

## Nrf2 전사유전자의 이온수송체 유전자 조절기전

조혜정<sup>1</sup>, 안규윤<sup>1</sup>

<sup>1</sup>전남대학교 의과대학 해부학교실

## Regulatory Pathway of Ion-Transporter Genes through Nrf2 Transcription Factor in Hypokalemic Condition

Hye Jung Cho<sup>1</sup>, Kyu Youn Ahn<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Anatomy, Chonnam National University Medical School

**Abstract** : The Nuclear factor-erythroid-2-related factor 2 (Nrf2) plays a key role in the cellular defense against oxidative stress. Low K<sup>+</sup> increased the reactive oxygen species and it stimulate Nrf2 activation. Previous our study demonstrated that low potassium promoted expression of H/K-ATPase and kNBC1 by Nrf2 transcription factor in cultured models. In addition, phosphorylation of ERK, JNK, p38 and PI3K was involved in the activation of Nrf2 expression. This study aims to elucidate the mechanism which low potassium regulates Nrf2 expression through various in vitro and in vivo models. Using various kinase inhibitors, promotion of Nrf2 expression in low potassium condition was inhibited by LY294002 and SP600125 while PD98059 and SB203580 did not affect Nrf2, suggesting that phosphorylation of Akt and JNK is specifically involved in Nrf2 expression in low potassium condition. Kidney tissues from low potassium diet rats showed increased phospho-ERK1/2 and phospho-Akt in diet time dependent manner but no effect to JNK and p38 phosphorylation. Specifically, Phospho-Nrf2 was also increased in nuclear compartment by low potassium diet. In order to demonstrate direct evidence that low potassium regulates ionic transporters by Nrf2, Nrf2 knockout mice were employed. Mouse embryonic fibroblasts (MEF) were harvested for the study. As expected, low potassium promotes expression of Nrf2 and level of phospho-ERK1/2 and phospho-Akt in MEF-Nrf2 (+/+). Low potassium promoted expression of kNBC1 and H/K-ATPase in MEF-Nrf2 (+/+), but unchanged or even decreased in MEF-Nrf2 (+/-) and MEF-Nrf2 (-/-). Taken together, these results show that Nrf2 was activated by ERK1/2 and AKT in low potassium condition and further regulates expression of kNBC1 and colonic H/K-ATPase.

**Keywords** : Hypokalemic condition, Akt, p-Akt, ERK1/2, p-ERK1/2, MEF-Nrf2 wild-type (+/+) cell line, MEF-Nrf2 Hetero (+/-) cell line, MEF-Nrf2 knock-out (-/-) cell line

저자(들)는 '의학논문 출판윤리 가이드라인'을 준수합니다.

저자(들)는 이 연구와 관련하여 이해관계가 없음을 밝힙니다.

**Received:** October 11, 2019; **Revised:** November 15, 2019;

**Accepted:** December 2, 2019

**Correspondence to:** 안규윤 (전남대학교 의과대학 해부학교실)

**E-mail:** kyahn@jnu.ac.kr

## 서론

정상상태에서 K<sup>+</sup> 배설의 90%는 신장 집합관을 지나면서 K<sup>+</sup>가 분비되어 이루어지고, 이 과정은 알도스테론과 Na<sup>+</sup>의 이동에 의해 조절되면서 체내 K<sup>+</sup> 균형이 유지된다고 한다 [1,2]. 저칼륨혈증 신장에서 H/K-ATPase, Na/K-ATPase 및

NBC-1 등 이온수송체 발현의 증가[3-6]와 Nrf2 mRNA와 단백질발현이 증가함을 보고[7]하였고 Nrf2가 NBC-1, colonic H/K-ATPase 및 Na/K-ATPase  $\alpha$ 3 이온수송체의 조절에 관여한다는 promotor 연구[8]로  $K^+$  평형 조절에 이온수송체나 Nrf2 전사유전자를 포함한 많은 유전자가 관여할 것으로 생각하였다. 칼륨결핍은 대사성 알칼리증을 야기시키는데 이의 유지는 NBC-1의 활성에 의해  $HCO_3^-$  재흡수가 증가하기 때문이라 하였고[2] 여기에  $K^+$  농도를 유지하는 데 H/K-ATPase가 관여하는데 위나 대장에서 클로링되어 각각 gastric H/K-ATPase나 colonic H/K-ATPase로 명명되었다.

Nrf2는 Cap-N-Collar (CNC) 계열의 basic region-leucine zipper (b-Zip) 전사조절인자로서, erythroid-derived CNC homology protein (ECH)라고 불리기도 하고, 또한 다양한 자극에 대해 반응하는 redox 감수성 인자로서 항산화와 생체 방어에 관여하는 유전자 발현을 조절하기도 한다[7,9-11]. 세포가 외부로부터 자극을 인지하여 Nrf2를 촉진하여 항산화나 phase II 해독화 효소의 합성을 유도하는지는 알려져 있지 않지만 세포 내에서 신호전달에 의미 있는 역할을 하는 mitogen-activated protein kinases (ERK, p38 MAPK, JNK)를 비롯한 Akt 및 PKC 등과 같은 키나아제에 의해 Nrf2의 Serine과 Threonine 기의 인산화를 통해서 Nrf2가 Keap1과 분리된 후 핵으로의 이동과 Antioxidant Response Element 결합을 용이하게 한다는 가능성도 제시되고 있다[7,12-15]. 또한 Lim과 Ahn [7]은 Nrf2의 인산화와는 별개로 세포 내 산화-환원 시스템을 방해하여 산화-환원 시스템에 관여하는 전사인자들 특히 Nrf2-Keap1 복합체의 Cysteine-SH가 산화됨으로써 Nrf2-Keap1 구조가 바뀌고 이로 인해 Nrf2가 떨어져 나와 항산화를 유도할 것으로 보고하였다. 저칼륨 상태에서 활성산소종의 양이 증가되고[16,17], 증가된 활성산소종은 Nrf2의 핵 내 이동을 촉진한다고 보고[14,18]한 바 있어 저칼륨혈증 신장에서 Nrf2를 활성화시키는 인산화효소에 대해 알아보는 것도 흥미로운 것으로 생각된다.

