

저칼륨혈증 흰쥐 신장에서 Akt, p-Akt, ERK 및 p-ERK 단백질발현의 변화

배춘상, 조혜정, 안규윤

전남대학교 의과대학 해부학교실

(2017년 6월 15일 접수, 2017년 8월 10일 수정접수, 2017년 8월 10일 게재승인)

간추림 : 저칼륨혈증은 신장의 형태학적 변화와 대사성 알칼리증을 유발시키는 것으로 알려져 있다. 이전 결과들은 저칼륨혈증의 병태생리학적 변화에 K^+ 평형 조절 이온채널, pump 유전자, NF-E2-related factor 2 (Nrf2) 전사유전자를 포함한 다양한 유전자가 관여할 것이라는 가능성을 제시하였다. 이에 본 연구는 칼륨제한 식이 기간에 따른 흰쥐 신장 내 Akt와 p-Akt 및 ERK와 p-ERK의 발현 및 분포의 변화를 Western 분석과 면역조직화학 방법으로 관찰함으로써, 저칼륨혈증이 신장에서 AKT/ERK 인산화에 영향을 미치는지를 확인하였다.

Western 분석소견에서 Akt 및 p-Akt 단백질 발현은 칼륨제한 식이가 진행될수록 증가하는 양상을 보였으며, ERK 및 p-ERK 단백질발현은 칼륨제한 식이 2주군에서 정상 식이군에 비해 약간 증가하는 양상을 보였다. 면역조직화학 소견에서 Akt 단백질의 면역반응성은 먼쪽곱슬세관, 겹질곶은부분 및 속질곶은부분에서 중등도의 발현을 보였다. 칼륨제한 식이군의 Akt의 면역반응성은 칼륨제한 식이가 진행될수록 바깥속질집합관에서 현저히 증가하였다. 칼륨제한 식이군의 p-Akt의 면역반응성은 칼륨제한 식이 2주군의 먼쪽곱슬세관, 치밀반점과 속질곶은부분에서 증가하였고 토리쪽곱슬세관에서는 중등도의 발현을 보였다. 칼륨제한 식이군의 ERK의 면역반응성은 칼륨제한 식이 2주군과 3주군의 바깥속질집합관에서 현저히 증가하였으며 먼쪽곱슬세관, 겹질집합관에서는 중등도의 증가를 보였다. 칼륨제한 식이군의 p-ERK의 발현부위는 정상식이군과 비교해 차이가 없었으나 면역반응성은 칼륨제한 식이 2주군의 바깥속질집합관의 핵에서 현저히 증가하였다.

이상의 결과 저칼륨혈증 시 p-Akt의 발현은 칼륨제한 식이가 길어질수록 점진적으로 증가하였지만, p-ERK의 발현은 칼륨제한 식이 2주군에서 현저히 증가되었다. 따라서 저칼륨 상태에서의 Akt 및 ERK 인산화의 촉진은 이온채널 및 이온수송체 유전자 조절뿐만 아니라 세포 내 신호전달에 있어 중요한 역할에 관여할 것임을 시사해 주었다.

찾아보기 낱말 : 저칼륨혈증, Akt, p-Akt, ERK, p-ERK, Western blot, 면역조직화학

서론

K^+ 는 세포 내 주요 양이온으로 세포막에 걸쳐 세포와

전기적 기울기의 삼투 평형을 유지하는 데 매우 중요하다 [1]. 또한 K^+ 는 세포 성장과 분열, 산-염기 평형, 많은 효소 반응, 세포용적 조절, 전기적인 세포분극, 그리고 근수축을 포함한 세포 기능에 중요한 역할을 담당하고 있어 모든 세포의 생리에 필수적이다. 체내 K^+ 균형이 정상인 상태에서 K^+ 배설은 섭취에 따라 조절되는데, 약 90%는 신장에 의해 배설되고, 주로 소변이 집합관을 지나면서 K^+ 의 분비가 이루어지며 이 과정은 알도스테론과 Na^+ 의 이동에 의해 조절된다 [2]. K^+ 결핍은 혈청 K^+ 농도가 3.0 mEq/L 미만

*본 논문은 2010~2011학년도 전남대학교병원 의생명연구원 학술연구비 지원에 의해 이루어졌으며 지원에 감사드립니다.

저자(들)는 '의학논문 출판윤리 가이드라인'을 준수합니다.

저자(들)는 이 연구와 관련하여 이해관계가 없음을 밝힙니다.

교신저자 : 안규윤(전남대학교 의과대학 해부학교실)

전자우편 : kyahn@jnu.ac.kr

인 경우를 말하며 전해질 장애로 암모니아 대사 증가, 산-염기 평형장애, 대사성 알칼리증을 일으킨다[3-5]. 이러한 암모니아 대사는 산 분비 및 염기 생성과 밀접하게 관련되어 있으며 산-염기 평형을 조절하는 주요 기전으로 작용한다[6]. 만성적인 K^+ 결핍은 신장세관의 손상과 사이질 조직 섬유화, 신장세관에서의 Osteopontin 발현 증가 및 손상부위로의 염증세포 침윤을 유발한다[7]. 임 등[8]은 저칼륨혈증 신장에서 H/K-ATPase, Na/K-ATPase, NHE-3 및 NBC-1에 대한 inhibitor-sensitive 이온수송체의 유전자 발현이 증가하며 Nrf2 mRNA 단백질의 발현이 증가되어 K^+ 평형 조절에 이온채널이나 Nrf2 전사유전자를 포함한 다양한 유전자가 관여할 것이라고 하였다.

Akt는 protein kinase B (PKB)로 알려져 있는 serine/threonine protein kinase로 phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt 신호전달경로이다. PI3K/Akt 신호전달경로는 다양한 성장인자 및 조절인자에 의해 활성화되어 세포 성장 및 생존, 역전사, 번역, 세포증식, 이동 그리고 세포주기를 조절하는 중요한 역할을 한다[9-11]. PI3K 경로 내에서 신호가 전달되면 Akt는 세포질 쪽에서 세포막 쪽으로 이동하여 구조적인 변화를 일으키고, 두 개의 아미노산이 노출되어 인산화되는데 이는 Akt의 활성화에 필요하다. 두 아미노산 중 하나는 Akt1의 kinase domain에 위치하는 308번 threonine으로서 phosphoinositide-dependent kinase 1 (PDK1)에 의해 인산화되어 활성화고리(activation loop)의 안정화에 관여하고, 다른 하나는 Akt1의 C-terminal domain에 위치하는 473번 serine으로서 PDK2에 의해 인산화되어 Akt의 활성화에 관여한다[12]. 이러한 Akt 활성화는 insulin 수용체를 통해 PI3K/Akt 경로를 자극하고 신장의 사구체 비대 및 세포사멸을 초래하여 당뇨병성 신장에서 Akt의 인산화를 증가시키고[13], AQP-2 수분통로 단백조절을 위한 또 다른 신호전달 경로로 제안되어 신장세포의 1차 배양에서 AQP-2 발현 증가를 통해 PI3K/Akt 경로를 자극한다고 한다[14].

