

# 염 민감성 쥐에서 안지오텐신 II가 고혈압 면역 기전에 미치는 영향

†황보 미 향

계명문화대학교 식품영양조리학부 조교수

## The Effect of Angiotensin II on the Hypertension Immune Mechanism in Salt-Sensitive Rats

†Mi-Hyang Hwangbo

Assistant Professor, Dept. of Food Nutrition and Cookery, Keimyung College University, Daegu 42601, Korea

### Abstract

Hypertension caused by high-fat and high-salt diets is a well-known significant risk factor for cardiovascular and cerebrovascular diseases. In this study, to confirm the relationship between hypertension and immune cells, angiotensin (Ang) II was administered to Dahl salt-sensitive (SS) rats and Dahl salt-resistant (SR) rats. Then the expression of immune cells and the proinflammatory cytokines were compared between the SS and SR rats. It was observed that after administration of Ang II (50ng/kg/min) for three weeks, blood pressure was increased in the SS rats, but there was no significant change in the SR rats. In addition, the expression of T helper (Th) cells and Th 17 cells in the spleen and the expression of Th cell Ror $\gamma$ t and regulatory T regulatory (Treg) cells in the peripheral blood mononuclear cells did not show a significant difference between the two experimental groups even after the administration of Ang II. IL-1 $\beta$  expression was significantly increased in the kidney tissue of the SS rats, while there was no significant difference in the IL-6 expression in all the experimental groups. The results of this study suggest that Ang II induces hypertension by stimulating IL-1 $\beta$  secretion from renal macrophage in SS rats.

Key words: hypertension, angiotensin, immune system, Dahl salt-sensitive rats, cytokines

### 서 론

한국인들은 일반적으로 김치, 된장찌개, 젓갈 등 나트륨이 많이 함유된 음식을 접할 수 있는 환경에 쉽게 노출되어 있으며, 세계의 여러 국가에서 역학조사를 실시한 결과, 나트륨을 과잉 섭취하게 되면 혈관 내 혈액량을 증가시켜 혈압을 상승시키는 문제를 일으킬 수 있다(Pak 등 2015; Yun & Kim 2021). 특히 소금에 민감한 사람(Salt-sensitive; SS)이 고함량의 나트륨을 지속적으로 섭취하게 되면 연령이 높아짐에 따라 고혈압이 발병할 가능성이 매우 높아진다. 반면에 고함량의 나트륨의 지속적으로 섭취하게 되더라도 정상 혈압을 유지하는 소금 저항성(Salt-resistant; SR)인 사람도 존재한다(Weinberger 등 2001; Dahl LK 2005).

레닌-안지오텐신-알도스테론 시스템은 체액과 염분의 항

상성을 유지하는데 필수적인 시스템이다. 레닌의 분비는 신장의 세부 기관 중 원위 세뇨관의 상피세포에서 이루어지며, 간에서 유래한 안지오텐시노젠(angiotensinogen)의 펩타이드를 절단하여 안지오텐신 I(Ang I)을 생성한다. 그리고 안지오텐신 I은 폐에서 생성된 안지오텐신 전환 효소(Angiotensin-converting enzyme; ACE)에 의하여 펩타이드가 절단되어 안지오텐신 II(Ang II)가 생성된다(Lastra 등 2010; Schweda F 2015). 고염식이 적용이 되면, 이 안지오텐신 전환 효소가 더 활성화되면서 안지오텐신 II를 더 많이 생성하게 된다(Gonzalez 등 2018). 이렇게 생성된 안지오텐신 II는 안지오텐신 수용체 유형 I(Angiotensin II receptor type I; AT1R)의 활성화를 통해 동맥 혈관에서 직접적으로 혈관의 수축을 야기하여 혈압의 상승을 유도한다(Lastra 등 2010; Schweda F 2015). 이전 연구들에 의하면 고혈압 그리고 면역반응은

† Corresponding author: Mi-Hyang Hwangbo, Assistant Professor, Dept. of Food Nutrition and Cookery, Keimyung College University, Daegu 42601, Korea. Tel: +82-53-589-7822, Fax: +82-53-589-7821, E-mail: mhhwangbo@kmcu.ac.kr

매우 밀접한 관계에 있는 것으로 보인다(Park & Kang 2020). 고혈압과 관련한 염증성 사이토카인으로는 인터루킨-17(IL-17), 인터루킨-6(IL-6), 인터루킨-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ ) 등이 있다(Zhang 등 2022). 인터루킨-17은 천식, 건선, 전신성 홍반성 루푸스 등의 염증 관련 질환과 고혈압에 관여하고(Langley 등 2014; Basile 등 2021), 인터루킨-6은 고혈압 및 여러 만성 염증 반응에서 중요 역할을 하며(Li 등 2010; Ogata & Tanaka 2012), 인터루킨-1 $\beta$ 는 전 염증성 사이토카인의 유전자들을 상향 조절하여 고혈압의 진행을 악화시킬 수 있다(Krishnan 등 2019; Veiras 등 2022).

안지오텐신 II 또한 면역계를 활성화시켜 고혈압을 유도할 수 있다(Zhang 등 2021). 안지오텐신 II에 의하여 자극된 혈관의 내피세포와 평활근세포는 세포간 접착 분자(intercellular adhesion molecule; ICAM)와 E-selectin 등을 활성화시켜 면역세포들이 좀 더 잘 부착될 수 있도록 유도함으로써 면역 반응이 좀 더 강화된다(Jia 등 2018; Piqueras & Sanz 2020). 그리고 안지오텐신 II는 대식세포의 분극화 및 활성화에도 영향을 주어 안지오텐신 II는 안지오텐신 수용체 유형 I의 활성화를 통해 전염증성 대식세포인 M1 대식세포 표현형을 생성할 수 있으며, 안지오텐신 II는 M1 대식세포의 염증성 사이토카인과 케모카인의 방출을 촉진하여 더 많은 염증 반응을 촉진하게 된다(Zhang 등 2021).

이에 본 연구에서는 고혈압 발생에 면역세포의 관련성을 확인하기 위하여 달 소금 민감성 쥐와 달 소금 저항성 쥐에 안지오텐신 II를 투여하고, 두 쥐에서 면역세포 및 전 염증성 사이토카인의 발현을 상호 비교함으로써 고혈압 발생의 기전을 확인하고자 실시하였다.

