Aldosterone과 Cytokine IL-1β, TNF-α가 혈관평활근세포의 Angiotensin Converting Enzyme 발현에 미치는 영향

성균관대학교 의과대학 내과학교실, 삼성서울병원 순환기내과, 심장혈관센터, 삼성생명과학연구소
김덕경 · 허정은 · 최윤혁 · 박선진 · 정은아 · 변종회 · 권현철
박승우 · 김준수 · 이상훈 · 홍경표 · 박정의 · 서정돈 · 이원로

The Effects of Aldosterone and Cytokines IL-1β, TNF-α on the Expression of Angiotensin Converting Enzyme Gene in Vascular Smooth Muscle Cells

Duk-Kyung Kim, MD, Jeong-Eun Huh, MS, Yoon-Hyuk Choe, PhD, Sun-Jin Park, BS, Eun-A Jung, MS, Jonghoe-Byun, PhD, Hyeon-Cheol Gwon, MD, Seung Woo Park, MD, June Soo Kim, MD, Sang Hoon Lee, MD, Kyung Pyo Hong, MD, Jeong Euy Park, MD, Jung Don Seo, MD and Won Ro Lee, MD

Division of Cardiology, Department of Medicine, Sungkyunkwan University School of Medicine, Samsung Cardiac and Vascular Center, Samsung Medical Center, Samsung Biomedical Research Institute, Seoul, Korea

ABSTRACT

Background : It has been suggested that all components of the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) are present in the vascular wall and that the vascular RAAS modulates vascular tone and vascular hypertrophy. One of the catalytic step in the RAAS cascade is the local conversion of angiotensin Ⅰ to angiotensin Ⅱ (Ang Ⅱ) by angiotensin converting enzyme (ACE). One of the major sources of ACE in the vasculature is vascular smooth muscle cells (VSMC). Here, we provide insight into the intrinsic mechanisms by which the components of RAAS regulate gene expression of ACE in cultured smooth muscle cells of the rat and we also investigated the effects of cytokines on ACE mRNA. **Methods** : RNA was extracted from the primary cultured VSMCs. We analyzed the expression levels of ACE by competitive reverse transcription-PCR using recombinant RNA as an internal standard. **Results** : 1) ACE mRNA level was increased markedly by aldosterone in a dose-and time-dependent manner, indicating that there exists positive feedback mechanism within RAAS. 2) The induction of ACE mRNA by aldosterone was inhibited by spironolactone. 3) Aldosterone-stimulated expression of ACE was also inhibited by Ang Ⅱ, which shows that Ang Ⅱ acts as a negative regulator of the expression of ACE in RAAS cascade. 4) Interleukin-1 β or TNF-α did not induce ACE mRNA expression. 5) However, mixture of interleukin-1 β and TNF-α (CytoMix) significantly increased the expression of ACE. It was also shown that CytoMix increased aldosterone-stimulated ACE mRNA expression in an additative manner. **Conclusions** : These results indicate that the expression of ACE in smooth muscle

교신저자 : 김덕경, 135 - 170 서울 강남구 일원동 50
성균관대학교 의과대학 내과학교실 삼성서울병원 순환기내과, 심장혈관센터, 삼성생명과학연구소
전화 : (02) 3410 - 3419 · 전송 : (02) 3410 - 3417
E - mail : dkkim@smc.samsung.or.kr

cells is modulated by the components of RAAS and cytokines. The intrinsic positive and negative feedback controls of RAAS would play an important role in the pathogenesis of vascular diseases. **(Korean Circulation J 1999;29(1):84-95)**

KEY WORDS : Angiotensin converting enzyme (ACE) · Gene expression · Aldosterone · Renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) · Interleukin-1β · TNF-α

서 론

최근 분자생물학적인 방법의 도입으로 과거 전형적인 호르몬계로 알려졌던 RAAS의 모든 구성요소들이 혈관벽에 국소적으로 존재함이 알려져 있다.[1)2)]

ACE는 Ang I을 Ang II로 변환시키는 dicarboxy peptidase로서 비록 ACE가 Ang II 생성의 rate-limiting step은 아니지만 혈관 내의 국소 ACE 활성도의 변화가 심혈관질환의 병태생리에 중요한 역할을 함이 알려지게 되었다.[3)4)] ACE를 발현하는 대표적인 세포는 혈관내피세포(endothelial cell ; EC)이나 VSMC도 ACE를 발현하는 것으로 보고되어 있다.[5)6)] VSMC은 혈관벽을 이루는 주요 구성 세포로 VSMC의 분열(hyperplasia) 및 비대 (hypertrophy)는 동맥경화나 혈관벽 비후의 중요 요인 중의 하나이다. 최근 들어 VSMC의 ACE 발현에 대하여 일부 연구가 이루어져 dexamethasone, basic FGF 등에 의하여 ACE 활성도 및 mRNA 발현이 증가됨이 알려졌다.[5)6)]

Aldosterone은 과거 부신피질에서만 생성되는 것으로 알려졌으나 최근 연구 결과에 의하면 혈관벽에서도 생산되며 VSMC과 EC에는 aldosterone 합성에 중요한 최종 효소인 CYP11B2와 aldosterone의 세포내 수용체인 mineralocorticoid receptor(MR) mRNA가 발현된다.[2)7)] 또한 Ang II는 EC에서 aldosterone의 합성을 증가시킨다.[8)] Aldosterone은 dexamethasone과 마찬가지로 mineralocorticoid에 속하므로 EC에서 국소적으로 생산된 aldosterone은 paracrine하게 작용하여 VSMC의 ACE 발현을 증가시킬 것으로 생각되나 이에 대한 연구결과는 없다.

한편 죽상경화를 비롯한 다양한 혈관질환에서 cytokine들은 병태생리에 중요한 역할을 한다. Cytokine 중 대표적인 물질인 interleukin-1β(IL-1β), tumor necrosis factor-α(TNF-α)는 EC을 활성화 시켜 cell surface adhesion molecule, cytokine, growth factor, coagulation system에 관여하는 물질들의 발현을 촉진시킨다. IL-1β, TNF-α가 ACE의 mRNA 발현을 증가시키는가에 대한 보고는 없으나 IL-1은 배양된 HUVEC(human umbilical vein endothelial cell)으로부터 ACE 활성도를 증가시킨다.[9)] 그러나 VSMC의 ACE 발현에 미치는 cytokine의 역할에 대하여는 연구된 바 없다.

따라서 본 연구진은 위의 사실들을 종합하여 aldosterone과 cytokine IL-1β, TNF-α가 배양된 VSMC의 ACE 유전자 발현을 증가시키는지 알아보고 이들간의 상호작용에 대하여 연구하였다.

방 법

Rat의 대동맥에서 VSMC의 배양

Male Sprague-Dawley rat(6wk old)로부터 흉부 대동맥을 떼어낸다. 혈관 주위의 loose connective tissue를 제거한 후 enzyme dissociation mixture(DMEM/F12 medium, 1 mg/ml type 2 collagenase, 0.25 mg/ml elastase, 1 mg/ml soybean trypsin inhibitor, 2 mg/ml bovine serum albumin)에 담아 37°C에서 10분간 반응시킨 후 혈관내벽세포를 제거하였고 adventitia와 media의 분리를 용이하게 하였다. Dissecting microspcopy 하에서 fine forceps을 이용하여 adventitia를 media와 박리한 후 media를 VSMC 배양에 사용하였다. Media를 2 3 mm의 크기로 잘게 자른 후 enzyme dissociation mixture에 담아 gyratory shaker내에서 37°C에서 60분간 반응시켰다. VSMC이 분리되어 enzyme dissociation mixture가 현탁해지면 fetal bovine serum을 최종농도가 20%되도록 첨가하여 enzyme을 비활성화 시킨 후 소독된 gauze로 걸러 digestion되지 않은 찌꺼기를 제거하였다. 4°C에서 1,000 rpm으로 5분간 원심분리 후 세포배양액(DMEM/F12 supplemented with 10% FBS, 100 mg/ml penicillin, 0.1 mg/ml streptomycin)에 재부유시켜 25 cm^2 세포배양 flask에 2-5×10^3 세포/cm^2의 농도로 plating하였다.

