신장 근위세뇨관세포에서 ANG II에 의한 Na/H 상호운반계의 조절과 관련된 신호전달경로

전남대학교 수의과대학, 호르몬연구센터

한 호 재

신장은 혈압을 조절하는데 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있는데 이는 체내 수분, 전해질량 및 삼투질농도의 조절과 renin-angiotensin 기능에 기초하고 있다. 여기서는 Na/H 상호운반계와 angiotensin II(ANG II)의 일반적인 기능을 먼저 살펴보고, 신장 근위세뇨관세포에서 ANG II가 어떠한 신호전달경로를 통하여 Na/H 상호운반계의 활성을 촉진 또는 억제시키는가를 중심으로 기술하고자 한다.

Na/H 상호운반계와 근위세뇨관세포

Na/H 상호운반계(NHE)는 NHE1이라고 명명된 운반계가 클론된 이래 4개의 이성체가 클론(NHE2, NHE3, NHE4 그리고 trout β-NHE) 되어졌으며 이 이성체들은 이들 운반계가 없는 세포주(cell line)에서 모두 발현되었다. 각 이성체들은 NHE1과 비슷한 특성을 가지고 있으며 이온 운반에 관련될 것이라고 추정되는 2개의 잘 보존된 세포막횡단 분절(two highly conserved transmembrane segment)을 가진 hydropathy profile을 가지고 있다(Fig. 1). 또한 이들은 세포내 H^+에 의해서 활성화(allosterism에 의해)되고, Na^- 의존적으로 세포내 pH를 조절하며, 높은 K_i값을 가진 amiloride와 5-amino 유도체에 의해서 억제된다. NHE1은 amiloride-sensitive하고 성장

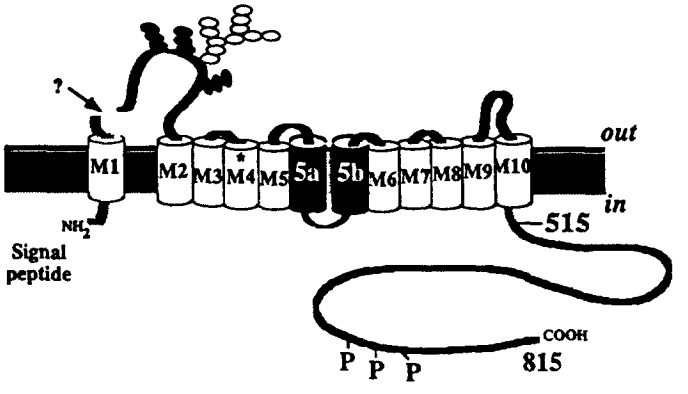


Fig. 1. Structural features of NHE1. NHE1 is an integral membrane protein of 815 amino acids comprising 10-12 transmembrane domains(M1 to M10, 500 amino acids) and cytoplasmic domain(315 amino acids). NHE2, NHE3, and NHE4 share 45-65% amino acid homology in transmembrane domains and 25-35% in cytoplasmic domain. Putative signal peptide is drawn in gray(M1). O-linked(●) and N-linked(○) glycosylated residues are in first extracellular loop between M1 and M2. Amiloride inhibition of NHE1 involved interaction with amino acids(*) of M4. The more conserved transmembrane domains, M5a and M5b, are presumably involved in catalytic transport of Na and H. Serines of cytoplasmic domain of NHE1 are phosphorylated at resting and stimulated states.

Table 1. Characteristics of Na^+/H^+ Exchanger Isoforms

	Isoform			
	NHE1	NHE2	NHE3	NHE4
Number of amino acids	815(Human) 816(Rabbit) 820(Rat)	809(Rabbit) 813(Rat)	832(Rabbit) 831(Rat)	717(Rat)
Calculated molecular weight	90,704(Human) 90,716(Rabbit) 91,506(Rat)	90,787(Rabbit) 91,296(Rat)	92,747(Rabbit) 92,997(Rat)	81,427(Rat)
Tissue localization	Ubiquitous	Kidney, intestine, stomach, adrenal gland.(Lesser amount) skeletal and heart muscles, trachea, liver, etc.	Kidney, intestine, stomach	Stomach, (Lesser amount) intestine, kidney, brain, etc.
Targeting in epithelial cells	Basolateral and apical	Basolateral and apical	Apical	ND
Inhibitor potency	Sensitive to amiloride and its analogues	Sensitive to amiloride(10 times less sensitive to its analogues than NHE1)	Resistant to amiloride and its analogues(50-500 times less sensitive than NHE1)	ND
Regulation	Growth factors ↑ Serum ↑ Phorbol esters ↑ Hyperosmolarity ↑ ATP depletion ↓	Growth factors ↑ Serum ↑ Phorbol esters ↑ Hyperosmolarity ↑ (or ↓) ATP depletion ↓	Growth factors ↑ Serum ↑ Phorbol esters ↓ Hyperosmolarity ↓ ATP depletion ↓	Hyperosmolarity ↑ ATP depletion ↓
Other features	Dimer Calmodulin binding Phosphorylation (serine) N-and *O*-glycosylation K^+ inhibitable	Calmodulin binding *O*-glycosylation	Dimer Calmodulin binding Phosphorylation (serine) No glycosylation	Calmodulin binding

ND, no data; ↑, increase; ↓, decrease

인자에 의해서 활성화되며 모든 세포에 고루 발현되는 반면 NHE2, NHE3, NHE4는 조직에 제한적으로 분포하는 것으로 보아 각각의 상피세포에서 특이한 기능을 할 것이라고 생각된다[1-3](Table 1). 실제로 LLC-PK_1/PKE_{20}(돼지 신장 근위세뇨관세포), MCT(마우스 신피질세포) 및 RKPC-2(토끼 근위세뇨관세포) 세포의 솔변연에는 amiloride-resistant 또는 amiloride-sensitive한 다양한 Na/H 상호운반계가 존재한다[4]. Na/H 상호운반계는 비록 세포에 따라 각각 다른 이성체들을 가지고 있지만 거의 모든 세포에 존재하며 성장인자나 호르몬 뿐만 아니라 삼투적 쇼크와 같은 세포외의 다양한 자극에 의해서 조절되어진다[1]. 그러므로 이 운반계는 신호전달경로의 연구를 위한 중요한 모델이 될 수 있다(Fig. 2).

근위세뇨관은 사구체에서 여과된 $NaHCO_3$의 70-90%, NaCl의 50% 재흡수를 담당한다[5]. 솔변연 및

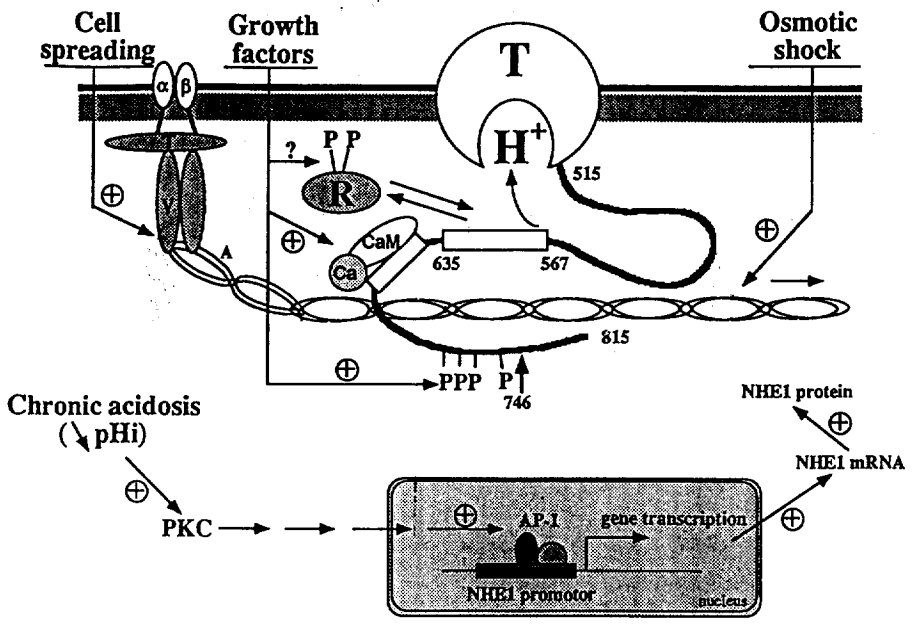


Fig. 2. Proposed model for NHE1 activation(+) by extracellular stimuli based on available knowledge. It shoud be remembered that >1 mechanism could be activated after stimulation by 1 of these stimuli, rendering this schematic representation much simpler than real in vivo situation. Growth factor-induced intracellular alkalinization of NHE1-expressing cells seems to be triggered either through 1) direct phosphorylation of cytoplasmic domain of NHE1 [downstream amino acid 635(P)]by NHE1 kinase, 2) regulatory protein(R), or 3) elevation of $[Ca^{2+}]_i$ leading to interaction of Ca^{2+}/CaM complex with a specific region of cytosolic domain. Osmotic shock and cell spreading both activate NHE1 through a possible interaction of cytoskeleton elements and cytoplasmic tail of NHE1. Chronic acidosis leads to increased activity of NHE1 by activation of gene transcription through PKC stimulation.

