



저작자표시 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 이차적 저작물을 작성할 수 있습니다.
- 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원 저작자를 표시하여야 합니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)



의학석사 학위논문

A thesis of Master's degree

백서 심실근세포에서 안지오텐신 II에 의한
NOS1의 활성화 및 이완촉진 기전에 대한 연구

Molecular Insights into Angiotensin II

Up-regulation of Nitric Oxide Synthase 1 and
Faster Ventricular Myocyte Relaxation in Rats

Molecular Insights into Angiotensin II
Up-regulation of Nitric Oxide Synthase 1 and
Faster Ventricular Myocyte Relaxation in Rats

백서 심실근세포에서 안지오텐신 II에 의한
NOS1의 활성화 및 이완촉진 기전에 대한 연구

2013 년 2 월

February, 2013

서울대학교 대학원
의과학과 의과학전공

장 지 현

The Department of Biomedical Sciences,
Seoul National University
College of Medicine

Jang, Jihyun

백서 심실근세포에서 안지오텐신 II에 의한

NOS1의 활성화 및 이완촉진 기전에 대한 연구

이 논문을 의학석사 학위논문으로 제출함

2012년 10월

서울대학교 대학원

의과학과 의과학전공

장지현

장지현의 의학석사 학위논문을 인준함

2012년 12월

위원장 _____

부위원장 _____

위원 _____

Molecular Insights into Angiotensin II

Up-regulation of Nitric Oxide Synthase 1 and

Faster Ventricular Myocyte Relaxation in Rats

by

Jang, Jihyun

A Thesis Submitted to the Department of Biomedical Sciences in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master of Science in Medicine at the Seoul National University College of Medicine

October, 2012

Approved by thesis committee:

Professor _____, Chairman

Professor _____, Vice Chairman

Professor _____,

국 문 초 록

목 차

국 문 초 록.....	i
도 표 목 록.....	iv
약 어 목 록.....	vi
서 론.....	1
연 구 목 표.....	7
연 구 재료 및 방법.....	8
연 구 결 과.....	13
고 찰.....	40
참 고 문 헌.....	45
영 문 초 록.....	51

백서 심실근세포에서 안지오텐신 II에 의한

NOS1의 활성화 및 이완촉진 기전에 대한 연구

장 지 현

의 과학과

서울대학교 대학원

레닌 안지오텐신 시스템은 정상적인 심혈관에 강력한 수축작용을 일으킬 뿐만 아니라 고혈압, 심장비대, 심부전, 부정맥과 같은 심혈관계 질환에서도 중요한 역할을 수행한다. 심장에서 안지오텐신 II (Angiotensin II)는 산화적 스트레스나 G 단백질의존적 신호전달 경로를 통하여 심장비대나 심부전과 같은 질병을 발생시킨다.

최근연구에 의하면 신경성 Nitric Oxide 합성효소(NOS1 혹은 nNOS)는 정상 심장에서 심근 이완을 촉진시킴으로서 심장 확장기 기능을 활성화시킨다. 특히, 심근비대나 심부전과 같은 질환의 심장 조직에서 NOS1 단백질의 발현 및 활성화 증가는 산화적 스트레스 및 심장질환 악화에 대항하는 중요한 방어 기전으로서 작용하고 있다. 하지만 아직까지 심장에서 특이적으로 NOS1을 조절하는 기전에 대해서는 알려진 바 없다. 본 연구에서는 백서의 좌심실근세포에서 안지오텐신 II에 의한 NOS1의 발현과 활성화에 의한 조절 및 수축성을 관찰하고 그 기전을 밝히고자 한다.

안지오텐신 II가 NOS1에 미치는 영향을 확인하기 위하여 안지오텐신 II ($1 \mu\text{M}$)를 시간에 따라 처리하고(30분~6시간), 좌심실 근세포에서 NOS1 mRNA, 단백질 발현을 관찰하였다. 3시간을 처리한 좌심실 근세포에서 NOS1의 mRNA와 단백질

발현이 증가함을 관찰할 수 있었다. 발현뿐만 아니라 NOS1 활성화(NO 생성)도 증가 되었다. NO 생성에 있어서 중요한 수용체인 안지오텐신 II 제 2형 수용체(AT2R)의 길항제인 PD123319를 전 처리 한 경우 NOS1 단백질 발현 및 NO 생성이 차단됨을 볼 수 있었다. 또한 AT2R의 선택적 효현제인 CGP42112A (1 μ M, 3시간)는 안지오텐신 II와 동일하게 NOS1 단백질의 발현을 증가시켰다. 따라서 안지오텐신 II에 의한 NOS1 증가에 있어서 AT2R이 필수적임을 알 수 있었다. 하지만 안지오텐신 II 제 1형 수용체(AT1R)인 Losartan을 전 처리 한 경우에도 안지오텐신 II에 의한 NOS1 단백질 발현과 NO 생성이 증가하지 않았다. 안지오텐신 II는 AT1R을 활성화시켜 NADPH 산화효소 의존적 ROS를 증가시킨다. NADPH 산화효소 억제제(Apocynin), ROS scavenger (4,5-dihydroxy-1,3-benzenedisulfonic acid, Tiron), 환원제(Dithiothreitol, DTT)를 사용하여 ROS 생성을 억제한 경우에도 안지오텐신 II에 의한 NOS1 단백질 발현 및 NO 생성이 차단된 것으로 나타났다. 따라서 AT1R 활성화로 인한 NADPH 산화효소 의존적 ROS 생성이 안지오텐신 II에 의한 NOS1 조절기전의 주요한 상위 조절자로서 작용함을 알 수 있었다. AT1R의 활성화와 AT2R 사이의 관계를 밝히기 위하여 안지오텐신 II 처리 전 후 AT1R과 AT2R의 세포막 발현 단백질을 각각 확인하여 보았다. 안지오텐신 II 처리 전에는 세포막에 발현된 단백질의 양이 AT1R에 비해 AT2R이 매우 낮았다. 하지만 안지오텐신 II 처리 후 30분에 AT1R의 세포막 단백질 발현은 감소하였고, AT2R의 세포막 단백질 발현은 증가함을 확인할 수 있었다. 흥미롭게도 AT2R의 세포막 단백질 발현은 Losartan, Apocynin, Tiron의 전 처리에 의하여 차단되었다. 따라서 AT1R을 통한 ROS 생성이 AT2R을 세포막으로 이동시켰음을 확인할 수 있었고, 이러한 결과는 AT1R-NADPH 산화효소 의존적 ROS 생성을 통한 AT2R의 세포막으로 이동 증가가 안지오텐신 II에 의한 NOS1의 조절 기전으로서 작용할 수 있음을 시사한다.

다음으로, 심근세포 내 생성된 NOS1의 작용을 살펴보기 위하여 안지오텐신 II 처리 후 NOS1이 ROS 생성에 미치는 영향을 살펴보았다. 잘 알려져 있듯이, 심근세포에 안지오텐신 II를 30분 처리하였더니 ROS가 증가한 사실을 확인할 수 있었다. 하지만 처리 후 3시간에는 ROS가 오히려 감소하였다. 놀랍게도, NOS1의 선택적 억제제인 SMTC (S-methyl-L-Thiocitrulline)는 감소된 ROS를 다시 증가시켰다. NADPH 산화효소 활성화에 따른 초파산화물(superoxide) 측정에서도 같은 결과를

얻었다. 따라서 안지오텐신 II에 의하여 증가된 NOS1은 NADPH 산화효소 활성화를 억제한다는 새로운 사실을 알 수 있었다. 활성화된 NOS1이 심장 수축에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 좌심실 근세포의 이완 시간(TR_{50})을 측정한 결과, 안지오텐신 II 처리 후(3시간) 심근 이완이 촉진됨을 확인할 수 있었고, 이는 SMTC, Losartan, PD123319, Apocynin, Tiron 전 처리에 의하여 모두 사라졌다. Phospholamban의 인산화(PLN-Ser¹⁶)는 NOS1의 심장 이완 촉진 기전으로서 알려져 있다. 예상과 같이 안지오텐신 II 처리 후 PLN-Ser¹⁶이 증가 되었고 SMTC는 이를 억제하였다. 따라서 안지오텐신 II에 의한 NOS1 생성이 PLN의 인산화를 통하여 심근세포의 이완을 촉진시킴을 알 수 있었다. Protein kinase A (PKA) 억제제 (PKI 14-22 amid)에 의해 안지오텐신 II에 의한 PLN-Ser¹⁶의 증가는 억제되지 않았으나 soluble guanylate cyclase (sGC)의 억제제인 ODQ (1H-[1,2,4] oxadiazolo [4, 3-a] quinoxalin-1-one)와 PKG 억제제인 KT5823은 모두 PLN-Ser¹⁶의 증가를 억제하였다.

이상의 결과를 종합해 볼 때, 백서 좌심실근세포에서 안지오텐신 II는 NOS1의 mRNA와 단백질 및 NO의 활성화를 증가시켰고, 이 효과는 AT1R과 AT2R에 의하여 매개된다. 흥미롭게도 안지오텐신 II에 의한 AT2R의 세포막 이동은 AT1R과 ROS 의존적이며 이는 AT2R 활성화를 통한 NOS1 증가의 상위기전으로 예상된다. 또한 증가한 NOS1은 NADPH 산화효소를 억제함과 동시에 sGC/PKG에 의한 PLN 인산화를 통하여 심근 이완을 촉진시켰음을 알 수 있었다.

핵심어 : NOS1, 안지오텐신 II, NADPH 산화효소, ROS

학번 : 2011 - 21951

도 표 목 록

Fig. 1. Renin-angiotensin system

Fig. 2. Sources of NO and NO regulation of cardiac function

Fig. 3. Increase of NOS1 mRNA, protein expression and activity by Ang II

Fig. 4. No effect of Ang II treatment on NOS3 protein expression in LV myocytes

Fig. 5. Ang II increased NOS1 protein expression and activity via AT2R

Fig. 6. Ang II increased NOS1 protein expression and activity via AT1R

Fig. 7. Effect of NADPH oxidase-dependent ROS on Ang II stimulation of NOS1 mRNA, protein expression & NO production

Fig. 8. Time-dependent expressions of AT1R and AT2R in biotinylated plasma membrane fraction following Ang II treatment

Fig. 9. Effects of Losartan, Apocynin and Tiron on Ang II-induced AT2R translocation to plasma membrane

Fig. 10. Time-dependent increase (30 min) and decrease (3 hrs) of intracellular ROS following Ang II treatment

Fig. 11. Inhibition of NOS1 increased intracellular ROS and NADPH oxidase activity in LV myocytes

Fig. 12. NOS1 mediated Ang II facilitation of LV myocyte relaxation

Fig. 13. Ang II increased PLN phosphorylation (PLN-Ser¹⁶) via NOS1

Fig. 14. DTT blocked Ang II-increase in PLN phosphorylation (PLN-Ser¹⁶) in LV myocytes

Fig. 15. PKA inhibition did not affect PLN phosphorylation (PLN-Ser¹⁶) in Ang II-treated LV myocytes

Fig. 16. cGMP/PKG inhibition blocked PLN phosphorylation (PLN-Ser¹⁶) in Ang II-treated LV myocytes

Fig. 17. Schematic diagram of hypothesized mechanisms for the activation of NOS1 and relaxation following Ang II stimulation in cardiac myocytes

Table 1. Mechanisms mediating LV myocyte shortening and relengthening after Ang II treatment (3 hrs)

약 어 목 록

ACE : angiotensin converting enzyme

Ang II : angiotensin II

AT1R : angiotensin II type 1 receptor

AT2R : angiotensin II type 2 receptor

cGMP : cyclic guanosine monophosphate

DTT : dithiothreitol

L-NAME : N(G)-nitro-L-arginine methyl ester

LV : left ventricular

NO : nitric oxide

NOS1 : nitric oxide synthase 1

NOS3 : nitric oxide synthase 3

ODQ : 1H- [1,2,4] oxadiazolo [4, 3-a] quinoxalin-1-one

PKA : protein kinase A

PKG : protein kinase G

PLN : phospholamban

ROS : reactive oxygen species

sGC : soluble guanylate cyclase

SMTc : S-methyl-L-thiocitrulline

Tiron : 4,5-dihydroxy-1,3-benzenedisulfonic acid

서 론

1. 심장에서 안지오텐신 II의 역할

레닌-안지오텐신 시스템은 뇌, 심혈관, 신장의 기능을 조절하여 혈압을 상승시킴으로서 정상적인 심혈관의 기능을 조절할 뿐 아니라 심혈관계 질환발생에 있어서도 중요하게 작용 한다(Fig. 1). 레닌-안지오텐신 시스템의 활성화로 인해 생성되는 안지오텐신 II는 죽상경화증, 고혈압, 심근비대증, 부정맥, 당뇨, 심부전과 같은 질병에 관여하는 단백질로서 알려져 있다(Marano G et al., 1997; Varagic J & Frohlich ED, 2002). 잘 알려진 실험적 결과들에서도 안지오텐신 II의 증가는 세포내부의 이온 조성을 변화시키고 염증반응 및 세포 죽음에 관여하며, 특히 심근세포에서는 수축력을 증가시키는 것으로 확인되어졌다(Varagic J & Frohlich ED, 2002; Unger T, 2002). 많이 알려진 안지오텐신 II 결합 수용체로서는 AT1R과 AT2R이 존재하며, 이들은 안지오텐신 II와 결합 시 상반된 작용을 나타내어 안지오텐신 II의 반응이 어느 한쪽으로 치우쳐 질 때 일부분 균형을 잡아주는 역할을 하는 것으로 알려져 있다.

1.1. 심장질환과 관련하여 제 1형 안지오텐신 II 수용체(AT1R)의 역할

안지오텐신 II의 병태생리학적 작용은 주로 안지오텐신 II 제 1형 수용체(AT1R)의 하위 신호전달 체계에 의하여 일어난다. 실제로, 안지오텐신 전환효소(angiotensin converting enzyme) 억제제들이나 AT1R 차단제들은 심혈관 관련 질병을 가진 환자들에서 증상을 차단하는 효과가 있기 때문에 치료제로 많이 사용되어지고 있다(Kjeldsen SE et al., 2002). 안지오텐신 II에 의한 AT1R의 자극은 세포 내에서 G 단백질을 통한 phospholipase C, protein kinase C, MAPK 등 세포내 다양한 신호전달 분자들을 활성화시킬 뿐만 아니라, 세포막에 존재하는 NADPH 산화효소를 자극시켜 세포 내 ROS 생성을 증가 시키는 것으로 이미 그 기전이 잘 알려져 있다(Mehta PK & Griendling KK, 2007; Higuchi S et al., 2007). 이렇듯 AT1R에 의해서 활성화된 단백질 인산화효소와 ROS는 모두 다양한 신호전달 경로를 통해 심혈관계 질병을 일으키는 방향으로 작용한다.

