



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](#)

석사학위논문

PCI34051을 이용한
비만성 고혈압 치료 효과 및 기전

계명대학교 대학원
의학과

장 윤 주

지도교수 김 지 인

2021년 8월

PCI3051을 이용한 비만성 고혈압 치료 효과 및 기전

장 윤 주

2021년
8월

PCI34051을 이용한 비만성 고혈압 치료 효과 및 기전

지도교수 김 지 인

이 논문을 석사학위 논문으로 제출함

2 0 2 1 년 8 월

계 명 대 학 교 대 학 원
의 학 과

장 윤 주

장윤주의 석사학위 논문을 인준함

주 심 최 미 선

부 심 김 지 인

부 심 이 재 호

계 명 대 학 교 대 학 원

2 0 2 1 년 8 월

목 차

1. 서 론	1
2. 재료 및 방법	3
3. 성 적	8
4. 고 찰	21
5. 요 약	24
참고문헌	25
Abstract	30
국문초록	32

List of Tables

Table 1. List of Mouse Primers for Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction	7
--	---

List of Figures

Figure 1. Increased body weight and raised blood pressure by high-fat diet	13
Figure 2. Altered blood pressure by treatment of PCI34051	14
Figure 3. Alteration of HDAC8 activity in the kidney by treatment of high-fat diet and PCI34051	15
Figure 4. Alteration of the renin-angiotensin system components in the liver and kidney by treatment of high-fat diet and PCI34051	16
Figure 5. Alteration of the angiotensin II in the serum by treatment of high-fat diet and PCI34051	17
Figure 6. Alteration of the sodium transporters in the kidney by treatment of high-fat diet and PCI34051	18
Figure 7. Alteration of inflammatory cytokines in the kidney by treatment of high-fat diet and PCI34051	20

1. 서론

과도한 체중 증가는 고혈압, 고지혈증, 만성 신장 질환, 심혈관 질환 등을 포함한 대사 증후군 및 합병증의 발병을 증가시킨다. 비만은 지난 수십 년 동안 주요한 질병으로 다루어지고 있으며 이에 대한 활발한 연구가 진행되고 있다(1). 비만은 과도한 내장 지방의 축적을 통해 염증을 발생시키고 호르몬 생산 및 분비, 혈관 내피의 변화 등에 의한 여러 메커니즘을 통해 고혈압을 일으킨다(2). 특히 신장에서 레닌-안지오텐신 시스템은 혈압, 체액 및 전해질 균형을 조절하는 주요 생리학적 시스템으로 비만, 염증, 산화 스트레스 및 인슐린 저항성의 병인과 관련되어 있다(3).

체질량지수는 체중과 키를 사용하는 체지방 추정 지수로 사람의 체중(kg)을 키의 제곱(m^2)으로 나눈 값으로 계산된다. 측정한 체질량지수가 $18.5 \text{ kg}/m^2$ 미만일 경우 저체중, $18.5 \sim 24.9 \text{ kg}/m^2$ 은 정상 체중, $25 \sim 29.9 \text{ kg}/m^2$ 은 과체중, $30 \text{ kg}/m^2$ 이상은 비만으로 나눈다(4). 대한비만학회의 자료에 따르면 한국인에서 체질량지수가 $25 \text{ kg}/m^2$ 이상인 과체중의 비율이 2009년에서 2018년 사이에 남성의 경우 37.1%에서 46.2%로, 여성의 경우 27.2%에서 29.6%로 증가하였다(5). 비만은 세계적으로 계속 증가되는 추세이며 2030년까지 미국 성인의 86%가 과체중 또는 비만이 될 것으로 예측된다(6).

히스톤 탈아세틸화 효소와 그 억제제에 대한 많은 연구들이 최근 암과 심혈관 질환에서 이루어지고 있다. 히스톤 탈아세틸화 효소는 클래스 I(히스톤 탈아세틸화 효소1, 2, 3, 8), 클래스 IIa(히스톤 탈아세틸화 효소4, 5, 7, 9), 클래스 IIb(히스톤 탈아세틸화 효소6 및 10), 클래스 III(시르투인1 - 7) 및 클래스 IV(히스톤 탈아세틸화 효소11)로 구분되어 있다. 최근 논문에 따르면 만성 고혈압 실험 모델인 데옥시코르티코스테론-소금 식이 쥐 모델에서 히스톤 탈아세틸화 효소 클래스 I 과 클래스 IIa 억제제인 발프로산을 투여하였을 때 히스톤 탈아세틸화 효소8의 활성이 약화되고 섬유증을 동반한 심장 비대 증상이 억제되었다(7). 2 kidney 2 clip 방법으로

유도된 신혈관 고혈압 쥐 모델에서도 발프로산이 히스톤 탈아세틸화 효소2 및 히스톤 탈아세틸화 효소8의 발현을 감소시키는 것을 확인하였으며 전환 성장인자 베타1과 결합조직성장인자를 감소시켜 고혈압 및 심장 리모델링을 악화시킨다는 것이 보고되었다(8). 또한 히스톤 탈아세틸화 효소8의 선택적 억제제인 PCI34051이 안지오텐신 II로 유도된 고혈압 모델에서 동맥 재형성, 혈관 수축 및 염증의 조절을 통해 고혈압을 낮춘다고 보고되어(9) 히스톤 탈아세틸화 효소8의 활동이 혈압 감소에 기여하는 것으로 알려져 있으나 비만성 고혈압 질병 모델에서 히스톤 탈아세틸화 효소8의 역할과 그 작용 기전에 대해서는 밝혀진 바가 없다.

따라서 본 연구에서는 히스톤 탈아세틸화 효소8의 선택적 억제제인 PCI34051이 고지방식으로 유도된 고혈압 쥐 모델에서 혈압에 미치는 영향과 그 작용 기전을 조사하였다.

2. 재료 및 방법

2.1 실험동물:

모든 동물 실험은 실험동물의 관리 및 사용에 대한 미국 국립보건원 (National Institutes of Health, NIH)의 지침에 따라 수행되었다. 실험 프로토콜(KM-2017-39R1)은 계명대학교 의과대학 동물실험윤리위원회의 승인을 받았으며 연구 진행 시 모든 윤리 규정을 준수하였다. 이 연구에는 9주령 C57BL/6 수컷 쥐(코아텍, 경기도, 한국)를 사용하였다. 쥐를 무작위로 두 군으로 나누어 60% Kcal가 지방인 고지방식이(TD. 06414, Harlan Laboratories, Inc., 매디슨, 위스콘신주, 미국) 또는 10% Kcal의 지방을 포함하는 일반식이(TD. 94048, Harlan Laboratories, Inc., 매디슨, 위스콘신주, 미국)를 공급하였다. 고지방식이군의 수축기 혈압이 140 mmHg 이상인 고혈압기에 도달하면 쥐에게 생리식염수 또는 PCI34051(10444, Cayman chemical, 앤아버, 미시간주, 미국)을 복강 내 주사로 하루에 한번 체중 kg당 0.5 mg을 12일 동안 투여하였다.

2.2 체중 측정:

체중계(HS1500A, 한국 에이.엔.디, Inc., 서울, 한국)를 사용하여 식이 시작 전 체중과 쥐의 혈압이 140 mmHg 이상인 고혈압기에 도달하여 약물을 투여하기 직전에 측정된 체중을 비교하였다. 약물을 투여하는 동안에는 매일 체중을 측정하였다.

2.3 혈압 측정:

혈압은 제조업체의 지침에 따라 CODA High Throughput 비침습성 혈압 시

스텝(CODA-HT4, Kent Scientific, 토링턴, 코네티컷주, 미국)을 사용하여 측정하였다. 쥐를 가열 패드에서 35 °C로 10분 동안 예열한 다음 움직임을 제지할 수 있는 통에 두고 공압 펄스 센서가 있는 컵을 꼬리에 부착하여 10회 측정값의 평균을 사용하였다.

