

사염화탄소가 고혈압흰쥐 신장의 aquaporin과 superoxide dismutase 발현에 미치는 영향

김경태, 이두환, 서윤경, 김신영

한양대학교 의과대학 해부·세포생물학교실

(2015년 4월 2일 접수, 2015년 6월 11일 수정접수, 2015년 6월 15일 게재승인, Published Online 30 June 2015)

간추림 : 간독성인자로 알려진 사염화탄소 (CCl₄)는 활성산소기를 발생시킴으로 간세포를 손상시키고, 간의 섬유화 또는 간경화를 일으킨다. 간경화의 마지막 단계에서 많은 환자들은 수분조절기전에 장애가 생기며, 이로 인해 복수를 경험하게 된다. 또한 사염화탄소가 대사되면서 발생하는 활성산소기는 신장의 토리와 세관의 변성을 유발한다고 알려져 있다. Aquaporin (AQP)은 신장에서 수분흡수를 조절하는 단백질로, 활성산소기에 의해 증가된 AQP는 수분조절 장애를 일으킨다고 알려져 있다. 활성산소기는 고혈압의 발병에도 관여하며, 항산화효소의 변화에도 영향을 준다고 알려져 있다. 이에 본 연구자들은 사염화탄소 처리가 신장의 AQP와 항산화효소 superoxide dismutase (SOD)의 발현에 어떤 영향을 주는지 알아보고, 이러한 변화가 고혈압 유무와 그 유병기간에 따라 차이가 있는지를 관찰하였다.

8주, 16주 그리고 24주령의 본태성고혈압흰쥐(고혈압군)와 정상혈압흰쥐(정상혈압군)를 실험군과 대조군으로 나누었다. 실험군에는 사염화탄소, 대조군에는 올리브오일을 주 2회씩 4주 동안 등에 피하주사(1.6 mL/kg)하였다. 마지막 주사 후 24시간이 지나서 혈액과 신장을 얻었다. 신장의 형태학적 변화는 H&E 염색으로 확인하였고, blood urea nitrogen (BUN), creatinine을 분석하였다. AQP1과 AQP2, CuZnSOD, MnSOD 발현은 면역조직화학염색과 Western blot 분석을 이용하여 관찰하였다.

사염화탄소 처리는 정상혈압군과 고혈압군 모두에서 세관의 종창과 상피세포의 위축 또는 탈락을, 고혈압군에서는 사이질조직의 부종과 세관내 cast, 염증세포의 침윤을 유도하였다.

사염화탄소 처리로 8주령과 16주령 정상혈압군과 16주령 고혈압군의 BUN이 증가되었다.

AQP1은 사염화탄소 처리로 8주령과 24주령 고혈압군의 유의성 있게 증가되었다. AQP2는 24주령 고혈압군에서 8주령 고혈압군보다 유의성 있게 감소되었다. 사염화탄소처리로 AQP2는 8주령과 24주령 고혈압군에서 유의성 있게 증가되었고, 24주령 고혈압군의 AQP2는 16주령 고혈압군보다 유의성 있게 증가되었다. CuZnSOD와 MnSOD는 24주령 고혈압군에서 24주령 정상혈압군보다 유의성 있게 증가되었다. 사염화탄소 처리는 8주령 고혈압군에서 CuZnSOD를 유의성 있게 증가시킨 반면, 24주령 고혈압군의 CuZnSOD와 MnSOD는 유의성 있게 감소시켰다.

이상의 결과를 종합할 때, 사염화탄소에 의한 AQP의 증가와 SOD의 감소는 고혈압흰쥐에서 유의성이 있었고, 24주령 고혈압흰쥐에서 신장 손상이 큰 것을 알 수 있었다. 이는 사염화탄소로 유도되는 활성산소기가 유병기간이 긴 고혈압흰쥐에서 AQP를 증가시켜 수분조절을 변화시킬 것으로 생각되며, 감소된 SOD는 신장손상을 가중시키는데 관여한다고 생각할 수 있었다.

