

콩팥에서 Erythropoietin 투여로 인한 HSP70의 발현 변화

정 주 영*, 김 진¹

충남대학교 수의과대학 해부학교실, ¹가톨릭대학교 의과대학 해부학교실

Expression of HSP70 Immunoreactivity in EPO Treated Rat Kidney

Ju-Young Jung* and Jin Kim¹

Department of Veterinary Anatomy, College of Veterinary Medicine,
Chungnam National University, Daejeon, Korea

¹Department of Anatomy, College of Medicine, The Catholic University of Korea, Seoul, Korea
(Received July 9, 2007; Accepted August 1, 2007)

ABSTRACT

Heat shock protein (HSP) 70 functions as a molecular chaperon and reduces stress-induced denaturation and aggregation of intracellular proteins. Erythropoietin (EPO) plays an important role during acute renal failure repair process by rapidly correcting anemia and enhancing renal tubular regeneration. The purpose of this study was to examine the effect of EPO treatment on renal HSP70 expression. Male Sprague-Dawley rats were injected rHuEPO. Kidney were preserved by *in vivo* perfusion with paraformaldehyde-lysine-periodate (PLP) and processed for immunohistochemistry and electron microscopy. In control kidney, HSP70 was expressed in the cortex, outer medulla and inner medulla. Especially, HSP immunoreactivity was mainly founded in descending thin limb of outer medulla and inner medullary collecting duct. In EPO treated kidney, HSP70 expression markedly increased in the descending thin limb of outer medulla and newly detected in cortical collecting duct. Electron microscopy showed the presence of HSP immunoreactivity on the intracellular vesicles and Golgi complex of descending thin limb and cortical collecting duct. These findings suggest that EPO treatment leads to new production of HSP70 in renal tubular cells, and induction of HSP70 by rHuEPO is causally related to protective function.

Keywords : Heat shock protein70, Erythropoietin, Electron microscopy, pre-embedding immunohistochemistry

서 론

Heat shock protein (HSP) 70은 열충격단백질의 한 종류로, 초기에는 열손상에 의해 발현이 증가되어 세포보호 효과를 나타내는 것으로 생각되었으나, 최근에는 열충격 손상 뿐 아니라 다양한 stress에 의한 세포 손상 및 각종 질병상태에서 molecular chaperon의 기능으로 조직 및 장기들을 보호 하는 것으로 알려져 있다(Hendrick et al., 1993). 이러한 HSP70의 세포 보호 기능은 세포내 대사에 관련된 필수 단백질들의 분해 및 파괴를 방지함으로써 이루어지는 것으로 알려져 있다. 특히 HSP70은 stress에 의한 세포자멸사(apoptosis)를 방지하며, 이러한 역할은 급성신부전(acute renal failure) 모델에서 증명되었다(Mestril et al., 1994). 유전자 조작을 통한 HSP70 과발현(over expression) 모델에서, 허혈로 급성신부전을 유발하였을때 세포자멸사가 급격히 감소하였다(Plumier et al., 1995). 콩팥속질은 고장성의 오줌을 생산하기 위해 오스몰농도가 사람과 흰쥐의 경우 1,100~3,000 mosm/L에 이르며 콩팥겉질 및 신체 다른 부위의 오스몰농도가 300 mosm/L인 것에 비해 월등히 높다. 이와 같은 콩팥속질의 고장성환경(hypertonic condition)은 콩팥속질의 세포들은 고장성인 주변 환경에 노출되어 심각한 기능장애와 세포사의 위험에 처하게 되며 세포의 부피가 수축되거나 DNA의 손상이 유발될 수 있다(Kultz et al., 2004). HSP70은 정상에서 발현되어 콩팥수질의 고장성스트레스 환경에서 속수질세포를 보호하는 것으로 알려져 있다.