기저막을 가로지르는 H^+ 분비의 약 70%는 amiloride 억제성 Na/H 상호운반계에 의해서 이루어지는 반면에 나머지 30%는 vacuolar H-ATPase에 의해서 이루어진다. 솔변연 NaCl 흡수는 Cl/base 운반계와 amiloride 억제성 Na/H 상호운반계에 의해서 이루어진다(Fig. 3). 이렇듯 솔변연 Na/H 상호운반계는 근위세뇨관 산성화($NaHCO_3$ 흡수) 및 NaCl 흡수에 중요한 역할을 하고 있다[6-8]. 세포내에서 생성된 염기는 $Na/HCO_3/CO_3$ 공동운반계를 통해, Na^+은 Na/K-ATPase와 $Na/HCO_3/CO_3$ 공동운반계를 통해 기저막을 통해 혈관으로 나간다[9]. Na/H 상호운반계는 근위세뇨관세포의 양쪽면에서 모두 발현되는데 솔변연 운반계는 모든 근위세뇨관 절편에 존재하는 반면에 기저막 운반계는 네프론 분절에 따라 다양하게 나타나고 종 특이적인 반응의 차이를 보인다. 일반적으로 기저막 Na/H 상호운반계는 사구체에서 보다 멀리 떨어진 세뇨관의 거의 모든 부분에서 나타난다. 근위세뇨관세포 Na/H 상호운반계 활성은 다양한 호르몬을 포함한 여러 가지 인자들에 의해 조절되는데 그 기점은 크게 3가지 범주로 나눌 수 있다. 첫 번째는 specific transport site에서 H^+와 Na^+과의 상호작용 뿐만 아니라 internal allosteric site에서 H^+와의 상호작용을 포함한 상호운반계의 kinetic 특성과 관련되어진다. 둘째는 세포내 특이적인 신호전달경로와 관련된 호르몬성(신경전달물질) 조절기전이다. 세 번째는 산/염기 장애와 신장무게의 감소에 기인한 적응반응이다. 조직배양을 이용한 실험에서 위의 조절기전들에 대한 많은 연구가 이루어짐에 따라 세포내 기전이 자세하게 밝혀지고 있다. 신장 근위세뇨관세포에서 Na/H 상호운반계의 활성을 분석하기 위해서 세포속으로 $^{22}Na^+$ influx 또는 형광색소(2', 7'-biscarboxyethyl-5, 6-carboxyfluorescein, BCECF)나 전극을 이용한 세

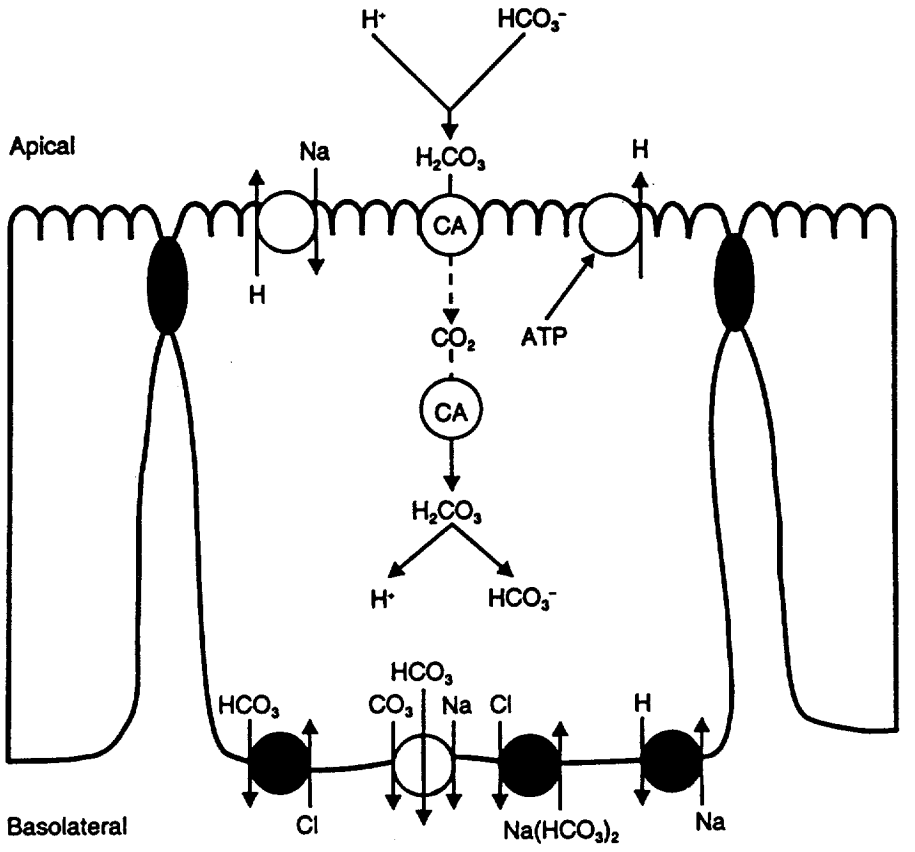


Fig. 3. Major transport systems involved in the transport of acid/base equivalents in a proximal tubular epithelial cell. The brush border membrane mainly contains transporters involved in proton secretion required for bicarbonate reabsorption. In the basolateral membrane the major exit step for bicarbonate is Na^+/HCO_3^- cotransport(open circle) whereas other transporters(filled circles) mainly fulfill "housekeeping" functions.

포내 pH_i의 측정 등의 방법이 주로 이용된다[10].

ANG II의 기능과 수용체

Renin-angiotensin system(RAS)은 1930년대 초반 Goldblatt과 그 동료들이 신동맥의 수축이 renin 생산을 증가시키고 결과적으로 고혈압을 일으킨다는 결과를 발표한 이래 집중적으로 연구되었다[11]. Renin은 신장에서 분비되는 aspartylprotease로서 angiotensinogen을 10개의 아미노산으로 이루어진 ANG I으로 자른다. 이 펩티드는 angiotensin I 전환효소(ACE)에 의하여 ANG II(octapeptide)로 된다. ANG II는 혈관 평활근의 수축, 알도스테론의 생합성, 신경성 카테콜라민 방출, 중추신경내에서의 작용에 의한 갈증유발(수분대사), 신혈류, 사구체 여과율 및 사구체 간질세포 기능을 선택적으로 조절함으로써 심맥관계 기능에 관여하고 있다[12, 13](Fig. 4). 최근의 연구에서는 심장과 혈관 및 신장에서 성장인자로서의 기능이 있음이 밝혀졌다[14, 15]. 이외에도 ANG II는 사구체 간질세포 및 심장 섬유아세포에서 세포성장 및 세포외 기질 생성에 중요한 역할을 하여 손상된 조직의 치유에 관여한다. 아울러 이들 세포에서 성장인자, cytokine 및 arachidonic acid의 생성 자극, 세포이동 및 부착 조절, 신경호르몬에 대한 반응성 변화 및 분화된 표현형의 발달, 유지에 관여한다[16]. 근위세뇨관내에서 ANG II는 NaCl 및 bicarbonate 재흡수, 당 및 암모니아 생성과 관련이 있다[17-22]. 또한 근위세뇨관에서 RAS는 ANG 매개성 세포성장 및 치유, ACE 매개

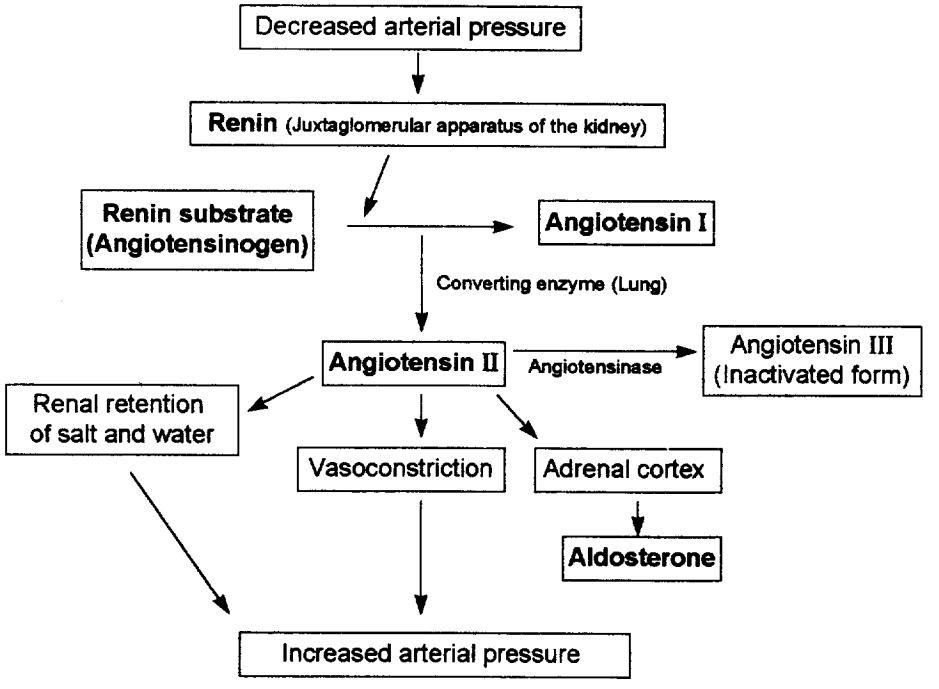


Fig. 4. *Schematic representation of the essential components of the renin-angiotensin-aldosterone system. Activation of this system results in renal retension of salt and water and subsequently increase arterial pressure.*

성 단백 처리과정(processing) 및 재흡수를 포함한 기능들을 하고 있다[23-25]. ANG Ⅱ에 의한 세뇨관 물질이동계의 조절은 식이성 염 섭취량 및 세포외액량 변화에 대한 신장의 적응반응을 포함한 다양한 생리학적인 작용에서 뿐만 아니라 고혈압과 같은 병태생리학적인 과정에서 중요한 역할을 한다. 그러나 근위세뇨관세포에서 ANG Ⅱ의 기능 및 작용기전에 관한 많은 의문점들이 여전히 해결되지 않고 있다.

ANG Ⅱ는 근위세뇨관세포(S1)의 솔변연과 기저막 쪽에 분포하고 있는 수용체에 결합하여 Na/H 상호운반계를 조절함으로써 심혈관계 항상성 유지에 중요한 역할을 하고 있다. ANG 수용체 subtype이 몇가지 밝혀져 있음에도 불구하고 ANG Ⅱ 기능의 대부분은 AT_1 수용체에 의해서 매개되어진다는 것이 약리학적 길항제를 사용한 연구들에서 보고되어 졌다[26,27]. AT_1 수용체의 두 개 subtype(AT_{1A}, AT_{1B})이 마우스와 랫트에서 밝혀졌으며 AT_{1B} 수용체는 사람에서 존재한다는 보고도 있다[28-31]. 이 두 subtype은 서로 다른 유전자의 생산물이고 핵산수준(sequence)에서 90% 이상의 상동성을 가지고 있다[28]. 대부분의 기관에서는 AT_{1A} 수용체가 많이 분포하지만 부신피질과 뇌하수체에서는 AT_{1B}가 보다 높게 발현된다[32-34]. 혈류역학과 혈압조절에 관련된 기능에 있어서 비AT_{1A} 수용체의 생리학적인 역할을 밝힌다는 것은 AT_{1A} 매개성 반응이 강도가 높고 우세하기 때문에 어렵다. 한편 AT_{1A} 수용체가 결핍되었을 때 AT_{1B} 수용체가 혈압조절에 있어서 중요한 역할을 하는 것으로 알려졌다[35]. 지금까지 알려진 모든 AT_1 수용체 길항제는 AT_{1A}, AT_{1B} 수용체와 비슷한 친화력을 갖고 있어 *in vivo* 에서 AT_{1A}와 AT_{1B}의 상대적인 기능은 밝히기 어렵다. AT_2의 발현은 조직 특이적이며 특히 태아 간엽조직과 대뇌핵에서 높게 나타나는 것으로 알려져 있으며 대동맥이나 신장에서도 발현된다[36-39]. 이와같은 발현은 출생후 급격히 감소한다. AT_2의 촉진은 세포성장을 억제하고 혈관확장, free water clearance 및 뇌혈관계 저항과 같은 혈역학 효과를 매개하기도 한다[40-44].