1.2. 제 2형 안지오텐신 II 수용체(AT2R)를 통한 심장의 방어적 기전

심장세포에서 AT1R과 동일하게 AT2R은 안지오텐신 II에 대해 10^{-9} 몰 정도의 결합력을 갖고 있으나, 그 작용이 서로 반대되는 것으로 알려졌다(Bradford C. Berk, 2003). AT1R과는 대조적으로 안지오텐신 II 제 2형 수용체(AT2R)는 AT1R이 일으키는 해로운 효과들에 대응하여 질병으로부터 심장을 보호한다. 구체적으로는 NOS/soluble guanylate cyclase/cGMP 순서로 활성화되는 신호전달 기전과 탈인산화효소(protein tyrosine phosphatase, protein phosphatase 2A)에 의해 나타나는 단백질 탈인산화 작용이 AT2R의 방어적 기전에 기여하는 것으로 알려져 있다(Tsuzuki S et al., 1996; Savoia C et al., 2006; Yan C et al., 2003; Matsubara H, 1998; Bottari SP et al., 1992). 최근에는 안지오텐신 II를 안지오텐신 (1-7)으로 전환시키는 새로운 안지오텐신 전환효소인 ACE2가 밝혀짐으로서 기존에 알려졌던 레닌-안지오텐신 시스템에 대한 새로운 조명이 이루어지고 있다. ACE2로 인한 안지오텐신 (1-7)의 생성은 AT2R 뿐만 아니라 MAS 수용체와 결합함으로서, 기존에 안지오텐신 II-AT1R로 이어지는 효과에 반하여 안지오텐신 II가 일으키는 심장 질환을 제어할 수 있는 기작으로 설명되어지고 있다.

2. Nitric Oxide (NO)의 생성 및 생리학적 기능

NO는 거의 모든 조직과 세포에 존재하며 세포의 성장, 증식, 대사뿐만 아니라 세포의 죽음까지도 관련하는 이차 전달자이다. 심혈관계에서 NO는 하위 신호전달 물질들을 활성화시킴으로써 혈관 평활근 세포 및 심근세포의 수축과 칼슘 조절에 중요한 역할을 한다. 특히 심장 조직에서 NO는 관상동맥 및 심근에서 생성되는 것으로 잘 알려졌으며, 심근에서 생성되는 NO는 심근세포를 이완시킴으로써 심장확장기 시작을 촉진하고 좌심실 확장기압을 낮추는 역할을 수행 한다(Fig. 2). 기본적으로, 세포 내 NO를 합성하는 효소로서 내피세포에서 기원한 NOS3과 신경에서 처음으로 확인된 NOS1이 존재한다. 1980년 초기부터 지금까지 NOS3에서 분비되는 NO는 cGMP-PKG 신호전달 경로를 통하여 혈관을 이완시키기 때문에 고혈압 조절에 중요한 역할을 하는 물질로 주목을 받았다(Paulus WJ, 1994). 이후 심장세포에서도 NOS3이 관찰되어졌다. 심장세포에서 NOS3은 세포의 수축과 이완을 비롯한 여러 가지 기능을 조절하는 동시에 세포 내 신호전달과정에 관여하며, 심부전과 같은 질병으로부터 심장을 보호하는 데에도 중요한 역할을 한다는 사실이 밝혀졌다. 심장

에서 많은 연구가 진행되었던 NOS3에 의한 NO 생성은 세포 내 칼슘 유입을 억제시키고 cGMP/PKG 신호전달 경로를 활성화 시켜 근섬유의 칼슘 감수성을 감소시킴으로서 심근의 이완을 촉진시키는 것으로 알려져 있다. 이처럼 잘 알려진 NOS3 이외에도 최근에는 NOS1에 의한 NO 생성이 심근세포 기능에 미치는 영향 또한 많이 연구되어지고 있다.

3. 심장에서 Nitric Oxide Synthase 1 (NOS1)의 역할

10여 년 전, 심근세포에서 NOS1이 확인 되었고 심장세포에서 중요한 역할을 하고 있음이 밝혀졌다. NOS1은 포유류의 심장근에 존재하는 NOS의 다른 아형으로서 NOS3과 같은 활성화 기전을 공유한다. 하지만 NOS3과 NOS1은 세포내 분포, Ca^{2+} 항상성, 심장근 수축력 조절에 있어서 기능 및 역할이 서로 다르다는 다음과 같은 증거들이 존재한다.

3.1. NOS3과는 다른 NOS1의 심근세포 내 분포

심근세포에서 NOS3은 대부분 Caveolin 3와 결합하여 세포막에 존재하고 있는 반면에 NOS1은 SR에서 Ryanodine receptor (RyR), Xanthine oxidoreductase (XOR)와 인접해 있다(Feron O et al., 1996; Williams JC et al., 2006; Kinugawa S et al., 2005; Khan SA et al., 2004). 또한 NOS3과 NOS1은 외부적 자극이나 질환 발생 시에는 서로 다른 세포내 구획으로 이동한다는 사실이 알려졌다. 예를 들면, 심근세포가 손상되게 되면 NOS3은 세포막으로부터 끌거나 헥파 같은 세포질 쪽으로 이동하지만 오히려 NOS1은 SR에서 세포막 쪽으로 이동하는 것으로 알려져 있다(Damy T et al., 2004; Bendall JK et al., 2004). NOS1의 세포내 분포 및 이동에 따라, 칼슘을 조절하는 효소와 칼슘을 방출하는 이온통로 사이에 분자적 접근 및 결합은 세포의 다양한 기능변화에 영향을 줄 것으로 예상되며 실질적인 역할을 이해하기 위한 구체적인 분자적 기전은 더 많은 실험적 증거들이 필요하다.

3.2. 심장기능 조절과 관련하여 NOS1의 역할

NOS1은 심근세포에서 세포 내 칼슘, 산화환원, 세포 내 단백질 인산화효소/탈인산화효소의 신호전달 기전, excitation-contraction coupling을 조절한다. 일반적인 조건에서 NOS1은 심근세포의 세포막에 위치한 L-type Ca^{2+} channel 활성화를 감소

시켜 수축력을 조절하고, 세포 내부에서는 Phospholamban (PLN)을 인산화하여 SR의 SERCA 펌프를 통한 칼슘 재흡수를 촉진함으로써 심장의 확장기능을 촉진시킨다(Fig 2). NOS1은 XOR과 같은 산화효소와 결합함으로써 초과산화물의 생성을 억제하여 세포 내 산화환경 과정 조절에도 영향을 미치는 것으로 알려져 있다(Kinugawa S et al., 2005; Khan SA et al., 2004).

심근비대, 심부전과 같은 질환에서는 NOS3이 감소하는 반면에 NOS1의 단백질 발현 양과 활성도는 증가하는데, 이는 NOS1이 질환발생시 심근세포를 산화적 스트레스로부터 보호하고 심부전 진행을 지연시키는 보호기전으로서 큰 역할을 수행함을 의미한다. 뿐만 아니라, 이런 경우에 SR에 존재한다고 알려져 있는 NOS1이 세포막 등으로 위치를 이동하여 정상 세포에서와는 다른 역할을 할 수도 있다고 알려져 있다. 하지만 아직 그 분자적 기전에 관해서는 자세한 연구가 필요한 상황이다.

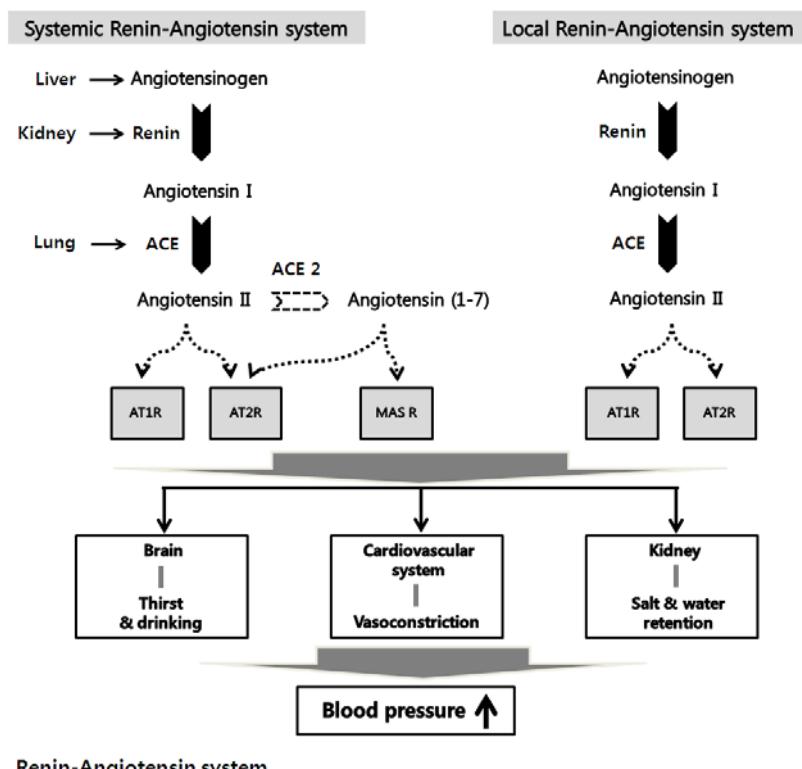
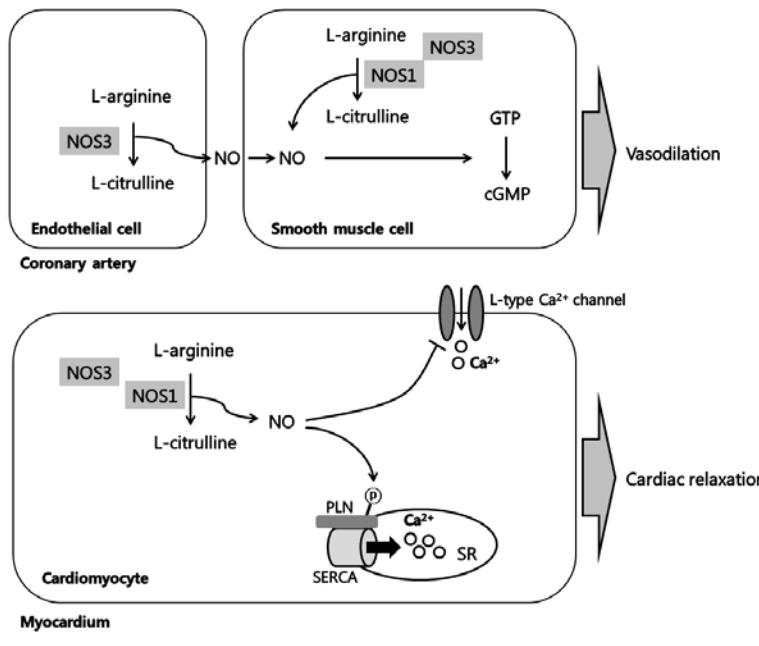


Fig. 1. Renin-Angiotensin system

Renin is an enzyme that converts angiotensinogen, which is released from the liver, into Angiotensin I. Angiotensin converting enzyme (ACE) further converts angiotensin I into angiotensin II in the lung. Angiotensin II binds to receptors in target cells (type 1, type 2 Ang II receptors) to exert its function, including increasing blood pressure. In addition to the systemic processes, Renin-Angiotensin system can also operate at tissue level (Local RAS).



연 구 목 표

이러한 배경을 바탕으로 좌심실 근세포에서 안지오텐신 II에 의한 NOS1 단백질의 생성기전 및 활성화 또한 작용기전을 확인하고자 한다. 본 연구에서는 백서의 좌심실 근세포에서 안지오텐신 II 수용체를 통한 NOS1 단백질 발현과 활성 여부를 살펴본 후, NOS1과 NADPH 산화효소 의존적 ROS의 관계를 확인함과 동시에 실질적인 이완 기능을 측정함으로서 안지오텐신 II 자극 시 NOS1의 분자적 작용 기전 및 생리학적 기능을 밝히고자 하였다.

Nitric Oxide production in heart

Fig. 2. Sources of NO and NO regulation of cardiac function

NO is generated by NO synthases (NOSs), which catalyzes the conversion of L-arginine to L-citrulline. NOS1 and NOS3 have been found to be constitutively expressed in myocardium and coronary artery. NO released from endothelial cells induces vasodilation *via* cGMP/PKG-dependent signaling in coronary smooth muscle cells. In cardiac myocytes, NO modulates myocyte contraction by inhibiting L-type Ca^{2+} channel activity and facilitates cardiac relaxation by promoting Phospholamban phosphorylation (PLN-Ser¹⁶) and Ca^{2+} reuptake into Sarcoplasmic reticulum (SR).

연구재료 및 방법

1. 연구재료

실험동물

본 실험에서는 12주령의 Sprague-Dawley rat (수컷)을 사용하였다.
(IACUC 승인 번호 : SNU-111102-9).

심장근세포 분리

12주령의 Sprague-Dawley rat (수컷)에 Pentobarbital sodium (40 mg/kg)을 복강 주입하여 마취시킨 후 심장을 적출하였다. 적출한 심장 대동맥 혈관으로 Ca^{2+} free Normal Tyrode (NT) 용액을 8분 동안 관류시킨다. 이 후 Collagenase (1 mg/ml) 와 Protease (0.133 mg/ml)가 함유된 NT 용액으로 심장을 8분 동안 관류시켰다. 효소 처리가 모두 끝난 심장의 좌심실 조직만을 떼어, Collagenase가 포함된 NT 용액을 사용하여 37 °C 온도에서 세포를 흔들어 준 후 상층액만을 원심 분리하여 세포를 얻었다. 막대모양의 세포가 분리한 세포의 전체 양에서 40~80 % 범위 내로 생존하였을 경우에만 이후의 실험들을 진행하였다. 좌심실 세포는 분리 후 상온에서 보관하였으며, 8시간 이내에 사용하였다.

2. 실험방법

2.1 Real time RT-PCR

심장세포에서 TRizol reagent (Invitrogen)를 사용하여 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA는 SuperScript TM III First-Strand Synthesis System (Invitrogen)을 사용하여 cDNA로 합성하였다. 합성한 cDNA는 SYBR green (TOPrealTM qPCR 2X PreMIX)을 사용하여 증폭하였고 primer는 다음과 같다.

