

## 저칼륨혈증 흰쥐 신장에서 Nrf2와 p-Nrf2 단백질발현의 변화

조혜정, 안규윤

전남대학교 의과대학 해부학교실, 의과학연구소

(2015년 3월 6일 접수, 2015년 3월 24일 수정접수, 2015년 3월 25일 게재승인, Published Online 30 March 2015)

**간추림** : K<sup>+</sup> 평형조절에 이온통로나 펌프 유전자 이외에도 다양한 유전자가 관여한다. 저칼륨혈증 신장에서 NF-E2-related factor 2 (Nrf2) mRNA의 분포와 Nrf2 전사유전자가 이온수송체를 조절한다는 것은 밝혀져 있지만 Nrf2와 phosphorylated-Nrf2 (p-Nrf2) 단백질의 분포는 밝혀지지 않았다. 이에 본 연구는 칼륨제한 식이에 따른 흰 쥐 신장 내 Nrf2와 p-Nrf2의 발현 및 분포의 변화를 면역조직화학적 방법으로 관찰하였다.

면역조직화학적 조건에서 Nrf2 단백질의 면역반응성은 토리쪽굽슬세관과 토리쪽곧은세관에서는 높게 발현되었고, 결질 굽은오름부분에서는 중등도의 발현을 보였으며 바깥속질 굽은오름부분과 결질집합관 및 바깥속질집합관에서는 낮게 발현되었다. 칼륨제한 식이군의 Nrf2의 발현부위는 정상 식이군과 비교해 차이가 없었으나 면역반응성은 칼륨제한 식이 3주군의 토리쪽굽슬세관과 토리쪽곧은세관에서 최대발현을 보였다. 정상 식이군 p-Nrf2 단백질의 면역반응성은 결질 굽은오름부분, 결질집합관 및 사구체내피세포의 핵에서는 높게 발현되었고, 먼쪽굽슬세관과 바깥속질집합관에서는 중등도의 발현을 보였으며, 토리쪽굽슬세관과 바깥속질 굽은오름부분의 핵에서는 낮게 발현되었다. 칼륨제한 식이군의 p-Nrf2의 발현부위는 정상 식이군과 비교해 유사하였으며 면역반응성은 칼륨제한 식이 2주군과 3주군의 바깥속질집합관의 핵에서 현저히 증가하였으며 그 외 결질집합관, 먼쪽굽슬세관, 결질 굽은오름부분 및 바깥속질 굽은오름부분에서는 중등도의 증가를 보였으며, 결질 토리쪽굽슬세관에서는 정상 식이군과 유사하였다.

이상의 결과로 저칼륨혈증에서 신장 Nrf2와 p-Nrf2의 단백질발현 양상은 상호 간에 차이를 나타냈으나 면역반응성은 칼륨제한 식이가 길어질수록 증가함을 보여주었다. 또한 이온수송체 단백질의 발현부위와 유사하여 이들 유전자의 조절뿐만 아니라 세포 내 신호전달에 있어 중요한 역할에 관여할 것임을 시사해 주었다.

**찾아보기 낱말** : 저칼륨혈증, NF-E2-related factor 2 (Nrf2), p-Nrf2, 면역조직화학

### 서 론

Nrf2는 Cap-N-Collar (CNC) 계열의 basic region-leucine zipper (b-Zip) 전사조절인자로서, erythroid-derived CNC homology protein (ECH)라고 불리기도 하고, 또한 여러 가지 자극에 대해 민감하게 반응하는 산화·환원

반응의 감수성 전자인자로서 다양한 항산화제와 생체방어의 유전자발현을 조절하기도 한다[1-3]. 세포 내 산화반응에 관여하는 전사조절인자 Nrf2는 보통 Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1) 단백질과 결합하여 있지만, 활성화가 되면 Nrf2가 Keap1에서 떨어져 나와 핵안으로 이동하여 c-Jun과 Maf와 같은 전사조절인자와 이종이합체 형태를 형성하고, 해당하는 유전자의 촉진인자 영역인 antioxidant response element (ARE)에 결합을 한다. Nrf2-ARE 결합은 세포 내 항산화 및 항염증에 관련된 200여 개의 유전자 발현을 조절하는 데 관여한다고 한다[4-6]. 또한 Nrf2와 ARE 신호전달계의 상위단계 조절 요인으로 mitogen-activated protein kinase

\*본 논문은 2011학년도 전남대학교 연구년 연구비 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

(MAPK), protein kinase C, phosphatidylinositol 3-kinase 등이 작용하며, 활성산소종을 생성하는 여러 약제나 항생제들에 유도된 산화적 스트레스는 MAPK 신호전달계의 활성화를 초래하고, Nrf2-Maf-defendant ARE 유전자들의 활성화가 발생하여 생체방어 기능을 갖거나 세포 성장이나 세포괴사를 조절하는 것으로 보고되고 있다 [7]. 저칼륨혈증 신장에서 Nrf2 mRNA와 단백질발현이 증가한다는 보고 [8]와 Nrf2가 Na/HCO<sub>3</sub> cotransporter-1 (NBC-1), colonic H/K-ATPase 및 Na/K-ATPase  $\alpha$ 3 이온수송체의 조절에 관여한다는 촉진인자 연구 [9]로 Nrf2가 이온수송체들의 유전자발현 조절에 큰 역할을 할 것으로 추측하였다.

