

흰쥐 콩팥에서 요소운반체-A의 발현: 미세구조적 면역세포화학법

임선우, 정주영, 김완영, 한기환, 차정호, 정진웅, 김진*
가톨릭대학교 의과대학 해부학교실

Expression of UT-A in Rat Kidney: Ultrastructural Immunocytochemistry

Sun-Woo Lim, Ju-Young Jung, Wan-Young Kim, Ki-Hwan Han,
Jung-Ho Cha, Jin-Woong Chung and Jin Kim*

Department of Anatomy, College of Medicine, The Catholic University of Korea
(Received March 13, 2002; Accepted May 24, 2002)

ABSTRACT

Urea transport in the kidney is mediated by a family of transporter proteins that includes renal urea transporters (UT-A) and erythrocyte urea transporters (UT-B). The cDNA of five isoforms of rat UT-A, UT-A1, UT-A2, UT-A3, UT-A4, and UT-A5 have been cloned. The purpose of this study was to examine the expression of UT-A (L194), which marked UT-A1, UT-A2 and UT-A4. Male Sprague-Dawley rats, weighing approximately 200 g, were divided into three groups: control rats had free access to water, dehydrated rats were deprived of water for 3 d, and water loaded rats had free access to 3% sucrose water for 3 d before being killed. The kidneys were preserved by *in vivo* perfusion through the abdominal aorta with the 2% paraformaldehyde-lysine-periodate (PLP) or 8% paraformaldehyde solution for 10 min. The sections were processed for immunohistochemical studies using pre-embedding immunoperoxidase method and immunogold method.

In the normal rat kidney, UT-A1 was expressed intensely in the cytoplasm of the inner medullary collecting duct (IMCD) cell and UT-A2 was expressed on the plasma membrane of the terminal portion of the short loop descending thin limb (DTL) cells (type I epithelium) and of the long loop DTL cells (type II epithelium) in the initial part of the inner medulla.

Immunoreactivity for UT-A1 in the IMCD cells, was decreased in dehydrated animals whereas strongly increased in water loaded animals compared with control animals. In the short loop DTL, immunoreactivity for UT-A2 was increased in intensity in both dehydrated and water loaded groups. However, in the long loop DTL of the outer part of the inner medulla, immunoreactivity for UT-A2 was markedly increased in intensity in dehydrated group, but not in water loaded group.

In conclusion, in the rat kidney, UT-A1 is located in the cytoplasm of IMCD cells, whereas UT-A2 is

* Correspondence should be addressed to Dr. Jin Kim, Department of Anatomy, College of Medicine, The Catholic University of Korea, 505 Banpo-Dong, Socho-Ku, Seoul 137-701, Korea. Ph: 02-590-1153, FAX: 02-536-3110, E-mail: jinkim@catholic.ac.kr
Copyright © 2002 Korean Society of Electron Microscopy

located in the plasma membrane of both the short and long loop DTL cells. Immunohistochemistry studies revealed that UT-A1 and UT-A2 may have a different role in urea transport and are regulated by different mechanisms.

Key words : Descending thin limb, Immunohistochemistry, Inner medullary collecting duct, Urea transporter

서 론

질소대사의 중요한 최종 산물인 요소(urea)는 간에서 형성된 후 콩팥으로 가서 속수질집합관(inner medullary collecting duct)의 말단부위(terminal part)에서 대부분 재흡수 되고 일부만 배설된다. 속수질 사이질내 요소는 오름곧은혈관(ascending vasa recta)을 타고 상승하다가 바깥수질에서 농도차에 의해 사이질을 거쳐 헨레고리나 내림곧은혈관(descending vasa recta)으로 들어가서 속수질로 다시 내려오는 콩팥내 요소재순환(intrarenal urea recycling) 과정에 의하여 속수질에 높은 농도로 축적된다. 속수질에 축적된 요소는 사이질의 삼투질 농도를 높여 속수질집합관에서의 수분 흡수를 도와 줌으로서 소변 농축기전에 중요한 역할을 한다(Bankir, 1996; Hediger et al., 1996; Knepper & Rector, 1996; Sands et al., 1997).

요소는 분자량이 60 Da에 불과한 작은 분자이나 단순확산(simple diffusion)만으로는 세포막을 빨리 통과할 수 없으며, 세포막에 요소운반체(urea transporter, UT)가 있어야 많은 양을 빨리 운반할 수 있다는 사실이 Chou & Knepper(1989), Star & Knepper(1990) 등에 의해 제시된 후, 최근 요소운반체는 요세관(renal tubule)에서 발현되는 요소운반체인 UT-A와 격혈구에서 발현되는 요소운반체인 UT-B가 있음이 밝혀 졌다(Sands et al., 1997).

UT-A는 UT-A1 (Shayakul et al., 1996), UT-A2 (Smith et al., 1995; You et al., 1993), UT-A3 (Karakashian et al., 1999), UT-A4 (Karakashian et al., 1999), UT-A5 (Fenton et al., 2000) 등 5 종류의 cDNA가 클로닝 되었다. 이들은 같은 유전자에서 유래된 mRNA 재조합의 변종으로 생각하고 있다. UT-A1이 가장 큰 아형이며 다른 것들은 UT-A1의 일부분으로 구성되어 있다(Fenton et al., 2000; Karakashian et al.,

1999). 한편 UT-B의 cDNA는 사람 골수 유전체는행으로부터 클로닝된 후(Olives, 1994) 상동성 검색을 통하여 흰쥐 속수질에서도 분리되었다(Couriaud et al., 1996; Tsukaguchi et al., 1997).

UT-A1, UT-A2, UT-A3 및 UT-A4는 콩팥에서 발현되며, UT-A5는 고환에서 발현되는 것으로 알려져 있다. 콩팥에서 UT-A의 분포에 대한 Northern 분석과 *in situ* hybridization 그리고 번역조지화학을 이용한 연구를 통하여 UT-A1과 UT-A3는 속수질집합관에서 발현되며(Nielsen et al., 1996; Shayakul et al., 1997; Terris et al., 2001), UT-A2는 헨레고리의 내림가는부분에 위치하는 것으로 밝혀졌다(Shayakul et al., 1997; Wade et al., 2000). 그러나 UT-A4의 위치에 대하여는 아직까지 명확히 밝혀져 있지 않다. 한편 UT-B mRNA와 단백질은 수질내 내림곧은혈관의 내피세포에서 발현됨을 알게 되었다(Olives et al., 1994; Tsukaguchi et al., 1997; Xu et al., 1997).

지금까지의 콩팥내 UT 분포에 대한 연구는 대부분 광학현미경적 소견을 바탕으로 한 것으로서 UT의 정확한 기능을 이해하기 위해서는 세포내 분포에 대한 전자현미경적 연구가 필요한 실정이다.

이 연구는 흰쥐 콩팥을 대상으로 UT-A의 분포를 전자현미경으로 관찰하고, 수분 공급 변화에 따른 UT-A의 발현 변화를 광학 및 전자현미경으로 관찰하였다.

재료 및 방법

1. 실험 동물

실험 동물은 Sprague-Dawley계의 흰쥐 수컷(200~250 g)을 사용하였으며, 정상군, 탈수군 및 수분과잉 공급군의 3군으로 나누었으며 각 군에 10마리씩 배정하였다. 정상군은 정상적인 식수를, 탈수군은 식수

를 3일간 공급하지 않았으며, 수분과잉공급군은 3%의 sucrose를 섞은 식수를 3일간 자유롭게 먹였다. 모든 실험 동물은 먹이를 자유롭게 먹게 하였고 12시간 light-dark cycle에 두었다. 그리고 각 실험 동물의 몸무게를 매일 측정하고 실험 마지막 12시간 동안은 각 동물의 오줌을 채취하였다.