Primer	Sequence	
NOS1	Forward	5' - CTG CAA AGC CCT AAG TCC AG - 3'
	Reverse	5' - AGT GTT CCT CTC CTC CAG CA - 3'
GAPDH	Forward	5' - GCC AAG GCT GTG GGC AAG GT - 3'
	Reverse	5' - GAG CAA TGC CAG CCC CAG CA - 3'

<PCR primer>

2.2 Immunoblot

좌심실근세포에 안지오텐신 II (1 μM)를 3시간동안 처리하였다. 이 후, protease inhibitor, phosphatase inhibitor가 포함된 Lysis buffer (0.5 M EDTA, 25 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.5 % CHAPS (NOS1) 또는 1 % Triton X-100 (NOS3, Phospholamban, Phospholamban^{Ser16}))를 사용하여 세포에서 단백질을 추출하였다. 추출한 단백질은 Bradford assay로 정량하였다. 30 μg 의 단백질을 4~12 % gradient 젤을 사용하여 150 V에서 전기영동 하였다. 전기영동이 끝난 젤은 120 V에서 1시간 동안 PVDF membrane으로 transfer 하였다. membrane은 5 % BSA, 1×TBS, 0.1 % Tween-20 으로 1시간 동안 블로킹 하였고, 1차 항체는 2시간 동안 처리하였다. 실험에 사용한 1차 항체는 다음과 같다.

Primary antibody	
NOS1	Mouse polyclonal (Santa Cruz Biotechnology; 1:1000)
NOS3	Mouse monoclonal (BD Transduction Laboratories; 1:1000)
PLN	Mouse monoclonal (Badrilla; 1:5000)
PLN ^{Ser16}	Rabbit polyclonal (MILLIPORE; 1:1000)

<Primary antibody>

1차 항체 처리 후 10분씩 세 번 세척 하였다. 각각의 2차 항체는 5 % BSA 용액에 1:5000의 비율로 희석하여 1시간 30분 동안 처리한 후 위의 과정과 동일하게 세척하였다. 마지막으로 ECL (Amersham Bioscience)로 5분간 반응시켜 원하는 단백질의 발현을 확인하였다.

2.3 Nitrite 생성 측정

좌심실 근세포의 NO는 NO assay kit (Griess Reagent System)를 사용하여 nitrite 생성을 확인함으로써 간접적으로 측정하였다. 좌심실 근세포는 Krebs Henseleit solution (NaCl 118 mM, NaHCO₃ 25 mM, Glucose 5.6 mM, KCl 4.7 mM, KH₂PO₄ 1.2 mM, MgSO₄ 1.1 mM, CaCl₂ 1.8 mM)으로 균질화한 뒤, 상온에서 Sulfanilamide (Sigma) 용액에 첨가하여 빛이 없는 조건에서 5-10분 동안 반응시킨다. Naphthylethylenediamine dihydrochloride (Sigma) 용액을 동일한 방법으로 5-10분 동안 반응시킨다. 각 well에 혼합물은 540 nm에서 흡광도를 측정한다.

2.4 Surface biotinylation

좌심실 근세포 표면에 Biotin을 붙여주기 위하여 Sulfo-NHE-SS-Biotin (0.25 mg/mL)을 PBS (Phosphate buffered saline)에 녹인 뒤 세포에 첨가하고 4 °C에서 1시간 동안 부드럽게 흔들어준다. 세포를 원심분리하여 상층액을 버린 후, 50 mM Tris-Cl (pH 7.4)을 세포에 다시 첨가하여 세포막과 결합하지 않은 유리 Biotin을 제거한다. 이 후에 Lysis buffer (500 mM EDTA, 25 mM Tris-Cl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 % Triton X-100)를 사용하여 세포를 분쇄한다. 분쇄한 세포를 원심분리한 뒤, 상층액을 NeutrAvidin Agarose Resins (Pierce)으로 1시간 동안 상온에서 avidin과 결합시킨다. Avidin이 결합한 단백질만을 Elution buffer (62.5 mM Tris-Cl pH 6.8, 1 % SDS, 10 % glycerol, 50 mM DTT)로 용리시킨 후에 SDS 10 % 폴리아크릴아마이드 젤을 사용하여 전기영동 한다. 이후에 블로팅은 다음의 항체를 사용하여 진행하였다.

Primary antibody	
AT1R	Rabbit polyclonal (Santa Cruz Biotechnology; 1:1000)
AT2R	Goat polyclonal (Santa Cruz Biotechnology; 1:1000)

<Primary antibody>

2.5 활성산소(ROS) 및 초파산화물(superoxide) 측정

NADPH 산화효소로부터 생성된 ROS는 좌심실 근세포에 막 투과성의 2', 7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate (H2DCF-DA, 10 μM, Molecular Probes)를 이용하여 측정하였다. 저 칼슘(200 μM) 저장 용액에서 좌심실 근세포를 H2DCF-DA (5-10 μM)로 15분 동안 처리하였다. 이후에 세포의 형광상을 488 nm의 excitation 파장과 530 nm의 emission 파장에서 laser scanning confocal microscope (Olympus, FluoView 1000)를 이용하여 관측하였다. 현미경을 통한 형광상의 측정은 각각의 실험군에서 두 번 이상 반복되어졌으며, 형광 강도는 Image J analysis software (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>)로 정량화하였다.

초파산화물은 Lucigenin-enhanced chemiluminescence 방법을 이용하여 측정하였다 (Lucigenin, 5 μM). Victor 3 1420 Multi-label Plate Reader (Perkin Elmer luminometer)기의 온도를 37 °C로 맞춰 준 후에 대조군과 안지오텐신 II 그룹에서 각각의 초파산화물을 측정하였다. NADPH 산화효소 활성화를 측정하기 위하여 대조군과 실험군 각각에서 추출한 단백질에 NADPH (Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate)를 농도별로 첨가한 후 초파산화물 양을 각각 비교하였다.

2.6 좌심실 세포의 전기적 수축력 기록

좌심실 근세포에 2 Hz의 전기적 자극을 주면서 video-sarcomere detection system (IonOptix Corp)으로 근절길이 변화를 측정하였다. 이원기와 수축기 근절길이 사이에 차이를 비교하였으며, 매 실험마다 10번 이상 수축력이 일정한 정도를 확인한 후에 측정 및 기록하였다. 모든 실험들은 36 ± 1 °C의 온도에서 진행하였다.
(위의 실험은 김춘자 학생의 도움으로 진행되었다)

3. 실험용액

3.1 심장근세포 분리 및 보관에 사용한 용액

① Ca^{2+} -free 용액(in mM ; NaCl 135, KCl 5.4, MgCl_2 3.5, Glucose 5, HEPES 5, Na_2HPO_4 0.4, Taurine 20, pH 7.4)

② Storage 용액(in mM ; NaCl 120, KCl 5.4, MgSO_4 5, CaCl_2 0.2, Na-pyruvate 5, Glucose 5.5, Taurine 20, HEPES 10, Mannitol 29, pH 7.4)

3.2 심장근세포 측정 시 사용한 용액

Normal Tyrode 용액(in mM ; NaCl 141.4, KCl 4, NaH_2PO_4 0.33, MgCl_2 1, HEPES 10, Glucose 5.5, CaCl_2 1.8, Mannitol 14.5, pH 7.4)

4. 자료 처리 및 분석

각 data는 origin 7.0으로 분석하였다. 모든 자료는 표준(mean) ± 표준오차(S.E)로 표시하였다.

연 구 결 과

결과 1. Up-regulation of NOS1 by Ang II

1-1. Ang II increases mRNA/protein expressions and activity of NOS1 in LV myocytes.

좌심실근세포에서 안지오텐신 II (1 μM)를 3시간 처리한 후에 NOS1의 발현을 확인해 본 결과 NOS1의 mRNA와 단백질 발현이 증가되었다($P=0.0002$, $n=10$ for mRNA and $P=0.01$, $n=9$ for protein, Fig. 3A, 3B). 증가된 NOS1의 활성화 여부를 보기 위하여 Nitrite 측정을 통한 간접적인 NO 생성량을 확인한 결과, 안지오텐신 II에 의한 NO 생성이 증가하였음을 볼 수 있었다($P<0.0001$, $n=8$, Fig. 3C). 이러한 안지오텐신 II에 의해 증가된 NO는 NOS1의 선택적 억제제인 SMTC (100 nM)를 전 처리 할 경우 억제되었다($P=0.4$, SMTC vs. SMTC+Ang II, $n=8$, Fig. 3C). 따라서 안지오텐신 II가 좌심실 근세포의 NOS1 발현 및 활성화를 증가시킴을 확인하였다.

1-2. NOS3 protein expression is not affected by Ang II.

심장 및 혈관을 비롯한 여러 조직에서 안지오텐신 II를 처리할 경우 NOS3의 발현은 증가하는 것으로 알려져 있다. 그러나 본 실험에서는 NOS3의 단백질 발현이 안지오텐신 II 처리 시에 증가하지 않았음을 확인할 수 있었다($P=0.96$, $n=7$, Fig. 4). 이는 NO의 합성효소 중 NOS1만이 심장근세포에서 안지오텐신 II에 의해 조절되어지는 단백질임을 시사한다. NOS3 단백질 발현은 변화되지 않았지만 함께 수행되었던 실험결과에서 NOS3^{Ser1177}의 인산화 일어났고 NO 생성도 비특이적 NOS 억제제인 L-NAME에 의해서도 크게 감소하는 현상을 보았다. 따라서 안지오텐신 II가 NOS3의 활성화에도 영향을 미칠 것으로 예측된다. 하지만 NOS의 특이적 억제제인 SMTC와 비특이적 억제제인 L-NAME 모두가 좌심실 세포 수축성에 같은 영향을 준 결과로 미루어보아 NOS3이 심장세포 수축에 미친 영향은 배제할 수 있다. 본 실험과정에서는 NOS3과 NOS1의 관계에 대해서는 아직 밝히지 못하였다.

결과 2. Upstream mechanisms of Ang II stimulation of NOS1

2-1. Both type 1 and type 2 Ang II receptors are involved in Ang II stimulation of NOS1 protein expression.

안지오텐신 II에 의한 NOS1 증가에 관여하는 안지오텐신 II 수용체를 확인하고자 하였다. AT2R의 특이적 길항제(antagonist)인 PD123319 ($1 \mu\text{M}$)를 좌심실 근세포에 전 처리하였을 경우에 안지오텐신 II로 인한 NOS1 단백질의 발현 증가가 나타나지 않음을 확인할 수 있었다($P<0.001$, Ang II vs. PD123319+Ang II, Fig. 5A). 반대로, AT2R의 효현제(agonist)인 CGP42112A ($1 \mu\text{M}$)는 NOS1 단백질의 발현을 증가시켰다($P=0.04$, n=4, Fig. 5C). PD123319는 NO의 생성 또한 억제하였다($P=0.001$, Ang II vs. PD123319+Ang II, Fig. 5B). 이러한 결과를 통하여 좌심실 근세포에서 안지오텐신 II는 AT2R의 활성화를 통하여 NOS1을 증가시킨다는 사실을 확인할 수 있었다. 심장근세포에서 AT2R과는 다르게 AT1R은 심근의 수축작용에 관여하는 안지오텐신 II 하위 신호전달경로를 활성화시키는 것으로 알려져 있다. 하지만 예상과는 달리 AT1R 길항제인 Losartan ($1 \mu\text{M}$)을 세포에 전 처리하였을 경우에도 안지오텐신 II에 의한 NOS1의 단백질 증가가 나타나지 않았다($P=0.005$, Ang II vs. Losartan+Ang II, n=5, Fig. 6A). 이러한 결과는 PD123319와 유사하게 Losartan 역시 안지오텐신 II에 의한 NOS1 단백질 발현 증가를 차단함을 나타낸다. 또한 Losartan 전처리 시 안지오텐신 II에 의한 NO 생성도 증가하지 않았다($P<0.001$, Ang II vs. Losartan+Ang II, n=12, Fig. 6B). 따라서 안지오텐신 II는 AT1R과 AT2R 두 수용체 모두를 통하여 NOS1 단백질 발현 및 활성화를 증가시켰음을 알 수 있다.

2-2. NADPH oxidase and intracellular ROS mediates Ang II stimulation of NOS1 mRNA/protein expression and activity.

세포내부의 ROS는 전사인자를 조절하여 심근의 NOS 단백질 발현과 활성화를 조절한다고 알려져 있다(Cai H et al., 2002; Sartoreto JL et al., 2011). 따라서 안지오텐신 II에 의해 증가된 NADPH 산화효소 의존적 ROS 생성이 NOS1을 실제

로 증가시키는지 확인하고자 하였다. 좌심실 근세포에 NADPH 산화효소 작용 억제제인 Apocynin ($100 \mu\text{M}$)과 ROS 유리기 포축제(scavenger)인 Tiron (1 mM)을 전 처리한 결과 안지오텐신 II에 의한 NOS1의 mRNA는 증가하지 않았다($P=0.04$, Ang II vs. Apocynin+Ang II, n=4; $P=0.009$, Ang II vs. Tiron+Ang II, n=4, Fig. 7A). mRNA 결과와 일치하게도, 좌심실 근세포에서 ROS를 억제하였을 경우에 NOS1 단백질은 증가하지 않았다(Apocynin, $P=0.03$, n=5; Tiron, $P=0.01$, n=5, Fig. 7B). 강력한 환원제로서 알려진 DTT (1 mM) 역시 NOS1의 단백질 발현을 증가시키지 못하였다($P=0.008$, Ang II vs. DTT+Ang II, n=5, Fig. 7C). 이러한 ROS의 억제는 NO의 생성도 증가시키지 못하였다(Apocynin, $P=0.001$, n=6; Tiron, $P<0.0001$, n=6, Fig. 7D).

이러한 결과들은 심장근세포에서 안지오텐신 II/AT1R 작용으로 인한 NADPH 산화효소 의존적 ROS 생성이 NOS1 단백질 발현에 중요한 상위 기전임을 나타낸다.

2-3. AT1R and NADPH oxidase determine AT2R translocation to plasma membrane.