Erythropoietin (EPO)은 조혈성장인자(hematopoietin growth factor)로 알려져 있으며, 오랜기간동안 빈혈의 치료제로서 임상에서 사용되어 왔다(Miyake et al., 1974). 조혈작용과 더불어 콩팥에서는 세포보호 효과가 있는 것으로 보고되고 있는데, 특히 신부전환자에서 빈혈을 회복시키는데 탁월한 효과가 있으며(Nemoto et al., 2001), 손상된 요세관의 회복에도 기여한다(Vaziri et al., 2001). 더욱이 최근 연구결과에 의하면 배양된 신경세포에서 EPO의 투여가 독성물질에 의한 신경세포손상과 설치류의 뇌졸중에서 세포보호 효과를 나타내어(Sadamoto et al., 1998; Bernaudin et al.,

1999; Brines et al., 2000), 독성물질에 의한 손상과 허혈에 의한 손상에서 보호기능이 제안되고 있다.

따라서 본 연구에서는, 아직까지 보고 되고 있지 않은 HSP70과 EPO와의 상관관계를 밝히는 연구의 일환으로 Sprague-Dawley계 흰쥐에 EPO를 투여하여 HSP70의 발현변화를 관찰하고자 하였다. 특히 이번 연구에서는 세포수준에서의 발현변화에 중점을 두고 전자현미경적 면역화학법을 이용하여, 정상 콩팥에서의 HSP70의 발현과 EPO투여군에서의 발현변화를 관찰함으로써, 외부스트레스에 의한 세포손상에서 이들이 역할을 알아보고자 한다.

재료 및 방법

1. 실험군

체중 200~250 g의 Sprague-Dawley계 흰쥐 수컷을 사용하여 정상군과 EPO 투여군으로 나누어 각각 5마리씩 사용하였다. 실험군은 rHuEPO (CJ Corporation, Korea) 3000U을 음경정맥(penile vein)을 통해 주사하였으며, 대조군은 같은 양의 식염수를 주사하여 24시간 후에 희생하였다.

2. 콩팥 조직절편 제작

면역조직화학법을 위해서는 동물을 16.5% urethane (10cc/kg 체중)으로 마취하여, 심장이나 복대동맥을 통하여 0.1 M phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4)로 먼저 혈액을 씻어낸 후 이어서 paraformaldehyde-lysine-periodate (PLP)로 3~5분 관류고정하고, 콩팥을 절취하여 콩팥유두가 포함되도록 중심부위를 2 mm 두께로 자른 후, 6~12시간 4°C에서 같은 고정액에 더 고정하였다. 고정이 끝난 조직은 50 μ m 두께의 vibratome 절편을 만들어 포매전 면역조직화학법을 시행하여 광학현미경 및 전자현미경으로 관찰하였다.

3. 항 체

HSP70에 대한 항체는 mouse monoclonal antibody (SPA-810, Stressengen, Victoria, BC, Canada)를 사용하였다.