찾아보기 낱말: 고혈압흰쥐, 사염화탄소, AQP, SOD

저자(들)는 '의학논문 출판윤리 가이드라인'을 준수합니다.

저자(들)는 이 연구와 관련하여 이해관계가 없음을 밝힙니다.

교신저자 : 김신영 (한양대학교 의과대학 해부·세포생물학교실)

전자우편 : 72shin02@hanmail.net

서 론

사염화탄소 (carbon tetrachloride, CCl_4)는 간독성의 원인 물질로 알려져 있으며, 간의 지방증, 섬유화 또는 간경화를 일으키기 위한 약물로 사용되고 있다. 간경화에서 관찰되는 수분조절장애는 사염화탄소를 반복하여 흡입 또는 투여한 실험동물에서도 관찰된다 [1]. Ozturk 등 [2]은 사염화탄소는 신장에서 세관 세포의 탈락과 괴사를 유발한다고 하였으며, Natarajan 등 [3]도 사염화탄소가 Wistar 흰쥐 신장의 토리쪽세관 상피의 사립체와 세포질세망의 변화를 가져오며 지방축적이나 염색질의 응집을 유도한다고 하였다.

Aquaporins (AQP)은 수분채널에서 물의 이동을 담당하는 막단백질로 [4], 10여 개의 아형이 알려져 있다. AQP1은 신장에서 관찰되는 주된 수분조절단백질로 겉질의 토리쪽세관과 속질의 가는내림가지를 구성하는 세포의 꼭대기와 가쪽바닥면에서 관찰된다. AQP2는 먼쪽세관과 집합세관, 집합관을 구성하는 주세포의 꼭대기에서 관찰된다 [5,6]. AQP1은 세관 여과액의 삼투평형을 유지하는 데 중요한 역할을 하며, 신장이 손상되면 AQP1이 증가된다고 알려져 있다 [7]. AQP2는 신장에서 일어나는 수분배출의 마지막 단계를 조절하며, AQP2의 변화는 간경화 환자의 수분정체를 일으키는 주된 원인으로 알려져 있다 [8]. Jun 등 [9]은 간경화를 유도하기 위해 디오아세타마이드 (thioacetamide)를 Wistar 흰쥐에 투여하면 AQP2가 증가된다고 하였으며, Natarajan 등 [3]은 디오아세타아마이드 역시 사염화탄소처럼 활성산소기를 발생시켜 신장에 손상을 준다고 하였다. Botsoglou 등 [10]은 사염화탄소 투여로 증가된 활성산소기를 억제하거나 감소시키면 신장의 손상을 감소시킬 수 있다고 하였다.

과산화수소분해효소 (superoxide dismutase, SOD)는 과산화수소 (superoxide, O_2^-)를 과산화수소 (hydrogen peroxide)로 전환시키는 효소로, 과산소가 산화질소 (NO)와 반응하여 반응성이 크고 세포에 치명적인 peroxynitrite로 전환되는 것을 차단하는 역할을 한다 [11]. 활성산소기 제거자라고도 불리는 SOD는 위치에 따라 세포질 내에서 관찰되는 CuZnSOD (SOD1)와 사립체에서 관찰되는 MnSOD (SOD2), 세포밖의 사이질에 존재하는 extracellular SOD (SOD3)로 구분할 수 있다. CuZnSOD와 MnSOD는 허혈 및 재관류시 생기는 활성산소기를 제거하여 심장근육과 뼈대근육의 허혈손상을 감소시켜 준다고 알려져 있다 [11, 12]. 또한 CuZnSOD와 MnSOD의 증가 또는 감소는 고혈압의 발병과도 관련이 있다고 알려져 있다 [13].

성인병의 하나인 고혈압은 미세순환의 장애가 동반되는 질환으로, 세포 또는 조직으로 공급되는 산소의 양을 감소

시키며, 결국 다량의 활성산소기를 발생시켜 조직에 허혈 및 재관류 손상을 일으키는 원인이 된다. 고혈압은 말초순환장애는 물론, 심장과 뼈대근육, 신장 등에도 영향을 주며 [12], 신장의 AQP의 발현에도 변화를 주는 것으로 알려져 있다 [14].

