는, NO가 sGC를 활성화하여 cGMP 생성을 촉진시킴으로써 세포내 Ca^{2+} 농도를 감소시켜 혈관을 확장한다.¹¹⁾¹²⁾ 또 혈관 평활근 세포의 성장과 이동은 외부의 NO 유리물질 투여나 내인성 NO 생성에 의해 억제되는데 이 같은 작용도 주로 cGMP에 의해 매개된다고 하지만 아직은 논란의 여지가 많다.

Ang II와 NO의 상호 길항 작용은 다양한 단계의 신호 전달에 서로 직접, 간접적인 영향을 미침으로써 야기된다. 예를 들어 Ang II는 NO synthase의 발현에 영향을 미치고 Ang II에 의해 생성된 superoxide (O_2^-)는 NO와 결합하여 세포 독성 물질인 peroxynitrite (ONOO^-)를 생성하게 되어 NO의 역할을 방해한다. 반면 NO는 AT1수용체의 발현을 downregulation 하고²⁵⁾ Ca^{2+} 의 이동을 억제하며²⁶⁾²⁷⁾ Ang II에 의해 활성화 되는 여러 종류의protein kinases의 기능을 방

해한다.²⁸⁾ 이외에 Ang II와 NO는 하부 단계 신호전달에서도 서로 영향을 미친다. 이처럼 두 물질 사이의 기능적 feedback의 균형 여부가 혈관에서의 정상 기능과 구조 유지에 중요한 역할을 담당한다. 즉 Ang II와 NO 사이의 균형이 깨지면 혈관은 병적인 상태로 이행된다. cGMP는 NO역할의 주요 매개자이며 따라서 Ang II에 의한 cGMP 수치 감소가 NO의 혈관 이완 기능을 억제한다고 생각된다. 저자 등은 cGMP-hydrolyzing PDEs의 발현증가가 Ang II에 의한 cGMP수치 감소의 주된 기전이라 생각하여 이 연구를 진행하였다.

본 연구에서 Ang II 투여후 AT1 수용체에 의해 PDE1A1과 PDE5A1의 유전자 발현이 증가 됨을 알 수 있었다. AT1 수용체가 관여 하여 발현이 증가되는 대표적인 경우가 *c-fos*, *c-jun*과 같은 proto-oncogene 이다. 보고에 의하면 Ang II에 의한 c-fos 유전자의

발현은 15분 이내에 유발된다고 하였다.⁸⁾ 또 Ang II에 의한 *c-fos* 유전자의 발현의 조절은 적어도 4개 이상의 신호 전달 체계에 의한다고 한다.²⁹⁾ *c-fos* promoter는 cAMP/calcium response element(CRE), serum response element(SRE)를 포함하고 있는데 이 둘은 혈관 평활근 세포 내에서 MEK1/2와 같은 MAPK에 의해 조절되고 있으며³⁰⁾ SRE는 또한 PKC에 의해서도 조절된다.²⁹⁾ Sis-inducing element(SIE)도 *c-fos* promoter에 존재하는데 SIE는 Janus kinase 2(JAK2)의 활성화에 의해 조절되는 전사 인자인 signal transducer and activator of transcription(STAT) family와 상호 반응을 하기도 한다.²⁹⁾ PDE1A와 PDE5A의 유전자 promoter에도 Ang II 신호 전달 체계에 의한 *c-fos* 유전자 promoter와 유사하게 SIE, SRE를 포함한다.

본 연구에서 Ang II에 의한 PDE1A1과 PDE5A1의 유전자 발현 증가는 PKC, MAPK, JAK2 각각의 길항제인 calphostin C, PD098059, AG490에 의해 억제되었는데 이는 Ang II에 의한 PDE1A1, PDE5A1 유전자 발현 증가는 *c-fos* 발현증가와 유사하게 PKC, MAPK 그리고 JAK2 등의 신호 전달계의 활성화에 의한다고 생각할 수 있었다(Fig. 5). 추후 PDE1A 혹은 PDE5A 유전자가 CRE를 포함하는지 또한 CRE가 혈관 평활근 세포에서 Ang II에 의한 PDE1A과 PDE5A 유전자 발현증가에 관여하는 역할에 관한 연구도 매우 중요한 것으로 생각된다.

