

저칼륨혈증 흰쥐 신장에서 Carbonic anhydrase II 발현 증가

이용찬¹, 정채용^{1,2}, 남광일¹, 이승원¹, 배춘상¹, 김백윤¹, 박성식¹, 안규윤^{1,2}

¹전남대학교 의과대학 해부학교실, ²전남대학교 기초의과학연구소
(2011년 3월 8일 접수, 2011년 3월 19일 수정접수, 2011년 3월 23일 게재승인)

간추림: 산-염기 평형장애나 전해질 불균형은 신요세관에서 HCO_3^- 재흡수가 증가되거나 감소되는 것과 연관이 있다고 알려져 있다. 칼륨제한시 대사성 알칼리증을 유발시키고 이와 관련된 Na/H exchanger와 Na/HCO_3^- cotransporter에 대한 연구는 잘 알려져 있지만 저칼륨혈증시 carbonic anhydrase에 관한 연구는 없다. 본 연구는 흰쥐 신장에서 칼륨제한 식이 시기에 따라 carbonic anhydrase II의 신장내 발현 및 분포의 변화를 Western 분석과 면역조직화학적 방법으로 관찰하였다.

Western 분석 소견에서 carbonic anhydrase II 단백질은 30 kDa 정도이고 정상식이 군에서 상당량 발현되었으며 칼륨제한 식이 군에서는 정상식이 군에 비해 약간 증가하는 경향이였다. 면역조직화학 소견에서 carbonic anhydrase II 단백질은 겔질집합관, 바깥속질집합관 및 속속질집합관의 상 1/3에서만 발현되었다. 면역반응성은 속속질 집합관으로 갈수록 감소하였다. 집합관에서의 면역반응성은 개재세포가 강했으며 주세포는 미약하였다. 칼륨제한 식이 군에서 면역반응 부위는 정상식이 군과 차이가 없었다. 면역반응성은 겔질집합관 특히 일부 개재세포와 주세포에서 감소하였고 바깥속질 바깥줄무늬층 집합관에서는 변화가 없었다. 이외는 대조적으로 바깥속질 속줄무늬층 집합관과 속속질집합관 상 1/3에서는 현저히 증가하였다.

이상의 소견은 저칼륨혈증시 신장 집합관에서의 carbonic anhydrase II 단백질은 부위에 따라 발현양상이 다름을 암시하였다.

찾아보기 낱말: 저칼륨혈증, 집합관, Carbonic anhydrase II, Western blot analysis, 면역조직화학

서 론

신장은 혈액의 pH 조절에 중요한 역할을 한다. 즉 세관에서 일어나는 HCO_3^- 흡수, H^+ 과 NH_4^+ 의 배설을 통하여 혈액의 산성화가 방지된다. 신장에서 정상적인 요산성화의 기전은 혈청 HCO_3^- 농도를 조절함으로써 산-염기 균형을 유지할 수 있는데, 이는 사구체에서 여과된 HCO_3^- 가 재흡수 되어서 산의 배설을 신장 세관세포에서 조절하고 있는 것이다. 산-염기 평형장애나 전해질 불균형은 신요세관에서 HCO_3^- 재흡수가 증가되거나 감소되는 것과 관련이 있다(Biagi와 Sohtell 1986, Capasso 등 1987, Soleimani 등 1987, Soleimani와 Singh

1995, Soleimani와 Burnham 2000, Ryu 등 2005).

체내 칼륨이온 균형은 신장에서의 칼륨이온 배설조절과 소화관에서의 칼륨이온 흡수조절에 의해서 이루어지지만 거의 대부분은 신장이 담당한다. 즉 칼륨이온은 신원을 따라서 재흡수와 분비의 일련의 과정을 거치면서 조절되는데 여과된 칼륨이온의 대부분은 여과액이 먼쪽곱슬세관에 도달하기 전에 재흡수되고 요중 칼륨이온 배설의 최종적인 조절은 집합관에서 이루어진다. 정상 상태에서 칼륨이온은 연결세관과 겔질집합관에서 분비되고 속질집합관에서 일부 재흡수된다. 이와는 대조적으로 칼륨이온 제한시 겔질집합관에서의 칼륨 순분비는 상당히 감소되거나 없어지는 반면 바깥속질 속줄무늬층 집합관과 속속질집합관에서 칼륨이온 재흡수가 촉진된다고 한다(Linas 등 1979, Backman와 Hayslett 1983, Wright와 Giebisch 1985, Ryu 등 2005).

칼륨 결핍은 흰쥐와 사람에서 대사성 알칼리증을 유발하고(Rector 등 1964, Kunau 1968, Jones 등, 1982,

*본 연구는 한국연구재단 기초과학연구사업 기초의과학연구소 지원비(안규윤, R13-2002-013-03003)지원에 의해서 수행되었으며 지원에 감사드립니다.

교신저자: 안규윤(전남대학교 의과대학 해부학교실)
전자우편: kyahn@jnu.ac.kr

Capasso 등 1987, Hernandez 등 1987) 이러한 대사성 알칼리증의 유지는 HCO_3^- 재흡수 증가에 의해서 이루어진다. 이와 관련된 기전은 기능적인 연구로 토리족세관 침부세포막 sodium hydrogen exchanger-3 (NHE-3)와 기저외세포막 sodium bicarbonate cotransporter-1 (NBC-1) 활성의 증가에 의한다고 하였다(Soleimani 등 1990, Amlal 등 2000, Kim 등 2004). 그러나 Laghmani 등(2001)과 Wang 등(1997)은 칼륨 결핍때 신장의 결질과 먼쪽곶은세관에서 NHE-3 mRNA의 발현은 대조군과 차이가 있었으나, 단백 발현은 대조군과 차이는 없었다고 하였고, Amlal 등(2000)은 NBC-1 mRNA는 대조군에 비해 신장 결질, 바깥속질 속줄무늬층, 먼쪽곶은세관, 신장유두에서 증가되었다고 보고하였다. 또한, NBC-1은 토리족세관에서만 발현되는 것으로 알려져 있어 Amlal 등(2000)의 분자생물학적 보고와는 차이가 있었다. 이와 같이 저칼륨혈증시 대사성 알칼리증을 일으키는 기전은 NHE-3와 NBC-1 만으로는 설명하기 곤란하고 일부 carbonic anhydrase (CA)도 관여될 것으로 생각된다.