2.4 히스톤 탈아세틸화 효소8 활성 측정:

신장과 간의 히스톤 탈아세틸화 효소8 활성은 히스톤 탈아세틸화 효소8 활성 형광 분석 키트(K348, BioVision, Inc., 밀피타스, 캘리포니아주, 미국)를 사용하여 제조업체의 지침에 따라 측정하였다. 히스톤 탈아세틸화 효소8 활성의 스탠다드 커브를 그리기 위하여 먼저 10 μM 7-아미노-4-트리플루오르메틸 쿠마린을 0, 2, 4, 6, 8, 10 μL 씩 웰에 넣고 히스톤 탈아세틸화 효소8 분석 용액을 추가하여 최종 양 100 μL 내에 0, 20, 40, 60, 80, 100 pmol이 포함되도록 하였다. 그리고 마이크로 플레이트 판독기 (Infinite® 200 PRO, Tecan, 시스트레스, 마네돌프, 스위스)를 사용하여 380/500 nm에서 형광 측정법으로 측정된 값으로 스탠다드 커브를 그렸다. 조직 샘플에서의 측정을 위해 쥐의 신장과 간 용해물을 각 플레이트 웰에 넣고 10배 농축된 히스톤 탈아세틸화 효소8 분석 용액 10 μL 와 히스톤 탈아세틸화 효소8 형광 기질 5 μL 를 각 웰에 첨가한 다음 혼합물을 실온에 30분간 두었다. 10 μL 의 라이신 현상액을 첨가하고, 마이크로 플레이트 판독기(Infinite® 200 PRO, Tecan, 시스트레스, 마네돌프, 스위스)를 사용하여 380/500 nm에서 탈아세틸화된 라이신을 측정하였다. 측정값은 시그마 플롯(Systat Software, Inc., 산호세, 캘리포니아주, 미국)을 사용하여 분석하였다.

2.5 정량적 실시간 중합효소연쇄반응 실험:

신장과 간 용해물에서 PureHelix RNA 추출 용액(나노헬릭스, inc., 대

전, 한국)을 사용하여 RNA를 추출하였다. DiaStar RT 키트(솔젠트, Inc., 대전, 한국)를 사용하여 RNA 1 μg 으로부터 cDNA를 합성하였다. LightCycler 480 SYBR Green I Master mix 10 μL 와 프라이머를 0.5 μL 씩 넣고 DNA 5 μL 를 템플릿에 넣었다. LightCycler 기계(LightCycler® 96 Instrument, Roche Applied Sciences, 바젤, 스위스)를 사용하여 안지오텐 시노겐, 안지오텐신 II 타입1 수용체, 히스톤 탈아세틸화 효소8, 인터류킨 6, 단백질 화학 유인 단백질1, 알파형 나트륨 칼륨 펌프, 베타형 나트륨 칼륨 펌프, 감마형 나트륨 칼륨 펌프, 염화나트륨 공동수송체, 나트륨 수소 교환체3, 나트륨 칼륨 클로라이드 공동수송체, 레닌, 종양괴사인자 알파의 mRNA 발현을 정량적 실시간 중합효소연쇄반응(qRT-PCR)으로 측정하였다. 실험에 사용한 프라이머는 www.IDTDNA.com.에서 PrimerQuest 소프트웨어를 사용하여 디자인하였다(Table 1).

2.6 안지오텐신 II 효소 면역 분석법:

안지오텐신 II 효소 면역 분석 키트(EK-002-12CE, Phoenix Pharmaceutical, Inc., 벨링게임, 캘리포니아주, 미국)를 사용하여 제조업체의 설명에 따라 혈청 안지오텐신 II 농도를 측정하였다. 미리 코팅된 면역 플레이트에 쥐 혈청 50 μL 를 넣고 1차 항체를 25 μL , 2차 항체인 비오티닐화된 펩타이드를 25 μL 로 혼합하고 혼합물을 실온에서 2시간 동안 배양하였다. 배양 후 플레이트를 세척하고 100 μL 의 streptavidin-horseradish peroxidase 용액을 첨가하여 혼합물을 실온에서 1시간 동안 두었다. 플레이트를 세척한 후, 100 μL 의 3,3', 5,5'- 테트라메틸벤지딘 기질을 첨가하고 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응을 종료하기 위해 2 N 염산 100 μL 를 첨가하고 450 nm에서의 광학 밀도를 마이크로 플레이트 판독기(Infinite® 200 PRO, Tecan, 시스트레스, 마네돌프, 스위스)를 사용하여 측정하였다. 시그마 플롯(Systat Software, Inc., 산호세, 캘리포니아주, 미국)을 사용하여 혈청 안지오텐신 II 농도를 분석하였다.

2.7 통계 분석:

본 연구에서는 실험 결과를 평균 \pm SE로 표시하고 Mann-Whitney U 테스트(Graph Pad Prism 5.0 software)를 사용하여 평가하였다. p 값이 < 0.05 일 때 군 간에 통계적으로 유의한 차이가 있다고 간주하였다.

Table 1. List of Mouse Primers for Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction

Primer	Sequence	
18s rRNA	F: GTAACCCGTTGAACCCCAT	R: CCATCCAATCGGTAGTAGCG
Angiotensinogen	F: CTCGAACTCAAAGCAGGAGAG	R: GTAGATGGCGAACAGGAAGG
AT1R	F: TGCCATAACCATCTGCATAG	R: TTTCAGGAGCTGGAGGAAATAC
HDAC8	F: AGTGCCTGATTGACGGGAAGTGTA	R: CGGTCAAATTTCCGTCGCAATCGT
IL6	F: GTAACCCGTTGAACCCCAT	R: CCATCCAATCGGTAGTAGCG
MCP1	F: GTAACCCGTTGAACCCCAT	R: CCATCCAATCGGTAGTAGCG
NaK ATPase α	F: CCTATTCTTAAGCGGGCAGTAG	R: TTGCTGTATTTCTCCCTCATCTC
NaK ATPase β	F: CTGGAGACTTACCCACTGATG	R: CTATGTTCCCGACTTTATCCTTATCT
NaK ATPase γ	F: GGACAGAGAATCCCTTCGAGTA	R: CCCACAGCGGAACCTTT
NCC	F: GGTGGAAGACCACATCAAGAA	R: AGGCTTAGGTTCTGGGTAAATGC
NHE3	F: AGCTAGGCATCAACCAGAATAA	R: TCCATAGGCAGTTTCCATTAG
NKCC	F: GGCTGGATCAAGGGTGTATTAG	R: TTACGACGACAGAGACCTAT
Renin	F: GAACGAATCCCGCTCAAGAA	R: AGGAAGGCCTCTTTGTGAATAC
TNF α	F: GTAACCCGTTGAACCCCAT	R: GTAACCCGTTGAACCCCAT

AT1R: angiotensin II type1 receptor; F: forward; HDAC8: histone deacetylase8; IL6: Interleukin6; MCP1: Monocyte chemoattractant protein1; NCC: Na-Cl cotransporter; NHE3: Sodium-hydrogen antiporter3; NKCC: Na-K-Cl cotransporter; R: reverse; TNF α : tumor necrosis factor α .

