



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 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](#)

의학 석사학위 논문

**HDAC6 억제에 의한 Angiotensin II
고혈압 유도 동물에서 고혈압 진행의
완화효과**

아주대학교대학원

의학과/의학전공

CHI ZHE XI

HDAC6 억제에 의한 Angiotensin II

고혈압 유도 동물에서 고혈압 진행의 완화효과

지도교수 이숙영

이 논문을 의학 석사학위 논문으로 제출함.

2017 년 8 월

아 주 대 학 교 대 학 원

의학과/의학전공

CHI ZHE XI

CHI ZHE XI의 의학 석사학위 논문을 인준함.

심사위원장 이 숙 영 (인)

심 사 위 원 박 성 용 (인)

심 사 위 원 김 종 엽 (인)

아 주 대 학 교 대 학 원

2017 년 8 월 21 일

HDAC6 억제에 의한 Angiotensin II 고혈압 유도 동물에서 고혈압 진행의 완화효과

고혈압은 선진국에서 노인인구의 사망 및 유병율에서 가장 빈도가 높은 심혈관계질환의 주요 위험 인자이며 심부전의 원인이 되기도 한다. 황화수소 (H_2S)는 혈관내에서 주요 가스 신호 전달물질(gasotransmitters) 중의 하나이며 혈관이완 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 현재까지 황화수소를 조절하는 기전의 고혈압 치료제는 개발되지 않았고 만약 개발되게 되면 고혈압과 심부전 등의 치료제로 사용될 가능성이 있을 것으로 생각한다.

본 연구에서는 C57BL/6N 쥐에게 Angiotensin II를 투여하여 고혈압을 유도하고 Histone Deacetylase6 (HDAC6) 억제제를 투여하여 고혈압 완화효과를 확인하고자 하였다.

Human Embryonic Kidney (HEK 293) 세포에서 Angiotensin II를 처리하여 HDAC6 발현이 증가하였음을 확인하였고 Angiotensin II와 HDAC6 억제제인 Tubastatin A로 처리하여 cystathionine gamma lyase (CSE) 발현이 증가하였다. HEK 293 세포와 Human aortic endothelial cell (HAEC) 세포에서 Angiotensin II를 처리하여 황화수소가 감소하였고 Tubastatin A를 처리하여 황화수소가 증가하였음을 확인하였다.

결론적으로 Angiotensin II 유도 고혈압 모델에서 Tubastatin A는 고혈압 완화효과가 있다는 것을 확인하였다. 본 연구는 CSE와 황화수소 조절기전에 의한 고혈압 치료의 새로운 방향을 제시할 수 있을 것으로 기대된다.

핵심어: Angiotensin II, HDAC6, CSE, H_2S , 고혈압

차 례

국문요약.....	i
차례.....	ii
그림차례.....	iii
I. 서론.....	1
II. 재료 및 방법.....	3
1. 세포 배양.....	3
2. Western blot.....	3
3. H ₂ S 측정.....	4
4. 쥐 혈압측정.....	5
5. 통계 분석.....	6
III. 결과.....	7
1. Angiotensin II에 의한 HDAC6 발현의 증가와 CSE 발현의 감소.....	7
2. HDAC6 억제제에 의한 HDAC6 발현의 감소와 CSE 발현의 증가.....	9
3. HDAC6 억제제에 의한 황화수소 생성의 증가.....	11
4. HDAC6 억제제에 의한 Angiotensin II 유도 고혈압 완화 효과.....	13
IV. 고찰.....	15
V. 결론.....	18
참고문헌.....	19
ABSTRACT.....	22

그림 차례

그림 1. HEK 293 세포에서 Angiotensin II (100 nM) 처리에 의한 HDAC6 발현의 증가와 CSE 발현의 감소	8
그림 2. HEK 293 세포에서 Tubastatin A (5 μ M)와 Angiotensin II (100 nM) 처리에 의한 HDAC6 와 CSE 단백질 발현의 변화	10
그림 3. HEK 293 세포와 HAEC 세포 배양에서 생성되는 황화수소 측정	12
그림 4. 대조군, Angiotensin II 군과 Angiotensin II + Tubastatin A군에서 쥐 혈압측정	14

I. 서론

현재 선진국에서 노인인구의 사망 및 유병율에서 가장 빈도가 높은 원인은 심혈관계질환이며 그 중에서도 고혈압에 의한 질병이 많은 비중을 차지한다. 고령화로 인하여 혈관의 탄력이 떨어지면서 혈압이 상승하고 심장에 부담이 되어 심부전을 초래하고 고혈압을 만성적으로 앓게 되면 뇌졸중, 심근경색, 심장마비, 대동맥류와 같은 심혈관계질환을 유발할 수 있다 (Stamler et al., 1993; Chobanian et al., 2003). 식이요법과 생활 방식의 변화로 혈압을 조절하여 합병증의 위험을 줄일 수 있으나 이러한 방식이 효과적이지 않은 사람들의 경우 약물 치료가 필요하다. 현재 사용되고 있는 고혈압 치료제들로는 베타억제제, 이노제, 칼슘억제제, 혈관이완제, 알파2 억제제 등 여러 종류의 약들이 있다. 고혈압 치료제의 선택은 혈압과 환자의 동반질환 및 합병증의 여부를 파악하여 고려하여야 한다 (Chobanian et al., 2003; Ferrario and Strawn, 2006).