## 연구대상 및 방법

### 1. 동물

동물실험은 실험동물의 수를 최소화하고 고통을 줄이는 방향으로 설계되었으며, 모든 동물 실험 절차는 미국 국립보건원의 실험동물 관리 및 사용 가이드라인을 준수하였다. 6주령의 건강한 수컷 달 소금 민감성 쥐(DIS/EisSlc; Dahl-Iwai S)와 소금 저항성 쥐(DIR/EisSlc; Dahl-Iwai R)를 일본 SLC (Hamamatsu, Shizoka, Japan)에서 구매하였다(n = 6/그룹). 쥐들은 1주 동안 환경에 적응시키고, tail-cuff 방식으로 혈압을 측정하는 방법에 1~2주 적응시켜 혈압이 정상 혈압으로 안정화 되었을 때, 안지오텐신 II(A9525, Sigma Aldrich, St. Louis, USA) 50 ng/kg/min을 3주 동안 작은 삼투압 펌프(Alzet Model 2002, Durect Co., CA, USA)를 쥐의 등 부분에 이식하여 투여했다. 3주 후에 모든 동물은 50 mg/kg의 소듐펜토바르비탈을 복강 내 주사로 투여하여 안락사한 후 수집된 혈청과 조

직 샘플은  $-80^{\circ}\text{C}$ 에서 보관하였다. 실험에 사용한 모든 그룹의 동물들은 희생하기 전까지 생존해 있었으며, 동물들이 자유롭게 사료와 수분 섭취를 하였다. 체중은 1주일 간격으로 혈압 측정 후에 확인하였다.

### 2. 혈압 측정

혈압 측정은 비침습적인 방법으로 측정이 가능한 Tail-cuff 방법으로 측정했다(CODA system, Kent Scientific Corporation, Torrington, USA). 쥐들은 보정틀 안에 넣어  $35^{\circ}\text{C}$ 로 설정 및 유지되는 온열 판에서 10분 동안 적응시킨 후, 혈압을 측정했다. 각 쥐의 평균 수축기 혈압은 최소 다섯 번 연속 측정된 값으로 계산하였다.

### 3. 유세포 분석

비장 세포는 쥐를 희생시켜 얻은 비장을  $40\ \mu\text{m}$  여과기로 걸러내어 얻었고, 말초 혈액 단핵 세포(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)는 쥐의 복대 정맥에서 혈액을 수집한 후, Ficoll-Paque Plus<sup>®</sup> gradient 시약(카탈로그 번호 17-1440-02; GE Healthcare, Chicago, IL, USA)위에 혈액을 쌓아 올렸다. 그리고 원심분리기를  $350\ \text{g}$ 으로 15분 설정하여 분리하였다. 비장 세포와 말초 혈액 단핵세포는 Fluorescein 5(6)-isothiocyanate(FITC)와 결합한 항-CD3(1:200, 카탈로그 번호 554832, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA)와 Phycoerythrin(PE)와 결합한 항-CD4(1:200, 카탈로그 번호 554838; BD Biosciences) 항체로 T 도움 세포를 표현하였다. T 조절 세포를 표지 하기 위해 Peridinin-chlorophyll-protein complex-Cyanine 5.5(PERCP-Cy 5.5)와 결합한 항-FOXP3항체(1:100, 카탈로그 번호 45-5773-82; ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA)와 T 도움 17 세포를 표지하기 위해 Allophycocyanine(APC)와 결합된 항-ROR $\gamma$ t 항체(1:100, 카탈로그 번호 NBP2-24451; Novus Biologicals, Centennial, CO, USA)를 사용하였다. 염색된 세포들은 유세포 분석기(FACS Calibur; BD Biosciences)를 사용하여 확인했으며, FlowJo 프로그램(BD Biosciences)을 이용하여 분석하였다.

### 4. 실시간 중합효소연쇄반응

비장과 신장 조직(약  $100\ \text{mg}$ )은 초음파 분쇄기를 통해 균질화시킬 후, QIAzol<sup>®</sup> Lysis Reagent(QIAGEN Science, Germantown, MD, USA)를 사용하여 제조사의 사용 설명서를 따라 RNA를 추출하였다. 추출된RNA는 RevertAid<sup>™</sup> First-Strand cDNA 합성 kit(Thermo Fisher Scientific)를 이용해 cDNA를 생성하였다. 그 후,  $2\ \mu\text{L}$ 의 물,  $2\ \mu\text{L}$ 의 cDNA,  $5\ \mu\text{L}$ 의 SYBR Green Master Mix(New England Biolabs, Ipswich, MA, USA), 그리고  $200\ \text{nmol/L}$ 의 프라이머를  $1\ \mu\text{L}$  혼합해 실시간 중합효소연쇄

반응기(Real-Time Quantitative Reverse Transcription PCR, RT-qPCR)을 QuantStudio 5(Thermofishers)에서 진행하였다. 실시간 중합효소연쇄반응의 조건은 50°C에서 2분, 95°C에서 10분, 그리고 95°C에서 15초, 60°C에서 1분 동안 40 사이클로 증폭시켜서 분석하였다. 사용한 프라이머 서열들은 Table 1에 명시하였다.

### 5. 통계적 분석

본 실험에서 나온 모든 데이터의 통계적인 분석은 GraphPad Prism 7(San Diego, CA, USA)을 이용하였다. 오차 막대는 평균±표준오차(standard error of the mean, SEM)를 나타내며,  $p < 0.05$ 를 통계적으로 유의미한 수준으로 간주하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. 안지오텐신 II 투여가 달 소금 민감성 쥐의 수축기 혈압에 미치는 영향

달 소금 민감성 쥐와 달 소금 저항성 쥐에서 안지오텐신 II를 투여했을 때 나타나는 혈압 변화를 관찰하기 위하여 작은 삼투압 펌프를 이용하여 3주간 50 ng/kg/min을 처리하였다. 그 결과, 달 소금 민감성 쥐는 수축기 혈압이 평균 약 120 mmHg에서 안지오텐신 II 처리 후 약 160 mmHg까지 증가하였음을 확인할 수 있었다( $p < 0.01$ ). 그러나 달 소금 저항성 쥐에게는 안지오텐신 II를 처리하더라도 혈압이 평균 120 mmHg 정도로 유지되는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 1A). 그러나 몸무게와 사료 및 음수량은 모든 그룹에서 유의미한 차이를 확인할 수 없었다(Fig. 1B~1D).

안지오텐신 II는 고혈압 연구를 위해 많이 사용되는 약물 중 하나로 고염식이 적용이 되면, 안지오텐신 전환 효소가 더 활성화되면서 안지오텐신 II를 더 많이 생성하게 된다(Gonzalez 등 2018). 안지오텐신 II는 내피 기능장애, 혈관 염증, 대동맥 리모델링과 같은 손상을 유도한다고 알려져 있다(Lerman 등 2019). 이전 연구에 의하면 4주 동안 안지오텐신 II 100 ng/kg/min을 달 소금 민감성 쥐와 달 소금 저항성 쥐에 투여했을 때, 두 그룹 모두 혈압이 상승하였으나, 이로 인한 신장의 손상은 달 소금 민감성 쥐에서 더 심하게 나타난 것으로 보고되었다(Wu 등 2016). 본 연구에서는 이전 보고된 용량보다 더 적은 용량의 안지오텐신 II(50 ng/kg/min)를 투여하여 달 소금 민감성 쥐와 달 소금 저항성 쥐에서 혈압 변화를 확인하고자 하였고, 그 결과 달 소금 민감성 쥐는 혈압이 증가하였으나, 달 소금 저항성 쥐에게는 혈압에 영향이 없었다. 이는 달 소금 민감성 쥐가 달 소금 저항성 쥐보다 고염식이 뿐만 아니라 안지오텐신 II에도 더 민감하다는 것