Mitogen-activated protein kinase (MAPK)는 extracellular regulated protein kinase (ERK), c-jun N-terminal kinase (JNK) /stress-activated protein kinase (SAPK), serine/threonine protein kinase인 p38 MAPK로 분류되며 세포의 분화, 발생, 세포 신호 전달 등의 다양한 세포 기능을 담당하는 것으로 알려져 있다[15]. 이 중 ERK는 성장인자, mitogen 등에 의해서 활성화되며 세포 유사분열 및 생존, 세포증식, 분화에 관여한다[16]. p38 MAPK는 일반적으로 세포 스트레스와 proinflammatory cytokine에 의해 활성화되어 염증반응에 중요한 역할을 하며 apoptosis 등에 관여한다[17]. Balbi 등[18]은 생쥐 신장의 발생과정에 관여하

는 안지오텐신 II 수용체의 발현과 MAPK 발현의 연관성을 관찰함으로써 안지오텐신 II의 작용이 MAPK 경로에 의해서 조절된다고 하였다. 또한 신장의 산화적 스트레스는 ERK와 JNK 경로를 자극하여 신장세포의 대사를 조절하며[19], MAPK 경로 중에 하나 혹은 여러 개가 저해되면 신장세포암의 성장이 억제된다고 한다[20]. 이와 같이 MAPK는 신장조직에서 다양한 세포작용에 관여하며, 흰쥐의 토리꼭세관세포에서 저농도 ouabain는 ERK 의존성 경로를 통해 Akt의 인산화를 자극하고 세포 증식을 유도한다고 한다[21]. 또한 저칼륨혈증 흰쥐 신장에서는 Nrf2 단백질의 발현이 증가되며[22], Nrf2의 인산화 활성조절 요인으로 MAPK, protein kinase C, PI3K 등이 있으며, 활성산소종을 생성하는 여러 약제나 항생제들에 유도된 산화적 스트레스는 MAPK 신호전달계의 활성화를 초래한다고 한다. 이상의 보고를 감안해볼 때 Akt와 p-Akt 및 ERK와 p-ERK의 단백발현 변화는 저칼륨혈증 시 신장의 이온수송체 유전자 조절뿐만 아니라 세포 내 신호전달에 있어 중요한 역할을 할 것으로 생각된다.

이에 본 연구는 칼륨제한 식이 기간에 따른 흰쥐 신장 내 Akt와 p-Akt 및 ERK와 p-ERK의 발현 및 분포의 변화를 Western 분석 및 면역조직화학적 방법으로 관찰하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험 동물

본 실험에 사용된 동물은 체중 230 g 내외의 성숙 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐 30마리로 다섯 군으로 구분하였다. 제1군은 정상 식이(150 mEq K^+ /kg, TD88082, Harlan Teklad, U.S.A.)를, 제2군은 칼륨제한 식이(potassium-free diet, TD88081, Harlan Teklad, U.S.A.) 3일, 제3군은 칼륨제한 식이 1주, 제4군은 칼륨제한 식이 2주, 제5군은 칼륨제한 식이 3주로 식이적응을 시켰다. 칼륨제한 식이군은 먹이 섭취가 변화될 것으로 여겨져 날마다 적은 양을 먹은 군의 양으로 먹이를 조절하였다.

2. 단백 분리와 Western 분석

칼륨제한 식이 기간에 따른 신장 조직을 적출하여 액체 질소에 담가 급속 동결시킨 후, 조직의 일부를 Nonidet P-40 buffer (150 mM NaCl, 1 mM benzamidine, 50 mM Tris pH 8.0, Trypsin inhibitor 1 μ g/mL, 5 mM EDTA pH 8.0, 1 mM PMSF, NP-40 1%)에 넣고 homogenizer로 분쇄하

여 균질액을 만들어 얼음 속에 30분간 방치하였다. 균질액은 3,000 rpm으로 15분간 원심시켜 상층액을 분리한 다음 다시 15,000 rpm으로 30분간 원심하고 단백 농도는 spectrophotometer로 정량화하였다. 추출한 총 단백 100 µg을 8% polyacrylamide gel에 전기 영동한 다음 nitrocellulose membrane에 4°C에서 20 mA로 12시간 전이하였다. Membrane은 TBS-T buffer (20 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 M HCl, pH 7.6, 0.1% Tween 20)에 5% skim milk가 첨가된 blocking buffer에 실온에서 2시간 동안 처리한 후 1차 항체 Akt (Santa Cruz Biothchnology, California, USA; sc-1619, 1 : 3,000), p-Akt (Santa Cruz Biothchnology, California, USA; sc-16646R, 1 : 3,000), ERK (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA; 9102, 1 : 3,000), p-ERK (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA; 9101, 1 : 3,000)에 4°C에서 14시간 반응시켰다. 다시 TBS-T로 10분씩 3번 수세하고 peroxidase conjugated goat anti-rabbit IgG (Santa Cruz, USA; sc-2004, 1 : 4,000)로 부치하였다. TBS-T로 3번 수세하고 발색제인 ECL용액 (Amersham, USA)에 5분간 반응시킨 후 시간별로 현상하였다.

3. 면역조직화학 염색

동물을 pentobarbital sodium (50 mg/Kg, ip)으로 마취하여 복강을 노출시킨 후 대동맥을 통해 phosphate buffered saline (PBS; 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM Na₂HPO₄, 1.4 mM KH₂PO₄)과 paraformaldehyde-lysine-periodate (PLP) 고정액으로 관류 고정시켰다. 상기 고정액에 16시간 동안 4°C 고정 후 PBS로 3회 세척하고 ethanol로 탈수 과정을 거친 후 wax (polyethylene glycol 400 distearate, Polysciens Inc. Warrington, PA, USA) 포매하였다. 포매된 조직은 회전식 절편기로 6 µm 절편을 얻어 면역조직화학 실험에 이용하였다. 면역조직화학 반응에 사용된 일차 항체는 Akt (Santa Cruz Biothchnology, California, USA; sc-1619, 1 : 800), p-Akt (Santa Cruz Biothchnology, California, USA; sc-16646R, 1 : 400), ERK (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA; 9102, 1 : 200), p-ERK (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA; 9101S, 1 : 400)였다. 면역조직화학 염색은 Vector ABC Kit (Vector Laboratories, California, USA)를 이용하였다. 즉, 탈왁스 과정을 거친 절편은 내재성 peroxidase 활성을 제거하기 위해 60% methanol에 녹인 3% H₂O₂에 30분 부치시킨 다음 PBS로 세척하였다. 5% normal horse serum, 5% normal goat serum, 10% normal goat serum으로 30분간 반응시켜 주변부의 비특이적 반응을 억제하고 일차항체에 4°C에서

14~16시간 반응시켰다. 반응시킨 조직은 PBS로 5분씩 3번 세척하고 biotinylated anti-goat IgG과 biotinylated anti-rabbit IgG에 30분간 부치시킨 다음 avidin-biotin conjugate에 30분간 반응시켰다. 반응이 끝난 절편은 PBS로 세척 후 3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB)으로 7분간 발색시킨 다음 탈수과정을 거친 후 permount로 봉입하여 광학현미경으로 관찰하였다.

결 과

1. Western 분석

Akt와 p-Akt 단백질은 60 kDa 정도이고 칼륨제한 식이가 진행될수록 증가하는 양상을 보였고, 칼륨제한 식이 1주군에서 정상 식이군에 비해 증가하기 시작하여 칼륨제한 식이 3주군에 최고의 발현을 보였다. ERK 단백질은 42,44 kDa 정도이고 칼륨제한 식이 2주군에서 정상 식이군에 비해 약간 증가하였지만 나머지 칼륨제한 식이군에서는 정상 식이군과 유사한 발현을 보였다. p-ERK 단백질은 42,44 kDa 정도이고 칼륨제한 식이 2주군에서 최고의 발현을 보였고 칼륨제한 식이 3주군에서는 약간 감소하였으나 칼륨제한 식이 1주군이나 정상 식이군보다는 증가하였다(Fig. 1).

2. 면역조직화학 소견

Akt와 p-Akt 및 ERK와 p-ERK에 대한 신장 내 발현 분포를 알아보기 위해서 면역조직화학 실험을 실시하였다. 일차항체를 사용하지 않은 대조염색에서는 대조군과 실험군 모두에서 면역반응성을 관찰할 수 없었다.