실험 동물은 16.5% urethan (10 ml/kg 체중)을 복강에 주사하여 마취한 후, 콩팥을 복대동맥을 통하여 0.01 M phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4)으로 관류하여 혈액을 제거한 후, 2% paraformaldehyde-lysine-periodate (PLP) 또는 8% paraformaldehyde-용액으로 10분간 관류 고정하였다. 고정된 콩팥을 절취하여 콩팥유두가 포함된 2 mm 두께의 횡단절편을 얻은 후 PLP로 고정한 경우에는 같은 고정액에 담가 4°C에서 하룻밤 동안 8% paraformaldehyde로 고정한 경우에는 4°C에서 2시간 동안 액침고정하였다.

2. 항 체

UT-A에 대한 토끼 다클론항체 (L194; UT-A1, UT-A2 및 UT-A4를 표지함) (미국 National Institutes of Health의 Dr. Mark A. Knepper 제공)를 사용하였다 (Terris et al., 1998; Wade et al., 2000). 그 외 굵은 오름부분 (thick ascending limb)을 표지하기 위해서는 Na/K-ATPase $\alpha 1$ 에 대한 토끼 다클론항체 (Upstate biotechnology Inc., Lake Placid, NY, USA)를 사용하였으며, 내림가는부분을 표지하기 위해서는 aquaporin 1 (AQP1)에 대한 토끼 다클론항체 (Chemicon Inc., Temecula, CA, USA)를 사용하였다.

3. 면역세포화학법 (포매전면역세포화학법)

1) 면역과산화효소법

고정된 콩팥을 vibratome으로 50 μ m 두께의 조직절편을 제작하여 PBS로 씻은 다음, 조직에 남아있는 aldehyde기를 제거하기 위하여 50 mM NH₄Cl/PBS로 15분씩 3번 씻어내었고, 항체의 침투력을 높이고 비특이적 항원항체 반응을 방지하기 위하여 1% bovine serum albumin (BSA)과 0.05% saponin/0.2% gelatin/PBS (PSG) (B용액)을 혼합한 용액에 3시간 처리하였다. 그 후 일차항체로 UT-A에 대한 항체를 1% BSA

/PBS (A용액)에 1:500으로 희석하여 4°C에서 하룻밤 동안 처리하였다. 다음날 상온에서 1시간 동안 방치하여 온도를 실온에 맞춘 후 내재성 과산화효소를 억제하기 위하여 3% H₂O₂/10% methanol/PBS로 10분간 처리하였다. PBS와 0.1% BSA/PSG (C용액)으로 씻어낸 후, 이차 항체로서 과산화효소가 표지된 donkey anti-rabbit IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratory, West Grove, PA, USA)를 A용액에 1:100으로 희석하여 실온에서 2시간 처리하였다. C용액과 0.05 M₂tris buffer (TB, pH 7.6)로 각각 10분씩 3번 씻어낸 다음 0.1% 3, 3-diaminobenzide/TB (DAB)로 5분간 처리하고 10% H₂O₂를 최종농도가 0.01% 되도록 첨가하여 10분 동안 반응시켜 발색시켰다. TB와 0.1 M phosphate buffer (PB)로 각각 5분씩 3번 씻어낸 다음 1% glutaraldehyde와 1% osmium tetroxide에서 각각 4°C에서 1시간씩 후고정하였고, 1% uranyl acetate/70% ethanol에서 1시간 처리한 후 Epon 812에 편평하게 포매하여 초박절편을 제작한 후 투과전자현미경 (1200EX, JEOL, Japan)으로 관찰하였다.

2) 이중면역염색법

UT-A로 면역염색하여 DAB로 발색한 조직 중 일부는 이중면역염색을 위해 AQP1 혹은 Na/K-ATPase $\alpha 1$ 을 다시 처리하여 Vector SG (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA)로 발색한 후 탈수과정을 거쳐 Epon 812에 포매하여 광학현미경으로 관찰하였다.

3) 면역도금법

한편 면역도금법에 의한 전자현미경적 관찰을 위하여는 일차항체를 처리한 일부 조직절편을 C용액과 0.8% BAS/0.1% gelatin/2 mM NaN₃/PBS (gold buffer)로 각각 20분씩 3번 씻어주었다. 이차항체로 직경 1 nm의 금 입자 (gold particle)가 표지된 goat anti-rabbit IgG (Amersham Life Science, Buckinghamshire, England)를 gold buffer에 1:50으로 희석하여 4°C에서 하룻밤동안 반응시켰다. 다음날 gold buffer와 증류수로 충분히 씻어낸 후 IntenSEM silver enhancement system (Amersham Life Science, Buckinghamshire, England)을 이용하여 실온에서 약 10분간 금 입자를 증폭시켰다. 1% glutaraldehyde와 1% osmium tetroxide

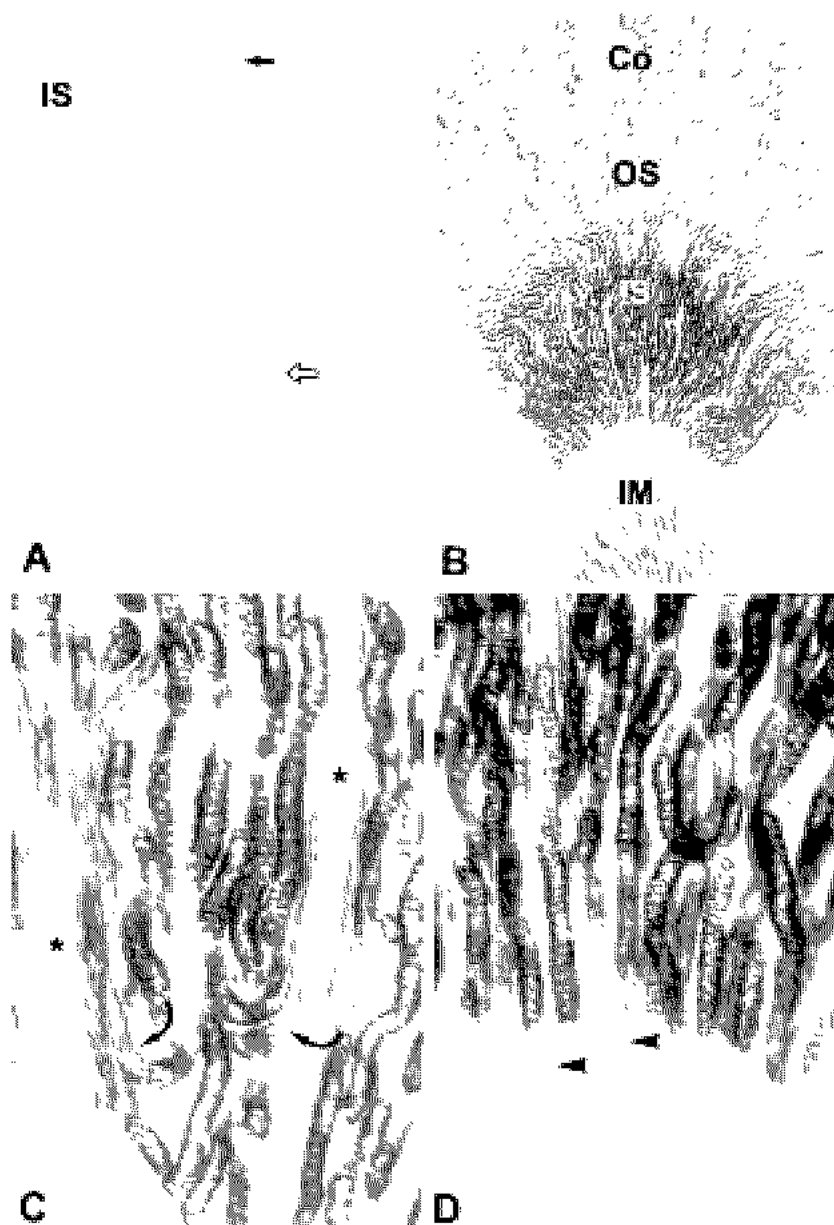


Fig. 1. Light micrographs of the kidneys from control animals illustrating single immunostaining for UT-A (A) and double immunostaining for Na/K-ATPase 1 and UT-A (B-D). A. Strong UT-A immunoreactivity was present in the terminal portion of short-loop descending thin limb (DTL; arrow) in the inner stripe of outer medulla (IS), and also present in the inner medullary collecting duct (IMCD; open arrow), where the intensity of the labeling gradually increased toward the papilla tip. C and D: higher magnification of IS and the border between outer and inner medulla, respectively. C: note that curved arrows indicate the abrupt transition from strong UT-A2-positive DTLs (brown) to Na/K-ATPase α 1-positive thick ascending limbs (blue). Asterisks indicate vascular bundles. D: note that UT-A2 was expressed also in the long-loop DTL located at the border between outer and inner medulla. Co, cortex; OS, outer stripe of outer medulla; IM, inner medulla. Magnifications: A & B, $\times 15$; C & D, $\times 140$.