본 연구는 Nrf2 전사유전자가 어떤 인산화효소에 의해 활성화되는지 ex vivo 세포배양실험 및 in vivo 동물실험을 통해 구명하고자 하였다. 저칼륨 배양조건에서 CV-1, 293T 및 MEF 세포주를 배양한 후 mRNA와 단백을 추출하여 RT-PCR 및 Western 분석을 시행하였고, 칼륨제한 식이 신장에서는 단백을 추출하여 Western 분석으로 Nrf2나 이온수송체들을 정량화하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험동물

본 실험에 사용된 동물은 앞선 연구자들[2,5,6,15]의 방

법에 따라 체중 230 g 내외의 성숙 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐 30마리로 다섯 군으로 구분하였다. 제1군은 정상식이 (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].

### 2. 저칼륨 상태에서 세포배양과 transfection

HEK 293T와 CV-1 세포주는 ATCC 제조회사(ATCC, Manassas, VA, USA)에서 구입하였다. 각각의 세포주는 Lee 등[8] 방법을 따라 실험을 행하였다. 즉, 이들 세포주는 100 U/mL penicillin, 100  $\mu$ g/mL streptomycin과 10% fetal bovine 혈청이 포함된 고포도당 Dulbecco's modified Eagle's 배양액(DMEM, Gibco, Gaithersburg, MD, USA)을 사용하여 5%  $CO_2$ 와 37°C 온도를 유지하여 세포배양기에서 배양하였다. 세포는 3분간 trypsin에 처치 후 추출하였다. 다양한 인산화억제제 {LY294002 (PI3K inhibitor), 10  $\mu$ M; PD98059 (MAPK inhibitor), 20  $\mu$ M; SB203580 (p38 MAPK inhibitor), 20  $\mu$ M; SP600125 (JNK inhibitor), 20  $\mu$ M}를 처치한 후 12시간 동안 배양하였다. MEF (mouse embryonic fibroblast)-Nrf2 wild-type (+/+), MEF-Nrf2 Hetero (+/-) 및 MEF-Nrf2 knock-out (-/-) 세포주는 서영준 교수(서울대학교 약학대학)가 제공해 주었다. 최적의 저칼륨배양 조건을 찾기 위해 K의 농도를 5.4, 2.7, 2, 1.3, 1 mM에서 배양하였으며 K 농도가 2.7 mM일 때 가장 높은 효과를 나타냈었다[8].

### 3. 총 RNA 분리와 RT-PCR 분석

RNA는 배양된 MEF 세포주로부터 Trizol 용액(Invitrogen, USA)을 이용하여 추출하였고 RT-PCR 분석을 위해서는 Invitrogen One step III<sup>TM</sup> Reverse Transcription PCR kit (Invitrogen, USA)를 이용하였다. PCR 조건은 95°C에서 5분; 95°C에서 30초, 58°C에서 30초, 72°C에서 30초로 40회; 72°C에서 10분이었다. 사용된 PCR primer 순서(5' to 3')는 mNrf2 (F): GCG ACG GAA AGA GTA TGA GC, (R) GTT GGC AGA TCC ACT GGT TT; kNBC1 (F): CAC TGA AAA TGT GGA AGG GAA G, (R): GAC CGA AGG TTG GAT TTC TTG; Colonic H/K (F): GTC GAG CTG GCA GAC CAG AAA GAT, (R): TGC ACC TAT CCA CAG AAG GAT GGA,  $\beta$ -actin (F): AGA GCA TAG CCC TCG

TAG AT, (R): CCC AGA GCA AGA GAG GTA TC였다. PCR 산물은 1% agarose 겔에 전기영동시키고 cyber green 염색을 이용하여 관찰하였다. 각각은  $\beta$ -actin으로 비교 정량화하였다.

#### 4. 단백질 분리와 Western 분석

칼륨제한 식이 기간별로 신장 조직을 적출하여 급속 동결시킨 후, 조직의 일부를 Nonidet P-40 buffer (150 mM NaCl, 1 mM benzamidine, 50 mM Tris pH 8.0, Trypsin inhibitor 1  $\mu$ g/mL, 5 mM EDTA pH 8.0, 1 mM PMSF, NP-40 1%)에 넣고 분쇄하여 균질액을 만들었다. 균질액은 상층액을 분리한 다음 13,000 rpm으로 20분간 원심분리하고 상층액은 세포질 추출 단백질로, 중간층 침전물은 핵 추출 단백질로 사용하기 위해 완충액으로 녹인 다음  $-70^{\circ}\text{C}$ 에 보관하였다. 세포배양에서 얻은 세포 pellet은 RIPA 완충액(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)으로 분해하고 단백질을 추출하였다. 추출한 총 단백질 30~100  $\mu$ g을 8% polyacrylamide gel에 전기 영동한 다음 nitrocellulose membrane에  $4^{\circ}\text{C}$ 에서 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 Nrf2 (Santa Cruz, USA), ERK1/2, Akt, JNK, p38, phospho-ERK1/2 (p-ERK1/2), phospho-Akt (p-Akt), phospho-p38 (p-p38) polyclonal antibody (Cell Signaling Technology, USA), phospho-JNK (p-JNK, BD Transduction Laboratories, USA) phospho-Nrf2 monoclonal antibody (Epitomics, USA),  $\beta$ -actin (1 : 1000; Millipore, USA)에  $4^{\circ}\text{C}$ 에서 14시간 반응시켰다. 다시 TBS-T로 10분씩 3번 수세하고 peroxidase conjugated goat anti-rabbit IgG (Santa Cruz, USA 1 : 2,000)로 부치하였다. TBS-T로 3번 수세하고 발색제인 ECL 용액(Amersham, USA)에 5분간 반응시킨 후 시간별로 현상하였고 densitometry로 정량화하였다.