K<sup>+</sup> 결핍은 혈청 K<sup>+</sup> 농도가 3.0 mEq/L 미만인 경우를 말하며 전해질장애로 암모니아 대사증가, 산-염기 평형장애, 대사성 알칼리증을 일으킨다 [10-12]. 이러한 암모니아 대사는 산 분비 및 염기 생성과 밀접하게 관련되어 있으며 산-염기 평형을 조절하는 주요 기전으로 작용한다 [13]. 대사성 알칼리증의 유지는 HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 재흡수 증가에 의해서 이루어지고 이와 관련된 기전은 토리쪽세관 침부세포막 Na/H exchanger3 (NHE-3)와 기저외세포막 NBC-1의 증가에 의한다고 하였다 [14-16]. 만성적인 K<sup>+</sup> 결핍은 신장세관의 손상과 사이질조직 섬유화, 신장세관에서의 Osteopontin 발현 증가 및 손상부위로의 염증세포 침윤을 유발한다고 보고하였다 [17]. 또한 Ahn 등 [18-20]은 저칼륨혈증 신장에서 정상보다 HK $\alpha$ 1, HK $\alpha$ 2 mRNA 발현이 증가하였고, Na/K-ATPase isoform mRNA 발현도 속속질에서 2~3배 증가되어 발현되었음을 보고 [21,22]하여 이들 효소 발현의 변화로 K<sup>+</sup> 재흡수가 일어날 것으로 생각하였다. 지금까지 칼륨 제한 시 신장에서의 대부분의 연구는 H/K-ATPase, Na/K-ATPase, NHE-3 및 NBC-1에 대한 inhibitor-sensitive 이온수송 혹은 효소활성이나 유전자의 발현에 관한 것 뿐이었고 [8], 이 유전자들의 발현을 조절하는 분자적 기전이나 칼륨 평형 장애에 대한 유전자의 특이한 반응과 조절에 관한 연구는 흔치 않다. 따라서 저칼륨혈증 시 신장 Nrf2와 p-Nrf2의 단백질발현 변화가 이온수송체 유전자 조절뿐만 아니라 세포 내 신호전달에 있어 중요한 역할을 규명하는 것도 흥미로운 것으로 생각된다. 이에 본 연구는 저칼륨혈증 신장에서 Nrf2와 p-Nrf2 단백질 발현과 분포의 변화를 면역조직화학적 방법으로 관찰하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험 동물

본 실험에 사용된 동물은 체중 230 g 내외의 성숙

Sprague-Dawley계 숫컷 흰쥐 30마리로 다섯 군으로 구분하였다. 제1군은 정상 식이 (150 mEq K<sup>+</sup>/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. 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 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)과 paraformaldehyde-lysine-periodate (PLP) 고정액으로 관류 고정시켰다. 상기 고정액에 16시간 동안 4°C 고정 후 PBS로 3회 세척하고 알코올로 탈수과정을 거친 후 왁스 (polyethylene glycol 400 distearate (Polysciences Inc, Warrington, PA, USA))에 포매하였다. 포매된 조직은 회전식 절편기로 6  $\mu$ m 절편을 얻어 면역조직화학 실험에 이용하였다. 면역조직화학 반응에 사용된 일차항체는 Nrf2 (Santa Cruz Biotechnology, California, USA; sc-722), p-Nrf2 (Epitomics Inc, California, USA; EP1809Y)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% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 30분 부치시킨 다음 PBS로 세척하였다. 3% 정상염소 혈청으로 30분간 반응시켜 주변부의 비특이적 반응을 억제하고 일차항체에 4°C에서 14~16시간 반응시켰다. 반응시킨 조직은 PBS로 5분씩 3번 세척하고 biotinylated anti-rabbit IgG에 30분간 부치시킨 다음 avidin-biotin conjugate에 30분간 반응시켰다. 반응이 끝난 절편은 PBS로 세척 후 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride으로 7분간 발색시킨 다음 탈수과정을 거친 후 permount로 봉입하여 광학현미경으로 관찰하였다.