에서 각각 4°C에서 1시간씩 후고정하고 1% uranyl acetate/70% ethanol에서 1시간 처리한 후 탈수과정을 거쳐 Epon 812에 포매하여 초박절편을 제작한 후 투과전자현미경 (1200EX, JEOL, Japan)으로 관찰하였다.

결 과

1. 실험동물의 체중 및 소변 오스몰농도 측정 결과

실험동물의 체중은 정상군과 수분과잉공급군에서는 약 10%가 증가한 반면, 탈수군에서는 약 10%가 감소하였다. 소변의 오스몰농도 (osmolality)는 정상군에서는 약 1,760 mOsm/kg이었으나, 탈수군에서는 3,613 mOsm/kg로 현저히 증가하였으며, 수분과잉공급군에서는 591 mOsm/kg로 감소하였다 (Table 1).

Table 1. Body weight, urine osmolality (U_{osm}) in water loaded, control, and dehydrated rats^a

Rat	Body Weight (g)		U_{osm}^b (mOsm/kg)
	At start	At end	
Water loaded	209 ± 14	232 ± 13	591 ± 77
Control	211 ± 16	237 ± 14	1760 ± 79
Dehydrated	208 ± 13	185 ± 11	3613 ± 213

^a Values are mean ± SEM (n = 9 to 12).

^b U_{osm} values are different from each other ($P < 0.001$)

2. 면역세포화학적 관찰 소견

정상군 광학현미경상 UT-A는 바깥수질 (outer medulla)의 속줄무늬층 (inner stripe)과 속수질 (inner medulla)에 국한하여 분포하였고 (Fig. 1A), 피질과 바깥수질의 바깥줄무늬층 (outer stripe)에서는 관찰할 수 없었다. UT-A-양성 부위 (갈색을 띠는 DAB로 발색함)를 확인하기 위하여 Na/K-ATPase $\alpha 1$ (청색을 띠는 Vector SG로 발색함)으로 굵은오름부분 (thick ascending limb)과 원위곱슬세관 (distal convoluted tubule)을 표지한 이중면역염색표본을 관찰한 결과는 다음과 같았다. 바깥수질 속줄무늬층에서 양성반응을 띠는 요세관은 속줄무늬층의 안쪽 1/2에 위치하며 (Fig. 1B), 혈관다발 (vascular bundle)의 주변에 위치하

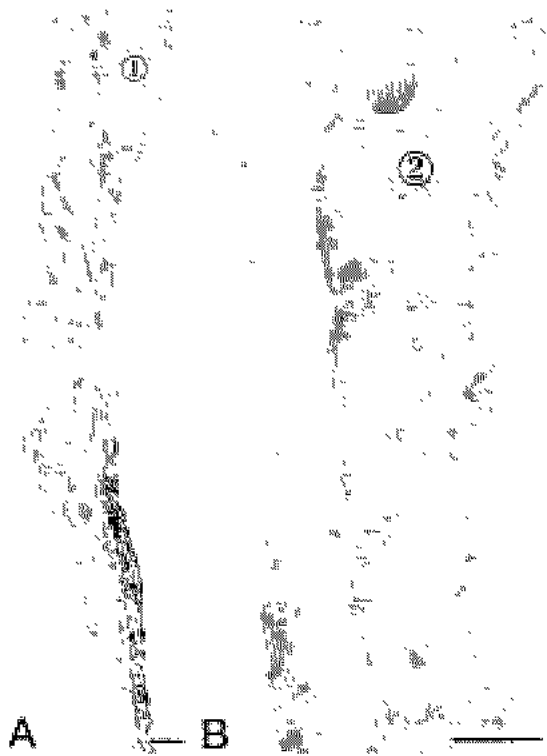


Fig. 2. Transmission electron microscopic localization of UT-A in the outer part of IS of rat kidney. In this area, there was no UT-A immunoreactivity in type I (①, A) and type II (②, B) epithelium. Bar = 1 μ m.

고 Na/K-ATPase $\alpha 1$ -양성 굵은오름부분으로 연결되는 것으로 보아 (Fig. 1C) 짧은-헨레고리 (short loop of Henle)의 내림가는부분 (descending thin limb) 말단부위 (terminal part)에 UT-A가 발현됨을 알 수 있었다. 한편 속수질에서는 속수질 초기부분 (initial part)에는 내림가는부분 중 일부가 양성 반응을 띠고 있을 뿐이었고 (Fig. 1D), 중간부분과 말단부분에서는 속수질 집합관 (inner medullary collecting duct)이 강한 양성 반응을 띠었다 (Fig. 1A).

전자현미경상 바깥수질 속줄무늬층에서 UT-A에 강한 양성반응을 보이는 세포는 얇고 외측돌기도 뚜렷하지 않았으며 자유면세포막에 미세융모가 거의 없는 짧은-헨레고리의 내림가는부분 상피세포인 전형적인 I형 세포 (type I cell)임을 확인하였다 (Fig. 2A, 3). 면역도금법에서 금 입자가 I형 세포의 세포막 특



Fig. 3. Transmission electron microscopic localization of UT-A in the inner part of IS of rat kidney. Strong UT-A2 was observed in the type I epithelium of the short-loop DTL which was directly connected with unlabeled TAL. Bar = 1 μ m.

히 기저외측면에 주로 분포하였고 세포질에는 상대적으로 적은 것으로 보아 UT-A가 I형 세포의 세포질 보다는 세포막에 주로 분포하고 있음을 알 수 있었다(Fig. 5). 그러나 바깥수질에 위치하는 긴-헨레고리의 내림가는부분 상피세포인 II형 세포에서는 면역반응을 관찰할 수 없었다(Fig. 2A). 한편 바깥수질과 속수질의 경계부위에서 UT-A에 중등도의 양성반응을 보이는 요세관은 AQP1에 양성반응을 띠는 긴-헨레고리의 내림가는부분임을 알 수 있었으며, 정상군에서 이 부분에 있는 AQP1-양성 내림가는부분 중 일부만이 UT-A-양성세포를 포함하고 있었다(Fig. 8G). 또한 전자현미경상 이 부분의 UT-A-양성세포는 I형 세포에 비하여 상대적으로 세포높이가 높고, 외측면에 많은 돌기가 형성되어 있으며, 자유면에는 짧은 미세융모가 발달되어있는 II형 세포의 특징을 띠고 있음을 확인하였다(Fig. 4A). III형 및 IV형 세포에서는 UT-A가 발견되지 않았다(Fig. 4B).