심장근세포와 혈관 평활근 세포에서 안지오텐신 II에 의해서 AT1R은 빠른 내재화가 일어나고 AT2R은 세포막으로 이동한다는 이전의 보고된 연구결과들이 있었다(de Godoy MA & Rattan S, 2006). 그러므로 앞선 실험결과를 바탕으로 하여 AT1R 활성화 이후에 세포막으로의 AT2R 이동이 NOS1 단백질 발현을 증가시키는 데 기여하는지를 알아보려 하였다. 좌심실 근세포에서 안지오텐신 II ($1 \mu\text{M}$)를 시간별로 처리(0, 5, 10, 20, 30분)한 뒤, surface biotinylation 방법을 통하여 세포막에서 AT1R과 AT2R의 발현을 확인해보았다. 안지오텐신 II를 30분 처리하는 동안 세포 전체의 AT1R과 AT2R의 단백질양은 변하지 않았으나, 세포막에 존재하는 수용체 단백질의 양은 각각 30분에 의미 있는 차이를 보였다. AT1R 세포막 단백질양은 안지오텐신 II 처리 후 5분과 10분 사이에 빠른 감소를 보였다가 다시 증가하였고, 처리 후 30분에는 다시 세포막 단백질양이 감소하는 것을 확인할 수 있었다(at 30 min, $P=0.03$, n=5, Fig. 8A, 8B). 반면에 AT2R은 안지오텐신 II 처리 후 세포막 단백질양이 점차 증가하기 시작하였고, 30분 후에는 의미 있는 수준의 증가를 보였다($P<0.005$, n=5, Fig. 8A, 8C). 다음으로, AT1R의 활성화가 AT2R의 세포막 이동에 관여하였는지를 보기 위하여 AT1R 길항제인 Losartan을 처리한 후에

안지오텐신 II에 의한 AT2R의 세포막 단백질 양을 확인하였다. 흥미롭게도, 안지오텐신 II에 의한 AT2R의 세포막 이동이 Losartan을 전 처리 하였을 경우 일어나지 않음을 확인할 수 있었다. 또한, 세포 내 NADPH 산화효소의 활성화를 억제하거나 ROS를 제거하였을 경우에도 안지오텐신 II에 의한 AT2R의 세포막 이동은 일어나지 않았다($P=0.01$, with Losartan, $P=0.02$ with Apocynin, $P=0.04$, with Tiron, $n=6$, Fig. 9). 이러한 결과들은 AT1R-NADPH 산화효소-ROS를 통한 AT2R의 세포막 발현 증가가 안지오텐신 II가 매개하는 NOS1 발현 증가에 중요한 상위 신호전달 경로임을 제안한다.

결과 3. Effect of nNOS on Ang II-stimulation of NADPH oxidase activity in LV myocytes

3-1. Ang II increased intracellular ROS at 30 min but reduced it at 3 hrs.

안지오텐신 II는 NADPH 산화효소를 자극하여 세포 내 ROS를 생성하는 물질로서 이미 잘 알려져 있다. 따라서 좌심실근세포에서 안지오텐신 II를 시간에 따라 처리할 경우 세포 내부의 ROS 생성에 변화가 있는지를 확인하였다. 안지오텐신 II를 처리한 좌심실근세포에서 형광현미경으로 세포내부의 ROS의 양을 측정한 결과 10분부터 세포 내부의 ROS는 증가하기 시작하였고 30분에는 평형상태에 도달하였다. 30분에 증가한 세포 내 ROS는 대조군과 비교하여 약 2배정도 차이가 보이는 것을 통계상으로 확인할 수 있었다(193.4 % of control, $P<0.0001$, $n=14$ with Ang II vs. controls, $n=16$, Fig. 10A, 10B). 이러한 증가는 Apocynin을 처리할 경우 감소하였다($P=0.4$, $n=10$, Fig. 10A, 10B). 안지오텐신 II를 처리하고 30분에서 보았던 ROS 변화와는 다르게 3시간 처리 후에는 세포 내부의 ROS가 대조군과 비교하여 증가하지 않았다($P=0.1$, $n=33$ with Ang II vs. controls $n=35$, Fig. 10A, 10B). H2DCF-DA로 염색되어 형광현미경을 통해 관찰할 수 있었던 세포 내부의 ROS는 superoxide, H_2O_2 , peroxynitrite, hydroxyl radical 등 자유라디칼을 형태를 가진 여러 종류가 혼재되어져 있었다. 그 중에서도 NADPH 산화효소 활성화로 인한 superoxide의 생성만을 측정하여 보았다. 좌심실 근세포에 안지오텐신 II를 3시간 처리 한 뒤,

NADPH 농도를 각각 다르게 주었을 때 모두 superoxide 생성이 감소함을 확인할 수 있었다($P=0.01$ in basal, and $P=0.003$, $P=0.09$ and $P<0.0001$ with NADPH at 2, 10 and 50 μM , $n=8$ each group, Fig. 10C).

3-2. NOS1 inhibited NADPH oxidase activity and reduced intracellular ROS and superoxide production.

앞선 결과에서 보았듯이 좌심실근세포에 안지오텐신 II를 3시간 처리할 경우 NOS1 발현 증가에 따라 NO 생성이 증가하였을 뿐 아니라 ROS의 생성은 감소하였다. 따라서 ROS의 생성을 저해하는 기전으로 NOS1의 가능성성을 검토하였다. NOS1의 선택적 억제제인 SMTC와 NOS의 비특이적 억제제로 알려진 L-NAME을 각각 전 처리 한 결과 안지오텐신 II에 의한 ROS의 증가가 다시 관찰되었다($P<0.0001$, for SMTC+Ang II vs. SMTC only, $n=22$ & $n=27$, and $P<0.0001$ for L-NAME+Ang II vs. L-NAME only, $n=29$ & $n=22$, Fig. 11A, 11B). 또한 증가된 ROS는 Apocynin 처리 시 다시 감소되어짐을 확인하였다(Fig. 11A, 11B). NOS1이 NADPH 산화효소 활성화를 억제함으로써 세포 내부의 ROS를 감소시키는지를 보기 위하여 NADPH 산화효소 활성화에 의해 생성된 초파산화물을 측정한 결과, SMTC를 처리할 경우 초파산화물의 양이 감소하지 않음을 관찰하였다($P>0.05$, SMTC vs. SMTC+Ang II in both basal and NADPH-stimulated superoxide, Fig. 11C). 위 결과로 NOS1이 안지오텐신 II에 의한 NADPH 산화효소 의존적 ROS 생성을 억제시키는데 중요한 역할을 한다는 것을 알 수 있었다.

결과 4. Ang II facilitation of LV myocyte relaxation is mediated by NOS1, AT1R, AT2R and NADPH oxidase.

좌심실근세포에서 안지오텐신 II는 AT1R, ROS, AT2R을 활성화시켜 NOS1의 단백질 발현과 활성화를 증가시켰다. 이러한 실험결과를 바탕으로 NOS1이 실제로 심근 이완에 어떠한 영향을 미치는지를 확인하여 보았다. 안지오텐신 II는 좌심실 근세포의 이완 시간을 상당히 단축시켰으며, NOS1 선택적인 억제제인 SMTC는 이러한 이완촉진 효과를 차단시켰다(TR_{50} : $P<0.001$, Ctr vs. Ang II, $n=57$ & 59;

$P=0.1$, SMTC vs. SMTC+Ang II, n=56 & 74, Fig. 12A, 12C). Losartan과 PD123319를 통한 안지오텐신 II 수용체 차단 시에도 심근 이완 촉진 효과가 사라졌다($TR_{50} : P=0.5$, Losartan vs. Losartan+Ang II, n=16 & 46; $P=0.6$, PD123319 & PD123319+Ang II, n=24 & 58, Table 1). 또한 Apocynin과 Tiron으로 NADPH 산화효소 의존적 ROS를 억제하였을 경우에도 안지오텐신 II에 의한 이완효과가 사라짐을 확인 할 수 있었다($TR_{50} : P=0.8$, Apocynin vs. Apocynin+Ang II, n=55 & 52; $P=0.4$, Tiron & Tiron+Ang II, n=53 & 96, Table 1).

결과 5. Downstream mechanisms of NOS1-mediated faster myocyte relaxation by Ang II

좌심실 근세포에서 이완 촉진 효과를 일으키는 NOS1의 하위 기전을 살펴보자 하였다. 심장세포에서 Phospholamban (PLN)은 근장그물(Sarcoplasmic Reticulum, SR)에 위치한 근장그물 칼슘펌프(SERCA)의 활성화에 관여하여 세포질 내 칼슘 농도를 조절한다. 또한 SR에 존재하는 PLN의 인산화는 SERCA 펌프 활성화를 통하여 세포질 내 칼슘 농도를 감소시키고 이완을 촉진시킨다. 따라서 NOS1이 PLN 인산화에 어떠한 역할을 하는지를 알아보고자 하였다.

5-1. Ang II increased phospholamban phosphorylation (PLN-Ser¹⁶) via NOS1.

안지오텐신 II에 의한 PLN 전체 단백질 양은 일정하였으나 인산화는 증가하였다 ($PLN\text{-Ser}^{16}, P=0.003$, n=18, Fig. 13). NOS1의 특이적 억제제인 SMTC (100 nM)를 전 처리 하였을 경우에는 $PLN\text{-Ser}^{16}$ 의 증가가 일어나지 않았다($P=0.04$, Ang II vs. SMTC+Ang II, n=6, Fig. 13). 따라서 안지오텐신 II 처리 시 NOS1에 의한 $PLN\text{-Ser}^{16}$ 이 증가한다는 사실을 확인할 수 있었다.

5-2. DTT reduced NOS1 protein expression and prevented Ang II increase of phospholamban phosphorylation (PLN-Ser¹⁶).

DTT는 강력한 환원제로서 ROS의 생성을 저해하는 역할을 한다. 앞선 결과에서

ROS 생성을 억제하였을 경우에 안지오텐신 II에 의한 NOS1 단백질 생성이 억제되어짐을 확인한 바 있다. 그러므로 좌심실 세포에서 DTT 처리로 인한 ROS 감소가 PLN 인산화에 미치는 영향을 보고자 하였다. 실험 결과, 좌심실근세포에서 DTT (1 mM)를 전 처리 하였을 경우에는 안지오텐신 II에 의한 $PLN\text{-Ser}^{16}$ 은 증가하지 않았다($P=0.038$, Ang II vs. DTT+Ang II, Fig. 14).

5-3. PKA inhibition did not attenuate Ang II increase of phospholamban phosphorylation (PLN-Ser¹⁶).

NOS1은 정상세포에서 PKA의존적 phospholamban 인산화 기전을 통하여 세포이완을 촉진시킨다. 따라서 PKA가 NOS1에 의하여 증가한 PLN 인산화에 원인으로서 작용하는 인산화효소 인지를 확인하기 위하여 PKA 억제제인 PKI 14-22 amid (PKI, 100 nM)를 전 처리 하여 인산화 된 단백질 양을 확인하였다. PKI는 안지오텐신 II에 의하여 증가한 $PLN\text{-Ser}^{16}$ 을 억제하지 못했다($P=0.02$, PKI vs. PKI+Ang II, n=11, Fig. 15). 뿐만 아니라 PKI는 안지오텐신 II가 일으키는 이완 촉진 효과를 억제하지 못하였다(data not shown). 따라서 PKA는 안지오텐신 II에 의한 NOS1의 심근 이완 촉진 효과에 영향을 미치는 기전으로서 작용하지 않았다.

5-4. Inhibition of GMP/PKG signaling with ODQ and KT5823 prevented NOS1-dependent phospholamban phosphorylation (PLN-Ser¹⁶).

cGMP/PKG는 NO의 신호전달 기전으로서 잘 알려져 있다. 실제로 좌심실근세포에서 안지오텐신 II를 처리 한 후 cGMP를 측정한 결과 세포 내 전체 cGMP의 양이 증가한 것을 확인하였다($P=0.001$, n=7, Fig. 16A). 전체 cGMP의 증가는 안지오텐신 II에 의한 NOS1 의존적인 NO 생성이 cGMP 경로를 활성화 시킨다는 사실을 시사하기 때문에, 실제로 NOS1에 의하여 cGMP/PKG 의존적 PLN의 인산화 ($PLN\text{-Ser}^{16}$)가 일어나는지를 확인하여 보았다. 좌심실근세포에 PKG 억제제(KT 5823, 1 μ M) 또는 cGMP를 생성하는 효소인 sGC의 작용 억제제인 ODQ (1 μ M)를 전 처리할 경우 안지오텐신 II에 의한 PLN 인산화가 억제되었다($P=0.88$, KT 5823 vs. Ang II+KT 5823, n=8; $P=0.8$, ODQ vs. ODQ+Ang II, n=8, Fig. 16B). 또한 ODQ와 KT 5823은 안지오텐신 II에 의한 심근이완촉진 효과를 억제하였다(data not shown). 그러므로 안지오텐신 II가 매개하는 NOS1의 PLN의 인산화는

cGMP/PKG 활성화를 통하여 일어남을 확인할 수 있었다.

앞선 실험결과를 바탕으로 좌심실 근세포에서 안지오텐신 II는 AT1R - ROS - AT2R 경로를 통하여 NOS1을 증가시켰으며, 증가한 NOS1은 NADPH 산화효소의 존적 ROS 생성을 억제함과 동시에 심근 이완을 촉진시켰음을 알 수 있다.

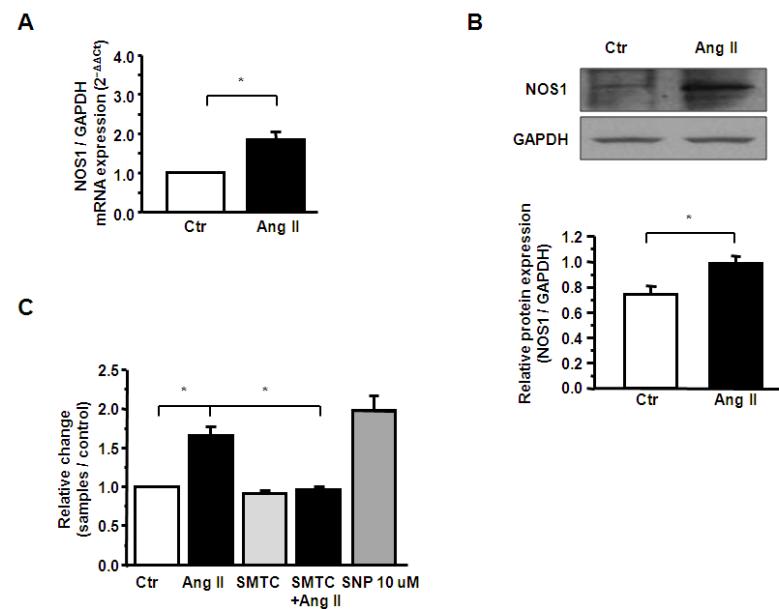


Fig. 3. Increase of NOS1 mRNA, protein expression and activity by Ang II

A. Mean ratios of NOS1 mRNA relative to GAPDH in control and Ang II-treated LV myocyte homogenates. NOS1 mRNA was significantly increased after Ang II-treatment for 3 hrs ($P=0.0002$, $n=10$). **B.** Similarly, NOS1 protein level was significantly greater by Ang II (3 hrs, $P=0.01$, $n=9$). **C.** NO production relative to control in LV myocytes. Ang II (3 hrs) significantly increased NO production ($P<0.001$, $n=8$). SMTc reduced both basal and Ang II-stimulated NO production ($P=0.004$, $n=8$, with SMTc only compare to control and $P=0.4$, $n=8$ with SMTc+Ang II compare to Ang II).