## 결 과

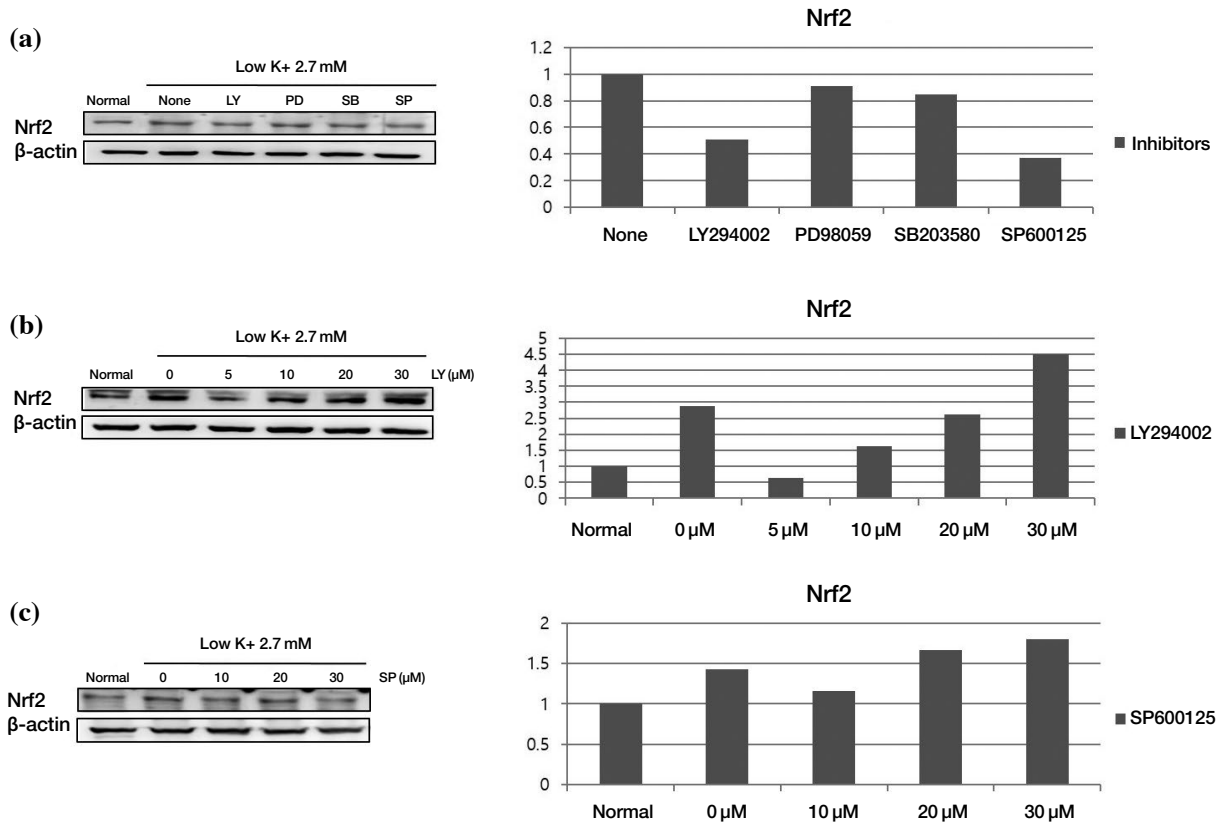
저칼륨 배양조건에서 다양한 인산화효소 억제제(LY294002, SP600125, PD98059, SB203580)를 293T 세포주에 처리하고 단백질을 추출하여 Western 분석으로 정량화하였다. 저칼륨 배양조건에서 증가된 Nrf2의 발현량이 LY294002와 SP600125로 처리했을 때 50% 이상 감소하는 것을 관찰할 수 있었으나 PD98059와 SB203580로 처리했을 때는 거의 변화가 없었다(Fig. 1). 이는 Nrf2 전사유전자 활성화에 Akt와 JNK 인산화효소가 관여할 가능성을 시사하는 소견이

었다.

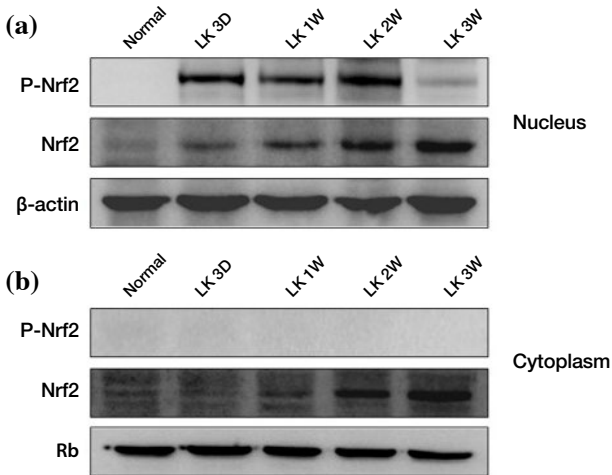
칼륨제한 식이 신장조직에서 Nrf2 단백질은 세포질이나 핵에서 칼륨제한 식이가 길어질수록 증가하였다. p-Nrf2 발현은 세포질에서는 관찰되지 않았으나 핵에서는 칼륨제한 식이 3일째에 발현되기 시작하여 2주째에 최고조의 발현을 보였고 3주째에서도 관찰되었다. 이는 칼륨제한 식이가 길어질수록 핵으로 많이 축적됨을 알 수 있었다(Fig. 2a, 2b). ERK1/2의 발현은 칼륨제한 식이 기간에 따른 변화는 차이가 거의 없었으나 p-ERK1/2의 발현은 칼륨제한 식이가 길어질수록 증가하는 경향이었고 특히 1, 3주에 최고의 발현을 보였다. Akt와 p-Akt의 발현은 칼륨제한 식이 1주에서 발현이 증가하기 시작하여 칼륨제한 식이가 길어질수록 증가하였다. JNK와 p38의 발현은 칼륨제한 식이에 따른 변화는 차이가 거의 없었으나 p-JNK와 p-p38의 발현은 거의 발현이 되지 않았고 칼륨식이 변화에 따른 차이도 없었다(Fig. 3a). CV-1 과 MEF 세포주에 저칼륨 상태로 배양한 후 단백질을 추출하여 Western 분석한 결과 CV-1 세포주에서 p-Akt의 발현은 10분에 시작하여 3시간까지 지속되며, p-ERK1/2의 발현은 5분에서 증가하기 시작하여 30분까지 지속되었다(Fig. 3b). MEF 세포주에서 p-Akt의 발현은 10분에 증가하기 시작하여 3시간까지 지속되며, p-ERK1/2의 발현은 3분에서 증가하기 시작하여 30분까지 지속되었다(Fig. 3c). 이는 세포주에 따라 약간의 차이는 있지만 저칼륨 상태에서 p-ERK1/2의 발현이 먼저 시작하고 p-Akt의 발현이 후에 시작하는 것으로 보아 Nrf2 발현조절이 ERK1/2가 먼저 시작하고 그 후에 Akt가 관여할 것으로 생각되었다.

