

모노크로탈린으로 유도된 폐동맥고혈압 백서 모델에서 안지오텐신 전환 효소에 대한 Bosentan 치료 효과

김 성 진, 차 지 혜, 이 혜 련, 홍 영 미

이화여자대학교 의학전문대학원 소아과학교실

Effects of Bosentan Treatment on Angiotensin Converting Enzyme in Monocrotaline Induced Pulmonary Hypertension Rats

Sung Jin Kim, MD, Ji Hae Cha, MD, Hae Ryun Lee, MD, Young Mi Hong, MD

Department of Pediatrics, Ewha Womans University School of Medicine, Seoul, Korea

ABSTRACT

Background: Pulmonary artery hypertension is characterized by persistent increase of vascular resistance, and is associated with right ventricle failure. We investigated changes of plasma renin, serum aldosterone, angiotensin converting enzyme (ACE) concentrations, ACE gene expressions and protein contents after bosentan treatment. **Methods:** Six-week-old male Sprague-Dawley rats were divided into three groups: control (C) group, monocrotaline (M) group, and bosentan (B) group. Groups M and B were subcutaneously administered with 60 mg/kg of monocrotaline. In group B, 20 mg/kg/day of bosentan was administered by gavage twice a day. The rats were sacrificed after 1, 5, 7, 14, and 28 days. Changes of ACE gene expressions were analyzed by reverse transcription-polymerase chain reaction. Also, plasma renin, serum aldosterone, and ACE levels were measured. **Results:** Serum aldosterone levels were significantly increased in group M compared with group C and significantly decreased after bosentan treatment on day 28. Serum ACE concentrations were significantly decreased compared with group M after bosentan treatment on day 28. Gene expressions of ACE were significantly increased in group M compared with group C on day 5 and significantly decreased after bosentan treatment on day 7 and 14. ACE protein contents significantly increased in group M compared with group C in week 2 and 4. It significantly decreased after bosentan treatment in week 2. **Conclusions:** The renin-angiotensin system is associated with pulmonary artery hypertension. To investigate the effects of bosentan on the renin-angiotensin system in pulmonary artery hypertension, further studies on the effects of bosentan according to different doses are required in the future. (J Korean Soc Hypertens 2011;17(1):28-36)

Key Words: Pulmonary artery hypertension, Monocrotaline, Bosentan, Angiotensin converting enzyme, Gene expression

논문접수일: 2011. 1. 21, 심사완료일: 2011. 3. 17, 게재승인일: 2011. 3. 18
교신저자: 홍영미
주소: 서울 양천구 목동 911-1
Tel: 02) 2650-2841, Fax: 02)2653-3718
E-mail: hongym@chollian.net, ymhong@ewha.ac.kr
이 연구는 2009년도 이화대학교 목동병원 임상연구비와 2009년도 한국연구재단의 (KRF-2009-0064784) 지원을 받아 수행되었음.

서론

폐동맥고혈압은 여러 가지 원인에 의해서 나타나며, 안정시 평균 폐동맥압이 25 mm Hg 보다 크거나 또는 운동

시에 30 mm Hg 보다 큰 경우로 정의된다.¹⁾ 폐동맥 고혈압이 폐혈관 내피의 기능 장애를 일으켜 폐의 섬유아세포(fibroblast)의 증식과 활성을 높이고, 세포 밖 기질의 형성과 섬유증, 염증세포의 침투, 염증을 증진시키는 사이토카인의 증가, 과장된 폐혈관 리모델링, 민무늬근(smooth muscle)의 비대를 일으킨다.^{2,3)}

지난 몇 십 년 동안 심혈관 질환에서 레닌안지오텐신 시스템의 역할에 대해 연구되었다. Angiotensin-converting enzyme (ACE)은 angiotensin (ANG) I에서 ANG II로 변환시키는데 중심적 역할을 한다.^{4,5)} 폐의 모세혈관 벽은 ACE가 매우 많이 발현하는 중요한 장소이다.⁶⁾ 폐의 근육형 내 포상동맥에 있는 내피에서의 ACE 발현 증가는 폐동맥 고혈압 환자⁷⁾와 저산소증에 의해 유발되는 폐동맥 고혈압을 가진 백서⁸⁾에서 동시에 관찰되었다. 이외에 레닌,⁹⁾ 안지오텐시노젠,¹⁰⁾ ANG II 수용체들¹¹⁾을 포함하여 레닌안지오텐신 시스템의 다른 구성성분들이 폐에서 발현된다.

활성화된 레닌안지오텐신 시스템이 폐혈관에 관련된 혈관 수축과 혈관 이완 사이의 불균형을 일으키고 이러한 불균형이 폐동맥고혈압을 일으킨다.¹²⁾ 모노크로탈린(monocrotaline, M)의 한번 투여가 수축기 우심실 압력, 우심실비대, 폐혈관 벽두께의 증가, interstitial 섬유화의 증가를 초래하고 이러한 변화가 레닌, ACE, 안지오텐시노젠, ANG 1 수용체의 mRNA와 염증 전 사이토카인을 증가시킨다고 하였다.¹²⁾ 이러한 사건들이 폐혈관 내피세포에 기능 이상을 초래하여 폐의 섬유아세포의 증식과 활성화를 증강시키고 세포외 기질 형성, 섬유화, 염증세포의 침투, 평활근 세포의 비대를 초래한다.