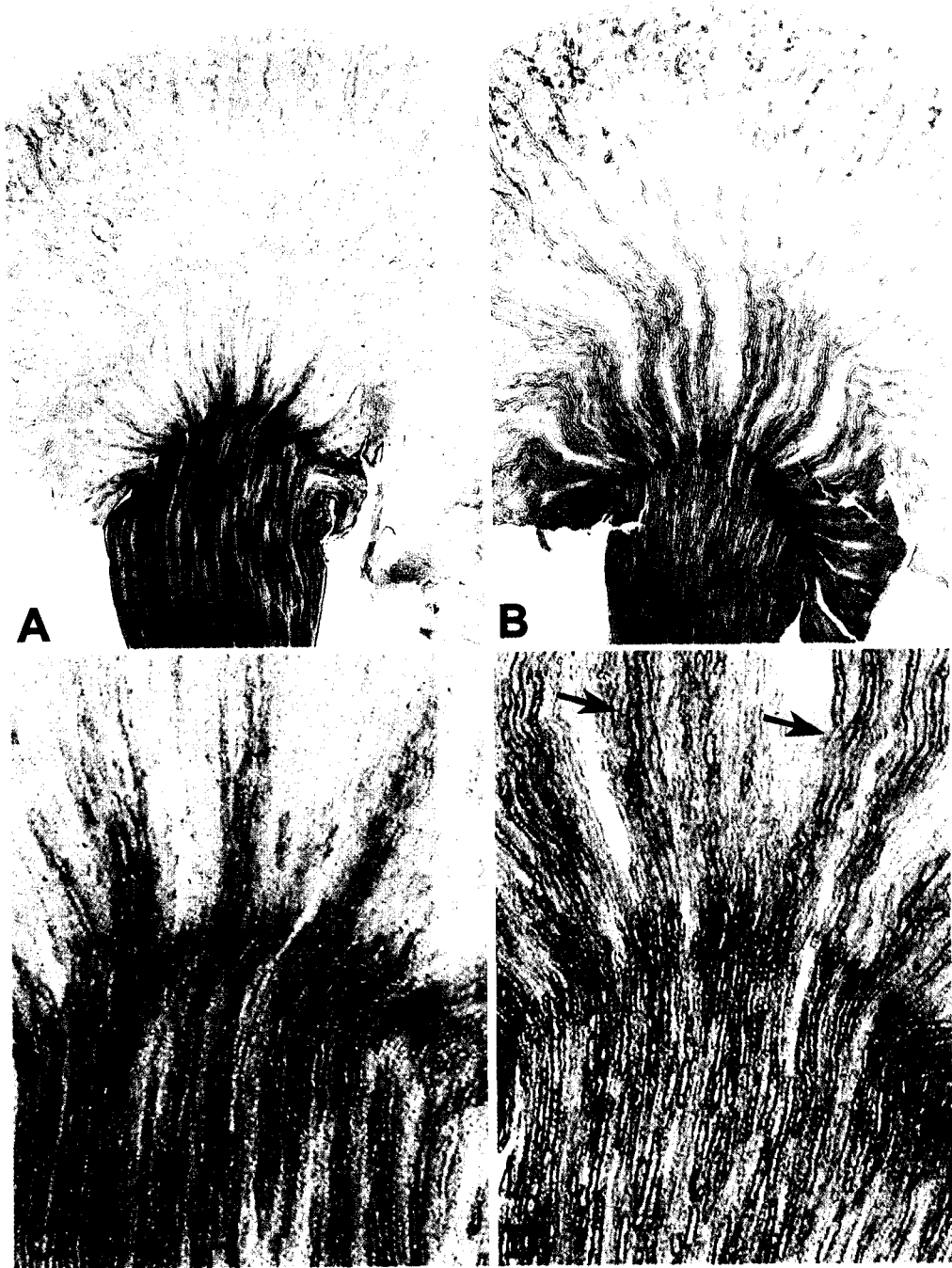


Fig. 1. Light micrographs of a 50- μ m thick vibratome section from control (A, C) and EPO treated animals (B, D) illustrating HSP70 immunoreactivity. A. HSP70 immunoreactivity is observed in cortex, outer medulla and inner medulla. B. HSP70 immunoreactivity is strikingly increased in the cortex and outer medulla. C & D. High resolution immunohistochemistry: HSP70 immunoreactivity is present in the some descending thin limb of Henle's loop (C). An arrows in D indicates an increasing HSP70-positive tubule. Magnifications: A, B \times 27; B & C, \times 500.

4. 포매전 면역조직화학법

고정된 신장을 vibratome으로 50 μm 두께의 조직절편을 제작하여 PBS로 씻은 다음, 조직에 남아 있는 aldehyde기를 제거하기 위하여 50 mM NH_4Cl 로 15분씩 3번 씻어낸다. 항체의 침투와 비특이성 반응을 줄

이기 위하여 0.05% saponin, 0.2% gelatin 및 1% bovine serum albumin (BSA)을 PBS에 혼합한 액(buffer A)에 2시간 처리하고, EGF에 대한 1차 항체를 1% BSA에 1:2,500으로 희석하여 4°C에서 하루 밤 동안 반응시켰다. Buffer A로 20분씩 3번 씻은 후, 2차 항체로 페록시다아제가 표지된 donkey anti-rabbit IgG