황화수소는 nitric oxide (NO), CO와 더불어 현재 알려져 있는 가스 신호 전달물질 중의 하나이며 혈관이완효과가 있는 것으로 알려져 있다 (Mustafa et al., 2009; Martelli et al., 2013). 또한 황화수소는 심장, 뇌 및 신장에서 세포 보호 효과를 나타내는 것으로 밝혀졌다 (Chang et al., 2008; Sen et al., 2009). 새로운 가스 신호전달물질로 대두된 황화수소가 염증세포 전달 물질과 활성산소들의 조절에 관여하여 염증세포와 활성산소를 감소시키고 혈관 이완에 관여하며 NO를 생산하는 Endothelial NO synthase (eNOS)와도 서로 교통한다는 사실이 증명되고 있다 (Hosoki et al., 1997; Zanardo et al., 2006). 황화수소는 내생적으로 (endogenous) 생성된 가스 신호 전달물질로 CSE, cystathionine β -synthase (CBS)와 3-mercaptopyruvate sulfur transferase (3-MST)에 의해 생성되어지는데 이 중 혈관에서는 CSE가 중요한 역할을 한다고 알려져 있다 (De Ruijter et al., 2003). CSE는 심장 혈관계에서 황화수소를 생성한다. CSE 유전자를 녹아

웃 시킨 쥐에서 내인성 황화수소의 생성을 감소시키고 혈압을 증가시키며 내피 의존성 혈관 확장의 장애를 초래하게 된다 (Kolluru et al., 2015b). 반면 외부에서 황화수소를 투여하여 고혈압과 염증반응을 완화시키는 연구들이 보고되고 있다 (Yan et al., 2004; Yin et al., 2013; Al-Magableh et al., 2015).

현재까지 황화수소를 조절하는 기전의 고혈압 치료제는 개발되지 않았고 만약 개발되게 되면 고혈압 치료, 심부전, 항산화, 항염증 등의 다기능 치료제로 사용될 가능성이 있고 고혈압 치료의 새로운 방향을 제시할 수 있을 것으로 생각된다.

HDAC은 전사 인자에 DNA를 노출시켜 특정 유전자 발현을 변화시키는 역할을 한다. HDAC은 클래스 I (HDAC 1-3 및 8), 클래스 II (HDAC 4-7, 9-10), 클래스 III (Sirtuin 1-7) 및 클래스 IV (HDAC 11) 그룹으로 분류된다 (De Ruijter et al., 2003; Longworth and Laimins, 2006; Valenzuela-Fernandez et al., 2008).

선행 연구에서 광범위 HDAC (Pan-HDAC) 억제제로 인간 대동맥 혈관 내피 세포(HAEC)에서 CSE 발현을 증가시키는 것을 확인하였고 HEK 293 세포에서 Angiotensin II를 처리하여 HDAC2, 6, 10 mRNA의 발현이 증가하였다. 이런 근거로 HDAC은 CSE와 관여한다고 생각하고 그 중에서 HDAC6가 CSE의 발현에 관여한다고 가정하였다.

본 실험에서 HEK 293 세포와 HAEC 세포에서 HDAC6 억제제인 Tubastatin A로 처리하여 CSE 조절에 관여하는 것을 확인하고자 하였고 동물실험에서 Angiotensin II 유도 고혈압 쥐에서 HDAC6 억제제를 투여하여 고혈압의 완화효과를 알아보하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 세포 배양

HEK 293 세포와 HAEC 세포를 사용하였다. HEK 293 세포는 10% Fetal bovine serum (FBS), 페니실린 (100 U/ml)이 첨가된 Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM, Corning) 배지에서 배양하였고 HAEC 세포는 10% FBS, 페니실린 (100 U/ml)이 첨가된 Endothelial Cell Growth Media (ECM, ScienCell) 배지에서 배양하였다. 배지는 3-4 일마다 교체하였고 세포가 70-80% 성장되었을 때 계대배양을 하였다. 모든 세포를 37°C, 5% CO₂ 조건으로 배양기 (incubator) 안에서 배양하였다.

2. Western Blot

HEK 293 세포와 HAEC 세포를 DMEM와 ECM 배지를 사용하여 60Φ plate에 분주하여 배양하였다. 세포 분화를 확인한 후 Angiotensin II (100 nM)로 처리한 후 균별로 세포를 수확하고 Radioimmunoprecipitation assay buffer (RIPA buffer, Bio-Rad)를 이용하여 세포에서 단백질을 분리하였다. 균 별로 세포를 수확한 각 튜브에 RIPA buffer를 50-100 μl 넣은 후 얼음에 30 분간 보관하면서 5-8 분마다 vortex로 섞어주었다. 그 후 4°C에서 12,000 rpm으로 15 분간 원심분리하여 상층액을 다시 취하였다. 단백질 정량은 Detergent Compatible (D.C) 단백질 정량 kit (Bio-Rad)를 사용하였다. 표준곡선(Standard curve)은 Bovine serum albumin (BSA, Bio-Rad)으로 하고 D.C 단백질 정량법에 의하여 각각의 단백질을 정량한 후 4 × sodium dodecyl sulfate (SDS) sample buffer와 bromophenol blue를 50 μg/ml 단백질에 가한 후 100°C에서 5 분간 가열하여 시료로 사용하였다. SDS/polyacrylamide 8% gel에서 100 V로 1.5~2 시간 동안 전기영동 하였다.