이전에 발표된 논문들을 통하여, 저자들은 사염화탄소가 활성산소기를 발생시켜 신장 손상을 일으키며, 고혈압의 병태생리 역시 활성산소기와 항산화제의 변화와 관련이 있는 것을 알 수 있었다. 그러나, 신장의 수분조절 단백질로 알려진 AQP와 산화자극에서 세포와 조직을 보호한다고 알려진 항산화효소를 동시에 관찰한 연구는 미미하다. 이에 본 연구자들은 정상혈압흰쥐 (Wistar-Kyoto rat)와 본태성고혈압흰쥐 (spontaneously hypertensive rat)에 사염화탄소를 투여하였을 때 나타나는 신장의 형태학적 변화를 관찰하고, 수분조절단백질인 AQP1과 AQP2, 그리고 항산화효소 CuZnSOD와 MnSOD 발현변화를 고혈압 유병 기간에 따라 살펴봄으로써 사염화탄소가 고혈압흰쥐의 신장에 미치는 영향을 알아보고자 본 연구를 실시하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물

8주령과 16주령, 24주령의 본태성고혈압흰쥐 (고혈압흰쥐, spontaneously hypertensive rat, SHR)와 정상혈압흰쥐 (normotensive rat, Wistar Kyoto rat, WKY)를 대조군과 실험군으로 구분하였고, 각 군당 5마리씩 총 60마리의 실험동물을 사용하였다. 실험동물은 7주령이 되었을 때 Janan SLC Inc. (Shizuoka, Japan)에서 구입하여 한양대학교 의과대학 실험동물실에서 사료와 식이를 무제한 공급하며 사육하였다. 본 연구는 한양대학교의 실험동물윤리위원회의 규정에 따라 진행되었다.

2. 혈압측정

흰쥐용 홀더를 이용하여 움직임을 최소화 시켰으며, 꼬리에 tail-cuff를 감은 뒤 30~34°C가 유지되는 실험용 아크릴상자에서 혈압측정기계 (Blood Pressure Analyzer, IITC Model 179, IITC Life Science Inc., CA, USA)를 이용하여 실험시작시에 수축기 혈압을 측정하여 고혈압과 정상혈압을 확인하였다.

3. 실험처치

올리브오일 (Sigma, MO, USA)에 녹인 사염화탄소 (Sigma, MO, USA)를 1.6 mL/kg씩 실험동물의 등에 피하주사

하였다. 대조군에는 동량의 올리브오일만을 주사하였다. 실험처치는 1주에 2회씩, 총 4주 동안 주사하였다. 마지막 주사 후 24시간이 되었을 때, Tiletamine + Zolazepam (27.78 mg/kg, VIRBAC laboratories, Carross, France)과 xylazine (0.647 mg/kg, BAYER, Gyeonggi-do, Korea)을 2 : 1의 비율로 혼합한 마취제를 복강내 주사하여 실험동물을 마취시켰다. 배안을 열어 배대동맥에서 동맥혈을 채취한 뒤 경추탈골로 안락사시킨 뒤 신장을 적출하였다. 적출한 신장은 액화질소를 이용하여 곧바로 얼린 후 Western blot 분석에 사용하였고, 일부는 0.1% glutaraldehyde-4% paraformaldehyde 혼합용액 (pH 7.4, Sigma, MO, USA)에 18시간 고정시킨 후 6µm의 파라핀절편을 만들었다.

4. 신장의 형태학적 관찰

신장의 조직학적 변화를 관찰하기 위해 헤마톡실린-에오신 (hematoxylin-eosin, H&E) 염색을 시행 후 광학현미경으로 관찰하였다.

5. 혈액분석

Blood urea nitrogen (BUN), creatinine의 분석은 한국동물체외분석센터 (ALKOREA, Gyeonggi-do, Korea)에 의뢰하였다.