3. 성적

3.1 고지방식이 섭취 군의 체중 및 혈압 상승:

9주령의 C57BL/6 쥐를 무작위로 두 군으로 나누고 12주 동안 일반식이 또는 고지방식을 공급하였다. 식이 공급 전 두 군 간의 체중과 혈압은 차이가 없었다. 12주 동안 다른 식이를 섭취한 후 두 군 모두 체중이 증가하였으며 고지방식이군의 경우 일반식이군보다 체중이 증가하였다. 일반식이군의 체중은 24.0 ± 0.8 g에서 30.1 ± 0.6 g, 고지방식이군의 체중은 22.6 ± 1.0 g에서 39.3 ± 0.8 g로 증가하였다($p < 0.001$ 일반식이군 vs 고지방식이군)(Figure 1a). 일반식이군의 경우 수축기 혈압은 119.7 ± 2.8 mmHg와 120.5 ± 2.2 mmHg로 변화가 없었지만, 고지방식이군은 수축기 혈압이 121.0 ± 1.9 mmHg에서 145.6 ± 2.2 mmHg로 상승하였다($p < 0.001$, 일반식이군 vs 고지방식이군)(Figure 1b). 일반식이군의 경우 이완기 혈압은 89.5 ± 3.7 mmHg와 93.0 ± 2.2 mmHg로 변화가 없었지만, 고지방식이군은 이완기 혈압이 95.2 ± 1.8 mmHg에서 114.2 ± 3.3 mmHg로 상승하였다($p < 0.001$, 일반식이군 vs 고지방식이군)(Figure 1c).

3.2 고지방식에 의해 유도된 고혈압에서 PCI34051의 혈압 강하 효과:

고지방식에 의한 고혈압에 대한 PCI34051의 효과를 조사하기 위해 각 식이 군에 생리식염수 또는 PCI34051을 하루에 한 번 복강 내 주사로 체중 kg당 0.5 mg을 12일 동안 투여하였다. 일반식이를 섭취한 쥐의 혈압은 PCI34051에 의해 변화하지 않았다(Figure 2a-b). 고지방식이 쥐의 경우 대

조군은 높은 수축기 및 이완기 혈압을 유지했지만, PCI34051을 투여하였을 경우 수축기 및 이완기 혈압이 정상 수준으로 낮아졌다(수축기 혈압: 145.6 ± 2.2 mmHg에서 124.4 ± 0.9 mmHg로 강하, 이완기 혈압: 114.2 ± 3.3 mmHg에서 96.1 ± 1.7 mmHg로 강하)($p < 0.001$ 고지방식이-대조군 vs 고지방식이-PCI34051 투여군)(Figure 2a-b). 일반식이 및 고지방식을 섭취한 쥐의 체중은 PCI34051 투여로 인해 변하지 않았다(Figure 2c).

3.3 고지방식이 섭취와 PCI34051 투여로 인한 히스톤 탈아세틸화 효소8 활성도 변화:

쥐의 신장에서 히스톤 탈아세틸화 효소8의 활성은 일반식이군보다 고지방식이군에서 1.3 ± 0.1 배 더 높았다($p < 0.05$ 일반식이-대조군 vs 고지방식이-대조군). 고지방식이군에 PCI34051을 투여하였을 때 신장에서의 히스톤 탈아세틸화 효소8의 활성이 일반식이군 수준으로 감소하였다(1.0 ± 0.0 배)($p < 0.01$ 고지방식이-대조군 vs 고지방식이-PCI34051 투여군)(Figure 3a). 일반식이군에서는 PCI34051의 투여가 히스톤 탈아세틸화 효소8의 활성에 영향을 미치지 않았다. 간에서 히스톤 탈아세틸화 효소8의 활성도는 대조군과 고지방식이군 간 유의적 차이가 없었다(Figure 3b).

3.4 PCI34051 투여에 의한 쥐의 간과 신장에서의 레닌-안지오텐신 시스템 발현 감소:

안지오텐시노젠 mRNA 발현은 간에서 일반식이군(1.0 ± 0.1 배)보다 고지방식이군(1.6 ± 0.0 배)에서 더 높았고($p < 0.01$ 일반식이-대조군 vs 고지방식이-대조군) PCI34051 투여 시 정상 수준으로 감소하였다($p < 0.01$ 고지방식이-대조군 vs 고지방식이-PCI34051 투여군)(Figure 4a). 안지오텐시노젠은 신장에서도 일반식이군(1.0 ± 0.0 배)보다 고지방식이군에서 1.8 ± 0.0 배 증가하였다($p < 0.01$ 일반식이-대조군 vs 고지방식이-대조군). 고지방식이군에

PCI34051을 투여 하였을 때 신장의 안지오텐시노겐 mRNA 발현이 1.3 ± 0.0 배 수준으로 감소하였다($p < 0.01$ 고지방식이-대조군 vs 고지방식이-PCI34051 투여군)(Figure 4b). 신장의 레닌 mRNA 발현은 일반식이군(1.0 ± 0.1 배)보다 고지방식이군에서 1.2 ± 0.2 배 증가하였으나 변화 폭이 작았다($p < 0.05$ 일반식이-대조군 vs 고지방식이-대조군). PCI34051 투여 시 고지방식이군의 레닌 mRNA 발현이 신장에서 정상 수준으로(1.0 ± 0.1 배) 감소하였다($p < 0.05$ 고지방식이-대조군 vs 고지방식이-PCI34051 투여군)(Figure 4c). 안지오텐신 II 타입1 수용체의 mRNA 발현은 신장에서 일반식이군(1.0 ± 0.0 배)보다 고지방식이군에서 1.2 ± 0.1 배 증가하였으나 변화 폭이 작았다($p < 0.05$ 일반식이-대조군 vs 고지방식이-대조군). PCI34051 투여 시 고지방식이군의 안지오텐신 II 타입1 수용체의 mRNA 발현이 신장에서 정상 수준으로(0.9 ± 0.0 배) 감소하였다($p < 0.01$ 고지방식이-대조군 vs 고지방식이-PCI34051 투여군)(Figure 4d).

3.5 PCI34051 투여에 따른 쥐의 혈청에서의 안지오텐신 II 농도 감소:

혈청 안지오텐신 II 농도는 일반식이군보다 고지방식이군에서 4.8 ± 0.5 배 높았다($p < 0.01$ 일반식이-대조군 vs 고지방식이-대조군). PCI34051 투여는 고지방식이군의 혈청 안지오텐신 II를 2.3 ± 0.6 배 수준으로 감소시켰다($p < 0.01$ 고지방식이-대조군 vs 고지방식이-PCI34051 투여군)(Figure 5).

3.6 PCI34051 투여에 따른 신장에서의 나트륨 수송체 발현 감소:

나트륨 수소 교환체3 mRNA 발현은 신장에서 일반식이군(1.0 ± 0.1 배)

과 고지방식이군(1.0 ± 0.1 배) 사이에 차이가 없었다. 그러나 고지방식이군에 PCI34051 투여 시 나트륨 수소 교환체3의 mRNA 발현이 0.6 ± 0.0 배로 감소하였다($p < 0.01$ 고지방식이-대조군 vs 고지방식이-PCI34051 투여군)(Figure 5a). 또한 나트륨 칼륨 클로라이드 공동수송체의 mRNA 발현이 신장에서 일반식이군보다 고지방식이군에서 1.7 ± 0.1 배 증가하였다($p < 0.01$ 일반식이-대조군 vs 고지방식이-대조군). 고지방식이군에 PCI34051을 투여하였을 때 나트륨 칼륨 클로라이드 공동수송체 mRNA 발현이 일반식이 수준으로 1.1 ± 0.0 배 감소하였다($p < 0.01$ 고지방식이-대조군 vs 고지방식이-PCI34051 투여군)(Figure 5b). 신장의 염화나트륨 공동수송체의 mRNA 발현은 일반식이군보다 고지방식이군에서 1.6 ± 0.2 배 증가하였고($p < 0.01$ 일반식이-대조군 vs 고지방식이-대조군) PCI34051 투여 시 감소하였다(0.7 ± 0.0 배)($p < 0.01$ 고지방식이-대조군 vs 고지방식이-PCI34051 투여군)(Figure 5c). 신장에서 알파형 나트륨 칼륨 펌프의 mRNA 발현은 일반식이군보다 고지방식이군에서 1.8 ± 0.2 배 증가하였다($p < 0.05$ 일반식이-대조군 vs 고지방식이-대조군). 고지방식이군에 PCI34051 투여 시 알파형 나트륨 칼륨 펌프의 mRNA 발현이 일반식이 수준으로 감소하였다(0.9 ± 0.1 배)($p < 0.01$ 고지방식이-대조군 vs 고지방식이-PCI34051 투여군)(Figure 5d). 베타형 나트륨 칼륨 펌프의 mRNA 발현은 일반식이군보다 고지방식이군(1.2 ± 0.1 배)에서 유의적으로 증가하였으나 변화 폭이 작았다($p < 0.05$ 일반식이-대조군 vs 고지방식이-대조군). 고지방식이군에 PCI34051 투여 시 베타형 나트륨 칼륨 펌프의 mRNA 발현이 감소하였다(0.6 ± 0.1 배)($p < 0.01$ 고지방식이-대조군 vs 고지방식이-PCI34051 투여군)($p < 0.01$ 일반식이-PCI34051 투여군 vs 고지방식이-PCI34051 투여군)(Figure 5e). 신장에서의 감마형 나트륨 칼륨 펌프 mRNA의 발현은 일반식이군보다 고지방식이군에서 1.3 ± 0.0 배 증가하였고($p < 0.05$ 일반식이-대조군 vs 고지방식이-대조군) PCI34051을 투여하였을 때 0.8 ± 0.2 배 수준으로 감소하였다($p < 0.01$ 고지방식이-대조군 vs 고지방식이-PCI34051 투여군)(Figure 5f).