## 결 과

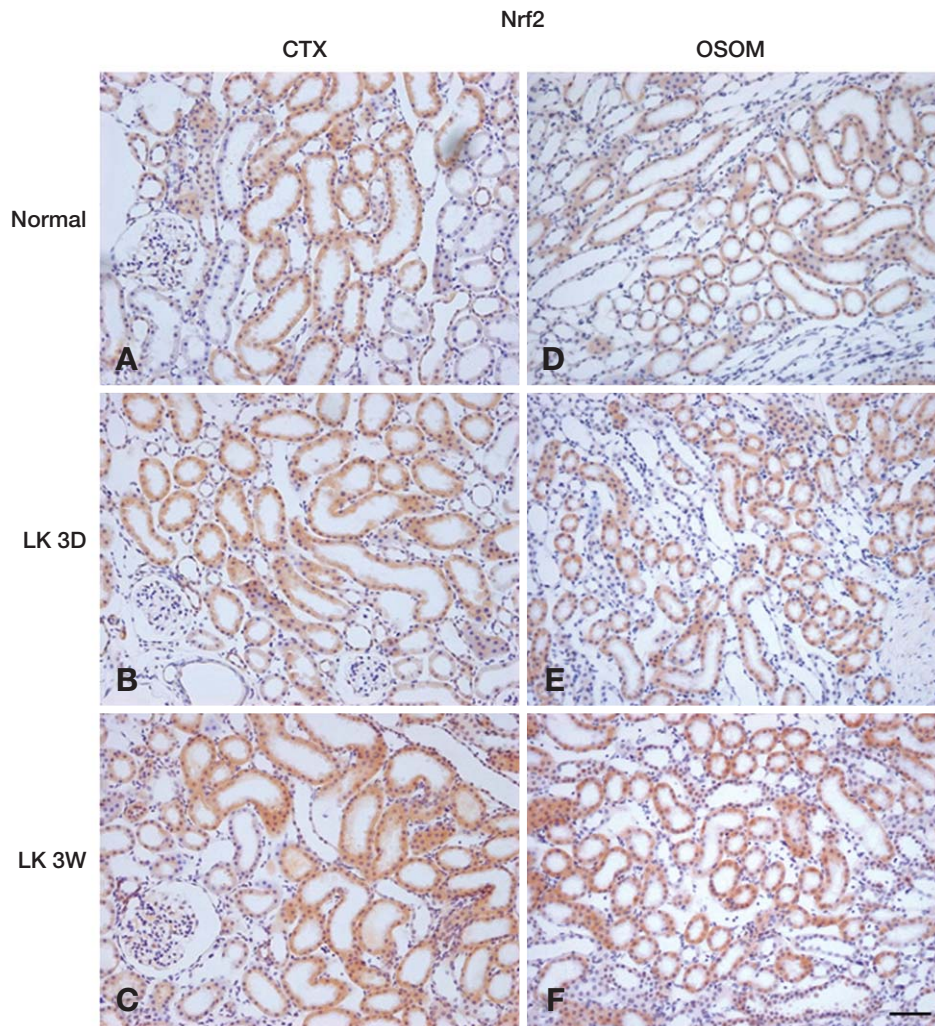
Nrf2와 p-Nrf2에 대한 신장 내 발현 분포를 알아보기 위해서 면역조직화학 실험을 실시하였다. 일차항체를 사용하지 않은 대조염색에서는 대조군과 실험군 모두에서 면역반응성을 관찰할 수 없었다.