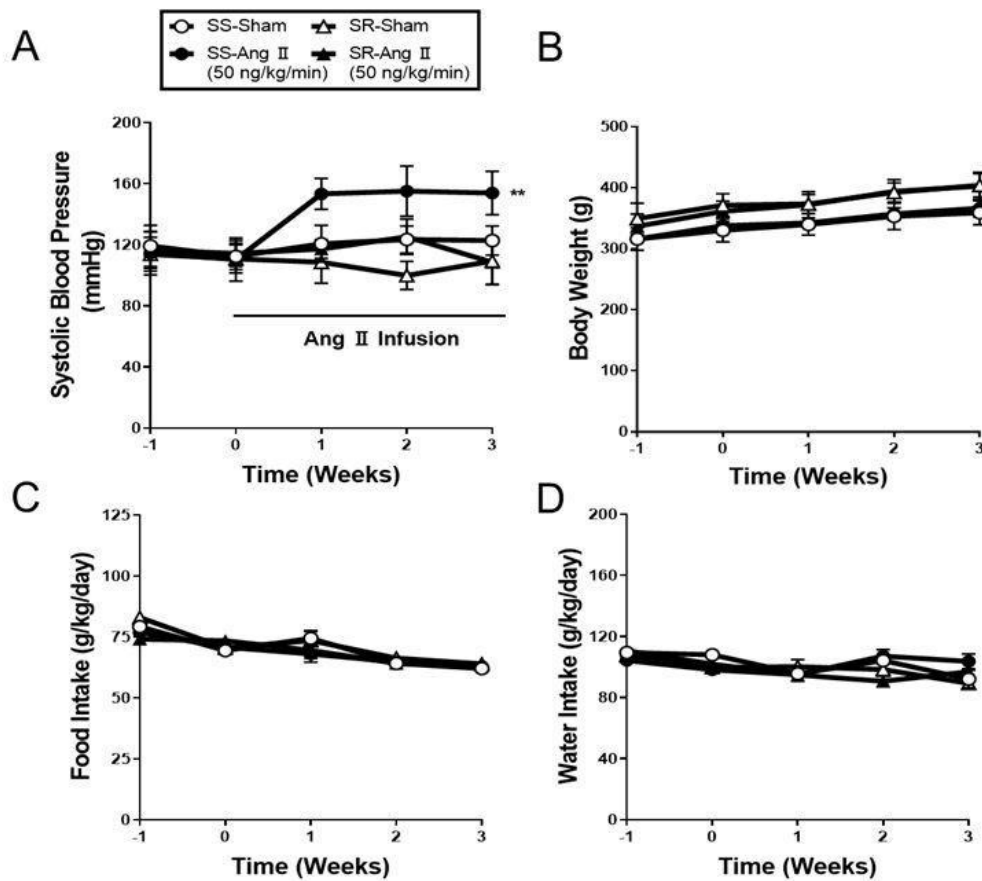
Table 1. Primer sequences for RT-qPCR

Genes (Accession No.)	Primer sequences (5' to 3')	Tm
RT-qPCR (for rat)		
<i>IL-17A</i> (NM_001106897.1)	F: GAAGGTCAACCTGAAAGTCC R: GGATATCTATCAGGGTCTCTC	60
<i>IL-17RA</i> (NM_001107883.2)	F: TCTTAGTGCCTGGCTGCGAG R: CACAGGGTGAAGTCCACTCG	60
<i>IL-23R</i> (NM_003753910.4)	F: CCAGTAGGCAGACAACCCTA R: AGCTGTGAGAGTTCCTGTAG	60
<i>ROR<math>\gamma</math>T</i> (NM_006232926.3)	F: ACTCAGCTGAAGACGCTGAG R: GCACACCTTACTGAGAGACC	60
<i>IL-10</i> (NM_008769426.2)	F: GCATCTACTGGACTGCAGGA R: GGAGAGAGGTACAAACGAGG	60
<i>CD25</i> (NM_013163.1)	F: CACAGTCTGTGTACCAGG R: CCACGAAGTGGTAGATTC	60
<i>TGF-<math>\beta</math></i> (NM_021578.2)	F: TGGACCGCAACAACGCAATC R: TTCTGGCACTGCTTCCCGAA	60
<i>FOXP3</i> (NM_006256731.3)	F: ACAAGGATCCTACCCACTGC R: ATGCAGTTTAGCCCTTTGCT	60
<i>IL-1<math>\beta</math></i> (NM_031512.2)	F: AGCAACGACAAAATCCCTGT R: GAAGACAAACCGCTTTTCCA	60
<i>IL-6</i> (NM_012589.2)	F: GCCTATTGAAAATCTGCTCTGG R: GGAAGTTGGGGTAGGAAGGA	60
<i>GAPDH</i> (NM_001394060.2)	F: ATGACTCTACCCACGGCAAG R: CTGGAAGATGGTGATGGGTT	60

을 알 수 있다.

### 2. 안지오텐신 II 투여가 달 소금 민감성 쥐와 달 소금 저항성 쥐의 T 도움 17 세포와 T 조절 세포에 미치는 영향

안지오텐신 II가 달 소금 민감성 쥐의 수축기 혈압을 상승시킨 원인을 면역적으로 확인하기 위하여 달 소금 민감성 쥐와 달 소금 저항성 쥐의 비장과 말초 혈액 단핵 세포를 분리한 후, 유세포 분석기를 통하여 후천성 면역 세포의 종류인 T 도움 17 세포와 T 조절 세포의 발현 정도를 비교, 분석하였다. 그 결과, 비장세포에서는 안지오텐신 II의 처리 유무와 관계없이 T 도움 17 세포와 T 조절 세포의 발현이 그룹 간에 유의미한 차이를 볼 수 없었다(Fig. 2A, 2B). 말초 혈액 단핵 세포에서도 마찬가지로 안지오텐신 II를 처리했을 때, T 도움 17 세포에서 관찰할 수 있는 Ror $\gamma$ T의 발현이 달 소금 민감성 쥐와 달 소금 저항성 쥐에서 증가하는 경향성은 볼 수 있었지만 유의미한 차이는 확인할 수 없었다(Fig. 5A). 그리고 T 조절 세포의 발현은 말초 혈액 단핵 세포에서 안지오텐신 II 처리 유무와 관계없이 발현에 유의미한 영향을 주지는 않