3.7 PCI34051 투여에 의한 쥐 신장의 염증성 사이토카인 발현 억제:

신장에서 단핵구 화학 유인 단백질1 mRNA 발현은 일반식이군보다 고지방식이군에서 1.6 ± 0.3 배 증가하였다($p < 0.05$ 일반식이-대조군 vs 고지방식이-대조군). 고지방식이군에 PCI34051을 투여하였을 때 단핵구 화학 유인 단백질1 mRNA 발현이 0.7 ± 0.2 배 수준으로 감소하였다($p < 0.05$ 고지방식이-대조군 vs 고지방식이-PCI34051 투여군)(Figure 7a). 신장의 인터류킨6의 mRNA 발현은 일반식이군과 고지방식이군을 비교하였을 때 차이가 없었다. 그러나 고지방식이군에 PCI34051 투여 하였을 때 인터류킨6의 mRNA 발현이 0.5 ± 0.1 배 수준으로 감소하였다($p < 0.05$ 고지방식이-대조군 vs 고지방식이-PCI34051 투여군)(Figure 7b). 종양괴사인자 알파 mRNA의 발현은 신장에서 일반식이군보다 고지방식이군에서 2.6 ± 0.2 배 증가하였고($p < 0.01$ 일반식이-대조군 vs 고지방식이-대조군) 고지방식이군에 PCI34051 투여 시 감소하였다(1.2 ± 0.1 배)($p < 0.01$ 고지방식이-대조군 vs 고지방식이-PCI34051 투여군)(Figure 7c).

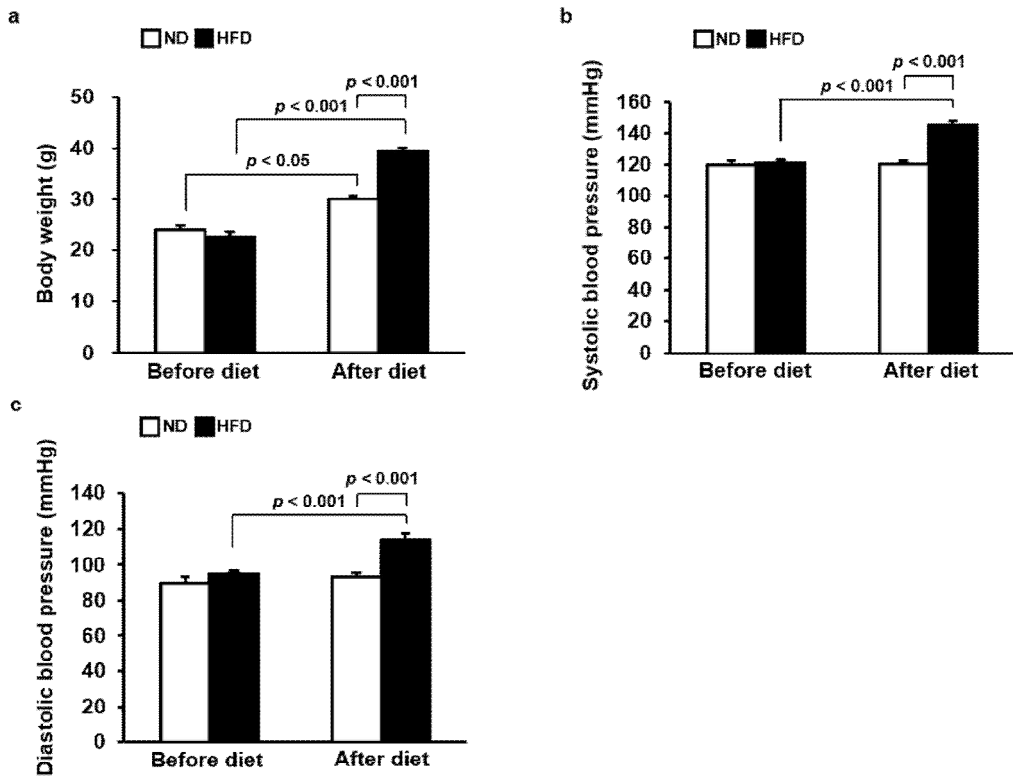


Figure 1. Increased body weight and raised blood pressure by high-fat diet. Graphs summarize body weight (a), systolic BP (b) and diastolic BP (c). BP was measured by using the tail-cuff method. Body weight (a), systolic BP (b), and diastolic BP (c) were increased by HFD. Results are expressed as the mean \pm SE (n = 3). BP: blood pressure; HFD: high-fat diet; ND: normal diet.

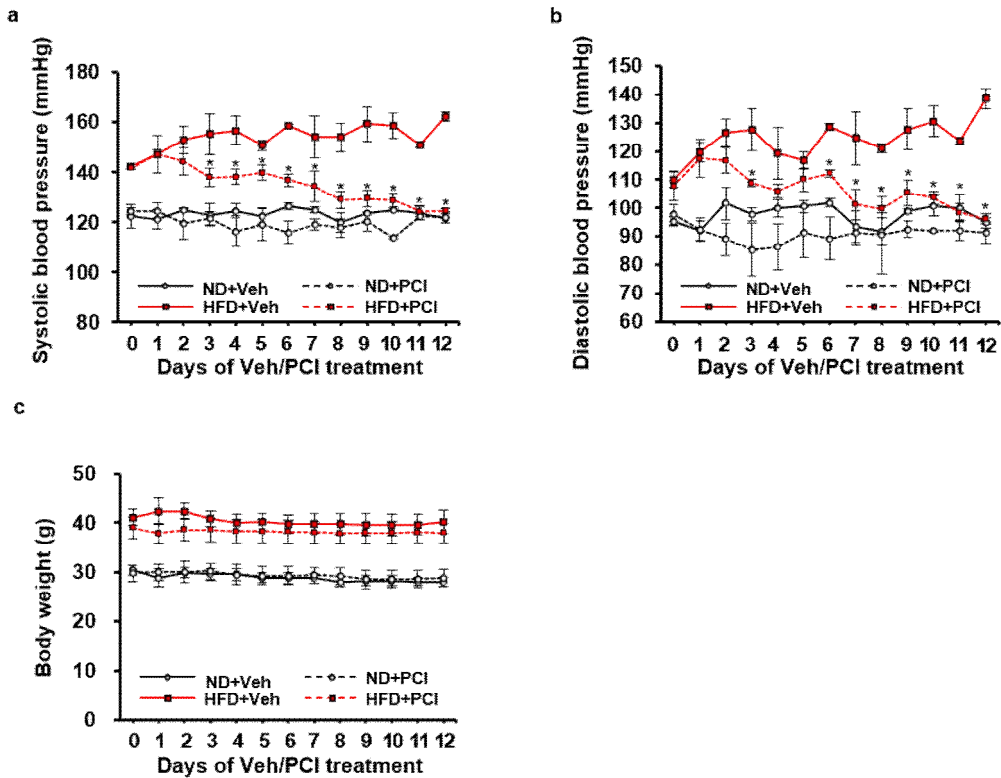


Figure 2. Altered blood pressure by treatment of PCI34051. Graphs summarize systolic BP (a), diastolic BP (b), and body weight (c) in groups of ND with Veh, ND with PCI34051, HFD with Veh, and HFD with PCI34051. Treatment with PCI34051 lowered BP in the HFD-fed group. Results are expressed as the mean \pm SE (n = 3). * p < 0.05 HFD-vehicle vs HFD-PCI34051. BP: blood pressure; HFD: high-fat diet; ND: normal diet; PCI: PCI34051; Veh: vehicle.