이에 본 연구는 흰쥐 신장에서 칼륨제한 식이 기간에 따른 HCO_3^- 재흡수와 관련된 CA II의 신장내 발현 및 분포의 변화를 Western 분석과 면역조직화학적 방법으로 관찰하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험 동물

본 실험에 사용된 동물은 체중 230 g 내외의 성숙 Sprague-Dawley계 숫컷 흰쥐 25마리로 다섯 군으로 구분하였다. 제1군은 정상식이(150 mEq K^+ /kg, TD88082, Harlan Teklad, USA)를, 제2군은 칼륨제한 식이(potassium-free diet, TD88081, Harlan Teklad, USA) 3일, 제3군은 칼륨제한 식이 1주, 제4군은 칼륨제한 식이 2주, 제5군은 칼륨제한 식이 3주로 식이적응을 시켰다. 칼륨제한식이 군은 먹이 섭취가 변화될 것으로 여겨져 날마다 적은 양을 먹은 군의 양으로 먹이를 조절하였다.

2. 단백 분리와 Western 분석

칼륨제한 식이 기간에 따른 신장 조직을 적출하여 액체질소에 담가 급속 동결시킨 후, 조직의 일부를 Nonidet P-40 buffer (150 mM NaCl, 1 mM benzamidine, 50 mM Tris pH 8.0, Trypsin inhibitor 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 5 mM EDTA pH 8.0, 1 mM PMSF, NP-40 1%)에 넣고 얼음 속에서

glass homogenizer로 분쇄하여 균질액을 만들어 얼음 속에 30분간 방치하였다. 균질액은 3,000 rpm으로 15분간 원심시켜 상층액을 분리한 다음 다시 15,000 rpm으로 10분간 원심하고 상층액을 aliquot로 나누어 -70°C 에 보관하였다. 단백 농도는 bovine serum albumin을 기준으로 spectrophotometer로 정량화하였다. 추출한 총 단백 40 μg 을 10% polyacrylamide gel에 전기 영동한 다음 nitrocellulose membrane에 4°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 CA II polyclonal antibody (Biogenesis, UK, 1 : 5,000)에 2시간 실온에서 반응시켰다. 다시 TBS-T로 10분씩 3번 수세하고 peroxidase conjugated donkey anti-sheep IgG (Santa Cruz, USA 1 : 2,000)로 부치하였다. TBS-T로 3번 수세하고 발색제인 ECL용액 (Amersham, USA)에 5분간 반응시킨 후 시간 별로 현상하였다.

3. 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_2HPO_4 , 1.4 mM KH_2PO_4)과 4% paraformaldehyde 고정액으로 관류 고정시켰다. 상기 고정액에 3시간 동안 냉고정한 후 PBS로 3회 세척하고 ethanol로 탈수과정을 거친 후 paraffin에 포매하였다. 포매된 조직은 회전식 절편기로 4 μm 절편을 얻어 면역조직화학 반응 실험을 행하였다. 면역조직화학 반응에 사용된 일차항체는 CA II polyclonal antibody (Biogenesis, UK, 1 : 2,400)였다. 면역조직화학 염색은 Vector ABC Kit (Vector Laboratories, USA)를 이용하였다. 즉, 탈 paraffin 과정을 거친 절편은 내재성 peroxidase 활성을 제거하기 위해 60% methanol에 녹인 3% H_2O_2 에 30분 부치시킨 다음 PBS로 세척하였다. 10% normal donkey serum으로 30분 반응시켜 주변부의 비특이적 반응을 억제하고 일차항체에 4°C 에서 14~16시간 반응시켰다. 반응시킨 조직은 PBS로 5분씩 3번 세척하고 biotinylated anti-sheep IgG에 30분간 부치시킨 다음 avidin-biotin conjugate에 30분간 반응시켰다. 반응이 끝난 절편은 PBS로 세척 후 3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride 로 7분간 발색시킨 다음 탈수과정을 거친 후 permount로 봉입하여 광학현미경으로 관찰하였다.

결 과

1. Carbonic anhydrase II 단백질의 상대적 정량분석

CA II 단백질은 30 kDa 정도이고 정상식이 군에서 상당량 발현되었으며 칼륨제한 식이 군에서는 정상식이 군에 비해 약간 증가하는 경향이였다(Fig. 1).

2. 면역조직화학 소견

CA II 단백질에 대한 신장내 발현 분포를 알아보기 위해서 면역조직화학 실험을 실시하였다. 일차항체를 사용하지 않은 대조염색에서는 정상식이 군과 칼륨제한