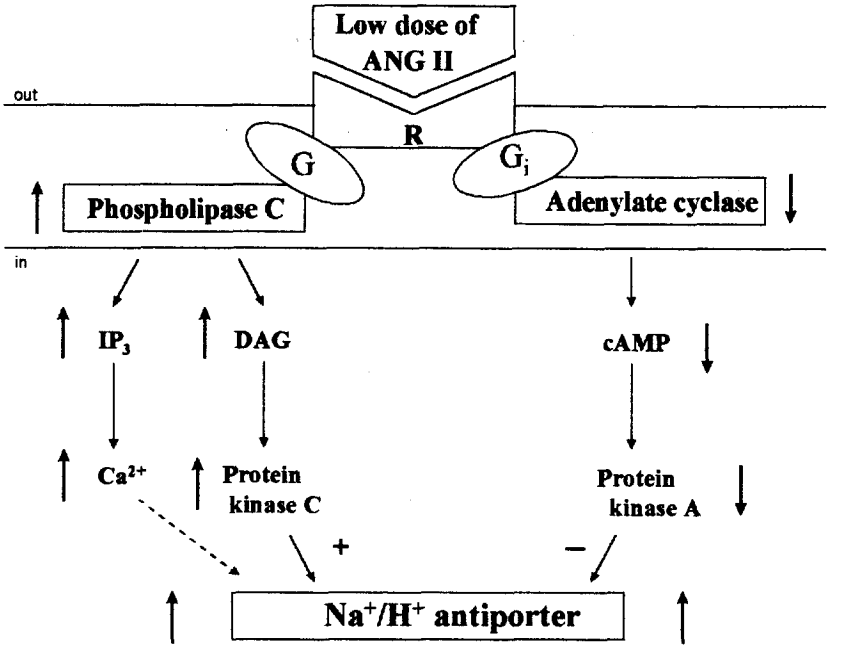


Fig. 5. Model for regulation of Na/H antiporter activity by low dose of ANG II in rabbit renal primary cultured proximal tubule cell. The ANG II receptor is coupled via a Gi protein to reduce adenylate cyclase, which diminishes intracellular cyclic adenosine monophosphate(cAMP) concentration and protein kinase A activity with consequent stimulation of the Na/H antiporter. In another pathway, ANG II increases phospholipase C activity with consequent rise in intracellular inositol triphosphate(IP_3) and diacylglycerol(DAG) concentrations, which then mobilize intracellular calcium and activate protein kinase C to stimulate the Na/H antiporter.
solid line; proposed pathway, dash line; suspected pathway.

ANG II에 의한 Na/H 상호운반계 조절과 관련된 신호전달경로

근위세뇨관세포의 솔변연 Na/H 상호운반계는 $NaHCO_3$ 흡수의 약 2/3와 세포를 통한 NaCl 흡수의 100%를 중개하는데 저농도(10^{-12}~10^{-9}M)의 ANG II는 Na^+ 재흡수를 촉진한 반면 고농도(10^{-7}~10^{-6} M)에서는 억제시키는 농도의존적인 이상성 효과(biphasic effect)를 보인다고 보고되었다[45, 46]. 이러한 효과는 pH에서도 나타나는데 고농도의 ANG II(10^{-6}M)를 토끼 근위세뇨관 배지에 처리했을때(솔변연으로부터 적용되었을때는 아니고) 세포를 −3.4±0.3mV로 과분극 시키고 0.06pH 단위로 알칼리화 시키지만 저농도는 탈분극 시키고 산성화 시켰다[47]. 랫트 근위세뇨관에서도 고농도 ANG II(10^{-7}M, 3분)에 의해서 dpHi/dt가 30±4% 감소, 저농도에서는 25±8% 증가했다는 보고가 있다[48]. 토끼 근위세뇨관세포 솔변연 Na/H 상호운반계에 대한 ANG II의 이상성 효과는 ANG II 농도에 따라 AT 수용체와 연결된 각기 다른 신호전달경로가 활성화되는데 기인한 것이라고 생각된다. 예를 들면, 초대배양한 토끼 신장 근위세뇨관세포에서 저농도(10^{-11}M)의 ANG II는 AT_1 수용체와 연결된 PLC- PKC 및 cAMP 경로를 통하여 촉진적으로 작용하며 고농도(10^{-9}M)에서는 PLA_2 및 cytochrome P-450 의존적인 경로를 통하여 억제적으로 작용한다[49, 50] (Fig. 5, 6). 이러한 신호전달계에는 adenylate cyclase의 억제, phospholipase A_2, C 또는 D의 활성화, IP_3에 의한 Ca^{2+} 유리 또는 arachidonic acid 대사물질인 5,6 EET에 의한 Ca^{2+} 통로 개방 등이 포함된다[51]. AT_1 수용체를 가진 심장 섬유아세포에서도 ANG II는 다양한 신호전달경로 즉 세

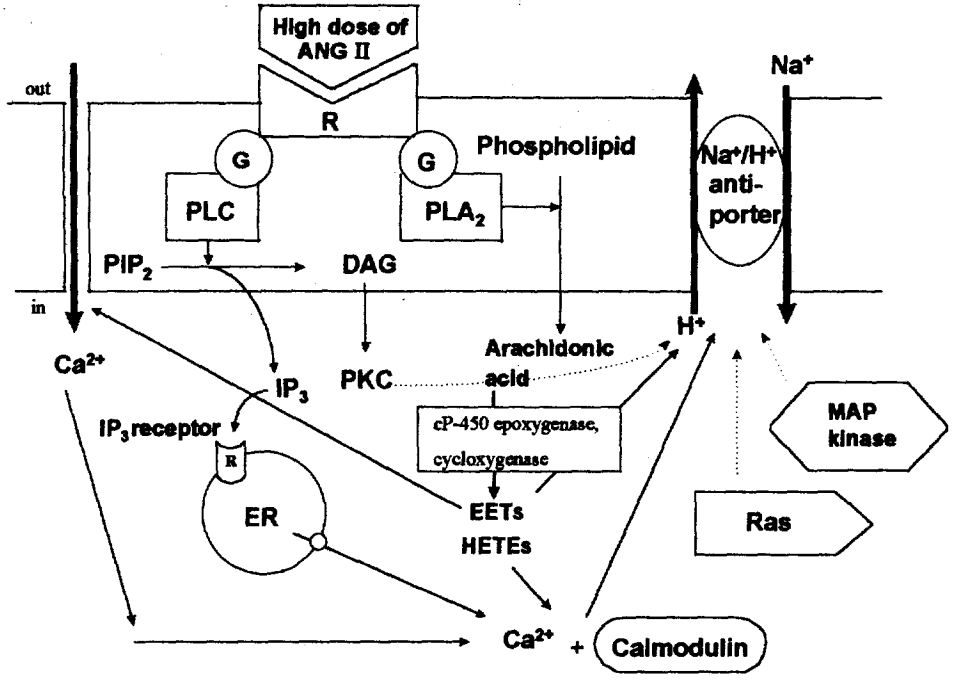


Fig. 6. Model for regulation of Na/H antiporter activity by high dose of ANG II in rabbit renal primary cultured proximal tubule cell. ANG II binding to its receptor is coupled to G-protein that leads to the activation of phospholipase A_2 or production of arachidonic acid metabolites and subsequently inhibition of Na/H antiporter. ANG II also activate PLC with consequent rise in intracellular IP_3 and DAG concentrations, which increased $[Ca^{2+}]_i$ to inhibit the Na/H antiporter. G; GTP binding protein, PLC; phospholipase C, PIP_2; phosphatidylinositol-4,5-bisphophate, IP_3; 1,4,5-inositol-trisphosphate, DAG; diacylglycerol, ER; endoplasmic reticulum, EETs; epoxyeicosatrienoic acids, HETEs; hydroxyeicosatetranoic acids, MAP kinase; mitogen activated protein kinase. solid line; proposed pathway, dash line; suspected pathway.

포내 Ca^{2+} 저장고로 부터 Ca^{2+} 방출과 PKC 활성화를 동반하는 PLC-β, mitogen-activated protein kinases, tyrosine kinase, PLD, phosphatidic acid 형성 및 전사에 관여하는 STAT family들을 활성화시켜 작용하는 것으로 알려지고 있다[52].

1. cAMP-dependent protein kinase(PKA)

cAMP 증가는 NHE1을 발현하는 랫트 이하선 세포, 랫트 갈색 지방조직, 골아세포(UMR-106) 그리고 Chinese hamster 난소세포에서 Na/H 상호운반계를 활성화시킨다고 보고된 바 있다[53-56]. 이와 반대로 LLC-PK_1 세포의 솔변연과 기저막 운반계, OK 세포의 솔변연 운반계, 골아세포 그리고 양과 개의 심장 Purkinje 섬유를 포함한 몇몇 세포에서 cAMP에 의해 Na/H 상호교환계가 억제된다는 보고도 있다[57-61]. 이와 같은 cAMP의 다양한 효과는 NHE 이성체들의 primary sequence와 상호운반계가 발현되는 세포의 특성에 기인한 것으로 보인다. cAMP는 섬유아세포처럼 NHE1을 발현하는 대부분의 세포에서 그 활성에 영향을 미치지 않았다. 실제로 포유동물의 NHE1에는 cAMP에 의한 적절한 인산화 부위가 없다. 또한 cAMP는 상호운반계가 없는 PS120 세포주에서 발현시킨 NHE2와 NHE3에 효과가 없었다. cAMP 인산화 부위가 없는 NHE1은 OK 세포의 기저막에 있는 상호운반계의 발현에 대한 cAMP 억제작용에 민감하다는 보고가 있는데 이는 cAMP 의존성 protein kinase에 의해서 인산화되는 세포 특이적인 조절자가 존재한다는 것을 의미하는 것이다[62]. 실제로, Cabado 등은 최근에 cAMP에 의한 억제작용의 원인이 되는 NHE3의 세포질내 특이부위(amino acid 579-684)를

확인했다[63]. 최근에 Weinman과 그의 동료들은 신장 솔변연으로부터 cAMP에 의한 상호운반계 활성의 억제에 관련되는 것으로 보이는 인산화될 수 있는 보조인자를 분리하였고 이와같은 단백질은 기저막에는 존재하지 않는 것으로 보아 솔변연 특이적인 이성체들과 관련이 있는 것으로 보았다[64]. 또한 조직과 이성체 특이적인 보조인자들은 심장 Purkinje 섬유 등과 같은 다른 세포에서도 관찰되었다[65].