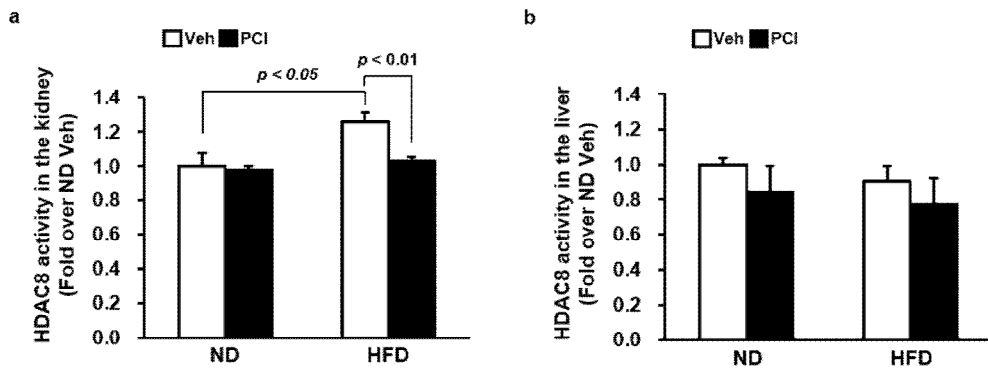


Figure 3. Alteration of HDAC8 activity in the kidney by treatment of high-fat diet and PCI34051. Graphs summarize HDAC8 activity in the kidney (a) and liver (b). Results are expressed as the mean \pm SE (n = 3). HDAC8: histone deacetylase8; HFD: high-fat diet; ND: normal diet; PCI: PCI34051; Veh: vehicle.

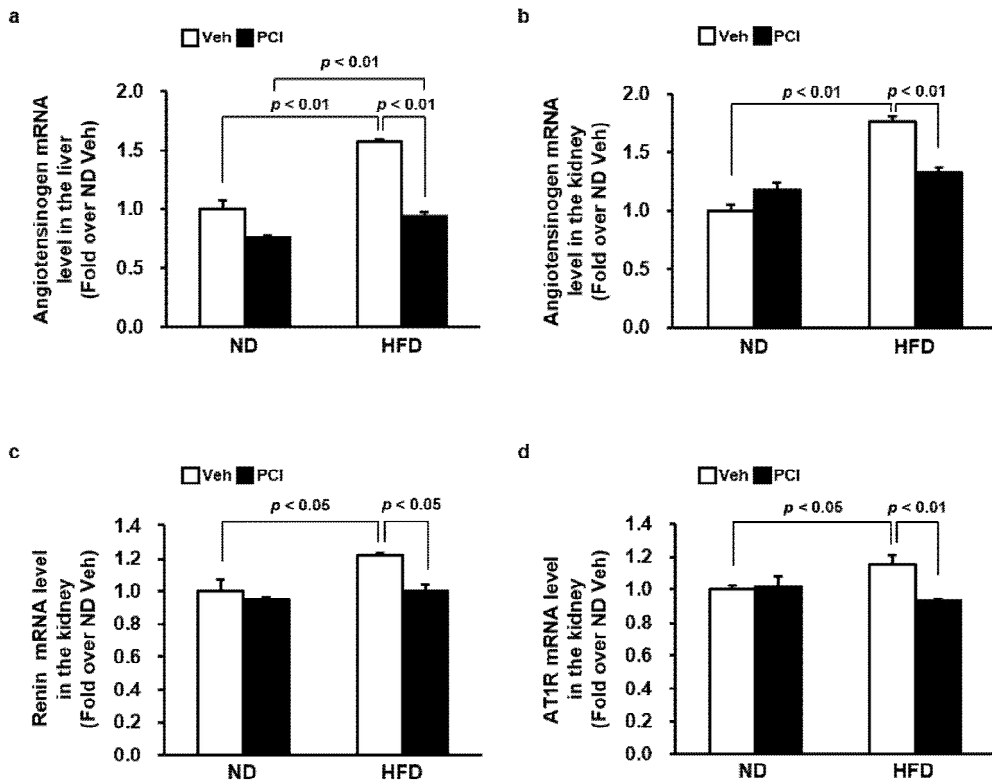


Figure 4. Alteration of the renin-angiotensin system components in the liver and kidney by treatment of high-fat diet and PCI34051. Graphs summarize mRNA expression of angiotensinogen in the liver (a), mRNA expressions of angiotensinogen (b), renin (c), and AT1R (d) in the kidney. Results are expressed as the mean \pm SE (n = 3). Ang II: angiotensin II; AT1R: angiotensin II type1 receptor; HFD: high-fat diet; ND: normal diet; PCI: PCI34051; Veh: vehicle.

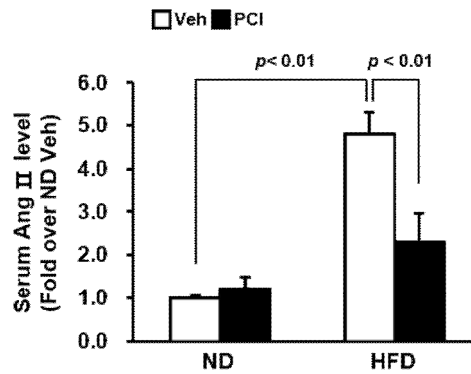


Figure 5. Alteration of the angiotensin II in the serum by treatment of high-fat diet and PCI34051. Graphs summarize of angiotensin II level in the serum. Results are expressed as the mean \pm SE (n = 3). Ang II: angiotensin II; HFD: high-fat diet; ND: normal diet; PCI: PCI34051; Veh: vehicle.

