

흰쥐 콩팥발생과정에서 interleukin-6와 그 수용체의 발현

이충범, 하유신, 조대행, 최재연¹, 차정호¹
가톨릭대학교 의과대학 비뇨기과학교실, ¹해부학교실

간추림 : Interleukin-6 (IL-6)와 그 수용체는 신경발생조직에서 중요한 기능을 담당하는 것으로 알려져 있으나, 콩팥의 발생과정에서의 기능은 거의 보고된 바가 없다. 본 연구에서는 IL-6와 그 특이수용체인 IL-6R의 발현을 흰쥐의 발생중인 콩팥에서 조사하였다.

임신 16, 18 및 20일 태아와 출생후 1, 3, 7, 14일의 동물 및 성체의 콩팥을 사용하여 IL-6와 그 수용체의 발현을 면역조직화학법과 *in situ* hybridization 법으로 각각 관찰하였다.

IL-6 단백질은 임신 16일의 태아에서 이미 발현되었으며, 요관썩과 사이조직의 중간엽세포를 포함하여 콩팥단위 발생구역의 여러 발생단계의 콩팥단위 구조물에 강한 면역반응성을 보였다. 그러나 성숙된 사구체와 근위세관에서는 발현되지 않았다. 출생후의 동물에서도 콩팥단위 발생구역에서의 발현양상은 태아의 것과 같았으며, 성숙된 콩팥세관에서는 원위세관과 집합세관에 강한 면역반응성이, 굵은오름세관에 매우 미약한 면역반응성이 관찰되었고, 이러한 양상은 성체에까지 계속되었다. IL-6R mRNA의 발현은 임신 16일의 태아에서 이미 관찰되며, 출생전 태아 콩팥에서의 발현부위는 IL-6의 것과 유사하였다. 출생후의 성숙된 콩팥단위에서의 IL-6R mRNA 발현은 원위세관, 굵은오름세관 및 집합세관에서 관찰되었으며, 근위세관에서는 S3 부분에서만 발현되었다.

본 연구의 결과로서 IL-6가 그 수용체를 통하여 콩팥단위발생의 초기과정에 관련되어 역할을 담당하고 있는 것으로 보이며, 성숙된 콩팥에서도 IL-6 단백질과 그 수용체가 계속 발현되는 것으로 보아 일정한 기능을 담당할 것으로 생각된다.

찾아보기 낱말 : 콩팥발생, interleukin-6, 수용체, 면역조직화학법, *in situ* hybridization, 흰쥐

서 론

콩팥은 발생과정에서 요관썩(ureteric bud)과 뒤콩팥중간엽(metanephric mesenchyme)이 서로 상호작용하여 집합관과 콩팥단위로 각각 분화한다. 이러한 과정은 여러 인자들이 시간적 공간적으로 발현되는 양상과 매우 관련이 깊다(Nigam 등 1996). 그러나 아직까지 이러한 콩팥의 발생과정의 기전은 아직

명확하지 않고, 아직까지 콩팥발생과정에 관련되어 밝혀져야 할 인자들이 많이 있을 것으로 유추된다.

Interleukin-6 (IL-6)는 IL-6 family에 속하는 시토카인(cytokine)으로서 여러 장기에서 다양한 기능을 수행한다. IL-6는 많은 세포 종류에서 발현됨이 알려져 있으며, 면역반응, 염증, 조혈과정, 세포의 증식 및 분화 등 다양한 생물학적 기능에 관련되어 있다(Naka 등 2002). IL-6의 작용은 수용체에 의하여 매개되는데 2가지 종류의 수용체, 즉 IL-6에 특이한 수용체인 IL-6R와 IL-6 family의 공통수용체인 gp130가 IL-6의 복합수용체로서 작용한다. IL-6는 먼저 IL-6R와 결합하게 되고, IL-6와 IL-6R의 복합

*본 연구는 2005년도 가톨릭대학교 성빈센트병원 임상의학연구소 연구비 지원으로 이루어진 것임.
교신저자 : 차정호(가톨릭대학교 의과대학 해부학교실)
전자우편 : jhcha@catholic.ac.kr

체는 다시 2개의 gp130과 결합하여 활성의 수용체 복합체를 형성하여 세포내로의 신호전달을 개시한다(Hirano 등 1997). Gp130은 콩팥을 포함하여 거의 모든 장기에서 발견되는 것으로 알려져 있다(Saito 등 1992). 이러한 광범위한 gp130의 분포양상은 대부분 다른 시토키인들의 기능이 주로 조절과정과 면역반응에만 국한되는 것에 비하여 IL-6를 포함한 IL-6 family의 기능이 다양하게 나타나는 원인으로 생각된다(Heinrich 등 1998, Gadiant와 Paterson 1999).