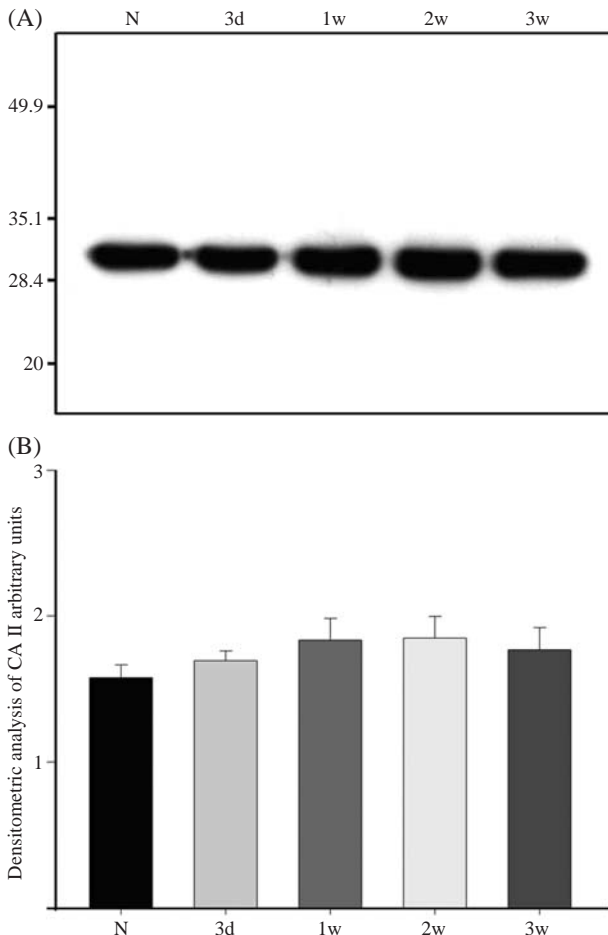


Fig. 1. (A) Protein expression of Carbonic anhydrase II to changes in dietary potassium. CA II protein was abundantly expressed in normal group and its molecular mass was ~30 kDa. CA II expression of potassium-depleted groups was slightly increased than that of normal group. (B) Densitometric analysis of Western blot. N: normal; 3d: K-depleted 3 day; 1w: K-depleted 1 week; 2w: K-depleted 2 weeks; 3w: K-depleted 3 weeks.

식이 군 모두에서 면역반응성을 관찰할 수 없었다(data not shown).

정상식이 군에서 CA II 단백질은 겔질집합관, 바깥속질 집합관 및 속속질집합관의 상 1/3에서만 발현되었다. 면역반응성은 속속질집합관으로 갈수록 감소하였다. 집합관에서의 면역반응성은 개재세포가 강했으며 주세포는 미약하였다(Figs. 2A, 3A, 4A, 5A). 칼륨제한 식이 군에서 면역반응 부위는 정상식이 군과 차이가 없었다. 면역반응성은 겔질집합관에서 감소하였으며 특히 일부 개재세포와 주세포에서 감소하였다. 이와 같은 소견은 칼륨제한 식이 3주째에 현저하였다(Fig. 2B~2E). 바깥속질 바깥줄무늬층 집합관에서는 칼륨제한 식이 시기에 따른 변화는 관찰할 수 없었다(Fig. 3B~3E). 이와는 대조적으로 바깥속질 속줄무늬층 집합관과 속속질집합관 상 1/3에서의 면역반응성은 증가하였으며(Figs. 4B~4E, 5B~5E) 특히 개재세포의 크기와 숫적 증가가 관찰되는 칼륨제한 식이 2주와 3주째에 현저하였다(Figs. 4D, 4E, 5D, 5E).

고 찰

Carbonic anhydrase (CA)는 아연을 함유한 금속성효소로 CO_2 와 HCO_3^- 의 가수 및 탈수 반응($\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{H}^+ + \text{HCO}_3^-$)을 촉매하여 호흡, 산염기평형, 이온수송, 골재 흡수 등과 같은 다양한 생리학적 및 생물학적 활동에 관여하며 인체의 거의 모든 조직에 존재한다고 한다. 또한 현재까지 CA는 10여 종의 동위효소가 알려져 있으며 크게 세포내 CA와 세포외 CA로 분류된다. 세포내 CA는 세포질에 존재하는 CA I, II, III와 사립체에 존재하는 CA V, 세포내 존재부위가 불명인 CA VII이 있다. 세포외 CA는 막에 결합된 CA IV, 분비형인 CA VI 및 막통과형인 CA IX, XII 등이 있다 하였다(Sly와 Hu 1995, Nishimori와 Onishi 2001, Lee 등 2004).

본 연구는 정상 및 칼륨제한 식이 기간에 따른 흰쥐 신장에서 CA II 단백질의 발현의 분포와 양적인 변화를 Western 분석과 면역조직화학 방법을 통해 관찰한 것이다. Western 분석 결과 CA II 단백질은 30 kDa 정도이고 정상식이 군에서 상당량 발현되었으며 칼륨제한 식이 군에서는 정상식이 군에 비해 약간 증가하는 경향을 보였다. 정상식이 군의 면역조직화학 소견에서 CA II 단백질은 겔질집합관, 바깥속질집합관 및 속속질집합관의 상 1/3에서만 발현되었고 면역반응성은 속속질집합관으로 갈수록 감소하였다. 집합관에서의 면역반응성은