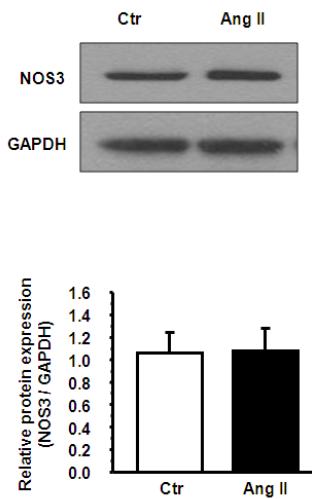


Fig. 4. No effect of Ang II treatment on NOS3 protein expression in LV myocytes

NOS3 protein expression was not affected after Ang II treatment (3 hrs) ($P=0.96$, $n=7$).

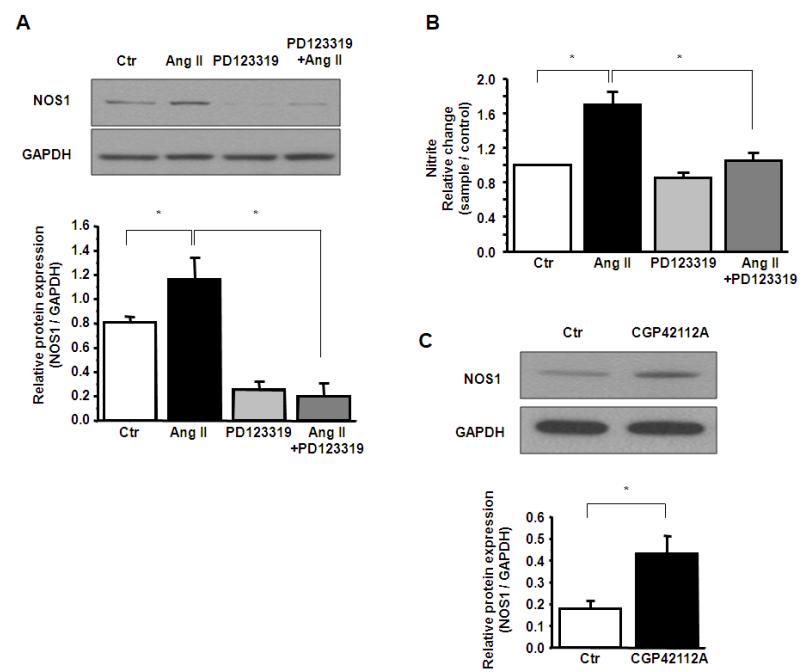


Fig. 5. Ang II increased NOS1 protein expression and activity via AT2R

A. NOS1 protein level was significantly increased after Ang II-treatment (3 hrs) in LV myocyte homogenates ($P=0.02$, $n=7$). Pre-treatment of LV myocytes with PD1213319 blocked Ang II-stimulation of NOS1 protein expression ($P<0.001$ between Ang II and PD1213319+Ang II, $n=5$).

B. PD213319 pre-treatment prevented Ang II-induced increase in NO production ($P=0.001$ between PD123319+Ang II and Ang II, $n=12$).

C. AT2R activation with CGP42112A increased NOS1 protein expression ($P=0.04$, $n=4$).

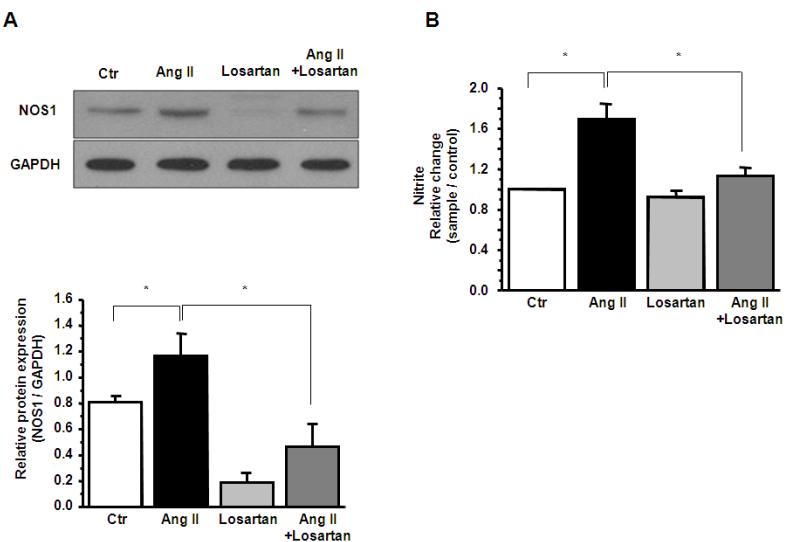


Fig. 6. Ang II increased NOS1 protein expression and activity via AT1R

A. Pre-treatment of LV myocytes with Losartan blocked Ang II-stimulation of NOS1 protein expression ($P=0.005$ between Ang II and Losartan+Ang II, $n=5$).
B. NO production (nitrite assay) was greater in LV myocyte homogenates following Ang II treatment (3 hrs) ($P<0.001$, $n=12$). Losartan and PD213319 pre-treatment prevented Ang II-induced increase in NO production ($P=0.004$ between Losartan+Ang II & Ang II, $n=12$).

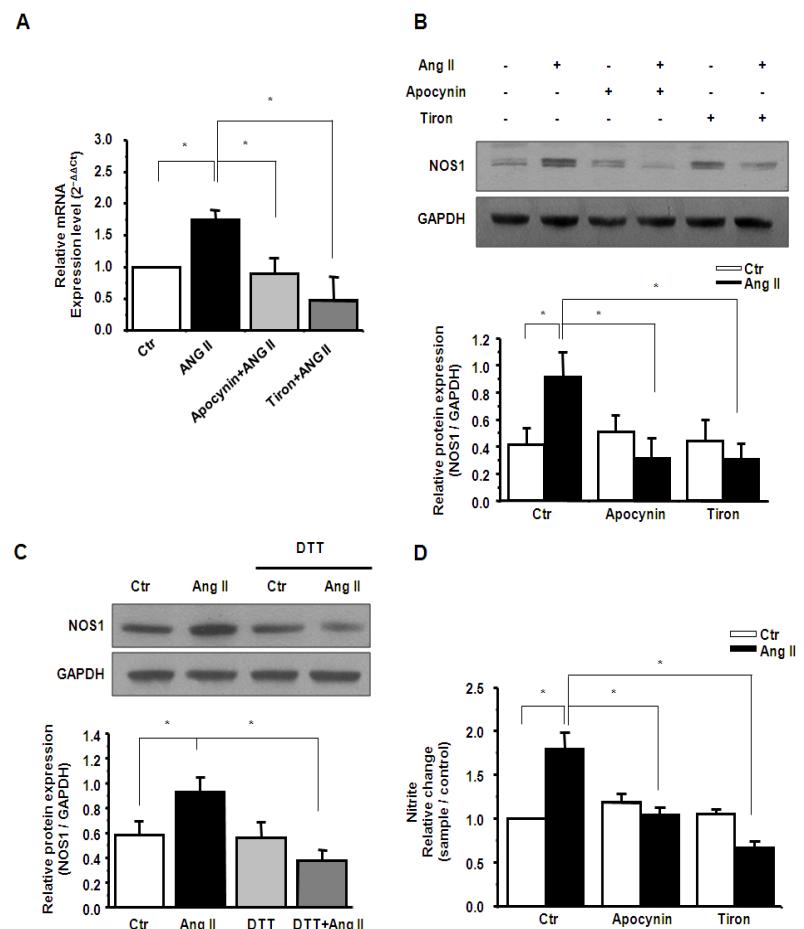


Fig. 7. Effect of NADPH oxidase-dependent ROS on Ang II stimulation of NOS1 mRNA, protein expression & NO production

A. Mean ratios of NOS1 mRNA relative to control (GAPDH) in control and Ang II-treated LV myocyte homogenates. NOS1 mRNA was significantly increased in Ang II-treated group ($P=0.04$, $n=4$). Apocynin or Tiron pre-treatment blocked Ang II-stimulation of NOS1 mRNA ($P=0.04$, $n=4$ for Apocynin and $P=0.009$, $n=4$ for Tiron). **B.** Apocynin or Tiron pre-treatment prevented Ang II-stimulation of NOS1 protein expression ($P=0.03$ between Apocynin+Ang II and Ang II, $n=5$; $P=0.01$ between Tiron+Ang II and Ang II, $n=5$). **C.** DTT pre-treatment prevented Ang II-stimulation of NOS1 protein expression ($P=0.008$ between DTT+Ang II and Ang II, $n=5$). **D.** Similarly, NO production (nitrite assay) was significantly increased following Ang II treatment (3 hrs, $P<0.001$, $n=12$). The effect of NO was blocked by Apocynin or Tiron pre-treatment (Apocynin, $P=0.001$, $n=6$; Tiron, $P<0.0001$, $n=6$).

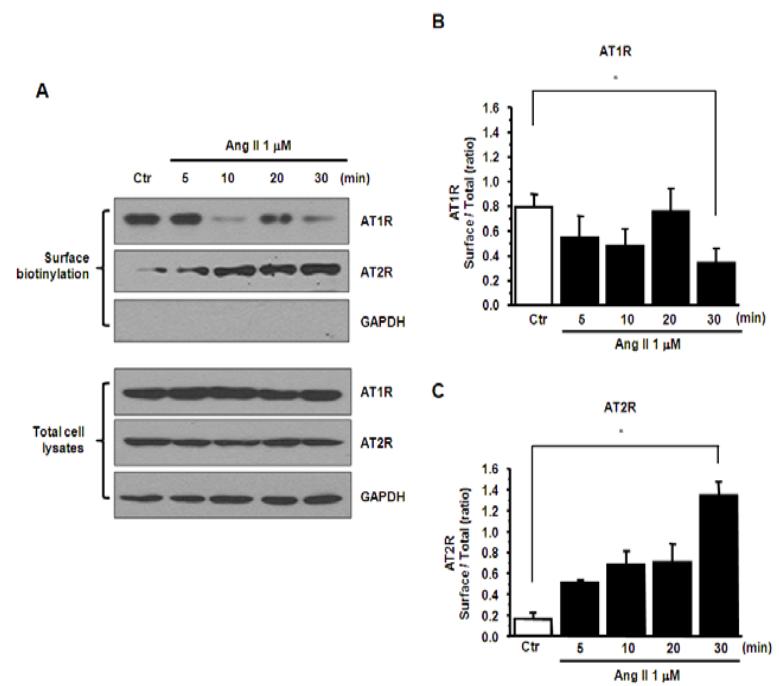


Fig. 8. Time-dependent expressions of AT1R and AT2R in biotinylated plasma membrane fraction following Ang II treatment

A. AT1R expression was decreased at 5~10 min and at 30 min, respectively. AT2R expression was significantly increased and maintained at this level to 30 min. Total protein expressions of AT1R and AT2R were not affected during the time period studied. **B.** Mean ratios of plasma membrane and total AT1R ($P=0.03$, $n=5$, at 30 min). **C.** Mean ratios of plasma membrane and total AT2R ($P<0.005$, $n=5$, at 30 min).

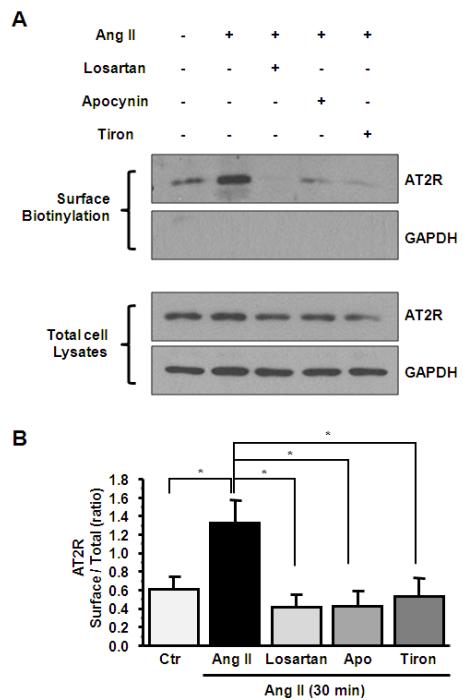


Fig. 9. Effects of Losartan, Apocynin and Tiron on Ang II-induced AT2R translocation to plasma membrane

AT2R expression in biotinylated plasma membrane fraction in Losartan, Apocynin and Tiron pre-treated LV myocytes. **A.** AT2R expression in the plasma membrane was increased by Ang II at 30 min. Losartan, Apocynin and Tiron all blocked AT2R expression without changing total AT2R level in the LV myocyte homogenates. **B.** Mean ratios of plasma membrane and total AT2R at 30 min ($P=0.01$, with Losartan, $P=0.02$ with Apocynin, $P=0.04$ with Tiron, $n=6$).