정상 식이군 Akt 단백질의 면역반응성은 먼쪽곱슬세관, 겉질곶은부분 및 속질곶은부분에서 중등도의 발현을 보였고, 겉질 및 바깥속질집합관에서는 낮게 발현되었다. 칼륨제한 식이 Akt의 발현 부위는 정상 식이군과 비교해 차이가 없었으나 면역반응성은 칼륨제한 식이 1주군의 바깥속질집합관에서 증가하기 시작하여 칼륨제한 식이 2주군에서 현저히 증가하였다. 그 외 먼쪽곱슬세관, 겉질 및 속질곶은부분에서는 중등도의 증가를 보였다(Fig. 2). 정상 식이군 p-Akt 단백질의 면역반응성은 토리쪽곱슬세관과 속질곶은부분에서 중등도의 발현을 보였고, 먼쪽곱슬세관과 치밀반점에서는 낮게 발현되었다. 칼륨제한 식이군의 p-Akt의 발현 부위는 정상 식이군과 비교해 차이가 없었으나 면역반응성은 칼륨제한 식이 1, 2주군의 먼쪽곱슬세관, 치밀반점과 속질곶은부분에서 높게 발현되었고 토리쪽곱슬세관에서는 중등도의 증가를 보였다(Fig. 3).

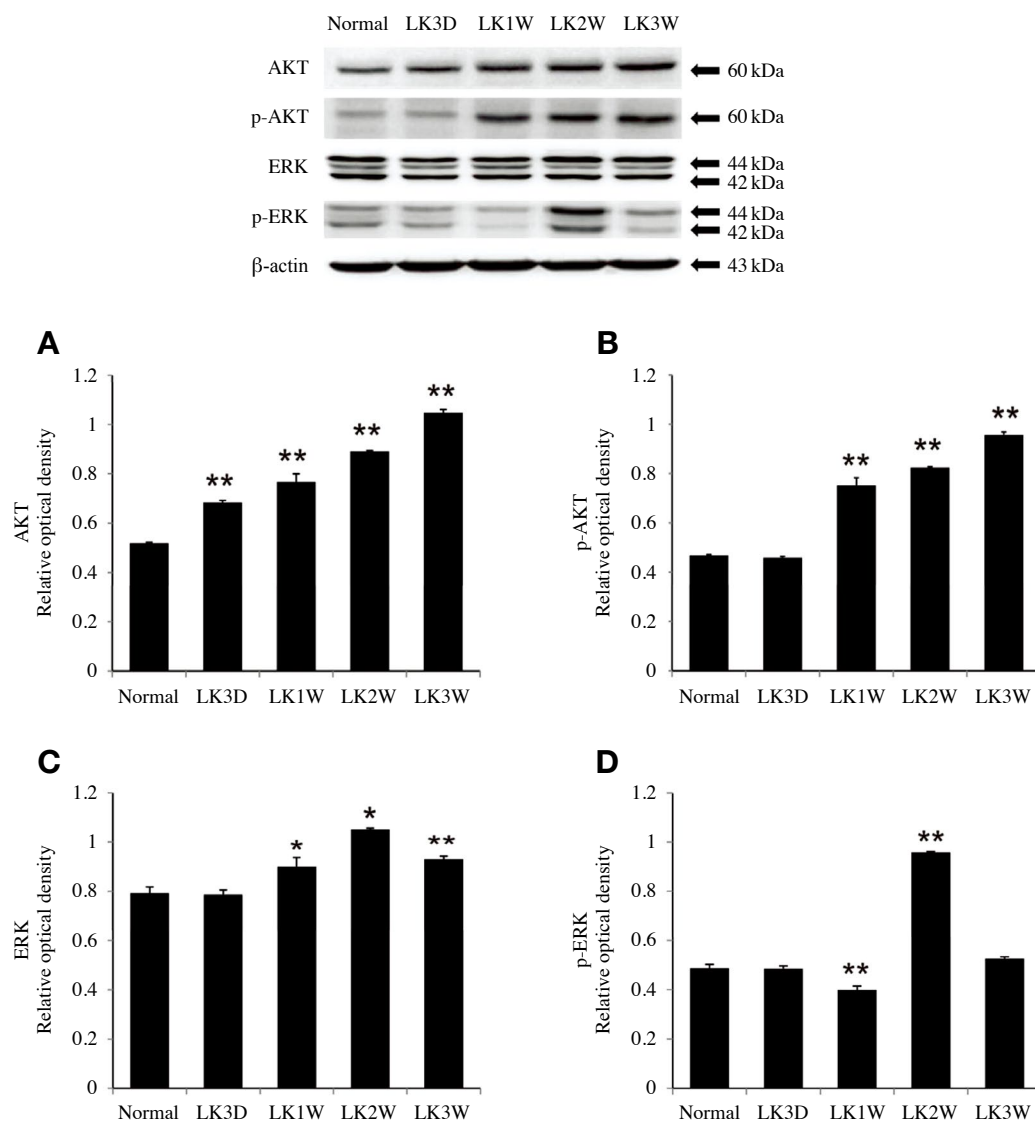


Fig. 1. Western blotting showed the protein level of Akt, p-Akt, ERK, p-ERK in Low K^+ (LK) diet rat kidney. (A) The protein level of Akt was gradually increased in LK3D, LK 1W, 2W, and 3W diet rat kidney in comparison with the normal diet rat kidney. (B) The protein level of p-Akt was gradually increased in LK 1W, 2W, and 3W diet rat kidney compared to the normal diet rat kidney. (C) The protein level of ERK was increased in LK 1W, 2W, 3W diet rat kidney compared to the normal diet rat kidney. (D) The protein level of p-ERK was markedly increased in LK 2W diet rat kidney compared to the normal diet rat kidney. Data are expressed as mean \pm S.E.M, and each experiment conducted 3 repeats per conditions. β -actin was used as control. Differences were considered significant at * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$ (ANOVA one way statistical analysis compared to the normal group) (Normal: normal diet rat kidney, LK3D: Low K^+ diet rat kidney for 3 days, LK1W: Low K^+ diet rat kidney for 1 week, LK2W: Low K^+ diet rat kidney for 2 weeks, LK3W: Low K^+ diet rat kidney for 3 weeks).

정상 식이군 ERK 단백질의 면역반응성은 먼쪽곱슬세관, 바깥속질집합관에서 중등도의 발현을 보였으며, 겉질집합관, 겉질곧은부분 및 속질곧은부분은 낮게 발현되었다. 칼륨제한 식이군의 ERK의 발현 부위는 정상 식이군과 비교해 차이가 없었으나 면역반응성은 칼륨제한 식이 2주군과 3주군의 바깥속질집합관에서 현저히 증가하였다. 그 외 먼쪽곱슬세관, 겉질집합관 및 속질곧은부분에서는 중등도의

증가를 보였다(Fig. 4). 정상 식이군 p-ERK 단백질의 면역반응성은 겉질 및 바깥속질집합관의 핵에서 중등도의 발현을 보였고, 먼쪽곱슬세관, 속속질집합관에서는 낮게 발현되었다. 칼륨제한 식이군의 p-ERK의 발현 부위는 정상 식이군과 비교해 차이가 없었으나 면역반응성은 칼륨제한 식이 1주군은 정상 식이군과 유사하였으나 칼륨제한 식이 2주군의 바깥속질집합관의 핵에서 현저히 증가하였고 그