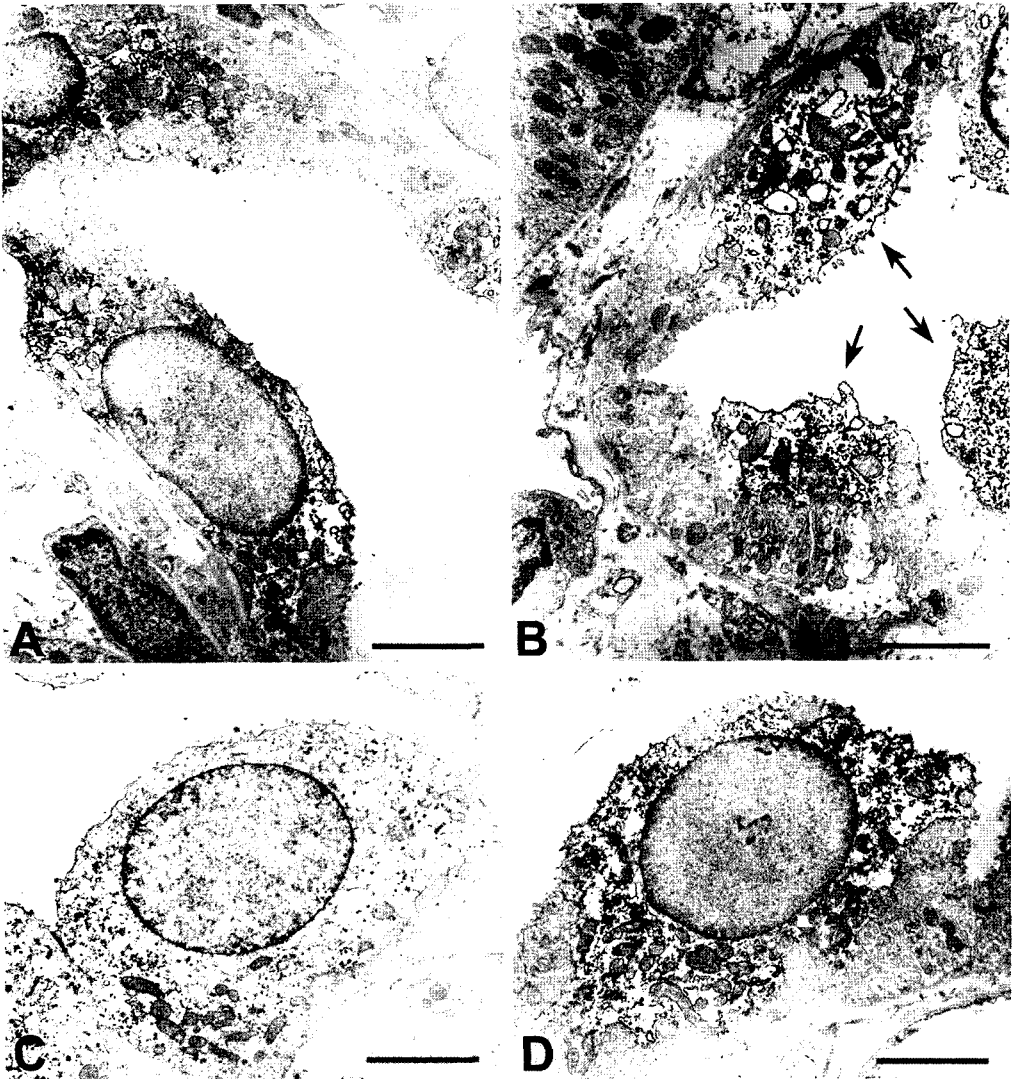


Fig. 2. Transmission electron micrographs illustrating HSP70 immunoreactivity in control (A, C) and EPO treated animals (B, D). A, B. Descending thin limbs : HSP70 immunoreactivity is present some vesicles in the cytoplasm. Note HSP70-positive vesicles striking increased in the EPO treated animals (arrows). Bar=3.5 μm . C & D. High resolution immunohistochemistry: HSP70 immunoreactivity is present in the apical membrane and vesicles (D). Intensity of HSP70 immunoreactivity of EPO treated animals stronger than that of control. Bar=2 μm