세포는 37℃ humidified 5% CO_2/95% air 환경에서 키우며 24 48시간 후 첫 배양액을 교환하여 주고 그 후로는 48 72시간 간격으로 배양액을 교환하여 주었다. 세포들을 1 : 3 1 : 5의 비율로 계대 배양하였으며 5 10번 계대배양한 세포를 실험에 사용하였다. 6 well plate에 분주된 세포들이 confluence 상태에 도달하면 defined serum - free medium(DSF ; DMEM/F12 medium containing 0.2% bovine serum albumin)로 배양액을 교환 후 48시간 배양하여 quiescent 상태로 만든 후 실험에 사용하였다. VSMC은 이러한 상태에서 quiescent, noncatabolic, differentiated 상태를 유지하며 VSMC에 특이한 단백질을 발현하는 것으로 알려져 있다.[10)]

배양된 세포나 조직에서 total RNA의 분리

Total RNA는 acid guanidinium isothiocyanate-phenol - chloroform을 이용한 단일단계방법으로 추출하였다. 세포를 cold PBS로 두 번 세척한 후, 4 M guanidinium isothiocyanate와 25 nM sodium citrate(pH 7.0), 0.5% sarcosyl, 0.1 M 2 - mercaptoethanol 등으로 구성된 변성용액(denaturing solution)을 세포배양용기에 넣어 세포를 용해시킨 후, 용해된 세포를 1.5 ml 미소튜브로 옮겼다. 이 튜브에 50 μl의 2 M sodium acetate(pH 4.0), 500 μl의 water - saturated phenol (pH 4.2), 170 μl의 chloroform - isoamyl alcohol(49 : 1)을 섞고 10초 이상 잘 섞어 주었다. 4℃에서 15분간 12,000 rpm으로 원심분리를 한 후, 수양층(aqueous phase)을 새튜브에 옮겼고, 위의 방법을 2회 반복한 후 동량의 isopropanol을 첨가하여 잘 섞은 다음, 16시간 이상 - 20℃에서 보관하였다. 4℃에서 12,000 rpm으로 30분간 원심 분리한 후, 상층액을 버리고 원침하여 얻은 RNA pellet을 75% ethanol로 2회 세척한 후, 실온에서 공기 건조시켰고, 0.1% diethyl pyrocarbonate(DEPC)로 처리한 증류수에 녹여 사용시까지 - 70℃에 보관하였다. 분리되어진 RNA는 1.5% formamide denatured agarose gel에서 전기영동하여 RNA의 int - egrity를 확인하였다.

ACE mRNA의 반정량적 역전사-중합효소 연쇄반응(semi-quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction ; SQRT-PCR)

표준 RNA의 제작 및 primer 합성

허정은 등의 방법을 이용하였다.[11)] Internal standard로 쓰일 ACE primer의 염기서열을 갖는 rcRNA를 만들기 위하여 180 bp의 GSTM(glutathione transferase) 유전자를 중간에 포함하고 앞뒤로 ACE specific primer sequence와 T7 promoter, poly(dT) tail을 갖는 spacer gene을 만들었다. 여기에 쓰이는 recombinant PCR primer의 구조를 살펴보면 다음과 같다(Fig. 1). 5 - primer는 5′ - (T7 promoter sequence) - (ACE 5′ primer sequence) - (GSTM 5′ primer sequence) - 3′, 3 - primer는 5′ - (poly dT) - (ACE 3′ primer sequence) - (GSTM 3′ primer sequence) - 3′의 구조를 갖는다. Target RNA를 ACE primer로 증폭시키면 437 bp의 크기를 갖도록 합성하였고, spacer gene의 경우는 ACE primer로 증폭되어지면 222 bp의 크기가 되도록 만들어 약 200 bp의 차이가 나므로, electrophoresis gel에서 쉽게 구별할 수 있도록 제조하였다 (Fig. 2). 인간 genomic DNA를 recombinant PCR primer로 PCR하여 spacer gene을 만들었고 PCR 반응은 94℃에서 1분간 가열하여 denaturation 시키고, 6

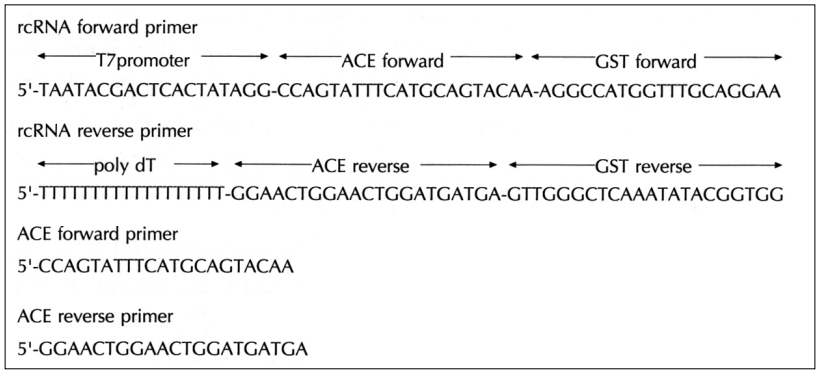


Fig. 1. Recombinant PCR primer and ACE primer sequenes.

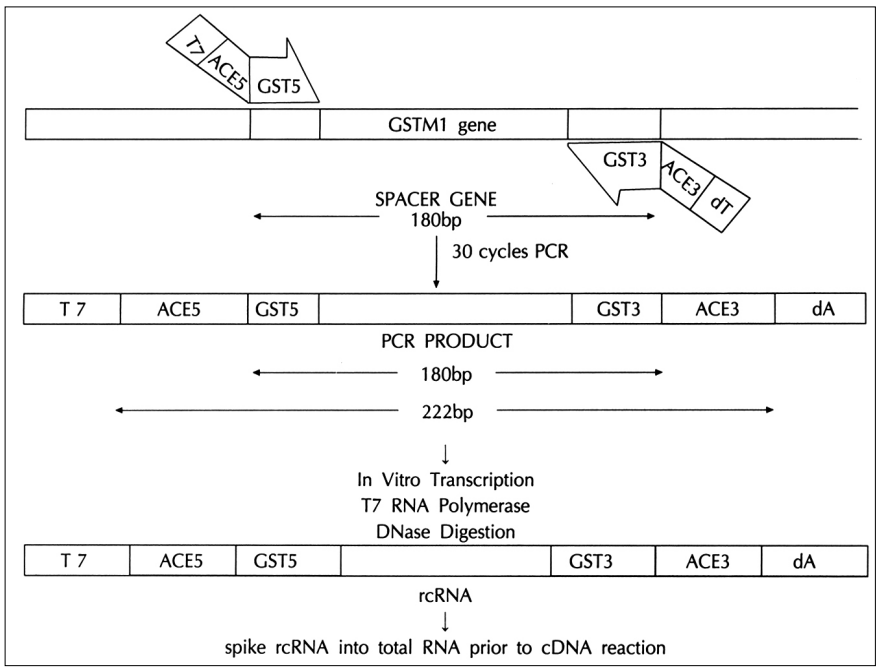
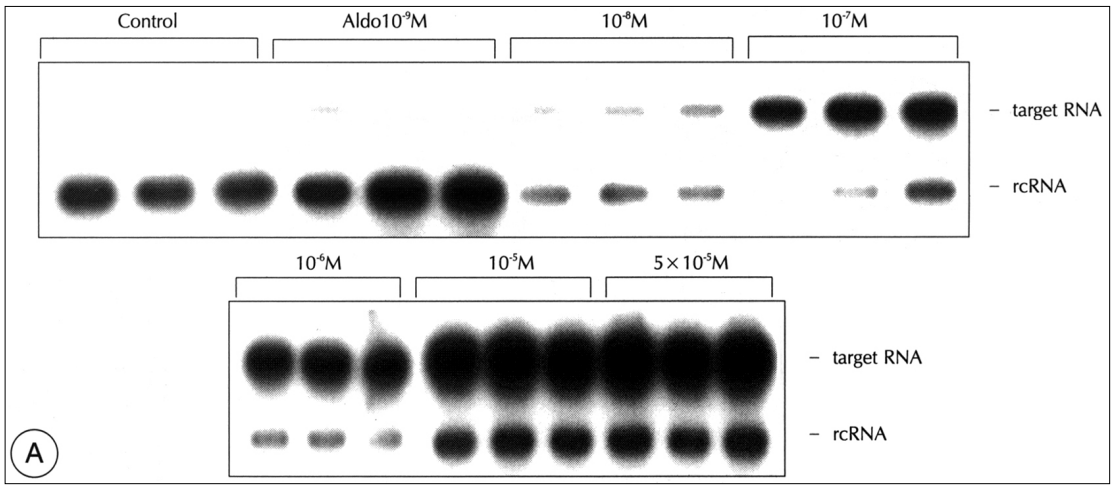