SDS/polyacrylamide 8% gel에서 분리된 단백질은 nitrocellulose membrane으로 80 V에서 약 1 시간 동안 10 × Tris/Glycine/SDS Buffer (Bio-Rad)와 10 × Tris/Glycine Buffer (Bio-Rad)를 사용하여 이동시켰다. Nitrocellulose membrane을 5% skim milk가 함유된 Phosphate buffered saline with Tween-20% (PBST) 완충액으로 1 시간 blocking한 후 각각의 일차 항체를 4°C 에서 12시간 동안 반응시켰다. 항HDAC6 항체(sc-5258, Santa cruz)를 1:1000으로, 항CSE 항체(sc-374249, Santa cruz)를 1:1000으로, 항β-Actin 항체(sc-81178, Santa cruz)를 1:1000으로 희석하여 사용하였다. 그 후 PBST 완충액으로 10 분간 3 회 세척한 후 2차 항체로 HDAC6는 Anti-Goat 1:2000으로 CSE는 Anti-Rabbit 1:5000으로 β-Actin는 Anti-Mouse 1:5000으로 1 시간 동안 반응시켰다. PBST 완충액으로 10분간 3회 세척한 후 Enhanced chemiluminescence (ECL, Bio-Rad) system으로 항체와 결합된 단백질을 조사하였다.

3. H2S 측정

Agar 포집법(Agar Trap) 으로 (Kantha et al., 2012) 세포 배양에서 생성된 황화수소를 측정하였다.

HEK 293 세포와 HAEC 세포는 T-25 플라스크 (Thermo Scientific)에서 배양하였다. 먼저 Agar (1% w/v LB-Bouillon 1%, Miller BD)를 3차 증류수 100 ml에 120°C 에서 20 분 동안 녹였다. Agar가 60°C까지 내려오면 45 mM zinc acetate (Sigma, Aldrich) 20 ml 및 3 M Sodium hydroxide (NaOH, Sigma Aldrich) 4.5 ml을 멸균 필터에 통과시켜 100 ml Agar 에 순서대로 기재하였다. 그 후 용액을 부드럽게 교반하여 5 ml를 T-25 플라스크 내부 표면에 즉시 적용하고 플라스크를 수평으로 유지시켜 고정하였다. 플라스크에 Agar 층을 고정시킨 후 상위층으로 하고 하위층에서 세포 배양을 진행하였다. 세포가 플라스크에 70-80% 성장하면 혈청이 없는 새로운 배지로 대체하였다.

대조군, Angiotensin II군과 Angiotensin II + Tubastatin A군으로 나누고

Angiotensin II군은 Angiotensin II (100 nM)로 처리하고 Angiotensin II + Tubastatin A군은 Tubastatin A (5 μ M)로 1시간 전 처리하고 Angiotensin II (100 nM)로 처리하였다. 황화수소 공여 화합물인 Sodium hydrosulfide (NaHS, 10-50 μ M, Sigma Aldrich)와 L-cysteine (1000-5000 μ M, Sigma Aldrich)를 세포 배양액에 첨가하여 그 결과 생성된 황화수소를 Agar 층에 흡수시키고 포집된 황화수소의 손실을 최소화하기 위해 플라스크 뚜껑을 Parafilm으로 덮었다. Parafilm을 덮은 것으로 인하여 세포 생존 능력에 영향을 미치지 않았다. 10 시간 동안 인큐베이터에 배양하고 배지를 제거한 후 N-dimethyl-pphenylene-diamine chloride (N,N-dpd, Sigma; 40 mM in 7.2 M HCl) 2 ml를 첨가하고 플라스크를 부드럽게 흔들어서 표면에 균일한 층을 형성시키고 실온에서 10 분간 배양하였다. 다음 Ferric chloride solution ($FeCl_3$, 30 mM in 1.2 M HCl) 400 μ l 을 첨가하고 N,N-dpd와 혼합하여 20 분간 배양하였다.

플라스크의 내용물을 철저히 혼합하고 200 μ l씩 96-well microtiter plate (Thermo Scientific)에 첨가 하였다. 마지막으로 흡광도 UV-Visible SpectraMax (Bio-Rad)분광 광도계로 590 nm 파장에서 측정 하였다. NaHS (250 mM)를 플라스크 내부 배지에 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에서 배양 한 후, 상온에서 NaHS 250 mM를 100, 50, 25, 5 mM로 희석하여 표준곡선을 만들어서 사용하였다.

4. 쥐 혈압측정

생후 11 주령인 C57BL/6N 쥐 18 마리를 2주간의 쥐꼬리 혈압계 적응기간을 거친 후 대조군, Angiotensin II 군과 Angiotensin II + Tubastatin A 군으로 나누어 실험하였다. 쥐꼬리를 이용한 혈압 측정은 쥐를 작은 틀 안에 넣고 혈압을 측정하는 방식인데 쥐가 이에 적응하는 기간이 2주 정도 소요된다.

고혈압 유도하기 전 각 군의 쥐들을 쥐꼬리 혈압계를 이용하여 기

저혈압을 측정하였다. 혈압을 측정하는 동안 전기담요의 온도를 37°C 로 유지하고 그 중 정확하게 측정된 혈압 10개를 선택하여 평균혈압을 구하였다.