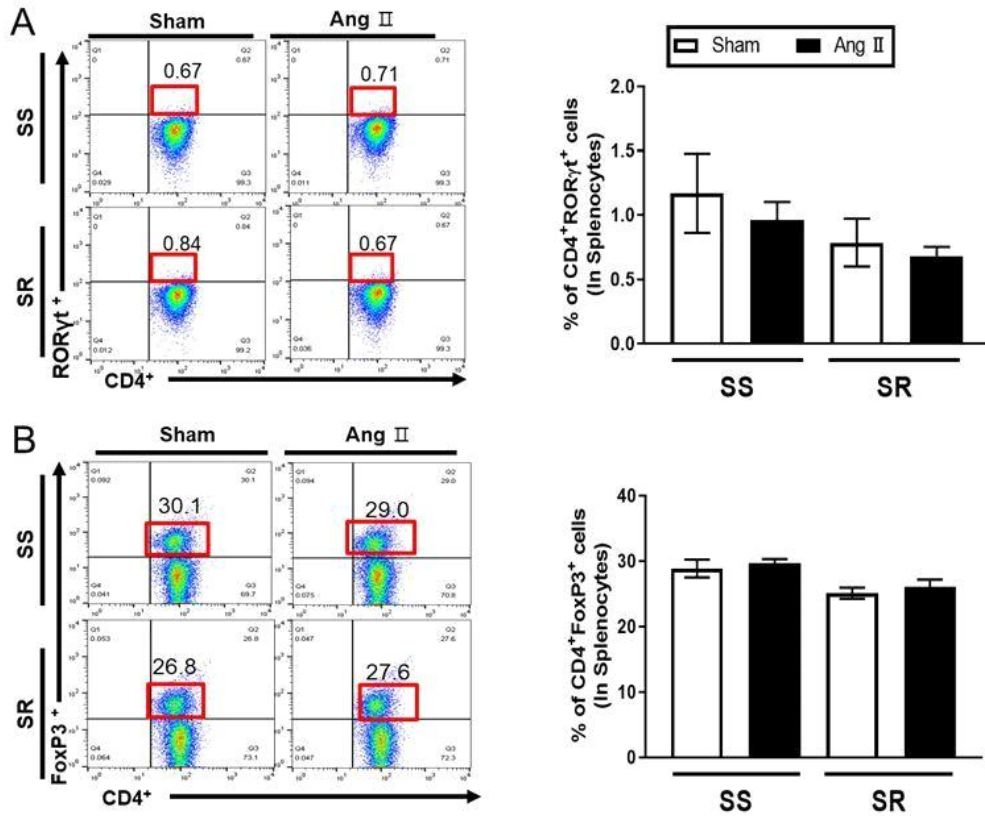
**Fig. 1.** The effect of angiotensin II (Ang II) on systolic blood pressure (SBP), body weight, food intake and water intake in Dahl salt-sensitive (SS) and salt-resistant (SR) rats. SS and SR rats were infused with Ang II 50 ng/kg/min for 3 weeks. (A) SBP and (B) body weights were measured weekly in SS and SR rats. Ang II induced hypertension in SS but not in SR rats. (C) Food intake and (D) water intake were assessed. Multiple analyses of variance (MANOVA) with Tukey's post-hoc multiple comparisons test ( $n=4$ , error bars of the result expressed the mean $\pm$ SEM). \*\* $p<0.01$  vs. SS rats in the Sham group.

았음을 확인할 수 있었다(Fig. 5B).

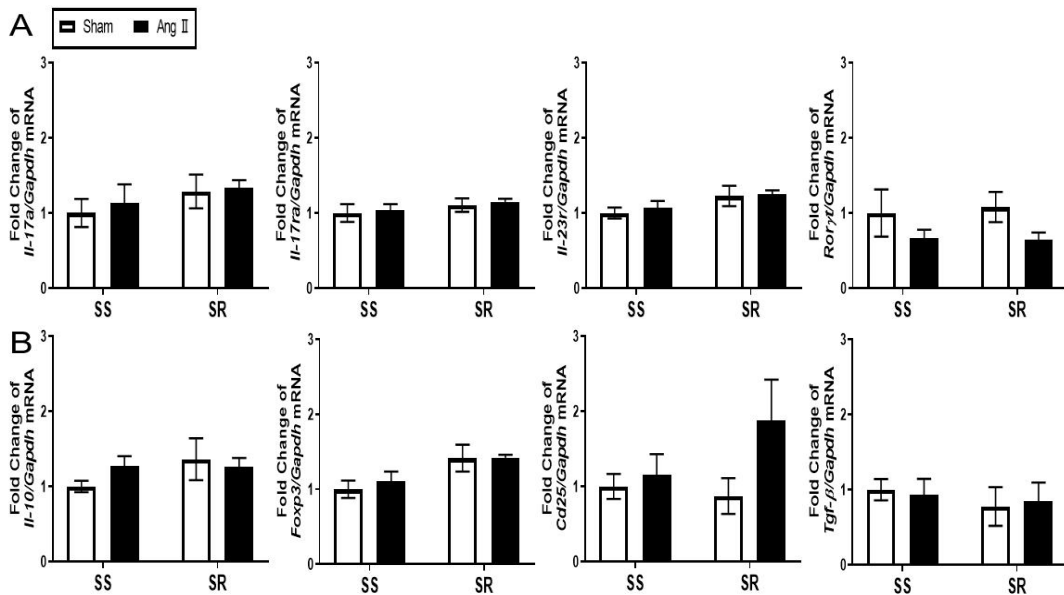
유세포 분석의 결과를 바탕으로, 안지오텐신 II가 T 도움 17 세포와 T 조절 세포와 관련한 유전자의 발현을 조절하는 지 확인하기 위해 비장 조직 및 안지오텐신 II 생성과 혈압 조절 과정에 관여하는 장기인 신장에서 T 도움 17세포 (*Il-17a*, *Il-17ra*, *Il-23r*, 그리고 *Roryt*) 또는 T 조절 세포(*Il-10*, *Foxp3*, *Cd25*, 그리고 *Tgf- $\beta$* )와 관련한 유전자의 발현 정도를 실시간 중합효소연쇄반응 실험을 통하여 확인하였다. 그 결과, 비장 조직에서는 유세포 분석 실험 결과와 마찬가지로 T 도움 17 세포와 T 조절 세포 관련 유전자가 모든 그룹에서 유의미한 차이를 확인할 수 없었다(Fig. 3A, 3B). 신장 조직에서는 말초 혈액 단핵 세포의 유세포 결과와 마찬가지로 안지오텐신 II를 처리한 달 소금 민감성 쥐( $p<0.05$ )와 달 소금 저항성 쥐( $p<0.01$ )에서 T 도움 17 세포의 전사 인자 중 하나인

*Roryt*의 발현이 대조군에 비하여 유의미하게 증가하였지만, T 도움 17 세포와 관련한 다른 유전자들의 발현에서는 유의미한 차이를 확인할 수 없었다(Fig. 4A). 또한 신장에서 T 조절 세포와 관련한 유전자는 모든 그룹 간에 유의미한 차이를 확인할 수 없었다(Fig. 4B).