M은 11개의 구성원으로 이루어진 단핵진 환형의 pyrrolizidine alkaloid (PA)계 독소로, 백서에서 폐동맥 고혈압의 특성을 나타내는 폐혈관 증후군을 야기한다. 현재 M에 의해 유도되는 폐의 독성에 관한 가설은, M이 간에 있는 활성화된 대사산물들을 적혈구를 통해 폐로 이동시켜, 폐에서 내피의 손상을 일으킨다는 것이다.¹³⁾ 그 내피의 손상은 급성 세포 사멸에 의한 것이라기보다는, 아직 알려지지 않은 기작에 의해 폐동맥 벽의 질병을 야기하는 것으로 보인다. M은 다른 PA계 독소와는 달리 폐에 선택적으로

작용한다. M이 경구나 주사로 백서에 투여되면, 폐동맥이 변형되고 우심실 비대가 일어난다.¹⁴⁾

Bosentan은 endothelin (ET)-1의 세포 작용 기전을 조절하는 약물로서 개발되었으며, ET 수용체에 대해 경쟁적으로 작용하여 ET-1의 결합을 차단하는 수용체 차단제이다. 이 중 bosentan은 수용체 A와 B 모두 작용하는 이중수용체 차단제로서 투여 용량에 비례하여 혈장 ET-1 농도를 증가시키며, ET-1에 관련된 세포 증식을 억제하는 것으로 알려져 있다.¹⁵⁾

폐동맥고혈압의 치료 진전에도 불구하고 아직 성공적인 조절이 이루어지지 않고 있다.¹⁶⁾ 아직 M으로 유발한 폐동맥고혈압 모델에서 bosentan 사용 후 ACE 유전자 발현의 변화에 대한 연구는 없었고, ACE 유전자 치료를 위한 기본 자료로 삼고자 본 연구를 실시하였다.

대상 및 방법

1. 재 료

체중이 200–250 g 사이인 6주령 Sprague-Dawley 수컷 백서 90마리를 사용하였다. 사용된 모든 실험동물들은 실험기간 동안 일반적인 동물 사료와 물을 공급하여 12시간 밤낮이 조절되는 사육실에서 관찰하였다. 60 mg/kg M 분말(Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA)를 0.5N NaCl 용액에 용해시켜 배부에 피하주사하여 폐동맥 고혈압을 유발하였다.

실험동물은 다음과 같이 세 그룹을 나누었다. 대조군(n=30)은 생리 식염수를 피하 주사하였고, M군(n=30)은 M을 60 mg/kg 피하주사 하였으며, bosentan군(n=30)은 M을 피하주사한 후 20 mg/kg/day의 bosentan (Tracleear®, Actelion Pharm, South San Francisco, CA, USA)을 멸균 증류수에 녹여 위관 영양법으로 하루에 2번 28일 동안 투여하였다.

1, 5, 7, 14, 28일 째 각 실험군의 동물들을 6마리씩 희생시켰었다. 폐 조직은 효소 분석을 위해, 적출 한 후 바로 -70℃에서 냉동시키고, 10% formalin에서 고정시킨 후, 통상적인 처리로써 paraffin 처리하였다.

2. 혈장 레닌, 혈청 알도스테론, ACE 농도

혈장 레닌, 혈청 알도스테론은 방사면역 측정법 radio-immunoassay (RIA)으로 COBRA-II Gamma Counter (Packard, Palo Alto, CA, USA) 기기를 이용하여 측정하였고, ACE 농도는 효소 분석법으로 COBRA MIRA (Roche, Basel, Switzerland) 기기를 이용하여 측정하였다.

3. 폐의 microarray 분석

TRI REAGENT (MRC, Cincinnati, OH, USA)를 이용하여 제조자의 지시에 따라 백서의 심장 조직으로부터 전체 RNA를 추출하였다. 각 전체 RNA sample (10 µg)은 역전사 효소 SuperScrip II (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 이용한 역 전사 반응을 이용하여 dCTP (Amersham Pharmacia, Piscataway, NJ, USA)와 접합된 cyanine (Cy5)으로 라벨을 하였다. 라벨된 cDNA는 에탄올 침전법을 이용하여 농축하였다. 농축된 Cy5로 라벨된 cDNA는 10 µL의 혼성화 용액 (Genocheck, Ansan, Korea)에 재현탁하였다. 라벨된 cDNA를 Roche NimbleGen Rat genome 12-plex array Roche NimbleGen Inc., Madison, WI, USA)에 놓은 후 NimbleGen H12 mixer (Roche NimbleGen Inc)로 처리하였다. 그 슬라이드는 12시간 동안 42°C에서 MAUI 시스템(BioMicro Systems, Salt Lake City, UT, USA)으로 혼성화하였다. 그 혼성화된 슬라이드는 2×SCC, 0.1% SDS로 2분, 1×SCC로 3분, 그리고 0.2× SCC로 실온에서 2분 동안 씻어냈다. 그 슬라이드는 3,000 rpm으로 20초 동안 말리기 위해 원심분리하였다. 평균적으로 서로 다른 60염기의 뉴클레오티드 (60-mer probe) 5개가 게놈 안에서 각 유전자에 제시되었다. Quality control check (혼성화)가 각 array에서 수행되었고 각 array들은 on-chip control oligonucleotide를 포함하였다. 그 array들은 Axon GenePix 4000B scanner와 결합된 소프트웨어(Molecular device Corp., Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 분석하였다. 유전자 발현 레벨은 Minibscan Version 2.4 (Roche NimbleGen, Inc.)로 계산되었다. 각 유전자의 상대적인 신호 강도는 Robust Multi-array average algorithm을 이용하여 발생되었다. 그 데이터는 Nimbescan version 2.4 (Roche NimbleGen, Inc.)를 이용한 median polish 정규

화 방법을 기초로 하여 처리되었다. 정규화되고, 로그로 전환된 강도 값은 GeneSpring GX 7.3.1 (Agilent technologies, Palo Alto, CA, USA)를 이용하여 분석하였다.