Angiotensin II 유도 고혈압 쥐를 만들기 위하여 Angiotensin II 1 mg/kg/d OSMOTIC pump (Alzet MODEL 1004)를 만들었다. 포란액(Forane Solution)을 사용하여 전신마취 시킨 후 Angiotensin II pump를 쥐 등쪽 피하에 수술하여 삽입시켰다. 동일한 실험조건을 만들기 위하여 대조군도 삽입하지 않고 수술하였다. 이 모든 실험과정은 아주대학교 동물실험센터 청정구역 무균 환경에서 진행하였다. 세 군의 쥐들을 동일한 조건에서 혈압을 측정하기 위하여 대조군과 Angiotensin II군은 Phosphate buffer saline (PBS) 200 μ l를 4주간 매일 복강 내 주사하였고 Angiotensin II + Tubastatin A 군은 Tubastatin A (50 mg/kg/d) 200 μ l를 4주간 매일 복강 내 주사하였다.

Angiotensin II pump를 삽입하고 2주 후와 4주 후에 모든 군에서 혈압을 측정하고 수축기 혈압, 이완기 혈압과 평균혈압(Mean) 을 분석하였다. Pump 삽입으로 인한 통증, 수술부위 염증소견 또는 심각한 가려움증 현상, 사료 섭취량의 감소나 심한 체중감소 혹은 심각한 탈모현상은 관찰되지 않았다.

5. 통계 분석

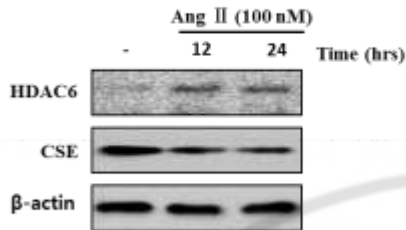
통계 프로그램 (Graphpad Prism7, CA USA)를 이용하여 통계학적 분석을 시행하였다. 데이터는 평균 \pm 표준오차로 표시되며 1-way 또는 2-way ANOVA 를 사용하여 분석하였다. 실험 데이터는 t-test 를 사용하여 분석하였다. p 값이 0.05 미만인 경우 통계학적으로 유의한 것으로 정의하였다.

III. 결과

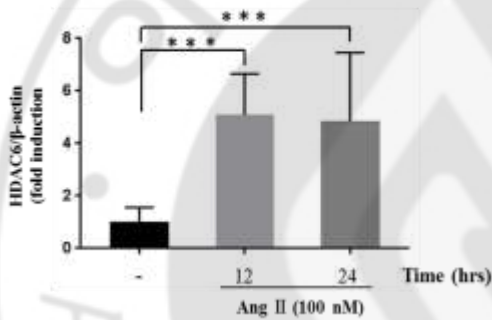
1. Angiotensin II에 의한 HDAC6 발현의 증가와 CSE 발현의 감소.

HEK 293 세포에서 Angiotensin II를 처리하였을 때 HDAC6와 CSE 단백질의 변화를 알아보기 위하여 western blot 실험을 진행하였다. Angiotensin II (100 nM)를 12시간과 24시간 동안 반응시킨 결과 HDAC6 단백질은 대조군에 비하여 12시간과 24시간에서 현저하게 증가하였고 12시간과 24시간에는 큰 차이가 없었다. CSE 단백질은 Angiotensin II를 처리한 12시간과 24시간에서 대조군에 비하여 현저하게 감소하였고 12시간과 24시간에는 큰 차이가 없었다. 실험 결과로 보면 HEK 293 세포에서 Angiotensin II로 처리하였을 때 HDAC6 발현은 증가하였고 CSE 발현은 감소하였다.

A



B



C

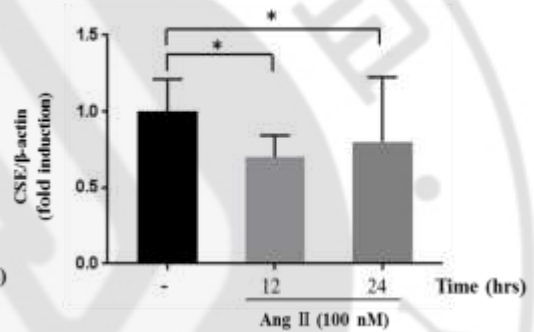


Figure 1. Angiotensin II에 의한 HDAC6 발현의 증가와 CSE 발현의 감소.

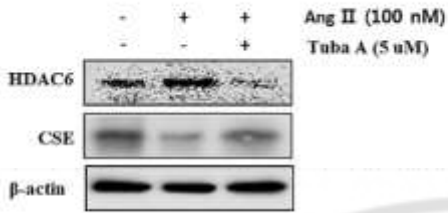
A: HEK 293 세포에서 Angiotensin II (100 nM)를 12시간과 24시간에서 처리하였을 때 대조군에 비하여 HDAC6는 발현이 증가하였고 CSE는 발현이 감소하였다. B: HDAC6 발현은 대조군에 비하여 Angiotensin II (100 nM)를 처리한 군에서 증가하였다. C: CSE 발현은 대조군에 비하여 Angiotensin II (100 nM)를 처리한 군에서 감소하였다. $n = 3$, *: $p < 0.05$, *** $p < 0.005$