저농도의 ANG Ⅱ에 의한 Na/H 상호운반계의 촉진은 세포막을 통한 Na^+과 bicarbonate flux의 측정을 통해 직, 간접적으로 잘 증명되어졌는데 이는 adenylate cyclase의 활성도 감소와 관련된다는 보고가 있다[66]. ANG Ⅱ에 의한 근위세뇨관(S1) bicarbonate 재흡수의 촉진은 세뇨관액으로의 cAMP 운반에 유의성 있는 감소(18±2 to 12±2 fmol/mm.min)와 관련된다[67]. *in vivo*에서 PTX 전처리시 ANG Ⅱ 유도성 bicarbonate 흡수는 30-45%까지 감소하였고, dibutyryl cAMP(10^{-5}M)를 세뇨관에 관류시켜 세포내 cAMP 농도를 고정했을때 ANG Ⅱ의 상호운반계에 대한 효과가 차단되었다[68]. 조직배양접시에서 배양한 토끼 근위세뇨관세포에서 저농도(10^{-11}~10^{-9}M)의 ANG Ⅱ는 adenylate cyclase의 억제에 의해서 cAMP 수준을 감소시켰다[68]. 이와 같은 결과들은 근위세뇨관(S1)에서 ANG Ⅱ가 자신의 수용체에 결합하여 G_i 단백질에 연결된 adenylate cyclase와 PKA를 통하여 일어나는 것임을 말해준다. 한편 ANG Ⅱ는 간세포에서 세포내 cGMP 농도에 영향을 미치나 근위세뇨관세포에서는 영향을 미치지 않는 것으로 보인다[69]. 세뇨관강내 ANG Ⅱ는 간접적으로 세포내 일련의 과정을 통하여 또는 직접적으로 기저막 수용체에 결합함으로써 이 효소에 영향을 미칠것으로 보이나 세뇨관강내 ANG Ⅱ가 어느 정도 기저막 수용체에 직접 도달하는지는 확실지 않다. Peterson 등이 분리된 토끼 근위직세뇨관의 관류를 이용한 실험을 통하여 단지 소량의 ANG Ⅱ만이 세뇨관 주변으로 방출될 것으로 추정하였다[70]. 솔변연과 세뇨관주변 ANG Ⅱ는 분리된 수용체를 통하여 작용함에도 불구하고 Jv를 촉진하는데 상가작용이 없는 것으로 보아 그들이 각각의 수용체에 결합한 후 일반적인 신호전달경로를 이용하는 것으로 보인다[71].

한편 ANG Ⅱ 유도성 bicarbonate 흡수 증가에 있어서 PKA 억제 효과에 대한 직접적인 실험결과는 없다. OK 세포에서 ANG Ⅱ에 의한 Na/H 상호운반계 촉진은 외래성 8-bromo-cAMP에 의해 차단되는 것으로 보아 cAMP에 비의존적이라는 보고도 있다[72]. 또한 ANG Ⅱ에 의한 Na/H 상호운반계의 조절에 cAMP가 관련이 없다는 것이 랫트 근위세뇨관 기저막 및 분리된 토끼 근위세뇨관을 이용한 실험에서 보고되었다[73, 74]. 이와 더불어 OK 세포에서 Na/H 상호운반계에 대한 ANG Ⅱ의 효과는 PTX-sensitive함에도 불구하고 cAMP 수준에는 영향을 미치지 않았다는 보고도 있다[72]. 솔변연 Na/H 상호운반계에 대한 저농도의 ANG Ⅱ 효과가 PKA 경로와 관련이 있는가를 조사하기 위해 특이적인 PKA 억제제(Rp-8-CTP-cAMP)를 사용하여 Na/H 상호운반계에 대한 효과를 조사하였는데, 단독처리시 운반계 활성에는 영향을 미치지 않았다. 그러나 저농도의 ANG Ⅱ에 의해서 유도된 Na/H 상호운반계의 촉진 효과는 Rp-8-CTP-cAMP의 전처리에 의하여 영향을 받지 않았다[48]. 이들 결과는 저농도의 ANG Ⅱ에 의해서 유도된 Na/H 상호운반계의 촉진 효과에 있어서 PKA의 역할을 의심케 하고 있다.

2. Ca^{2+}/phospholipid-dependent protein kinase(PKC)

NHE1을 활성화시키는데 PKC가 관련되지 않는다는 보고가 있음에도 불구하고 PKC와 관련된 신호전달계의 중요성이 계속 보고되고 있다[75-78]. PKC가 NHE1 활성화에 관여한다는 사실은 1, 2-diacylglycerol과 phorbol esters가 상호운반계를 활성화시키고 PKC 억제제는 상호운반계 활성을 방해하며 PKC 활성이 없는 세포에서 phorbol esters는 상호운반계를 활성화시키지 못하는 것 등으로 알 수 있다. 그래서 PKC가 직접적으로 NHE1을 인산화시켜 활성화시킬 수 있다고 가정해 볼 수 있다. 실제로 phorbol esters는 섬유아세포에서 NHE1 인산화를 증가시켰다[79]. 이 결과와 일치되게 NHE1은 PKC에 의해서 인산화될 수 있는 적절한 부위를 가지고 있다. 사람 NHE1에서 serine-648이 PKC 인산화 부위로 생각된다. 그러나 이와 같은 serine 잔기의 alanine으로의 대치는 phorbol ester에 반응해서 세포질내 알칼리에 중요한 변화를 일으키지 않았다. PKC는 상피세포 종류에 따라 Na/H 상호운반계에 서로 다른 효과를 나타낸다[80]. 예를 들면, phorbol esters는 사람의 회장

암 세포주의 기저막 상호운반계에 효과가 없었으나 신장 세포주인 LLC-PK_1과 OK 세포의 솔변연 상호운반계에는 억제작용을 나타내었다[80-82]. 최근에 phorbol esters는 상호운반계가 없는 PS120 세포에서 발현시킨 NHE3를 억제시키고 NHE1과 NHE2 발현을 활성화시켰다[83].

랫트 근위세뇨관을 이용한 미세관류실험에서 저농도의 ANG Ⅱ에 의해서 유도된 Na^+과 물 흡수의 증가는 PKC를 촉진하는 phorbol ester에 의해서 부분적으로 비슷한 효과가 나타났고 PKC 억제제인 sphingosine 또는 1-(5-isoquinolinessulfonyl)-2-methylpiperazine에 의해서 약화되었다[84]. 다른 PKC 억제제(staurosporine, sphingosine, calphostin) 또한 저농도의 ANG Ⅱ에 의한 Na/H 상호운반계 촉진 효과를 완전히 차단하였다. ANG Ⅱ는 PTX-sensitive한 G protein을 통해 PKC를 활성화시키고, AT_1 수용체 subtype을 통하여 losartan-sensitive하게 농도의존적으로 초기에 inositol phosphate 생산을 촉진하고 이어 세포내 Ca^{2+} 저장고로 부터 Ca^{2+} 방출을 촉진시켜 세포질내 Ca^{2+} 농도를 높이고 또한 농도의존적으로 PKC 이성체의 전위를 유도한다는 것이 사구체 간질세포와 랫트 근위세뇨관세포를 이용한 실험에서 증명되었다[48]. 이와 더불어 저농도의 ANG Ⅱ가 PKC 경로를 경유하여 솔변연 Na/H 상호운반계를 촉진시킨다는 확실한 몇몇 보고가 있다[49, 85]. 이는 phorbol ester가 솔변연에서 Na/H 상호운반을 촉진시킨다는 사실과 일치한다[84]. 이와 같은 결과는 ANG Ⅱ에 의한 근위세뇨관 Na/H 상호운반계 촉진에 있어서 PKC가 부분적으로 중요한 신호전달물질임을 말해준다. 그러나 배양한 토끼 근위세뇨관세포에서 ANG Ⅱ는 inositol phosphate 생산을 촉진시키지 못했다는 결과도 있다[86].

3. $[Ca^{2+}]_i$

Ca^{2+} ionophore A23187이 HSWP세포(human foreskin fibroblast)에서 Na^+ influx를 촉진시킨다는 첫 보고는 세포내 Ca^{2+}이 NHE1을 촉진시킨다는 증거가 되었다[87, 88]. 세포질내 Ca^{2+} 농도의 증가는 Ca^{2+}/CaM-dependent protein kinase 또는 protein kinase C를 활성화시킬 것이고 결과적으로는 NHE1의 인산화와 활성화를 일으킬 것이라고 생각했다. 그러나 Ca^{2+} ionophore로 급작히 유도된 NHE1의 활성화 동안에 NHE1 인산화의 유의성있는 증가는 관찰되지 않았다[89]. 최근에 Shigeo Wakabayshi 그룹은 NHE1이 Ca^{2+}/calmodulin(CaM)-binding protein 이며 그것의 활성은 세포내 Ca^{2+} 농도에 의해서 조절될 것이라고 하였다[90, 91]. NHE1의 cytoplasmic domain은 20nM의 친화력을 가지고 Ca^{2-} 의존적인 방식으로 CaM과 결합한다. 20개 아미노산(~637-656)의 제거나 이 부위의 양전하를 반전시키는 변이는 CaM/Ca^{2+} 결합을 억제하였다[90]. 보다 중요한 것은 ionomycin으로 세포질내 Ca^{2+} 농도를 증가시킬경우 NHE1의 pH_i 의존성이 알칼리성 pH 쪽으로 이동한다는것이다. 이와 같은 사실은 NHE1에 CaM-binding domain의 존재를 의미한다.