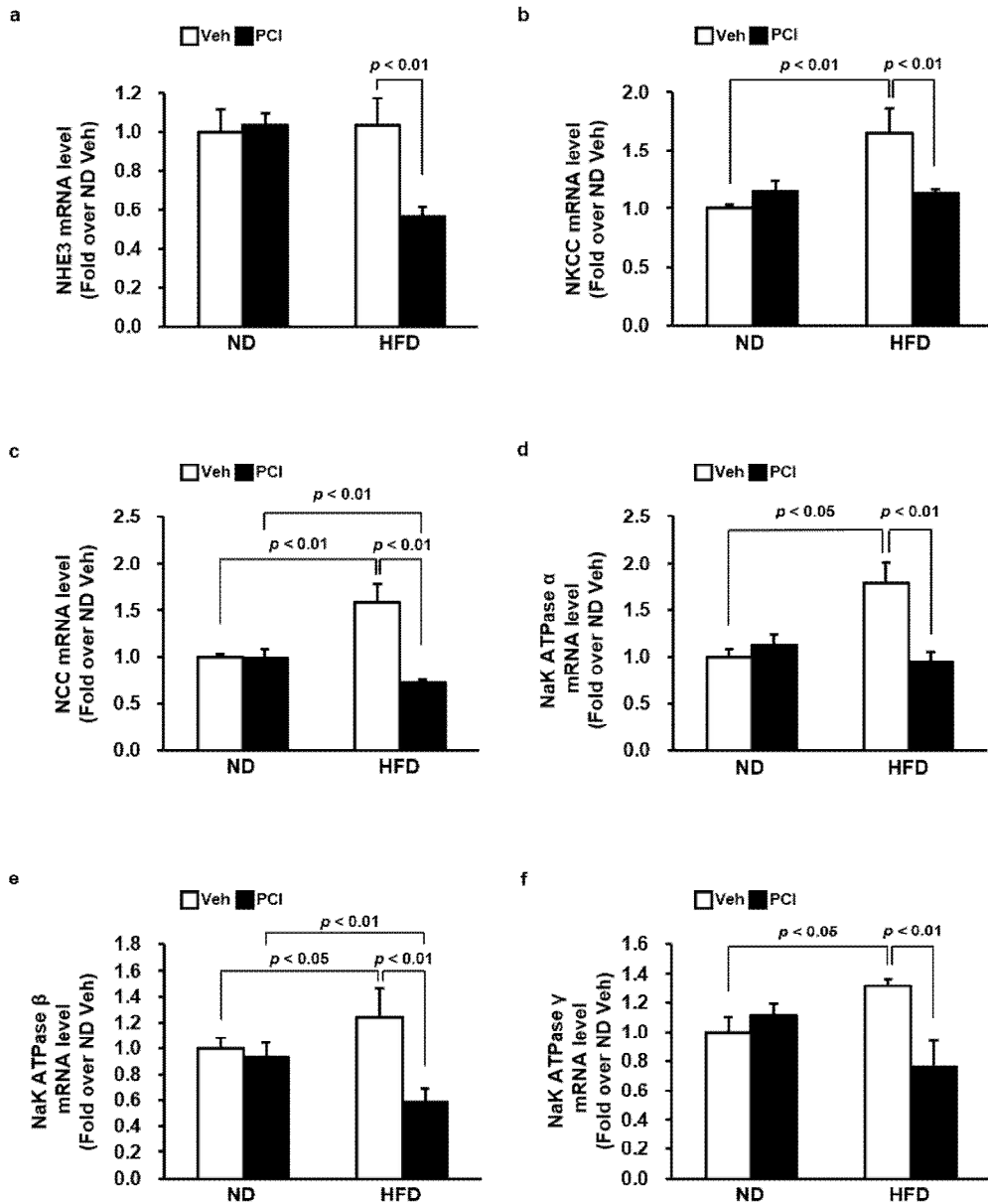


Figure 6. Alteration of sodium transporters in the kidney by treatment of high-fat diet and PCI34051. Graphs summarize mRNA expressions of NHE3 (a), NKCC (b), NCC (c), NaK ATPase α (d), NaK ATPase β (e), and NaK ATPase γ (f) in the

kidney. Results are expressed as the mean \pm SE (n = 3).
HFD: high-fat diet; NCC: Na-Cl cotransporter; ND: normal
diet; NHE3: sodium-hydrogen antiporter3; NKCC: Na-K-Cl
cotransporter; PCI: PCI34051; Veh: vehicle.

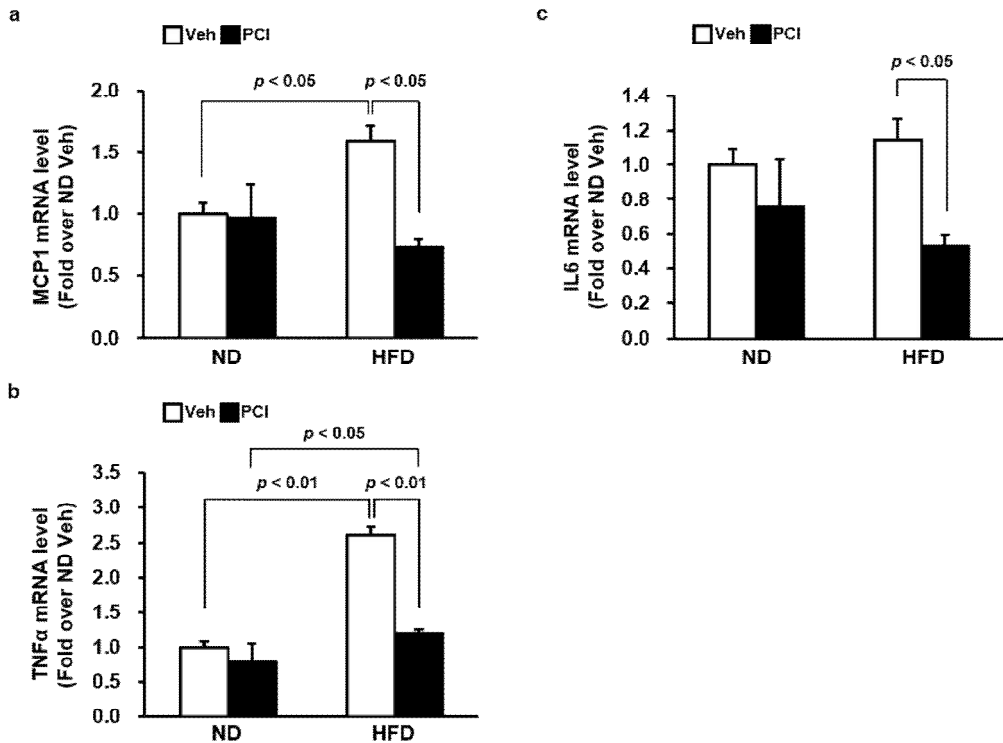


Figure 7. Alteration of inflammatory cytokines in the kidney by treatment of high-fat diet and PCI34051. Graphs summarize mRNA expression of MCP1 (a), IL6 (b), and TNF α (c) in the kidney. Results are expressed as the mean \pm SE (n = 3). HFD: high-fat diet; IL6: interleukin6; MCP1: monocyte chemoattractant protein1; ND: normal diet; PCI: PCI34051; TNF α : tumor necrosis factor α ; Veh: vehicle.

4. 고 찰

연구자는 본 연구를 통하여 고지방식이로 유발된 고혈압 모델 쥐에서 히스톤 탈아세틸화 효소8 억제제인 PCI34051이 고혈압 치료에 유용한 역할을 할 수 있으며 그 주요한 표적이 레닌-안지오텐신 시스템을 확인하였다. PCI34051은 T세포림프종에서 세포 사멸을 유도하여 치료 효과를 가지고 (10) 소아 신경모세포종에서는 신경모세포종의 분화를 유도하여 모세포종 분화 요법의 잠재적인 약물로서의 가능성이 제시되었다(11). 히스톤 탈아세틸화 효소8을 억제하였을 때 기생충 및 바이러스 감염도 감소되는 것으로 알려져 있다(12, 13). 최근에는 심혈관 질환에서도 히스톤 탈아세틸화 효소8에 대한 연구가 활발하게 이루어지고 있다.

본 연구 그룹의 선행 연구에 따르면 광범위 히스톤 탈아세틸화 효소 억제제인 발프로산과 CG200745가 신장에서 안지오텐시노겐과 그 수용체들을 감소시켜 고지방식이로 인한 고혈압을 개선하였다(14, 15). 이는 고지방식이로 유도된 고혈압 모델에서 히스톤 탈아세틸화 효소의 활성이 증가하였으며 히스톤 탈아세틸화 효소 억제제 투여로 고혈압이 개선됨을 설명하였다. 본 연구에서도 고지방식이로 유도된 고혈압 쥐의 신장에서 히스톤 탈아세틸화 효소8의 활성도를 확인하였을 때 고지방식이 섭취 후 히스톤 탈아세틸화 효소8의 활성이 증가하였으며 PCI34051을 투여하였을 때 활성이 감소하였다. PCI34051 투여에 의해 레닌-안지오텐신 시스템 구성 성분의 발현이 감소하였으며 이에 따라 혈압이 정상 수준으로 강하하여 유지되는 결과를 바탕으로 히스톤 탈아세틸화 효소8 억제제가 고혈압을 개선시키는 데 중요한 치료제로 사용될 수 있음을 알 수 있었다.