2. HDAC6 억제제에 의한 HDAC6 발현의 감소와 CSE 발현의 증가.

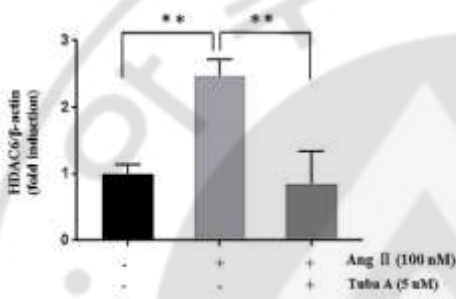
HEK 293 세포에서 HDAC6 억제제인 Tubastatin A와 Angiotensin II로 처리하였을 때 HDAC6와 CSE 단백질의 변화를 알아보기 위하여 western blot 실험을 진행하였다. HEK 293 세포에 Tubastatin A (5 μ M)로 1시간 전 처리하고 Angiotensin II (100 nM)로 12시간 처리하여 실험을 진행한 결과 HDAC6는 대조군에 비하여 Angiotensin II를 처리한 군에서 발현이 증가하였고 Angiotensin II + Tubastatin A를 처리한 군에서 발현이 감소되었다. CSE는 대조군에 비하여 Angiotensin II를 처리한 군에서 발현이 감소하였고 Angiotensin II + Tubastatin A를 처리한 군에서 발현이 증가 되었다.

Angiotensin II를 처리하였을 때 HDAC6 발현이 증가하면서 CSE 발현이 감소하였고 Angiotensin II 와 Tubastatin A를 함께 처리하였을 때 HDAC6 발현이 감소하면서 CSE 발현이 증가하였다. 이런 결과로부터 HDAC6가 CSE 단백질 조절에 관여한다는 것을 확인하였다.

A



B



C

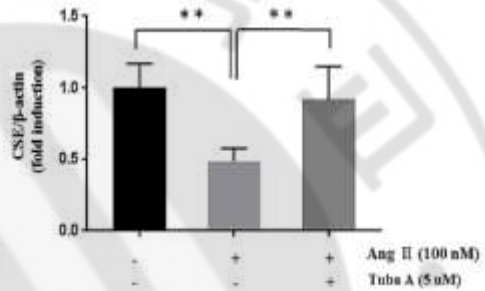


Figure 2. HDAC6 억제제에 의한 HDAC6 발현의 감소와 CSE 발현의 증가. A: HEK 293 세포에서 Tubastatin A (5 uM)를 1시간 전 처리하고 Angiotensin II (100 nM)를 12시간 처리하였을 때 HDAC6 발현이 감소하고 CSE 발현이 증가하였다. B: HDAC6 발현은 Angiotensin II를 처리하였을 때 증가하고 Angiotensin II + Tubastatin A를 처리하였을 때 감소하였다. C: CSE 발현은 Angiotensin II를 처리하였을 때 감소하고 Angiotensin II + Tubastatin A를 처리하였을 때 증가하였다. n = 3 ** $p < 0.01$

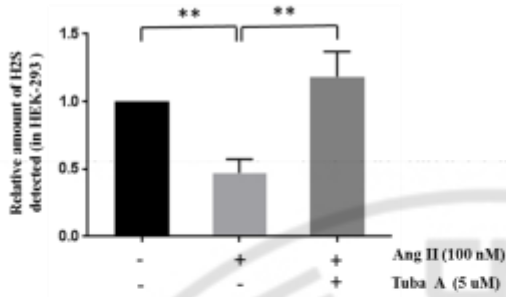
3. HDAC6 억제제에 의한 황화수소 생성의 증가

HEK 293 세포와 HAEC 세포에서 Angiotensin II와 Tubastatin A를 처리하였을 때 황화수소의 변화를 알아보기 위하여, Agar 포집법으로 세포 배양에서 생성된 황화수소를 측정하였다.

HEK 293 세포와 HAEC 세포에서 Agar를 사용하는 T-25 플라스크에 대조군, Angiotensin II 군과 Angiotensin II + Tubastatin A 군으로 배양하여 NaHS (25 μ M)와 L-cysteine (3000 μ M)를 첨가하여 생성된 황화수소를 측정한 결과 대조군에 비하여 Angiotensin II 군에서 황화수소 생성이 감소하였고 Angiotensin II + Tubastatin A 군에서 황화수소 생성이 증가하였다.

결과적으로 Angiotensin II를 처리하였을 때 황화수소 생성이 감소하였음을 확인하였고 Angiotensin II + Tubastatin A를 처리하였을 때 황화수소 생성이 증가하였음을 확인하였다.

A



B

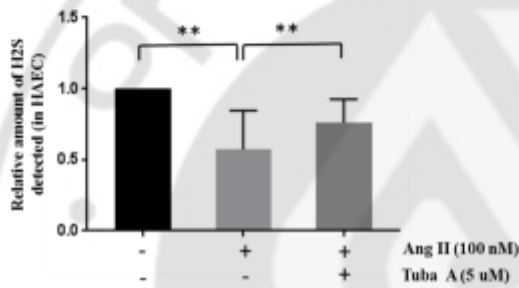


Figure 3. HDAC6 억제제에 의한 황화수소 생성의 증가. A: HEK 293 세포에서 Angiotensin II (100 nM)를 처리하였을 때 황화수소 생성이 감소하였고 Angiotensin II + Tubastatin A를 처리하였을 때 황화수소 생성이 증가하였다. B: HAEC 세포에서 Angiotensin II (100 nM)를 처리하였을 때 황화수소 생성이 감소하였고 Angiotensin II + Tubastatin A를 처리하였을 때 황화수소 생성이 증가하였다. $n = 5$, $**p < 0.01$

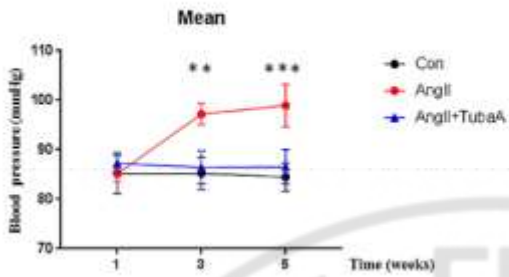
4. HDAC6 억제제에 의한 Angiotensin II 유도 고혈압 완화효과

C57BL/6N 11주령 쥐 18 마리를 대조군, Angiotensin II 군과 Angiotensin II + Tubastatin A 군으로 나누어 혈압을 측정하였다.