속수질 중간 및 말단부분에서 UT-A는 광학현미경상 강한 양성반응을 보이는 속수질집합관을 전자현미경으로 관찰한 결과 UT-A 양성세포와 음성세포가 섞여 있음을 알 수 있었다(Fig. 9A). 전자현미경상

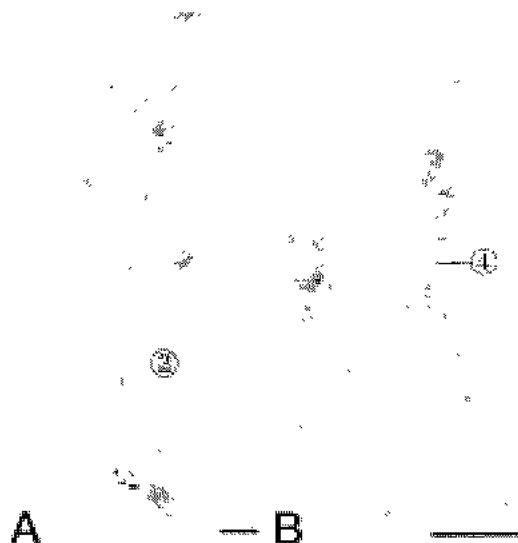


Fig. 4. Transmission electron microscopic localization of UT-A in the initial part of the inner medulla of rat kidney. UT-A2 was weakly expressed in the type II epithelium of the long-loop DTL (②). There was no UT-A immunoreactivity in the type IV epithelium (④) which is characterized by an absence of surface microvilli but has an abundance of lateral cell processes and interdigitations. Bar = 1 μ m.

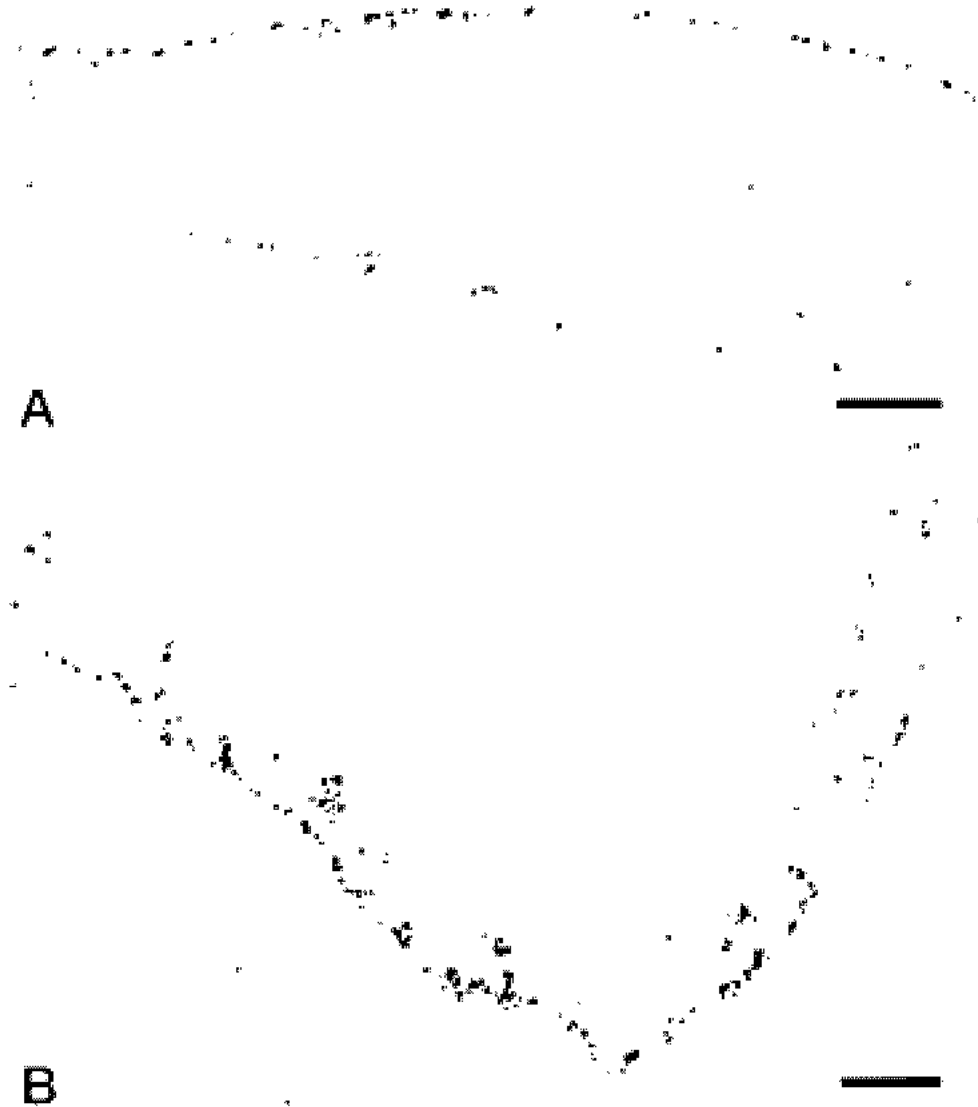


Fig. 5. Transmission electron microscopic localization of UT-A2 in the DTL cells of the terminal part of the short-loop DTL in the inner part of IS using immunogold method. Note UT-A2 was localized predominantly on the plasma membrane especially on the basolateral plasma membrane. Bar = 1 μ m.

UT-A-양성세포에서 금 입자가 세포질에 산재되어 있었으며, 자유면세포막이나 기저외측세포막에서는 거의 관찰할 수 없어(Fig. 6), 속수질집합관에서 UT-A는 세포질에 주로 분포함을 알 수 있었다. 한편 UT-A-음성세포는 주로 세포질과 핵의 전자밀도가 높

고 소포가 많은 어두운 세포였으며, 일부는 세포질이 밝은 세포였다(Fig. 7).

탈수근 광학현미경상 UT-A 면역반응성은 바깥수질과 속수질 초기부분에서는 증가되어 있었으나(Fig. 8B), 속수질에서는 현저히 감소되어 있었다(Fig. 8B).



Fig. 6. Transmission electron microscopic localization of UT-A1 in the IMCD cells of the middle part of IMCD using immunogold method. UT-A1 was distributed diffusely in the cytoplasm of IMCD. There was no UT-A1 labeling on the plasma membrane including apical plasma membrane. Bar = 1 μ m.

UT-A와 AQP1에 대한 이중면역염색 표본에서 탈수군의 속수질 초기부분에 있는 AQP1-양성인 긴-헨레고리의 내림가는부분 대부분이 UT-A-양성세포를 포함하고 있었다(Fig. 8H). 속수질집합관상피에서 UT-A-양성세포가 현저히 줄어들어 거의 관찰할 수 없었다(Fig. 9B). 정상군의 바깥수질에서는 짧은-헨레고리의 내림가는부분(I형 세포)의 말단 부위에서만 UT-A가 발견되었으나, 탈수군에서는 긴-헨레고리의 내림가는부분 상피세포인 II형 세포에서도 UT-A가 발견되었으며 특히 골지복합체에서 UT-A 면역반응성을 관찰할 수 있었다(Fig. 10).

수분과잉공급군 UT-A 면역반응성은 짧은-헨레고리의 내림가는부분과 속수질집합관에서는 정상군과 탈수군에 비하여 증가되어 있었으며, 긴-헨레고의 내림가는부분은 탈수군에 비하여 약하였으며 정상군과 거의 비슷하였다(Fig. 8C, 8F, 8I). 속수질에서 관찰되는 UT-A-양성세포들은 정상군에 비해서 그 면역성이 매우 강하며 세포수도 증가하였다(Fig. 9C).

고 찰

이 실험에 사용한 UT-A 항체는 UT-A1, UT-A2 및 UT-A4에 공통으로 존재하는 COOH-말단에 대한 항체이다(Terris et al., 1998; Wade et al., 2000). Nielsen et al. (1996)과 Wade et al. (2000)의 결과에서와 같이 이 실험에 사용한 UT-A 항체는 정상군 흰 쥐 콩팥에서 UT-A1은 속수질집합관에 UT-A2는 짧은-헨레고리의 내림가는부분에서 강하게 발견되었다. 또한 긴-헨레고리의 내림가는부분 중 바깥수질과 속수질의 경계부위에서 UT-A2가 약하게 발견되어 Kim et al. (2002)의 결과와 같았다.