정상 식이군 Nrf2 단백질의 면역반응성은 결질 토리쪽 곱슬세관과 바깥속질 토리쪽곧은세관에서는 높게 발현

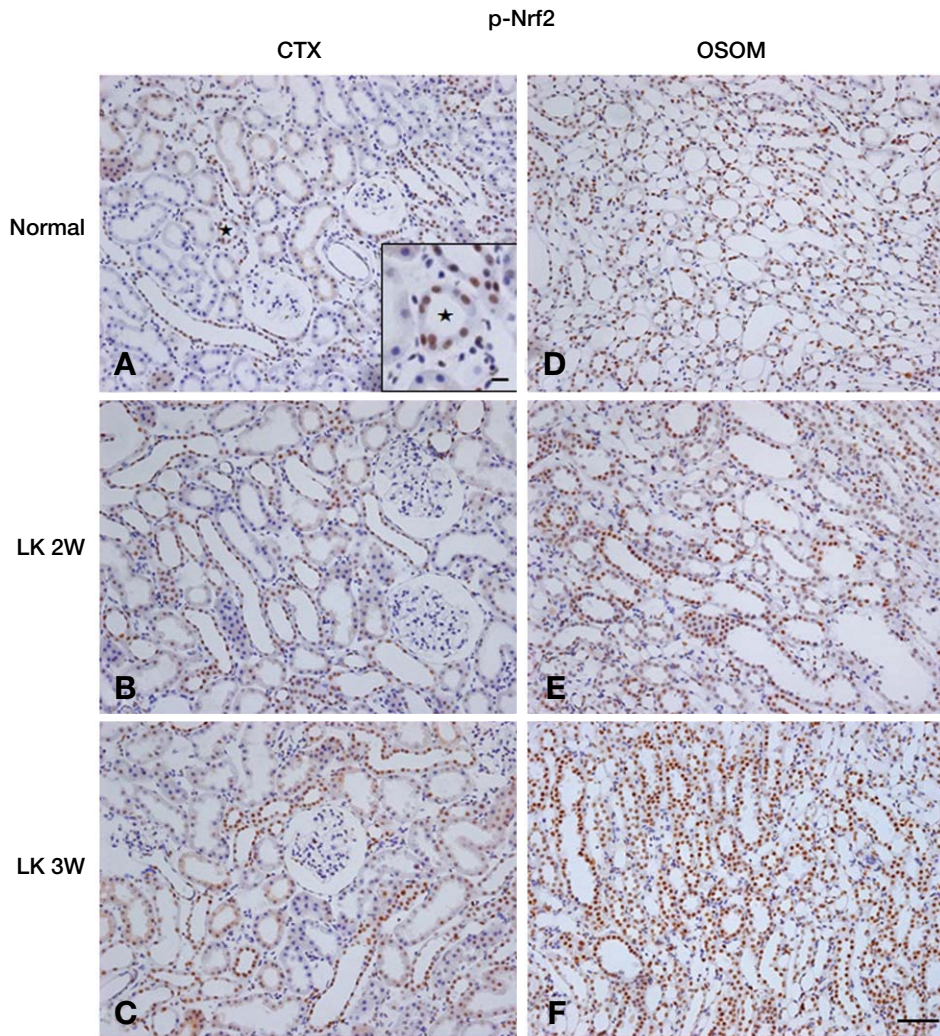
되었고, 겉질 굵은오름부분에서는 중등도의 발현을 보였으며 바깥속질 굵은오름부분, 겉질집합관 및 바깥속질 집합관에서는 낮게 발현되었다. 칼륨제한 식이 3일군의 Nrf2의 발현 부위는 정상 식이군과 비교해 차이가 없었으나 면역반응성은 바깥속질 토리쪽곧은세관에서 약간 증가하였고, 그 외 겉질 굵은오름부분, 바깥속질 굵은오름부분, 겉질집합관 및 바깥속질 집합관에서는 정상 식이군과 유사하였다. 칼륨제한 식이 3주군의 Nrf2의 발현 부위는 정상 식이군과 비교해 차이가 없었으나 면역반응성은 겉질 토리쪽곧은세관과 바깥속질 토리쪽곧은세관에서 최대 발현을 보였고, 겉질 굵은오름부분에

서는 중등도의 증가를 보였으며 바깥속질 굵은오름부분, 겉질집합관 및 바깥속질 집합관에서는 약간 증가하였다 (Fig. 1).

정상 식이군 p-Nrf2 단백질의 면역반응성은 겉질 굵은오름부분, 겉질집합관 및 사구체내피세포의 핵에서는 높게 발현되었고, 먼쪽곧은세관과 바깥속질 집합관에서는 중등도의 발현을 보였으며, 겉질 토리쪽곧은세관과 바깥속질 굵은오름부분의 핵에서는 낮게 발현되었다. 칼륨제한 식이군의 p-Nrf2의 발현 부위는 겉질 토리쪽곧은세관, 겉질 굵은오름부분, 겉질집합관 및 먼쪽곧은세관과 바깥속질 굵은오름부분과 바깥속질 집합관으로 정



**Fig. 1.** Light micrograph illustrating the expression and cellular localization of Nrf2. Expression of Nrf2 in the renal cortex (A-C) and outer medulla (D-F) of normal diet (A, D), K-free diet 3 day (B, E) and K-free diet 3 weeks (C, F) groups. In normal group, Nrf2 is highly expressed in the proximal convolute tubule and proximal straight tubule, moderately in cortical thick ascending limb, and weakly in cortical collecting duct, outer medullary thick ascending limb, and outer medullary collecting duct. In K-depleted groups, the pattern of cellular labeling of Nrf2 protein is identical to that of normal group, but the signal intensity is prominently increased in proximal straight tubule especially in rats at K-free diet 3 weeks. Scale bar is 30  $\mu$ m (Normal: normal diet 2weeks; LK 3D: K-free diet 3 day; LK 3W: K-free diet 3 weeks).