최근 Barasch 등(1999)과 Plisov 등(2001)은 조직 배양연구를 통하여 IL-6 family에 속하는 leukemia inhibitory factor (LIF)가 콩팥발생을 유도하는 가장 중요한 인자가 된다고 보고하였고, 또한 IL-6도 중간엽세포의 상피세포변환(mesenchymal to epithelial conversion)과 콩팥세관의 발생(tubulogenesis)에 관여할 것이라고 하였다. 이러한 보고는 IL-6를 포함하는 IL-6 family가 콩팥의 발생과정에 매우 중요한 역할을 담당할 것으로 유추된다. 그러나 아직까지 발생과정의 콩팥 생체내(in vivo)에서 IL-6와 그 수용체에 대한 보고는 거의 찾아볼 수 없다.

본 연구는 발생과정의 콩팥에서 IL-6와 IL-6R의 발현을 관찰함으로써 IL-6의 콩팥발생과정에서의 기능을 밝히는 형태학적 기초를 수립하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물과 조직표본작성

실험에 사용한 동물은 Sprague-Dawley 흰쥐(샘타코(주), 경기도, 대한민국)로서, 임신 16일, 18일 및 20일의 태아 그리고 출생후 1, 3, 7, 14일의 어린 동물 및 성체(체중 250g)를 사용하였다. 출생전 동물에서는 각 시기의 임신된 흰쥐 3마리를 사용하였고, 출생후 어린 동물과 성체도 각 시기에서 각각 3마리씩을 사용하였다.

실험동물을 16.5% urethane (10 mL/kg 체중)으로 복강주사하여 마취한 후 콩팥을 periodate-lysine-2% paraformaldehyde 고정액으로 5분간 심장(태아 및 어린 동물의 경우) 또는 배대동맥(성체의 경우)을

통하여 관류고정하였으며, 콩팥을 떼어낸 후 같은 고정액에 4°C에서 하룻밤 동안 후고정을 시행하였다. 임신 16일 동물은 콩팥을 분리하여 절취하기가 어려워 콩팥이 부착된 뒤배벽 부위 전체를 그대로 고정하여 사용하였다. 고정이 끝난 다음 탈수과정을 거쳐 wax에 포매한 다음 5 µm 두께의 절편을 제작하여 사용하였다.

2. 면역조직화학법

면역조직화학법을 위하여 먼저 조직절편에서 wax를 제거하여 수화시킨 다음 내인성 과산화효소를 제거하기 위하여 3% H₂O₂ 액에 30분간 두었고, PBS (0.1 M, pH 7.4)로 씻은 다음 donkey의 정상혈청(3%)에 1시간 동안 처리하여 비특이 단백질반응을 방지하였다. 사용한 1차항체는 mouse 단일클론 IL-6 항체(R & D Systems, MN, USA; 희석비율, 1:100)이며 4°C에서 하룻밤 동안 반응시켰다. PBS로 세척한 다음 2차항체로서 과산화효소가 결합된 donkey anti-mouse 항체(Jackson ImmunoResearch Lab., PA, USA; 희석비율, 1:200)를 실온에서 2시간 동안 처리하였다. 이어서 0.05 M Tris buffer (TB, pH 7.6)로 세척하고 3,3'-diaminobenzidine (DAB) 용액으로 발색시켰다. 발색이 끝난 표본 헤마톡실린으로 대조염색 후 탈수과정을 거쳐 balsam으로 봉입하여 관찰하였다. 염색강도는 염색반응이 없는 경우 음성(-), 음성 또는 매우 미약한 반응은 ±, 약한 반응은 +, 강한 반응은 ++로 구분하였다(Table 1).

3. Riboprobe의 제작

흰쥐의 대하여 시판되는 적절한 항체가 없는 IL-6R을 위한 형태학적 연구를 시행하기 위하여 다음과 같이 이에 대한 riboprobe를 제작하여 *in situ* hybridization 법에 사용하였다. 흰쥐 성체의 콩팥에서 Trizol 액(Life Technologies, NY, USA)을 사용하여 total RNA를 추출한 다음 RT-PCR을 시행하여 riboprobe 제작에 사용할 cDNA 단편을 합성하였다. 이때 사용한 primer는 다음과 같다. antisense primer, GAGGGTGACAAAGTGTACCACA; sense primer, GTACTGATCCTCGTGGTTGTCA; Gene Bank