이러한 UT-A의 세포내 분포에 대한 전자현미경적 관찰은 지금까지 1996년 Nielsen들의 보고가 유일하다. Nielsen et al. (1996)은 면역도금법을 통하여 속수질집합관에 있는 UT-A1은 자유면세포막과 핵상부 세포질에 있는 소포에 위치하며, 기저외측세포막에는 거의 없다고 하였으며, 헨레고리의 내림가는부분에

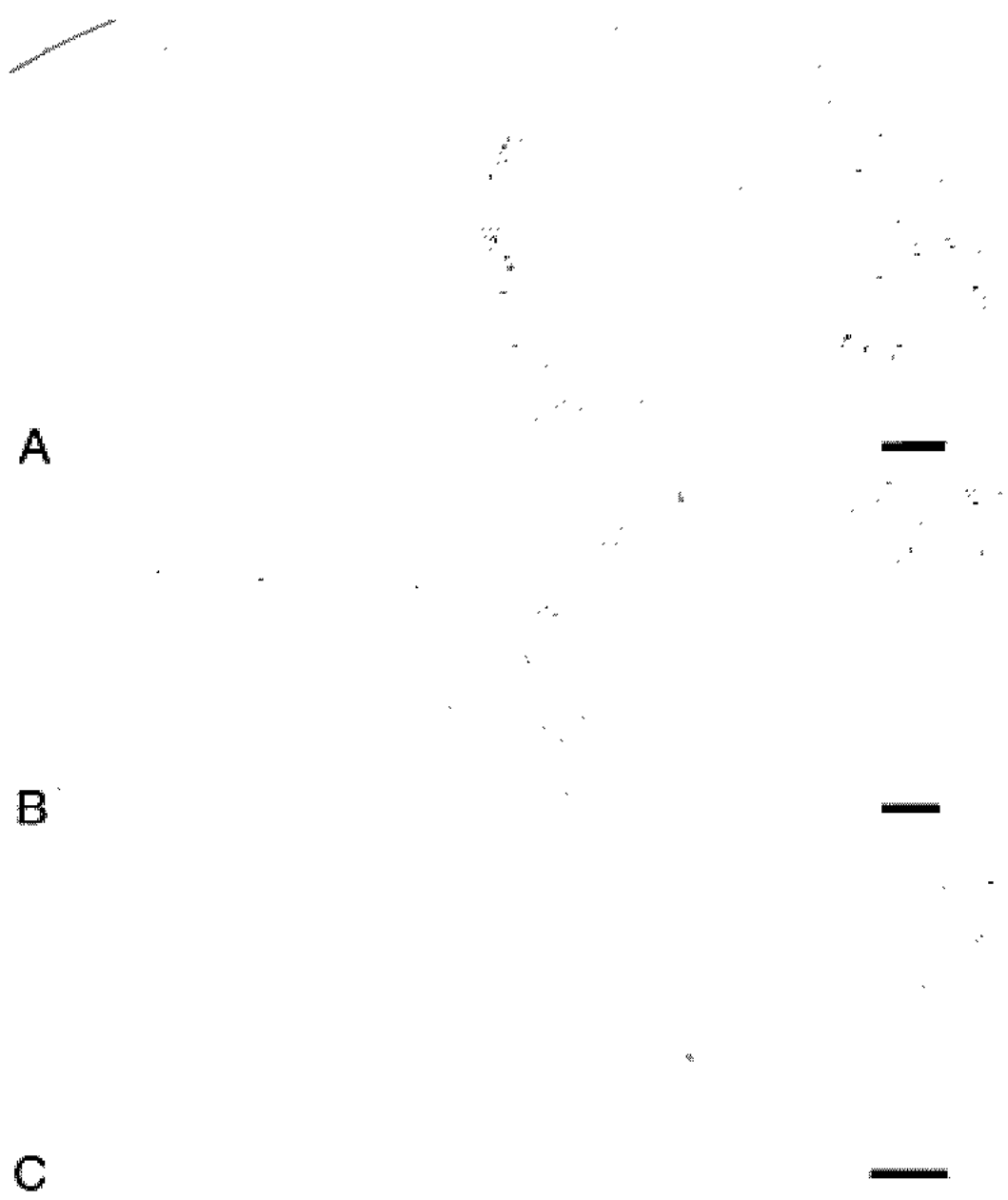


Fig. 7. Transmission electron microscopic localization of UT-A1 in the middle part of IMCD using immunogold method (A-C). Note UT-A1-negative cells with a condensed nucleus and an electron dense cytoplasm. Bar = 1 μ m.

대하여는 관찰하지 못했다. 이 실험에서는 포매전면
 역화학법을 이용한 면역과산화효소법을 시행하여 바
 갈수질의 속무늬층에서 UT-A2에 강한 양성반응을

보이는 세포는 I형 세포(type I cell)이고, 바깥수질과
 속수질의 경계부위에서 UT-A2에 중등도의 양성반
 응을 보이는 세포는 II형 세포의 특징을 띠고 있음을