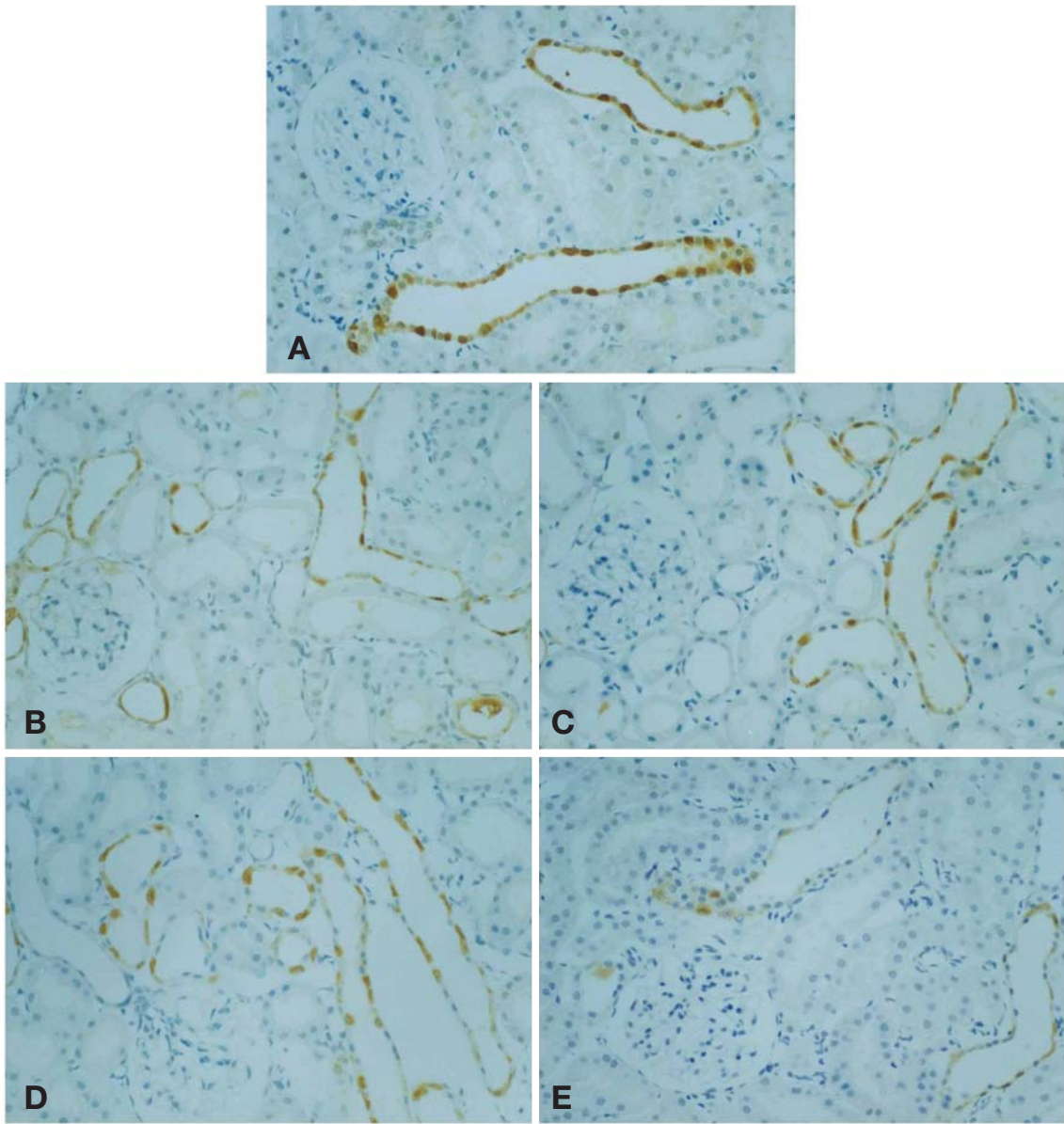


Fig. 2. Expression of CA II in the renal cortex of control (A), K-depleted 3 day (B), K-depleted 1 week (C), K-depleted 2 weeks (D) and K-depleted 3 weeks (E) groups. In control group, immunoreactivity of CA II was detected in cortical collecting duct. Signal intensity was prominent in the intercalated cells and weak in the principal cells of the cortical collecting ducts. In K-depleted groups, the pattern of cellular labeling of CA II protein was identical to that of normal group, but the signal intensity was decreased. $\times 200$

개재세포가 강했으며 주세포는 미약하였다. 이와 같은 소견은 이전 연구자들의 면역조직화학 소견과 일치하였다 (Brown 등 1983, Holthofer 등 1987, Kim 등 1990).

칼륨제한 식이 군의 면역조직화학 소견에서 면역반응 부위는 정상식이 군과 차이가 없었으나 면역반응성은 결질집합관에서 감소하였으며 특히 일부 개재세포와 주세포에서 감소하였다. 이와는 대조적으로 바깥속질 속줄무늬층 집합관과 속속질집합관 상 1/3에서의

면역반응성은 상당히 증가하였으며, 바깥속질 바깥줄무늬층 집합관의 변화는 관찰할 수 없었다. 결질집합관에서의 감소보다는 바깥속질 속줄무늬층 집합관과 속속질집합관에서의 증가가 칼륨제한시 CA II 단백질이 약간 증가하였다는 Western 분석 소견을 뒷받침해 줄 수 있을 것으로 생각되며 또한 저칼륨혈증시 신장 집합관에서의 CA II 단백질은 부위에 따라 발현양상이 다를 수 있다. 그러나 신장 부위별 발현양상의 차이는 결질,