6. 면역조직화학염색

크실렌 (xylene)으로 파라핀절편의 파라핀을 제거하고, 에탄올을 이용하여 흡수시킨 뒤, phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4)과 1차 증류수로 세척하였다. 3% 과산화수소가 들어있는 메탄올혼합용액으로 6분 처리한 후 세척한 뒤 0.4% pepsin 용액 (Sigma, MO, USA)으로 실온에서 10분 반응시켜 항원을 노출시켰다. Rabbit blocking 용액 (PBS, 2% bovine serum albumin, 산양의 정상혈청 15 µL/mL)을 37°C에서 40분 처리한 뒤, rabbit anti-AQP1 항체 (1 : 50) 또는 rabbit anti-AQP2 항체 (1 : 50)를 4°C에서 하룻밤 반응시켰다. 또한 sheep blocking 용액 (PBS, 2% bovine serum albumin, 토끼의 정상혈청 15 µL/mL)으로 37°C에서 40분 처리한 뒤, sheep anti-CuZnSOD 항체 (1 : 100) 또는 sheep anti-MnSOD 항체 (1 : 100)를 4°C에서 하룻밤 반응시켰다. PBS로 세척 후 2차 항체, goat anti-rabbit IgG 항체 (1 : 1000) 또는 rabbit anti-sheep IgG 항체 (1 : 1000)를 실온에서 40분 반응시킨 뒤, ABC 용액을 실온에서 30분 처리하였다. PBS로 세척 뒤 DAB kit를 이용하여 발색시켰으며, 1% 메틸블루용액으로 대조염색 후 광학현미경 (Olympus BX51, Japan)으로 관찰 및 사진촬영 하였다. AQP 항체는 SantaCruz (CA, USA), SOD 항체는 Calbiochem (CA,

USA)에서, 2차 항체와 ABC kit, DAB kit는 Vector Laboratory (CA, USA)에서 구입하였다.

7. Western blot analysis

잘게 부순 신장조직에 단백질을 분해소억제제 (PMSF 1.0 mM, EDTA 1.0 mM, pepstatin A 1 µM, leupeptin 1 µM, aprotinin 0.1 µM)가 포함된 단백질추출용액 (0.01 g/300 µL, iNtRON Biotechnology, Korea)을 첨가한 뒤 조직분쇄기 (homogenizer, Janke & Kunkel, IKA®-Labtechnik, Germany)를 이용하여 13,500 rpm 에서 10초씩 2회 균질화시켰다. 얼음 위에 20분 놓아둔 균질액을 4°C에서 12,000 rpm 속도로 10분 동안 원심분리한 뒤 상층액을 얻었다.

150 µg의 단백질을 10% SDS-polyacrylamide gel 전기영동을 이용하여 분리시킨 뒤, Hybond™-P membrane (Amersham Biosciences, Cardiff, UK)에 이동시켰다. Membrane을 3% blocking 용액 (TBST; 25 mM Tris, 8% NaCl, 0.1% Tween-20, 3% non-fat dry milk)으로 실온에서 1시간 처리한 뒤, rabbit anti-AQP1 항체 (1 : 300), rabbit anti-AQP2 항체 (1 : 300), rabbit anti-CuZnSOD 항체 (1 : 2000), rabbit anti-MnSOD 항체 (1 : 2000)를 blocking 용액에 각각 희석하여 4°C에서 하룻밤 반응시켰다. TBST로 세척한 뒤 horseradish peroxidase가 결합된 2차 항체 anti-rabbit IgG 항체 (1 : 1000, Amersham Biosciences, Cardiff, UK)를 실온에서 1시간 반응시키고, TBST로 세척한 뒤 1분간 ECL 용액 (enhanced chemiluminescence solution, GE Healthcare, Cardiff, UK)에 처리한 뒤 x-ray (Kodak, Tokyo, Japan) 필름에 노출시켰다. Quantity one® 프로그램 (Gel Doc 2000, Bio-Rad Laboratories, Italy)을 이용하여 단백질 (band)의 농도를 측정하였다. Anti-mouse actin 항체 (1 : 5000, BD Biosciences, CA, USA)를 이용하여 각 실험군에 포함된 단백질의 양을 확인하였고, AQP 항체는 SantaCruz Biotechnology (CA, USA), SOD 항체는 Assay designs (NY, USA)에서 구입하였다.