고지방식이에 의한 고혈압 발생의 중요한 기전은 레닌-안지오텐신 시스템의 활성화이다. 고지방식이를 섭취하면 염증성 사이토카인이나 나트륨 수송체가 증가하거나(16), 지방 조직으로 인한 신장의 기계적 압박이 가해져 레닌-안지오텐신 시스템이 활성화된다(17). 고지방식이를 장기 섭취한 고혈압 모델로 진행된 연구를 통해 안지오텐신 전환 효소 및 알도스테론

발현이 증가함으로써 심장 염증 유발과 심장 비대 및 섬유증 진행에 영향을 미칠 수 있다고 보고되었다(18). 본 연구에서도 고지방식이에 의한 고혈압 모델에서 간과 신장에서 안지오텐시노겐 발현과 신장에서 레닌, 안지오텐신 II 타입1 수용체의 mRNA 발현, 그리고 혈청 안지오텐신 II 농도가 증가하였고 PCI34051을 투여하였을 때 이들이 유의적으로 감소함을 확인하였다.

신장 근위세뇨관의 안지오텐신 II 타입1 수용체를 통한 안지오텐신 II 신호 전달은 혈압과 나트륨 항상성의 주요 조절자로, 레닌-안지오텐신 시스템의 활성화가 나트륨 재흡수를 증가시킨다고 보고되었다(19). 인간 근위세뇨관에서 안지오텐신 II는 용량 의존적으로 중탄산나트륨 공동수송체를 활성화 시키고, 그 결과 근위세뇨관에서 나트륨 재흡수가 증가하여 고혈압이 유발되었다(20). 히스톤 탈아세틸화 효소는 신장에서 단백질 인산화효소C 및 단백질 키나아제A를 활성화시킴으로써 나트륨 수송체가 활성화된다(21). 본 연구에서 고지방식을 섭취한 군에서 나트륨 수송체를 조사한 결과 나트륨 칼륨 클로라이드 공동수송체, 염화나트륨 공동수송체, 알파형 나트륨 칼륨 펌프, 베타형 나트륨 칼륨 펌프, 감마형 나트륨 칼륨 펌프의 발현이 증가하였고 PCI34051을 투여하였을 때 유의적으로 감소함을 확인하였다.

염증성 사이토카인은 신장 내 손상으로 인해 고혈압을 유발할 뿐만 아니라 신장에서 레닌-안지오텐신 시스템 생산을 증가시키거나(22) 나트륨 칼륨 클로라이드 공동수송체 및 염화나트륨 공동수송체의 활성을 증가 시켜 고혈압을 유발한다(16). 본 연구에서는 단핵구 화학 유인 단백질1과 종양 괴사인자 알파의 mRNA 발현이 고지방식이군에서 높아지고 PCI34051 투여시 유의적으로 감소함을 확인하였다.

PCI34051은 암의 치료 효과를 확인하는 연구에 주로 이용되어 왔으며 최근에는 다양한 질병에서의 치료 효과도 보고되었다. 흑색종 항암 치료 연구에서 PCI34051을 40 mg/kg을 투여하였을 때 치료 가능성이 제시되었고(23) 안지오텐신 II로 유도된 고혈압 모델에서는 3 mg/kg을 투여하였을 때 고혈압이 개선되는 효과가 확인되었다(9). 무린 천식 모델을 사용한 연구

에서는 0.5 mg/kg을 투여하였을 때 만성 알레르기 기도 질환에서 염증, 기도 재형성 및 기도 과민반응을 줄일 수 있음이 확인되었다(24). 본 연구에서는 PCI34051의 치료 효과를 확인한 연구 중 가장 낮은 농도인 0.5 mg/kg을 복강 내 주사로 12일 동안 투여하였으며 그 결과 고지방식이군의 혈압이 정상 수준으로 강하하고 유지됐지만 일반식이군의 혈압 강하는 관찰되지 않았다. 레닌-안지오텐신 시스템, 나트륨 수송체, 그리고 염증성 사이토카인도 고지방식이군에서 증가하였고 PCI34051을 투여하였을 때 감소되었으나 일반식이-대조군과 일반식이-PCI34051 투여군 간에는 유의적인 차이가 나지 않는 것을 확인함으로써 일반식이군에는 영향을 미치지 않는 용량을 확인하였다. 이 결과들을 종합하여, 본 연구자는 고지방식이에 의한 고혈압에 대한 치료제로서 히스톤 탈아세틸화 효소8 억제제 PCI34051의 사용 가능성을 제시하는 바이다.

5. 요약

본 연구에서는 고지방식이로 유도한 고혈압 쥐 모델에서 고혈압 치료제로서 히스톤 탈아세틸화 효소8 억제제인 PCI34051 약물의 역할을 확인하고 작용 기전을 규명하였다. 고지방식이 섭취에 의한 고혈압 쥐에 PCI34051을 복강 내 주사로 하루에 한 번 12일 동안 체중 kg당 0.5 mg을 투여 시 혈압이 정상 수준으로 회복되는 것을 확인하였다. 신장에서 히스톤 탈아세틸화 효소8의 활성도와 레닌-안지오텐신 시스템 구성 성분의 발현을 확인하였으며 일반식이군과 비교하였을 때 고지방식이군에서 이들이 높아졌으나 PCI34051 투여 시 감소함을 확인하였다. 나트륨 수송체 및 염증성 사이토카인 발현이 고지방식이군에서 증가하였고 PCI34051 투여 시 감소하였다. 이러한 연구 결과들을 통해 히스톤 탈아세틸화 효소8이 고혈압의 잠재적인 치료 표적이 될 수 있음을 제안한다.

참 고 문 헌

1. Polyzos SA, Kountouras J, Mantzoros CS: Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: From pathophysiology to therapeutics. *Metabolism* 2019; 92: 82-97.
2. Seravalle G, Grassi G: Obesity and hypertension. *Pharmacol Res* 2017; 122: 1-7.
3. Ramalingam L, Menikdiwela K, LeMieux M, Dufour JM, Kaur G, Kalupahana N et al.: The renin angiotensin system, oxidative stress and mitochondrial function in obesity and insulin resistance. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 2017; 1863(5): 1106-14.
4. Weir CB, Jan A: BMI classification percentile and cut off points. *StatPearls [Internet]* 2020 [cited 2020 July 10]. Available from: URL:<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK541070/>.
5. Lee WY, Kim YH, Nam GE, Kwon HS, Kim BY, Kim ES et al.: 2020 Obesity fact sheet web. KOSSO, Korean Society for The Study of Obesity. Version 2020. Korea, 2020.
6. Engin A: The definition and prevalence of obesity and metabolic syndrome. *Adv Exp Med Biol* 2017; 960: 1-17.