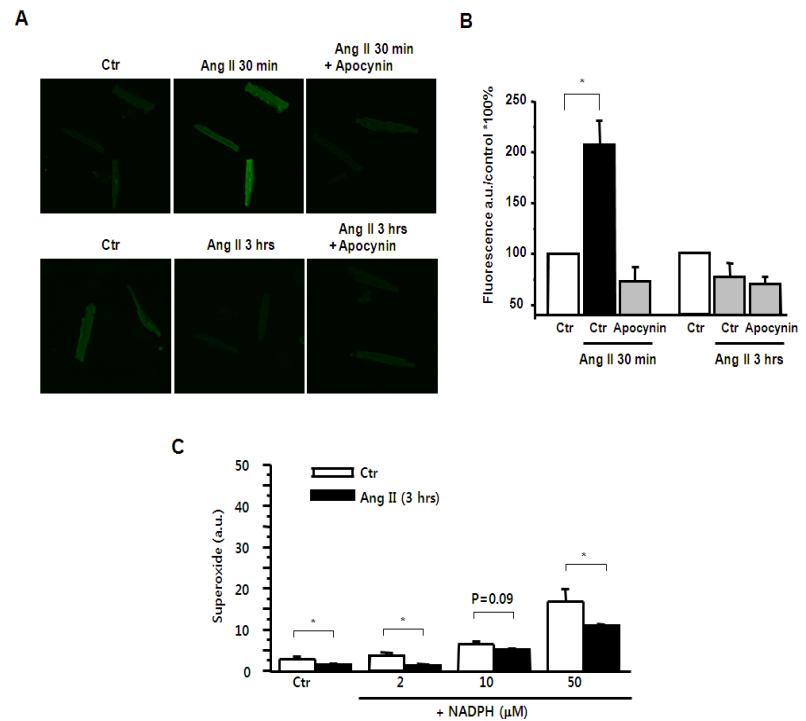


Fig. 10. Time-dependent increase (30 min) and decrease (3 hrs) of intracellular ROS following Ang II treatment

A. Upper image: Fluorescent images of intracellular ROS from LV myocytes of control (left), Ang II treatment for 30 min (middle) and Apocynin+Ang II (30 min, right). Lower image : Fluorescent images of ROS from LV myocytes of control (left), Ang II treatment for 3 hrs (middle) and Apocynin+Ang II (3 hrs, right). **B.** Mean values of ROS (intensity relative to controls) with Ang II and Ang II+Apocynin at 30 min and at 3 hrs. Ang II significantly increased ROS at 30 min (193.4 % of control, $P<0.0001$, $n=14$ with Ang II vs. controls, $n=16$). At 3 hrs, ROS was not different from that in control ($P=0.1$, $n=33$ with Ang II vs. control). **C.** Superoxide production was measured at different NADPH concentrations (0, 2, 10, 50 μ M). Superoxide production increased with NADPH concentration. Ang II (3 hrs) significantly increased superoxide production at 50 μ M NADPH compared to control ($P=0.09$).

controls n=35). Apocynin pre-treatment prevented ROS increase by Ang II at 30 min ($P=0.4$, n=10). C. Mean values of basal and NADPH-stimulated superoxide (measured by Lucigenin-enhanced chemiluminescence) in control and in Ang II (3 hrs)-treated LV myocardial homogenates.

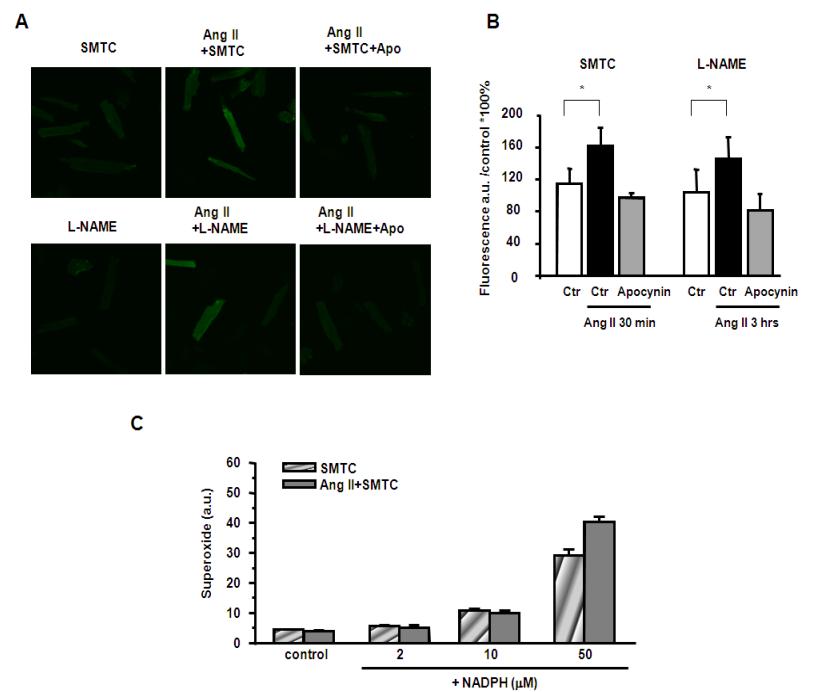


Fig. 11. Inhibition of NOS1 increased intracellular ROS and NADPH oxidase activity in LV myocytes

A. Upper image: Fluorescent images of ROS in LV myocytes with SMTC (left), SMTC+Ang II (3 hrs, middle) and Apocynin+SMTC+Ang II (right). Lower image : Images of ROS from LV myocytes with L-NAME, L-NAME+Ang II (3 hrs, middle) and Apocynin+L-NAME+Ang II (right). **B.** Mean values of ROS after NOS1 inhibition. SMTC or L-NAME tended to increase ROS. However, ROS was significantly increased after Ang II (3 hrs) in the presence of SMTC or L-NAME ($P<0.0001$, for SMTC+Ang II vs. SMTC only, n=22 & n=27, and $P<0.0001$ for L-NAME+Ang II vs. L-NAME only, n=29 & n=22). Apocynin pre-treatment prevented ROS increase. **C.** Mean values of basal and NADPH -

stimulated superoxide (measured by Lucigenin-enhanced chemiluminescence) in control and in Ang II (3 hrs)-treated LV myocardial homogenates. NOS1 inhibition with SMTC significantly increased superoxide level in both basal and Ang II-treated hearts.

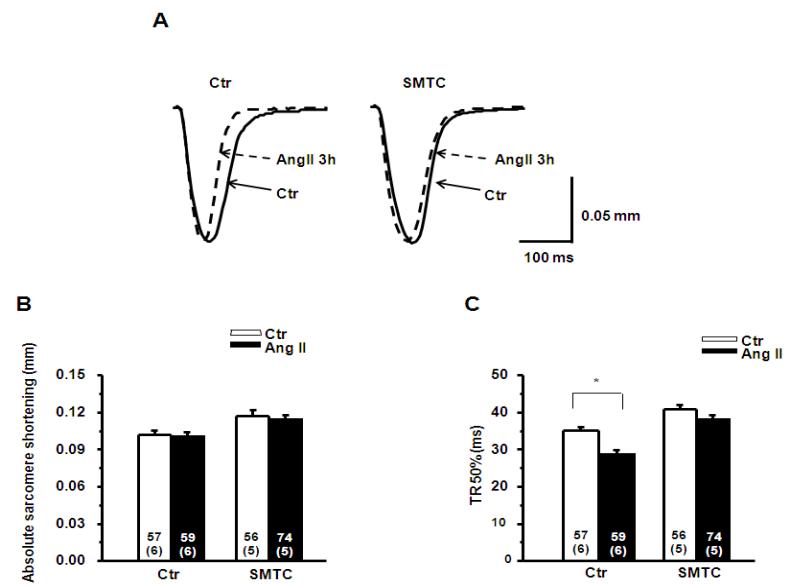


Fig. 12. NOS1 mediated Ang II facilitation of LV myocyte relaxation

A. Representative raw traces of LV myocyte shortening and relengthening in control vs. Ang II (3 hrs) before and after pre-treatment of LV myocytes with SMTC. **B.** Mean values of the amplitudes of sarcomere shortening. **C.** Mean values of $TR_{50\%}$. Ang II significantly shorten $TR_{50\%}$ ($P<0.001$, $n=57$). However, Ang II no longer facilitate LV myocyte relaxation (SMTC, $P=0.09$, $n=74$)

	Control		Ang II (3 hrs)	
	Peak height ($\Delta\mu\text{m}$)	TR ₅₀ (ms)	Peak height ($\Delta\mu\text{m}$)	TR ₅₀ (ms)
SMTc	0.12±0.004	0.04±0.001	0.11±0.003	0.04±0.001
Losartan	0.10±0.007	0.04±0.003	0.11±0.005	0.04±0.001
PD123319	0.11±0.003	0.04±0.002	0.11±0.004	0.04±0.001
Apocynin	0.12±0.004	0.04±0.001	0.10±0.005	0.04±0.002
Tiron	0.10±0.004	0.04±0.002	0.10±0.003	0.04±0.001
DTT	0.12±0.005	0.04±0.001	0.11±0.004	0.04±9.06E-4

Table 1. Mechanisms mediating LV myocyte shortening and relengthening after Ang II treatment (3 hrs)

Ang II no longer facilitates LV myocyte relaxation (TR₅₀ : $P=0.53$, Losartan vs. Losartan+Ang II, n=16 & 46; $P=0.59$, PD123319 vs. PD123319+Ang II, n=24 & 58; $P=0.8$, Apocynin vs. Apocynin+Ang II, n=55 & 52; $P=0.4$, Tiron vs. Tiron+Ang II, n=53 & 96)

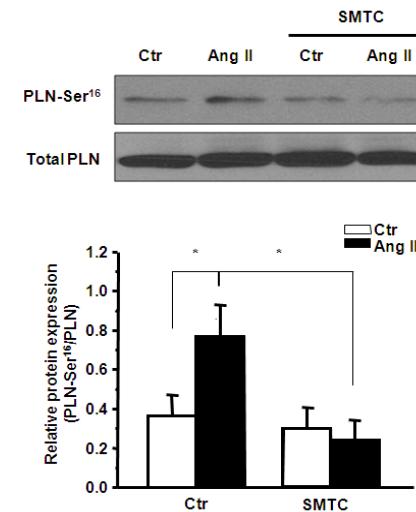


Fig. 13. Ang II increased PLN phosphorylation (PLN-Ser¹⁶) via NOS1
Representative immunoblotting of PLN phosphorylation at Ser¹⁶ and total PLN in control and Ang II (3 hrs)-treated LV myocyte homogenates. PLN phosphorylation was increased and total PLN remained unchanged by Ang II ($P=0.003$, control vs. Ang II, n=18). SMTc pre-treatment abolished Ang II-increase of PLN-Ser¹⁶ ($P=0.04$, Ang II vs. SMTc+Ang II, n=6).

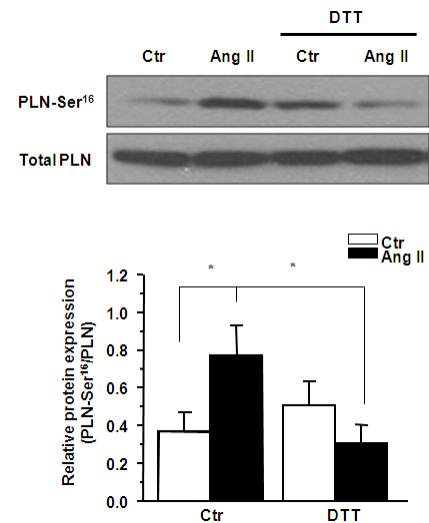


Fig. 14. DTT blocked Ang II-increase in PLN phosphorylation (PLN-Ser¹⁶) in LV myocytes

Representative immunoblotting of PLN phosphorylation at Ser¹⁶ and total PLN in control and Ang II (3 hrs)-treated LV myocyte homogenates. Mean values of PLN-Ser¹⁶/PLN ratios. DTT pre-treatment abolished Ang II-increase of PLN-Ser¹⁶ ($P=0.038$, Ang II vs. DTT+Ang II, n=6).

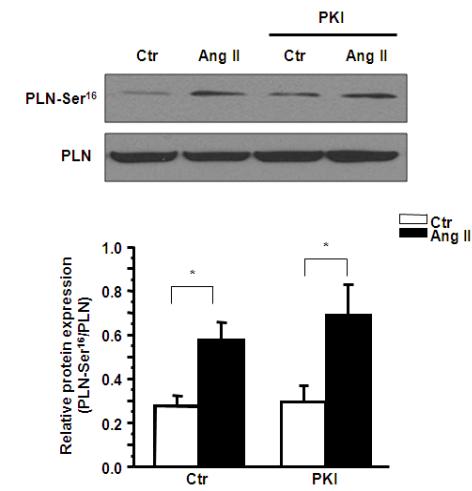


Fig. 15. PKA inhibition did not affect PLN phosphorylation (PLN-Ser¹⁶) in Ang II-treated LV myocytes

Representative immunoblotting of PLN phosphorylation at Ser¹⁶ and total PLN in control and Ang II (3 hrs)-treated LV myocyte homogenates. Inhibition of PKA with PKI (100 nM) did not reduce PLN-Ser¹⁶ ($P=0.02$ between PKI only vs. PKI+Ang II, n=11).

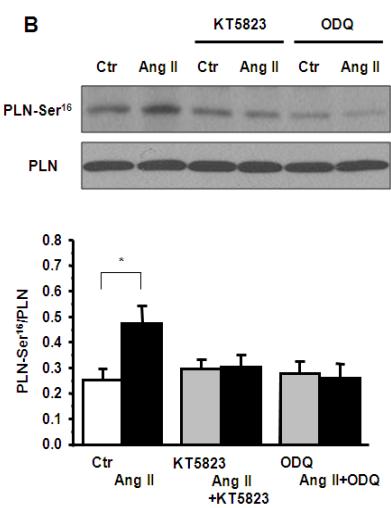
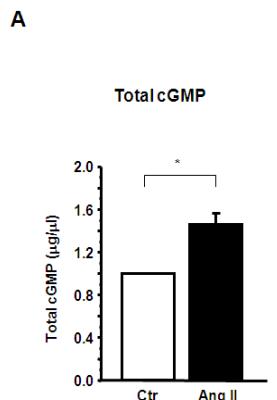


Fig. 16. cGMP/PKG inhibition blocked PLN phosphorylation (PLN-Ser¹⁶) in Ang II-treated LV myocytes

A. Total cGMP was increased by Ang II ($P=0.001$, $n=7$). B. Representative immunoblotting of PLN phosphorylation at Ser¹⁶ and total PLN of LV myocytes in control and Ang II (3 hrs) with and without cGMP/PKG inhibitors. PLN-Ser¹⁶ was increased and total PLN was remained unchanged by Ang II ($P=0.03$, control vs. Ang II, $n=9$). Inhibition of PKG and cGMP with KT 5823 (1 μM) and with ODQ (10 μM) reduced PLN-Ser¹⁶ ($P=0.88$, KT 5823 vs. Ang II+KT 5823, $n=8$; $P=0.8$, ODQ vs. ODQ+Ang II, $n=8$).