4. RNA 추출과 cDNA 합성

전체 RNA는 TRIzol Reagent™ (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 이용하여 Trizal method protocol에 따라 추출되었고, diethyl pyrocarbonate water에서 재 부유하였다. RNA의 양은 분광 광도적 방법에 의해 260/280 nm에서 결정되었다. RNA 샘플은 -70°C에서 보관되었다. cDNA는 제조자의 protocol (High Capacith RNA-to-cDNA kit, Applied Biosystem, Foster City, CA, USA)에 의해 합성되었다.

5. 유전자 발현 분석과 실시간 역 전사 중합효소 체인 반응 (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)

실시간 양적 PCR은 384-well plate에 3배로 하여 수행되었다. 384 well의 high throughput-put 분석이 ABI Prism 7,900 Sequence Detection System에 의해 수행되었다. 각 샘플로부터 방출된 형광은 charge-coupled device-camera로 모아지고 양적인 데이터는 Sequence-Detection System software (SDS version 2.0, PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)를 이용하여 분석되었다. 반응 혼합물은 10 pmol/µL의 각 프라이머와 2×SYBR Green PCR Master mix (PE Applied Biosystems)를 포함하였다.

cDNA의 첫 번째 가닥의 결과는 glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) 유전자에 의해 표준화되었다. 그 표준화된 cDNA는 PCR 과정에서 주형으로 사용되었다. 쥐의 ACE를 위한 그 특정한 프라이머는 5'-GEE CAC CGA CTC TAC AAC AT-3' (forward)와 5'- ATG GGA CAC TCC TCT GTT GG-3' (reverse)이다. 모든 프라이머들은 같은 조건에서 증폭되었다. 온도 순환 조건은 50°C에서 2분, 95°C에서 10분 그리고 그 다음 95°C에서 30초, 60°C에서 30초, 72°C에서 30초로 40회 순환시켰다. 불특정한 생산물의 존재를 제외시키기 위해 고 해상도 데이터 집합에 의해 증폭이 끝난 후, 온도가 60°C

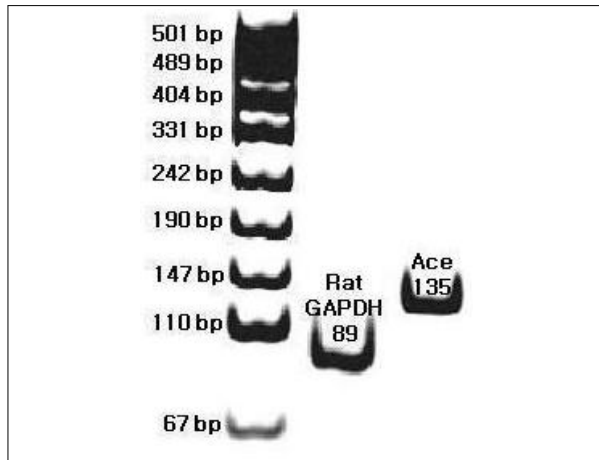


Fig. 1. Typical example of RT-PCR products of ACE mRNA in lung tissue. The RT-PCR products from the transcripts of ACE and GAPDH were 135 bp and 89 bp. RT-PCR, reverse transcription polymerase chain reaction; ACE, angiotensin converting enzyme; GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase.

에서 90℃로 증가되는 동안 온도 증가 비율은 0.21℃/sec로 생산물의 녹는점 곡선 분석이 규칙적으로 수행하였다. 실시간 PCR의 순환 횟수를 방정식에 기초하여 유전자의 양(ng)에 따라 전환시켰다. 실시간 PCR 분석은 Applied Biosystem Prism 7900 Sequence detector system에 의해 수행되었다(Fig. 1).

6. Western blot 분석

조직을 pH 7.4의 10 mM Tris HCl 완충용액, pH 8.0의 0.5 mM EDTA, 0.25 M sucrose, 1 mM PMSF, 1 mM Na_4VO_3 와 단백질 분해효소 저해제 혼합제(Roche-Boehringer-Mannheim) 내에서 균질화시켰다. 원심분리 후, 상청액을 sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)에 의해 분리하였다. 샘플은 동량의 단백질 25 μg 이 포함되도록 하여 10% polyacrylamide gel에 로딩하였다. Acrylamide gel에 의해 분리된 단백질들은 polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane (Millipore, Bedford, MA)으로 pH 8.4의 25 mM Tris와 192 mM glycine이 포함된 transfer buffer를 사용하여 400 mA에서 옮겼다. PVDF membrane은 5% non-fat dry milk와 1% Tween 20이 포함된 TBS로 실온에서 1시간 동안 차단하

였다. 그리고 ACE (Abnova, Taipei, Taiwan), ET1 (Santa cruz, CA, USA), GAPDH (Epitomics, CA, USA)가 포함된 적절한 1차 항체와 함께 4℃에서 하룻밤 반응시켰다.