근위세뇨관세포의 ANG Ⅱ 수용체와 phosphoinositide 전환의 연결은 랫트에서 잘 증명되었고 그것을 위해 ANG Ⅱ의 솔변연내 세포내이입은 phospholipase C(PLC) 활성화를 위해 필요하다고 하였다[92]. 그러나 토끼 근위세뇨관세포에서 ANG Ⅱ에 의한 PLC 활성화는 제시되지 못했다[71]. 랫트에서 솔변연과 기저막의 고농도 ANG Ⅱ(10^{-6}M)는 phosphoinositide의 가수분해를 유의성있게 촉진하였다[92]. 이 효과는 Ca^{2+} 유입에 의존하지 않기 때문에 세포외액에 Ca^{2+}이 없는 상태에서도 촉진이 일어난다. 이것은 솔변연 또는 기저막쪽 ANG Ⅱ가 직접적으로 PLC를 촉진하고 이차적으로 PKC를 활성화시킴을 말해준다. 지금까지 알려진 PLC는 3가지가 있는데 즉 β, γ, δ이다. 다양한 연구결과 PLC β(β1-β4)는 heterotrimeric한 G protein의 α 또는 $\beta\gamma$ subunit에 의해, PLC-γ(PLC-γ1, PLC-γ2)는 tyrosine 인산화에 의해, PLC δ는 calcium에 의해서 활성화 된다는 것이 밝혀졌다[93]. 배양된 랫트 대동맥 평활근세포 및 랫트 사구체 간질세포에서 ANG Ⅱ는 PLC-γ1을 활성화시켜 phosphatidyl-inositol-4,5-bis-phosphate로부터 diacylglycerol과 inositol-1, 4, 5-trisphosphate(IP_3)의 유리를 일으키며, 유리된 IP_3는 세포내 Ca^{2+} 저장고로 부터 Ca^{2-}을 방출시켜 세포질내 Ca^{2-} 농도를 일시적으로 증가시킨다[94]. 근위세뇨관 또는 랫트 근위세뇨관 미세관류실험에서 고농도의 ANG Ⅱ에 의한 bicarbonate 흡수의 억제는 calcium ionophore인 ionomycin의 효과와 비슷하고 세포내 Ca^{2-} 동원 차단제로 사용되는 TMB-8에 의해서 차단되었다[94]. 이들 결과로 보아 고농도의 ANG Ⅱ는 세포질

내 Ca^{2+} 농도를 증가시켜 근위세뇨관세포의 물질이동을 억제시킨다는것을 말해주고 있다. 토끼 근위세뇨관세포에서도 A23187에 의해 renin 분비가 억제된다는 결과는 이 가설을 뒷받침해 주고 있다[95]. 고농도의 ANG II(10^{-6}M)는 토끼의 AT_1 ANG II 수용체를 가지고 형질전환시킨 LLC-PK_1/Cl_4 세포에서 PLC를 활성화시키며 배양된 랫트 근위세뇨관세포에서도 솔변연 ANG II 수용체를 통하여 PLC를 활성화시켜 Na^+ 수송을 촉진 시킨다는 보고가 있다[92, 96]. 또한 신장 근위세뇨관세포에 고농도의 ANG II를 처리하면 voltage sensitive Ca^{2+} 통로를 통하여 세포외액으로부터 Ca^{2+} 유입이 증가한다는 보고도 있다[68]. 또한 송아지 사구체세포에서 ANG II는 T형의 Ca^{2+} 통로를, 랫트 사구체세포에서 Ca^{2+}-permeant 비선택적 양이온 통로를, 토끼 근위세뇨관세포에서 L형 Ca^{2+} 통로를 활성화 시켜 세포외액으로부터 Ca^{2+} 유입을 일으킨다는 보고들로 보아 ANG II의 Na/H 상호운반계 조절 작용에 있어서 $[Ca^{2+}]_i$이 매우 중요한 역할을 하는 것으로 보인다[97-99]. 이렇게 ANG II에 의해 증가된 세포질내 Ca^{2+}은 랫트 근위세뇨관에서 Cl^- 통로를 활성화 시키기도 한다[100].

4. Ca^{2+}/CaM-dependent protein kinase II (Ca^{2+}/CaMKII)

Ca^{2+}/CaMKII가 NHE1의 조절에 관련된다는 직접적인 증거는 없으나 세포질내 Ca^{2+}은 몇몇 세포의 상호운반계를 촉진하는 것으로 알려졌다[101, 102]. 한편 솔변연 막 단백질 소포를 이용한 실험에서 상호운반계는 Ca^{2+}, CaM 및 ATP의 혼합체에 의해서 억제되었다[103]. 최근에 Levine 등은 CaM 길항제인 W-13 또는 CaMKII 억제제인 KN-62가 carboxyterminal (amino acids 757-832)에 의존하는 방식으로 NHE3를 활성화시킨다고 보고하였다[104]. 그러므로 NHE1과 NHE3는 서로 다른 방식으로 세포질내 Ca^{2+}에 의해서 조절된다고 보여진다. 그러나 NHE3는 OK세포에서 Ca^{2+}/CaMKII 의존적인 경로를 통하여 부분적으로 촉진된다는 결과도 있다[105]. 또한 두가지의 다른 Ca^{2+}/CaMKII 억제제(TFP, W7)가 Na/H 상호운반계 활성을 촉진시키는 것으로 보아 Ca^{2+}/ CaMKII가 상호운반계에 지속적인 억제효과를 발휘한다고 보여진다. 또한 Ca^{2+}/CaMKII는 근위세뇨관 솔변연과 LLC-PK_1 세포의 솔변연 Na/H 상호운반계를 억제하는 것으로 보고되었다[106, 107]. 토끼 근위세뇨관세포에 ionomycin 처리시 Na/H 상호운반계는 억제되었고, 또한 세포내 Ca^{2+} chelator인 1,2-bis(2-aminophenoxy)ethane-N, N, N', N'-tetraacetic acid와 Ca^{2+}/CaMKII 억제제인 KN-62에 해서도 차단되었다[108]. 이와 같은 결과는 Ca^{2+}/CaMKII가 직접적으로 재구성된 Na/H 상호운반계의 활성을 억제시킨다는 사실과 일치한다[103]. 그러나 랫트에서 고농도의 ANG II는 Ca^{2+}/CaMKII가 억제되든지 안되든지 간에 Na/H 상호운반계를 동일하게 억제시켰는데 이는 Ca^{2+}/CaMKII가 고농도의 ANG II의 효과를 매개하는데 관여하지 않는다는 것을 의미한다[48]. 또한 10^{-8}~10^{-6}M의 ANG II는 토끼 신장 근위세뇨관세포에서 $[Ca^{2+}]_i$에 일시적인 증가를 가져왔지만 이들 세포에서 ANG II 유도성 $[Ca^{2+}]_i$의 변화가 세포외액의 Ca^{2+} 양에 의존하고, phosphatidyl-inositol-4,5-bis-phosphate의 가수분해를 촉진하지 못했다. 이와 같은 사실로 보아 ANG II의 Na/H 상호운반계 억제 작용에 있어서 PLC 이외의 다른 신호전달경로가 관여하는 것으로 생각된다.

5. Phospholipase A_2(PLA_2)

ANG II가 작용하는데 있어서 지방족에 속하는 신호전달물질이 관련된다는 것이 그것의 수용체를 가진 다양한 세포모델에서 보고되었다[109]. PLA_2는 14-kDa Ca^{2+} 의존성 및 sn-2 arachidonyl specific cytosolic PLA_2(cPLA_2), Ca^{2+} 비의존성 PLA_2, 분비성 PLA_2를 포함하여 여러 가지가 있는데 이중에서 cPLA_2가 많은 수용체에 의해 매개된 arachidonic acid 방출에 관여하는것 같다. 여기에서 Ca^{2+} 의존성 PLA_2의 경우 Ca^{2+}은 촉매작용이라기 보다는 세포막 또는 인지질 소포로의 cPLA_2의 결합에 이용된다[110, 111]. 한편 LLC-PK_{cl4} 세포와 심근세포의 arachidonic acid 방출은 Ca^{2+} 비의존적인 PLA_2의 활성에 의해 일어나며 선택적으로 HELSS 억제성 arachidonic acid 방출을 촉진한다[112]. PLA_2에 의해 방출된 arachidonic acid는 세 가지 주요 경로 즉 cycloxygenase, lipoxygenase, cytochrome P-450 monoxygenase에 의해 대사된다.

ANG II는 다양한 조직에서 혈관을 수축시키거나, 너무 과도한 수축시는 음성되먹이기 기전으로 cycloxygenase를 활성화시켜 prostaglandin들(PGE_2 및

PGI_2)의 생산을 촉진해 혈관을 확장시킨다[113]. 한편 사람 태반에서 ANG Ⅱ는 lipoxygenase를 자극해 12 HETE의 방출을 증가시켜 혈관수축 효과를 나타냈고 랫트의 혈관 AT_{1A} ANG Ⅱ 수용체를 과대 발현시킨 Chinese hamster 난소 섬유세포에서는 MAP kinase를 활성화시켜 성장에 관여한다는 보고도 있다[114, 115]. 한편 ANG Ⅱ는 랫트의 수질옆 네프론에서 lipoxygenase 및 cytochrome P-450 monoxygenase 경로를 통하여 수입소동맥 수축을 일으켰고 고양이의 폐혈관상에서는 부분적으로 PLA_2, PLC, lipoxygenase의 활성을 변화시켜 혈관을 수축시켰다[116, 117]. 이처럼 ANG Ⅱ의 작용경로는 종과 기관에 따라 다양하고 복잡하게 나타난다. 혈관평활근에서 ANG Ⅱ는 수초내에 PLC 및 Ca^{2+}을 동원시키고 수분내에 PLD, PLA_2, PKC 및 MAP kinase의 활성화를, 그리고 수시간내에 유전자 복사 및 NADP/NADPH oxidase를 활성화 시키는 것으로 보아 시간에 따라 다양한 세포반응이 일어나고 있음을 보여준다[118]. 신장은 풍부한 cycloxygenase 뿐만 아니라 높은 P-450 monoxygenase 활성을 보여주는 것으로 보아 arachidonic acid 대사의 주된 장소이다[119]. Cytochrome P-450 monoxygenase는 arachidonic acid를 4가지의 epoxyeicosatrienoic acid(5,6-, 8,9-, 11,12-, 14,15-EET)와 그와 관련된 vicinial diols (DHET), 19-, 20-hydroxyeicosatetraenoic acids 또는 w-/w-1 alcohols을 포함한 몇가지의 새로운 생활성 물질로 전환시킨다[120-122]. 랫트의 근위세뇨관에 ANG Ⅱ 처리시 epoxygenase의 활성이 촉진되었으며 뇨중에서 5,6-DHET가 epoxygenase에 의해 생산되는것으로 보아 신장이 5,6-epoxydation의 장소임을 말해 주고 있다. Douglous 등은 근위세뇨관에서 고농도의 ANG Ⅱ(10^{-9}~10^{-6}M)가 5,6 EET의 생성을 촉진하여 Na^+ 수송을 억제한다고 보고하였다. 이와 함께 5,6 EET가 Ca^{2-} 방출을 억제시킨다는 사실은 arachidonic acid 대사와 Ca^{2-}과의 관련성을 시사해 준다[68]. 식이성으로 많은 양의 염 섭취는 정상 랫트에서 뇨중 EET 및 DHET 분비를 증가시켰으나 흥미롭게도 Dhal salt-sensitive 고혈압 랫트에서 epoxygenase 활성의 증가는 보이지 않았다. 그러나 Dhal salt-resistant rat는 Na^+ 섭취 증가시 신장에서 epoxygenase 활성을 증가시켰다[123]. 이는 혈압조절과 신장 epoxygenase system이 관련됨을 의미하는것인데 이는 arachidonic acid의 대사물질인 EET와 w-/w-1 수화물들이 신장 혈관의 긴장성과 상피세포의 Na^+ 이동을 조절하는 것에 의해서 더욱 확증되었다[124]. 5,6 EET는 토끼 신피질 집합관에서 Na^+ 흡수를 억제하여 결과적으로 transepithelial voltage에 탈분극을 일으켰다[68]. 이와 같은 Na^+ 흡수 억제는 나트륨 요증을 일으켜 Na^+ 저류와 고혈압을 방어하였다[125]. 또한 5,6 EET는 cycloxygenase에 의해 PGE_2의 생산을 촉진시켰고, 뇌하수체 및 이하선 세포에서 세포질내 Ca^{2+} 농도를 증가시키고 분비기능을 매개하는데 관여한다는 보고도 있는것으로보아 다른 경로도 함께 관련되는 것으로 보인다[126-128]. 배양한 토끼 근위세뇨관세포에서 고농도의 ANG Ⅱ에 의한 5,6 EET 생산 촉진과 솔변연 Na/H 상호운반계 활성 억제효과가 P-450 epoxygenase 억제제인 ketonazole 또는 econazole에 의해서 차단되는 것으로 보아, 5,6 EET는 ANG Ⅱ가 Na/H 상호운반계 억제 효과를 나타는데 중요한 신호전달물질임을 알 수 있다[50, 86]. 이와 같은 결과들은 Na^+ 평형, 고혈압, 신장 P-450 epoxygenase 활성간에 중요한 상관관계가 있음을 시사한다.