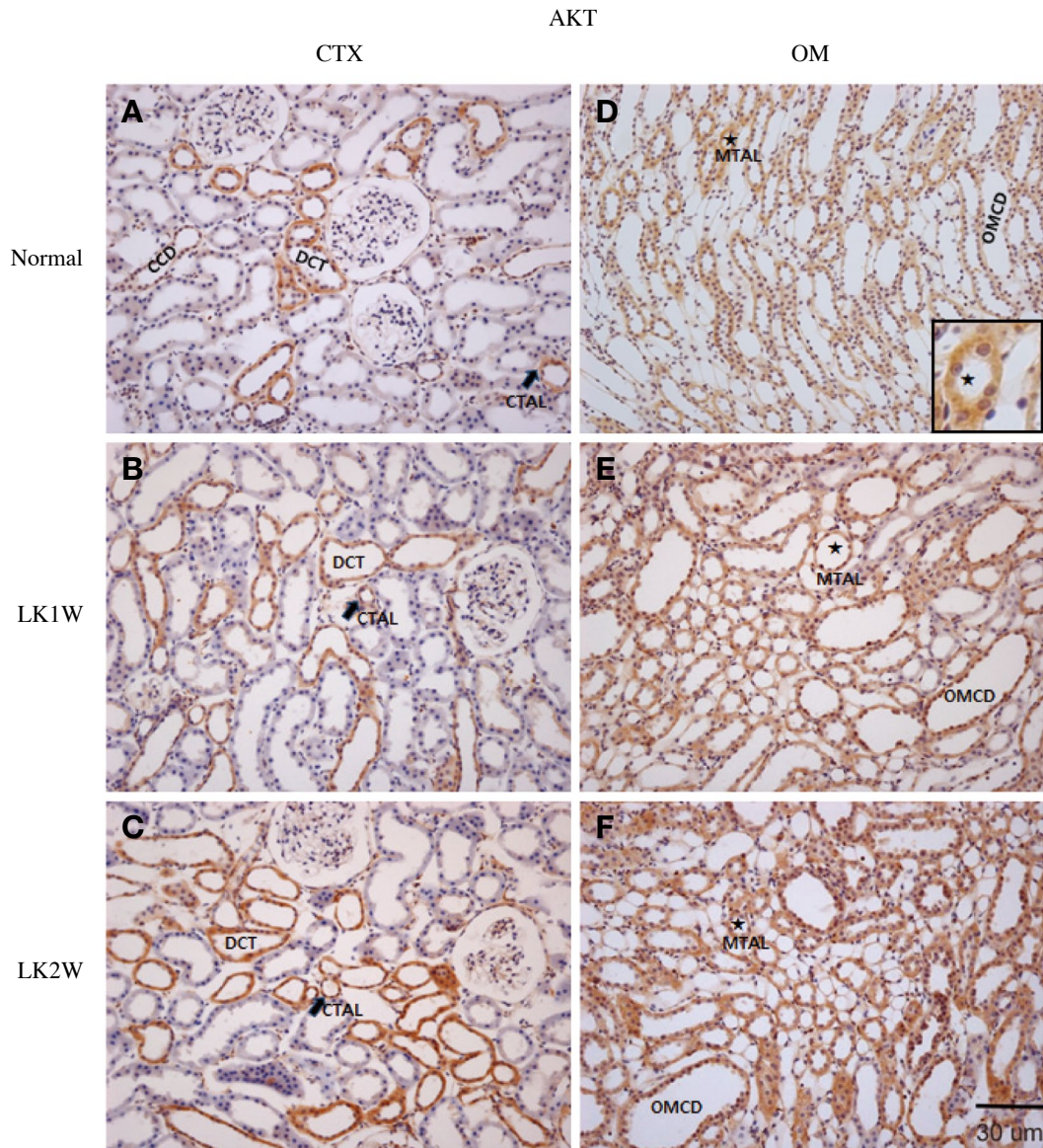


Fig. 2. Images showed the expression of Akt in Low K^+ (LK) diet rat kidney. We checked the expression of Akt in kidney using 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) staining. (A~C) Renal cortex, (D~F) outer medulla. In normal group, immunoreactivity of Akt was moderately detected in the distal convoluted tubule (DCT) and cortical thick ascending limb (CTAL) and outer medullary thick ascending limb (MTAL), and weakly in cortical collecting duct (CCD) and outer medullary collecting duct (OMCD). The immunoreactivity is prominently increased in outer medullary collecting duct especially in K^+ -depleted diet 2 weeks (Akt: Akt, CTX: renal cortex, OM: outer medulla, Normal: normal diet rat kidney, LK1W: Low K^+ diet rat kidney for 1 week, LK2W: Low K^+ diet rat kidney for 2 weeks. Scale bar: 30 μ m, CTAL: cortical thick ascending limb (arrow), MTAL: outer medullary thick ascending limb (asterisk)).

외 겔질집합관, 먼쪽곱슬세관에서는 중등도의 증가를 보였다(Fig. 5).

고 찰

PI3K/Akt 및 MARK/ERK 신호전달경로는 다양한 성장

인자 및 조절인자에 의해 활성화되며, 이로 인해 세포 성장 및 생존, 역전사, 번역, 세포증식, 이동 및 세포주기를 조절하는 중요한 역할을 한다[9-11]. 또한 최근 PI3K/Akt 및 MAPK/ERK 신호전달경로의 활성화는 악성세포에서 세포 사멸신호에 대한 중추적인 메카니즘으로 생각되었고[23] 세포의 분화, 발생, apoptosis와 같은 다양한 세포반응을 조절하는 serine/threonine kinase로 알려져 있으며 이러한