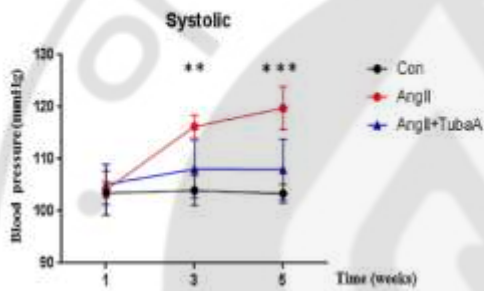
Angiotensin II pump 삽입 전, 삽입 2주와 4주 후에 혈압을 측정한 결과 수축기와 이완기, 평균혈압 모두 pump 삽입 2주 후부터 Angiotensin II 군에서 대조군에 비하여 상승하였고 Angiotensin II + Tubastatin A 군에서 Angiotensin II 군에 비교하여 상승하지 않았고 그 변화가 4주 후까지 유지되었다.

Angiotensin II pump를 삽입하여 고혈압을 유도한 결과 쥐들의 고혈압이 유도 되었고 HDAC6 억제제인 Tubastatin A를 4주간 매일 복강 내 주사한 결과 Angiotensin II 유도 고혈압의 진행이 완화하였다. 결과적으로 HDAC6 억제제인 Tubastatin A는 Angiotensin II 유도 고혈압의 완화효과가 있는 것을 확인하였다.

A



B



C

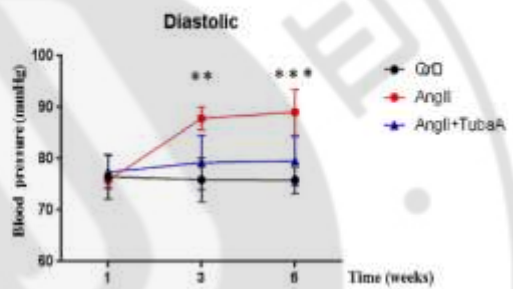


Figure 4. HDAC6 억제제에 의한 Angiotensin II 유도 고혈압 완화효과. 수축기 혈압, 이완기 혈압과 평균혈압 모두 pump 삽입 2주 후부 Angiotensin II 군에서 혈압이 대조군에 비하여 상승하였고 4 주까지 고혈압이 유지되었다. Angiotensin II + Tubastatin A 군에서 혈압은 Angiotensin II 군에 비하여 상승하지 않았고 4 주까지 유지되었다. $n = 6$, ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$

IV. 고찰

황화수소는 CSE에 의해 혈관에서 생성되는 가스 전달물질이다. 혈관에서 황화수소의 주요 기능은 혈관 확장 및 신생혈관의 생성을 촉진시킨 (Mustafa et al., 2011; Jackson-Weaver et al., 2013; Kolluru et al., 2015a). 혈관내피 세포에서 황화수소를 생산하는 CSE의 유전자를 녹아웃 시킨 쥐에서 고혈압이 초래되고 (Yang et al., 2008) 고혈압과 염증반응을 완화시키는 연구들이 보도되고 있다 (Mustafa et al., 2009; Sen et al., 2009; Mustafa et al., 2011). 이런 근거로부터 CSE는 고혈압과 연관성이 있을 것이라고 추정되지만 현재까지 CSE의 조절기전은 밝혀지지 않았다.

최근 Angiotensin II에 의한 심장 비대(Cardiac hypertrophy)가 HDAC 억제제를 사용하여 감소시킬 수 있음이 밝혀졌고 (Sato et al., 2000), HDAC 활성은 자발성 고혈압 쥐(Spontaneously hypertensive rat)의 심장에서 증가하는 것으로 나타났다 (Cardinale et al., 2010). 다른 연구에서 HDAC 억제제로 인하여 Angiotensin II type1 receptor (AT1 receptor)의 발현을 감소시켜 Angiotensin II로 인한 고혈압을 억제하였다. 자발성 고혈압 쥐를 valproic acid로 8주간 치료하면 고혈압의 진행을 약화시킬 수 있다 (Cardinale et al., 2010). 이런 결과들로부터 HDAC은 고혈압과 연관성이 있을 거라고 생각한다.

선행실험에서 Pan-HDAC 억제제인 TSA를 사용하여 HAEC 세포에서 CSE 발현을 증가하였고 HEK 293 세포에 Angiotensin II를 처리하였을 때 HDAC6 mRNA의 발현이 증가하였다. HDAC와 CSE가 연관성이 있을 것이라고 생각하고 HDAC6 선택적 억제제인 Tubastatin A를 사용하여 CSE 발현을 조절함으로써 Angiotensin II 유도 고혈압 모델에서 고혈압 완화 효과가 있을 거라는 가설을 세웠다.