Table 1. Expression of IL-6 protein and IL-6R mRNA in the rat kidney

	Prenatal		Postnatal		Adult	
	IL-6	IL-6R	IL-6	IL-6R	IL-6	IL-6R
DG	+~++	+	+	±	no*	no*
MG	-~±	-	-~±	-	-~±	-
PT	-	-	-/-	-/+	-/-	-/+
TAL	no*	no*	±	+	±	+
DT	++	++	++	+~+++	+~+++	+
CD	++/++	++/+	++/++	++/±	++/+	+/±

CD, (cortical/medullary) collecting duct; DG, developing glomerulus; DT, distal tubule; MG, mature glomerulus; PT, (S1 & S2/S3 segment) proximal tubule; TAL, thich ascending limb. *: no structure is present.

Access No., NM_017020; cDNA 서열위치 643~1134). 합성된 cDNA 단편을 pGEM-T Easy vector (Promega Co., WI, USA)에 삽입한 후 서열을 확인하였다. 삽입을 확인한 후 DIG RNA Labeling Kit (Roche, Mannheim, Germany)를 사용하여 digoxigenin-표지 riboprobe를 제작하되, pGEM-T Easy vector의 서열에서 반대 방향에 있는 T7 RNA합성효소와 SP6 RNA합성효소를 사용하여 antisense riboprobe와 sense probe를 각각 합성하였으며, dot blot을 시행하여 합성된 IL-6R riboprobe의 농도를 측정하여 *in situ* hybridization 법에 사용하였다.

4. *In situ* hybridization 법

In situ hybridization 법을 위하여는 5 µm wax 절편을 특수슬라이드 (ProbeON Plus; Fisher Scientific, PA, USA)에 부착하여 사용하였다. *In situ* hybridization 법의 시행과정 중에서 hybridization 과정까지는 RNase의 오염을 막기 위하여 용액의 경우 diethyl pyrocarbonate 처리를 한 후 사용하였고, 유리용기는 180°C에 8시간 동안 처리하여 사용하였다. 먼저 조직절편에서 wax를 제거한 후 0.2 N HCl 용액에 20분간 둔 다음 이어서 pepsin (2 µg/mL, 0.1 N HCl) 용액에 실온에서 20분간 처리하였다. PBS로 pepsin 용액을 씻어낸 후 알콜 처리과정을 거쳐 탈수하여 조직을 실온에서 완전히 마르게 하였다. 이어서 prehybridization 과정과 hybridization 과정을 53°C에서 각각 2시간 및 15시간씩 시행하였다.

Prehybirdization 용액의 조성은 다음과 같다. 50% formamide, 4× SSC, 10% dextran sulfate, 1X Denhardt's solution, salmon sperm DNA (1 µg/mL). Hybridization 용액의 조성은 prehybirdization 용액의 것과 동일하되 salmon sperm DNA 대신 antisense digoxigenin-표지 riboprobe (400 ng/mL)를 사용하였다. Hybridization이 끝난 조직은 2X SSC, 0.5X SSC, 0.2X SSC 용액으로 각각 15분간 3번씩 53°C에서 세척하였으며, 이어서 RNase T1 (Roche, Mannheim, Germany; 희석배율, 1 : 1,000)을 실온에서 20분간 처리하여 혼성화되지 않은 riboprobe를 제거하였다. 다음 TBS (0.1 M, pH 7.4)로 세척한 후 digoxigenin에 대한 면역발색과정을 시행하였다. 즉 정상혈청을 1시간 동안 처리하여 비특이면역반응을 제거한 후 alkaline phosphatase conjugated anti-digoxigenin antiserum (Roche, Mannheim, Germany; 희석배율, 1 : 400)을 실온에서 2시간 동안 반응시켰으며, 이어서 NBT/BCIP 혼합액을 사용하여 발색시켰다. 발색된 표본은 glycerol gel로 봉입하여 관찰하였다. 음성대조군을 위하여는 hybridization 용액에 antisense probe 대신 sense probe를 넣어 전 과정을 똑같이 시행하였다. *In situ* hybridization의 염색강도는 면역염색의 반응강도와 마찬가지로 구분하였다 (Table 1).

결 과

1. IL-6의 발현

1) 성체 콩팥에서의 발현

성체의 콩팥에서 IL-6는 원위세관에서 강하게 발현하였으며, 집합세관에서도 강하게 발현되되 결질에서는 강하게, 그리고 콩팥유두로 갈수록 면역반응성이 감소하였다. 근위세관에서는 IL-6가 전혀 관찰되지 않았으며, 사구체에서는 일부의 세포에서 약한 반응성이 관찰되었다. 바깥수질에 위치하는 굵은오름세관에서는 매우 미약한 면역반응성이 관찰되었다 (Fig. 1A-C).