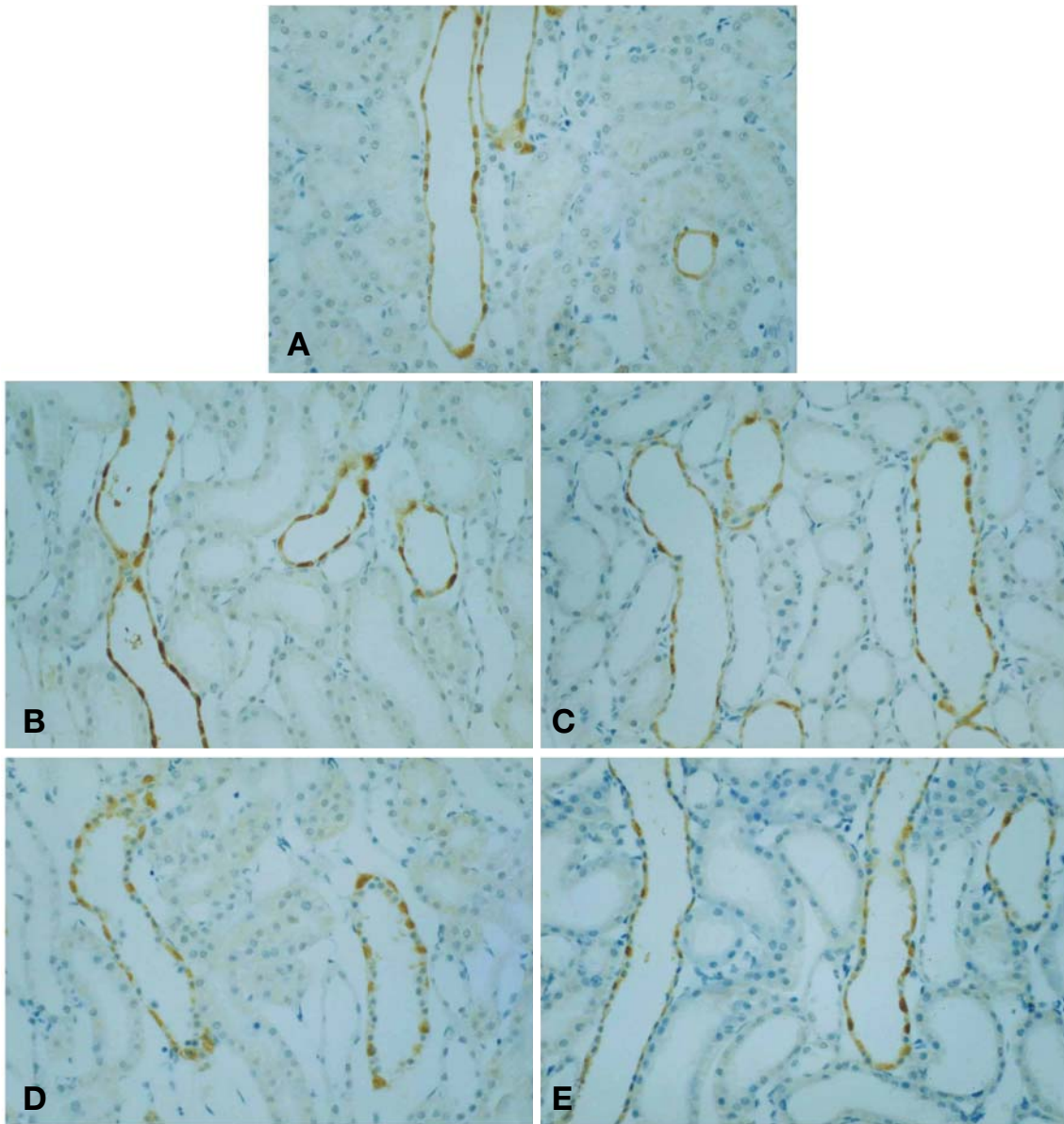


Fig. 3. Expression of CA II in the outer stripe of outer medulla of control (A), K-depleted 3 day (B), K-depleted 1 week (C), K-depleted 2 weeks (D) and K-depleted 3 weeks (E) groups. In control group, immunoreactivity of CA II was detected in the outer stripe of outer medullary collecting duct. In K-depleted groups, the pattern and signal intensity of cellular labeling of CA II protein was identical to that of normal group. $\times 200$

바깥속질 및 속속질 별로 Western 분석 실험이 추후 요구된다.

칼륨 결핍은 대사성 알칼리증을 유발하고(Rector 등 1964, Kunau 등 1968, Jones 등 1982, Capasso 등 1987, Hernandez 등 1987) 이의 유지는 HCO_3^- 재흡수 증가에 의해서 이루어지는데 이와 관련된 기전은 토리쪽세관 침부세포막 NHE-3와 기저외세포막 NBC-1 활성의 증가에 의한다고 하였다(Soleimani 등 1990, Amlal 등 2000).

또한 Kim 등(2004)은 저칼륨혈증시 NHE-3와 NBC-1 단백질이 토리쪽세관에서 정상식이 군보다 유의한 증가를 보인다고 하여 상기 기전을 뒷받침 하였다. 그러나 정상 상태에서 여과된 HCO_3^- 의 재흡수는 토리쪽세관에서 80~90%가 이루어지며 나머지는 먼쪽세관과 집합관에서도 이루어지고 또한 HCO_3^- 대사에 CA 효소가 관련되기 때문에 저칼륨혈증시 CA 효소의 변화도 예상된다.