293T, CV-1 세포주뿐만 아니라 MEF 세포주에서도 저칼륨 배양 시 Nrf2를 활성화시키는 지 확인하기 위해 다양한 저칼륨 배양조건으로 RT-PCR 실험을 수행하였다. Fig. 4a, 4b에서 보여주듯이 2.7 mM의 저칼륨 배양조건에서 Nrf2의 활성이 최고조로 발현되는 것을 확인하였다. 또한 2.7 mM의 저칼륨 배양조건에 다양한 시간대별로 Nrf2 및 이온수송체들의 mRNA 발현을 확인한 결과 정상 대비 저칼륨 배양조건에서 Nrf2, kNBC1 및 colonic H/K mRNA 발현이 증가함을 관찰하였다(Fig. 4c, 4d, 4e 및 4f).

저칼륨 상태 MEF 세포주에서 Nrf2가 ion transporter의 발현 증가와 관련이 있는지 조사하기 위해 MEF-Nrf2 wild-type (+/+), MEF-Nrf2 Hetero (+/-), MEF-Nrf2 knock-out (-/-) 세포주에서 얻은 mRNA로 RT-PCR 실험을 수행하여 Nrf2와 kNBC1, colonic H/K의 mRNA 발현을 확인하였다. 저칼륨 배양조건에서 MEF-Nrf2 wild-type (+/+)의 Nrf2 발현이 증가하였지만 MEF-Nrf2 Hetero (+/-) 세포주에서는 감소하였고, MEF-Nrf2 knock-



**Fig. 1.** Akt and JNK specific inhibitors block low-potassium stimulated Nrf2 activation. (a) 293T cells were treated with indicated pharmacological inhibitors in the normal or low potassium media for 12 h (LY294002, 10 μM; PD98059, 20 μM; SB203580, 20 μM; SP600125, 20 μM). Cells were lysed, and Western blotting was performed using anti-Nrf2 antibodies. (b), (c) Cells were treated with indicated concentration of LY294002 or SP600125 for 12 h. Cells were lysed, and Western blotting was performed using anti-Nrf2 antibodies.

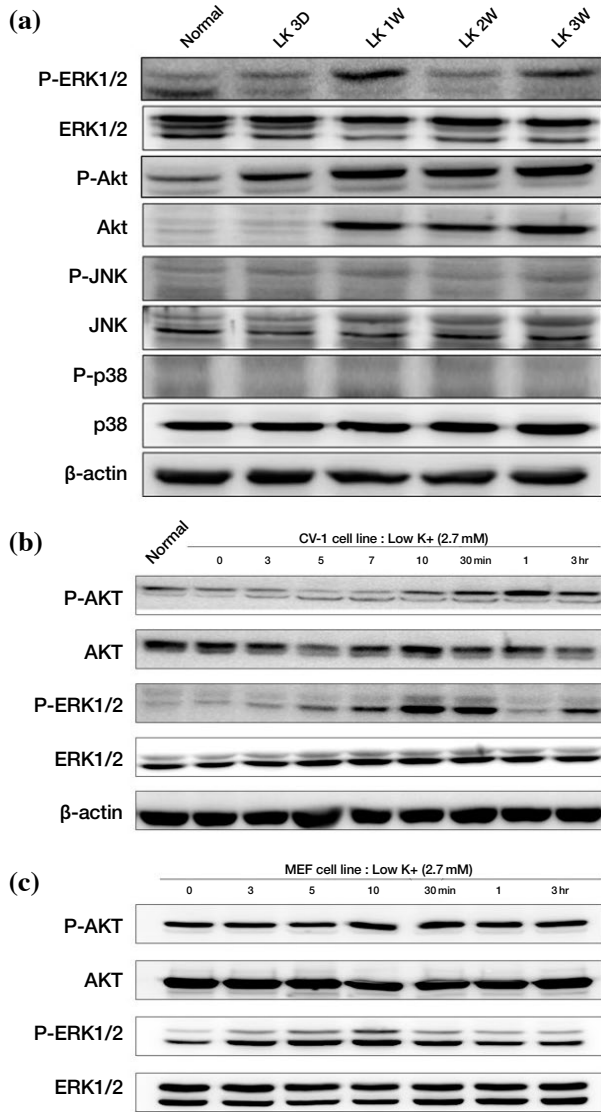


**Fig. 2.** P-Nrf2 accumulates in the nucleus following low  $K^+$  stimulation. (a) Western blot analysis reveal that the accumulation of p-Nrf2 and Nrf2 protein from nuclear extract increased in the rat kidney according to potassium depleted diet. (b) In cytoplasm extract, the abundance of Nrf2 protein increased but p-Nrf2 protein was undetected.

out (-/-) 세포주에서는 발현이 되지 않음을 확인하였다. kNBC1와 colonic H/K의 mRNA 발현 역시 저칼륨 상태 MEF-Nrf2 wild-type (+/+) 세포주에서는 증가하였으나 MEF-Nrf2 Hetero (+/-) 세포주와 MEF-Nrf2 knock-out (-/-) 세포주에서는 억제되었음을 관찰하였다 (Fig. 5a, 5b)

## 고 찰

본 연구는 저칼륨 상태에서 어떤 인산화효소가 Nrf2 활성화에 관여하는지, 그리고 활성화된 Nrf2가 이온수송체의 발현에 영향을 미치는지를 알아보려고 정상 및 칼륨제한 식이 흰쥐 신장과 CV-1, 293T 및 MEF 세포주를 정상 및 저칼륨 상태에서 배양하여 각각 RT-PCR 과 Western 분석으로 정량화하여 Nrf2 전사유전자의 기전을 규명한 것이다. 본 연구에서 LY294002, SP600125, PD98059, SB203580 인산화효소 억제제를 저칼륨 배양