Fig. 2. Scheme for the synthesis of rcRNA internal standard. Abbreviations : T7=T7 promoter sequence, ACE5=ACE sequence forward primer, GST 5=Spacer gene forward primer, GST3=Spacer gene reverse primer, ACE3=ACE sequence reverse primer, dT=d(T)18 tail, dA =d(A) 18 tail.



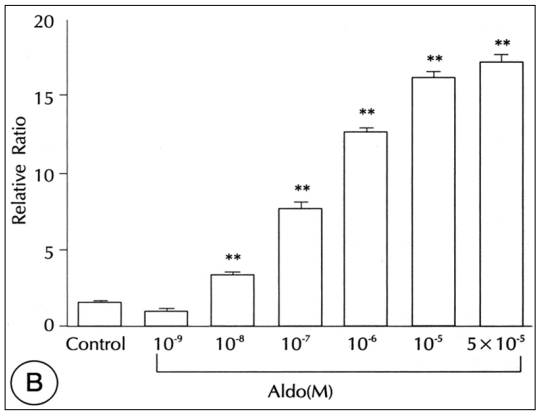


Fig. 3. Effect of aldosterone on ACE mRNA expression. (A) Growth-arrested vascular smooth muscle cells were stimulated with aldosterone for 24 hours. 1 μg of total RNA and 50 pg of recombinant RNA was reverse-transcribed and PCR-amplified with ACE primers in the presence of 32P-dCTP. PCR products were electrophoresed in 2% agarose gel. Gel was dried and exposed to x-ray film. (B) Density of each bands was measured using densitometer. Ratio of target RNA to rcRNA was calculated. The value of negative control was normalized to 1 arbitrary unit for quantitative comparisons. The values given are the mean±SEM for three separate samples. Bar graph shows the concentration-dependence of the aldosterone-induced increase in mRNA of ACE. **$p<0.01$ vs Control.

0°C에서 1분간 annealing후 72°C에서 1분 30초간 extention 시켜 35회 반복하였다. 이를 glass milk(BIO 101 kit, Boehringer Mannheim)로 순수 분리 후, T7 RNA polymerase를 이용하여 in vitro transcription (Riboprobe in vitro transcription system, Promega, USA) 시켜 rcRNA를 완성시켰고, 분광광도계상 광학밀도를 이용하여 정량하였다.

SQRT-PCR

1 μg의 VSMC total RNA와 50 pg의 표준 RNA를 같은 튜브 안에 섞은 후 MMLV reverse transcriptase (Promega, USA)를 넣고 37°C에서 60분간 반응시켜 각각을 single stranded cDNA로 역전사 시켰고, 99°C에서 5분 동안 역전사효소를 비활성화 시킨 후, 5°C에서 방치하였다. 이렇게 만들어진 cDNA를, 10 mM Tris(pH 8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM $MgCl_2$, 200 μM dNTP, 0.02 μCi/ul의 32P-dCTP, 25 pmol씩의 ACE sense primer와 antisense primer를 넣고 PCR 하였다. Hot start 방법을 이용하여 반응액을 95°C에서 5분간 가열하여 변성시킨 후, 85°C에서 5분간 유지시키면서 2.5 unit의 Taq DNA 중합효소(Boehringer Mannheim, FRG)를 따로 첨가하였다. PCR 반응은 95°C에서 1분간 가열하여 denaturation 시키고, 58°C에서 1분간 annealing후 72°C에서 1분 30초간 extention 시켰고, PCR cycle 수를 조절하여 amplification의 exponential phase 기간 내에서 DNA 산물을 얻도록 하였다. 음성대조군으로는 cDNA 합성시 RNA대신 증류수를 넣어 PCR을 시행하였다. PCR 산물의 반정량을 위하여 gel을 건조시킨 후 phosphoimager를 이용하여 해당 band의 감광 정도를 측정하였고 x-ray film에 노출시켜 사진을 얻었다. RNA를 첨가하지 않고 RTN-PCR의 모든 과정을 거친 산물을 동시에 전기영동하여 background를 측정하여 빼어 준 후 목표 RNA와 표준 RNA의 크기 차이에 따른 32P-dCTP의 incorporation 차이를