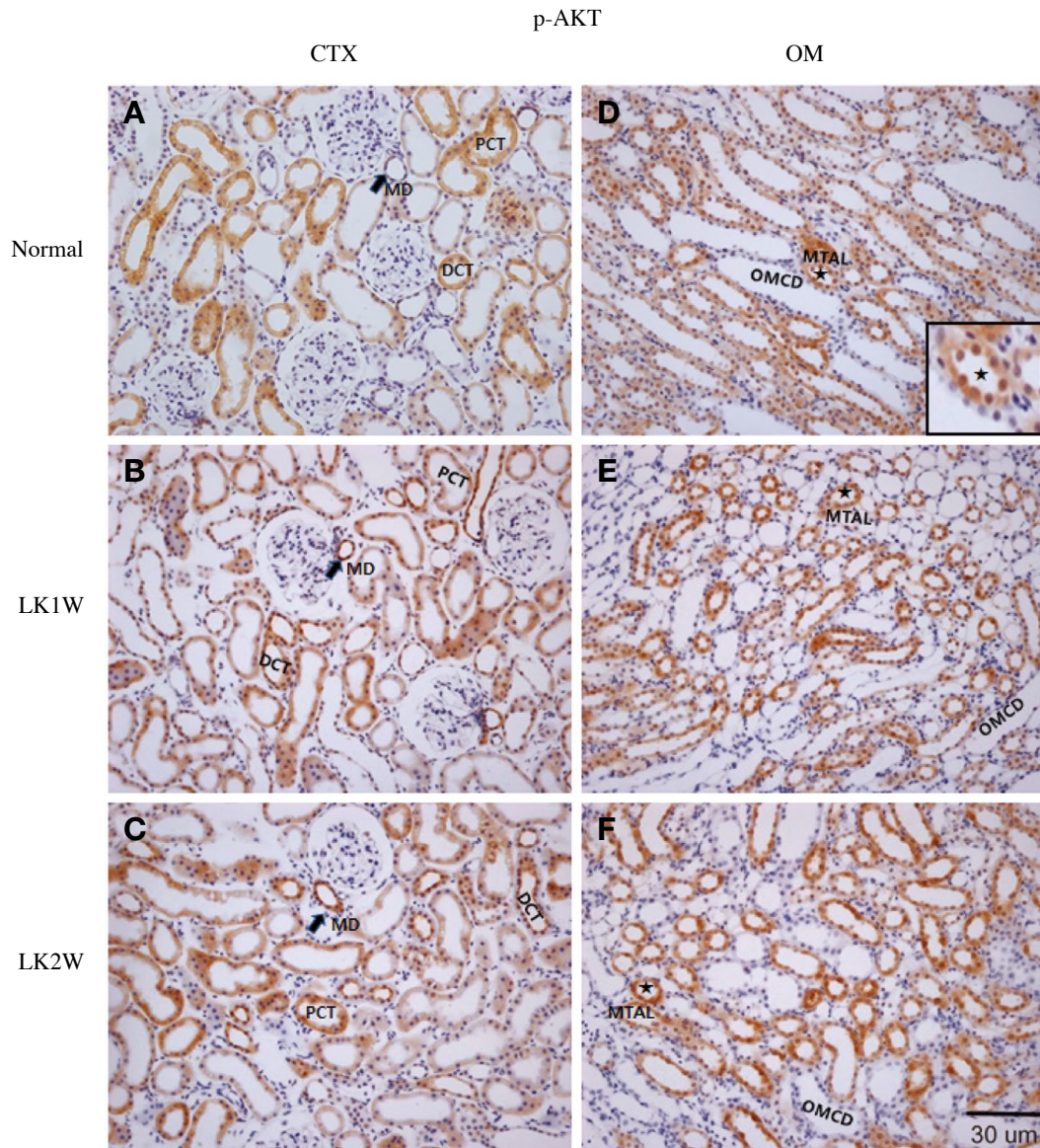


Fig. 3. Images showed the expression of p-Akt in Low K^+ (LK) diet rat kidney. We checked the expression of p-Akt in kidney using 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) staining. (A~C) Renal cortex, (D~F) outer medulla. In normal group, p-Akt is moderately detected in the proximal convolute tubule (PCT) and outer medullary thick ascending limb, and weakly in distal convoluted tubule and macula densa (MD). The expressed localization of p-Akt proteins in K^+ -depleted groups was not different from normal group, but the immunoreactivity is significantly increased in distal convoluted tubule, macula densa and outer medullary thick ascending limb in K^+ -depleted diet 1 and 2 weeks groups (p-Akt: phosphorylation of Akt, CTX: renal cortex, OM: outer medulla, Normal: normal diet rat kidney, LK1W: Low K^+ diet rat kidney for 1 week, LK2W: Low K^+ diet rat kidney for 2 weeks. Scale bar: 30 μ m, MD: macula densa (arrow), MTAL: outer medullary thick ascending limb (asterisk)).

kinase는 신장조직에서 다양한 세포작용과 연관성이 있는 것으로 보고되었다. 신장세포의 신호전달과정에 미치는 영향에 대한 연구는 미약하며, Akt와 p-Akt 및 ERK와 p-ERK 단백질발현이 저칼륨혈증 신장에서 신호전달에 미치는 영향을 관찰하고자 하였다. 이에 본 연구는 정상 및 칼륨제한식이 기간에 따른 흰쥐 신장에서 Akt와 p-Akt 및 ERK와

p-ERK 단백질발현 및 분포의 변화를 알아보려고 Western 분석과 면역조직화학적 방법을 관찰한 것이다.

Western 분석결과 Akt와 p-Akt 단백질은 60 kDa 정도이고 칼륨제한 식이가 진행될수록 증가하는 양상을 보였고, 칼륨제한 식이 1주군에서 정상 식이군에 비해 증가하기 시작하여 칼륨제한 식이 3주군에 최고의 발현을 보였다. 면

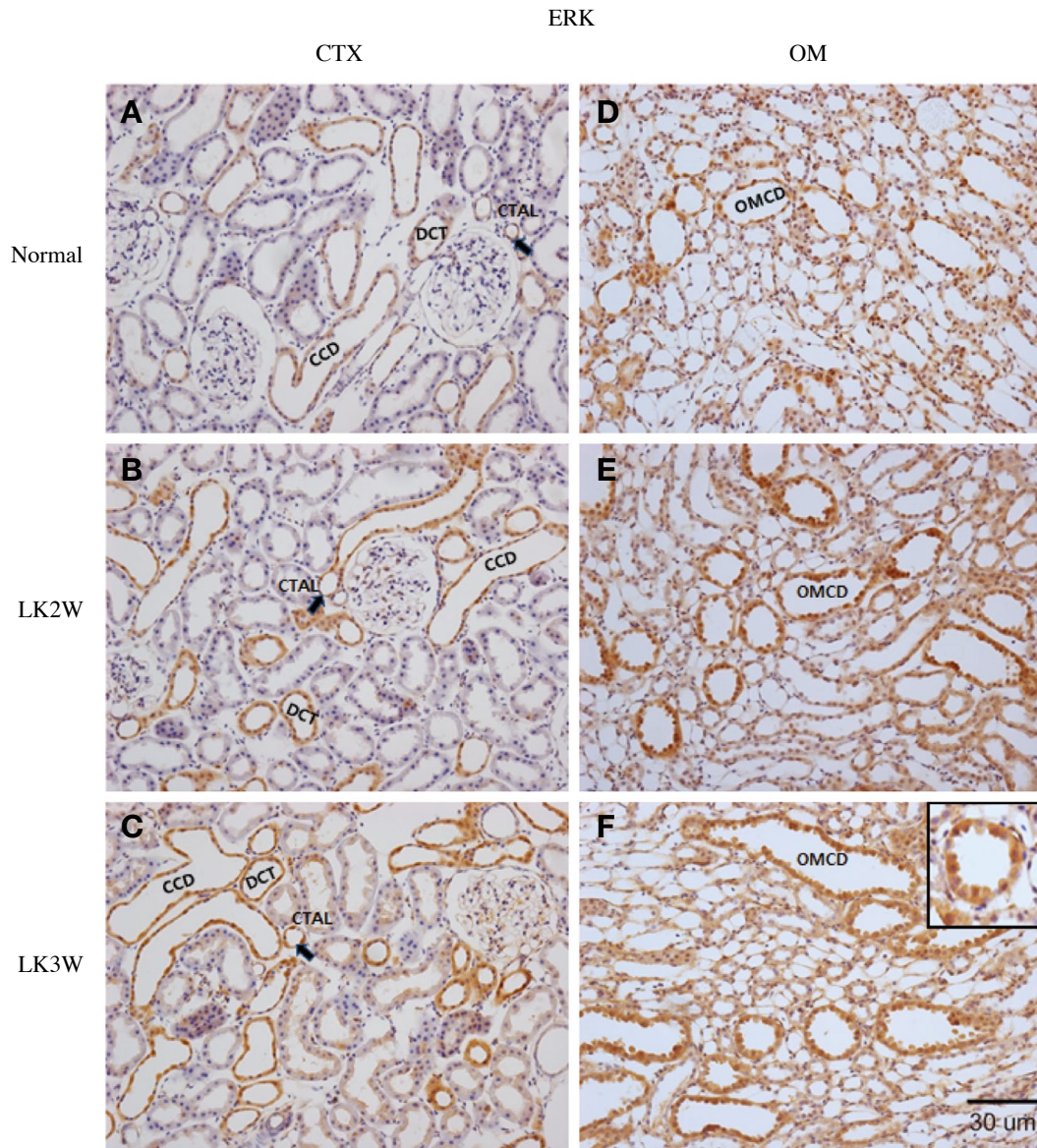


Fig. 4. Images showed the expression of ERK in Low K^+ (LK) diet rat kidney. We checked the expression of ERK in kidney using 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) staining. (A~C) Renal cortex, (D~F) outer medulla. In normal group, ERK is moderately detected in the distal convoluted tubule and outer medullary collecting duct, weakly in cortical collecting duct, cortical thick ascending limb and outer medullary thick ascending limb. The immunoreactivity is prominently increased in outer medullary collecting duct especially in K^+ -depleted diet 2 and 3 weeks (ERK: ERK, CTX: renal cortex, OM: outer medulla, Normal: normal diet rat kidney, LK2W: Low K^+ diet rat kidney for 2 week, LK3W: Low K^+ diet rat kidney for 3 weeks. Scale bar: 30 μ m. CTAL: cortical thick ascending limb (arrow)).