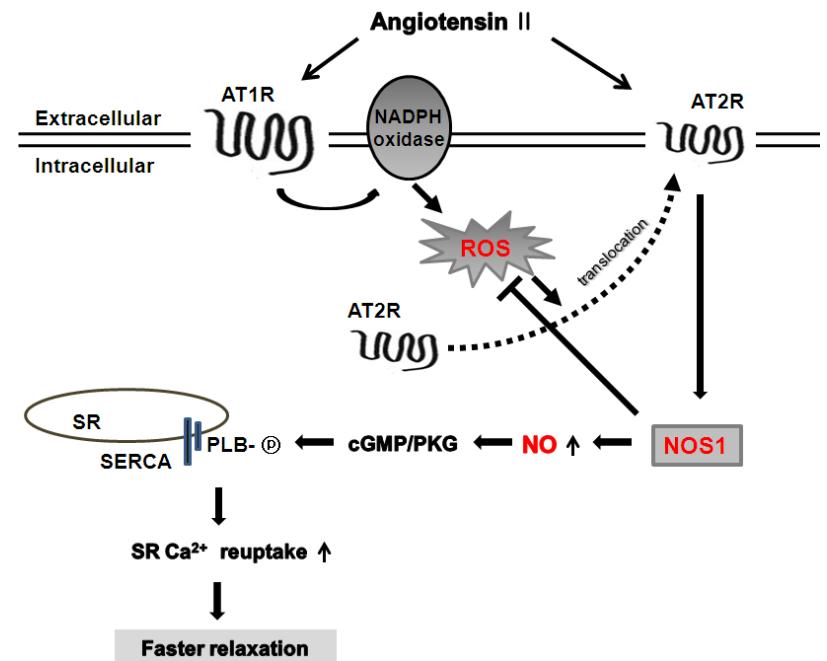


Fig. 16. Schematic diagram of hypothesized mechanisms for the activation of NOS1 and contractility following Ang II stimulation in cardiac myocytes.

고 찰

본 연구를 통하여 좌심실 근세포에서 Ang II에 의한 ROS 생성이 NOS1의 단백질 발현 및 활성화를 증가시켰음을 새롭게 관찰하였다. 또한 생성된 NOS1은 NADPH 산화효소의 활성화를 저해하고 cGMP/PKG 의존적인 PLN의 인산화를 통하여 좌심실근의 이완을 촉진시킴을 차례로 확인할 수 있었다.

본 연구에서 진행한 실험들을 토대로 하여 다음과 같은 결과를 얻을 수 있었다.

- 1) 좌심실 근세포에 안지오텐신 II를 3시간 처리할 경우 NOS1 mRNA와 단백질 발현이 증가하였고 이는 NO (nitrite 측정) 생성 또한 증가시켰다.
- 2) AT1R과 AT2R 길항제(Losartan, PD123319)는 안지오텐신 II로 인해 증가되는 NOS1 단백질의 발현을 막았고, 선택적인 AT2R 효험제(CGP42112A)는 안지오텐신 II에서 보였던 결과와 일치하게 NOS1의 단백질 발현을 증가시켰다.
- 3) NADPH 산화효소 억제제와 superoxide scavenger는 안지오텐신 II에 의한 NOS1 mRNA와 단백질 발현 증가 및 활성화를 억제하였다.
- 4) 안지오텐신 II에 의한 AT2R의 세포막 단백질 발현의 증가가 Losartan, PD123319, Apocynin, Tiron 전 처리로 억제되었기 때문에 AT1R과 NADPH 산화효소 활성화 다음으로 AT2R의 세포막 이동이 일어났음을 알 수 있었다.
- 5) 30분 동안 안지오텐신 II를 처리할 경우 증가한 NADPH 산화효소 의존적 ROS의 생성이 3시간 처리하였을 경우에는 감소하였다. 하지만 NOS1의 선택적인 억제제로 세포를 전 처리 하였을 경우에는 3시간에도 안지오텐신 II에 의한 ROS 증가가 관찰되었다.
- 6) 안지오텐신 II에 의하여 좌심실근의 이완이 촉진되었고 이는 NOS1 억제제에 의하여 사라졌다. 또한 AT1R, AT2R 길항제와 ROS 억제제를 전 처리 하였을 경우에도 안지오텐신 II에 의한 이완 촉진 현상을 나타나지 않았다.
- 7) 안지오텐신 II에 의한 NOS1 활성화는 PLN의 인산화(PLN-Ser¹⁶)를 증가시켰다. 이러한 증가된 PLN의 인산화는 PKA 억제제에 의해서는 감소되지 않았다. 하지만 cGMP/PKG 신호전달의 억제제들(ODQ와 KT5823)은 안지오텐신 II에 의한 PLN의 인산화를 감소시켰다.

안지오텐신 II에 의한 NOS1 조절 경로

레닌 안지오텐신 시스템(RAS)의 자극은 증가된 산화적 스트레스, 손상된 칼슘 조절과 관련이 있다. 따라서 표적 RAS를 목적으로 한 치료제(안지오텐신 전환효소 억제제 또는 AT1R 억제제)는 심부전 환자들을 위한 일반적인 치료방법 중 하나로서 쓰이고 있다. AT1R 또는 안지오텐신 전환효소를 억제함으로써 이로운 기전 중 하나는 조직에서 안지오텐신 II와 결합할 수 있는 AT2R의 밀도를 증가시켜 NOS3 활성화를 일으키고 산화적 스트레스를 감소시킬 수 있다는 점이다. 본 연구에서 AT1R과 AT2R 길항제 모두 안지오텐신 II에 의한 NOS1 발현 및 활성화를 저해하였다. 이러한 결과는 두 수용체 모두를 통하여 NOS1의 발현이 증가한다는 사실을 나타낸다.

그렇다면, 두 수용체 및 ROS 생성을 통하여 증가되어지는 NOS1 단백질은 어찌 한 경로에 의해서 일어나는 것일까? 우선 이미 잘 알려진 AT2R 뿐 아니라 AT1R의 활성화를 통한 NOS 증가를 보았던 이전의 결과들을 살펴보면, 내피세포에서 본질적으로 활성화된 AT1R을 발현하는 유전자 형질 전환 모델 줄에서 안지오텐신 II에 의한 NOS3과 NO의 증가가 일어났고 이는 혈압 저하 효과를 일으켰다는 연구가 보고되어진 바 있었다(Ramchandran et al., 2006). 또한 Losartan이 심장근에서 NO 생성을 감소시킨다는 내용 또한 발표된 바 있다(Huisamen et al., 2011). 비록 앞선 연구들은 AT1R을 통한 NOS3 증가만을 실험하였으나, 본 연구에서는 심장근 세포에서 NOS1 단백질 발현의 상위 기전을 알아보고자 하였다.

다음으로, AT1R을 통한 ROS의 증가는 이미 잘 알려져 있을 뿐 아니라 본 실험에서도 직접 확인한 사실이고 NADPH 산화효소로부터 생성된 ROS는 NOS3을 생성시킨다는 연구결과(Cai H et al., 2002)가 있었기 때문에 AT1R을 통한 NADPH 산화효소 의존적 ROS 생성이 안지오텐신 II에 의한 NOS1 생성에 있어서 상위 조절자로서 작용할 수 있다고 생각하였다.

이러한 앞선 연구결과들을 종합해 볼 때, NOS1 활성화에 있어서 AT1R과 ROS 및 AT2R 사이에 관계는 잘 알려져 있지 않았다. 흥미롭게도 실험 결과에서 NADPH 산화효소에 의해 생성된 ROS는 AT1R 활성화 후 AT2R의 세포막 이동에 필수적임을 보였다. 이러한 결과는 AT1R이 NADPH 산화효소에 의한 ROS 생성을 통하여 AT2R의 세포 내 이동에 따른 NOS 활성화 조절에 관여할 수 있음을 시사한다.

비록 AT1R과 ROS를 통한 AT2R의 세포막 이동이 관찰 되었지만 이러한 AT1R-ROS 생성-AT2R 경로를 확정짓기에는 아직 조심스러운 부분들이 많다. ROS는 세포 내 단백질의 전사 및 전사 후 가공과정에서 중요한 역할을 하기 때문에 ROS 생성이 직접 NOS1 단백질을 가공하는데 영향을 미쳤을 가능성 또한 배제 할 수 없기 때문이다. 심장근세포에서 NOS1의 단백질 가공과 관련하여 기전이 아직 분명하게 밝혀져 있지 않다. 신경에서 cAMP responding element-binding (CREB)은 NOS1 exon 2 프로모터 내에 존재하는 CRE와 상호작용하고(Sasaki, M, 2000), Sirt-1을 통한 CREB 의존적 NOS1 유전자의 발현을 촉진시키는 것으로 알려져 있다(Fusco, et al., 2011). 하지만 심장에서도 이러한 기전이 일어나는지는 아직 연구되지 않았다. 그러나 안지오텐신 II가 다양한 조직에서 CREB를 인산화 시킴으로써 특이적 표적 단백질들의 전사를 촉진시킨다는 연구결과가 있었고(Xie Z et al., 2011; Chan SH et al., 2010), 이러한 과정은 NADPH 산화효소 활성화와 세포 내부의 ROS 생성을 필요로 하므로 안지오텐신 II와 NADPH 산화효소 활성화에 의한 NOS1의 증가가 CREB 의존적인 경로를 통하여 일어날 가능성이 있다. 따라서 추가적으로 ROS 증가가 NOS1을 조절하는 직접적인 기전에 관한 연구도 이후에 수행되어야 할 것이라 생각된다.

또한, 최근에 안지오텐신 II로부터 안지오텐신 전환효소 2(ACE 2)에 의해 생성되는 안지오텐신 (1-7)이 MAS 수용체 또는 AT2R과 결합함으로써 NOS 활성화를 일으키는 새로운 물질로서 밝혀졌다. 실험결과를 보면, 좌심실근에서 안지오텐신 II 자극 시 MAS 수용체 길항제인 A779를 전 처리 할 경우에 NOS1 단백질의 발현이 억제됨을 확인하였다(data not shown). 따라서 안지오텐신 II 자극 시 Ang (1-7)의 MAS 수용체 결합을 통한 NOS1이 증가됨 또한 확인하였다. 하지만 AT2R과 MAS 수용체 모두를 통해 증가되는 NOS1 단백질 발현과 관련하여 상호연관관계는 좀 더 실험이 필요하다.

결과들을 종합해 볼 때, 본 연구에서는 심장근에서 안지오텐신 II 자극 시 NOS1 단백질 발현 까지를 연결하는 새로운 경로가 존재함을 시사하는 바이다.

심근세포에서 NOS1 작용 기전

이전에 심장에서 안지오텐신과 심근 NOS와의 관계를 규명하기 위한 연구들이 많이 진행되어져 왔었다. 하지만 안지오텐신 II 자극 후에 NOS1이 심근세포 기능에 미치는 역할에 대해서는 거의 밝혀진 바가 없다.

세포내부의 ROS와 질소산화물은 서로 균형을 이루고 있다. 이 때, 한 쪽 물질이 지나치게 생성될 경우에는 균형이 깨짐으로서 세포 변화를 일으키게 된다. 실험결과를 보면, 안지오텐신 II가 시간에 따라 다른 NADPH 산화효소 활성화 효과를 보이는 것을 관찰할 수 있었다. 안지오텐신 II 처리 후 30분에 증가된 세포 내부의 ROS는 3시간에 증가된 NOS1로 인하여 감소되었다. 이러한 결과를 통하여 생성된 NOS1은 안지오텐신 II에 의해 증가되는 ROS로 인하여 깨지는 세포 내 균형을 다시 맞춰주는 역할을 수행하는 것으로 보여 진다.

또한 NOS1의 생성 증가가 실제로 심근기능에 미치는 영향을 살펴본 결과, 안지오텐신 II에 의한 심실근 이완이 촉진됨을 확인할 수 있었고 이는 SMTc에 의해 억제되어졌다. 이전에 좌심실근세포에서 cGMP/PKG 신호전달 기전과는 독립적으로 PKA에 의한 PLN의 인산화가 NOS1에 의한 심근이완 촉진 기전으로서 제시되어진 바 있었다(Zhang YH et al., 2008). 하지만 본 실험결과에서 확인한 결과, 안지오텐신 II 처리 후에 나타나는 NOS1의 심근이완 촉진 효과는 cGMP/PKG 신호전달기전을 통한 PLN의 인산화 때문임이 관찰 되었다.

NOS1의 생리학적 의미

일반적으로 안지오텐신 II에 의한 심장근 수축현상이 잘 알려져 있음을 생각할 때 본 연구에서 보이는 NOS1의 심실근 이완촉진 현상은 흥미로우면서도 놀랍다. 앞선 결과들을 통해 NOS1의 생리학적 의미를 살펴보면, 안지오텐신 II가 유도하는 심장 질병에서 NOS1은 심실근세포의 이완을 촉진시킴으로써 ROS 및 이에 따른 세포 수축에 대항하는 방어적 기전으로 작용하는 것으로 생각된다. 이런 생각을 뒷받침하기 위한 추가적인 실험으로써 안지오텐신 II를 4 주간 투여한 고혈압 모델에서 심근세포 변화 및 NOS1의 작용 기전을 살펴본 바 있다. 실제로 고혈압 모델에서도 NOS1 단백질 양이 현격하게 증가함을 관찰 할 수 있었고, NOS3의 단백질 양은 오히려 감소함을 확인할 수 있었다. 뿐만 아니라 고혈압 모델에서 NOS1에 의한 심

실근 이완 촉진 현상도 관찰할 수 있었다(data not shown). 물론 아직 이러한 모델에서의 NOS1 작용 기전이 정상 백서에서 안지오텐신 II를 세포에 처리하였을 경우 관찰하였던 기전과 일치하는지는 좀 더 연구가 필요한 상황이다. 하지만 분명한 것은 고혈압과 같은 생체 내 변화 시, NOS1이 심근세포 변화에 맞서는 중요한 방어 물질로서 심장기능 이상을 제어할 가능성이 충분하다는 점이다. 따라서 안지오텐신 II에 의한 심근 NOS 생성 및 작용 기전에 대한 이해는 심장관련 질병에 있어서 병원의 보상기전을 이해할 수 있다는 점에서 가치가 있다.

결론적으로, 본 연구결과에서는 좌심실근세포에서 안지오텐신 II에 의한 AT1R 활성화 - NADPH 산화효소 의존적 ROS 생성 - AT2R 세포막 발현 증가로 나타나는 새로운 NOS1 생성 기전을 밝히고자 하였다. 또한 NOS1은 다시 ROS 생성을 저해하고 세포의 이완을 촉진시킴으로써 안지오텐신 II의 ROS 생성에 대항한 작용 기전을 갖고 있음을 제시한다.