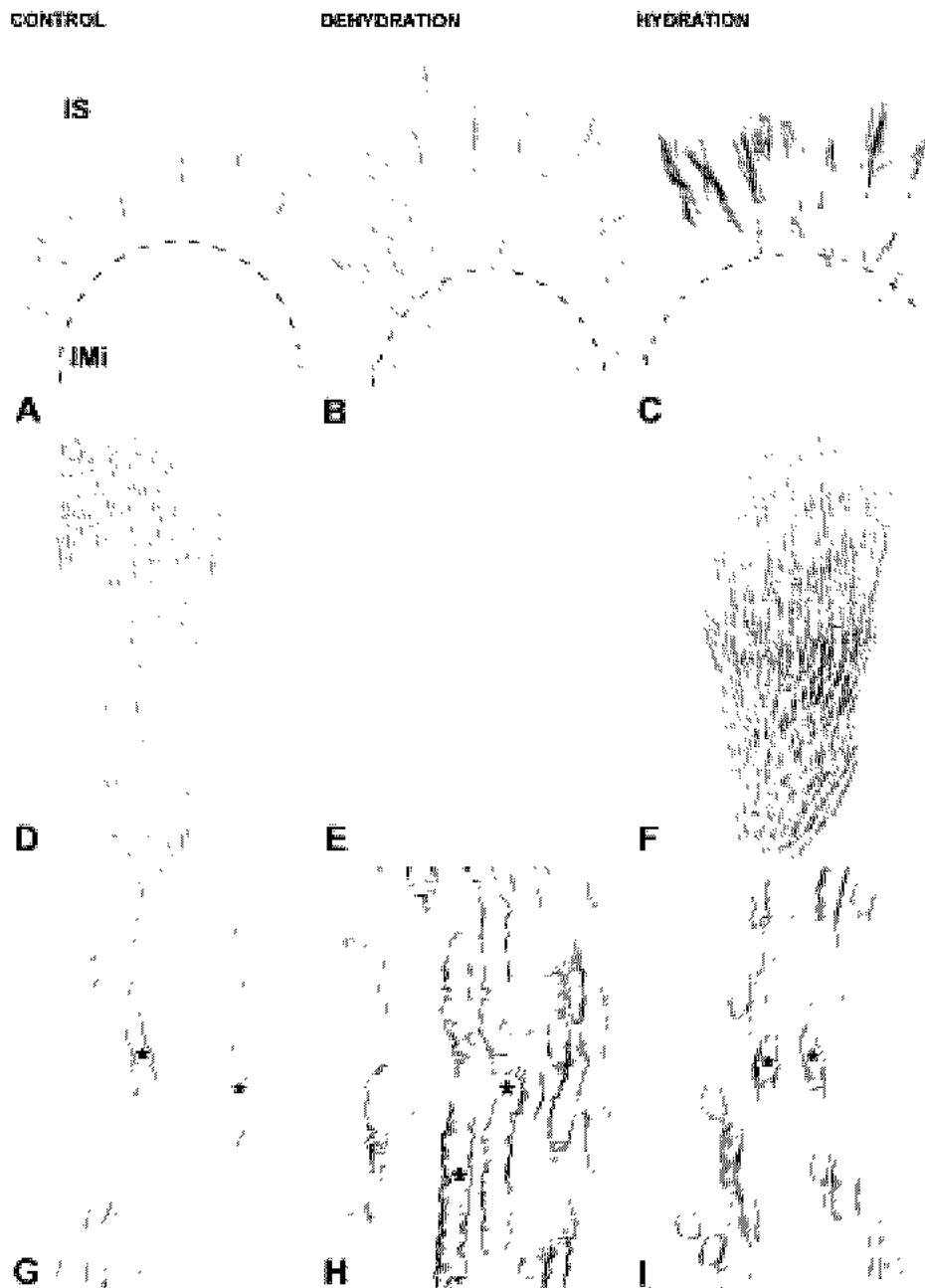


Fig. 8. Light micrographs of the kidneys from control (A, D & G), dehydrated (B, E & H) and water loaded animals (C, F & G) illustrating single immunostaining for UT-A (A-F) and double immunostaining for AQP1 and UT-A (G-I). In dehydrated animals, UT-A2 was up regulated both in the short- and long-loop DTLs (B), whereas UT-A1 was down regulated in the IMCDs (E). In water loaded animals, UT-A2 of the short-loop DTL and UT-A1 in IMCD was up regulated, however UT-A2 in the long-loop DTL was not increased (G-H). UT-A2-positive cells (brown) were markedly increased in number in the AQP1-positive (blue) long-loop DTL (asterisks) of dehydrated animal compare to control and water loaded animals. Magnifications: A-F, $\times 20$; G-I, $\times 200$.

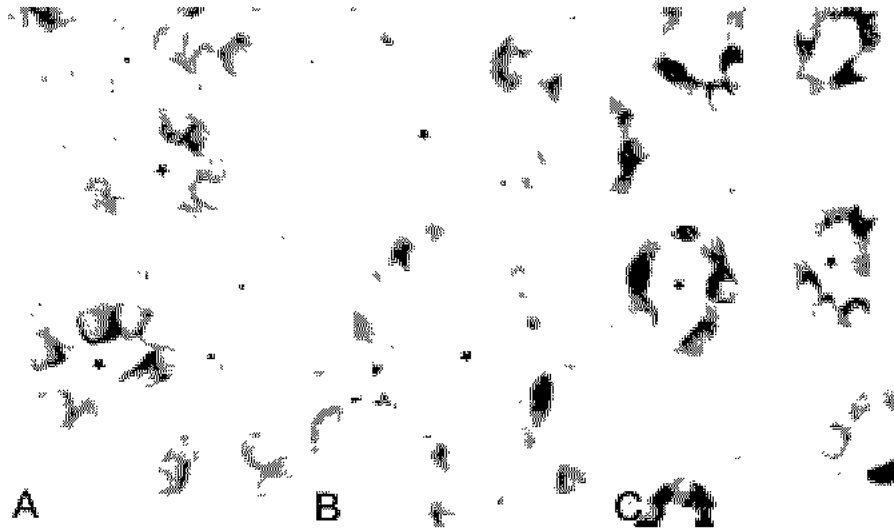


Fig. 9. Light micrographs of the middle parts of renal papillas from control (A), dehydrated (B) and water loaded animals (C) illustrating single immunostaining for UT-A. Note that UT-A1-positive IMCD cells were decreased in number in dehydrated animals (B) but increased in water loaded animals (C). Stars indicate the inner medullary collecting duct. Magnifications: A-C, $\times 480$.

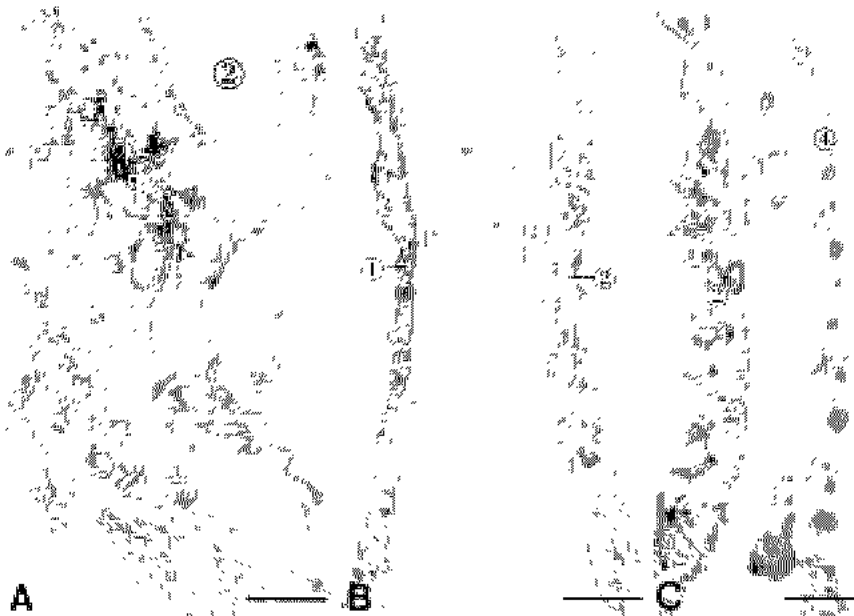


Fig. 10. Transmission electron microscopic localization of UT-A in the outer (A) and inner part (B) of IS, and initial part of inner medulla (C) of rat kidneys from dehydrated animals. UT-A2 was expressed not only in the type I epithelium (①) of the short-loop DTL but also in the type II epithelium (②) of long-loop DTL in all parts of medulla. Note UT-A2 positive Golgi complex (g) in A. No UT-A2 immunoreactivity was observed in the type IV epithelium (④) of the ascending thin limb (C). Bar = $1 \mu\text{m}$.

확인하였다. 면역도금법을 통하여 UT-A2는 세포질 보다는 세포막 특히 기저외측세포막에 주로 위치한다는 새로운 사실을 알게 되었다. 일찍이 Shayskul et al. (1997)은 RT-PCR법을 이용하여, Trinch-Trang-Tan et al. (1998)은 *in situ* hybridization법을 이용하여 UT-A2 mRNA가 속수질내 내림가는부분에 있다고 주장하였으나, 그 동안 면역조직화학법을 이용하여 밝히지 못하였다가 최근 Wade et al. (2000)와 Kim et al. (2002)가 면역조직화학법을 통하여 알게 되었다. 그러나 이들의 연구는 광학현미경수준의 연구로서 바깥수질과 속수질의 경계부위에서 관찰되는 UT-A2-양성세포가 긴-헨레고리의 내림가는부분 중 II형 세포인지 III형 세포인지에 대하여 모르는 상태였으나, 이 실험을 통하여 II형 세포의 특징을 띠고 있음을 확인하였다. 한편 Nielsen et al. (1996)은 AQP1이 짧은-헨레고리의 내림가는부분에는 거의 발견되지 않으나, 긴-헨레고리의 내림가는부분에는 강하게 발견된다고 하였다. 이 실험에서 UT-A와 AQP1 또는 UT-A와 Na/K-ATPase $\alpha 1$ 과의 이중염색법을 시행한 결과 AQP1에 음성인 짧은-헨레고리의 내림가는부분은 UT-A2가 강하게 발견되며 Na/K-ATPase $\alpha 1$ -양성인 굵은오름부분으로 바로 이행됨을 확인하였고, AQP2가 강하게 발견되는 긴-헨레고리의 내림가는부분은 UT-A2가 바깥수질에서는 발견되지 않으나, 속수질의초기부분에서만 발견됨을 확인하였다. 바깥수질과 속수질 초부에 발견하는 UT-A2는 요소 재순환 과정에 매우 중요하며 요농축이 다량으로 필요할 때 증가된다(Bankir et al., 1985; Lemley et al., 1987; Valtin, 1998).