HDAC은 HDAC 1-11 및 SIRT 1-7로 지칭되는 18개의 효소 군으로 구성된다. 클래스 I HDAC 내에서 HDAC1, 2 및 3은 핵에서 주로 발견되는 반면 HDAC8은 핵 및 세포질에서 모두 발견된다. 클래스 II HDAC (HDAC4, 5, 6, 7, 9

및 10)는 신호에 따라 핵을 왕복 할 수 있다. HDAC6는 히스톤 및 비 히스톤 단백질(tubulin, Heat shock protein 90 및 cortactin)을 탈 아세틸화 하는 것으로 알려져 있고 단백질과 복합체를 형성하므로 다양한 생물학적 과정에 관여한다 (Yan et al., 2004; Valenzuela-Fernandez et al., 2008; Yin et al., 2013).

HEK 293 세포는 원래 조직 배양에서 성장한 인간 배아 신장 세포에서 유래 된 특정 세포주이다. HEK 293 세포는 신뢰할 수 있는 성장 및 형질 감염 때문에 수년 동안 세포 생물학 연구에 널리 사용되어 왔다. 우리 실험에서 HEK 293 세포를 선택한 이유는 HEK 293 세포가 무한대로 계대배양이 가능하고 세포내에 본 실험에서의 표적 단백질인 CSE 가 많이 들어있다.

본 연구에서 Angiotensin II를 HEK 293 세포에 처리하였을 때 HDAC6 발현이 증가하였고 CSE 발현이 감소하였음을 확인하였다. HDAC6 억제제인 Tubastatin A와 Angiotensin II를 함께 처리하였을 때는 HDAC6 발현이 감소하고 CSE 발현이 증가하였음을 확인하였다. HEK 293 세포와 HAEC 세포에서 Agar 포집법으로 황화수소 생성을 측정한 결과 HEK 293 세포와 HAEC 세포에서 모두 Angiotensin II를 처리하였을 때 황화수소 생성이 대조군에 비하여 감소하였다. Angiotensin II와 Tubastatin A를 함께 처리하였을 때 황화수소 생성이 증가하였다. Angiotensin II를 처리하였을 때 황화수소 생성이 감소되었고 HDAC6 억제제인 Tubastatin A와 Angiotensin II를 함께 처리하였을 때 황화수소를 생성하는 CSE의 활성이 증가되었음을 확인하였다. 이런 실험결과로부터 세포에서 HDAC6 발현 및 활성에 따라 CSE 발현이 조절된다는 것을 증명하였다.

C57BL/6N 쥐를 세 군으로 나누어 혈압을 측정한 결과 Angiotensin II pump 삽입 2주와 4주 후에 Angiotensin II군에서 혈압이 상승하였고 Angiotensin II+ Tubastatin A 군에서 Tubastatin A를 4주간 매일 복강 내 주사한 결과 Angiotensin II 유도 고혈압이 방지되었음을 확인하였다. 실험 결과로부터 Angiotensin II 유도 고혈압 쥐에서 HDAC6 이로 인하여 고혈압 완화효과를 확인하였다.

본 연구에서 Angiotensin II-HDAC6-CSE의 조절기전의 정확한 메커니즘을 밝히지 못하였으나 향후 이러한 메커니즘을 밝히기 위하여 추가 실험을 진행할 예정이다.



V. 결론

본 연구에서는 western blot 실험과 황화수소 측정하는 실험방법을 이용하여 세포에서 Angiotensin II와 HDAC6 억제제인 Tubastatin A를 처리하였을 때 HDAC6 발현이 감소하고 CSE 발현이 증가하면서 황화수소 생성이 증가하였음을 확인하였고 쥐꼬리 혈압 측정기를 이용하여 혈압을 측정한 결과 HDAC6 억제제인 Tubastatin A를 투여하였을 때 Angiotensin II 유도 고혈압 쥐에서 혈압의 완화효과를 확인하였다. 이러한 결과는 HDAC6 억제제인 Tubastatin A가 고혈압 치료에 효과가 있을 것으로 생각하고 CSE-황화수소 조절기전에 의한 고혈압 치료의 새로운 방향을 제시할 수 있을 것으로 기대된다.

참고문헌

1. Al-Magableh MR, Kemp-Harper BK, Hart JL: Hydrogen sulfide treatment reduces blood pressure and oxidative stress in angiotensin II-induced hypertensive mice. *Hypertens Res* 38: 13-20, 2015
2. Cardinale JP, Sriramula S, Pariaut R, Guggilam A, Mariappan N, Elks CM, Francis J: HDAC inhibition attenuates inflammatory, hypertrophic, and hypertensive responses in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 56: 437-444, 2010
3. Chang L, Geng B, Yu F, Zhao J, Jiang H, Du J, Tang C: Hydrogen sulfide inhibits myocardial injury induced by homocysteine in rats. *Amino Acids* 34: 573-585, 2008
4. Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL, Jr., Jones DW, Materson BJ, Oparil S, Wright JT, Jr., Roccella EJ, National Heart L, Blood Institute Joint National Committee on Prevention DE, Treatment of High Blood P, National High Blood Pressure Education Program Coordinating C: The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure: the JNC 7 report. *JAMA* 289: 2560-2572, 2003
5. De Ruijter AJ, Van Gennip AH, Caron HN, Stephan K, Van Kuilenburg AB: Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochemical Journal* 370: 737-749, 2003
6. Ferrario CM, Strawn WB: Role of the renin-angiotensin-aldosterone system and proinflammatory mediators in cardiovascular disease. *Am J Cardiol* 98: 121-128, 2006
7. Hosoki R, Matsuki N, Kimura H: The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous smooth muscle relaxant in synergy with nitric oxide. *Biochemical and biophysical research communications* 237: 527-531, 1997
8. Jackson-Weaver O, Osmond JM, Riddle MA, Naik JS, Bosc LVG, Walker BR, Kanagy NL: Hydrogen sulfide dilates rat mesenteric arteries by activating endothelial large-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels and smooth muscle Ca²⁺ sparks. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*