**Fig. 2.** Light micrograph illustrating the expression and cellular localization of p-Nrf2. Expression of p-Nrf2 in the renal cortex (A-C) and outer medulla (D-F) of normal diet (A, D), K-free diet 2 weeks (B, E), and K-free diet 3 weeks (C, F) groups. In normal group, p-Nrf2 is highly expressed in nucleus of cortical thick ascending limb, cortical collecting duct, and glomerular endothelial cell, moderately in distal convoluted tubule and outer medullary collecting duct, and weakly in proximal convoluted tubules and outer medullary thick ascending limb. In K-depleted groups, the pattern of cellular labeling of p-Nrf2 protein is similar to that of normal group, signal intensity is significantly increased in the nucleus of outer medullary collecting duct from K-free diet 2 and 3 weeks groups. Inset: high magnification of tubule (asterisk). Scale bar is 30  $\mu$ m (Normal: normal diet 2 weeks; LK 2W: K-free diet 2 weeks; LK 3W: K-free diet 3 weeks).

상 식이군과 비교해 유사하였으며, 면역반응성은 칼륨 제한 식이 2주군과 3주군의 바깥속질집합관의 핵에서 현저히 증가하였고, 그 외 겉질집합관, 먼쪽굽슬세관, 겉질 굽은오름부분 및 바깥속질 굽은오름부분에서는 중등도의 증가를 보였으며, 겉질 토리쪽굽슬세관에서는 정상 식이군과 유사하였다 (Fig. 2).

## 고찰

본 연구는 정상 및 칼륨제한 식이 기간에 따른 흰쥐

신장에서 Nrf2와 p-Nrf2 단백질 발현 및 분포의 변화를 알아보고자 면역조직화학적 방법으로 관찰한 것이다.

면역조직화학적 소견에서 Nrf2 단백질의 면역반응성은 토리쪽굽슬세관과 토리쪽곧은세관에서는 높게 발현되었고, 겉질 굽은오름부분에서는 중등도의 발현을 보였으며 바깥속질 굽은오름부분, 겉질집합관 및 바깥속질 집합관에서는 낮게 발현되었다. 칼륨제한 식이 3주군의 Nrf2의 발현 부위는 정상 식이군과 비교해 차이가 없었으나 면역반응성은 토리쪽굽슬세관과 토리쪽곧은세관에서 최대 발현을 보였고, 겉질 굽은오름부분에서는 중등도의 증가를 보였으며 바깥속질 굽은오름부분, 겉질

집합관 및 바깥속질집합관에서는 약간 증가하는 소견을 보였다. 이와 같은 소견은 저칼륨혈증에서 다양한 이온 수송체의 유전자가 이들 부위에서 발현한다는 소견 [16, 18-22]과 일치하였고, 저칼륨혈증 흰쥐 신장의 *in situ* hybridization 조직화학소견에서 Nrf2 유전자가 이들 부위에서 발현된다는 소견 [8]과도 유사하였다. 또한 만성 신부전 흰쥐 신장에서 Nrf2가 토리쪽세관 및 먼쪽곱슬세관에서 발현되었다는 보고와도 유사하였다 [23]. 이는 Nrf2가 이들 유전자의 기능을 촉진시켰거나 또는 이온 수송에 직접 관여했을 가능성이 추측되었다.

정상 식이군 p-Nrf2 단백질의 면역반응성은 겔질 굵은 오름부분, 겔질집합관 및 사구체내피세포의 핵에서는 높게 발현되었고, 먼쪽곱슬세관과 바깥속질집합관에서는 중등도의 발현을 보였으며, 토리쪽곱슬세관과 바깥속질 굵은오름부분의 핵에서는 낮게 발현되었다. 칼륨제한 식이군의 p-Nrf2의 발현 부위는 정상 식이군과 비교해 차이가 없었으나, 면역반응성은 칼륨제한 식이 2주군과 3주군의 바깥속질집합관의 핵에서 현저히 증가하였고, 그 외 겔질집합관, 먼쪽곱슬세관, 겔질 굵은오름부분 및 바깥속질 굵은오름부분에서는 중등도의 증가를 보였으며, 토리쪽곱슬세관에서는 정상 식이군과 유사하였다. p-Nrf2 발현에 관해서는 생쥐의 간 [24]과 대장 [25]에서 보고한 바 있으나 신장에서는 최초로 p-Nrf2 발현을 관찰한 것이다. 그리고 저칼륨혈증 신장에서 HK $\alpha$ 1, HK $\alpha$ 2 mRNA 발현과 Na/K-ATPase isoform mRNA 발현이 이들 부위에서 발현한다는 소견과 [18-22] 유사하였으며, 또한 현재 진행 중인 CV-1 또는 293T 세포주에 저칼륨 배양한 후 단백을 추출하여 Western 분석한 결과 p-Nrf2가 칼륨제한 식이가 길어질수록 핵으로 많이 축적되어 증가함을 보여주었다 (data not shown).