다음으로, 그 membrane을 anti-rabbit horseradish peroxidase-conjugated IgG 2차 항체(Cell Signaling Co., Beverly, MA, USA)와 1시간 동안 실온에서 반응시켰다. 그것을 씻고 난 후, membrane은 Enhanced Chemiluminescence (ECL) detection system을 적용하여 현상하였다.

7. 통계학적 분석

평균 $\pm$ 표준편차에 따라 결과를 표현하였다. Unpaired two-tailed test와 Mann-Whitney test가 사용되었고, p-value < 0.05가 통계학적으로 유의하다고 간주하였다.

결 과

1. 혈청 알도스테론과 ACE 농도, 혈장 레닌 농도

혈청 알도스테론의 농도는 M군에서 C군에 비해 28일째(346.4 ± 97.6 vs. 36.2 ± 25.2 pg/mL) 유의하게 증가하였고, bosentan 투여 후에 의미 있게 감소하였다(85.8 ± 84.1 pg/mL) (Fig. 2).

혈청 ACE 농도는 M군과 C군은 유의한 차이가 없었고, bosentan군에서 M군에 비해 28일(190.7 ± 52.8 U/L vs.

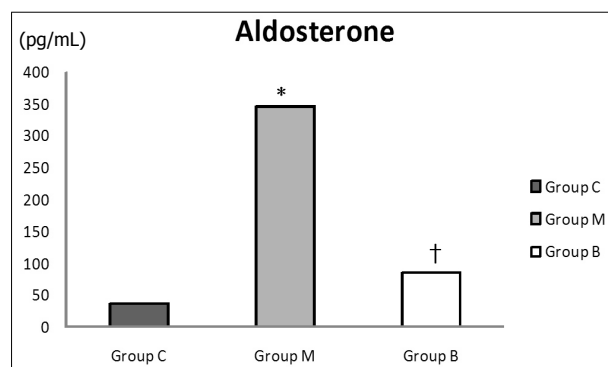


Fig. 2. Changes in serum aldosterone levels on day 28. Serum aldosterone levels significantly increased in group M compared with group C and decreased after bosentan treatment on day 28. C, control; M, monocrotaline; B, bosentan. *p<0.05 significantly different from C group. †p<0.05 significantly different from M group.

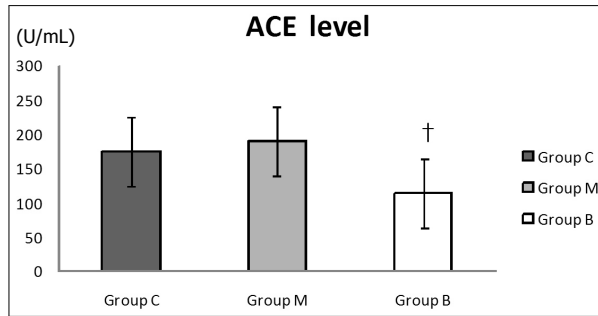


Fig. 3. Changes in serum ACE levels on day 28. Serum ACE levels significantly decreased compared with M group after bosentan treatment on day 28. ACE, angiotensin converting enzyme; C, control; M, monocrotaline; B, bosentan. [†]*p* < 0.05 significantly different from M group.

114.1 ± 54 U/L)에 유의한 감소를 보였다(Fig. 3).

혈장 레닌 농도는 측정하였지만 세 그룹 간에 차이가 없었고, 자료를 제시하지 않았다.

2. Microarray 분석

ACE가 microarray 분석에서 M을 투여 후에 2배 이상의 과발현됨을 확인하였다(자료는 제시하지 않았다).

3. 폐조직에서 ACE 유전자의 발현의 변화

ACE 유전자 발현이 C군과 비교하였을 때 M군에서 5일

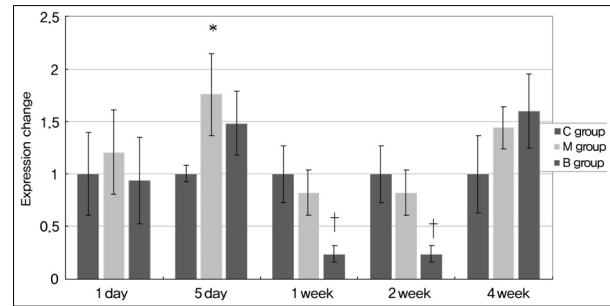


Fig. 4. Gene expressions of ACE after bosentan treatment. Group M presented with significantly increased gene expression of ACE on day 5. It significantly decreased on day 7 and 14 after bosentan treatment. ACE, angiotensin converting enzyme; C, control; M, monocrotaline; B, bosentan. **p* < 0.05 significantly different from C group. [†]*p* < 0.05 significantly different from M group.

Table 1. Gene expression levels of angiotensin converting enzyme in the lungs by RT-PCR

Day	No	Group C	Group M	Group B
1	6	1±0.39	1.21±0.40	0.94±0.42
5	6	1±0.07	1.76±0.39*	1.48±0.31
7	6	1±0.27	0.82±0.21	0.24±0.08 [†]
14	6	1±0.27	0.82±0.22	0.24±0.08 [†]
28	6	1±0.36	1.44±0.21	1.60±0.35

RT-PCR, reverse transcription polymerase chain reaction; C, control; M, monocrotaline; B, bosentan.

**p* < 0.05 significantly different from C group.

[†]*p* < 0.05 significantly different from M group.