- 304: H1446-H1454, 2013
9. Kartha RV, Zhou J, Hovde LB, Cheung BW, Schröder H: Enhanced detection of hydrogen sulfide generated in cell culture using an agar trap method. *Analytical biochemistry* 423: 102-108, 2012
 10. Kolluru GK, Bir SC, Yuan S, Shen X, Pardue S, Wang R, Kevil CG: Cystathionine γ -lyase regulates arteriogenesis through NO dependent monocyte recruitment. *Cardiovascular research* 107: 590-600, 2015a
 11. Kolluru GK, Yuan S, Shen X, Kevil CG: H₂S regulation of nitric oxide metabolism. *Methods Enzymol* 554: 271-297, 2015b
 12. Longworth MS, Laimins L: Histone deacetylase 3 localizes to the plasma membrane and is a substrate of Src. *Oncogene* 25: 4495-4500, 2006
 13. Martelli A, Testai L, Breschi MC, Lawson K, McKay NG, Miceli F, Taglialatela M, Calderone V: Vasorelaxation by hydrogen sulphide involves activation of Kv7 potassium channels. *Pharmacol Res* 70: 27-34, 2013
 14. Mustafa AK, Gadalla MM, Snyder SH: Signaling by gasotransmitters. *Sci Signal* 2: re2, 2009
 15. Mustafa AK, Sikka G, Gazi SK, Steppan J, Jung SM, Bhunia AK, Barodka VM, Gazi FK, Barrow RK, Wang R: Hydrogen Sulfide as Endothelium Derived Hyperpolarizing Factor Sulphydrates Potassium Channels Novelty and Significance. *Circulation research* 109: 1259-1268, 2011
 16. Satoh N, Suter TM, Liao R, Colucci WS: Chronic α -adrenergic receptor stimulation modulates the contractile phenotype of cardiac myocytes in vitro. *Circulation* 102: 2249-2254, 2000
 17. Sen U, Basu P, Abe OA, Givvimani S, Tyagi N, Metreveli N, Shah KS, Passmore JC, Tyagi SC: Hydrogen sulfide ameliorates hyperhomocysteinemia-associated chronic renal failure. *Am J Physiol Renal Physiol* 297: F410-419, 2009
 18. Stamler J, Stamler R, Neaton JD: Blood pressure, systolic and diastolic, and cardiovascular risks. US population data. *Arch Intern Med* 153: 598-615, 1993
 19. Valenzuela-Fernandez A, Cabrero JR, Serrador JM, Sanchez-Madrid F: HDAC6: a key regulator of cytoskeleton, cell migration and cell-cell interactions. *Trends Cell Biol* 18: 291-297, 2008

20. Yan H, Du J, Tang C: The possible role of hydrogen sulfide on the pathogenesis of spontaneous hypertension in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 313: 22-27, 2004
21. Yang G, Wu L, Jiang B, Yang W, Qi J, Cao K, Meng Q, Mustafa AK, Mu W, Zhang S: H₂S as a physiologic vasorelaxant: hypertension in mice with deletion of cystathionine γ -lyase. *Science* 322: 587-590, 2008
22. Yin J, Tu C, Zhao J, Ou D, Chen G, Liu Y, Xiao X: Exogenous hydrogen sulfide protects against global cerebral ischemia/reperfusion injury via its anti-oxidative, anti-inflammatory and anti-apoptotic effects in rats. *Brain Res* 1491: 188-196, 2013
23. Zanardo RC, Brancaleone V, Distrutti E, Fiorucci S, Cirino G, Wallace JL: Hydrogen sulfide is an endogenous modulator of leukocyte-mediated inflammation. *The FASEB journal* 20: 2118-2120, 2006

- ABSTRACT-

Inhibition of HDAC6 attenuates progression of hypertension in Angiotensin II – induced hypertension mice model

Hypertension is the major risk factor of cardiovascular disease with the highest mortality and prevalence of elderly population in developed countries. It also causes chronic kidney failure.

Hydrogen sulfide (H₂S) is one of the gasotransmitters and is known to have vasodilatory effect. Up to now, there have not been developed hypertension medication that regulates hydrogen sulfide. If developed, it may be used as a treatment for hypertension and heart failure.

In this study, we confirmed whether inhibition of Histone Deacetylase6 (HDAC6) attenuated the progression of Angiotensin II induced hypertension in mice model.

The expression of HDAC6 was increased by treatment with Angiotensin II and the expression of cystathionine gamma-lyase (CSE) was increased by Tubastatin A and Angiotensin II in HEK 293 cells. The production of hydrogen sulfide was decreased by Angiotensin II and the production of hydrogen sulfide was increased by Tubastatin A and Angiotensin II in HEK 293 cells and human aortic endothelial cell (HAEC) cells.

In conclusion, it was confirmed that Tubastatin A is effective in relieving hypertension in Angiotensin II-induced hypertension model. This study is expected to provide a new direction for the treatment of hypertension via regulation of CSE-H₂S.

Keyword : Angiotensin II , HDAC6, CSE, H₂S, Hypertension