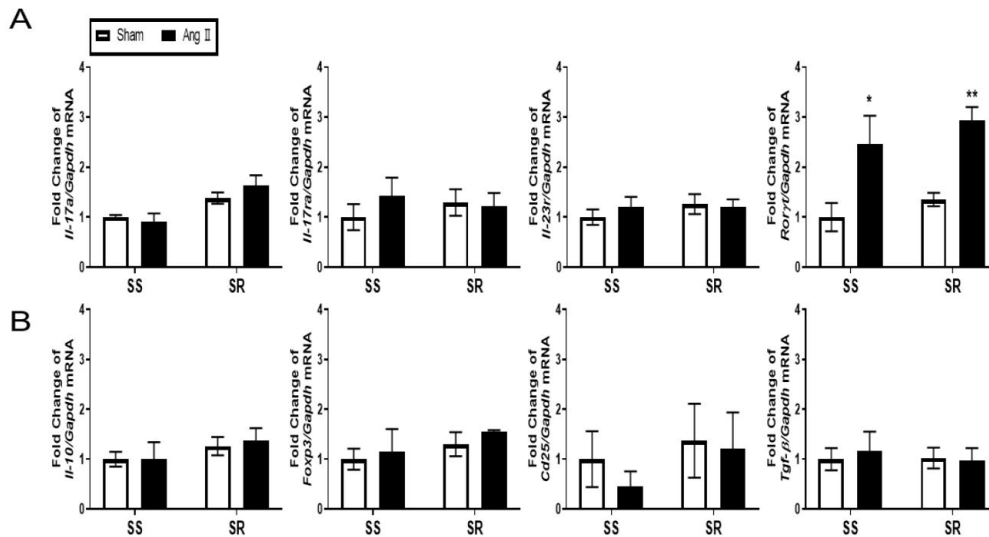
면역 체계는 고혈압의 진행 단계에서 매우 중요한 역할을 한다. 특히 고혈압 발생에 중요한 사이토카인 중 하나인 인터루킨-17은 T 도움 17 세포에서 주로 생산되며, 대표적인 주요 전사 인자인 *ROR $\gamma$ t*를 가지고 있다(Wu 등 2013). 이전 연구에 의하면 T 세포와 B 세포의 발달을 모두 억제하는 *Rag1* 결실 달 소금 민감성 쥐에 안지오텐신 II를 야생형의 달 소금 민감성 쥐와 함께 처리하였을 때, 혈압의 증가가 야생형에 비하여 *Rag1* 결실 달 소금 민감성 쥐에서 느리게 나타나는 것을 확인할 수 있었고, 신장의 손상도 적은 것을 확



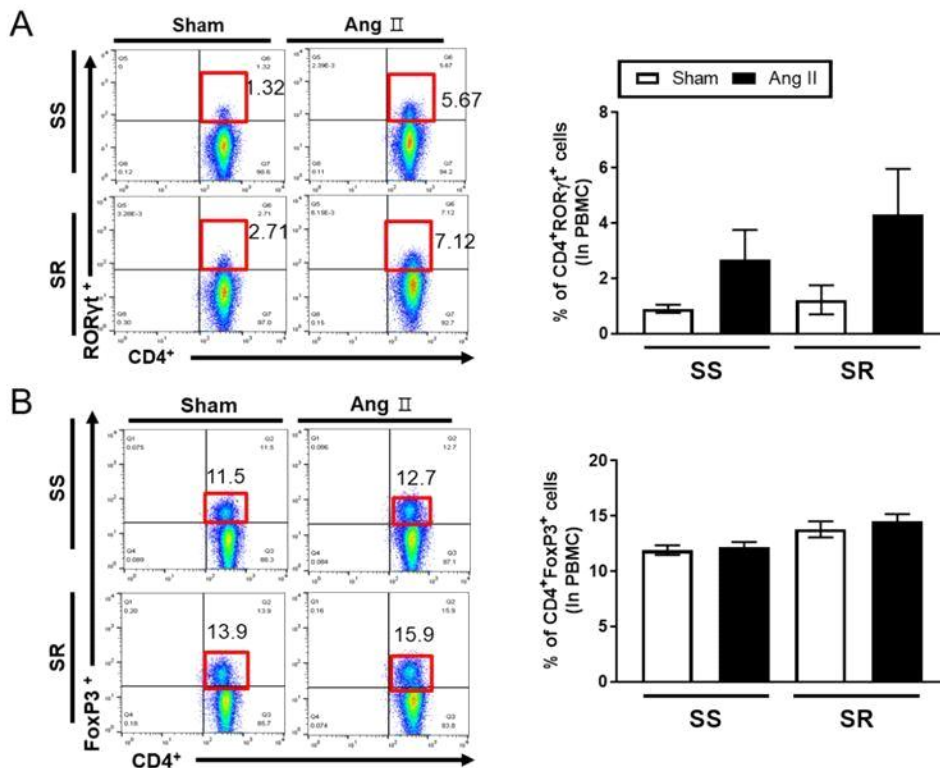
**Fig. 2.** The effect of angiotensin II on T cell profiles of spleen in SS and SR rats. (A and B) The representative flow cytometry of T helper 17 (Th17; CD4<sup>+</sup>RORγt<sup>+</sup>) and regulatory T (Treg; CD4<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup>) cells in spleen.



**Fig. 3.** The effect of angiotensin II on the expression of genes related to Th17 and Treg cells in the spleen of SS and SR rats. (A and B) The mRNA expressions of Th17 cell-related genes (*Il-17a*, *Il-17ra*, *Il-23r*, and *Rorγt*) or Treg cell-related genes (*Il-10*, *Foxp3*, *Cd25*, and *Tgf-β*) were measured in the spleen of SS and SR rats.



**Fig. 4.** The effect of angiotensin II on the expression of genes related to Th17 and Treg cells in the kidney of SS and SR rats. (A and B) The mRNA expressions of Th17 cell-related genes (*Il-17a*, *Il-17ra*, *Il-23r*, and *Rorγt*) or Treg cell-related genes (*Il-10*, *Foxp3*, *Cd25*, and *Tgf-β*) were measured in the kidney of SS and SR rats. MANOVA with Tukey’s post-hoc multiple comparisons test (n=6, error bars of the result expressed the mean±SEM). \**p*<0.05 and \*\**p*<0.01 vs. SS rats in the Sham group.



**Fig. 5.** The effect of angiotensin II on T cell profiles of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) in SS and SR rats. (A and B) The representative flow cytometry of T helper 17 (Th17; CD4<sup>+</sup>RORγt<sup>+</sup>) and regulatory T (Treg; CD4<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup>) cells in PBMCs.

인할 수 있었다. 또한 신장에서 선천성 면역세포와 후천성 면역세포들의 분포도 야생형이 Rag1 결실 달 소금 민감성 쥐보다 더 높은 것을 확인할 수 있었다. 그리고 안지오텐신 II와 재조합 인터루킨-17을 동시에 처리한 경우 혈압 상승이 대조군에 비하여 적게 증가된 것을 확인할 수 있었다(Wade 등 2018). 그리고 조절 T 세포는 염증의 주요 조절자로서 역할 할 뿐만 아니라 자가면역질환에 대한 보호역할을 한다. 조절 T 세포는 전사인자 FoxP3에 의하여 매개되는 신호에 의존하게 된다(Chen 등 2003; Shevach & Thornton 2014).