역조식화 소견에서 Akt 단백질의 면역반응성은 먼쪽곱슬세관, 겉질골은부분 및 속질골은부분에서 중등도의 발현을 보였고, 겉질 및 바깥속질집합관에서는 낮게 발현되었다. 칼륨제한 식이 Akt의 면역반응성은 칼륨제한 식이 1주군의 바깥속질집합관에서 증가하기 시작하여 칼륨제한 식이 2주군에서 현저히 증가하였다. 그 외 먼쪽곱슬세관, 겉질 및 속질골은부분에서는 중등도의 증가를 보였다. 이와 같

은 소견은 저칼륨혈증에서 여러 이온수송체의 유전자가 이들 부위에서 발현하고 칼륨제한 식이가 진행될수록 단백질 발현이 점진적으로 증가한다는 소견과도 일치하였다 [24-26]. 정상 식이군 p-Akt 단백질의 면역반응성은 토리쪽곱슬세관과 속질골은부분에서 중등도의 발현을 보였고, 먼쪽곱슬세관과 치밀반점에서는 낮게 발현되었다. 칼륨제한 식이군의 p-Akt의 면역반응성은 칼륨제한 식이 1, 2주군

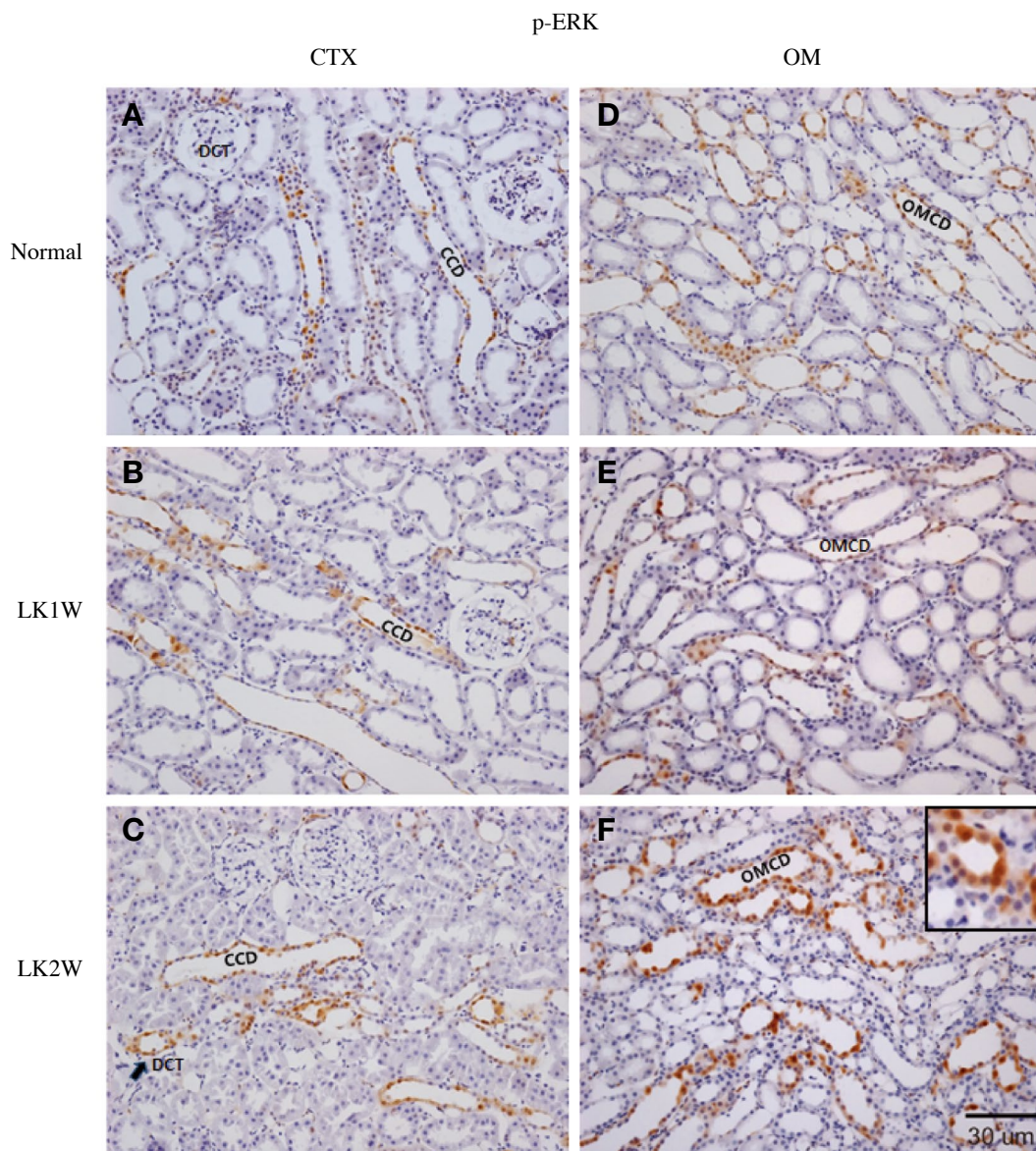


Fig. 5. Images showed the expression of p-ERK in Low K^+ (LK) diet rat kidney. We checked the expression of p-ERK in kidney using 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) staining. (A~C) Renal cortex, (D~F) outer medulla. In normal group, p-ERK is moderately detected in nucleus of cortical and outer medullary collecting duct and weakly in distal convoluted tubule and inner medullary collecting duct. The expressed localization of p-ERK proteins in K^+ -depleted groups was not different from normal group, but the immunoreactivity is prominently increased in the nucleus of outer medullary collecting duct especially in K^+ -depleted diet 2 weeks (p-ERK: phosphorylation of ERK, CTX: renal cortex, OM: outer medulla, Normal: normal diet rat kidney, LK1W: Low K^+ diet rat kidney for 1 week, LK2W: Low K^+ diet rat kidney for 2 weeks. Scale bar: 30 μ m. DCT: distal convoluted tubule (arrow)).

의 먼쪽곱슬세관, 치밀반점과 속질골은부분에서 높게 발현되었고 토리쪽곱슬세관에서는 중등도의 증가를 보였다. 이와 같은 소견은 일측성 요관 폐쇄 후 생쥐 신장의 면역조직화학적 소견에서 p-Akt 단백질이 겔질의 토리쪽세관, 먼쪽곱슬세관에서 발현되었다는 결과와도 일치하였고 [27], *in vivo* cryotechnique (IVCT) 기법을 이용한 저산소증 생쥐 신장에서 p-Akt 단백질이 토리쪽세관 세포질에서 발현되

었다는 보고 [28]와도 유사하였다. 또한 저산소증 신장에서 phospho-(Ser/Thr) PKA/C substrate (P-PK-S), Na/HCO₃ cotransporter-1 (NBC-1) 등의 유전자가 이들 부위에서 발현하였다는 보고를 감안하면 Protein kinase (PKs)가 신장의 요세관에 작용하여 신호전달 활성영역에서 단백질인산화에 관여하였을 것으로 생각되었다. 칼륨제한 식이군의 p-Akt 단백질발현이 칼륨제한 식이가 길어질수록 점진

적으로 증가함을 보여주었는데, 이는 Western 분석소견과 일치하였으며 이러한 Akt 활성화는 인슐린수용체를 통해 PI3K/Akt 경로를 자극하고 streptozotocin 당뇨 유발 흰쥐 신장의 p-Akt 단백질 발현을 증가시켰다는 소견[29], 신세포 암에서 활성화된 Akt는 세포사멸을 억제하고 인산화를 통해 세포증식을 촉진하여 p-Akt 단백질 발현이 증가한다는 소견과도 일치하였다[30]. 이와 같이 PI3K/Akt 신호전달 경로가 신장조직에서 다양한 성장인자 및 조절인자에 의해 활성화되며, 이로 인해 세포 성장 및 생존, 역전사, 번역, 세포증식, 이동 및 세포주기에 중요한 역할을 한다는 이전의 연구를 감안하면[9,10], 저칼륨혈증 신장에서 Akt와 p-Akt 단백질 발현이 높게 나타나 활성화되어 세포 내 신호전달 조절인자로 관여하였을 가능성이 추측되었다.