집합관을 구성하는 세포는 주세포와 개재세포로 나누

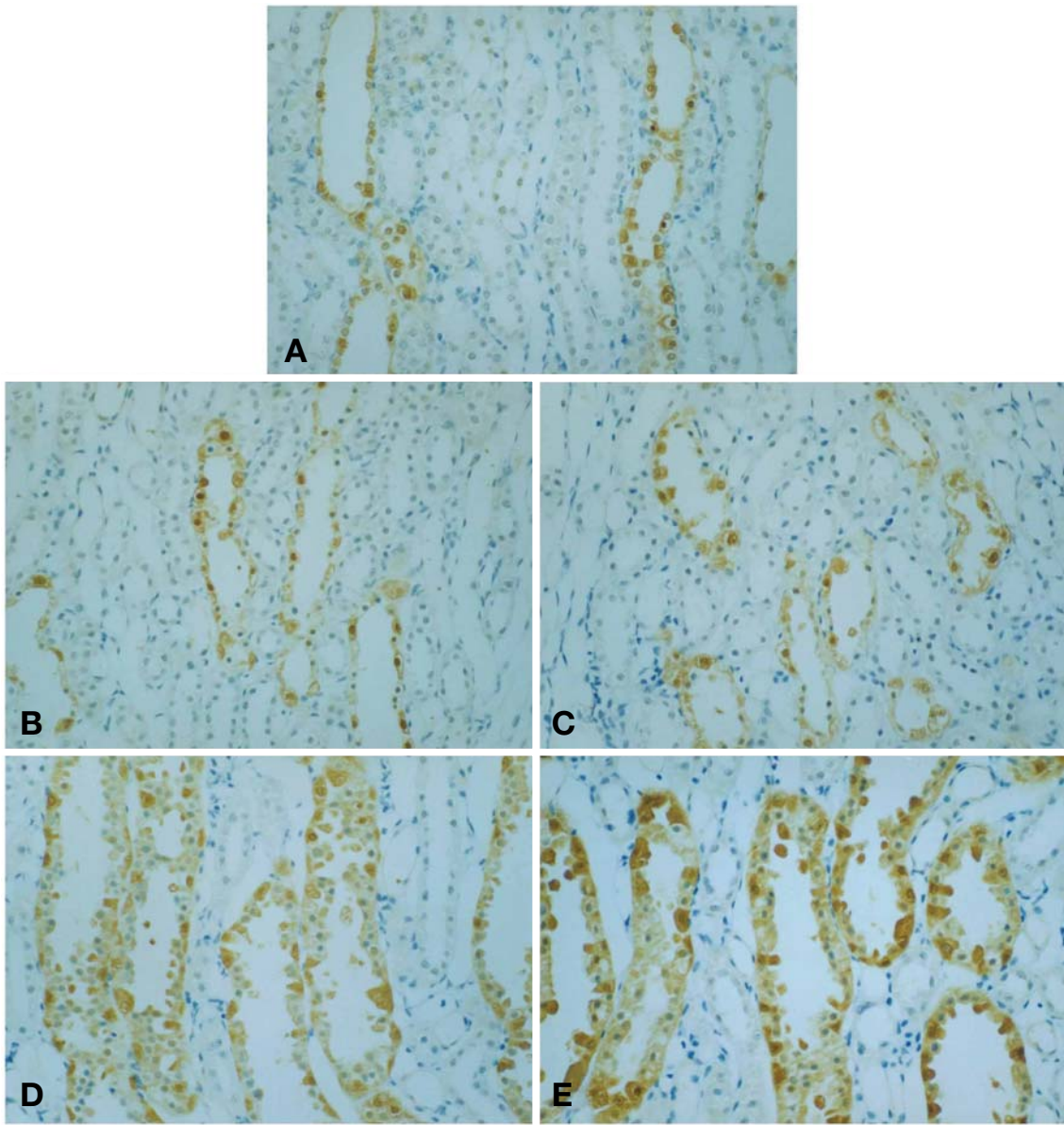


Fig. 4. Expression of CA II in the inner stripe of outer medulla of control (A), K-depleted 3 day (B), K-depleted 1 week (C), K-depleted 2 weeks (D) and K-depleted 3 weeks (E) groups. In control group, immunoreactivity of CA II was detected in the inner stripe of outer medullary collecting duct. In K-depleted groups, the pattern of cellular labeling of CA II protein was identical to that of normal group, but the signal intensity was markedly increased. $\times 200$

고 다시 개재세포는 A형과 B형 개재세포로 분류된다. A형 개재세포는 산(H^+) 분비에 관여하여 첨부세포막에 H-ATPase, 기저외세포막에 chloride-bicarbonate exchanger 및 세포질에 CA II를 가지고 있고, B형 개재세포는 세포질과 기저세포막에 H-ATPase, 첨부세포막에 chloride-bicarbonate exchanger 및 세포질에 약간의 CA II를 가지고 있다 하였다(Brown 등 1988, Verlander 등 1988, Alper 등, 1989). 본 연구 소견에서 저칼륨혈증시 면역

반응성이 바깥속질 속줄무늬층 집합관과 속속질집합관 상 1/3의 개재세포에서 증가하였는데 이 부위에는 B형 개재세포의 수가 매우 적고 A형 개재세포가 대다수여서 내강에서 흡수된 CO_2 가 CA II에 의해 HCO_3^- 로 되어 혈액으로 재흡수되고 알칼리혈증을 유지하는데 관여할 것으로 생각되었다. 이 부위의 CA II에 의해 만들어진 H^+ 는 저칼륨혈증시 H/K-ATPase에 의해 내강으로 분비되고 대신 K^+ 을 재흡수 할 것으로 추측된다. 이