이상의 결과로 저자 등은 NO/cGMP에 대한 Ang II의 길항 작용은 cGMP-hydrolyzing PDEs의 발현증가에 따른 cGMP수치 감소에 의한다는 사실을 알 수 있었으며 또 이 과정에서 Ang II의 여러 신호 전달 체계가 관여함을 알 수 있었다. 저자 등은 현재 Ang II의 투여가 혈관 평활근 세포 주기에 미치는 영향, Ang II에 의한 PDE1A1과 PDE5A1의 유전자 발현 증가의 기전 및 PDE1A1과 PDE5A1특이성 길항제를 이용한 PDE1A1과 PDE5A1효소 활성도 변화등에 대한 연구를 진행 중이다. 본 연구 결과로 Ang II가 cGMP-hydrolyzing PDEs 유전자 발현에 밀접한 관계가 있음을 알았으며 추후 cGMP-hydrolyzing PDEs가 동맥 경화에 미치는 영향등의 연구 확대가 필요할 것으로 생각된다.

요 약

배경 및 목적 :

Ang II와 NO/cGMP는 혈관의 균형을 유지하는데 매우 중요한 역할을 한다. 통상적으로 Ang II는 NO에 대해 길항 작용을 한다고 알려져 있는데 이는 cGMP수치 감소와 관계가 있을 것으로 생각되어 Ang II가 cGMP-hydrolyzing PDEs(PDE1A1 & PDE5A1) 발현에 미치는 영향과 Ang II의 신호 전달계와 PDEs 발현 사이의 관계에 대해 연구하였다.

방 법 :

백서 대동맥 평활근 세포를 배양하고 Ang II(400 nM)을 투여한 후 세포를 추출한 뒤 얻은 total RNA로 relative quantitative RT-PCR을 시행하여 시간대별 PDE1A1 & PDE5A1 유전자 발현 양상을 알아보고 또한 AT1수용체, PKC, JAK2, MEK1/2/5길항제를 전처치한 후 같은 방법으로 Ang II 신호 전달계와 유전자 발현 사이의 관계를 관찰 하였으며 western blot analysis를 시행하여 PDE1A1 & PDE5A1 단백질의 발현 정도를 평가하였다.

결 과 :

Ang II투여 후 PDE1A1 & PDE5A1 유전자 발현이 증가됨을 관찰할 수 있었고 PDE1A1 & PDE5A1 단백질 발현 양상도 유사함을 알 수 있었다. 한편 AT1수용체, PKC, JAK2, MEK1/2 길항제를 Ang II 투여 전 전처치한 경우 Ang II에 의한 PDE1A1 & PDE 5A1 유전자 발현 증가가 의미 있게 감소되는 소견을 보였다.

결 론 :

본 연구의 결과로 Ang II는 cGMP를 분해시키는 PDE1A1, PDE5A1 유전자의 발현을 증가시킴으로써 cGMP 수치를 감소시켜 NO/cGMP경로에 길항 작용을 하며 또한 Ang II 투여에 의한 PDE1A1 & PDE5A1 유전자 발현 증가는 AT1수용체를 통한 MAPK, PKC, JAK/STAT 등의 신호 전달 체계가 활성화 되어 나타남을 알 수 있었다.

중심 단어 : 안지오텐신 II ; 3', 5'-cyclic-GMP phosphodiesterase ; 혈관 평활근세포 ; 유전자 발현.

본 연구는 연세대학교 의과대학 2001년도 교수연구비(과제번호 : 2001-07호)에 의하여 이루어졌음.