칼륨제한 식이군의 Nrf2와 p-Nrf2 단백질 발현이 칼륨제한 식이가 길어질수록 점진적으로 증가함을 보여주었는데, 이는 신부전 흰쥐 모델의 일측성 요관폐쇄에서 Nrf2 유전자의 발현 변화가 Dimethylfumarate 처리 시 증가한다는 소견과도 일치하였다 [26]. 이와 같은 소견은 저칼륨 상태에서 활성산소종의 생성이 유도되고 활성산소종의 과도 생성은 세포 비대와 세포 분열에 관여하는 다양한 유전자들의 발현을 매개하는 중요한 신호전달 기전이라는 보고 [5, 27-29]를 감안하면 세포의 비대와 증대가 일어나는 저칼륨혈증 신장에서 Nrf2와 p-Nrf2 발현이 높게 나타난다는 사실을 설명할 수 있을 것으로 생각된다.

Nrf2는 항산화반응과 해독화에 관련된 항독소 효소의 발현 조절에 관여하는 전사인자로서 ARE에 의해서 전사단계가 조절되고 ARE에 의해서 조절되는 주요 효소는 HO-1, NQO1, glutathione S-transferase (GST),  $\gamma$ -glu-

tamyl cysteine synthetase ( $\gamma$ -GCS), thioredoxin reductase-1, thioredoxin 등이 있다 [6, 30]. 또한 Nrf2와 ARE 신호 전달계의 상위 단계 조절 요인으로 MARK, protein kinase C, phosphatidylinositol 3-kinase 등이 작용하며, 활성산소종을 생성하는 여러 약제나 항생제들에 유도된 산화적 스트레스는 MARK 신호전달계의 활성화를 초래하고, 항독소 효소들을 포함한 Nrf2-Maf-defendant ARE 유전자들의 활성화가 발생하여 생체방어 기능을 갖거나 세포 성장이나 세포 괴사를 조절하는 것으로 보고되고 있다 [7]. 세포가 어떻게 외부 신호를 받아들여 Nrf2를 활성화하여 항산화제나 항독소 효소의 합성을 유도하는지는 명확히 밝혀져 있지 않지만 세포 내 신호전달에 있어 중요한 역할을 하는 MAPK (ERK, p38 MAPK, c-jun, JNK)의 의해 Nrf2는 세포질에서 Keap1이라는 억제 단백질과 결합하여 비활성화 되어 있다가 산화 스트레스 조건 하에 분비되어 핵 내로 이동하여 ARE의 단백질과 결합하여 표적 유전자의 발현을 조절할 것으로 생각된다. YU 등 [7]은 MAPK가 Nrf2를 핵 내로 이동시켜 여러 DNA 단백질과 결합하도록 인산화 및 안정화에 중요한 역할을 할 것이라고 보고하였고, 활성산소종 생성 항암제인 cisplatin 처리에 의해 Nrf2 발현이 증가됨을 보고하였다 [31]. 또한 허혈성 급성신손상 치료제인 bardoxolonemethyl 처리 시 Nrf2 단백질 발현이 신장의 토리쪽세관에서 증가함을 보여주었다 [32]. 저칼륨혈증 신장에서 Nrf2 mRNA와 단백질 발현이 증가한다는 보고 [8]와 Nrf2가 NBC-1, colonic H/K-ATPase 및 Na/K-ATPase  $\alpha$ 3 이온수송체의 조절에 관여한다는 촉진인자 연구 [9]로 Nrf2가 이온수송체들의 유전자 발현 조절에 큰 역할을 할 것으로 추측하였고, 저칼륨혈증 신장에서 HK $\alpha$ 1, HK $\alpha$ 2 mRNA 발현과 Na/K-ATPase isoform mRNA 발현 [18-22]이 바깥속질집합관에서 증가하였다는 소견은 저칼륨혈증 신장에서 p-Nrf2 단백질 발현과 일치함으로써 p-Nrf2가 칼륨제한 상태에서 집합관의 K<sup>+</sup> 재흡수에 관여할 것으로 추측하였다.

이상의 소견은 저칼륨혈증에서 신장 Nrf2와 p-Nrf2의 단백질 발현 양상은 상호 간에 차이가 있었으며 칼륨제한 식이가 길어질수록 증가함을 보여주었고, 이온수송체 단백질 발현 부위와 유사하여 이들 유전자의 조절뿐만 아니라 세포 내 신호전달에 있어 중요한 역할과 K<sup>+</sup>의 재흡수에 관여할 것임을 시사해 주었다. 그러나 본 연구는 신장의 Nrf2와 p-Nrf2 단백질 발현과 분포의 변화를 알아보는 데 국한되었고, 세포 내 신호전달에 있어 중요한 역할 특히 Nrf2의 인산화 활성 조절에 기여할 것으로 생각되어지는 MAPK (ERK, p38 MAPK, c-jun, JNK) 단백질 발현에 대한 연구는 시행하지 못했다. 또한 저칼륨혈증에서 Nrf2와 p-Nrf2 유전자 발현 변화가 세포 내 신호

전달과  $K^+$ 의 재흡수에 직접 관여했는지는 추후 여러 가지 분자 생물학적인 방법을 이용하여 연구해야 할 과제라고 생각한다.