한편 속수질집합관 세포에서 발견되는 UT-A1은 Nielsen et al. (1996)의 보고와는 달리 세포질에 고루 퍼져 있었으며, 자유면세포막이나 기저외측세포막에서는 발견되지 않았다. 이는 아마도 사용한 항체가 Nielsen들이 사용한 항체(L194)와 이 실험에 사용한 항체(L403)가 서로 다르기 때문일 가능성도 있다. 그러나 최근 Inoue et al. (1999)은 vasopressin을 투여시 속수질집합관 세포에서 AQP2를 포함하는 소포와 UT-A1을 포함하는 소포가 서로 다르다고 보고하였다. 즉 Brattleboro 흰쥐에 vasopressin을 투여한 경우 AQP2는 세포질에서 자유면세포막으로 이동하나

UT-A1은 세포질에 그대로 남아 있음을 관찰하였다. 이들의 결과와 이 실험 결과로 보아 UT-A1은 세포막보다는 세포질에 분포하고 있다고 생각한다. 흥미롭게도 같은 부위의 속수질집합관이라 할지라도 UT-A1 양성 세포와 음성세포가 섞여 있었으며, UT-A1-음성 세포의 경우 정상적인 형태를 띠는 세포도 있었으나 일부 세포는 핵이 농축되고 모습이 불규칙하고, 세포질에 소포가 많으며, 세포질의 전자밀도가 높은 것으로 보아 죽어가는 세포로 생각되나 이에 대하여는 앞으로 밝혀야 할 과제로 생각한다.

탈수나 vasopressin 투여시 UT-A2 mRNA (Smith et al., 1995; Promeneur et al., 1996)나 단백질 (Wade et al., 2000)이 증가한다는 보고처럼 이 실험에서 3일간 탈수한 군에서 내림가는부분내의 UT-A2는 증가되어 있었다. 또한 vasopressin 투여시 짧은-헨레고리의 내림가는부분에서의 UT-A2에 대한 면역반응이 증가하며 말단 1/2 부분 뿐 아니라 위쪽 부분에도 면역반응이 나타난다고 Promeneur et al. (1998)와 Wade et al. (2000)가 보고 하였다. 그러나 이 실험에서 탈수시 UT-A2는 짧은-헨레고리의 내림가는부분에서 증가하나, 긴-헨레고리의 내림가는부분에서 보다 현저히 증가되어 있었다. 즉 바깥수질내 긴-헨레고리의 내림가는부분 상피세포인 II형 세포에서는 UT-A2가 관찰되지 않았으나, 탈수군에서는 UT-A2가 발견되었으며 특히 골지복합체에서도 UT-A2에 대한 면역반응이 관찰되어 탈수 상태에서 II형 세포에서 UT-A2의 생성이 증가됨을 알 수 있었다.

일반적으로 vasopressin의 효과는 vasopressin receptor를 통하여 이루어지는 것으로 알려져 있다. 그러나 짧은-헨레고리의 내림가는부분에는 vasopressin V1a receptor가 있는데 반하여 (Arpin-Bott et al., 1999), 긴-헨레고리의 내림가는부분에 vasopressin receptor가 있다는 보고는 아직까지 없다. 따라서 짧은-헨레고리의 내림가는부분의 UT-A2는 vasopressin의 직접적인 영향을 받는데 비하여, 긴-헨레고리의 내림가는부분의 UT-A2는 다른 기전에 의하여 조절되는 것으로 생각된다. 이 실험에서 수분과잉공급군에서 UT-A2에 대한 면역반응이 짧은-헨레고리의 내림가는부분에서는 현저히 증가되어 있는데 반하여 긴-헨레고리의 내림가는부분에서는 감소되어 있어

서로 다른 기전에 의하여 조절되고 있음을 보여주고 있다. 아마도 긴-헨레고리의 내림가는부분의 UT-A2는 주위의 osmolality의 변화에 의해 조절될 가능성이 있다 (Sands et al., 1997; Promeneur et al., 1998; Nakayama et al., 2000).

한편 Smith et al. (1995)와 Shayakul et al. (2000)은 탈수나 vasopressin 투여시 속수질집합관내 UT-A1 mRNA가 감소함을 보고하였다. 이 실험에서는 탈수군에서 속수질집합관에서 UT-A1-양성세포의 수가 현저히 감소하여 거의 관찰할 수 없어 UT-A1 단백질이 줄어들었음을 증명하였다. 그러나 수분공급과잉군에서는 UT-A1이 증가하여 속수질집합관내 거의 모든 세포에서 강한 면역반응성을 관찰할 수 있었다. 면역반응성은 증가되어 있음에도 불구하고 자유면 세포막이나 기저외측 세포막으로의 이동은 관찰되지 않았다. 속수질집합관 상피세포의 세포막을 통한 UT의 이동은 아마도 UT-A3 (Terris et al., 2001)가 관여할 가능성이 있다.

이상의 결과로 보아 흰쥐 콩팥에서 짧은-고리 콩팥단위의 내림가는고리중 말단부위는 항상 UT-A에 대한 면역반응성이 강한 것으로 보아 요소를 재흡수하는 주요장소이며, 긴-고리 콩팥단위의 내림가는고리중 바깥수질과 속수질 경계부위에 위치하는 II형 세포에서의 UT-A 면역반응성은 수분공급량에 따라 현저히 변화하는 것으로 보아 이 부위는 재흡수되는 요소의 양을 능동적으로 조절함으로써 콩팥에서의 소변농축 기전에 중요한 역할을 하리라 생각한다.

속수질내 오스몰농도에 따라 소변의 오스몰농도가 변하는 것을 감안할 때, 높은 소변 오스몰농도를 가진 탈수군의 경우 요소의 사이질로의 흡수가 증가되리라 생각되지만 UT-A는 현저히 감소되어 있었고 수분과잉공급군에서 오히려 증가하였다. 여기에는 다른 종류의 요소 운반체나 혹은 다른 물질이 관여할 것으로 생각되며 앞으로 이에 대해 더 많은 연구가 뒷받침되어야 할 것으로 생각한다.

참 고 문 헌

Arpin Bott MP, Waltisperger E, Freund Mercier MJ, Stoerckel ME: Autoradiographic localization, pharma-

cology and ontogeny of V(1a) vasopressin binding sites in the rat. *Nephron* 83:74-84, 1999.

Bankir L: Urea and the kidney. In: Brenner BM, ed, *The Kidney*, pp. 571-606, Saunders, Philadelphia PA, 1996.

Bankir L, C de Rouffignac. Urinary concentrating ability: insights from comparative anatomy. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 249:R643-666, 1985.

Chou CL, Knepper MA: In vitro perfusion of chinchilla thin limb segments: urea and NaCl permeabilities. *Am J Physiol Renal Physiol* 264:F337-343, 1993.

Couriaud C, Ripoche P, Rousset G: Cloning and functional characterization of a rat urea transporter: Expression in the brain. *Biochim Biophys Acta* 1309:197-199, 1996.

Edwards BR, Mendel DB, LaRoche FT Jr, Stern P, Valtin H: Postnatal development of urinary concentrating ability in rats: Changes in renal anatomy and neurohypophysial hormones. In: A. Spitzer. NY, ed, *The Kidney During Development, Morphology and Function*, pp. 233-239, Masson, NY, 1989.

Fenton RA, Howorth A, Cooper GJ, Meccariello R, Morris ID, Smith CP: Molecular characterization of a novel UT-A urea transporter isoform (UT-A5) in testis. *Am J Physiol Cell Physiol* 279:C1425-1431, 2000.

Hediger MA, Smith CP, You G, Lee WS, Kanai Y, Shayakul C: Structure, regulation, and physiological roles of urea transporters. *Kidney Int* 49:1615-1623, 1996.