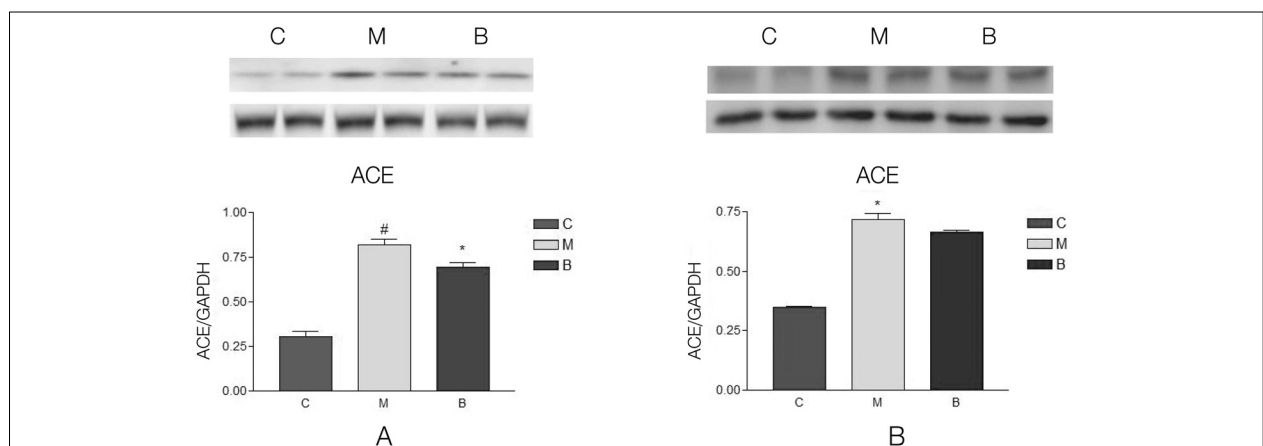


Fig. 5. ACE protein contents by western blot analysis. ACE protein contents significantly increased in the M group compared with group C. It significantly decreased after bosentan treatment in week 2 (A). ACE protein contents significantly increased in the M group compared with group C in week 4. However, it did not change after bosentan treatment in week 4 (B). ACE, angiotensin converting enzyme; GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; C, control; M, monocrotaline; B, bosentan. [#]*p* < 0.05 significantly different from C group. **p* < 0.05 significantly different from M group.

째 유의하게 증가하였고(1.76 ± 0.38 vs. 1 ± 0.07), 그 이후에는 유의한 차이가 없었다. ACE 유전자의 발현량은 bosentan을 투여한 후 14일, 28일 M군에 비해 유의하게 감소하였다(Table 1, Fig. 4).

4. 폐조직에서 ACE 단백질의 변화

2주째 시행한 ACE 단백질 발현량은 M군에서 C군에 비해 유의하게 높았고, B군에서 M군에 비해 유의한 감소를 보였다(Fig. 5A). 4주째 ACE 단백질 발현량은 M군에서 C군 비해 유의하게 증가하였으나 B군에서는 M군에 비해 유의한 차이가 없었다(Fig. 5B).

고 찰

본 연구자들은 이전 연구에서 M이 폐동맥고혈압을 유발하는 것을 증명하였다.^{16,17)} 우심실 무게, 우심실/좌심실+중격 비, 평균 우심실 압력이 M을 투여 후 대조군에 비해 14일, 28일에 유의하게 증가하였고, 이상의 소견으로 우심실 비대가 2주부터 진행되는 것을 확인할 수 있었다.^{16,17)} 폐세동맥 중막 비후 소견은 5일째부터 M군에서 대조군에 비해 유의하게 증가하였고, 폐 근육형 내 포상동맥은 M 투여 1일째부터 대조군에 비해서 유의하게 증가하였다. 이상의 소견으로 M이 폐동맥고혈압을 일으키는 것을 입증하였다. 우심실비대는 폐동맥고혈압의 이차적으로 오는 것으로 생각되고 이 소견을 이전의 보고들과 유사하였다.^{16,17)} 본 연구자들은 이전 연구^{16,17)}에서 bosentan에 대한 폐동맥고혈압에 대한 치료 효과를 보고하였다. Bosentan 투여 후 14일 이후부터는 우심실 무게, 우심실/좌심실+중격 비, 평균 우심실 압력이 유의하게 감소함을 관찰하였다. 폐세동맥 중막 비후 소견은 bosentan 투여 후 14일 이후부터 M군에 비해 뚜렷한 감소를 보였고, 폐 근육형 내 포상동맥은 bosentan 투여 1일 이후부터 유의하게 감소하였다.^{16,17)}

Bosentan에 대한 폐동맥고혈압에 대한 효과는 투여한 약의 용량에 따라 연구자마다 결과가 다르고, 사용한 백서의 주수에 따라 매우 다양하게 보고하고 있다.

현재 사람의 폐동맥고혈압과 똑같은 완전한 실험 모델은 없다. 동물과 사람의 폐동맥고혈압 모델 사이에 유사점과 차이점이 있다. 폐동맥 고혈압을 촉진시킬 수 있는 자극에 대한 반응이 종족 간에 차이가 있고 사용되는 동물의 성별, 연령에 따라 다르다.