요 약

ANG Ⅱ는 신장 근위세뇨관세포에서 Na^+을 재흡수하는데 있어서 농도의존적으로 이상성 효과를 보인다. 즉 저농도의 ANG Ⅱ는 근위세뇨관세포에서 Na^+ 재흡수를 촉진하고 고농도는 이를 억제한다. 이와같은 근위세뇨관세포의 Na^+ 재흡수에 대한 ANG Ⅱ의 이상성 효과와 관련된 신호전달경로에 대해서 많은 연구가 이루어지고 있지만 여전히 많은 의문점을 남기고 있다. 현재까지 밝혀진 신호전달경로들을 간단히 요약해 보면 다음과 같다.

저농도의 ANG Ⅱ에 의한 Na^+ 재흡수 촉진 효과는 cAMP- dependent protein kinase(PKA)보다는 주로 Ca^{2-}/phospholipid-dependent protein kinase (PKC) 경로를 경유하여 이루어지는 것으로 보인다. 반면 고농도의 ANG Ⅱ에 의한 억제 효과는 $[Ca^{2+}]_i$ 증가, calcium-calmodulin-dependent kinase(Ca^{2+}/CaMKII), phospholipase A_2(PLA_2) 및 cytochrome P-450 의존성 대사산물(arachidonic acid, 5,6-EET) 등이 관련되는 것으로 보인다.

그러나 이와 같은 연구결과들은 사용하는 종(세포 또는 실험동물)과 기관 및 연구 방법에 따라 다양하고 복잡하게 나타나기 때문에 ANG II 농도에 따른 신호전달경로들과 그것의 효과를 단정적으로 말하기는 매우 어려운 실정이다. 향후 ANG II의 농도에 따른 다양한 기능들과 그와 관련된 각각의 신호전달경로들이 정확히 밝혀진다면 생리 및 병태생리적 상태(예; 고혈압)에 따라 ANG II를 효과적으로 사용(예방 및 치료제)할 수 있을 뿐만 아니라 그 활용성을 더욱 넓힐 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 글

본 과제는 한국과학재단 핵심전문연구비와 호르몬 연구센터(KOSEF 961-0606-057-1, HRC 97-0401-0401)의 지원을 받아 수행되었다. 본 원고를 정리하고 모델을 그리는데 도움을 준 박수현, 고현주 선생에게 감사드린다.

참 고 문 헌

1) Noel J, Pouyssegur J : *Hormonal regulation, pharmacology, and membrane sorting of vertebrate Na^+/H^+ exchanger isoforms. Am J Physiol 268:C283-C296, 1995*
2) Wakabayashi S, Shigekawa M, Pouyssegur J : *Molecular physiology of vetebrate Na^+/H^+ exchangers. Physiological Reviews 77:51-74, 1977*
3) Weinman EJ, Shenolikar S : *Regulation of the renal brush border membrane Na^+-H^+ exchanger. Ann Rev Physiol 55:289-304, 1993*
4) Murer H, Krapf R, Helmle-Kolb C : *Regulation of renal proximal tubular Na/H-exchange : A tissue culture approach. Kidney Int Suppl 44: S23-S31, 1994*
5) Seldin DW, Preisig PA, Alpern RJ : *Regulation of proximal reabsorption by effective arterial blood volume. Seminar in Nephrology 11:212-219, 1991*
6) Alpern RJ, Moe OW, Preisig PA : *Chronic regulation of the proximal tubular Na/H antiporter : From HCO_3 to SRC. Kidney Int 48:1386-1396, 1995*
7) Preisig PA, Ives HE, Cragoe EJ, Alpern RJ, Rector FC JR : *Role of the Na/H antiporter in rat proximal tubule bicarbonate absorption. J Clin Invest 80:970-978, 1987*
8) Preisig PA, Rector FC JR : *Role of Na-H antiport in rat proximal tubule NaCl absorption. Am J Physiol 255:F461-F465, 1988*
9) Soleimani M, Aronson PS : *Ionic mechanism of Na^+/HCO_3^- cotransport in rabbit renal basolateral membrane vesicles(BLMV). J Biol Chem 264:18302-18308, 1989*
10) Mrkic B, Tse CM, Forgo J, Helmle-Kolb C, Donowitz M, Murer H : *Indentification of PTH-responsive Na/H-exchanger isoforms in a rabbit proximal tubule cell line(RKPC-2). Pflugers Arch 424:377-384, 1993*
11) Smith MC, Dunn MJ, in The kidney(Brenner BM, Rector FC, etc) : *pp1221-1251, 1986*
12) Bottari SP, De Gasparo M, Steckelings UM, Levens NR : *Angiotensin II receptor subtypes : characterization, signaling mechanisms, and possible physiological implications. Frontiers Neuroendocrinol 14:123-171, 1993*
13) Burns KD, Homma T, Harris RC : *The intrarenal renin-angiotensin system. Semin Nephrol 13:13-30, 1993*
14) Wolf G, Stahl RA : *Angiotensin II-stimulated hypertrophy of LLC-PK1 cells depends on the induction of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1. Kidney Int 50:6,2112-2119, 1996*
15) Wolf G, Mueller E, Stahl RA, Ziyadeh FN : *Angiotensin II-induced hypertrophy of cultured murine proximal tubular cells is mediated by endogenous transforming growth factor-β. J Clin Invest 92:1366-1372, 1993*
16) Hsueh WA, Do YS, Anderson PW, Law RE : *Angiotensin II in cell growth and matrix production. Adv Exp Med Biol 377:217-223, 1995*
17) Harris PJ, Navar LG : *Tubular transport responses to angiotensin. Am J Physiol 248:F261-F630, 1985*
18) Schuster VL, Kokko JP, Jacobson HR : *Angiotensin II directly stimulates sodium transport in rabbit proximal convoluted tubules. J Clin Invest 73:507-515, 1984*
19) Yanagawa N, Capparelli AW, Jo OD, Friedal A, Barrett JD, Eggena P : *Production of angiotensinogen and renin-like activity by rabbit proximal tubular cells in culture. Kindney Int 39:938-941, 1991*
20) Guder WG : *Stimulation of renal gluconeogenesis by angiotensin II. Biochim Biophys Acta 584: 507-519, 1979*
21) Chobanian MC, Julin CM : *Angiotensin II stimulates ammoniagenesis in canine renal proximal segments. Am J Physiol 260:F19-F26, 1991*

22) Nagami GT : *Effect of luminal angiotensin II on ammonia production and secretion by mouse proximal tubules. Am J Physiol 269:F86-F92, 1995*
23) Norman J, Badie-Dezfooly B, Nord EP, Kurtz I, Schlosser J, Chaudhari A, Fine LG : *EGF-induced mitogenesis in proximal tubular cells : potentiation by angiotensin II. Am J Physiol 253:F299-F309, 1987*
24) Defendini R, Zimmerman EA, Weare JA, Alhenc-Gelas F, Erdos EG : *Angiotensin-converting enzyme in epithelial and neuroepithelial cells. Neuroendocrinology 37:32-40, 1983*
25) Wolf G, Neilson EG : *Angiotensin II induces cellular hypertrophy in cultured murine proximal tubule cells. Am J Physiol 259:F768-F777, 1990*
26) Griendling KK, Lassegue B, Alexander RW : *Angiotensin receptors and their therapeutic implications. Annu Rev Pharmacol Toxicol 36:281-306, 1996*
27) Timmermans PB, Wong PC, Chiu AT, Herblin WF, Benfield P, Carini DJ, Lee RJ, Wexler RR, Saye JA, Smith RD : *Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists. Pharmacol Rev 45:205-251, 1993*
28) Sasamura H, Hein L, Krieger JE, Pratt RE, Kobilka BK, Dzau VJ : *Cloning, characterization, and expression of two angiotensin receptor (AT-1) isoforms from the mouse genome. Biochem Biophys Res Commun 185:253-259, 1992*
29) Elton TS, Stephan CC, Taylor GR, Kimball MG, Martin MM, Durand JN, Oparil S : *Isolation of two distinct type I angiotensin II receptor genes. Biochem Biophys Res Commun 184: 1067-1073, 1992*
30) Iwai N, Inagami T : *Identification of two subtypes in the rat type I angiotensin II receptor. FEBS Lett 298:257-260, 1992*
31) Konishi H, Kuroda S, Inada Y, Fujisawa Y : *Novel subtype of human angiotensin II type 1 receptor : cDNA cloning and expression. Biochem Biophys Res Commun 199:467-474, 1994*
32) Burson JM, Aguilera G, Gross KW, Sigmund CD : *Differential expression of angiotensin receptor 1A and 1B in mouse. Am J Physiol 267: E260-E267, 1994*
33) Gasc JM, Shanmugam S, Sibony M, Corval P : *Tissue-specific expression of type I angiotensin II receptor subtypes. An in situ hybridization study. Hypertension 24:531-537, 1994*
34) Kakar SS, Riel KK, Neill JD : *Differential expression of angiotensin II receptor subtype mRNAs(AT-1A and AT-1B) in the brain. Biochem Biophys Res Commun 185:688-692, 1992*
35) Oliverio MI, Best CF, Kim HS, Arendshorst WJ, Smithies O, Coffman TM : *Angiotensin II responses in AT_{1A} receptor-deficient mice : a role for AT_{1B} receptors in blood pressure regulation. Am J Physiol 272:F515-F520, 1997*
36) Grady EF, Sechi LA, Griffin CA, Schambelan M, Kalinyak JE : *Expression of AT_2 receptors in the developing rat fetus. J Clin Invest 88:921- 933, 1991*
37) Tsutsumi K, Viswanathan M, Stromberg C, Saavedra JM : *Type-1 and type-2 angiotensin II receptors in fetal rat brain. Eur J Pharmacol 198:89-92, 1991*
38) Viswanathan M, Tsutsumi K, Correa FMA, Saavedra JM : *Changes in expression of angiotensin receptor subtypes in the rat aorta during development. Biochem Biophys Res Commun 179: 1361-1367, 1991*
39) Kakuchi J, Ichiki T, Kiyama S, Hogan BLM, Fogo A, Inagami T, Ichikawa I : *Ontogenic activation of renal angiotensin II receptor gene in the mouse. Kidney Int 47:140-147, 1995*
40) Stoll M, Steckelings M, Paul M, Bottari SP, Metzger R, Unger T : *The angiotensin AT2-receptor mediates inhibition of cell proliferation in coronary endothelial cells. J Clin Invest 95:651-657, 1995*
41) Nakajima M, Horiuchi M, Morishita R, Yamada T, Pratt RE, Dzau VJ : *Growth inhibitory function of type 2 angiotensin II receptor: gain of function study by in vivo gene transfer(abstract). Hypertension 24:379, 1994*
42) Scheuer DA, Perrone MH : *Angiotensin II type 2 receptors mediate depressor phase of biphasic pressure response to angiotensin. Am J Physiol 264:R917-R923, 1993*
43) Cogan MG, Liu F-Y, Wong PC, Timmermans P : *Comparison of inhibitory potency by nonpeptide angiotensin II receptor antagonists PD123177 and Dup 753 on proximal nephron and renal transport. J Pharmacol Exp Thers 259:687-691, 1991*
44) Naveri L, Stromberg C, Saavedra JM : *Angiotensin II AT_2 receptor stimulation increases cerebrovascular resistance during hemorrhagic hypotension in rats. Regul Pept 52:21-29, 1994*
45) Reilly AM, Harris PJ, Williams DA : *Biphasic effect of angiotensin II on intracellular sodium concentration in rat proximal tubules. Am J Physiol 269:F374-F380, 1995*