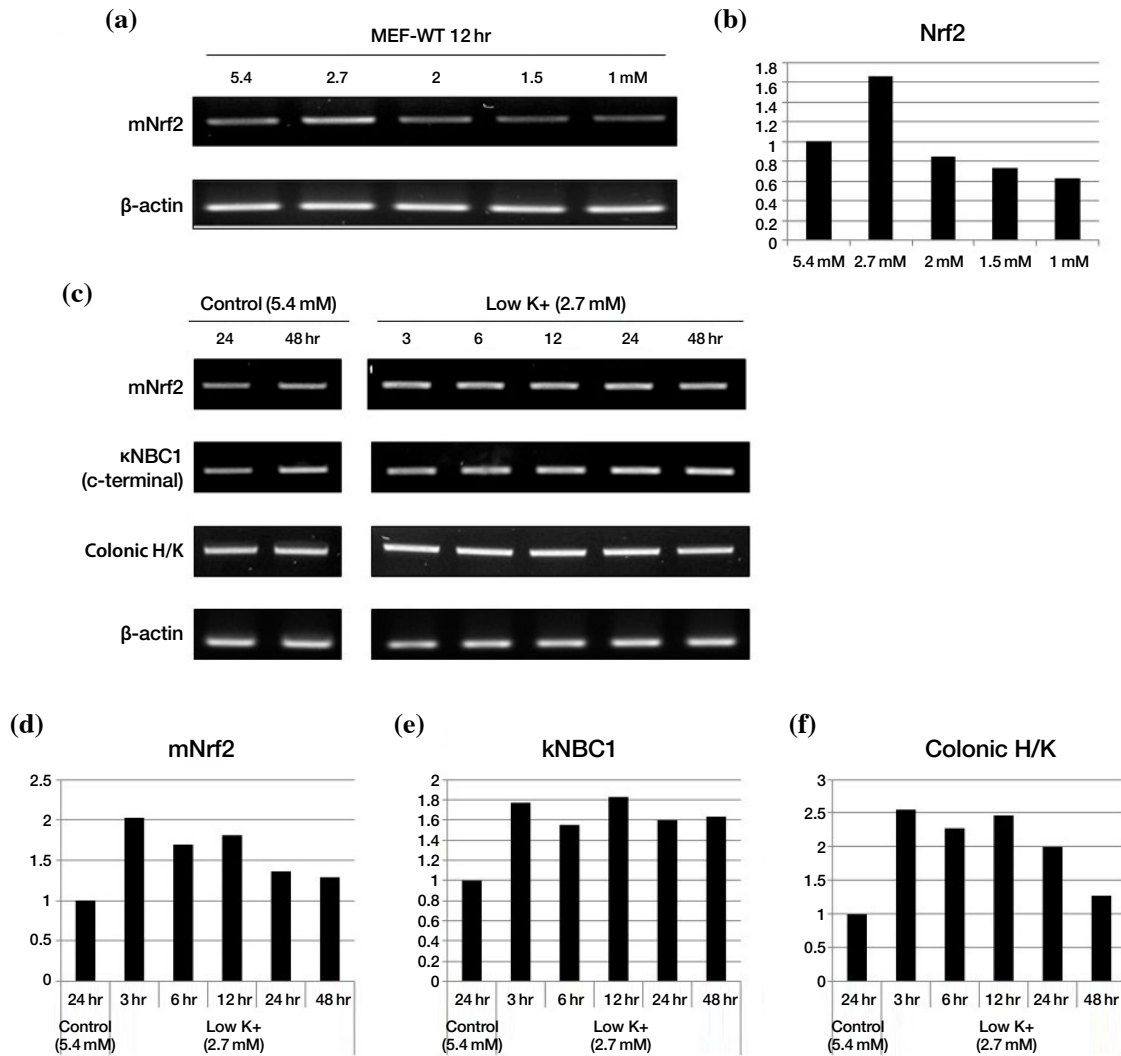


**Fig. 3.** Effect of low  $K^+$  on phosphorylation of ERK1/2 and Akt in rat kidney, CV-1 cell and MEF cell. (a) Expression levels of both phosphorylated and total ERK1/2, Akt, JNK and p38 were measured by western blot analysis in the kidney of potassium depleted rats. A transient increase in the phosphorylation of ERK1/2 and Akt was observed in potassium depleted rat kidney, whereas the phosphorylation of JNK and p38 did not change. (b) CV-1 cells exposed to normal or low potassium media for indicated time periods and harvested in protein lysis buffer. Western blotting was performed using specific antibodies. In low potassium condition, stimulated phosphorylation of ERK1/2 as early as 5 min, and this increase persisted through 30 min. The activation of Akt was observed at 30 min, and this activation persisted through 24 h. (c) MEF cells stimulated phosphorylation of ERK1/2 as early as 3 min, and this increase persisted through 30 min. The activation of Akt was observed at 10 min, and this activation persisted through 3 h.

조건에서 293T 세포주에 처리하고 Western 분석하였더니 저칼륨 배양조건에서 증가된 Nrf2의 발현량이 LY294002

와 SP600125로 처리했을 때 50% 이상 감소함을 관찰할 수 있었으나 PD98059와 SB203580로 처리했을 때는 변화가 없었고, 칼륨제한 식이 신장조직에서는 ERK1/2와 Akt의 활성화된 형태인 phospho-ERK1/2, phospho-Akt의 발현이 칼륨제한 식이가 길어질수록 증가하였고 JNK와 p38의 활성화는 변화가 없었다. 이와 같은 소견은 PI3K/Akt 및 MARK/ERK 신호전달경로는 다양한 성장인자 및 조절인자에 의해 활성화되며, 이로 인해 세포성장, 역전사, 번역, 세포증식, 이동 및 세포주기를 조절하는 중요한 역할을 하며 이러한 kinase는 신장조직에서도 다양한 세포작용과 연관성이 있다는 보고[2,19-21]와, Nrf2의 인산화 활성화조절요인으로 MAPK, protein kinase C, PI3K 등이 작용하고 활성화산소종을 생성하는 약물들에 의해 유도된 산화적 스트레스는 MAPK 신호전달계의 활성화를 초래한다는 보고[2]를 감안하면 Nrf2 전사유전자 활성화에 Akt와 JNK 인산화효소가 관여함을 시사하는 소견이며 저칼륨혈증 시 신장 Akt와 p-Akt 및 ERK와 p-ERK의 단백질 발현 변화[2]가 이온수송체 유전자 조절뿐만 아니라 세포 내 신호전달에 있어 중요한 역할을 할 것으로 생각되었다.