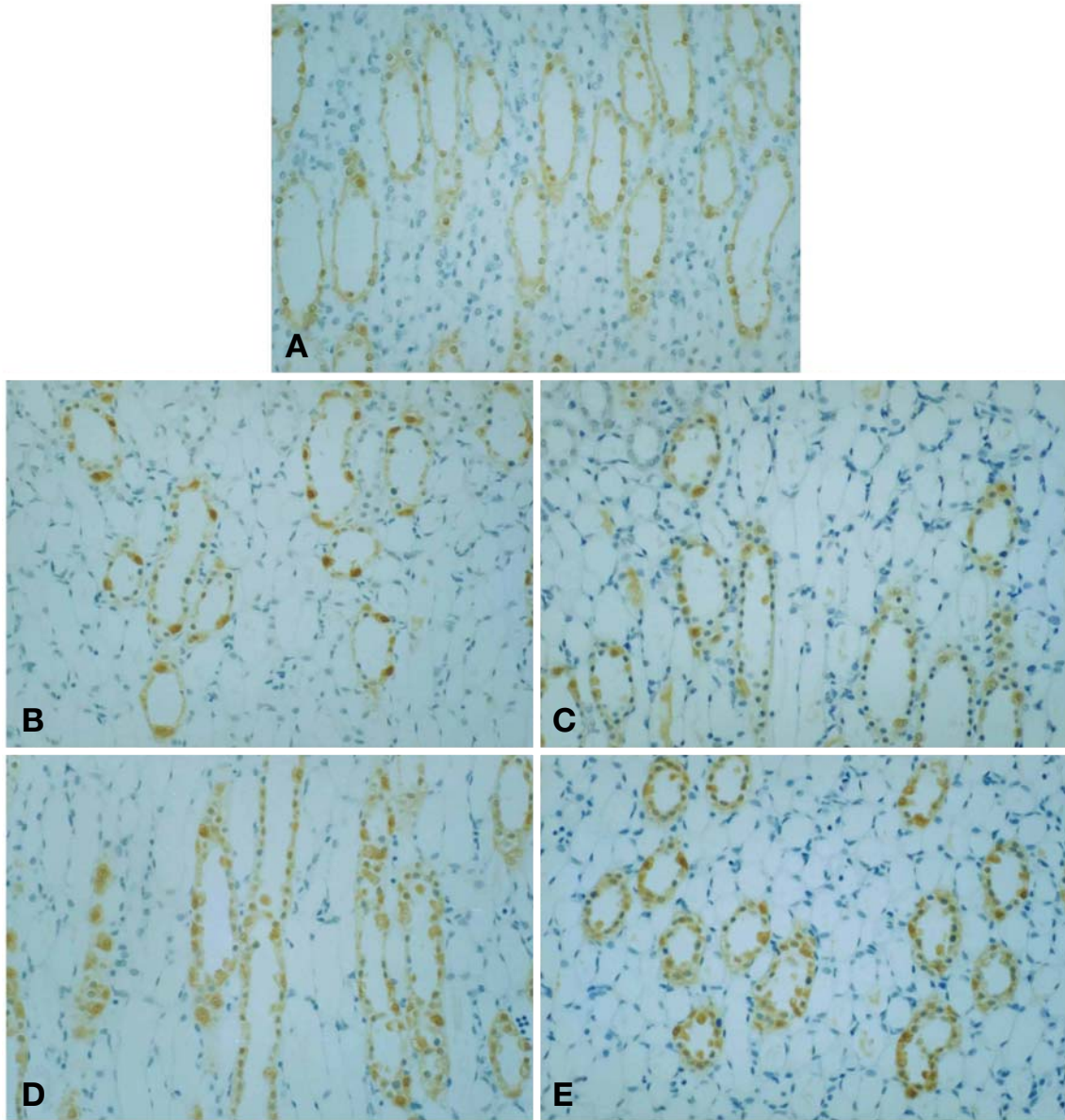


Fig. 5. Expression of CA II in the proximal portion of inner medulla of control (A), K-depleted 3 day (B), K-depleted 1 week (C), K-depleted 2 weeks (D) and K-depleted 3 weeks (E) groups. In control group, immunoreactivity of CA II was weakly detected in the inner medullary collecting duct cells. In K-depleted groups, the pattern of cellular labeling of CA II protein was identical to that of normal group, but the signal intensity was increased. $\times 200$

와 같은 추측은 칼륨제한시 바깥속질집합관 속줄무늬층과 속속질집합관 상부에서의 개재세포의 크기나 수가 증가한다는 보고(Stetson 등 1980, Elger 등 1992)와 H/K-ATPase (Zhang 등 1995, Ahn 등 1996)가 증가한다는 보고를 감안하면 설명될 수 있다.

이상의 결과로 저칼륨혈증시 신장 집합관에서의 Carbonic Anhydrase II 단백질은 부위에 따라 발현양상이 다름을 암시하고, 바깥속질 속줄무늬층 집합관과 속속질

집합관 상부에서의 CA II 단백질 발현 증가가 HCO_3^- 재흡수를 향진시켜 대사성 알칼리증을 유지하는데 일부 관여할 것으로 생각되었다.