Bosentan의 효과는 ET-1과 ET A 수용체 또는 ET B 수용체와의 상호작용을 차단함으로써 일어난다. ET A 수용체는 혈관의 평활근(smooth muscle)에 위치하며, ET B 수용체는 혈관 안쪽의 내피세포에 위치하여 둘 다 혈관과 관련있는 기능을 가진다. ET는 혈관의 항상성을 유지하는데 중요한 단백질로서, 이것이 과발현되면 고혈압과 심장병을 유발한다. 폐에서 ET-1이 발현되면 생명을 위협하는 치명적인 질병인 폐동맥 고혈압이 유발된다.

Bosentan 치료 후 ET-1, ET 수용체 A,¹⁷⁾ endothelial nitric oxide synthase, matrix metalloproteinase-2, tissue inhibitor of matrix metalloproteinase¹⁸⁾ 등 유전자 발현의 변화에 대해서 본 연구자들은 보고하였다.

Bosentan 투여 후 ACE 유전자 발현에 대한 보고는 없기 때문에 본 연구를 실시하였다. M을 투여 후 혈청 알도스테론 농도는 M군에서 C군에 비해 28일째 유의하게 증가하였고, 혈청 ACE, 혈장 레닌 농도는 대조군과 유의한 차이가 없었다. Bosentan 투여 후 4주째 시행한 혈청 알도스테론, ACE는 MCT군에 비해 유의하게 감소하였으나 혈장 레닌은 유의한 차이가 없었다. ACE의 유전자 발현은 5일째 M군에서 C군에 비해 유의하게 증가하였고, 7일, 14일에 B군에서 M군에 유의하게 감소하였다. ACE 단백질 발현은 M군에서 2주, 4주에 유의하게 감소하였고, bosentan 치료 후 2주에 ACE 단백질 발현이 유의하게 감소하였다. M을 투여하였을 때 레닌안지오텐신 시스템이 ACE의 유전자 발현을 초기에 증가시키는 것을 알 수 있었다. 본 연구자들은 이번 실험에서는 M에 의해 유도된 폐동맥 고혈압에서 ET-1 수용체에 대한 비특이적 차단제인 bosentan을 지속적으로 투여하였을 때 효과가 나타나는 시기는 각기 다르지만 혈장 레닌, 혈청 알도스테론, ACE의 유전자 발현, ACE 단백질 발현에 대해 영향을 미치는 것을 증명하였다.

레닌안지오텐신 시스템은 체액과 염분 평형 뿐 아니라 혈압의 항상성을 유지하는데 중요한 역할을 한다. 레닌안지오텐신 시스템의 구성요소들 중 일부가 과발현될 경우에는 고혈압과 심장병이 발생할 수 있다. ANG 2의 농도가 증가하면 부신에서 알도스테론 분비가 증가하는데, 알도스테론은 신장에서 염분과 수분의 재흡수를 도와 혈류량을 증가시킨다. 동맥의 수축과 혈류량의 증가는 혈압을 상승시킨다. 레닌안지오텐신 시스템은 폐동맥고혈압, 폐섬유화의 병리에 관여한다.¹⁹⁾ 폐혈관에 있는 모세혈관은 ACE가 높게 발현되는 주요한 장기이다.⁶⁾ 폐동맥고혈압 환자⁷⁾와 저산소증으로 유발된 폐동맥고혈압을 가진 쥐²⁰⁾에서 폐 근육형 내 포상동맥의 내피세포에서 ACE 발현의 증가가 관찰되었다.

ACE insertion/deletion polymorphism과 폐동맥고혈압과의 관련성에 대해서는 논란이 많다.^{21,22)} ACE insertion/deletion polymorphism이 폐동맥고혈압에 관여하고 ACE 유전자의 D allele가 혈청 ACE 활동을 증가시킨다고 하였다. ACE D/D 유전자형과 증상의 심각도와 관련이 있다는 보고²¹⁾가 있는 반면에 ACE D/D 유전자형은 우심실 비대와 덜 관련이 있다고 하였다.²²⁾

폐동맥고혈압에서 레닌안지오텐신 시스템의 역할에 대해서도 논란이 많다. Ferreira 등¹²⁾은 M 투여 후 레닌, 안지오텐시노젠 mRNA가 18배 증가하였고, AT1 수용체가 4배, ACE mRNA가 5배 증가됨을 보고하였다.

반면에 본 연구에서는 혈청 알도스테론 농도는 M군에서 28일째 유의하게 증가하였으나, 레닌, ACE 농도는 대조군에 비해 유의한 차이가 없었다. ACE 유전자 발현의 변화는 5일째 M군에서 유의하게 증가하였으나 그 이후에는 뚜렷한 변화가 없었다. ACE 단백질 발현은 M군에서 2주, 4주에 유의하게 증가하였기 때문에 본 연구 결과로 M으로 유발된 폐동맥고혈압 모델에서 레닌안지오텐신 시스템에 변화를 초래함을 알 수 있었다.

Bosentan 투여에 대한 효과는 혈청 알도스테론, ACE는 M군에 비해 유의한 감소를 보였고, ACE 유전자 발현의 변화는 1주, 2주, ACE 단백질 발현은 2주에 유의하게 감소함을 알 수 있었다.