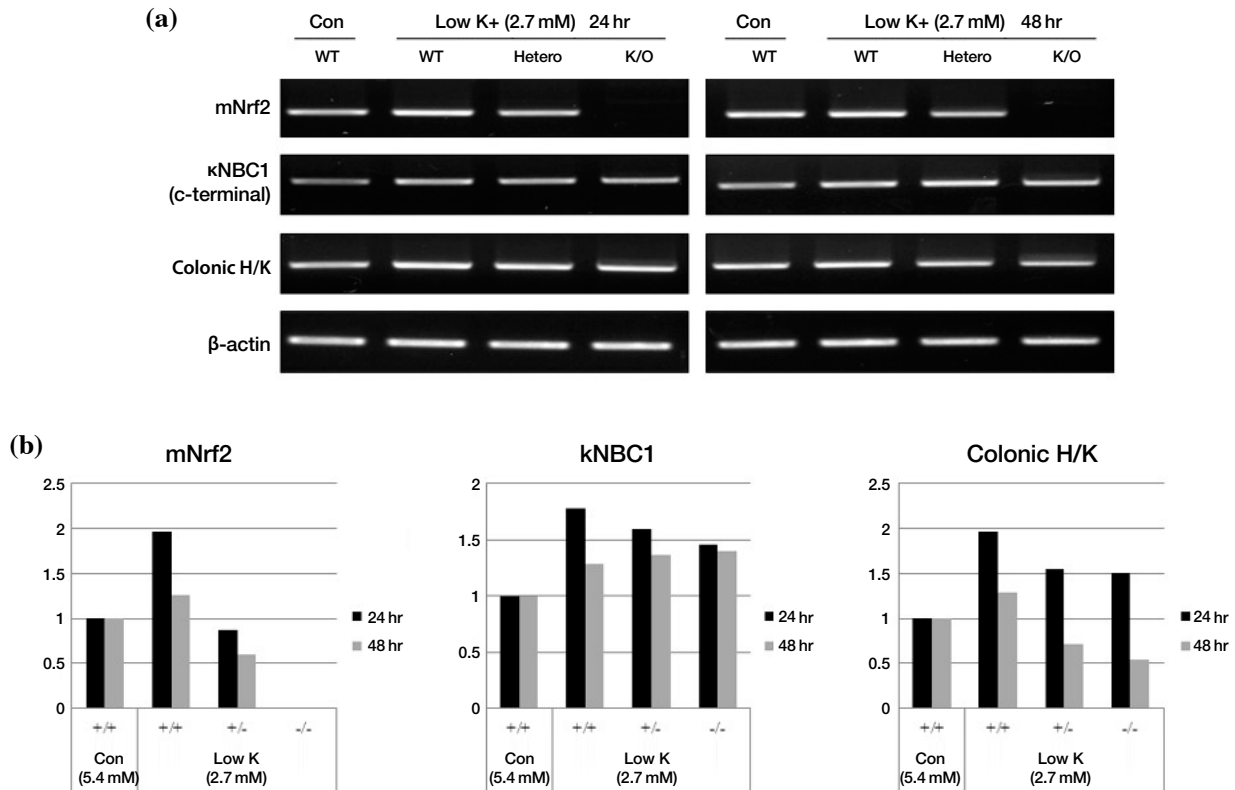
일반적으로 Nrf2는 세포 내에서 불안정한 상태로 존재하지만, 세포에 산화적, 전자친화적인 스트레스가 가해지면 안정화되는 단백질로서 NAD(P)H-quinone oxidoreductase (*NQO1*), glutathione S-transferase (*GSTs*), glutamate cysteine ligase (*GCL*), heme oxygenase 1 (*HO-1*)과 같은 세포방어 유전자들의 발현량을 조절한다고 한다[22]. 본 연구에서는 저칼륨 상태 동안 Nrf2에 의한 이온수송체들의 조절기전을 조사하였고, 저칼륨 상태 동안 Nrf2의 발현량 증가는 이온수송체들의 활성화에 Nrf2가 중요한 역할을 할 것이라는 가능성을 새롭게 제시하였다. 저칼륨 상태 동안 이온수송체의 조절에 대한 Nrf2의 중요성에 관한 두 가지 가능성이 있다. 첫째, 이전 연구들[13-18]에 의하면 저칼륨 상태에서는 ROS의 생성이 증가되고, 증가된 ROS는 Nrf2의 방출과 핵으로의 이동을 촉진한다고 보고한 결과를 토대로 본 연구에서도 ROS의 생성을 측정할 수는 없었지만 정상 식이 신장 세포질에서 발현되지 않은 p-Nrf2가 칼륨제한 식이 핵에서 p-Nrf2를 관찰할 수 있어(Fig. 2a), 핵으로 이동된 p-Nrf2로 인해 다양한 이온수송체들이 조절받을 가능성을 제시하는 바이다. 이는 저칼륨 상태에서 ROS의 생성이 유도되고 ROS의 과도생성은 대부분 세포비대와 세포분열에 관여하는 다양한 유전자들의 발현을 매개하는 중요한 신호전달 기전이라는 사실을 뒷받침해 주고 있다. 둘째, Nrf2에 의한 이온수송체들의 조절은 이온수송체 유전자들 간에 약간의 차이점이 있어 보인다. Lee 등[8]은 세포주에 저칼륨 상태를 처리했을 때 Nrf2와



**Fig. 4.** Low-potassium Enhances Nrf2 gene in MEF cells. (a, b) MEF cells were treated with low potassium media, total RNA was extracted, and Nrf2 mRNA expression was analyzed by RT-PCR. Nrf2 expression was measured with various concentrations of low potassium at 12 h (control 5.4 mM; low potassium 2.7 mM, 2 mM, 1.5 mM, 1 mM). The expression levels of Nrf2 are up-regulated during low potassium at 2.7 mM. (c) Expression of Nrf2, kNBC1 and colonic H/K at various time periods in 2.7 mM low potassium conditions. (d~f) Densitometric analysis of mRNA expression levels of Nrf2, kNBC1 and colonic H/K.