2) 태아 및 출생후 동물 콩팥에서의 발현

IL-6 면역반응성은 16일군의 태아 콩팥에서도 별

써 그 발현이 관찰되었다. 콩팥단위발생구역(nephrogenic zone)에서 보이는 여러 발생단계의 사구체, 즉 콤파- 또는 S-형 사구체에서 강한 면역반응성이 관찰되며, 요관싹(ureteric bud)과 요관싹의 팽대(ampulla)도 강하게 염색되었다. 또한 원위세관과 집합세관에서도 IL-6 면역반응성이 발현되었다. 그러나 성숙된 사구체와 근위세관에서는 면역반응성이 관찰되지 않았다. 사이조직(interstitial tissue)의 중간엽세포도 IL-6가 발현되었으나, 특이하게도 팽대주위의 중간엽세포에서는 음성반응이 관찰되었다(Fig. 2A, B).

출생 후 동물의 콩팥에서 7일까지 콩팥발생구역이 피막아래의 겉질에 존재하며, 이 구역에서의 IL-6 발현은 출생전의 양상과 같았다. 또한 분화가 완료된 부위에서의 IL-6 발현은 성체의 것과 동일하였다(Fig. 3A-E).

2. IL-6R의 발현

1) 성체 콩팥에서의 발현

IL-6R mRNA의 발현을 관찰하기 위하여 *in situ* hybridization 법을 수행한 결과 원위세관과 집합세관 및 굵은오름세관에서 다같이 약한 IL-6R mRNA의 발현이 관찰되었다. 근위세관에서 S1과 S2 부분에서는 발현되지 않았으나, S3 부분에서는 약하게 발현되었다. Sense probe를 사용한 음성대조군에서는 반응성이 나타나지 않았다(Fig. 1D-F).

2) 태아 및 출생후 동물 콩팥에서의 발현

IL-6R mRNA는 콩팥단위발생구역과 원위세관 및 집합세관에서 주로 발현되었다. 태아의 콩팥에서 IL-6R mRNA는 임신 16일부터 발현이 관찰되었는데, 콩팥단위구역내의 여러 구조물 들, 즉 여러 발생단계의 사구체, 요관싹의 팽대 및 사이조직의 중간엽세포에서 발현이 관찰되었으며, 원위세관과 집합세관에서도 반응성이 관찰되었다. 특히 임신 16일 표본의 경우 콩팥의 크기가 매우 작아서 콩팥만을 분리하지 못하여 태아의 전체 배부분의 횡단표본을 사용하였으며, 이 표본에서 보이는 등쪽 신경절의 신경모세포에서도 IL-6R 반응성을 관찰할 수 있었다(Fig. 2C-E). 출생후 동물의 콩팥에서 IL-6R의 발

현양상은 콩팥단위발생구역이 있는 부위에서는 태아의 콩팥단위발생구역의 발현과 동일하였고, 그 외의 부분은 성체의 것과 동일하였다(Fig. 3F-J).

이상의 결과들을 Table 1에 요약하였다.

고 찰

본 연구는 발생초기로부터 성체에 이르는 흰쥐의 콩팥에서 IL-6 단백질과 그에 연관된 IL-6R의 발현을 형태학적 방법을 사용하여 관찰하였다. 지금까지 발생과정에서 생체내 콩팥에서 IL-6 및 그에 연관된 수용체에 대한 형태학적 보고는 거의 찾아볼 수 없었다. 단지 Dame와 Juul(2000)이 사람의 태아 콩팥에서 IL-6R이 발생과정중의 사구체, 원위세관 및 집합세관에 약하게 발현하며 근위세관에서는 전혀 발현되지 않았다고 하여 본 연구의 결과와 일치하였다.

본 연구의 결과를 보면 콩팥 초기발생에 중요한 두 구조물인 요관싹과 중간엽세포에서 IL-6 단백질과 수용체인 IL-6R의 mRNA가 발현하였다. 특히 두 구조물이 상호 작용하여 집합세관과 콩팥단위가 형성되는데 요관싹에서 유래되는 집합세관에서는 성숙한 콩팥에 이르기까지 IL-6 및 IL-6R이 계속적으로 발현이 유지되며, 중간엽세포가 상피세포로 변화하여 사구체 및 콩팥단위의 콩팥세관이 형성될 때는 구조물의 종류와 시기에 따라 발현이 변화하였다. 이러한 결과는 IL-6가 그 수용체인 IL-6R를 매개로 하여 특히 사구체가 중간엽세포로 부터 변화되고 성숙된 사구체로 되는 초기과정에 중요한 역할을 할 것임을 예시한다.