(Jackson ImmunoResearch Laboratory, West Grove, PA)를 1% BSA에 1:100으로 희석하여 실온에서 2시간 처리하였다. Buffer A와 0.05 M Tris buffer (pH 7.6)로 각각 5분씩 3번 씻어준 후 0.1% 3,3'-diaminobenzidine로 5분 처리한 후, H₂O₂를 최종농도가 0.01%가 되도록 첨가하여 10분간 더 반응시켜 발색시켰다. 0.05 M Tris buffer와 PBS로 각각 5분씩 3번 씻은 후, 광학현미경 관찰을 위해서는 슬라이드에 epon 812로 봉합 하였으며, 전자현미경 관찰을 위해서는 HSP70 항체로 염색한조직을 1% glutaraldehyde와 1% osmic acid에 각각 1시간씩 4°C에서 후고정한 다음 탈수과정을 거쳐 epon 812에 포매하여 초박절편을 제작하여 lead nitrate로 염색한 후 투과전자현미경(JEM-1200 EX, Jeol, Japan)으로 관찰하였다.

결 과

1. 광학현미경관찰

정상군에서 HSP70은 겉질(cortex), 바깥수질(outer medulla) 그리고 속수질(inner medulla)에 발현하였으며, 속수질에서의 발현이 가장 강하게 나타났다(Fig. 1A). 속수질에서 HSP70은 속수질집합관(inner medullary collecting duct)에서 강하게 발현되었으며 헨레 고리의 내림가는부분(descending thin limb)에서도 관찰되었다. 바깥수질에서는 일부 내림가는부분에서 발



Fig. 3. Transmission electron micrographs illustrating HSP70 immunoreactivity of cortical thick ascending limb in control (A) and EPO treated animals (B). There was no HSP70 immunoreactivity in control and EPO treated animals of cortical thick ascending limb. Bar=4µm.

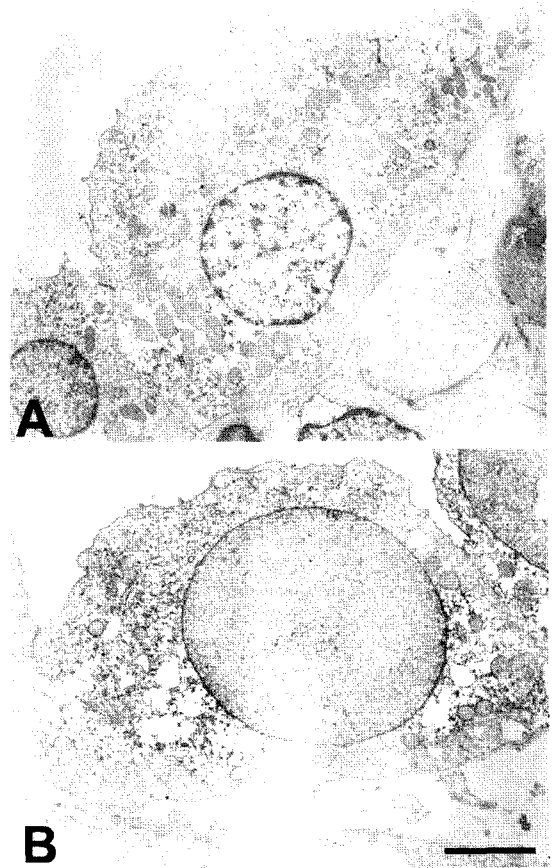


Fig. 4. Transmission electron micrographs illustrating HSP70 immunoreactivity of cortical collecting duct in control (A) and EPO treated animals (B). There was no HSP70 immunoreactivity in control (A). In contrast, HSP70 immunoreactivity was newly founded in EPO treated animals (B). Bar=4µm.