초기 연구들은 폐에서 ACE에 대한 M으로 유발된 초기 손상에 초점을 두었다.^{23,24)} 이전 연구는 M 투여는 ACE 활동의 이상성(biphasic) 변화를 제시하였다. M 투여 후 초기에 ACE 활동은 증가하나,²⁵⁾ 폐동맥 고혈압이 진행함에 따라 후기에는 감소한다.²³⁾ M으로 유발된 ACE 활동의 감소는 지연된 내피세포 손상과 관련된 M의 간접 효과라고 생각된다.²⁶⁾ 이것은 본 연구 결과와 일치하였다. M으로 유발된 폐동맥 고혈압에서 폐에서 ACE 활동성의 변화는 폐혈관 리모델링에서 ANG I의 병리생리학적 변화를 일으킴을 제시하였다.²⁶⁾ ACE 억제제 MCT 유발된 폐동맥 고혈압을 억제한다고 하였다.²⁶⁾ 이전 제시되었던 ACE 억제제가 M으로 유발된 폐동맥 고혈압을 방지하거나 억제할 수 있는 능력은 AT1 생성의 감소라기 보다 폐 bradykinin을 증가시킬 수 있는 능력으로 부터 초래될 수 있다.

폐동맥고혈압의 치료의 진전에도 불구하고 아직 성공적인 조절이 이루어지지 않고 있다. ACE 효소의 과발현이 급성 폐손상에 유익할 것이라는 가설을 바탕으로 ACE2를 포함하는 lentivirus vector는 우심실 수축기 압력과 관련된 M으로 유발된 폐동맥고혈압에서 병리생리를 회복시키고 전염증 cytokine을 억제한다고 보고하였다.²⁷⁾ AT1 수용체 길항제와 ACE 억제제에 대한 폐동맥고혈압 연구는 계속 진행 중이다.²⁸⁾

본 연구의 제한점은 혈장 레닌, 혈청 알도스테론, ACE 검사를 28일에만 시행하였기 때문에 추후에 다른 주수에 서 혈액 검사가 필요할 것으로 생각한다. 실험동물의 연령과 종족이 같을지라도 개체간의 차이가 있기 때문에 더 많은 실험동물에서 후속 연구가 필요할 것으로 생각한다.

레닌안지오텐신 시스템이 폐동맥 고혈압에 관련됨을 알 수 있었고 bosentan이 ET에 대한 길항 효과 외에 혈청 알도스테론, ACE 농도를 유의하게 감소시켰으므로 레닌안지오텐신 시스템에도 관여함을 알 수가 있었다. 폐동맥 고혈압에서 bosentan이 레닌안지오텐신 시스템에 미치는 효과를 알기 위해서는 bosentan 용량에 따른 후속 실험이 필요할 것으로 생각한다.

요 약

연구배경: 폐동맥 고혈압은 폐혈관 저항의 지속적인 증가에 의해 특징지어지고 우심실 부전과 사망을 초래한다. 집중적인 치료에도 불구하고 예후가 좋지 않았으며 폐동맥 고혈압에 관여하는 분자 기전에 대해서도 충분히 밝혀지지 않았다. 이번 실험에서는 monocrotaline (M)에 의해 유도된 폐동맥 고혈압에서 ET-1 수용체에 대한 비특이적 차단제인 bosentan을 지속적으로 투여하였을 때 혈장 레닌, 혈청 알도스테론, angiotensin converting enzyme (ACE)의 농도, ACE 유전자 발현 및 단백 농도 변화를 알아보았다.

방법: 체중 250 g 내외의 6주된 자성 Sprague-Dawley 백서를 대조(C)군, monocrotaline (M)군, bosentan (B)군으로 나누었다. M군과 B군에는 M 수용액 60 mg/kg를 배부에 1회 피하 주사하였고 대조군에는 동량의 생리식염수를 주사하였다. B군에서는 bosentan을 1일째부터 20 mg/kg/day을 경구로 2회 투여하였다. 1일, 5일, 7일, 14일, 28일에 각각 동물을 희생시켜 RT-PCR과 westernblot 분석을 시행하였다. 혈청에서 레닌, 알도스테론, ACE를 측정하였다.

결과: 혈청 알도스테론의 농도는 M군에서 C군에 비해 28일에 유의하게 증가하였고, 혈청 ACE, 혈장 레닌 농도는 대조군과 유의한 차이가 없었다. Bosentan 투여 후 4주째 시행한 혈청 알도스테론, ACE는 M군에 비해 유의하게 감소하였으나 혈장 레닌은 유의한 차이가 없었다. ACE의 유전자 발현은 5일째 M군에서 C군에 비해 유의하게 증가하였고, 7일, 14일에 B군에서 M군에 비해 유의하게 감소하였다. ACE 단백질 발현은 M군에서 2주, 4주에 유의하게 증가하였고, bosentan 치료 후 2주에 ACE 단백질 발현이 M군에 비해서 유의하게 감소하였다.

결론: 레닌안지오텐신 시스템이 폐동맥 고혈압에 관련됨을 알 수 있었고, 폐동맥고혈압에서 bosentan이 레닌안지오텐신 시스템에 미치는 효과를 알기 위해서는 bosentan 용량에 따른 후속 실험이 이루어져야 할 것으로 생각한다.