Barasch 등(1999)은 뒤콩팥중간엽세포의 조직배양시 IL-6를 IL-6R의 용액형(soluble form, sIL-6R)과 같이 투여하면 중간엽세포의 상피세포변환과 콩팥세관의 발생이 유도되는 것으로 보아 IL-6와 그 수용체가 콩팥단위의 발생과정에 관여할 것이라고 하였다. 이들의 결과는 본 형태학적 연구가 IL-6의 기능을 시후하는 바와 잘 일치한다. 그러나 IL-6의 투여하지 않거나, sIL-6R 없이 IL-6 단독투여는 유도과정이 일어나지 않았다고 하여, IL-6와 IL-6R이 발

현되지 않을 가능성이 있어 앞으로 뒤콩팥중간엽세포에서의 IL-6와 IL-6R의 발현에 대한 정밀한 연구가 필요하다.

본 연구와 Barasch 등(1999)의 보고를 종합하면 IL-6의 발현과 IL-6R의 수용체로서의 역할은 매우 미묘한 기전이 있을 것으로 예상된다. 콩팥단위의 발생시 뒤콩팥중간엽세포는 요관썩과 서로 접촉하여 상호작용함으로써 상피세포로 전환되어 콩팥단위로 발생이 유도된다. 본 연구의 결과를 보면 요관썩과 접하지 않은 중간엽세포에서는 IL-6가 발현되거나 요관썩의 팽대와 접촉하여 상피세포로 유도될 부위의 중간엽세포에서는 IL-6가 발현되지 않았다. 이는 Barasch 등(1999)의 보고에서 요관썩 추출물을 함유한 배양액에 배양되는 뒤콩팥중간엽세포에 IL-6의 첨가가 없으면 콩팥단위발생유도가 이루어지지 않는다는 것과 종합하면 요관썩의 유도를 받은 뒤콩팥중간엽세포에서 IL-6발현이 사라지는 것으로 사료된다.

IL-6R은 일반적인 수용체와 달리 세포막 부분이 떨어져 체내를 순환하며 작용하는 sIL-6R으로도 존재한다. 따라서 sIL-6R은 IL-6R가 발현되지 않는 세포에서도 gp130이 존재하면 IL-6와 함께 gp130에 결합하여 IL-6의 신호를 전달하게 된다. 또한 체액 내의 IL-6와 결합하여 IL-6가 세포에 신호를 전달하는 것을 막는 역할도 할 것으로 생각되고 있다 (Jones 등 2005). 세포막에 부착된 수용체가 sIL-6R으로 떨어져 나오는 이유는 아직까지 명확하지 않다. 그러나 일부 질병상태에서 혈청과 뇨의 sIL-6R 농도가 증가하며 (Suzuki 등 1993, Sadeghi 등 2003), 신경세포의 생존에 sIL-6R가 일부 역할을 한다는 보고(März 등 1999)를 종합하면 뒤콩팥중간엽세포가 콩팥단위로 발생할 때 IL-6R가 sIL-6R로서 작용할 가능성도 있다고 사료된다.

성체의 콩팥에서 IL-6는 콩팥질병과 관련되어 여러 기능이 있을 것으로 알려져 있다. 정상콩팥에서 IL-6는 여러 연구자들에 의하여 혈관사이세포 (mesangial cell)와 여러 콩팥세관 (Fukatsu 등 1991, Ranieri 등 1996)에 발현한다고 보고되었으며, 특히 질병상태에서 IL-6 발현의 변화가 연구되어, Ig A 콩팥병증, 증식사구체신염 (proliferative glomerulonep-

hritis), 안지오테신 II에 의한 콩팥손상, 급성콩팥기능상실 등에서 IL-6의 발현이 증가되며 (Horii 등 1989, Taniguchi 등 1999, Homis 등 2002, Ruiz-Ortega 등 2002), IL-6의 기능과 관련되어 콩팥손상시 IL-6가 콩팥세관의 재생을 촉진한다는 보고도 있다 (Kayama 등 1995). 또한 여러 콩팥질환에서 뇨의 IL-6 농도가 증가하며 이는 콩팥질환의 진행을 유추할 수 있는 유용한 표지자로 사용될 수 있다고 하였다 (Makela 등 2004). 본 연구에서 IL-6와 IL-6R이 정상적으로 콩팥세관에 발현되는 것으로 보아 정상콩팥에서도 콩팥의 기능에 어떠한 역할을 할 것으로 생각되나 아직까지 정상콩팥에서 IL-6의 기능에 대한 연구는 거의 없는 실정이어서 앞으로 이에 대한 연구가 요망된다.