현되어 속수질까지 발현양상이 이어짐을 알 수 있었다(Fig. 1C). 결질에서는 일부 피질집합관(cortical collecting duct)에서 발현되었으나 그 양상은 매우 약하였다(Fig. 1A). EPO 투여군에서 HSP70은 전반적으로 증가하는 양상을 나타내었으나 특히 결질의 피질집합관과 바깥수질에서의 증가가 두드러지게 관찰되었다(Fig. 1B). 바깥수질에서의 증가 양상은 내림가는 부분에서 증가하였으며, 집합관에서의 증가는 관찰되지 않았다(Fig. 1D). 이러한 결과를 확인하기 위해 각 부위별 세포내 발현양상을 관찰하였다.

2. 전자현미경관찰

바깥수질의 내림가는 부분에서 HSP70 면역염색성은 광학현미경적 관찰의 결과와 일치하게 일부세포의 세포질과 골지부분에서 관찰되었으며, 발현양상은 일부에 국한되어 나타났다(Fig. 2A). 반면 EPO 투여 실험군서 대조군에 비해 면역염색성이 자유면(free surface)과 핵상부(supranuclear region)에 소포(vesicle)에서 급격히 증가하였으며, 발현면적과 발현세포의 수도 증가하였다(Fig. 2B). 고배율에서 관찰결과 대조군에 비해 실험군의 발현양상은 세포질전반에 걸쳐 고르게 증가 하였으나 세포 기저면(basal region)에서는 관찰되지 않았다(Fig. 2C & D). 이러한 결과는 광학현미경상에서 바깥수질부위의 증가가 내림가는부분세포에서의 증가로 인함을 알 수 있다.

피질과 바깥수질의 굵은오름부분(thick ascending limb)에서는 핵이 자유면에 치우치고 미토콘드리아에 의한 기저주름(basal infolding)이 대조군과 실험군에서 모두 관찰되었으나, HSP70의 면역염색성은 관찰되지 않았다(Fig. 3A & B).

반면 피질집합관에서는 정상군에서는 HSP70의 면역염색성이 관찰되지 않거나, 매우 약하게 발현되었으나 EPO투여군의 경우 핵주변을 중심으로 새로이 발현되는것을 관찰할 수 있었다(Fig. 4A & B). 하지만 핵상부와 세포질기저부분에서는 관찰되지 않았다(Fig. 4B).