8. 통계분석

자료는 Sigma Plot 11.0 (Systat Software Inc., USA)을 이용하여 독립변수 *t*-test를 실시하였고, 통계적 유의수준은 $p < 0.05$ 로 하였다.

결 과

1. 실험동물 혈압

정상혈압군의 평균 수축기혈압은 8주령 148.80 ± 6.30

mmHg, 16주령 151.30±5.30 mmHg, 24주령 150.80±6.60 mmHg이었고, 고혈압군은 8주령 180.60±9.50 mmHg, 16주령 223.50±17.80 mmHg, 24주령 224.70±17.30 mmHg이었다. 대조군과 실험군의 혈압 차이는 없었다.

2. 신장의 형태학적 변화

대조군 신장의 겉질과 속질은 정상 형태로 관찰되었고, 주령이나 혈압에 따른 차이는 없었다. 사염화탄소 투여는 신장의 겉질에서 토리쪽세관의 종창과 솔가장자리 (brush border)의 감소를 유도하였고, 집합관의 종창과 상피세포의 탈락 또는 괴사를 일으켰다. 16주와 24주령군의 겉질

에서는 사이질조직의 부종과 세관 확장, 세관 속의 원주 (cast), 염증세포의 침윤이 관찰되었고, 이러한 변화는 고혈압군에서 두드러졌다. 토리의 형태학적 변화는 관찰되지 않았다 (Fig. 1).

3. BUN과 Creatinine

1) BUN

24주령 정상혈압군의 BUN은 8주령 정상혈압군보다 증가되었다 ($p < 0.05$). 24주령 고혈압군의 BUN은 8주와 16주령 고혈압군보다 ($p < 0.05$), 24주령 정상혈압군보다 증가되었다 ($p < 0.05$). 사염화탄소 투여로 BUN이 증가되었