## 참 고 문 헌

- Moi P, Chan K, Asunis I, Cao A, Kan YW. Isolation of NF-E2-related factor 2 (Nrf2), a NF-E2-like basic leucine zipper transcriptional activator that binds to the tandem NF-E2/AP1 repeat of the beta-globin locus control region. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994; 91:9926-30.
- Itoh K, Igarashi K, Hayashi N, Nishizawa M, Yamamoto M. Cloning and characterization of a novel erythroid cell-derived CNC family transcription factor heterodimerizing with the small Maf family proteins. *Mol Cell Biol*. 1995; 15:4184-93.
- Liu M, Grigoryev DN, Crow MT, Haas M, Yamamoto M, Reddy SP, et al. Transcription factor Nrf2 is protective during ischemic and nephrotoxic acute kidney injury in mice. *Kidney Int*. 2009; 76:277-85.
- Motohashi H, Yamamoto M. Nrf2-Keap1 defines a physiologically important stress response mechanism. *Trends Mole Med*. 2004; 11:549-55.
- Shen G, Jeong W, Hu R, Kong AT. Regulation of Nrf2, NF- $\kappa$ B, and AP-1 signaling pathways by chemopreventive agents. *Antioxid Redox Signal*. 2005; 7:1648-63.
- Kobayashi M, Yamamoto M. Molecular mechanisms activating the Nrf2-Keap1 pathway of antioxidant gene regulation. *Antioxid Redox Signal*. 2005; 7:385-94.
- 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 Nrf2-dependent mechanism. *J Biol Chem*. 2000; 275:39907-13.
- Lim JS, Ahn KY. Expression of Nrf2 transcription factor in rat kidney. *Korean J Nephrol*. 2011; 30(3):239-45.
- Lee CB, Lee YS, Lee JY, Lee SE, Ahn KY. Nrf2 and Sp family genes enhance the expression of ion-transporters in K-depleted condition. *J Nephrol*. 2012; 25:225-32.
- 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.
- Hernandez RE, Schambelan M, Cogan MG, Colman J, Morris RC Jr, Sebastian A. Dietary NaCl determines severity of potassium depletion-induced metabolic alkalosis. *Kidney Int*. 1987; 31:1356-67.
- 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*. 2011; 301(4):F823-32.
- Knepper MA, Packer R, Good DW. Ammonium transporter in the kidney. *Physiol Rev*. 1989; 69:179-249.
- Soleimani M, Bergman JA, Hosford MA, McKinney TD. Potassium depletion increases luminal  $Na^+/H^+$  exchange and basolateral  $Na^+:CO_3^{2-}:HCO_3^-$  cotransport in rat renal cortex. *J Clin Invest*. 1990; 86:1076-83.
- Amlal H, Habo K, Soleimani M. Potassium deprivation upregulate expression of renal basolateral  $Na^+-HCO_3^-$  cotransporter (NBC-1). *Am J Physiol*. 2000; 279:F532-43.
- Kim JH, Cho HJ, Bae MO, Park JJ, Ahn KY. Regulation of biocarbonate ions hypokalemic rat kidney. *Korean J Anat*. 2004; 37(4):337-45.
- 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.
- Ahn KY, Turner PB, Madsen KM, Kone BC. Effect of Chronic hypokalemia on renal expression of the gene encoding the "gastric"  $H^+-K^+-ATPase \alpha$  subunit. *Am J Physiol*. 1996a; 270:F557-66.
- 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.
- Ahn KY, Kim BY, Lee SW, Kim KK, Park SS. Renal adaptive responses of HK  $\alpha 2$  gene (HK  $\alpha 2a$ , HK  $\alpha 2b$ ) to the change of potassium (K) diet. *Korean J Nephrol*. 1999; 18: 672-82.
- Ahn KY, Madsen KM, Tisher CC, Kone BC. Differential expression and cellular distribution of mRNAs encoding alpha-and beta-isoforms of  $Na^+-K^+-ATPase$  in rat kidney. *Am J Physiol*. 1993; 265:F792-801.
- Ahn KY, Kim SC, Moon B, Kim KK, Kim BY. Renal adaptive responses of Na/K-ATPase subunit isoform to chronic hypokalemia. *Korean J Anat*. 1998; 31(3):405-18.
- Bolati D, Shimizu H, Yisireyili M, Nishijima F, Niwa T. Indoxyl sulfate, a uremic toxin, a downregulates renal expression of Nrf2 through activation of NF- $\kappa$ B. *BNC Nephrology*. 2013; 14:56-64.
- Yang Y, Li W, Li Y, Wang Q, Gao L, Zhao J. Dietary Lycium barbarum Polysaccharide Induces Nrf2/ARE Pathway and Ameliorates Insulin Resistance Induced by High-Fat via Activation of PI3K/AKT Signaling. *Oxid Med Cell Longev*. 2014; 145641-50.
- Kim SB, Pandita RK, Eskiocak U, Ly P, Kaisani A, Kumar R, et al. Targeting of Nrf2 induces DNA damage signaling and protects colonic epithelial cells from ionizing radiation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2012; 109(43):E2945-55.