고 찰

허혈로 인한 콩팥세포의 손상에서 어떻게 EPO가

세포손상을 보호하는지에 대해서는 아직까지 밝혀져 있지 않으며, 더욱이 EPO가 HSP70의 발현에 미치는 영향과 세포내 분포양상에 대한 연구는 수행된 바가 없다. 따라서 본 연구에서는 정상 흰쥐에 EPO를 투여하여 HSP70의 발현양상을 세포수준에서 관찰하고자 하였다. 정상 콩팥에서 HSP70은 속수질집합관과 바깥수질의 내림부분에 주로 발현하였으며 피질에도 일부 요세관에서 발현양상을 나타내었다. 특히 속수질에서는 속수질집합관에서의 발현이 가장 강하게 나타났으며, 이는 오줌을 농축하기 위한 고장성환경의 형성에서 속수질세포의 보호를 위한 기전으로 생각된다. 바깥수질에서의 발현은 아직까지 정확한 기전은 밝혀져 있지 않으나, 본 연구에서 수행한 EPO 투여군에서 HSP70은 바깥수질의 내림가는부분에서 강하게 증가하였으며, 정상군에서 발현하지 않았던 피질의 집합관에서 새로운 발현이 관찰되었다. 이러한 증가원인은 아직까지 정확하게 밝혀져 있지 않다. 다만 HSP70은 세포자멸사를 유발하는 signal transduction pathway를 저해하며, 이는 스트레스로 유발된 JNK와 p38의 활성을 저해시킴으로써 이루어진다(Gabai et al., 1997; Buzzard et al., 1998). 더욱이 HSP70은 스트레스로부터 유발된 tumor necrosis factor- α 와 interleukin-1의 활성을 감소시키고(Jaattela et al., 1992), 허혈로 인한 세포자멸사와 proapoptotic gene의 발현을 감소시킨다(Wang et al., 2002). 따라서 본 연구에서 수행된 EPO에 의한 HSP70의 발현증가는 허혈로 유발된 급성신부전을 비롯한 다양한 스트레스 상황에서 MAPK 활성을 저해함으로써 세포를 보호할 것으로 생각된다. 하지만 어떠한 기전으로 EPO가 HSP70의 발현을 증가시키는지에 대해서는 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다. 다만 신경세포에서 EPO와 그 수용체가 Janus tyrosine kinase (JAK) 2 단백질을 활성화 시킨다는 보고가 있다(Dificaylioglu et al., 2001). 이후에 STAT5 (signal transducer and activators of trascription), bcl-2, protein kinase B, MAKP 그리고 nuclear factor- κ B 등의 작용기전을 이끈다(Vairano et al., 2002). 그런데 HSP70은 JAK/STAT pathway의 활성화에 의해 스트레스에도 반응하여 작용한다(Madamanchi et al., 2001). 따라서 EPO에 의한 JAK/STAT pathway의 활성화에 의해 HSP70의 발현이 증가하는 것으로 생각

된다. 콩팥의 허혈에 의한 손상시 바깥수질부위의 손상이 가장 심하며 이는 혈관의 분포와도 관련이 된다. 본 연구를 통해 HSP70의 발현 증가가 바깥수질에서 두드러진 점은 이러한 주장을 뒷받침한다. 따라서 콩팥에서 EPO에 의해 HSP70의 발현이 조절되며 그 부위는 내림가는부분과 걸질집합관이며, 속수질집합관에서 해당되지 않는다.

본 연구에서는 EPO투여후에 콩팥에서 HSP70의 발현변화를 전자현미경적 면역조직화학법으로 관찰하였으며, 바깥수질의 내림가는부분에서의 발현증가와 피질집합관세포에서의 새로운 발현을 밝혔다. 이러한 결과는 EPO에 의한 세포보호 효과가 HSP70과 밀접한 관계가 있음을 증명하며, 또한 급성신부전을 포함한 다양한 질병상태 및 세포손상환경에서도 적용될 수 있을 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