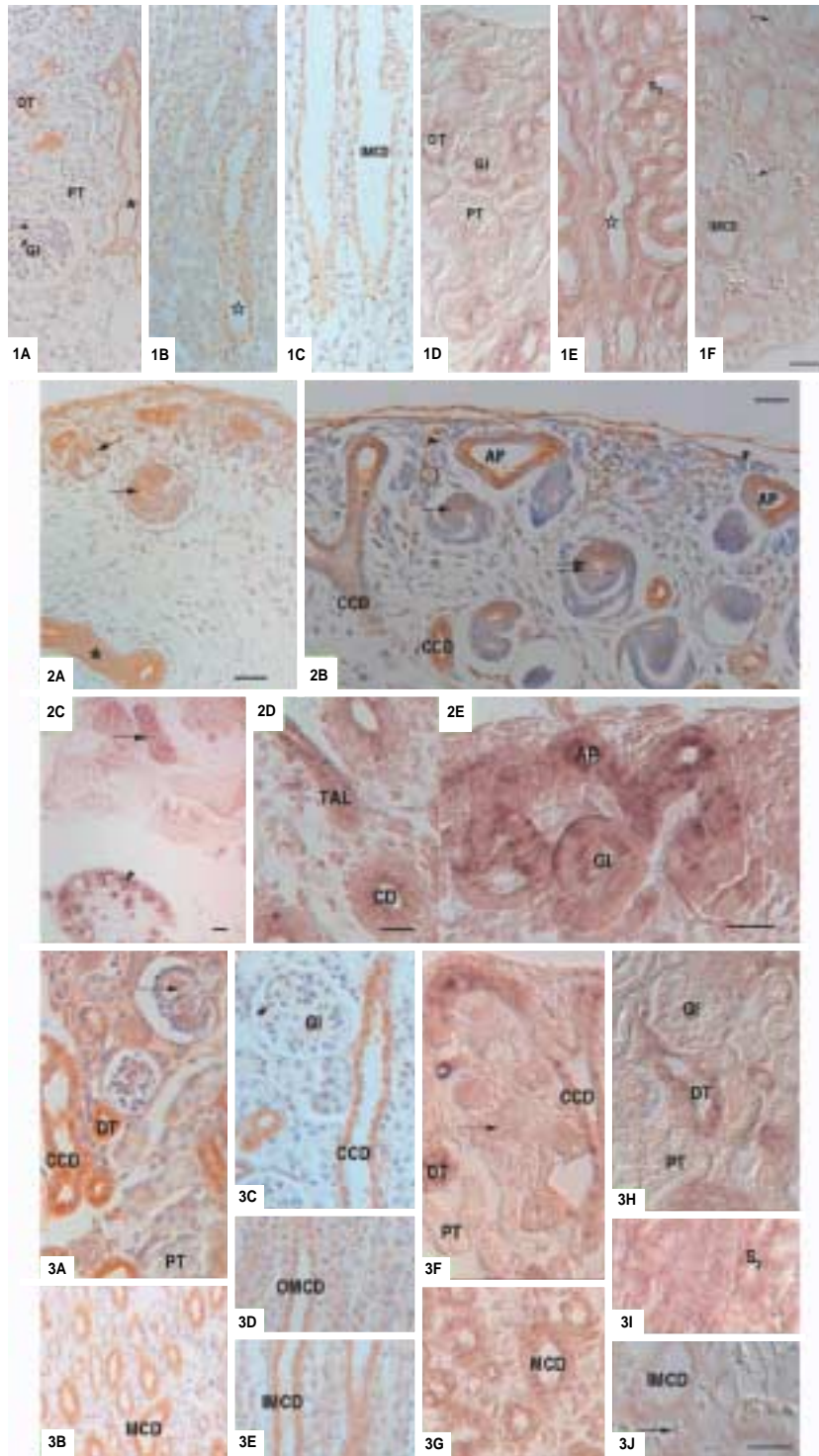
참 고 문 헌

- Barasch J, Yang J, Ware CB, Taga T, Yoshida K, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Parravicini E, Malach S, Aranoff T, Oliver JA : Mesenchymal to epithelial conversion in rat metanephros is induced by LIF. *Cell* 99: 377-386, 1999.
- Dame JB, Juul SE : The distribution of receptors for the pro-inflammatory cytokines interleukin (IL)-6 and IL-8 in the developing human fetus. *Early Hum Dev* 58: 25-39, 2000.
- Fukatsu A, Matsuo S, Tamai H, Sakamoto N, Matsuda T, Hirano T : Distribution of interleukin-6 in normal and diseased human kidney. *Lab Invest* 65: 61-66, 1991.
- Gadient RA, Patterson PH : Leukemia inhibitory factor, interleukin 6, and other cytokines using the gp130 transducing receptor: roles in inflammation and injury. *Stem Cells* 17: 127-137, 1999.
- Heinrich PC, Behrmann I, Muller-Newen G, Schaper F, Graeve L : Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem J* 334: 297-314, 1998.
- Hirano T, Nakajima K, Hibi M : Signaling mechanisms through gp130: a model of the cytokine system. *Cytokine Growth Factor Rev* 8: 241-252, 1997.
- Homs E, Ribeiro-Alves MA, Lopes de Faria JB, Dias EP : Interleukin-6 stimulates tubular regeneration in rats with glycerol-induced acute renal failure. *Nephron* 92: 192-199, 2002.
- Horii Y, Muraguchi A, Iwano M, Matsuda T, Hirayama T,

- Yamada H, Fujii Y, Dohi K, Ishikawa H, Ohmoto Y : Involvement of IL-6 in mesangial proliferative glomerulonephritis. *J Immunol* 143: 3949-3955, 1989.
- Jones SA, Richards PJ, Scheller J, Rose-John S : IL-6 trans-signaling: the in vivo consequences. *J Interferon Cytokine Res* 25: 241-253, 2005.
- Kayama F, Yoshida T, Elwell MR, Luster MI : Cadmium-induced renal damage and proinflammatory cytokines: possible role of IL-6 in tubular epithelial cell regeneration. *Toxicol Appl Pharmacol* 134: 26-34, 1995.