REFERENCES

- Williams DA, Fay FS. Calcium transients and resting levels in isolated smooth muscle cells as monitored with quin 2. *Am J Physiol* 1986;250:C779-91.
- van Haasteren G, Li S, Muda M, Susini S, Schlegel W. Calcium signaling and gene expression. *J Recept Signal Transduct Res* 1999;19:481-92.
- Berk BC, Vekshtein V, Gordon HM, Tsuda T. Angiotensin II-stimulated protein synthesis in cultured vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 1989;13:305-14.
- Geisterfer AA, Peach MJ, Owens GK. Angiotensin II induces hypertrophy, not hyperplasia, of cultured rat aortic smooth muscle cells. *Circ Res* 1988;62:749-56.
- Schlondorff D, de Candido S, Satriano JA. Angiotensin II stimulates phospholipases C and A2 in cultured rat mesangial cells. *Am J Physiol* 1987;253:C113-20.
- Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD, Alexander RW. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 1994;74:1141-8.
- Marrero MB, Schieffer B, Paxton WG, Heerdt L, Berk BC, Delafontaine P, Bernstein KE. Direct stimulation of Jak/STAT pathway by the angiotensin II AT1 receptor. *Nature* 1995;375:247-50.
- Taubman MB, Berk BC, Izumo S, Tsuda T, Alexander RW, Nadal-Ginard B. Angiotensin II induces c-fos mRNA in aortic smooth muscle: role of Ca^{2+} mobilization and protein kinase C activation. *J Biol Chem* 1989;264:526-30.
- Smith JB. Angiotensin-receptor signaling in cultured vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol* 1986;250:F759-69.
- Summers C, Myers LM, Kalberg CJ, Raizada MK. Physiological and pharmacological comparisons of angiotensin II receptors in neuronal and astrocyte glial cultures. *Prog Neurobiol* 1990;34:355-85.
- Ignarro LJ, Gruetter CA. Requirement of thisols for activation of coronary arterial guanylyl cyclase by glyceryl trinitrate and sodium nitrite: positive involvement of S-nitrosothiols. *Biochim Biophys Acta* 1980;631:221-31.
- Ignarro LJ, Lipton H, Edwards JC, Baricos WH, Hyman AL, Kadowitz PJ, Grutter CA. Mechanism of vascular smooth muscle relaxation by organic nitrates, nitrites, nitroprusside and nitric oxide: evidence for the involvement of S-nitrosothiols as active intermediates. *J Pharmacol Exp Ther* 1981;218:739-49.
- Elkayama U. Tolerance to organic nitrates: evidence, mechanisms, clinical relevance and strategies for prevention. *Ann Intern Med* 1991;114:667-77.
- Beavo JA. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: functional implications of multiple isoforms. *Physiol Rev* 1995;75:725-48.
- Fisher DA, Smith JF, Pillar JS, St Denis SH, Cheng JB. Isolation and characterization of PDE8A, a novel human cAMP-specific phosphodiesterase. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;246:570-7.
- Fisher DA, Smith JF, Pillar JS, St Denis SH, Cheng JB. Isolation and characterization of PDE9A, a novel human cGMP-specific phosphodiesterase. *J Biol Chem* 1998;273:15559-64.
- Chiu PJ, Tetzloff G, Ahn HS, Sybertz EJ. Comparative effects of vinpocetine and 8-Br-cyclic GMP on the contraction and $45Ca$ -fluxes in the rabbit aorta. *Am J Hypertens* 1988;1:262-8.
- Kim D, Rebalkin SD, Pi X, Wang Y, Zhang C, Munzel T, Beavo JA, Berk BC, Yan C. Upregulation of PDE1A1 gene expression is associated with the development of nitrate tolerance. *Circulation* 2001;104:2338-43.
- Ahn HS, Crim W, Romano M, Sybertz E, Pitts B. Effects of selective inhibitors on cyclic nucleotide phosphodiesterases of rabbit aorta. *Biochem Pharmacol* 1989;38:3331-9.
- Yan C, Zhao AZ, Bentley JK, Beavo JA. The calmodulin-dependent phosphodiesterase gene PDE1C encodes several functionally different splice variants in a tissue-specific manner. *J Biol Chem* 1996;271:25699-706.
- Sonnenburg WK, Rybalkin SD, Bornfeldt KE, Kwak KS, Rynalkina IG, Beavo JA. Identification, quantitation, and cellular localization of PDE1 calmodulin-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Methods* 1998;14:3-19.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-54.
- Rybalkin SD, Bornfeldt KE, Sonnenburg WK, Rybalkina IG, Kwak KS, Hanson K, Krebs EG, Beavo JA. Calmodulin-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE1C) is induced in human arterial smooth muscle cells of the synthetic, proliferative phenotype. *J Clin Invest* 1997;100:2611-21.
- Touyz RM, Schiffrin EL. Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Pharmacol Rev* 2000;52:639-72.
- Cahill PA, Redmond EM, Foster C, Sitzmann JV. Nitric oxide regulates angiotensin II receptors in vascular smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol* 1995;288:219-29.
- Komalavilas P, Lincoln TM. Phosphorylation of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor by cyclic GMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 1994;269:8701-7.
- Komalavilas P, Lincoln TM. Phosphorylation of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor: cyclic GMP-dependent protein kinase mediates cAMP and cGMP dependent phosphorylation in the intact rat aorta. *J Biol Chem* 1996;271:21933-8.
- Sauzeau V, le Jeune H, Cario-Toumaniantz C, Smolenski A, Lohmann SM, Bertoglio J, Chardin P, Pacaud P, Loirand G. Cyclic GMP-dependent protein kinase signaling pathway inhibits RhoA-induced Ca^{2+} sensitization of contraction in vascular smooth muscle. *J Biol Chem* 2000;275:21722-9.
- Berk BC, Duff JL, Marrero MB, Bernstein KE. Angiotensin II signal transduction in vascular smooth muscle cell. In: Sowers JR, editor. *Endocrinology of the Vasculature*. Humana Press;1996. p.187-204.
- Duff JL, Marrero MB, Paxton WG, Schieffer B, Bernstein KE, Berk BC. Angiotensin II signaling transduction and the mitogen-activated protein kinase pathway. *Cardiovasc Res* 1995;30:511-7.