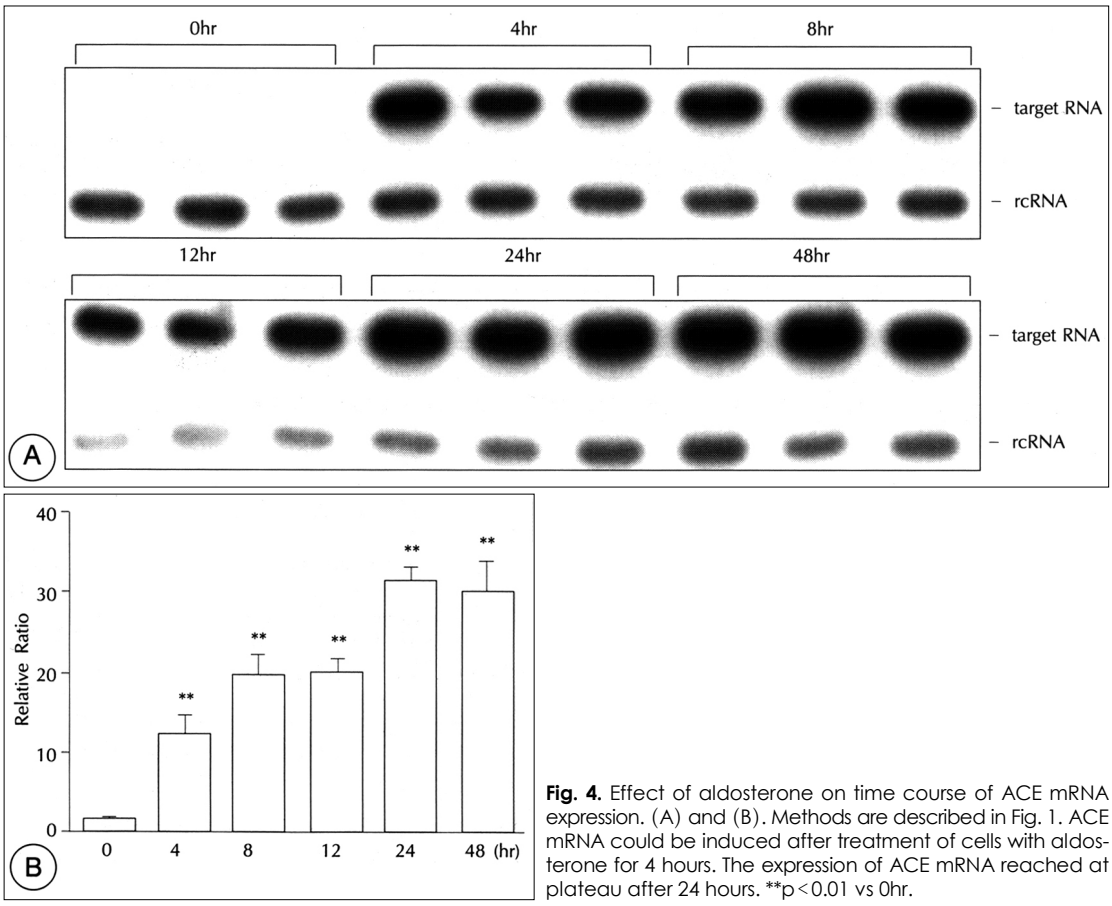


Fig. 4. Effect of aldosterone on time course of ACE mRNA expression. (A) and (B). Methods are described in Fig. 1. ACE mRNA could be induced after treatment of cells with aldosterone for 4 hours. The expression of ACE mRNA reached at plateau after 24 hours. **$p < 0.01$ vs 0hr.

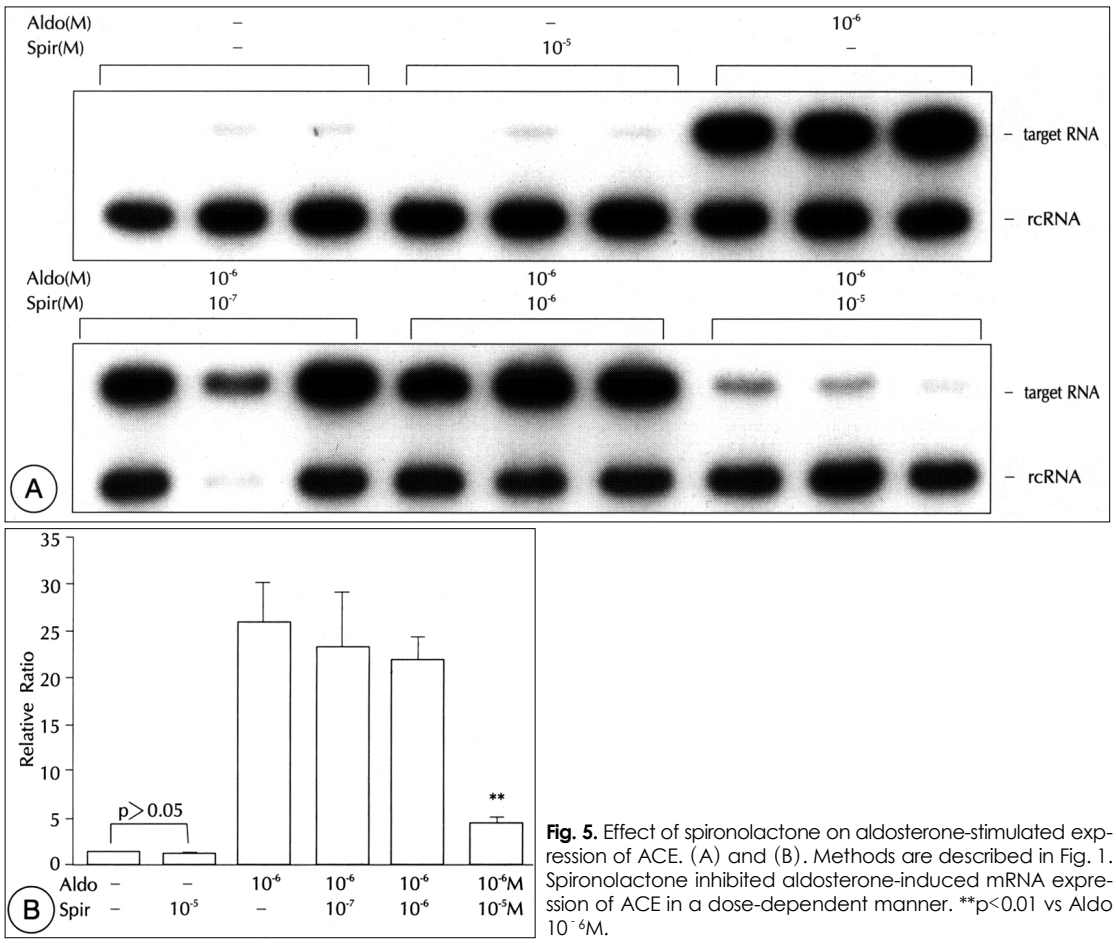


Fig. 5. Effect of spironolactone on aldosterone-stimulated expression of ACE. (A) and (B). Methods are described in Fig. 1. Spironolactone inhibited aldosterone-induced mRNA expression of ACE in a dose-dependent manner. **p<0.01 vs Aldo 10^{-6}M.

보정하기 위하여 목표 RNA와 표준 RNA의 G/C 양을 계산하여 표준 RNA의 측정값에 2.6을 곱하였다. rcRNA/target RNA ratio를 구하였고 DSF 조건에서의 ACE mRNA 발현을 1로하여 비를 구하였다.

VSMC의 자극

6 well plate에 VSMC을 배양하여 세포가 confluent한 상태에 도달하면 DSF로 배양액을 갈아주고 48 72시간 후 aldosterone(Sigma, USA), Ang II(Sigma, USA), spironolactone(Sigma, USA), IL-1β(R&D, USA), TNF-α(R&D, USA)를 각각 또는 동시에 첨가하여 세포를 자극한 후 RNA를 추출하여 ACE mRNA의 발현을 반정량적인 방법으로 조사하였다.

통계처리

데이터는 mean±SEM으로 표시하였다. 두 군간의 통계 처리는 unpaired Student's t test를 이용하였다. 3개 이상의 군의 차이는 ANOVA for multiplesample comparison을 이용하여 분석하였으며 $p<0.05$일 경우 통계적으로 유의한 것으로 하였다.

결 과

1) 먼저 aldosterone이 ACE mRNA의 발현을 증가시키는지와 aldosterone 용량에 따른 발현의 차이를 조사하였다. Aldosterone은 ACE mRNA의 발현을 증가시켰으며, aldosterone을 1 nM부터 50 μM까지 서로 다른 농도로 24시간 동안 자극하였을 경우 VSMC의 ACE mRNA의 발현은 aldosterone 농도에 비례하여 증가하였다(Fig. 3). Aldosterone에 의한 ACE mRNA 발현의 ED 50는 약 10 μM이었다.

2) 다음으로 aldosterone에 의한 ACE mRNA 발현

의 시간적인 변동을 조사하였다. Aldosterone 10 uM을 4, 8, 12, 24, 48시간 자극하였을 때 VSMC의 ACE mRNA 발현은 4시간 후 이미 증가하기 시작하여 24시간 후에는 plateau에 도달하였다(Fig. 4).

3) 위와 같은 aldosterone에 의한 ACE mRNA 발현의 증가가 aldosterone이 mineralocorticoid 수용체에 결합하여 일어나는 non-genomic action인지 알아보기 위하여, mineralocorticoid 수용체의 aldosterone 길항제인 spironolactone투여 후 aldosterone에 의한 ACE mRNA 발현이 억제되는지를 알아보았다. Spironolactone을 aldosterone 1 μM과 함께 투여하였을 때 농도에 비례하여 ACE mRNA의 발현을 억제하였으며 10 μM에서 ACE mRNA의 발현은 거의 관찰되지 않았다(Fig. 5).