46) Wong PS, Johns EJ : *The action of angiotensin II on the intracellular sodium content of suspensions of rat proximal tubules. J Physiol (Lond) 497:219-227, 1996*
47) Coppola S, Fromter E : *An electrophysiological study of angiotensin II regulation of Na-HCO_3 cotransport and K conductance in renal proximal tubules. II. Effect of micromolar concentrations. Pflugers Arch 427:151-156, 1994*
48) Houillier P, Chambrey R, Achard JM, Froissart M, Poggioli J, Paillard M : *Signaling pathways in the biphasic effect of angiotensin II on apical Na/H antiport activity in proximal tubule. Kidney Int 50:1496-1505, 1996*
49) Han HJ, Koh HJ, Park SH : *Regulatory mechanisms of angiotensin II on the Na^+/H^+ antiport system in rabbit renal proximal tubule cells. I. Stimulatory effects of ANG II on Na^+ uptake. Korean J Physiol Pharmacol 1:413-423, 1997*
50) Han HJ, Park SH, Koh HJ : *Regulatory mechanisms of angiotensin II on the Na^+/H^+ antiport system in rabbit renal proximal tubule cells. II. Inhibitory effects of ANG II on Na^+ uptake. Korean J Physiol Pharmacol 1:425-434, 1997*
51) Harris PJ, Hiranyachattada S, Antoine AM, Walker L, Reilly AM, Eitle E : *Regulation of renal tubular sodium transport by angiotensin II and atrial natriuretic factor. Clin Exp Pharmacol Physiol Suppl 3:S112-S118, 1996*
52) Booz GW, Baker KM : *Molecular signaling mechanisms controling growth and function of cardiac fibroblast. Cardiovasc Res 30:4,537-543, 1995*
53) Manganel M, Turner RJ : *Agonist-induced activation of Na^+/H^+ exchange in rat parotid acinar cells. J Membr Biol 111:191-198, 1989*
54) Giovannini P, Seydoux PJ, Girardier L : *Evidence for a modulating effect of Na^+-H^+ exchange on the metabolic response of rat brown adipose tissue. Plugers Arch 411:273-277, 1988*
55) Azarani A, Orliowski J, Goltzman D : *Parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide activate the Na^+/H^+ exchanger NHE-1 isoform in osteoblastic cells(URM-106) via a cAMP-dependent pathway. J Biol Chem 270: 23166-23172, 1995*
56) Kandasamy RK, Yu FH, Harris R, Boucher A, Hanrahan JW, Orlowski J : *Plasma membrane Na^+/H^+ exchanger isoforms(NHE-1, -2, and -3) are differentially responsive to second messenger agonists of the protein kinase A and C pathways. J Biol Chem 270:29209-29216, 1995*
57) Casavola V, Reshkin SJ, Murer H, Helmle-Kolb C : *Polarized expression of Na^+/H^+ exchange activity in LLC-PK1/PKE20 cells : II. Hormonal regulation. Pflugers Arch 420:282-289, 1992*
58) Cano A, Preisig P, Alpern RJ : *Cyclic adenosine monophosphate acutely inhibits and chronically stimulates Na/H antiporter in OKP cells. J Clin Invest 92:1632-1638, 1993*
59) Green J, Kleeman CR : *Role of calcium and cAMP messenger systems in intracellular pH regulation of osteoblastic cells. Am J Physiol 262:C111-C121, 1992*
60) Guo H, Wasserstrom JA, Rosenthal JE : *Effect of catecholamines on intracellular pH in sheep cardiac Purkinje fibres. J Physiol(Lond) 458:289-306, 1992*
61) Wu ML, Tseng YZ : *The modulatory effects of endothelin-1, carbachol and isoprenaline upon Na^+-H^+ exchange in dog cardiac Purkinje fibres. J Physiol(Lond) 471:583-597, 1993*
62) Helmle-Kolb C, Counillon L, Roux D, Pouyssegur J, Mrkic B, Murer H : *Na/H exchange activities in NHE1 transfected OK-cells : cell polarity and regulation. Pflugers Arch 425:34-40, 1993*
63) Cabado AG, Yu FH, Kapus A, Lukacs G, Grinstein S, Orlowski J : *Distinct structural domains confer cAMP sensitivity and ATP dependence to the Na^+/H^+ exchanger NHE3 isoform. J Biol Chem 271:3590-3599, 1996*
64) Weinman EJ, Steplock D, Shenolikar S : *cAMP mediated inhibition of the renal brush border membrane Na^+-H^+ exchanger requires a dissociable phosphoprotein cofactor. J Clin Invest 92:1781-1786, 1993*
65) Wu ML, Tseng YZ : *The modulatory effects of endothelin-1, carbachol and isoprenaline upon Na^+-H^+ exchange in dog cardiac Pukinje fibres. J Physiol(Lond) 471:301-313, 1993*
66) Wang T, Chan YL : *Mechanism of angiotensin II action on proximal tubular transport. J Pharmacol Exp Ther 252:689-695, 1990*
67) Liu FY, Cogan MG : *Angiontensin II stimulates early proximal bicarbonate absorption in the rat by decreasing cyclic adenosine monophosphate. J Clin Invest 84:83-91, 1989*
68) Douglas JG, Romero M, Hopfer M : *Signaling mechansims coupled to the angiotensin receptor of proximal tubular epithelium. Kidney Int Suppl 30:S43-S47, 1990*
69) Huang C-L, Ives HE, Cogan MG : *In vivo evidence that cGMP is the second messenger for atrial natriuretic factor. Proc Natl Acad Sci*

USA 83:8015-8018, 1986

70) Peterson DR, Chrabaszcz G, Peterson WR, Oparil S : *Mechanism for renal tubular handling of angiotensin. Am J Physiol 236:F365-F372, 1979*

71) Li L, Wang YP, Capparelli AW, Jo OD, Yanagawa N : *Effect of luminal angiotensin II on proximal tubule fluid transport : role of apical phospholipase A_2. Am J Physiol 266:F202-F209, 1994*

73) Liu FY, Cogan MG : *Angiontensin II stimulates early proximal bicarbonate absorption in the rat by decreasing cyclic adenosine monophosphate. J Clin Invest 84:83-91, 1989*

74) Eitle E, Harris PJ, Morgan YO : *Effects of atrial natriuretic factor on cyclic nucleotides in rabbit proximal tubule. Hypertension 23:358-363, 1994*

72) Cano A, Miller RT, Alpern RJ, Preisig PA : *Angiotensin II stimulation of Na-H antiporter activity is cAMP independent in OKP cells. Am J Physiol 266:C1603-C1608, 1994*

75) Vilella S, Guerra L, Helmle-Kolb C, Murer H : *Aldosterone actions on basolateral Na^+/H^+ exchange in Madin-Darby canine kidney cells. Pflugers Arch 422:9-15, 1992*

76) Moolenaar WH : *Effects of growth factors on intracellular pH regulation. Annu Rev Physiol 48: 363-376, 1986*

77) Lowe JH, Huang CL, Ives HE : *Sphingosine differentially inhibits activation of the Na^+/H^+ exchanger by phorbol esters and growth factors. J Biol Chem 265:7188-7194, 1990*

78) Huang CL, Cogan MG, Cragoe EJ, Ives HE : *Thrombin activation of the Na^+/H^+ exchanger in vascular smooth muscle cells. Evidence for a kinase C-independent pathway which is Ca^{2+}-dependent and pertussis toxin-sensitive. J Biol Chem 262:14134-14140, 1987*

79) Sardet C, Counillin L, Franchi A, Pouyssegur J : *Growth factors induce phosphorylation of the Na^+/H^+ antiporter, a glycoprotein of 110kD. Science Wash DC 247:723-726, 1990*

80) Watson AJ, Levine S, Donowitz M, Montrose MH : *Kinetics and regulation of a polarized Na^+-H^+ exchanger from Caco-2 cells, a human intestinal cell line. Am J Physiol 261:G229-G238, 1991*

81) Haggerty JG, Agarwal N, Reilly RF, Adelberg EA, Slayman CW : *Pharmacologically different Na/H antiporters on the apical and basolateral surfaces of cultured porcine kidney cells(LLC-PK1). Proc Natl Acad Sci USA 85:6797-6801, 1988*

82) Helmle-Kolb C, Montrose MH, Stange G, Murer H : *Regulation of Na^+/H^+ exchange in opossum kidney cells by parathyroid hormone, cyclic AMP and phorbol esters. Pflugers Arch 415: 461-470, 1990*

83) Tse CM, Levine SA, Yun CH, Brant SR, Pouyssegur J, Montrose MH, Donowitz M : *Functional characteristics of a cloned epithelial Na^+/H^+ exchanger(NHE3) : resistance to amiloride and inhibition by protein kinase C. Proc Natl Acad Sci USA 90:9110-9114, 1993*