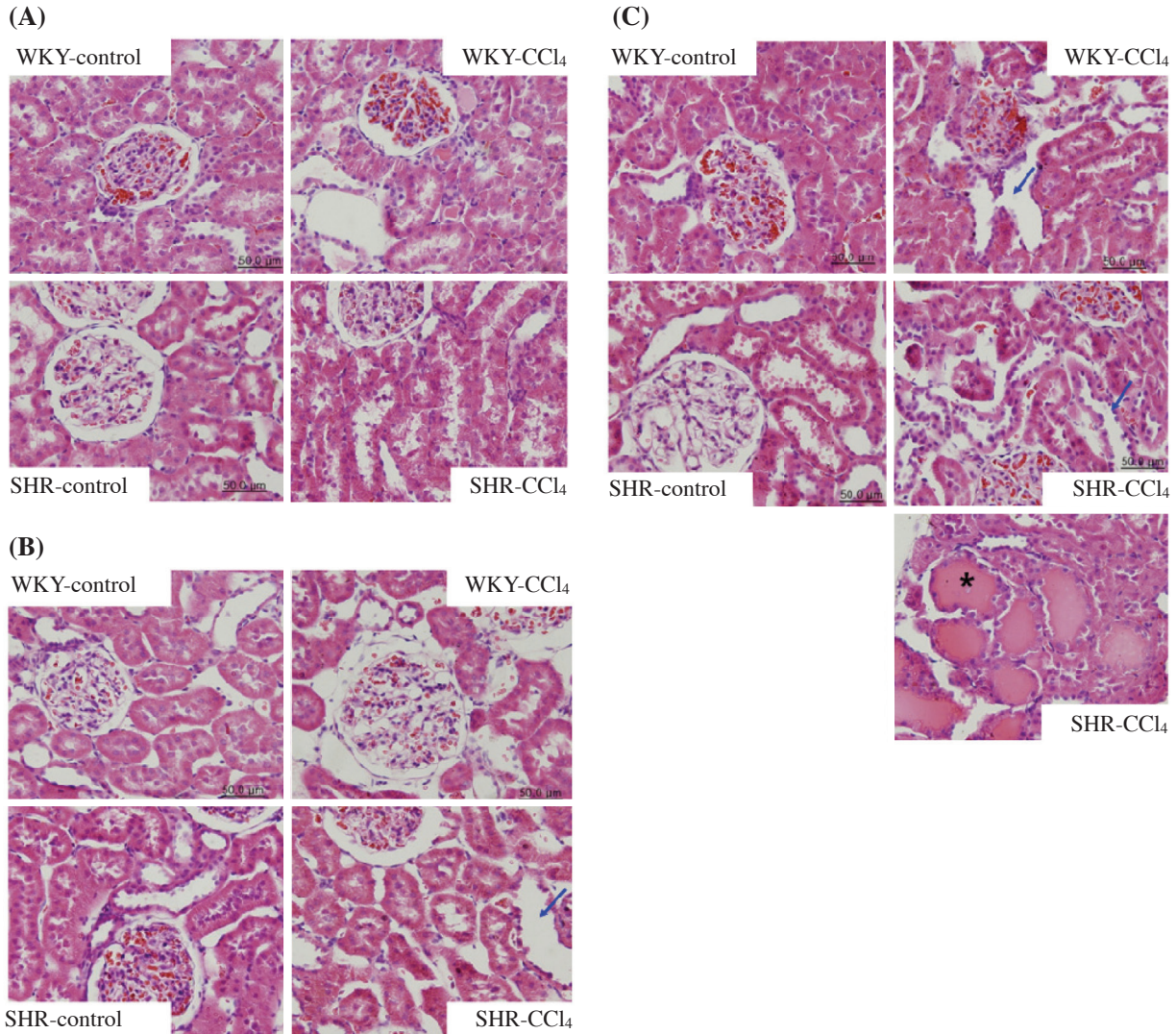


Fig. 1. Renal histology with H&E in WKY and SHR. In control groups, the cortical appearance is normal. In CCL₄-treated groups, the renal tubules show swelling, brush border loss and epithelium necrosis. In 16 weeks (B) and 24 weeks groups (C), CCL₄ induced the interstitial edema, tubular dilatation (arrow) and tubular cast (asterisk). A; 8 weeks group, B; 16 weeks group, C; 24 weeks group. Original magnification × 400.