4) VSMC의 ACE mRNA 발현이 RAAS의 다른 구성요소에 의하여 어떠한 영향을 받는지 알아보기 위하여 Ang II가 aldosterone에 의한 ACE mRNA의 발현에 미치는 영향을 조사하였다. Ang II는 VSMC의 기저 ACE mRNA 발현에 영향을 미치지 않았으나 aldosterone에 의한 ACE 발현을 농도에 비례하여 억제하였다(Fig. 6). 따라서 RAAS내의 ACE 발현에는 negative feedback loop가 형성되어 있음을 알 수 있었다.

5) 다음으로 혈관질환의 병태생리에 중요한 역할을 하는 cytokine들인 IL-1β와 TNF-α가 ACE 발현에 미치는 영향을 알아보았다. IL-1β와 TNF-α 각각은 ACE 발현을 유의하게 증가시키지는 않았고 lipopolysaccharide(LPS)도 ACE 발현에 영향을 미치지 않았다(Fig. 7).

6) Cytokine IL-1β와 TNF-α를 동시에 투여하였을 경우 VSMC의 ACE mRNA 발현은 대조군에 비하여 1.6배로 미약한 증가를 보였으나($p<0.01$) aldosterone과 이들 cytokine들을 같이 투여했을 경우 ACE의

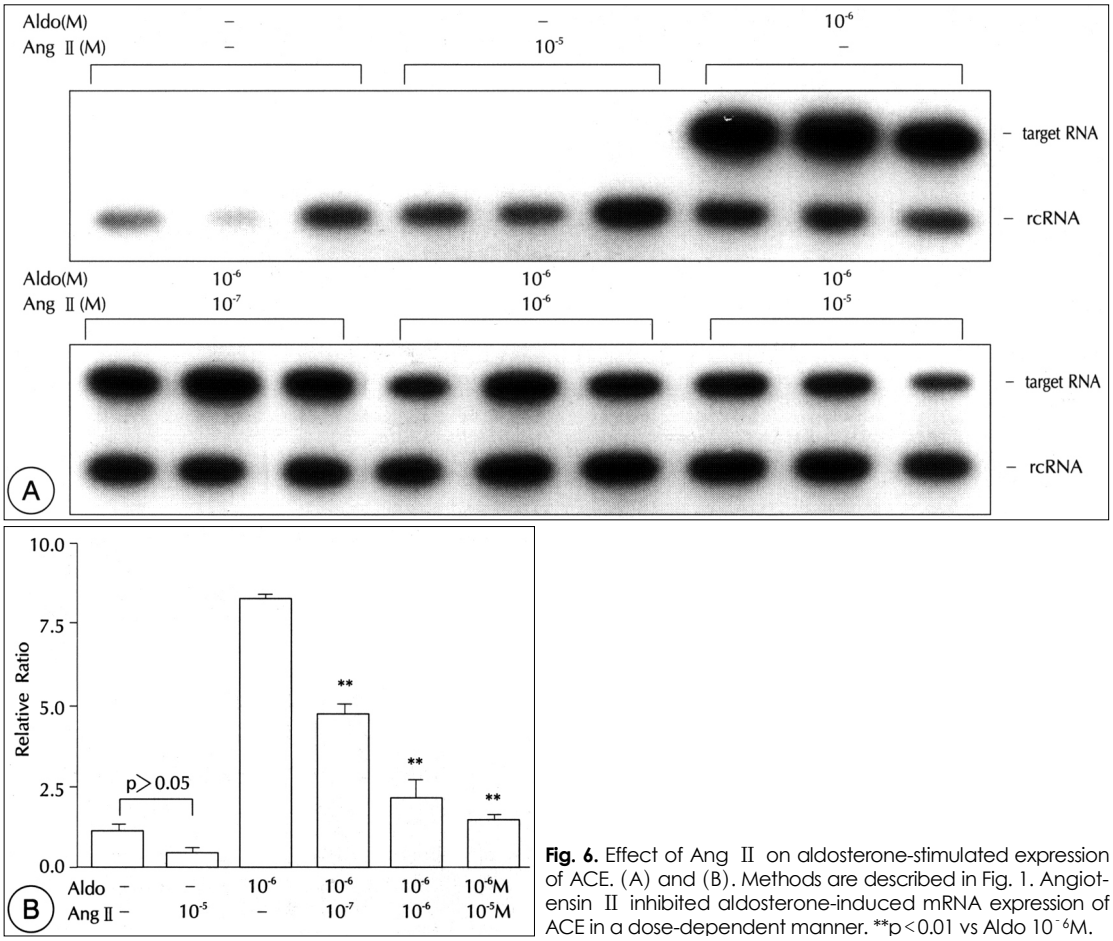


Fig. 6. Effect of Ang II on aldosterone-stimulated expression of ACE. (A) and (B). Methods are described in Fig. 1. Angiotensin II inhibited aldosterone-induced mRNA expression of ACE in a dose-dependent manner. **$p<0.01$ vs Aldo 10^{-6}M.

발현은 aldosterone 단독 자극 시의 6.8배에서 10.2배 ($p<0.01$) 증가하여 aldosterone과 이들 cytokine들과는 ACE 발현에 대하여 상승 작용이 있음을 관찰할 수 있었다(Fig. 8).

고 찰

RAAS은 과거 전형적인 endocrine system의 하나로서 마지막 작용물질인 Ang II, aldosterone을 통하여

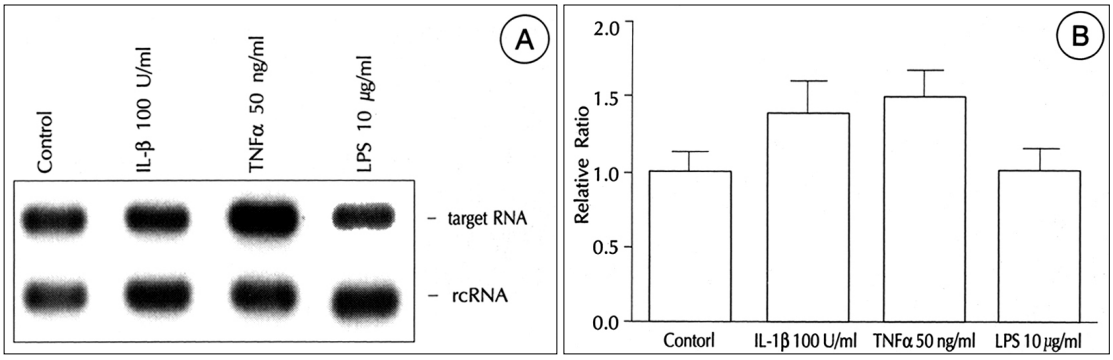


Fig. 7. Effect of cytokine IL-1b or TNF-a on ACE mRNA expression.
(A) and (B). Methods are described in Fig. 1. IL-1b or TNF-a as well as lipopolyssacharide(LPS) did not induce mRNA expression of ACE gene in vascular smooth muscle cells ($p>0.05$ vs Control).