7. Kee HJ, Bae EH, Park S, Lee KE, Suh SH, Kim SW et al.: HDAC inhibition suppresses cardiac hypertrophy and fibrosis in DOCA-salt hypertensive rats via regulation of HDAC6/HDAC8 enzyme activity. *Kidney Blood Press Res* 2013; 37(4-5): 229-39.
8. Li RF, Cao SS, Fang WJ, Song Y, Luo XT, Wang HY et al.: Roles of HDAC2 and HDAC8 in cardiac remodeling in renovascular hypertensive rats and the effects of valproic acid sodium. *Pharmacology* 2017; 99(1-2): 27-39.
9. Kee HJ, Ryu Y, Seok YM, Choi SY, Sun S, Kim GR et al.: Selective inhibition of histone deacetylase8 improves vascular hypertrophy, relaxation, and inflammation in angiotensin II hypertensive mice. *Clin Hypertens* 2019; 25: 13.
10. Balasubramanian S, Ramos J, Luo W, Sirisawad M, Verner E, Buggy JJ: A novel histone deacetylase8 (HDAC8)-specific inhibitor PCI-34051 induces apoptosis in T-cell lymphomas. *Leukemia* 2008; 22(5): 1026-34.
11. Oehme I, Deubzer HE, Lodrini M, Milde T, Witt O. Targeting of HDAC8 and investigational inhibitors in neuroblastoma. *Expert Opin Investig Drugs* 2009; 18(11): 1605-17.
12. Marek M, Kannan S, Hauser AT, Mourao MM, Caby S, Cura V et al.: Structural basis for the inhibition of histone deacetylase8 (HDAC8), a key epigenetic player in the blood fluke *Schistosoma*

- mansoni. PLoS Pathog 2013; 9(9): e1003645.
13. Yamauchi Y, Boukari H, Banerjee I, Sbalzarini IF, Horvath P, Helenius A: Histone deacetylase8 is required for centrosome cohesion and influenza A virus entry. PLoS Pathog 2011; 7(10): e1002316.
 14. Choi J, Park S, Kwon TK, Sohn SI, Park KM, Kim JI: Role of the histone deacetylase inhibitor valproic acid in high-fat diet-induced hypertension via inhibition of HDAC1/angiotensin II axis. Int J Obes (Lond) 2017; 41: 1702-9.
 15. Yoon GE, Jung JK, Lee YH, Jang BC, Kim JI: Histone deacetylase inhibitor CG200745 ameliorates high-fat diet-induced hypertension via inhibition of angiotensin II production. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 2020; 393: 491-500.
 16. Norlander AE, Madhur MS: Inflammatory cytokines regulate renal sodium transporters: how, where, and why?. Am J Physiol Renal Physiol 2017; 313(2): F141-4.
 17. Fantin F, Giani A, Zoico E, Rossi AP, Mazzali G, Zamboni M: Weight Loss and Hypertension in obese subjects. Nutrients 2019; 11(7): 1667.
 18. Jin N, Wang Y, Liu L, Xue F, Jiang T, Xu M: Dysregulation of the renin-angiotensin system and cardiometabolic status in mice fed a long-term high-fat diet. Med Sci Monit 2019; 25: 6605-14.

19. Haaster MC, McDonough AA, Gurley SB: Blood pressure regulation by the angiotensin type 1 receptor in the proximal tubule. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2018; 27(1): 1-7.
20. Horita S, Nakamura M, Suzuki M, Satoh N, Suzuki A, Homma Y et al.: The role of renal proximal tubule transport in the regulation of blood pressure. *Kidney Res Clin Pract* 2017; 36(1): 12-21.
21. Muzi-Filho H, Jannuzzi LB, Bouzan ACS, Alves-Barros S, Alves-Bezerra DS, Pereira-Acacio A et al.: Histone Deacetylase Activity and the Renin-Angiotensin-Aldosterone System: Key Elements in Cardiorenal Alterations Provoked by Chronic Malnutrition in Male Adult Rats. *Cell Physiol Biochem* 2020; 54(6): 1143-62.
22. Satou R, Gonzalez-Villalobos RA, Miyata K, Ohashi N, Katsurada A, Navar LG et al.: Costimulation with angiotensin II and interleukin 6 augments angiotensinogen expression in cultured human renal proximal tubular cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008; 295(1): F283-9.
23. Wang YF, Liu F, Sherwin S, Farrelly M, Yan XG, Croft A et al.: Cooperativity of HOXA5 and STAT3 is critical for HDAC8 inhibition-mediated transcriptional activation of PD-L1 in human melanoma cells. *J Invest Dermatol* 2018; 138(4): 922-32.
24. Ren Y, Su X, Kong L, Li M, Zhao X, Yu N et al.: Therapeutic effects of histone deacetylase inhibitors in a murine asthma

model. Inflamm Res 2016; 65(12): 995-1008.

Effects and Underlying Mechanism of PCI34051 in obesity-induced hypertension

Jang, Yun Ju

Department of Molecular Medicine
Graduate School

Keimyung University

(Supervised by Professor Kim, Jee In)

(Abstract)

Obesity is one of the major diseases that increase the incidence of metabolic syndrome and complications such as hyperlipidemia, chronic kidney disease, cardiovascular disease, as well as hypertension. Especially obesity causes changes the renin-angiotensin system (RAS) in the kidney, which has a direct effect on the hypertension. Histone deacetylase8 (HDAC8) is one of class I Histone deacetylases and it regulates gene expression by acetylation. PCI34051 is the selective inhibitor of HDAC8. Nine-week-old male C57BL/6 mice were given normal diet or a high-fat diet for 12 weeks. After the high-fat diet group reached hypertension phase (140 mmHg or higher systolic blood pressure), physiological saline or PCI34051 was intraperitoneally injected (0.5 mg kg⁻¹ day⁻¹) for 12 days. The high-fat diet raised

blood pressure (BP) and accelerated increase in body weight. PCI34051 treatment lowered high-fat diet group's systolic and diastolic BPs to level of the normal diet group. A high-fat diet increased the RAS components and HDAC8 activity. It also increased expressions of sodium transporters and inflammatory cytokines in the kidney. PCI34051 also down-regulated the renal inflammation and expressions of RAS components and sodium transporters through inhibition of HDAC8 activity. I propose that HDAC8 may be a potential therapeutic target and PCI34051 could be used to treat obesity-induced hypertension.

PCI34051을 이용한 비만성 고혈압 치료 효과 및 기전

장 윤 주

계명대학교 대학원

의학과 분자의학 전공

(지도교수 김 지 인)

(초록)

비만은 고지혈증, 만성 신장 질환, 심혈관 질환 등의 대사 증후군 및 합병증 발병을 증가시키는 주요 질병 중 하나이다. 특히 비만은 신장에서 레닌-안지오텐신 시스템의 변화를 일으키고 이는 고혈압 유발에 직접적인 영향을 미친다. 히스톤 탈아세틸화 효소는 유전자의 발현을 조절하며, 히스톤 탈아세틸화 효소가 고혈압을 포함한 심장질환에서 중요한 역할을 한다는 사실이 밝혀지고 있다. 히스톤 탈아세틸화 효소8은 클래스 I에 속하며 PCI34051은 히스톤 탈아세틸화 효소8의 선택적 억제제이다. 본 연구에서는 PCI34051이 고지방식으로 유발된 고혈압에 미치는 영향을 확인하고 고혈압 유발 메커니즘을 조사하였다. 9주령 수컷 C57BL/6 쥐에게 12주 동안 일반식이 또는 고지방식이를 제공하고 고지방식이군이 고혈압 단계(140 mmHg 이상 수축기 혈압)에 도달한 후 생리식염수 또는 PCI34051을 복강 내 주사로 하루에 한 번 체중 kg당 0.5 mg을 12일 동안 투여하면서 체중과 혈압을

측정하였다. 12일 후 신장의 레닌-안지오텐신 시스템 성분의 발현, 나트륨 수송체의 발현, 염증성 사이토카인 그리고 혈청 안지오텐신 II 농도를 확인하였다. 일반식이군에서 혈압은 정상 수준을 유지하였으나 고지방식이군에 PCI34051 투여 시 수축기 및 이완기 혈압을 감소시켰다. 고지방식이는 신장에서 레닌-안지오텐신 시스템 발현과 히스톤 탈아세틸화 효소8의 활성을 증가시켰고 PCI34051 투여 시 레닌-안지오텐신 시스템의 발현 및 히스톤 탈아세틸화 효소8 활성을 감소시켰다. 또한, 신장에서 고지방식이는 나트륨 수송체의 발현 및 염증성 사이토카인을 증가시켰고 PCI34051 투여가 이를 감소시켰다. 본 연구자는 이 결과들을 토대로 히스톤 탈아세틸화 효소8이 고혈압의 잠재적인 치료 표적이 될 수 있으며 PCI34051이 비만성 고혈압 치료제로 사용될 수 있음을 제안한다.