따라서 우리의 실험 결과는 안지오텐신 II를 처리한 달 소금 민감성 쥐와 달 소금 저항성 쥐에 고혈압과 연관 있다고 알려진 조절 T 세포와 이를 억제하는 기능을 가진 조절 T 세포의 분포 정도와 유전자의 발현 수준을 비교하였을 때, 비장에서는 모든 그룹에서 유의미한 차이를 볼 수 없었지만, 신장에서 T 도움 17 세포와 관련한 전사 인자인 *Roryt*가 mRNA 수준에서 달 소금 민감성 쥐와 달 소금 저항성 쥐의 신장에서 증가된 것을 확인할 수 있었다. 그러나 그 외 다른 T 도움 17 세포와 관련한 유전자 마커들은 유의미한 차이가 없는 것으로 나타났다. 또한 신장에서 조절 T 세포와 관련한 유전자 마커들 역시 유의미한 차이를 보이지는 않았다. 이는 안지오텐신 II가 직접적으로 T 도움 17 세포에 영향을 크게 주지 않았고, 그로 인하여 조절 T 세포 역시 증가하지 않은 결과를 나타낸 것으로 생각된다.

### 3. 안지오텐신 II 투여가 달 소금 민감성 쥐와 달 소금 저항성 쥐의 대식세포에 미치는 영향

안지오텐신 II가 달 소금 민감성 쥐의 수축기 혈압을 상승시킨 원인을 면역학적으로 확인하기 위하여 선천성 면역세포 중 하나인 대식 세포와 관련한 염증성 사이토카인인 *Il-1 $\beta$* 와 *Il-6*의 유전자 발현 정도를 비장과 신장 조직에서 확인하

였다. 비장 조직에서는 *Il-1 $\beta$* 와 *Il-6*의 발현이 모든 그룹에서 유의미한 차이를 관찰할 수는 없었다(Fig. 6A). 신장 조직에서는 *Il-1 $\beta$* 가 달 소금 민감성 쥐에서 유의미하게 증가된 것을 확인할 수 있었으나( $p < 0.05$ ), *Il-6*는 모든 그룹에서 유의미한 차이를 확인할 수 없었다(Fig. 7A).

앞서 서론에서 언급했듯이 인터루킨-6는 단핵구, 대식세포 및 수지상세포에서 분비되며, 도움 T 세포의 분극화를 촉진시켜 인터루킨-17의 생산을 촉진해 고혈압 및 여러 만성 염증 반응에서 중요 역할을 한다(Li 등 2010; Ogata & Tanaka 2012). 그리고 인터루킨-1 $\beta$ 는 주로 단핵구, T 세포 및 호중구에서 유래하며, 인터루킨-6와 인터루킨-17 및 인터페론- $\gamma$ 를 포함한 여러 전 염증성 유전자들을 상향 조절하여 고혈압의 진행을 악화시킬 수 있다(Krishnan 등 2019; Veiras 등 2022). 안지오텐신 II는 신장에 염증을 유도하여 다양한 신장 질환의 병인과 연관이 되어 있다. 신장 염증은 신장의 섬유화와 기능 장애를 유발하여 고혈압 발생에 기여하게 된다(Della Penna 등 2015). 이전 연구에 의하면 안지오텐신 II를 1.1 mg/kg/d를 3주 동안 C57BL/6 쥐에 처리했을 때, 대조군에 비하여 혈압이 높게 증가된 것을 확인할 수 있었으며, 심장의 비대화 및 섬유화가 2주차 때 이미 증가된 것을 확인할 수 있었다. 그리고, 심장 조직에서 T 세포와 전체 면역세포의 양을 안지오텐신 II 투여 3일, 7일, 그리고 14일 후에 확인하였을 때, 3일 차 T 세포의 분포가 가장 높았고, 그 이후 차차 분포 정도가 낮아지면서 2주 차에는 거의 존재하지 않고 백혈구와 같은 선천성 면역세포들이 주를 이루고 있음을 확인했다(Emmerson 등 2018). 또한 이전 연구에 의하면 안지오텐신 II로 고혈압을 유도한 후, Rag1 결실 마우스에 고혈압이 유도된 쥐의 T 세포를 이식하고 안지오텐신 II를 각 그룹에 투여했을 때, 비장과 신장에서 대조군과 T 세포의 변화를 비교하게 되면, 후천성 면역과 관련한 세포들은 모두 유의미한

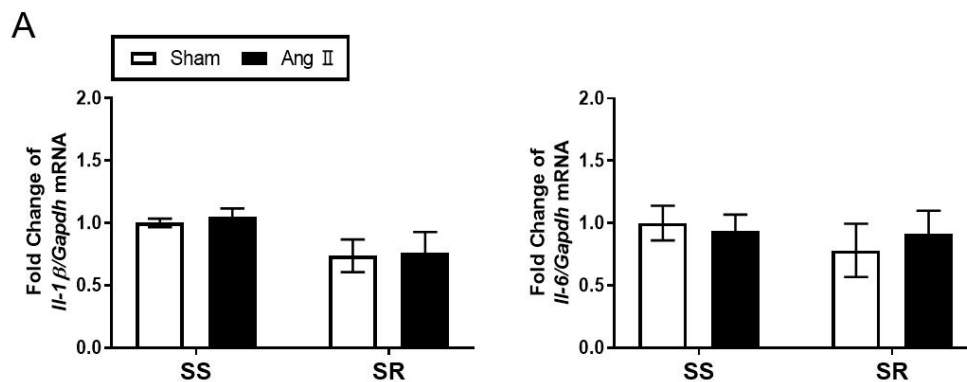
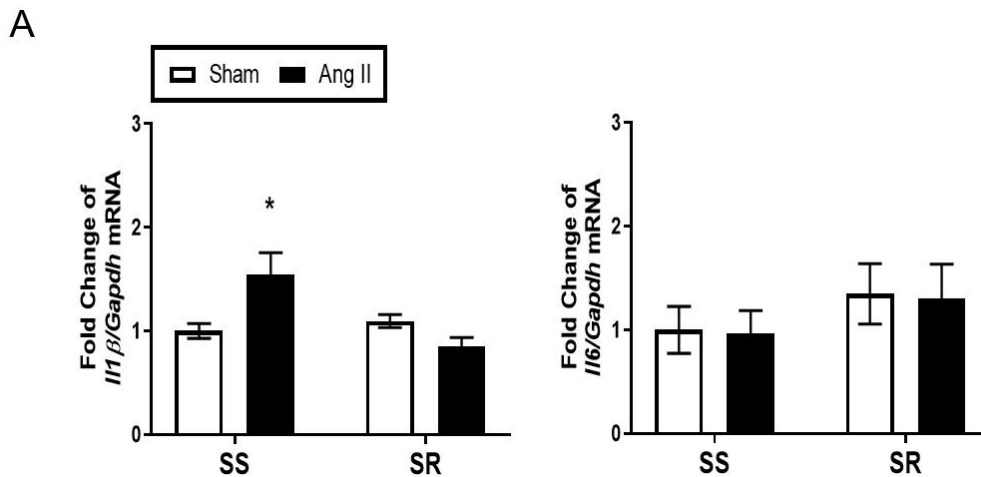


Fig. 6. The effect of angiotensin II on the expression of genes related to macrophages in the spleen of SS and SR rats. (A) The mRNA expressions of macrophages-related genes (*Il-1 $\beta$*  and *Il-6*) were measured in the spleen of SS and SR rats.