이온수송체들의 발현이 급격하게 증가되는 것을 관찰하였고 전사인자억제유전자 Nrf2 (dominant-negative Nrf2)를 과다발현시켰을 때 저칼륨 상태에서 매개된 이온수송체들의 발현이 완전히 억제되는 것을 확인하였으나 ChIP assay 실험을 통해 Nrf2와 이온수송체인 colonic H/K-ATPase와 kNBC1 간의 서로 다른 결합이 이루어짐을 밝혔다. 이는 Nrf2가 직접적으로 kNBC1의 프로모터 영역에 결합하지만, colonic H/K-ATPase의 프로모터 영역에는 직접적으로 결합하지 않음을 보여주었다. colonic H/K-ATPase 유전자의 5'-flanking 영역에 2개의 Nrf2 결합사이트가 있음에도 불구하고, 이 두 개의 사이트는 전사시작 사이트로부터 약

5 kb 내에 위치하고 있다. 오히려, 전사시작 사이트의 가까운 영역에는 몇 개의 Sp1과 Sp2가 결합할 수 있는 서열로 추정되는 GC-rich 뉴클레오타이드가 있고, ChIP assay 결과 이온수송체의 프로모터 영역에 Sp1과 Sp2가 직접적으로 결합한다는 것을 보여주었다. 사실, 산화적 혹은 전자친화적 스트레스에 노출되었을 때 Nrf2-c-Jun 복합체는 PKC에 의해 인산화가 되어지고, 핵으로 이동된다. Sp1 역시 스트레스 신호가 왔을 때 c-Jun과 복합체를 형성하고 표적유전자의 활성화가 c-Jun을 끌어 당기는 anchor 단백질로서의 역할을 한다고 한다. 이러한 증거들을 토대로 Nrf2-Sp1 복합체가 저칼륨 상태 동안 표적 유전자를 활성화시킬 수



**Fig. 5.** Effect of low  $K^+$  on Nrf2 expression in Nrf2 ( $-/-$ ) MEF cell. (a) MEF cells of each genotype were incubated in low potassium (2.7 mM) media for 24 and 48 hr. (b) Densitometric analysis of mRNA expression levels of Nrf2, κNBC1 and colonic H/K in MEF cells during pretreatment with low potassium. Low potassium promoted expression of Nrf2, κNBC1 and colonic H/K-ATPase in MEF-Nrf2 ( $+/+$ ), but unchanged or even decreased in MEF-Nrf2 ( $+/-$ ) and MEF-Nrf2 ( $-/-$ ).

있을 것으로 생각되었다.

Nrf2가 ion transporter들의 발현에 직접 또는 간접적으로 영향을 미치는가는 Lee 등 [8]이 293T와 CV-1 세포주를 저칼륨 조건으로 배양 후 각각의 이온수송체 mRNA 발현 변화를 RT-PCR을 통해 κNBC1, colonic H/K-ATPase, 및 Na/K-ATPase  $\alpha$ 3가 증가함을 관찰하였고, Nrf2 dominant-negative 처리 때는 다시 감소함을 보고하였다. 본 연구에서도 293T, CV-1 세포주뿐만 아니라 MEF 세포주에서도 저칼륨 배양 시 Nrf2를 활성화시키는 지 확인하기 위해 다양한 저칼륨 배양조건으로 RT-PCR 실험을 수행하였다. Lee 등 [8]이 확인하였던 결과와 같이 2.7 mM의 저칼륨 배양조건에서 Nrf2의 활성이 증가하는 것을 확인하였고 또한 2.7 mM의 저칼륨 배양조건에 다양한 시간대별로 Nrf2 및 이온수송체의 mRNA 발현을 확인한 결과 정상조건 대비 저칼륨 배양조건에서 Nrf2 및 κNBC1, colonic H/K의 mRNA 발현이 증가함을 관찰하였다. 저칼륨 조건에서 Nrf2가 이온수송체의 발현 증가와 관련이 있는지 조사하기 위해 MEF-Nrf2 wild-type ( $+/+$ ), MEF-Nrf2 Hetero

( $+/-$ ), MEF-Nrf2 knock-out ( $-/-$ ) MEF 세포주를 배양하였다. 저칼륨 배양조건에서 MEF-Nrf2 wild-type ( $+/+$ )의 Nrf2 발현이 증가하였지만 MEF-Nrf2 Hetero ( $+/-$ ) 세포주에서는 감소하였고, MEF-Nrf2 knock-out ( $-/-$ ) 세포주에서는 발현이 되지 않음을 확인하였다. κNBC1, colonic H/K의 mRNA 발현 역시 MEF-Nrf2 wild-type ( $+/+$ )에서 저칼륨 배양하였을 때 Nrf2 발현이 증가하였으나 MEF-Nrf2 Hetero ( $+/-$ )와 MEF-Nrf2 knock-out ( $-/-$ ) 세포주에서는 Nrf2 발현이 억제되었음을 관찰하였다.

이상의 결과로 저칼륨 상태에서 Nrf2는 ERK1/2와 Akt에 의해 활성화되고, 활성화된 Nrf2는 κNBC1과 colonic H/K-ATPase 유전자의 전사를 조절할 것으로 추측하였다. 추후 Nrf2 knock out 생쥐를 제작하여 downstream target 유전자군을 확보하고 이들 유전자의 발현변동 여부 및 관련 표현형을 분석한다면  $K^+$  평형에 관련된 유전자의 발현을 조절하는 전사나 전사 후 기전을 밝힐 수 있을 뿐만 아니라 선택된 유전자들의 기능과 생체조절에 관한 정보와 신장에서  $K^+$  분비에 관한 연구에 기초를 제공해 줄 것이

다. 더 나아가  $K^+$  평형은 신장 외 소화관에서도 조절되기 때문에 많은 세포형에 있어서 이들 유전자의 기능과 생체 조절의 이해에 도움이 될 것으로 생각된다.

## 사 사

MEF (mouse embryonic fibroblast)-Nrf2 wild-type (+/+), MEF-Nrf2 Hetero (+/-) 및 MEF-Nrf2 knock-out (-/-) 세포주는 서영준 교수(서울대학교 약학대학)가 제공해 주셨습니다. 감사드립니다.