Western 분석결과 ERK 단백질은 42,44 kDa 정도이고 칼륨제한 식이 2주군에서 정상 식이군에 비해 약간 증가하였지만 나머지 칼륨제한 식이군에서는 정상 식이군과 유사한 발현을 보였다. p-ERK 단백질은 42,44 kDa 정도이고 칼륨제한 식이 2주군에서 최고의 발현을 보였고 칼륨제한 식이 3주군에서는 약간 감소하였다. 면역조직화학 소견에서 ERK 단백질의 면역반응성은 먼쪽곱슬세관, 바깥속질집합관에서 중등도의 발현을 보였으며, 겹질집합관, 겹질관은 부분 및 속질관은 부분 낮게 발현되었다. 칼륨제한 식이군의 ERK의 면역반응성은 칼륨제한 식이 2주군과 3주군의 바깥속질집합관에서 현저히 증가하였다. 그 외 먼쪽곱슬세관, 겹질집합관 및 속질관은 부분에서는 중등도의 증가를 보였다. 이와 같은 소견은 당뇨유발 흰쥐 신장에서 ERK 단백질이 먼쪽곱슬세관과 집합관에서 발현되었다는 보고[31]와 일측성 요관 폐쇄 후 흰쥐 신장의 면역조직화학 소견에서 ERK 단백질이 속질관은 부분과 바깥속질집합관에서 발현되었다는 소견[32]과 일치하였다. 정상 식이군 p-ERK 단백질의 면역반응성은 겹질 및 바깥속질집합관의 핵에서 중등도의 발현을 보였고, 먼쪽곱슬세관, 속속질집합관에서는 낮게 발현되었다. 칼륨제한 식이군의 p-ERK의 면역반응성은 칼륨제한 식이 1주군은 정상 식이군과 유사하였으나 칼륨제한 식이 2주군의 바깥속질집합관의 핵에서 현저히 증가하였고 그 외 겹질집합관, 먼쪽곱슬세관에서는 중등도의 증가를 보였고 속속질집합관 핵에서도 높게 발현되었다. 이는 일측성 요관 폐쇄 후 p-ERK 단백질이 바깥수집 집합관의 핵에서 발현되었다는 보고[32], 머리부터 발끝까지 작용하는 높은 중력 가속도에 노출된 흰쥐 신장 집합관의 핵에서 증가되었다는 소견[33]과도 일치하였다. 칼륨제한 식이군의 ERK와 p-ERK 단백질 발현이 칼륨제한 식이 기간이 길어질수록 증가함을 보여주었는데, 이는 일측성 요관폐쇄로 유발된 신장의 섬유화가 ERK 단백을

활성화시켜 산화스트레스에 영향을 주어 p-ERK 단백질의 겹질집합관과 바깥수집집합관에서 증가되었다는 소견과도 일치하였다[34]. 이는 MAPK가 세포 내 신호 전달 등의 다양한 세포 기능을 담당하며 저칼륨혈증 시 ERK 단백질 발현이 이온수송체 유전자 조절뿐만 아니라 세포 내 신호 전달에 있어 중요한 역할에 관여할 것임을 암시해 주었다. 또한 MAPK가 Nrf2를 핵 내로 이동시켜 여러 DNA 단백질과 결합하도록 인산화 및 안정화에 중요한 역할을 하고[35] Puerarin이 생쥐 신장에서 ERK/Nrf2/ARE 경로를 조절함으로써 CCl₄에 의해 유도된 염증을 완화시켰다는 보고를 감안하면[36] 세포 내 신호전달에 있어 중요한 역할을 하는 MARK (EKR, p38 MARK, c-jun, JNK)에 의해 산화스트레스나 염증반응 조건하에 Nrf2는 핵 내로 이동하여 ARE의 단백질과 결합하여 표적 유전자의 발현을 조절할 것으로 생각되어진다.

이상의 소견은 저칼륨혈증에서 신장 Akt와 p-Akt 및 ERK와 p-ERK의 단백질 발현 양상은 상호 간에 차이가 있으며 칼륨제한 식이가 길어질수록 증가함을 보여주었고, 이온수송체 단백질의 발현 부위와 유사하여 이들 유전자의 조절뿐만 아니라 세포 내 신호전달에 있어 중요한 역할을 할 것이라는 가능성을 시사해 주었다. 그러나 본 연구는 신장의 Akt와 p-Akt 및 ERK와 p-ERK의 단백질 발현과 분포의 변화를 알아보는 데 국한되었고, 세포 내 신호전달에 있어 중요한 역할을 하는 MARK (EKR, p38 MARK, c-jun, JNK)가 Nrf2의 세포 핵 내로 이동하여 ARE의 단백질과 결합하여 표적 유전자의 발현을 조절하는 기전에 대한 연구는 시행하지 못했다. 또한 저칼륨혈증에서 Akt와 p-Akt 및 ERK와 p-ERK 유전자 발현 변화가 세포 내 신호전달에 직접 관여했는지는 추후 여러 가지 생물학적인 방법을 이용하여 연구해야 할 과제라고 생각된다.

REFERENCES

1. Lin SH, Yang SS, Chau T. A Practical Approach to Genetic Hypokalemia. *Electro Electrolyte Blood Press.* 2010; 8:38-50.
2. Giebisch G. Renal potassium transport: mechanisms and regulation. *Am J Physiol* 1998; 274:F817-33.
3. Jones JW, Sebastian A, Hulter HN, Schambelan M, Sutton JM, Biglieri EG. Systemic and renal acid-base effects of chronic dietary potassium depletion in humans. *Kidney Int.* 1982; 21:402-10.
4. Hernandez RE, Schambelan M, Cogan MG, Colman J, Morris RC Jr, Sebastian A. Dietary NaCl determines se-