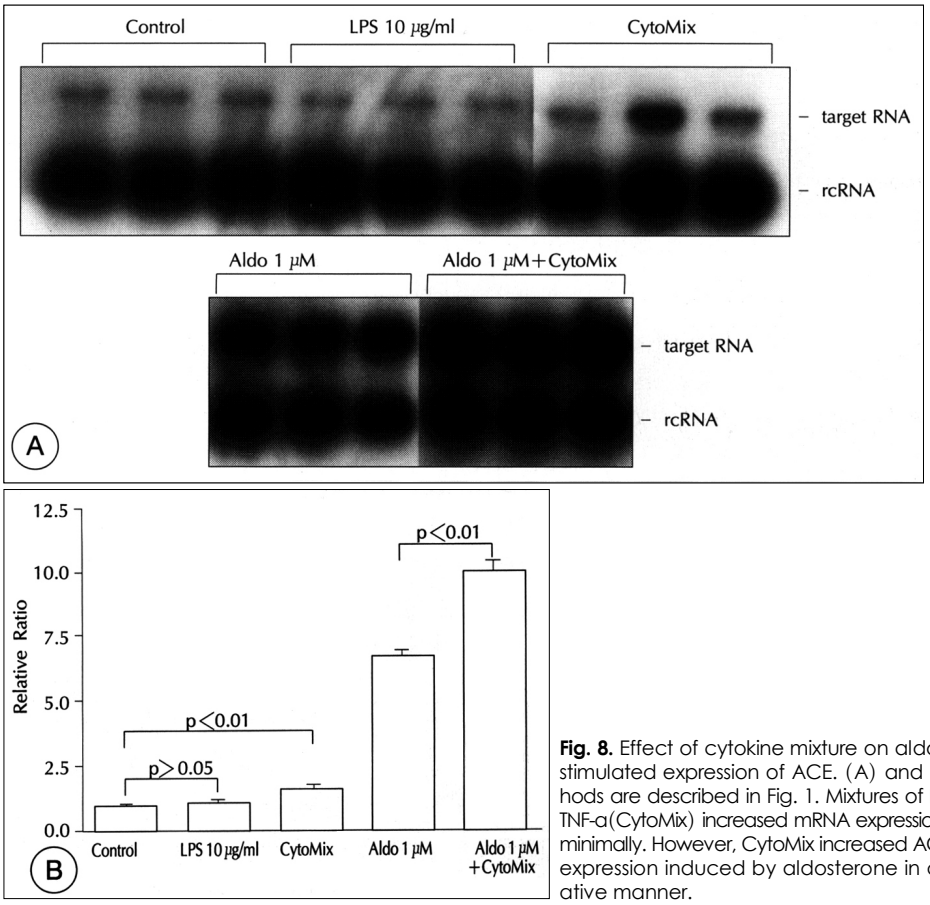


Fig. 8. Effect of cytokine mixture on aldosterone-stimulated expression of ACE. (A) and (B). Methods are described in Fig. 1. Mixtures of IL-1b and TNF-a(CytoMix) increased mRNA expression of ACE minimally. However, CytoMix increased ACE mRNA expression induced by aldosterone in an additative manner.

여러 기관에 작용하여 혈관수축, 염분과 수분 항상성(salt and volume homeostasis) 등에 관여하는 것으로 알려져 왔다. 그러나 최근 분자생물학적인 방법의 도입으로 RAAS의 조직 내에서의 autocrine, paracrine action이 심혈관질환의 병태생리에 중요한 역할을 함이 알려지게 되었다.[1)2)] 전형적인 endocrine system으로서의 RAAS은 renin은 신장에서, angiotensinogen은 간에서, ACE은 주로 폐의 EC에서, aldosterone은 부신피질에서 생산되는 것을 일컬어 왔다. 최근 들어 RAAS의 구성 요소들인 renin-like enzyme, angiotensinogen, ACE, angiotensin receptor, aldosterone 생성 효소(CYP11B2), mineralocorticoid receptor(MR) 등이 혈관벽의 VSMC와 아마도 EC에 존재함이 알려짐에 따라 혈관 내에 local RAAS(=vascular RAAS)가 있음을 알게 되었다.

ACE은 Ang I을 Ang II로 변환시켜 혈관의 병태생리에 중요한 역할을 한다. 즉, ACE 억제제를 투여하여 ACE 활성도가 억제되면 Ang II의 생산이 줄어들게 되고, ACE 유전자를 과발현시키게 되면 혈관 손상 후의 신내막(neointima)의 형성이 증가하게 된다.[3)] 한편 Ang II는 배양된 bovine aortic EC로부터 aldosterone을 생산하는 것으로 알려져 있다.[8)] 따라서 혈관벽 내의 ACE 활성도가 혈관벽 내의 Ang II과 aldosterone의 최종 농도를 조절한다고 가정할 수 있으며, 따라서 동맥경화에서 혈관벽 내의 ACE 발현이 증가된다면 Ang I으로부터 Ang II의 생성이 증가되어 Ang II의 약리작용을 나타내며, Ang II는 aldosterone의 합성을 증가시켜 aldosterone에 의한 약리작용을 나타낼 것이다.

ACE을 발현하는 대표적인 세포는 EC로서 ACE는 세포 표면에 ectoenzyme으로 존재한다. ACE는 monocyte의 세포 표면에도 존재하는 것으로 알려져 있으며 monocyte가 macrophage로 변환하게 되면 발현이 증가하게 되고, VSMC, fibroblast도 ACE를 발현하는 것으로 보고되고 있다. 현재까지 알려진 EC의 ACE 활성도를 증가시키는 물질로는 세포내 calcium 농도의 증가, phobol ester, cAMP, glucocorticoid, mineralocorticoid, 갑상선 호르몬, FGF, hypoxia 등이 있다.[12-19)] 최근 들어 VSMC의 ACE 발현에 대하여 일부 연구가 이루어져 dexamethasone, basic FGF 등에 의하여 ACE 활성도 및 mRNA 발현이 증가됨이 알려졌다.[5)6)] Dasarathy 등[20)]에 의하면 aldosterone은 EC에서 ACE의 활성도를 증가시키므로 VSMC에서도 ACE의 발현을 증가시킬 것으로 생각되나 이에 대한 연구결과는 없었다. Aldosterone은 과거 부신피질에서만 생성되는 것으로 알려졌으나 최근 연구 결과에 의하면 혈관벽에서도 생산되며 VSMC과 EC에는 aldosterone 합성에 중요한 최종 효소인 CYP11B2와 aldosterone의 세포네 수용체인 mineralocorticoid receptor(MR) mRNA가 발현된다.[2)7)] 본 연구에서 aldosterone은 농도와 시간에 의존적으로 평활근세포의 ACE mRNA의 발현을 증가시켰다. Dexamethasone에 의한 ACE의 활성도의 증가는 세포에 따른 차이가 있어 EC과 VSMC에서는 농도 증가에 따라 증가하였으나, 단핵구에서는 biphasic한 증가를 보였었다.[21)] 본 연구에서의 aldosterone에 의한 ACE mRNA의 증가는 4시간 후부터 관찰되었으며 이는 Dasarathy 등[20)]의 EC에서의 dexamethasone에 의한 ACE mRNA의 증가와 유사한 소견을 보였다. 이와 같이 빠른 시간 내의 mRNA 발현의 증가는 ACE 유전자의 전사에 새로운 단백합성이 필요하지 않음을 시사하는 소견으로, 이는 EC에서의 dexamethasone에 의한 ACE 활성도의 증가가 RNA 합성을 저해하는 α-amanitin에 의하여는 억제되나 단백합성을 억제하는 cycloheximide에 의하여는 억제되지 않는다는 실험결과와[20)] 일치하나 보다 더 자세한 기전 연구를 위하여는 추후 연구가 필요하다. 본 연구에서의 aldosterone에 의한 ACE mRNA의 증가의 EC 50는 약 10 μM로서 이는 dexamethasone의 경우 ACE 활성도의 증가가 bovine aortic EC(BAEC)에서의 3 nM,[20)] rat VSMC에서의 30 nM[5)] 보다 높은 값이다. 이는 aldosterone이 dexamethasone보다 potency가 낮기 때문이거나, 또는 ACE가 안정적인 효소이므로 ACE 단백의 활성도는 더 낮은 농도의 steroid에 의하여 포화농도에 도달하기 때문일 것으로 생각된다. BAEC의 경우 ACE 활성도의 증가는 dexamethasone이 aldosterone의 1.3배에 지나지 않았으므로,[20)] 세포의 종류 또는 실험동물 종간의 potency의 차이가 있거나, 위의 가설들 중 후자의 가능성이 있을 것으로 생각된다. Steroid 호르몬의 ACE 활성도의 증가는 steroid의 종류에 따른 차이가 있어 BAEC의 경우 costicosterone-21-acetate, dexamethasone, hydrocortisone, aldosterone과 같이 11번째 carbon atom에 hydroxyl 기가 있는 steroid는 ACE 활성도를 증가시켰으나 beta-estradiol, estrone, testosterone, pro-

gesterone, cortisone, dehydrocorticosterone과 같이 11번째 carbon atom에 keto 그룹이 있는 steroid는 영향이 없었다.[20] Steroid 종류에 따른 ACE 활성도 증가도는 BAEC의 경우 hydrocortisone>dexamethasone>aldosterone>corticosterone-21-acetate 순이며, VSMC의 경우 dexamethasone>hydrocortisone=prednisolone 순이었다.[5)20)]