- Makela S, Mustonen J, Ala-Houhala I, Hurme M, Koivisto AM, Vaheeri A, Pasternack A : Urinary excretion of interleukin-6 correlates with proteinuria in acute Puumala hantavirus-induced nephritis. *Am J Kidney Dis* 43: 809-816, 2004.
- März P, Otten U, Rose-John S : Neural activities of IL-6-type cytokines often depend on soluble cytokine receptors. *Eur J Neurosci* 11: 2995-3004, 1999.
- Naka T, Nishimoto N, Kishimoto T : The paradigm of IL-6: from basic science to medicine. *Arthritis Res* 4(suppl 3): S233-S242, 2002.
- Nigam SK, Aperia AC, Brenner BM : Development and Maturation of the kidney. in *The Kidney*, ed Brenner BM, Saunders, pp 72-98, 1996.
- Plisov SY, Yoshino K, Dove LF, Higinbotham KG, Rubin JS : TGF β 2, LIF and FGF2 cooperate to induce nephrogenesis. *Development* 128: 1045-1957, 2001.
- Ranieri E, Gesualdo L, Petrarulo F, Schena FP : Urinary IL-6/EGF ratio: a useful prognostic marker for the progression of renal damage in IgA nephropathy. *Kidney Int* 50: 1990-2001, 1996.
- Ruiz-Ortega M, Ruperez M, Lorenzo O, Esteban V, Blanco J, Mezzano S, Egido J : Angiotensin II regulates the synthesis of proinflammatory cytokines and chemokines in the kidney. *Kid Int suppl* 82: 12-22, 2002.
- Sadeghi M, Daniel V, Wiesel M, Hergesell O, Opelz G : High urine sIL-6R as a predictor of late graft failure in renal transplant recipients. *Transplantation* 76: 1190-1194, 2003.
- Saito M, Yoshida K, Hibi M, Taga T, Kishimoto T : Molecular cloning of a murine IL-6 receptor-associated signal transducer, gp130, and its regulated expression *in vivo*. *J Immunol* 148: 4066-4071, 1992.
- Suzuki H, Yasukawa K, Saito T, Narazaki M, Hasegawa A, Taga T, Kishimoto T : Serum soluble interleukin-6 receptor in MRL/lpr mice is elevated with age and mediates the interleukin-6 signal. *Eur J Immunol* 23: 1078-1082, 1993.
- Taniguchi Y, Yorioka N, Kumagai J, Katsutani M, Kuratsune M, Amimoto D, Yamakido M. Interleukin-6 Localization and the Prognosis of IgA Nephropathy. *Nephron* 81: 94-98, 1999.