26. Oh CJ, Kim JY, Choi YK, Kim HJ, Jeong JY, Bae KH, et al. Dimethylfumarate attenuates renal fibrosis via NF-E2-related factor 2-mediated inhibition of transforming growth factor- $\beta$ /Smad signaling. *PLoS One*. 2012; 7(10):e45870-81.
27. Bowen JW, McDonough A. Pretranslational regulation of Na, K-ATPase in cultured canine kidney cells by low K<sup>+</sup>. *Am J Physiol*. 1987; 252:C179-89.
28. Deplanke B, Gaskins HR. Redox control of the transsulfuration and glutathione biosynthesis pathways. *Curr Opin Clin Nutri Metab Care*. 2002; 5:85-92.
29. Zhou X, Yin W, Doi SQ, Robinson SW, Takeyasu K, Fan X. Stimulation of Na, K ATPase by low potassium requires reactive oxygen species. *Am J Physiol*. 2003; 285:C319-26.
30. Jaiswal AK. Nrf2 signaling in coordinated activation of antioxidant gene expression. *Free Radic Biol Med*. 2004; 36:1199-207.
31. Kim HR, Kim S, Kim EJ, Park JH, Yang SH, Jeong ET, et al. Suppression of Nrf2-driven heme oxygenase-1 enhances the chemosensitivity of lung cancer A549 cells cisplatin. *Lung Cancer*. 2008; 60: 47-56.
32. Wu QQ, Wang Y, Sentiko M, Meyer C, Wigley WC, Ferguson DA, et al. Bardoxolone methyl (BARD) ameliorates ischemic AKI and increases expression of protective genes Nrf2, PPAR $\gamma$ , and HO-1. *Am J Physiol*. 2011; 300:F1180-92.

## Alteration of Nrf2 and p-Nrf2 Protein Expression in Hypokalemic Rat Kidney

Hye Jung Cho, Kyu Youn Ahn

*Department of Anatomy & Research Institute of Medical Science, Chonnam National University Medical School*

---

**Abstract** : Potassium (K) balance is regulated not only by ion channels and ion transporters, but also by various genes including NF-E2-related factor 2 (Nrf2). Although mRNA distribution and role of Nrf2 has been studied in hypokalemic kidney, the distribution of Nrf2 and phosphorylated-Nrf2 (p-Nrf2) proteins are not known. The present study was planned to examine the alteration of expression and distribution of Nrf2 and p-Nrf2 protein in the kidney of normal and K-depleted rats using immunohistochemistry.

In normal rat kidneys, Nrf2 was highly expressed in the proximal convoluted tubule and proximal straight tubule, moderately in cortical thick ascending limb, and weakly in cortical collecting duct, outer medullary thick ascending limb, and outer medullary collecting duct. In K-depleted groups, the pattern of cellular labeling of Nrf2 protein was identical to that of normal group, but the signal intensity was prominently increased in proximal convoluted tubule and proximal straight tubule especially in rats at K-free diet 3 weeks. In normal rat kidneys, p-Nrf2 was highly expressed in nucleus of cortical thick ascending limb, cortical collecting duct, and glomerular endothelial cell, moderately in distal convoluted tubule and outer medullary collecting duct, and weakly in proximal convoluted tubules and outer medullary thick ascending limb. In K-depleted groups, the pattern of cellular labeling of p-Nrf2 protein was similar to that of normal group, but signal intensity was significantly increased in the nucleus of outer medullary collecting duct from of K-free diet 2 and 3 weeks groups.

These results suggest that Nrf2 and p-Nrf2 expression was gradually increased in K-depleted groups of kidney, but Nrf2 and p-Nrf2 expression patterns were not exactly matched. In addition, it is suggested that enhanced expression of Nrf2 and p-Nrf2 in hypokalemic condition may affect the regulation of ion channels and ion transporters and subsequent intracellular signal transduction.

---

**Keywords** : Hypokalemia, NF-E2-related factor 2 (Nrf2), p-Nrf2, Immunohistochemistry