Aldosterone의 VSMC에 대한 작용 기전은 genomic action과 non-genomic action 두 가지가 있다.[22] Genomic action은 기존 잘 알려진 작용으로 세포핵 내의 MR과 결합하여 작용을 나타내는데 MR에 대한 결합은 mineralocorticoid와 glucocorticoid간에 동일하며 전형적인 mineralocorticoid 길항제인 spironolactone에 의하여 결합이 억제된다. 결합 후 수시간이 지나서부터 세포의 단백질 합성을 증가시킨다. Non-genomic action은 최근 알려졌으며 아직 cloning되지 않은 세포막 수용체를 통하여 생리작용을 나타낼 것으로 생각되는데, 이 세포막 수용체는 mineralocorticoid에 선택적으로 결합하며 spironolactone에 의한 길항작용이 없다. 결합 후 즉시(수분 이내) 생리작용이 나타나며 VSMC의 Na^+/H^+ exchanger를 활성화시키며, 세포내 calcium의 농도를 증가시켜 VSMC의 세포 용적 및 수축력에 관여하는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서의 aldosterone에 의한 VSMC의 ACE mRNA 발현의 증가는 spironolactone에 의하여 억제되어 non-genomic action에 의하여 ACE 발현이 유도됨을 알 수 있었으며 이는 다른 연구자들의 연구결과와 일치하는 소견이다.

Aldosterone에 의하여 ACE가 많이 만들어져 활성도가 증가하고 이에 따라 Ang Ⅰ의 Ang Ⅱ로의 변환이 증가되어 Ang Ⅱ의 국소 농도가 증가한다면 Ang Ⅱ는 EC에서 aldosterone의 생산을 유도하고, 이렇게 하여 생산된 aldosterone은 EC과 VSMC의 ACE를 증가시키게 되어 positive feedback loop가 형성되어 혈관벽의 RAAS은 가속적으로 활성화될 것이다. 그러나 본 연구에서 보듯이 aldosterone에 의한 ACE mRNA 발현은 Ang Ⅱ에 의하여 억제되므로 이는 negative feedback loop가 존재하며 궁극적으로는 positive, negative feedback loop의 조절에 의하여 RAAS의 최종생산물인 Ang Ⅱ와 aldosterone의 농도가 정해진다고 예측할 수 있다. Ang Ⅱ은 RAAS의 여러 요소들의 발현을 억제함이 알려져 있다. Ang Ⅱ는 renin과 VSMC의 AT1 수용체의 발현을 억제하며,[23)24)] Ang Ⅱ의 지속적인 주입은 in vivo에서 폐, 고환, 뇌의 ACE mRNA 발현을 억제함이 보고되어 있다.[25-27)] 본 연구에서 Ang Ⅱ는 VSMC의 기저 ACE 유전자발현에는 영향을 미치지 않았다. 이는 EC에서 ACE 활성도가 Ang Ⅰ 또는 Ang Ⅱ에 의하여 영향을 받지 않는다는 보고와 일치하나,[28)] EC은 Ang Ⅱ 수용체가 거의 존재하지 않는 세포이나 VSMC은 Ang Ⅱ 수용체가 풍부하여 Ang Ⅱ에 의하여 매우 민감한 작용을 보임을 고려할 때, Ang Ⅱ가 기저 ACE 발현에 영향이 없음을 확립하는 결과라 할 수 있다. 그러나 aldosterone에 의한 발현을 억제하여 이러한 작용은 위에 열거한 Ang Ⅱ에 의한 RAAS 구성요소 억제 작용에 새로운 기전이 추가됨을 보여주고 있다.

한편 동맥경화 플라크를 구성하는 주요 세포는 활성화된 대식세포로서 대식세포는 혈관벽세포에 영향을 미치는 여러 가지 단백질 및 지질 mediator를 생산한다. 최근의 연구 결과에 의하면 이러한 mediator 중 cytokine들이 동맥경화의 병태생리와 관련이 있음이 알려져 있다. IL-1β, TNF-α가 ACE의 mRNA 발현을 증가시키는가에 대한 보고는 없으나 IL-1은 배양된 HUVEC(human umbilical vein endothelial cell)으로부터 ACE 활성도를 증가시킨다.[12)] 그러나 VSMC의 ACE 발현에 미치는 cytokine의 역할에 대하여는 연구된 바 없었다. 본 연구결과에 의하면 IL-1β와 TNF-α는 VSMC의 ACE 유전자발현에 단독으로는 영향이 없었으나 aldosterone에 의한 ACE 발현을 추가적으로 증가시켰다. 이는 aldosterone 의한 ACE 유전자발현이 동맥경화와 같은 병적인 상태에서 더 증폭될 수 있다는 가능성을 제시한다.

결 론

VSMC의 ACE mRNA는 RAAS의 최종 산물인 aldosterone에 의하여 발현이 증가되었으며 이는 aldosterone 길항제인 spironolactone과 RAAS의 중간 산물인 angiotensin Ⅱ에 의하여 억제되었고, cytokine IL-1β와 TNF-α는 VSMC의 ACE mRNA 발현을 소량 증가시켰으나 aldosterone과 상승 작용을 보였다.

결론적으로 VSMC의 ACE 발현은 RAAS의 구성요소들과 cytokine의 상호작용에 의하여 조절되며 이에 대한 이해는 혈관 질환의 병태생리에 미치는 RAAS의

역할에 대한 이해를 증진시킬 것이다.

요 약

연구배경 :

혈관벽세포들에는 renin - angiotensin - aldosterone system(RAAS)의 구성요소들이 존재하여 이를 국소 RAAS라 한다. 혈관벽의 angiotensin converting enzyme(ACE) 활성도의 변화는 혈관의 병태생리에 중요한 역할을 한다. 최근 내피세포 이외에도 혈관평활근세포(Vascular smooth muscle cell ; VSMC)도 ACE를 생산하는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 RAAS의 구성요소인 aldosterone과 angiotensin II가 ACE 발현에 미치는 영향을 연구하였다. 아울러 혈관질환의 병태생리에 중요한 cytokine인 IL - 1β와 TNF - α가 ACE 발현에 미치는 영향을 연구하였다.

방 법 :

백서 대동맥으로부터 VSMC를 분리하여 일차 배양하였다. VSMC의 ACE mRNA의 발현을 반정량적 역전사 - 중합효소 연쇄반응(RT - PCR)을 이용하여 조사하였다.