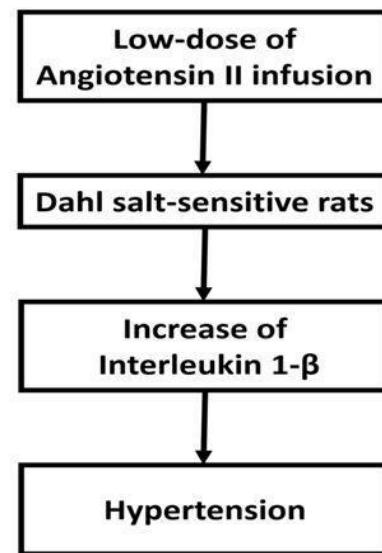


**Fig. 7. The effect of angiotensin II on the expression of genes related to macrophages in the kidney of SS and SR rats.** (A) The mRNA expressions of macrophages-related genes (*Il-1β* and *Il-6*) were measured in the kidney of SS and SR rats. \* $p < 0.05$  vs. SS rats in the Sham group.

차이가 보이지 않았다. 그러나 신장에서 대조군과 비교해 대식세포가 유의하게 증가하였음을 관찰했다(Sylvester 등 2022).

따라서 우리의 실험에서 안지오텐신 II를 투여한, 달 소금 민감성 쥐와 달 소금 저항성 쥐에 고혈압과 연관있다고 알려진 *Il-1β*와 *Il-6*의 유전자 발현 수준을 비교하고자 했으며, 비장에서는 모든 그룹에서 유의미한 차이를 볼 수 없었지만, 신장에서는 *Il-1β*가 mRNA 수준에서 달 소금 민감성 쥐가 달 소금 저항성 쥐보다 통계적으로 유의미하게 증가된 것을 확인할 수 있었다. 그러나 *Il-6*는 모든 그룹 간의 유의미한 차이를 볼 수 없었다. 이는 안지오텐신 II가 달 소금 민감성 쥐의 대식세포에서 *Il-1β*의 분비를 자극하여 고혈압의 발생을 유도한 것으로 생각할 수 있다(Fig. 8).

소금 민감성 고혈압은 또한 고과당 식이를 통해서 유도되기도 하는데 그 기전으로 고과당 식이가 지속되면 간, 소장, 신장에서 요산의 증가가 이루어지고, 궁극적으로 레닌-안지오텐신-알도스테론 시스템을 활성화하며, 나트륨의 재흡수와 관련한 이온 채널들의 발현을 증가시킴으로 인하여 유도될 수 있다, 이 때 고염식이 함께 적용되면 소금 민감성 고혈압이 나타나게 된다(Xu & Yu 2022). 또한 과다한 영양 섭취로 인하여 비만이 유도되었을 때, 비만 세포는 알도스테론 방출 인자를 생산이 된다. 이들은 부신에서 알도스테론이 분비되도록 자극하며, 고염식이 함께 적용이 되면 무기질 코르티코이드 수용체를 활성화시킨다. 그로 인하여 역시 나트륨 이온 채널의 발현이 신장에서 증가되면서 소금 민감성 고혈압이 유도된다. 그리고, 비만세포가 생성하는 렙틴은 렙틴 수용체와 결합하여 궁극적으로 레닌-안지오텐신-알도스



**Fig. 8. Summary of the current study.** Low-dose of angiotensin II infusion for three weeks induced an increase in interleukin-1β in Dahl salt-sensitive rats, leading to the maintenance of high blood pressure.

테론 시스템을 활성화시켜 소금 민감성 고혈압을 유도하게 된다(Kawarazaki & Fujita 2021).

따라서 이러한 이해를 기반으로, 소금 민감성 고혈압은 유전적인 요인뿐만 아니라 후천적인 요인에도 영향을 받을 수 있다. 그러므로 소금 민감성 고혈압을 예방하기 위해서는 염분 섭취를 제한하고 영양 섭취를 조절하여 비만을 피해야 하고, 건강한 체중을 유지하여 염증성 면역계의 활성화를 방지해 중증 고혈압으로 진행되는 것을 막는 것이 중요하다.



## 요약 및 결론

고지방식과 고염식으로 인한 고혈압은 심·뇌혈관 질환의 주요 위험 요인이라는 것은 잘 알려져 있다. 혈압 조절 인자들 중 레닌-안지오텐신-알도스테론 시스템은 혈압 유지에 필요한 체액과 염분 항상성 조절에 필수적이다. 그러므로 이 시스템의 손상은 면역계의 손상과 더불어 고혈압을 유발하는 것으로 알려지고 있다. 이에 본 연구에서는 고혈압 발생과 면역세포의 관련성을 확인하기 위하여 달 소금 민감성 쥐와 달 소금 저항성 쥐에 안지오텐신 II를 투여한 다음 면역세포의 발현과 전 염증성 사이토카인의 발현을 상호 비교함으로써 고혈압 발생의 기전을 확인하고자 실험을 계획하였다. 안지오텐신 II(50 ng/kg/min)를 3주간 실험동물에 투여하였을 때, 달 소금 민감성(SS) 쥐에게서는 혈압이 증가하였으나, 달 소금 저항성 쥐에게서는 별다른 변동이 없었다. 그러나 체중과 사료 섭취량 및 음수량은 두 실험군 간에 유의한 차이는 없었다. 그리고 비장의 도움 T 세포와 T 도움 17 세포의 발현 및 말초 혈액 단핵세포에서의 도움 T 세포의 Rorrt 발현과 조절 T 세포의 발현은 안지오텐신 II의 투여에 의해서도 두 실험군 간에 유의한 차이는 나타나지 않았다. 또한 T 도움 17 세포 및 조절 T 세포 관련 유전자들은 모든 실험군에서 유의한 차이가 없었다. 신장에서 T 도움 17 세포의 전사 인자 중 하나인 Ror $\gamma$ t의 발현이 대조군에 비해 유의하게 증가하였으나, 조절 T 세포와 관련된 유전자 발현은 모든 실험군에서 유의한 차이가 없었다. 한편, 안지오텐신 II 투여에 의한 비장 조직에서 대식세포 관련 염증성 사이토카인인 *Il-1b*와 *Il-6*의 유전자 발현은 두 실험군 간에 유의한 차이는 없었다. 그러나 달 소금 민감성 쥐의 신장 조직에서는 IL-1 $\beta$ 가 유의하게 증가하였고, IL-6는 모든 실험군에서 유의한 차이가 없었다. 이러한 실험의 결과로 보아 Ang II가 달 소금 민감성 쥐의 신장 대식세포 IL-1 $\beta$  분비를 자극하여 고혈압 발생을 유도한 것으로 생각된다. 위의 실험 결과들을 종합해 볼 때, 소금 민감성인 사람들에서 고혈압 예방 및 경감을 위해 절제된 염분 섭취가 필요함을 제시한다.