- Bernaudin M, Marti HH, Rouseel S, Divoux D, Nouvelot A, MacKenzie ET, Petit E: A potential role for erythropoietin in focal permanent cerebral ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 19 : 643-651, 1999.
- Brines ML, Ghezzi P, Keenan S, Angello D, de Lanerolle NC, Cerami C, Itri LM, Cerami A: Erythropoietin crosses the blood-brain barrier to protect against experimental brain injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 97 : 10526-10531, 2000.
- Buzzard KA, Giaccia AJ, Killender M, Anderson RL: Heat shock protein 72 modulates pathways of stress-induced apoptosis. *J Biol Chem* 273 : 17147-17153, 1998.
- Digicaylioglu M, Lipton SA: Erythropoietin-mediated neuroprotection involves cross-talk between Jak2 and NF-kappa-B signalling cascades. *Nature* 412 : 641-647, 2001.
- Gabai VL, Meriin AB, Mosser DD, Caron AW, Rits S, Shifrin VI, Sherman MY: HSP70 prevents activation of stress kinases. A novel pathway of cellular thermotolerance. *J Biol Chem* 272 : 18033-18037, 1997.
- Hendrick JP, Hartl FU: Molecular chaperone functions of the heat-shock proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 62 : 349-384, 1993.
- Jaattela M, Wissing D, Bauer PA, Li GC: Major heat shock protein hsp70 protects tumor cells from tumor necrosis factor cytotoxicity. *EMBO J* 11 : 3507-3512, 1992.
- Kultz D: Hyperosmolality triggers oxidative damage in kidney cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 101(25) : 9177-9178, 2004.
- Madamanchi NR, Li S, Patterson C, Runge MS: Reactive oxygen species regulate heat-shock protein 70 via the JAK/STAT pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21 : 321-326, 2001.
- Mestrlil R, Chi SH, Sayen MR, O' Reilly K, Dillmann WH: Expression of inducible stress protein 70 in rat heart myogenic cells confers protection against stimulated ischemia-induced injury. *J Clin Invest* 93: 759-767, 1994.
- Miyake T, Kung CK, Goldwasser E: Purification of human erythropoietin. *J Biol Chem* 252 : 5558-5564, 1977.
- Nemoto T, Yokota N, Keane WF, Rabb H: Recombinant erythropoietin rapidly treats anemia in ischemic acute renal failure. *Kidney Int* 59 : 246-251, 2001.
- Plumier JC, Ross BM, Currie RW, Angelidis CE, Kazlaris H, Kollias G, Pagoulatos GN: Transgenic mice expression the human heat shock protein70 have improved post-ischemic myocardial recovery. *J Clin Invest* 95 : 1854-1860, 1995.
- Sadamoto Y, Igase K, Sakanaka M, Sato K, Otsuka H, Sakaki S, Masuda S, Sasaki R: Erythropoietin prevents place navigation disability and cortical infarction in rats with permanent occlusion of the middle cerebral artery. *Biochem Biophys Res Commun* 253 : 26-32, 1998.
- Vairano M, Dello Russo C, Pozzoli G, Battaglia A, Scambia G, Tringali G, Aloe-Spiriti MA, Preziosi P, Navarra P: Erythropoietin exerts anti-apoptotic effects on rat microglial cells in vitro. *Eur J Neurosci* 16 : 684-692, 2002.
- Vaziri ND, Zhou XJ, Liao SY: Erythropoietin enhances recovery from cisplatin-induced acute renal failure. *Am J Physiol* 266 : 360-366, 1994.
- Wang YH, Knowlton AA, Li FH, Borkan SC: Hsp72 expression enhances survival in adenosine triphosphate-depleted renal epithelial cells. *Cell Stress Chaperones* 7 : 137-145, 2002.

<국문초록>

Heat shock protein 70 (HSP70)은 다양한 질병상태와 치명적인 열 손상에서 세포 및 조직을 보호하는데 중요

한 역할을 하며, 또한 외부의 stress로부터 세포내 단백질의 파괴와 변화를 감소시키는 단백질로 알려져 있다. 본 연구에서는 오랜 기간 동안 조혈기관의 치료제로 콩팥에서도 세포보호효과가 있는 것으로 알려진 Erythropoietin (EPO)을 투여하여 콩팥내의 HSP70의 발현변화를 세포수준에서 관찰하고자 하였다. Sprague-Dawley계 흰쥐를 사용하여 전자현미경적 면역조직화학법으로 rHuEPO투여군과 대조군에서 HSP70의 발현변화를 관찰하였다. 대조군에서 HSP70은 콩팥의 바깥수질과 속수질에서 관찰되었으며, 특히 속수질에서 강하게 발현되었고 그 부위는

속수질집합관세포와 헨레고리의 내림가는 부분이었다. EPO 투여군에서는 속수질과 바깥수질의 내림가는 부분에서는 발현변화가 관찰되지 않았으나, 바깥수질의 집합관 세포에서 발현이 급격히 증가함을 관찰되었다. 특히 대조군에서의 핵주변부위뿐 아니라 세포내 핵상부분을 비롯한 세포막주변부위에도 강한 면역염색성을 나타내었다. 이러한 결과는 콩팥의 바깥수질에서 stress성 단백질인 HSP70의 조절기전이 EPO에 의해 매개됨을 보여주며, 세포 stress 및 질병상태에서도 이러한 기전이 작용할 것으로 생각된다.