결 과 :

1) VSMC의 ACE mRNA의 발현은 aldosterone 농도에 비례하여 증가하여 positive feedback loop가 있음을 알 수 있었다. 2) Aldosterone에 의한 VSMC의 ACE mRNA 발현은 4시간 후 증가하기 시작하여 24 시간 후에는 plateau에 도달하였다. 3) Aldosterone의 mineralocorticoid 수용체 길항제인 spironolactone에 의하여 aldosterone에 의한 ACE mRNA 발현은 억제되었다. 4) Aldosterone에 의한 ACE mRNA 유발은 angiotensin II에 의하여 억제되어 negative feedback loop가 형성됨을 알 수 있었다. 5) Cytokine IL - 1β와 TNF - α 각각은 ACE 발현을 유의하게 증가시키지 않았다. 6) Cytokine IL - 1β와 TNF - α를 동시에 투여하였을 경우 VSMC의 ACE mRNA 발현은 대조군에 비하여 미약한 증가를 보였으나, aldosterone과 이들 cytokine들을 같이 투여했을 경우 ACE의 발현은 aldosterone 단독 자극 시보다 현저히 증가하였다($p<0.01$).

결 론 :

VSMC의 ACE 발현은 RAAS의 구성 요소들과 cytokine의 상호작용에 의하여 조절되며 이에 대한 이해는 혈관 질환의 병태생리에 미치는 RAAS의 역할에 대한 이해를 증진시킬 것이다.

중심 단어 : 안지오텐신전환효소 · 유전자발현 · 알도스테론 · 레닌 - 안지오텐신 – 알도스테론계.

■ **감사문**

본 연구는 1995년도 대한순환기학회 신진연구비의 지원에 의해 이루어졌음.

REFERENCES

1) Dzau VJ. *Circulating versus local renin-angiotensin system in cardiovascular homeostasis. Circulation 1988;77 (Suppl. I):I4-I13.*
2) Hatakeyama H, Miyamori I, Fujita T, Takeda Y, Takeda R, Yamamoto H. *Vascular aldosterone. J Biol Chem 1994; 269:24316-20.*
3) Morishita R, Gibbons GH, Ellison KE, Lee W, Zhang L, Yu H, *et al. Evidence for direct local effect of angiotensin in vascular hypertrophy. In vivo gene transfer of angiotensin converting enzyme. J Clin Invest 1994;94:978-84.*
4) Rakuki H, Kim DK, Krieger JE, Wang DS, Dzau VJ, Pratt RE. *Induction of angiotensin converting enzyme in the neointima after vascular injury, possible role in restenosis. J Clin Invest 1994;93:339-46.*
5) Fishel RS, Eisenberg SJ, Shai SY, Redden RA, Bernstein KE, Berk BC. *Glucocorticoids induce angiotensin-converting enzyme expression in vascular smooth muscle. Hypertension 1995;25:343-9.*
6) Fishel RS, Thourani V, Eisenberg SJ, Shai SY, Corson MA, Nabel EG, *et al. Fibroblast growth factor stimulates angiotensin converting enzyme expression in vascular smooth muscle cells. Possible mediator of the response to vascular injury. J Clin Invest 1995;95:377-87.*
7) Takeda R, Hatakeyama H, Takeda Y, Iki K, Miyamori I, Sheng WP, *et al. Aldosterone biosynthesis and action in vascular cells. Steroids 1995;60:120-4.*
8) Brilla CG, Myers ZG, Weber KT. *Angiotensin II-mediated aldosterone synthesis in cultured bovine aortic cells (abstract). J Hypertens 1992;10:S75.*
9) Matucci-Cerinic M, Jaffa A, Kahaleh B. *Angiotensin converting enzyme: An in vivo and in vitro marker of endothelial injury. J Lab Clin Med 1992;120:428-33.*
10) Owens GK, Thomson LG. *Expression of smooth muscle specific isoactin in cultured vascular smooth muscle cells: Relationship between growth and cytodifferentiation. J Cell Biol 1986;102:343-52.*
11) Huh JE, Kim DK, Choe YH, Ryu JC, Joo SB, Gwon HC, *et al. Development of Quantitative Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction for the Measurement of Angiotensin Converting Enzyme mRNA. Kor Circ J 1997; 27:334-41.*
12) Dasarathy Y, Fanburg BL. *Elevation of angiotensin converting enzyme by 3-isobutyl-1-methylxanthine in cultured endothelial cells: A possible role for calmodulin. J Cell Physiol 1988;137:179-84.*
13) Iwai N, Matsunaga M, Kita T, Tei M, Kawai T. *Regulation of angiotensin converting enzyme activity in cultured*

human vascular endothelial cells. Biochem Biophys Res Commun 1987;149:1179-85.

14) Krulewitz AH, Fanburg BL. *Stimulation of bovine endothelial cell angiotensin-I-converting-enzyme by cyclic AMP-related agents. J Cell Physiol 1986;29:147-50.*
15) Mendelsohn FAO, Lloyd CJ, Kachel C, Funder JW. *Induction by glucocorticoids of angiotensin converting enzyme production from bovine endothelial cells in culture and rat lung in vivo. J Clin Invest 1982;70:684-92.*
16) Okabe T, Yamagata K, Fusisawa M, Takaku F, Hidaka H, Umezawa Y. *Induction by fibroblast growth factor of angiotensin converting enzyme in vascular endothelial cells in vitro. Biochem Biophys Res Commun 1987;145:1211-6.*
17) Krulewitz AH, Baur WE, Fanburg BL. *Hormonal influence on endothelial cells angiotensin-converting enzyme activity. Am J Physiol 1984;247:C163-C168.*
18) King SJ, Booyse FM, Lin PH, Traylor M, Narkates AJ, Oparil S. *Hypoxia stimulates endothelial cell angiotensin converting enzyme antigen synthesis. Am J Physiol 1989; 256:C1231-C1238.*
19) Krulewitz AH, Fanburg BL. *The effect of oxygen tension on the in vitro production and release of angiotensin-converting enzyme by bovine pulmonary artery endothelial cells. Am Rev Respir Dis 1984;130:866-9.*
20) Dasarathy Y, Lanzillo JJ, Fanburg BL. *Stimulation of bovine pulmonary artery endothelial cell ACE by dexamethazone: Involvement of steroid receptors. Am J Physiol 1992;263:L645-9.*
21) Vuk-Pavlovic Z, Kreofsky TJ, Rohrbach MS. *Characteristics of monocyte angiotensin-converting enzyme (ACE) induction by dexamethasone. J Leukocyte Biol 1989;45: 503-9.*
22) Wehling M, Neylon CB, Fullerton M, Bobik A, Funder JW. *Nongenomic effects of aldosterone on intracellular Ca^{2+} in vascular smooth muscle cells. Circ Res 1995;76: 973-9.*
23) Johns DW, Peach MJ, Gomez RA, Inagami T, Carey RM. *Angiotensin Ⅱ regulates renin gene expression. Am J Physiol 1990;259:F882-F887.*
24) Lassegue B, Alexander RW, Nickening G, Clark M, Murphy TJ, Griendling KK. *Angiotensin Ⅱ down-regulates the vascular smooth muscle AT1 receptor by transcriptional and post-transcriptional mechanism: Evidence for homologous and heterologous regulation. Mol Pharmacol 1995; 48:601-9.*
25) Berecek KH, King SJ, Wu SN, Oparil S, Rydzewski B, Raizada M. *Effects of angiotensin Ⅱ (AII) in the presence and absence of subtype-specific AII blockers on ACE gene expression in central nervous system tissue (abstract). FASEB J 1992;6:A1578.*
26) Kohara K, Brosnihan KB, Ferrario Cm, Milsted A. *Peripheral and central angiotensin Ⅱ regulates expression of genes of the renin-angiotensin system. Am J Physiol 1992; 262:E651-E657.*
27) Schunkert H, Ingelfinger JR, Hirsch AT, Pinto Y, Remme WJ, Jacob H, *et al. Feedback regulation of angiotensin converting enzyme activity and mRNA levels by angiotensin Ⅱ. Circ Res 1993;72:312-8.*
28) Fyhrquist F, Hortling L, Grnhagen-Riska C. *Induction of angiotensin converting enzyme by captopril in cultured human endothelial cells. J Clin Endocrinol Metab 1982; 55:783-6.*