참고 문헌

Ahn KY, Park KW, Kim KK, Kone BC : Chronic hypokalemia

- enhances expression of the H/K-ATPase α_2 subunit gene in renal medulla. *Am J Physiol* 271: F314-F321, 1996.
- Alper SL, Natale J, Gluck S, Lodish HF, Brown D : Subtypes of intercalated cells in rat kidney collecting duct defined by antibodies against erythroid band 3 and renal vacuolar H⁺-ATPase. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 5429-5433, 1989.
- Amlal H, Habo K, Soleimani M : Potassium deprivation upregulates expression of renal basolateral Na⁺-HCO₃⁻ cotransporter (NBC-1). *Am J Physiol* 279: F532-F543, 2000.
- Backman KA, Hayslett JP : Role of the medullary collecting duct in potassium conservation. *Pflugers Arch* 396: 297-300, 1983.
- Biagi BA, Sohtell M : Electrophysiology of basolateral bicarbonate transport in the rabbit proximal tubule. *Am J Physiol* 250: F267-F272, 1986.
- Brown D, Hirsch S, Bluck S : An H⁺-ATPase in opposite plasma membrane domains in kidney epithelial cell subpopulations. *Nature (London)* 331: 622-624, 1988.
- Brown D, Kumpulainen T, Roth J, Orci L : Immunohistochemical localization of carbonic anhydrase in postnatal and adult rat kidney. *Am J Physiol* 245: F110-F118, 1983.
- Capasso G, Jaeger P, Giebisch G, Guckian V, Malnic G : Renal bicarbonate reabsorption in the rat. II. Distal tubule load dependence and effect of hypokalemia. *J Clin Invest* 80: 409-414, 1987.
- Elger M, Bankir L, Kriz W : Morphometric analysis of kidney hypertrophy in rats after chronic potassium depletion. *Am J Physiol* 262: F656-F667, 1992.
- 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* 31: 1356-1367, 1987.
- Holthöfer H, Schulte BA, Pasternack G, Siegel GJ, Spicer SS : Immunocytochemical characterization of carbonic anhydrase-rich cells in the rat kidney collecting duct. *Lab Invest* 57: 150-156, 1987.
- 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* 21: 402-410, 1982.
- Kim J, Tisher CC, Linser PJ, Madsen KM : Ultrastructural localization of carbonic anhydrase II in subpopulations of intercalated cells of the rat kidney. *J Am Soc Nephrol* 1: 245-256, 1990.
- Kim JH, Cho HJ, Bae MO, Park JJ, Ahn KY : Regulation of bicarbonate ions in hypokalemic rat kidney. *Korean J Anat* 37: 337-345, 2004. (in Koreans)
- Kunau, RT Jr, Frick A, Rector FC Jr, Seldin DW : Micropuncture study of the proximal tubular factors responsible for the maintenance of alkalosis during potassium deficiency in the rat. *Clin Sci* 34: 223-231, 1968.
- Laghmani K, Richer C, Borensztein P, Paillard M, Froissart M : Expression of rat thick limb Na/H exchangers in potassium depletion and chronic metabolic acidosis. *Kidney Int* 60: 1386-1396, 2001.
- Lee DJ, Nam KI, Lee SW, Ahn KY, Bae CS, Kim BY, Park SS : The expression of Carbonic anhydrase isozymes in human intestine. *Korean J Anat* 37: 385-393, 2004. (in Koreans)
- Linás SL, Peterson LN, Anderson RJ, Aisenbrey GA, Simon FR, Berl T : Mechanism of renal potassium conservation in the rat. *Kidney Int* 15: 601-611, 1979.
- Nishimori I, Onishi S : Carbonic anhydrase isozymes in the human pancreas. *Digest Liver Dis* 33: 68-74, 2001.
- Rector FC Jr, Bloomer HA, Seldin DW : Effect of potassium deficiency on the reabsorption of bicarbonate in the proximal tubule of the rat kidney. *J Clin Invest* 43: 1976-1982, 1964.
- Ryu SR, Lee SE, Cho HJ, Nam KI, Bae CS, Kim BY, Park SS, Ahn KY : Alteration of cyclooxygenase-1, 2 expression in hypokalemic rat kidney. *Korean J Anat* 38: 515-525, 2005. (in Koreans)
- Sly WS, Hu PY : Human carbonic anhydrases and carbonic anhydrase deficiencies. *Annu Rev Biochem* 64: 375-401, 1995.
- Soleimani M, Bergman JA, Hosford MA, McKinney TD : Potassium depletion increases luminal Na⁺/H⁺ exchange and basolateral Na⁺:CO₃⁻:HCO₃⁻ cotransport in rat renal cortex. *J Clin Invest* 86: 1076-1083, 1990.
- Soleimani M, Burnham CE : Physiologic and molecular aspects of the Na⁺:HCO₃⁻ cotransporter in health and disease processes. *Kidney Int* 57: 371-384, 2000.
- Soleimani M, Grassi SM, Aronson PS : Stoichiometry of Na⁺-HCO₃⁻ cotransport in basolateral membrane vesicles isolated from rabbit renal cortex. *J Clin Invest* 79: 1276-1280, 1987.
- Soleimani M, Singh G : Physiologic and molecular aspects of the Na⁺/H⁺ exchangers in health and disease processes. *J Invest Med* 43: 419-430, 1995.
- Stetson DL, Wade JB, Giebisch G : Morphologic alterations in the rat medullary collecting duct following potassium depletion. *Kidney Int* 17: 45-56, 1980.
- Verlander JW, Madsen KM, Low PS, Allen DP, Tisher CC : Immunocytochemical localization of band 3 protein in the rat collecting duct. *Am J Physiol* 255: F115-F125, 1988.
- Wang Z, Baird N, Shumaker H, Soleimani M : Potassium deple-

tion and acid-base transporters in rat kidney: differential effect of hypophysectomy. *Am J Physiol* 272: F736-F743, 1997.

Wright FS, Giebisch G : Regulation of potassium excretion. *The Kidney. Physiology and Pathophysiology*, 1st ed.,

New York, Raven, pp 1223-1249, 1985.

Zhang R, Hering-Smith KS, Hamm LL : Opposite effect of low K diet on the expression of gastric and colonic H, K-ATPase in rabbit cortical collecting duct. *J Amer Soc Nephrol* 6: 318, 1995.

Enhanced Expression of Carbonic anhydrase II in Hypokalemic Rat Kidney

Yong Chan Lee¹, Chaeyong Jung^{1,2}, Kwang Il Nam¹, Seung Won Lee¹, Choon Sang Bae¹, Baik Yoon Kim¹, Sung Sik Park¹, Kyu Youn Ahn^{1,2}

¹Department of Anatomy, Chonnam National University Medical School

²Medical Research Center for Gene Regulation, Chonnam National University

Abstract : A number of acid-base or electrolyte disorders are associated with decreased or increased HCO_3^- reabsorption in the renal tubules. The present study was to examine the alterations of expression and distribution of Carbonic anhydrase II in the kidneys of normal and potassium-depleted rats using Western blot analysis and immuno-histochemistry.

Western blot analysis demonstrated that CA II protein, ~30 kDa at molecular mass, was abundantly expressed in normal group. All potassium-depleted groups showed slightly increased CA II protein compared to normal group. In control group, immunoreactivity of CA II protein was detected in the entire collecting duct. Signal intensity was prominent in the intercalated cells and weak in the principal cells of the cortical collecting ducts. In potassium-depleted groups, the pattern of cellular labeling of CA II protein was identical to that of normal group, but the signal intensity was decreased in cortical collecting duct, markedly increased in the inner stripe of outer medullary and inner medullary collecting ducts, and unchanged in the outer stripe of outer medullary collecting duct.

These results suggest that chronic hypokalemia impact the expression pattern of CA II protein depending the portion of the collecting duct.

Keywords : Hypokalemia, Collecting duct, Carbonic anhydrase II, Western blot analysis, Immunohistochemistry