- verity of potassium depletion-induced metabolic alkalosis. *Kidney Int.* 1987; 31:1356-67.
5. Han KH, Lee HW, Handlogten ME, Bishop JM, Levi M, Kim J, et al. Effect of hypokalemia on renal expression of the ammonia transporter family members, Rh B Glycoprotein and Rh C Glycoprotein, in the rat kidney. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2011; 301:F823-32.
 6. Kenepfer MA, Packer R, Good DW. Ammonium transporter in the kidney. *Physiol Rev.* 1989; 69:179-249.
 7. Ray PE, Suga S, Liu XH, Johnson RJ. Chronic potassium depletion induces renal injury, salt sensitivity, and hypertension in young rats. *Kidney Int.* 2001; 59:1850-8.
 8. Lim JS, Ahn KY. Expression of Nrf2 transcription factor in rat kidney. *Korean J Nephrol.* 2011; 30:239-45.
 9. Kwon T, Kwon TD, Chun J, Kim JH, Kang SS. Akt protein kinase inhibits Rac1-GTP binding through phosphorylation at serine 71 of Rac1. *J Biol Chem.* 2000; 275:423-8.
 10. Vivonco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-kinase Akt pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer.* 2002; 2:489-501.
 11. Osaki M, Oshimura M, Ito H. PI3K-Akt pathway: its functions and alterations in human cancer. *Apoptosis.* 2004; 9:667-76.
 12. Alessi DR, Andjelkovic M, Caudwell B, Cron P, Morrice N, Cohen P, et al. Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO J.* 1996; 15:6541-51.
 13. Rane MJ, Song Y, Jin S, Barati MT, Wu R, Kausar H, et al. Interplay between Akt and p38 MARK pathways in the regulation of renal tubular cell apoptosis associated with diabetic nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2010; 298:F49-61.
 14. Jung HJ, Kwon TH. Membrane Trafficking of Collecting Duct Water Channel Protein AQP-2 Regulated by Akt/AS160. *Electrolyte Blood Press.* 2010; 8:59-65.
 15. Obata K, Yamanaka H, Kobayashi K, Dai Y, Mizushima T, Katsura H, et al. Role of mitogen-activated protein kinase activation in injured and intact primary afferent neurons for mechanical and heat hypersensitivity after spinal nerve ligation. *J Neurosci.* 2004; 24:10211-22.
 16. Widmann C, Gibson S, Jarpe MB, Johnson GL. Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol Rev.* 1999; 79:143-80.
 17. Ji LL, Chen Y, Wang ST. The toxic effect of pyrrolizidine alkaloid clivorine on the human embryonic kidney 293 cells and its primary mechanism. *Exp Toxicol Pathol.* 2008; 60:87-93.
 18. Balbi AP, Marin EC, Francescato HD, Costa RS, Coimbra TM. MARK and angiotensin II receptor in kidney of newborn rats from losartan-treated dams. *Pediatr Nephrol.* 2008; 23:1433-44.
 19. Taruno A, Niisato N, Marunaka Y. Hypotonicity stimulates renal epithelial sodium transport by activating JNK via receptor tyrosine kinases. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2007; 293:F128-38.
 20. Huang D, Ding Y, Luo WM, Bender S, Qian CN, Kort E, et al. Inhibition of MARK kinase signaling pathways suppressed renal cell carcinoma growth and angiogenesis in vivo. *Cancer Res.* 2008; 68:81-8.
 21. Khundmiri SJ, Amin V, Henson J, Lewis J, Ameen M, Rane MJ, et al. Ouabain stimulates protein kinase B (Akt) phosphorylation in opossum kidney proximal tubule cells through an ERK-dependent pathway. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2007; 293:C1171-80.
 22. Cho HJ, Ahn KY. Alteration of Nrf2 and p-Nrf2 Protein Expression in Hypokalemic Rat Kidney. *Korean J Phys Anthropol.* 2015; 28:55-62.
 23. Mitsui H, Takuwa N, Maruyama T, Maekawa H, Hirayama M, Sawatari T, et al. The MEK1-ERK map kinase pathway and the PI3-Akt pathway independently mediate anti-apoptotic signals in HepG2 liver cancer cells. *Int J Cancer* 2001; 92:55-62.
 24. Ahn KY, Turner PB, Madsen KM, Kone BC. Effect of Chronic hypokalemia on renal expression of the "gastric" H(+)-K(+)-ATPase alpha-subunit gene. *Am J Physiol.* 1996a; 270:F557-66.
 25. Ahn KY, Park KY, Kim KK, Kone BC. Chronic hypokalemia enhances expression of the H(+)-K(+)-ATPase alpha 2-subunit gene in renal medulla. *Am J Physiol.* 1996b; 271: F314-21.
 26. Ahn KY, Kim SC, Moon B, Kim KK, Kim BY. Renal adaptive responses of H(+)-K(+)-ATPase subunit isoform to chronic hypokalemia. *The Korean J Anat.* 1998; 31:405-18.
 27. Rodriguez-Pena AB, Grande MT, Eleno N, Arevalo M, Guerrero C, Santos E, et al. Activation of Erk1/2 and Akt following unilateral ureteral obstruction. *Kidney Int.* 2008; 74:196-209.
 28. Saitoh S, Terada N, Ohno N, Saitoh Y, Soleimani M, Ohno S. Immunolocalization of phospho-Arg-directed protein kinase-substrate in hypoxic kidneys using in vivo cryotechnique. *Med Mol Morphol.* 2009; 42:24-31.
 29. Nagai K, Matsubara T, Mima A, Kanamori H, Iehara N, Fukatsu A, et al. Gas6 induces Akt/mTOR-mediated mesangial hypertrophy in diabetic nephropathy. *Kidney Int.* 2005; 68:552-61.
 30. Chen J, Zhu H, Zhang Y, Cui MH, Han LY, Jia ZH, et al. Low expression of phosphatase and tensin homolog in clear-cell renal cell carcinoma contributes to chemoresistance through activating the Akt/HDM2 signaling pathway. *Mol Med Rep.* 2015; 12:2622-8.

31. Fujita H, Omori S, Ishikura K, Hida M, Awazu M. ERK and p38 mediate high-glucose-induced hypertrophy and TGF- β expression in renal tubular cells. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2004; 286:F120-6.
32. Masaki T, Foti R, Hill PA, Ikezumi Y, Atkins RC, Nikolic-Paterson DJ. Activation of the ERK pathway precedes tubular proliferation in the obstructed rat kidney. *Kidney Int.* 2003; 63:1256-64.
33. Kim HS, Kim YW. Expression of phosphorylated extracellular signal-regulated kinase in rat kidneys exposed to high +Gz. *Bosn J Basic Med Sci.* 2012; 12:269-72.
34. Pat B, Yang T, Kong C, Watters D, Johnson DW, Gobe G. Activation of ERK in renal fibrosis after unilateral ureteral obstruction: modulation by antioxidants. *Kidney Int.* 2005; 67:931-43.
35. Yu R, Chen C, Mo YY, Hebber V, Owuor ED, Tan TH. Activation of mitogen-activated protein kinase pathways induces antioxidant response element-mediated gene expression via a Nrf2-dependent mechanism. *J Biol Chem.* 2000; 275:39907-13.
36. Ma JO, Ding J, Xiao ZH, Liu CM. Puerarin ameliorates carbon tetrachloride oxidative DNA damage and inflammation in mouse kidney through ERK/Nrf2/ARE pathway. *Food Chem Toxicol.* 2014; 71:264-71.

Alteration of Akt, p-Akt, ERK, and p-ERK Proteins Expression in the Kidney of Hypokalemic Rat

Choon Sang Bae, Hye Jung Cho, Kyu Yoon Ahn

Department of Anatomy, College of Medicine, Jeonnam University

Abstract : Hypokalemia causes metabolic alkalosis and morphological changes of the kidney. K^+ balance is regulated not only by ion channels or pump gene, but also by various genes including NF-E2-related factor 2 (Nrf2). Previous study suggested the possibility that Akt and ERK kinase may be involved in Nrf2 transcriptional gene activation. In present study, we investigate the alterations of Akt, p-Akt, ERK, p-ERK protein in both normal kidney and K^+ -deficient diet kidney using Western blot analysis, and immunohistochemistry.

Our western blot data showed that the expression of Akt and p-Akt was increased gradually in K^+ -depleted diet (from 1W-3W) compared to normal group. The expression of ERK and p-ERK was markedly increased in K^+ -depleted diet 2W in comparison with normal group. Based on our immunostaining results, Akt protein immunoreactivity was prominently increased in outer medullary collecting duct, especially in K^+ -depleted diet 2 weeks. The localization of p-Akt proteins in K^+ -depleted groups was not different from normal group, but the immunoreactivity was significantly increased in distal convoluted tubule, macula densa and outer medullary thick ascending limb in K^+ -depleted diet 1 and 2 weeks groups. ERK protein immunoreactivity was prominently increased in outer medullary collecting duct, especially in K^+ -depleted diet 2 and 3 weeks. The localization of p-ERK proteins in K^+ -depleted groups was not different from normal group, but the immunoreactivity was prominently increased in the nucleus of outer medullary collecting duct especially in K^+ -depleted diet 2 weeks.

Taken together, we suggest that the expression of p-Akt was gradually increased in K^+ -depleted groups of kidney, but the expression of p-ERK was markedly increased in K^+ -depleted diet 2 week group. Hence, the promotion of AKT and ERK phosphorylation in hypokalemic condition may be involved in the regulation of ion channels, ion transporters and subsequent intracellular signal transduction.

Keywords : Hypokalemia, Metabolic alkalosis, Akt, p-Akt, ERK, p-ERK, Immunohistochemistry