## REFERENCES

- Giebisch G. Renal potassium transport: mechanisms and regulation. *Am J Physiol.* 1998;274:F817-33.
- Bae CS, Cho HJ, Ahn KY. Alteration of Akt, p-AKT, ERK, and p-ERK proteins expression in the kidney of hypokalemic rat. *Korean J Phys Anthropol.* 2017;30:87-98. Korean
- 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.* 1996;270:F557-66.
- Ahn KY, Park KW, Kim KK, Kone BC. Chronic hypokalemia enhances expression of the H(+)-K(+)-ATPase  $\alpha_2$  alpha 2-subunit gene in renal medulla. *Am J Physiol.* 1996;271:F314-21.
- Ahn KY, Kim SC, Moon B, Kim KK, Kim BY. Renal adaptive responses of Na-K-ATPase subunit isoforms to chronic hypokalemia. *The Korean J Anat.* 1998;31:405-18. Korean
- Kim JH, Cho HJ, Bae MO, Park JJ, Ahn KY. Regulation of bicarbonate ions hypokalemic rat kidney. *Korean J Anat.* 2004;37:337-45. Korean
- Lim JS, Ahn KY. Expression of Nrf2 transcription factor in rat kidney. *Korean J Nephrol.* 2011;30:239-45. Korean
- Lee CB, Lee YS, Lee JY, Lee SE, Ahn KY. Nrf2 and Sp synergistically enhance the expression of ion transporters in potassium-depleted conditions. *J Nephrol.* 2012;25:225-32.
- 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 U S A.* 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;15:4184-193.
- 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.
- Yu R, Chen C, Mo YY, Hebbar V, Owuor ED, Tan TH, et al. 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.
- Motohashi H, Yamamoto M. Nrf2-Keap1 defines a physiologically important stress response mechanism. *Trends Mole Med.* 2004;11:549-57.
- Shen G, Jeong WS, Hu R, Kong AN. Regulation of Nrf2, NF-kappaB, and AP-1 signaling pathways by chemopreventive agents. *Antioxid Redox Signal.* 2005;7:1648-63.
- Cho HJ, Ahn KY. Alteration of Nrf2 and p-Nrf2 proteins expression in hypokalemic rat kidney. *Korean J Phys Anthropol.* 2015;28:55-62. Korean
- 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 Cell Physiol.* 2003;285:C319-26.
- Babilonia E, Wei Y, Sterling H, Kaminski P, Wolin M, Wang WH. Superoxide anions are involved in mediating the effect of low K intake on c-Src expression and renal K secretion in the cortical collecting duct. *J Biol Chem.* 2005;280:10790-6.
- Deplancke B, Gaskins HR. Redox control of the transsulfuration and glutathione biosynthesis pathways. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2002;5:85-92.
- Kwon T, Kwon DY, 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.
- Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer.* 2002;2:489-501.
- Osaki M, Oshimura M, Ito H. PI3K-Akt pathway: its functions and alterations in human cancer. *Apoptosis.* 2004;9:667-76.
- Jaiswal AK. Nrf2 signaling in coordinated activation of antioxidant gene expression. *Free Radic Biol Med.* 2004;36:1199-207.

**간추림** : 저칼륨 상태에서 활성산소종의 양이 증가되고, 증가된 활성산소종은 Nrf2의 핵 내 이동을 촉진한다고 하고, Nrf2 활성화는 extracellular-regulated kinase (ERK), Jun N-terminal kinase (JNK), p38과 phosphatidyl-inositol 3-kinase (PI3K)라는 인산화효소가 작용하는 것으로 알려져 있다. 본 연구는 저칼륨 상태에서 어떤 인산화효소가 Nrf2 활성화에 관여하는지, 그리고 활성화된 Nrf2가 이온수송체의 발현에 관련이 있는지 알아보고자 정상 및 칼륨제한 식이 흰쥐 신장과 CV-1, 293T 및 MEF (mouse embryonic fibroblast) 세포주를 정상 및 저칼륨 상태에서 배양하여 각각 RT-PCR과 Western 분석으로 정량화하였다.

저칼륨 배양조건에서 증가된 Nrf2의 발현량이 LY294002와 SP600125로 처리하였을 때 감소하는 것을 관찰할 수 있었으나 PD98059와 SB203580로 처리하였을 때는 변화가 없었다. 이는 Nrf2 전사유전자 활성화에 Akt와 JNK 인산화효소가 관여할 가능성을 시사하였다. 칼륨제한 식이 신장조직에서는 ERK1/2 와 Akt의 활성화된 형태인 phospho-ERK1/2, phospho-Akt의 발현이 칼륨제한 식이가 길어질수록 증가하였고 JNK와 p38의 활성화는 변화가 없었다. 저칼륨 상태 CV-1 세포주에서는 phospho-ERK1/2, phospho-Akt의 발현이 증가함을 확인하였다. 또한 phospho-Nrf2가 칼륨제한 식이가 길어질수록 핵으로 많이 축적됨을 알 수 있었다. 저칼륨 배양조건 MEF-Nrf2 wild-type (+/+) 세포주에서는 Nrf2 발현이 증가하였지만 MEF-Nrf2 Hetero (+/-) 세포주에서는 감소하였고, MEF-Nrf2 knock-out (-/-) 세포주에서는 발현이 되지 않음을 확인하였다. kNBC1과 colonic H/K의 mRNA 발현 역시 저칼륨 배양조건 MEF-Nrf2 wild-type (+/+) 세포주에서는 증가하였으나 MEF-Nrf2 Hetero (+/-)와 MEF-Nrf2 knock-out (-/-) 세포주에서는 억제되었음을 관찰하였다.

이상의 결과로 저칼륨 상태에서 Nrf2는 ERK1/2와 Akt에 의해 활성화되고, 활성화된 Nrf2는 kNBC1과 colonic H/K-ATPase 유전자의 전사를 조절할 것으로 추측하였다.

**찾아보기 낱말** : 저칼륨 상태, Akt, p-Akt, ERK1/2, p-ERK1/2, MEF-Nrf2 wild-type (+/+) 세포주, MEF-Nrf2 Hetero (+/-) 세포주, MEF-Nrf2 knock-out (-/-) 세포주