중심단어: 폐동맥고혈압, Monocrotaline, Bosentan, Angiotensin converting enzyme, Gene expression

References

1. Runo JR, Loyd JE. Primary pulmonary hypertension. *Lancet*. 2003;361:1533-44.
2. Chan SY, Loscalzo J. Pathogenic mechanisms of pulmonary arterial hypertension. *J Mol Cell Cardiol*. 2008;44:14-30.
3. Minamino T, Christou H, Hsieh CM, Liu Y, Dhawan V, Abraham NG, et al. Targeted expression of heme oxygenase-1 prevents the pulmonary inflammatory and vascular responses to hypoxia. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001;98:8798-803.
4. Skeggs LT, Dorer FE, Levine M, Lentz KE, Kahn JR. The biochemistry of the renin-angiotensin system. *Adv Exp Med Biol*. 1980;130:1-27.
5. Turner AJ, Hooper NM. The angiotensin-converting enzyme gene family: genomics and pharmacology. *Trends Pharmacol Sci*. 2002;23:177-83.
6. Studdy PR, Lapworth R, Bird R. Angiotensin-converting enzyme and its clinical significance--a review. *J Clin Pathol*. 1983;36:938-47.
7. Orte C, Polak JM, Haworth SG, Yacoub MH, Morrell NW. Expression of pulmonary vascular angiotensin-converting enzyme in primary and secondary plexiform pulmonary hypertension. *J Pathol*. 2000;192:379-84.
8. Cargill RI, Lipworth BJ. The role of the renin-angiotensin and natriuretic peptide systems in the pulmonary vasculature. *Br J Clin Pharmacol*. 1995;40:11-8.
9. Dezso B, Nielsen AH, Poulsen K. Identification of renin in resident alveolar macrophages and monocytes: HPLC and immunohistochemical study. *J Cell Sci*. 1988;91(Pt 1):155-9.
10. Ohkubo H, Nakayama K, Tanaka T, Nakanishi S. Tissue distribution of rat angiotensinogen mRNA and structural analysis of its heterogeneity. *J Biol Chem*. 1986;261:319-23.
11. Andersen K. Renin-angiotensin-aldosterone system in the elderly: rational use of aliskiren in managing hypertension. *Clin Interv Aging*. 2009;4:137-51.
12. Ferreira AJ, Shenoy V, Yamazato Y, Sriramula S, Francis J, Yuan L, et al. Evidence for angiotensin-converting enzyme 2 as a therapeutic target for the prevention of pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009;179:1048-54.
13. Wilson DW, Segall HJ, Pan LC, Lame MW, Estep JE,

- Morin D. Mechanisms and pathology of monocrotaline pulmonary toxicity. *Crit Rev Toxicol*. 1992;22:307-25.
14. Todd L, Mullen M, Olley PM, Rabinovitch M. Pulmonary toxicity of monocrotaline differs at critical periods of lung development. *Pediatr Res*. 1985;19:731-7.
15. Weber C, Schmitt R, Birnboeck H, Hopfgartner G, van Marle SP, Peeters PA, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the endothelin-receptor antagonist bosentan in healthy human subjects. *Clin Pharmacol Ther*. 1996;60:124-37.
16. Lim KA, Shim JY, Cho SH, Kim KC, Han JJ, Hong YM. Effect of endothelin receptor blockade on monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *Korean J Pediatr*. 2009;52:689-95.
17. Lim KA, Kim KC, Cho MS, Lee BE, Kim HS, Hong YM. Gene expression of endothelin-1 and endothelin receptor A on monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats after bosentan treatment. *Korean Circ J*. 2010;40:459-64.
18. Koo HS, Kim KC, Hong YM. Gene expressions of nitric oxide synthase and matrix metalloproteinase-2 in monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats after bosentan treatment. *Korean Circ J*. 2011;41:83-90.
19. Kuba K, Imai Y, Penninger JM. Angiotensin-converting enzyme 2 in lung diseases. *Curr Opin Pharmacol*. 2006;6:271-6.
20. Morrell NW, Morris KG, Stenmark KR. Role of angiotensin-converting enzyme and angiotensin II in development of hypoxic pulmonary hypertension. *Am J Physiol*. 1995;269:H1186-94.
21. Kanazawa H, Okamoto T, Hirata K, Yoshikawa J. Deletion polymorphisms in the angiotensin converting enzyme gene are associated with pulmonary hypertension evoked by exercise challenge in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;162:1235-8.
22. van Suylen RJ, Wouters EF, Pennings HJ, Cheriex EC, van Pol PE, Ambergen AW, et al. The DD genotype of the angiotensin converting enzyme gene is negatively associated with right ventricular hypertrophy in male patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;159:1791-5.
23. Kay JM, Keane PM, Suyama KL, Gauthier D. Angiotensin converting enzyme activity and evolution of pulmonary vascular disease in rats with monocrotaline pulmonary hypertension. *Thorax*. 1982;37:88-96.
24. Lafranconi WM, Huxtable RJ. Changes in angiotensin-converting enzyme activity in lungs damaged by the pyrrolizidine alkaloid monocrotaline. *Thorax*. 1983;38:307-9.
25. Molteni A, Ward WF, Ts'ao CH, Port CD, Solliday NH. Monocrotaline-induced pulmonary endothelial dysfunction in rats. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1984;176:88-94.
26. Cassis L, Shenoy U, Lipke D, Baughn J, Fetting M, Gillespie M. Lung angiotensin receptor binding characteristics during the development of monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Biochem Pharmacol*. 1997;54:27-31.
27. Yamazato Y, Ferreira AJ, Hong KH, Sriramula S, Francis J, Yamazato M, et al. Prevention of pulmonary hypertension by Angiotensin-converting enzyme 2 gene transfer. *Hypertension*. 2009;54:365-71.
28. Jeffery TK, Wanstall JC. Pulmonary vascular remodeling: a target for therapeutic intervention in pulmonary hypertension. *Pharmacol Ther*. 2001;92:1-20.