## References

- Basile DP, Abais-Battad JM, Mattson DL. 2021. Contribution of Th17 cells to tissue injury in hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 30:151-158
- Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei KJ, Li L, Marinos N, McGrady G, Wahl SM. 2003. Conversion of peripheral CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> naive T cells to CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells by TGF- $\beta$  induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med* 198:1875-1886
- Dahl LK. 2005. Possible role of salt intake in the development of essential hypertension. *Int J Epidemiol* 34:967-972
- Della Penna SL, Rosón MI, Toblli JE, Fernández BE. 2015. Role of angiotensin II and oxidative stress in renal inflammation by hypernatremia: Benefits of atrial natriuretic peptide, losartan, and tempol. *Free Radic Res* 49:383-396
- Emmerson A, Trevelin SC, Mongue-Din H, Becker PD, Ortiz C, Smyth LA, Peng Q, Elgueta R, Sawyer G, Ivetic A, Lechler RI, Lombardi G, Shah AM. 2018. Nox2 in regulatory T cells promotes angiotensin II - induced cardiovascular remodeling. *J Clin Invest* 128:3088-3101
- Gonzalez SR, Ferrão FM, Souza AM, Lowe J, Morcillo LSL. 2018. Inappropriate activity of local renin-angiotensin-aldosterone system during high salt intake: Impact on the cardio-renal axis. *J Bras Nefrol* 40:170-178
- Jia G, Aroor AR, Hill MA, Sowers JR. 2018. Role of renin-angiotensin-aldosterone system activation in promoting cardiovascular fibrosis and stiffness. *Hypertension* 72:537-548
- Kawarazaki W, Fujita T. 2021. Kidney and epigenetic mechanisms of salt-sensitive hypertension. *Nat Rev Nephrol* 17:350-363
- Krishnan SM, Ling YH, Huuskes BM, Ferens DM, Saini N, Chan CT, Diep H, Kett MM, Samuel CS, Kemp-Harper BK, Robertson AAB, Cooper MA, Peter K, Latz E, Mansell AS, Sobey CG, Drummond GR, Vinh A. 2019. Pharmacological inhibition of the NLRP3 inflammasome reduces blood pressure, renal damage, and dysfunction in salt-sensitive hypertension. *Cardiovasc Res* 115:776-787
- Langley RG, Elewski BE, Lebwohl M, Reich K, Griffiths CEM, Papp K, Puig L, Nakagawa H, Spelman L, Sigurgeirsson B, Rivas E, Tsai TF, Wasel N, Tyring S, Salko T, Hampele I, Notter M, Karpov A, Helou S, Papavassilis C ERASURE and FIXTURE Study Groups. 2014. Secukinumab in plaque psoriasis - Results of two phase 3 trials. *N Engl J Med* 371:326-338
- Lastra G, Dhuper S, Johnson MS, Sowers JR. 2010. Salt, aldosterone, and insulin resistance: Impact on the cardiovascular system. *Nat Rev Cardiol* 7:577-584
- Lerman LO, Kurtz TW, Touyz RM, Ellison DH, Chade AR, Crowley SD, Mattson DL, Mullins JJ, Osborn J, Eirin A, Reckelhoff JF, Iadecola C, Coffman TM. 2019. Animal models of hypertension: A scientific statement from the American Heart Association. *Hypertension* 73:e87-e120
- Li K, Guo D, Zhu H, Hering-Smith KS, Lee Hamm L, Ouyang

- J, Dong Y. 2010. Interleukin-6 stimulates epithelial sodium channels in mouse cortical collecting duct cells. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 299:R590-R595
- Ogata A, Tanaka T. 2012. Tocilizumab for the treatment of rheumatoid arthritis and other systemic autoimmune diseases: Current perspectives and future directions. *Int J Rheumatol* 2012:946048
- Pak HO, Sohn CY, Park JH. 2015. Dietary life related to sodium of participants in hypertension and diabetes preventive education at the Public Health Center. *Korean J Food Nutr* 28:219-227
- Park JP, Kang SA. 2020. Antioxidant effect and blood pressure control ability of *Lactobacillus* fermented *Gastrodia elata* Bl. in hypertension model rats (SHR). *Korean J Food Nutr* 33:493-504
- Piqueras L, Sanz MJ. 2020. Angiotensin II and leukocyte trafficking: New insights for an old vascular mediator. Role of redox-signaling pathways. *Free Radic Biol Med* 157: 38-54
- Schweda F. 2015. Salt feedback on the renin-angiotensin-aldosterone system. *Pflugers Arch* 467:565-576
- Shevach EM, Thornton AM. 2014. tTregs, pTregs, and iTregs: Similarities and differences. *Immunol Rev* 259:88-102
- Sylvester MA, Pollow DP Jr, Moffett C, Nunez W, Uhrlaub JL, Nikolich-Zugich J, Brooks HL. 2022. Splenocyte transfer from hypertensive donors eliminates premenopausal female protection from ANG II-induced hypertension. *Am J Physiol Renal Physiol* 322:F245-F257
- Veiras LC, Bernstein EA, Cao DY, Okwan-Duodu D, Khan Z, Gibb DR, Roach A, Skelton R, Williams RM, Bernstein KE, Giani JF. 2022. Tubular IL-1 $\beta$  induces salt sensitivity in diabetes by activating renal macrophages. *Circ Res* 131: 59-73
- Wade B, Petrova G, Mattson DL. 2018. Role of immune factors in angiotensin II-induced hypertension and renal damage in Dahl salt-sensitive rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 314:R323-R333
- Weinberger MH, Fineberg NS, Edwin Fineberg S, Weinberger M. 2001. Salt sensitivity, pulse pressure, and death in normal and hypertensive humans. *Hypertension* 37:429-432
- Wu C, Yosef N, Thalhamer T, Zhu C, Xiao S, Kishi Y, Regev A, Kuchroo VK. 2013. Induction of pathogenic TH17 cells by inducible salt-sensing kinase SGK1. *Nature* 496:513-517
- Wu Y, Takahashi H, Suzuki E, Kruzliak P, Soucek M, Uehara Y. 2016. Impaired response of regulator of G $\alpha$ q signaling-2 mRNA to angiotensin II and hypertensive renal injury in Dahl salt-sensitive rats. *Hypertens Res* 39:210-216
- Xu C, Yu J. 2022. Pathophysiological mechanisms of hypertension development induced by fructose consumption. *Food Funct* 13:1702-1717
- Yun MJ, Kim YM. 2021. The relationship between subjects with metabolic syndrome diagnosed with disease and sodium intake for Korean adults. *Culin Sci Hosp Res* 27:194-209
- Zhang RM, McNerney KP, Riek AE, Bernal-Mizrachi C. 2021. Immunity and hypertension. *Acta Physiol* 231:e13487
- Zhang Z, Zhao L, Zhou X, Meng X, Zhou X. 2022. Role of inflammation, immunity, and oxidative stress in hypertension: New insights and potential therapeutic targets. *Front Immunol* 13:1098725

---

Received 13 September, 2023

Revised 24 October, 2023

Accepted 06 November, 2023