Inoue T, Terris J, Ecelbarger CA, Chou CL, Nielsen S, Knepper MA: Vasopressin regulates apical targeting of aquaporin 2 but not of UT1 urea transporter in renal collecting duct. *Am J Physiol Renal Physiol* 276:F559-566, 1999.

Karakashian A, Timmer RT, Klein JD, Gunn RB, Sands JM, Bagnasco SM: Cloning and characterization of two new isoforms of the rat kidney urea transporter: UT-A3 and UT-A4. *J Am Soc Nephrol* 10:230-237, 1999.

Kim YH, Kim DU, Han KH, Jung JY, Sands JM, Knepper MA, Madsen KM, Kim J: Expression of urea transporters in the developing rat kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 282:F530-540, 2002.

Knepper MA, Rector FC Jr.: Urine concentration and dilution. In: *The Kidney* (5th ed), Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, pp. 532-570, 1996.

Lemley KV, Kriz W. Cycles and separations: the histopathology of the urinary concentrating process. *Kidney Int* 31:

- 538-548, 1987.
- Nakayama Y, Peng T, Sands JM, Bagnasco SM: The ToneE/ToneBP pathway mediates tonicity responsive regulation of UT A urea transporter expression. *J Biol Chem* 275 : 38275-38280, 2000.
- Nielsen S, Terris J, Smith CP, Hediger MA, Ecelbarger CA, Knepper MA: Cellular and subcellular localization of the vasopressin regulated urea transporter in rat kidney. *Proc Natl Acad Sci USA* 93 : 5495-5500, 1996.
- Olives B, Neau P, Bailly P, Hediger MA, Rousset G, Carton JP, Ripoche P: Cloning and functional expression of a urea transporter from human bone marrow cells. *J Biol Chem* 269 : 31649-31652, 1994.
- Promeneur D, Bankir L, Hu MC, Trinh Trang Tan MM: Renal tubular and vascular urea transporters: influence of antidiuretic hormone on messenger RNA expression in Brattleboro rats. *J Am Soc Nephrol* 9 : 1359-1366, 1998.
- Promeneur D, Rousset G, Bankir L, Bailly P, Carton JP, Ripoche P, Trinh Trang Tan MM: Evidence for distinct vascular and tubular urea transporters in the rat kidney. *J Am Soc Nephrol* 7 : 852-860, 1996.
- Sands JM, Timmer RT, Gunn RB: Urea transporters in kidney and erythrocytes. *Am J Physiol Renal Physiol* 273 : F321-339, 1997.
- Shayakul C, Knepper MA, Smith CP, DiGiovanni SR, Hediger MA: Segmental localization of urea transporter mRNAs in rat kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 272 : F654-660, 1997.
- Shayakul C, Smith CP, Mackenzie HS, Lee WS, Brown D, Hediger MA: Long term regulation of urea transporter expression by vasopressin in Brattleboro rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 278 : F620-627, 2000.
- Shayakul C, Steel A, Hediger MA: Molecular cloning and characterization of the vasopressin regulated urea transporter of rat kidney collecting ducts. *J Clin Invest* 98 : 2580-2587, 1996.
- Smith CP, Lee WS, Martial S, Knepper MA, You G, Sands JM, Hediger MA: Cloning and regulation of expression of the rat kidney urea transporter (rUT2). *J Clin Invest* 96 : 1556-1563, 1995.
- Star RA, Knepper MA: The vasopressin regulated urea transporter in renal inner medullary collecting duct. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol* 259 : F393-F401, 1990.
- Terris J, Ecelbarger CA, Sands JM, Knepper MA: Long term regulation of renal urea transporter protein expression in rat. *J Am Soc Nephrol* 9 : 729-736, 1998.
- Terris J, Knepper MA, Wade JB: UT A3: localization and characterization of an additional urea transporter isoform in the IMCD. *Am J Physiol Renal Physiol* 280 : F325-332, 2001.
- Trinh Trang Tan M M, Bankir L: Integrated function of urea transporters in the mammalian kidney. *Exp Nephrol* 6 : 471-479, 1998.
- Tsakaguchi H, Shayakul C, Berger UV, Tokui T, Brown D, Hediger MA: Cloning and characterization of the urea transporter UT3: localization in rat kidney and testis. *J Clin Invest* 99 : 1506-1515, 1997.
- Valtin H: Sequestration of urea and nonurea solutes in renal tissues of rats with hereditary hypothalamic diabetes insipidus: effect of vasopressin and dehydration on the countercurrent mechanism. *J Clin Invest* 45 : 337-345, 1966.
- Wade JB, Lee AJ, Liu J, Ecelbarger CA, Mitchell C, Bradford AD, Terris J, Kim GH, Knepper MA: UT A2: a 55 kDa urea transporter in thin descending limb whose abundance is regulated by vasopressin. *Am J Physiol Renal Physiol* 278 : F52-62, 2000.
- Xu Y, Olives B, Bailly P, Fischer E, Ripoche P, Ronco P, Carton JP, Rondeau E: Endothelial cells of the kidney vasa recta express the urea transporter HUT11. *Kidney Int* 51 : 138-146, 1997.
- You G, Smith CP, Kanai Y, Lee WS, Stelzner M, Hediger MA: Cloning and characterization of the vasopressin regulated urea transporter. *Nature* 365 : 844-847, 1993.

< 국문초록 >

포유동물의 콩팥에서 오줌 농축기전에 중요한 요소(urea)의 이동에 관여하는 요소운반체(urea transporter, UT)에는 요새판에서 발견되는 요소운반체인 UT A와 직혈구에서 발견되는 요소운반체인 UT B가 있다. 최근 UT A에는 UT A1, UT A2, UT A3, UT A4, UT A5 등 5종류가 있음이 밝혀졌다. 이 연구에서는 콩팥내 요새판 세포에서 UT A1, UT A2 및 UT A4를 표지하는 것으로 알려진 UT A(L403)의 분포를 밝히고자 하였다.

Sprague Dawley계 흰쥐(200~250 g)의 콩팥을 대상으로 정상군, 탈수군(식수를 3일간 공급하지 않은 군) 및 수분과잉공급군(3%의 sucrose를 섞은 식수를 3일간 자유롭게 먹었다)의 3군으로 나누었다. 콩팥은 복대동맥을 통하여 2% paraformaldehyde lysine periodate (PLP) 또는 8% paraformaldehyde 용액으로 10분간 관류 고정하였다. 콩팥조직절편은 UT A에 대한 토끼 다클론항체를 이용하여 포매전면염색법을 이용한 과산화효소법과 면역도금법을 시행한 후 광학 및 전자현미경으로 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

흰쥐 콩팥에서 UT A1은 속수질집합관의 세포질에 산재하여 분포하고 있었으며, UT A2는 짧은 헨레고리의 내림가는부분 말단 1/2 부분의 상피세포(I형 세포)와 속수질 초기부분에 있는 긴 헨레고리의 내림가는부분

상피세포(II형 세포)의 세포막에 분포하고 있었다. 속수질집합관내 UT A1은 탈수군에서는 감소하였으며, 수분과잉공급군에서는 증가하였다. 짧은 헨레고리의 내림가는부분에 있는 UT A2는 탈수군과 수분과잉공급군 모두에서 증가되 수분과잉공급군에서 더 증가하였다. 긴 헨레고리의 내림가는부분 중 속수질 초기부분에서 발견되는 UT A2의 면역반응성은 탈수군에서 현저히 증가하였으나, 수분과잉공급군에서는 정상군에서처럼 약하게 발견되었다.

이상의 연구 결과로 보아 흰쥐 콩팥에서 UT A1은 속수질집합관의 세포질에 UT A2는 짧은 헨레고리와 긴 헨레고리의 내림가는부분 상피세포의 세포막에 분포하고 있으며 서로 다른 기전에 의하여 조절되고 있는 것으로 생각된다.