참 고 문 헌

- Barouch LA, Harrison RW, Skaf MW, Rosas GO, Cappola TP, Kobeissi ZA, Hobai IA, Lemmon CA, Burnett AL, O'Rourke B, Rodriguez ER, Huang PL, Lima JA, Berkowitz DE, Hare JM (2002). Nitric oxide regulates the heart by spatial confinement of nitric oxide synthase isoforms. *Nature* 416, 337-9.
- Bendall JK, Cave AC, Heymes C, Gall N, Shah AM (2002). Pivotal role of a gp91(phox)-containing NADPH oxidase in angiotensin II-induced cardiac hypertrophy in mice. *Circulation* 105, 293-6.
- Bendall JK, Damy T, Ratajczak P, Loyer X, Monceau V, Marty I, Milliez P, Robidel E, Marotte F, Samuel JL, Heymes C (2004). Role of myocardial neuronal nitric oxide synthase-derived nitric oxide in beta-adrenergic hyporesponsiveness after myocardial infarction-induced heart failure in rat. *Circulation* 110, 2368-2375.
- Burkard N, Williams T, Czolbe M, Blömer N, Panther F, Link M, Fraccarollo D, Widder JD, Hu K, Han H, Hofmann U, Frantz S, Nordbeck P, Bulla J, Schuh K, Ritter O (2010). Conditional overexpression of neuronal nitric oxide synthase is cardioprotective in ischemia/reperfusion. *Circulation* 122, 1588-1603.
- Cai H, Li Z, Dikalov S, Holland SM, Hwang J, Jo H, Dudley SC Jr, Harrison DG (2002). NAD(P)H oxidase-derived hydrogen peroxide mediates endothelial nitric oxide production in response to angiotensin II. *J Biol Chem* 277, 48311-7.
- Chan SH, Wu CW, Chang AY, Hsu KS, Chan JY (2010). Transcriptional upregulation of brain-derived neurotrophic factor in rostral ventrolateral medulla by angiotensin II: significance in superoxide homeostasis and neural

- regulation of arterial pressure. *Circ Res* 107, 1127-39.
- Copp SW, Hirai DM, Ferguson SK, Holdsworth CT, Musch TI, Poole DC (2012). Effects of chronic heart failure on neuronal nitric oxide synthase-mediated control of microvascular O₂ pressure in contracting rat skeletal muscle. *J Physiol* 590, 3585-96.
- Costa MA, Lopez Verrilli MA, Gomez KA, Nakagawa P, Peña C, Arranz C, Gironacci MM (2010). Angiotensin-(1-7) upregulates cardiac nitric oxide synthase in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 299, H1205-11.
- Damy T, Ratajczak P, Shah AM, Camors E, Marty I, Hasenfuss G, Marotte F, Samuel JL, Heymes C (2004). Increased neuronal nitric oxide synthase-derived NO production in the failing human heart. *Lancet* 363, 1365-1367.
- de Godoy MA, Rattan S (2006). Translocation of AT1- and AT2-receptors by higher concentrations of angiotensin II in the smooth muscle cells of rat internal anal sphincter. *J Pharmacol Exp Ther* 319, 1088-1095.
- Dias-Peixoto MF, Santos RA, Gomes ER, Alves MN, Almeida PW, Greco L, Rosa M, Fauler B, Bader M, Alenina N, Guatimosim S (2008). Molecular mechanisms involved in the angiotensin-(1-7)/Mas signaling pathway in cardiomyocytes. *Hypertension* 52, 542-8.
- Feron O, Belhassen L, Kobzik L, Smith TW, Kelly RA, Michel T. (1996) Endothelial nitric oxide synthase targeting to caveolae. Specific interactions with caveolin isoforms in cardiac myocytes and endothelial cells. *J Biol Chem* 271, 22810 - 22814.
- Frantz S, Klaiber M, Baba H, Oberwinkler H, Volker K, Gaßner B, et al. (2011). Stress dependent dilated cardiomyopathy in mice with cardiomyocyte-restricted inactivation of cyclic GMP-dependent protein kinase I. *Eur Heart J* [Eelectoric publication ahead of print]
- Fusco S, Ripoli C, Podda MV, Ranieri SC, Leone L, Toietta G, McBurney MW, Schütz G, Riccio A, Grassi C, Galeotti T, Pani G (2012). A role for neuronal cAMP responsive-element binding (CREB)-1 in brain responses to calorie restriction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 621-6.
- Huisamen B, Pérel SJ, Friedrich SO, Salie R, Strijdom H, Lochner A (2011). ANG II type I receptor antagonism improved nitric oxide production and enhanced NOS3 and PKB/Akt expression in hearts from a rat model of insulin resistance. *Mol Cell Biochem* 349, 21-31.
- Jin CZ, Jang JH, Wang Y, Kim JG, Bae YM, Shi J, Che CR, Kim SJ, Zhang YH (2012). Neuronal nitric oxide synthase is up-regulated by angiotensin II and attenuates NADPH oxidase activity and facilitates relaxation in murine left ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 52, 1274-1281.
- Jones ES, Vinh A, McCarthy CA, Gaspari TA, Widdop RE (2008). AT2 receptors: functional relevance in cardiovascular disease. *Pharmacol Ther* 120, 292-316.
- Jugdutt BI, Menon V (2004). AT1 receptor blockade limits myocardial injury and upregulates AT2 receptors during reperfused myocardial infarction. *Mol Cell Biochem* 260, 111-8.
- Kellogg DL Jr, Zhao JL, Wu Y (2008). Neuronal nitric oxide synthase control mechanisms in the cutaneous vasculature of humans *in vivo*. *J Physiol* 586, 847-857.
- Khan SA, Lee K, Minhas KM, Gonzalez DR, Raju SV, Tejani AD, et al. (2004). Neuronal nitric oxide synthase negatively regulates xanthine oxidoreductase

- inhibition of cardiac excitation - contraction coupling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 15944 - 15948.
- Kinugawa S, Huang H, Wang Z, Kaminski PM, Wolin MS, Hintze TH. (2005). A defect of neuronal nitric oxide synthase increases xanthine oxidase-derived superoxide anion and attenuates the control of myocardial oxygen consumption by nitric oxide derived from endothelial nitric oxide synthase. *Circ Res* 96, 355 - 362.
- Patel KP, Schultz HD (2012). Angiotensin Peptides and Nitric Oxide in Cardiovascular Disease. *Antioxid Redox Signal*.
- Paliege A, Pasumarthi A, Mizel D, Yang T, Schnermann J, Bachmann S (2006). Effect of Apocynin treatment on renal expression of COX-2, NOS1, and renin in Wistar-Kyoto and spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 290, 694-700.
- Paulus WJ, Vantrimpont PJ, Shah AM (1994). Acute effects of nitric oxide on left ventricular relaxation and diastolic distensibility in humans. Assessment by bicoronal sodium nitroprusside infusion. *Circulation* 89, 2070-2078.
- Ramchandran R, Takezako T, Saad Y, Stull L, Fink B, Yamada H, Dikalov S, Harrison DG, Moravec C, Karnik SS (2006). Angiotensinergic stimulation of vascular endothelium in mice causes hypotension, bradycardia, and attenuated angiotensin response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 19087-92.
- Sartoretti JL, Kalwa H, Pluth MD, Lippard SJ, Michel T (2011). Hydrogen peroxide differentially modulates cardiac myocyte nitric oxide synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 15792-15797.
- Sasaki M, Gonzalez-Zulueta M, Huang H, Herring WJ, Ahn S, Ginty DD, Dawson VL, Dawson TM (2000). Dynamic regulation of neuronal NO synthase transcription by calcium influx through a CREB family transcription factor-dependent mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 8617-22.
- Savoia C, Ebrahimian T, He Y, Gratton JP, Schiffrian EL, Touyz RM (2006). Angiotensin II/AT2 receptor-induced vasodilation in stroke-prone spontaneously hypertensive rats involves nitric oxide and cGMP-dependent protein kinase. *J Hypertens* 24, 2417-2422.
- Sears CE, Bryant SM, Ashley EA, Lygate CA, Rakovic S, Wallis HL, Neubauer S, Terrar DA, Casadei B (2003). Cardiac neuronal nitric oxide synthase isoform regulates myocardial contraction and calcium handling. *Circ Res* 92, e52-9.
- Takimoto E, Champion HC, Li M, Ren S, Rodriguez ER, Tavazzi B, Lazzarino G, Paolocci N, Gabrielson KL, Wang Y, Kass DA (2005). Oxidant stress from nitric oxide synthase-3 uncoupling stimulates cardiac pathologic remodeling from chronic pressure load. *J Clin Invest* 115:1221-31.
- Tambascia RC, Fonseca PM, Corat PD, Moreno H Jr, Saad MJ, Franchini KG (2001). Expression and distribution of NOS1 and NOS3 in the myocardium of angiotensin II-infused rats. *Hypertension* 37, 1423-1428.
- Tsai EJ, Liu Y, Koitabashi N, Bedja D, Danner T, Jasmin JF, et al. (2012). Pressure overload induced subcellular relocalization/oxidation of soluble guanylate cyclase in the heart modulates enzyme stimulation. *Circ Res* 100, 295-303.
- Unger T (2002). The role of the renin-angiotensin system in the development of cardiovascular disease. *Am J Cardiol* 89, 3A-10A
- Varagic J, Frohlich ED (2002). Local cardiac renin-angiotensin system: hypertension and cardiac failure. *J Mol Cell Cardiol* 34, 1435-1442.

Wang h, Kohr MJ, Traynham CJ, Wheeler DG, Janssen PM, Ziolo MT (2008). Neuronal nitric oxide synthase signaling within cardiac myocytes targets phospholamban. *Am J physiol Cell Physiol* 294, C1566-1575

Williams JC, Armesilla AL, Mohamed TMA, Hagarty CL, McIntyre FH, Schomburg S, et al. (2006). The sarcolemmal calcium pump, a-1 syntrophin, and neuronal nitric-oxide synthase are parts of a macromolecular protein complex. *J Biol Chem* 281, 23341 - 23348.

Xie Z, Liu D, Liu S, Calderon L, Zhao G, Turk J, Guo Z (2011). Identification of a cAMP-response element in the regulator of G-protein signaling-2 (RGS2) promoter as a key cis-regulatory element for RGS2 transcriptional regulation by angiotensin II in cultured vascular smooth muscles. *J Biol Chem* 286, 44646-44658.

Xu KY, Huso DL, Dawson TM, Bredt DS, Becker LC (1999). Nitric oxide synthase in cardiac sarcoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 657-662.

Zhang YH, Zhang MH, Sears CE, Emanuel K, Redwood C, El-Armouche A, Kranias EG, Casadei B (2008). Reduced phospholamban phosphorylation is associated with impaired relaxation in left ventricular myocytes from neuronal NO synthase-deficient mice. *Circ Res* 102, 242-249.

Zhang YH, Dingle L, Hall R, Casadei B (2009). The role of nitric oxide and reactive oxygen species in the positive inotropic response to mechanical stretch in the mammalian myocardium. *Biochim Biophys Acta* 1787, 811-817.

Abstract

Molecular Insights into Angiotensin II

Up-regulation of Nitric Oxide Synthase 1 and

Faster Ventricular Myocyte Relaxation in Rats

Jang, Jihyun

Department of Biomedical Sciences
The Graduate School
Seoul National University

Renin-angiotensin system plays crucial roles in the regulation of myocardial contractile function and in the progression towards diseases including hypertension, hypertrophy and heart failure. Angiotensin II (Ang II) exerts these effects by increasing NADPH oxidase-dependent oxidative stress and by activating G protein-dependent signaling cascades in the myocardium. Recently, Nitric oxide synthase 1 (NOS1) is known to be responsible for NO regulation of Ca^{2+} fluxes, intracellular signaling pathways and contraction in cardiac myocytes. Under physiological conditions, NOS1-derived NO facilitates cardiac relaxation by promoting Ca^{2+} reuptake back into sarcoplasmic reticulum. Importantly, cardiac NOS1 is up-regulated and plays an important compensatory mechanism to prevent or delay the progression of cardiac diseases (by reducing sources of

oxidative stress). So far, the upstream/downstream mechanisms mediating NOS1 up-regulation in the left ventricular (LV) myocardium under stress and NOS1 regulation of myocyte relaxation remain unidentified. Therefore, we investigated whether Ang II regulates NOS1 protein expression and activity in rat LV myocytes and the mechanisms mediating NOS1 regulation of myocardial contractile function.

Our results showed that Ang II (1 μ M, 3 hrs) significantly increased the mRNA/protein expressions and the activity of NOS1 in LV myocyte homogenates. NOS3 protein expression was not affected by Ang II. Both type 1 and type 2 Ang II receptor (AT1R, AT2R) antagonists, Losartan and PD123319 blocked Ang II stimulation of NOS1, whereas AT2R agonist, CGP42112A increased NOS1, suggesting that both receptor subtypes are involved in Ang II up-regulation of NOS1. Stimulation of AT1R by Ang II can increase NADPH oxidase activity to produce reactive oxygen species (ROS). Inhibition of NADPH oxidase (Apocynin) or reducing intracellular ROS (4,5 - dihydroxy - 1,3 - benzenedisulfonic acid, Tiron) prevented Ang II - stimulation of NOS1 mRNA /protein expressions and activity, indicating that AT1R - NADPH oxidase - ROS axis is the upstream regulator of NOS1. Interestingly, Ang II induced the translocation of AT2R to the plasma membrane (surface membrane biotinylation) within 30 min. Such an effect was abolished by Losartan, Apocynin or Tiron pre-treatment, suggesting that AT1R - NADPH oxidase - ROS controls AT2R translocation to plasma membrane, which in turn, regulates NOS1 protein expression in cardiac myocytes.

Functionally, Ang II-induced an increase in ROS (30 min) but such an increase was no longer observed after 3 hrs treatment with Ang II. N(G)-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) or a selective NOS1 inhibitor, S-methyl-L-thiocitrulline (SMTC) increased NADPH oxidase production of superoxide/ROS at 3 hrs, suggesting that NOS1 inhibited NADPH oxidase and reduced ROS under these conditions. Furthermore, LV myocytes relaxation was facilitated after Ang II-treatment (3 hrs), an effect that was blocked by SMTC

and L-NAME. Myocyte contraction was not affected by Ang II. All the factors that prevented NOS1 protein expression and activity (e.g. Losartan, PD123319, Apocynin or Tiron) abolished NOS1-mediated faster relaxation by Ang II. In addition, Ang II increased phospholamban phosphorylation at serine 16 (PLN-Ser¹⁶) and SMTC prevented such an increase. Surprisingly, inhibition of PKA did not affect Ang II-induced increase of PLN-Ser¹⁶ and faster relaxation, these effects were abolished by cGMP/PKG inhibitors.

These results reveal that Ang II stimulates the mRNA/protein expressions and the activity of NOS1 *via* AT1R - NADPH oxidase - AT2R - dependent mechanism in murine left ventricular myocytes. NOS1, in turn, suppresses the activity of NADPH oxidase, reduces intracellular ROS and facilitates myocyte relaxation *via* cGMP/PKG - dependent PLN-Ser¹⁶.

Key words : NOS1, Angiotensin II, NADPH oxidase, ROS

Student number : 2011 - 21951