Legends for Figures

- Fig. 1.** Expressions of IL-6 protein (A-C), and IL-6R mRNA (D-F) in the adult rat kidney. In renal cortex (A & D), IL-6 & IL-6R are expressed in both distal tubule (DT) and cortical collecting duct (asterisk), but negative in proximal tubule (PT). A few of cells (arrowheads in A) in glomerulus (Gl) are IL-6 positive. In the outer medulla (B & E), outer medullary collecting ducts (star) express both IL-6 and IL-6R. Note that S3 segments (S3) of proximal tubules which are IL-6-negative show moderate to strong IL-6R-in situ signaling. In the inner medulla (C & F), inner medullary collecting ducts (IMCD) are positive for both IL-6 and IL-6R staining. Arrows indicate negatively stained Henle loops. Scale bar, 50 μ m.
- Fig. 2.** Expressions of IL-6 protein (A, B), and IL-6R mRNA (C-E) in 16- (A, C), 18-day-old (B, D, E) fetal rat kidneys. A. IL-6 immunoreactivity appears as early as on fetal 16-day. In nephrogenic zone, several stages of developing glomeruli (arrows) showing IL-6-immunoreactivities are shown. Note the strongly stained medullary collecting duct (asterisk) derived from ureteric bud. B. Higher magnification of nephrogenic zone. Ampulla (AP), comma- (arrow) and S-shaped (double arrow) developing glomeruli, cortical collecting duct (CCD) are densely stained. Mesenchymal cells (open circles) in the interstitial tissue are IL-6-positive. Note that mesenchymal cells (arrowheads) in the mesenchymal caps surrounding the ampulla become IL-6-negative. C-E. Note the intense signals in the neuroblast cells of the dorsal root ganglions (arrow in C) and in the renal cotices (arrowhead in C). IL-6R is detected in collecting duct (CD), thick ascending limb of Henle loop (TAL), ampulla (AP), developing glomerulus (Gl). Scale bars in A & C, 150 μ m; Scale bars in B, D & E, 50 μ m.
- Fig. 3.** Expressions of IL-6 protein and IL-6R mRNA in 3- (A, B, F, G; A & F, cortex; B & G, medulla) and 14-day-old (C-E, H-J; C & H, cortex; D & I, outer medulla; E & J, inner medulla) pups kidneys. In the newborn pups, note IL-6-staining in the glomeruli of the capillary loop stage (arrows in A). In contrast, IL-6R-signaling in the developing glomerulus decreases quickly to undetectable levels after birth (arrows in F). Note the positively stained cortical collecting ducts (CCD), distal tubules (DT), and medullary collecting ducts (MCD), and the negatively stained proximal tubules (PT). In 14-day-old pups, renal expressions of IL-6, IL-6R are very similar those in adult kidney. Scale bar, 50 μ m.



Abstract

The Expression of Interleukin-6 and Its Receptor in the Developing Rat Kidney

Choong-Bum Lee, Ha-U Syn, Dae-Haeng Cho, Jae-Youn Choi¹, Jung-Ho Cha¹

*Department of Urology, ¹Department of Anatomy College of Medicine,
The Catholic University of Korea*

Interleukin-6 (IL-6) and its receptor are presumed to play important roles in the developing nervous system. However, little is known about their potential role(s) in the developing kidney. To investigate this, we have studied the expression of IL-6 and its receptor (IL-6R) in the developing rat kidney.

Kidneys from 16- (F16), 18- and 20-day-old (F20) fetuses, 1- (P1), 3- (P3), 7- (P7) and 14-day-old (P14) pups, and adult rats were extracted. Renal expressions of IL-6 and its receptors were examined by immunohistochemistry and *in situ* hybridization respectively.

IL-6 protein already appeared in F16. The early stage of renal development before birth, IL-6 showed strong immunoreactivity in the ureteric bud, metanephric mesenchymal cells (MMC) and developing glomerulus. The expression pattern of IL-6 in nephrogenic zone are very similar even after birth. In matured nephron after birth, IL-6 immunoreactivities were detected in distal tubules strongly, and collecting ducts moderately and thick ascending limb weakly. IL-6R hybridization signals have also already appeared in 16-day old fetal kidney. Before birth, IL-6R mRNAs were expressed in ureteric bud, MMC and developing glomerulus. In the matured nephron after birth, IL-6R mRNA was expressed in the thick ascending limb, distal tubules, collecting ducts and S3 segment of proximal tubule.

These results suggest that IL-6 and its receptor may be involved in regulation of nephron formation in nephrogenic zone of rat, and play a role in distal nephron including collecting duct after birth.

Key words : Nephrogenesis, Interleukin-6, Immunohistochemistry, *In situ* hybridization, Rat