84) Steplock D, Hise M, Weinman EJ : *Phorbol esters stimulate Na^+/H^+ exchange in rabbit renal brush border membrane vesicles. Kidney Int 29: 408, 1986*

85) Liedtke CM, Thomas L : *Phorbol ester and okadaic acid regulation of Na-2Cl-K cotransport in rabbit tracheal epithelial cells. Am J Physiol 271:C338-C346, 1996*

86) Madhun ZT, Goldthwait DA, Mckay D, Hopfer U, Douglas JG : *An epoxygenase metabolite of arachidonic acid mediates angiotensin II-induced rises in cytosolic calcium in rabbit proximal tubule epithelial cells. J Clin Invest 88:456-461, 1991*

87) Vicentini LM, Villereal ML : *Activation of Na^+/H^+ exchange in cultured fibroblasts : synergism and antagonism between phorbol ester, Ca^{2+} ionophore, and growth factors. Proc Natl Acad Sci USA 82:8053-8056, 1985*

88) Wakabayashi S, Bertrand B, Ikeda T, Pouyssegur J, Shigekawa M : *The Na^+/H^+ exchanger isoform 1(NHE1) is a novel member of the calmodulin-binding proteins. J Biol Chem 269: 13703-13709, 1994*

89) Villereal ML : *Sodium fluxes in human fibroblasts : effect of serum, Ca^{2+}, and amiloride. J Cell Physiol 107:359-369, 1981*

90) Wakabayashi S, Bertrand B, Ikeda T, Pouyssegur J, Shigekawa M : *Mutation of calmodulin-binding site renders the Na^+/H^+ exchanger (NHE1) highly H^+-sensitive and Ca^{2+} regulation-defective. J Biol Chem 269:13710-13715, 1994*

91) Bertrand B, Wakabayashi S, Ikeda T, Pouyssegur J, Shigekawa M : *The Na^+/H^+ exchanger isoform 1(NHE1) is a novel member of the calmodulin-binding proteins. Identification and characterization of calmodulin-binding sites. J Biol Chem 269:13703-13709, 1994*

92) Schelling JR, Hanson AS, Marzec R, Stuart L. Linas SL : *Cytoskeleton-dependent endocytosis is*

required for apical type 1 angiotensin II receptor-mediated phospholipase C activation in cultured rat proximal tubule cells. J Clin Invest 90:2472-2480, 1992

93) Marrero MB, Paxton WG, Schieffer B, Ling BN, Bernstein KE : *Angiotensin II signaling events mediated by tyrosine phosphorylation. Cell Signal 8:21-26, 1996*

94) Wang T, Chan YL : *The role of phosphoinositide turnover in mediating the biphasic effect of angiotensin II on renal tubular transport. J Pharmacol Exp Ther 256:309-317, 1991*

95) Henrich WL, McAllister EA, Eskue A, Miller T, Moe OW : *Renin regulation in cultured proximal tubular cells. Hypertension 27:6,1337-1340, 1996*

96) Burns KD, Harris RC : *Signaling and growth responses of LLC-PK$_1$/Cl$_4$ cells transfected with the rabbit AT1 ANG II receptor. Am J Physiol 268:C925-C935, 1995*

97) Lu HK, Fern RJ, Luthin D, Linden J, Liu LP, Cohen CJ, Barrett PQ : *Angiotensin II stimulates T-type Ca^{2+} channel currents via activation of a G protein, Gi. Am J Physiol 271: C1340-C1349, 1996*

98) Lotshaw DP, Li F : *Angiotensin II activation of Ca^{2+}-permeant nonselective cation channel in rat adrenal glomerulosa cells. Am J Physiol 271:C1705-C1715, 1996*

99) Zhang MI, O'Neil RG : *A regulated calcium channel in apical membranes of renal proximal tubule cells. Am J Physiol 271:C1757-C1764, 1996*

100) Wong KR, Berry CA, Cogan MG : *Chloride transport in the rat S1 proximal tubule. Am J Physiol 268:F723-F729, 1995*

101) Poch E, Botey A, Gaya J, Darnell A, Rivera F, Revert L : *Intracellular calcium concentration and activation of the Na^+/H^+ exchanger in essential hypertension. Kidney Int 45:1037-1043, 1994*

102) Flores G, Ye M, Lapointe M, Batlle D : *Ionic effects of angiotensin II and their role in the activation of Na^+/H^+ antiporter. Kidney Int Suppl 55:S122-S125, 1996*

103) Weinman EJ, Dubinsky WP, Fisher K, Dinh Q, Steplock D, Shenolikar S : *Regulation of reconstituted renal Na^+/H^+ exchanger by calcium dependent protein kinases. J Membr Biol 103: 237-244, 1988*

104) Levine SA, Nath SK, Yun CH, Yip, JW, Montrose M, Donowitz M, Tse CM : *Separate C-terminal domains of the epithelial specific brush border Na^+/H^+ exchanger isoform NHE3 are involved in stimulation and inhibition by protein kinases/growth factors. J Biol Chem 270: 13716-13725, 1995*

105) Chu TS, Peng Y, Cano M, Yanagisawa M, Alpern RJ : *Endothelin(B) receptor activates NHE-3 by a Ca^{2+}-dependent pathway in OKP cells. J Clin Invest 97:1454-1462, 1996*

106) Weinman EJ, Hanley R, Morell G, Yuan N, Steplock D, Bui G, Shenolikar S : *Regulation of the renal Na^+-H^+ exchanger by calcium calmodulin-dependent multifunctional protein kinase II. Miner Electrol Matab 18:35-39, 1992*

107) Burns KD, Homma T, Harris RC : *Regulation of Na^+-H^+ exchange by ATP depletion and calmodulin antagonism in renal epithelial cells. Am J Physiol 261:F607-F616, 1991*

108) Yamada H, Seki G, Taniguchi S, Uwatoko S, Nosaka K, Suzuki K, Kurokawa K : *Roles of Ca^{2+} and PKC in regulation of acid/base transport in isolated proximal tubules. Am J Physiol 271:F1068-F1076, 1996*

109) Lokuta AJ, Copper C, Gaa ST, Wang HE, Rogers TB : *Angiotensin II stimulates the release of phospholipid-derived second messengers through multiple receptor subtypes in heart cells. J Biol Chem 269:4832-4838, 1994*

110) Leslie CC : *Properties and regulation of cytosolic phospholipase A_2. J Biol Chem 272:27, 16709-16712, 1997*

111) Aarsman AJ, Schalkwijk CG, Neys FW, Iijima N, Wherrett JR, Van den Bosch H : *Purification and characterization of Ca(2+)-dependent phopholipase A_2 from rat kidney. Arch Biochem Biophys 331:1,95-103, 1996*

112) Becker BN, Harris RC : *A potential mechanism for proximal tubule angiotensin II-mediated sodium flux associated with receptor-mediated endocytosis and arachidonic acid release. Kidney Int Suppl 57:S66-S72, 1996*

113) Schramek H, Coroneos E, Dunn MJ : *Interaction of the vasoconstrictor peptides, angiotensin II and endothelin-1, with vasodilatory prostaglandins. Semin Nephrol 15:195-204, 1995*

114) Kisch ES, Jaffe A, Knoll E, Stern N : *Role of the lipoxygenase pathway in angiotenisin II-induced vasoconstriction in the human placenta. Hypertension 29:796-801, 1997*

115) Wen Y, Nadler JL, Gonzales N, Scott S, Clauser E, Natarajan R : *Mechanism of ANG II-induced mitogenic responses : role of 12-lipoxy-*

genase and biphasic MAP kinase. Am J Physiol 271:C1212-C1220, 1996

116) Imig JD, Deichmann PC : *Afferent arteriolar responses to ANG II involve activation of PLA2 and modulation by lipoxygenase and P-450 pathways. Am J Physiol 273:F274-F282, 1997*

117) Kaye AD, Nossaman BD, Smith DE, Ibrahim IN, Imig JD, Kadowitz PJ : *Effects of phospholipid A_2, 12-lipoxygenase, and cycloxygenase inhibitors in the feline pulmonary bed. Am J Physiol 272:L573-L579, 1997*

118) Griendling KK, Ushio-Fukai M, Lassegue B, Alexander RW : *Angiotensin II signaling in vascular smooth muscle. New concepts. Hypertension 29:366-373, 1997*

119) Carroll MA, Balazy M, Margiotta P, Huang DD, Falck JR, McGiff JC : *Cytochrome P-450-dependent HETEs : profile of biological activity and stimulation by vasoactive peptides. Am J Physiol 271:R863-R869, 1996*

120) Omata, K, Abraham NG, Schwartzman ML : *Renal cytochrome P-450-arachidonic acid metabolism : localization and hormonal regulation in SHR. Am J Physiol 262:F591-F599, 1992*

121) Imaoka S, Wedlund PJ, Ogawa H, Kimura S, Gonzalez, Kim HY : *Identification of CYP2C23 expressed in rat kidney as an arachidonic acid epoxygenase. J Pharmacol Exp Ther 267:1012-1016, 1993*

122) Lieber CS : *Cytochrome P-4502E1 : It's physiological and pathological role. Physiol Rev 77: 517-544, 1997*

123) Makita K, Takahashi K, Karara A, Jacobson HR, Falck JR, Capdevila JH : *Experimental and/or genetically controlled alterations of the renal microsomal cytochrome P450 epoxygenase induce hypertension in rat fed a high salt diet. J Clin Invest 94:2414-2420, 1994*

124) Omata K, Abraham NG, Escalante B, Schwartzman ML : *Age-related changes in renal cytochrome P-450 arachidonic acid metabolism in spontaneously hypertensive rats. Am J Physiol 262:F8-F16, 1992*

125) Zhang Y, Mircheff AK, Hensley CB, Magyar CE, Warnock DG, Chambrey R, Yip KP, Marsh DJ, Holstein-Rathlou NH, McDonough AA : *Rapid redistribution and inhibition of renal sodium transporters during acute pressure natriuresis. Am J Physiol 270:F1004-F1014, 1996*

126) Carroll MA, Balazy M, Flick JR, Margiotta P, McGiff JC : *Renal vasodilator activity of 5,6-epoxyeicosatrienoic acid depends upon conversion by cycloxygenase and release of prostaglandins. J Biol Chem 268:12260-12266, 1993*

127) Sakairi Y, Jacobson HR, Noland TD, Capdevila JH, Falck JR, Breyer MD : *5,6-EET inhibits ion tranport in collecting duct by stimulating endogenous prostaglandin synthesis. Am J Physiol 268:F931-F939, 1995*

128) Carroll MA, Garcia MP, Falck JR, McGiff JC : *Cycloxygenase dependency of the renovascular actions of cytochrome P450-derived arachidonate metabolites. J Pharmacol Exp Ther 260: 104-109, 1992*