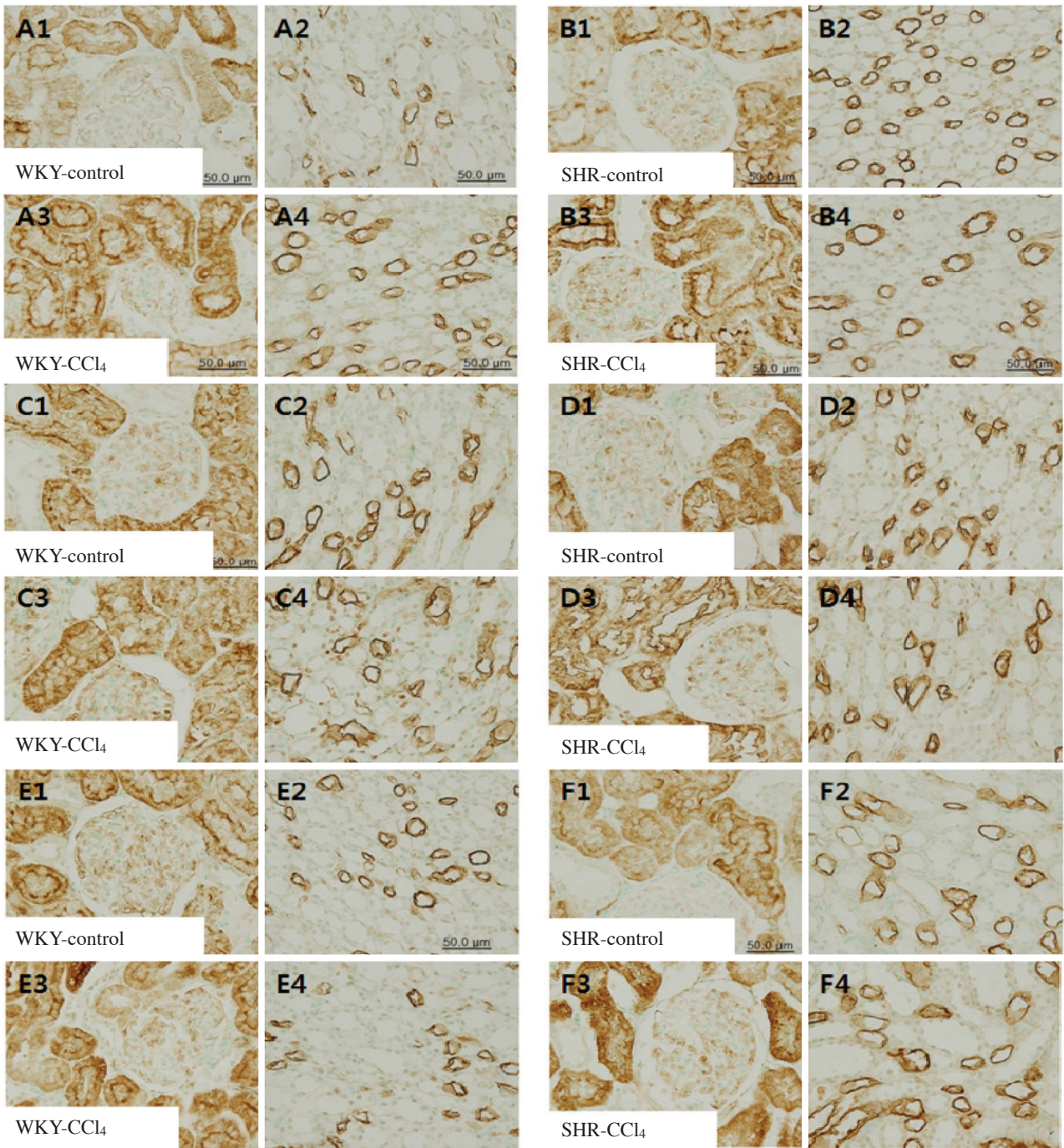


Fig. 2. Immunohistochemical staining of the expression of AQP1. AQP1 is expressed in the proximal tubules and descending thin limbs. The treatment of CCl₄ during 4 weeks increased the expression of AQP1 in renal cortex and medulla. A & B; 8 weeks group, C & D; 16 weeks group, E & F; 24 weeks group. Original magnification × 400.

으나, 8주와 16주령 정상혈압군, 16주령 고혈압군을 제외 하고는 통계적 유의성이 없었다 (Table 1).

2) Creatinine

정상혈압군과 고혈압군의 creatinine은 차이가 없었으며,

주령에 따른 차이도 없었다. 사염화탄소 투여로 creatinine 은 감소되는 경향이 있었으나, 8주령 정상혈압군과 고혈압 군을 제외하고는 통계적 유의성이 없었다 (Table 2).

Table 1. The level of BUN in WKY and SHR treated with CCl₄.

(mean ± SD (mg/dL))

	WKY-control	WKY-CCl ₄	SHR-control	SHR-CCl ₄
8 weeks	13.90 ± 1.43	18.50 ± 0.75*	15.78 ± 1.58	16.98 ± 2.33
16 weeks	20.00 ± 2.10	24.82 ± 1.82*	16.35 ± 0.78 [†]	22.92 ± 3.90*
24 weeks	18.38 ± 0.95 [‡]	21.30 ± 4.34	24.07 ± 4.28 [‡]	24.98 ± 2.52 [‡]

*; *p* < 0.05, compared with control group

[†]; *p* < 0.05, compared with WKY-control

[‡]; *p* < 0.05, compared with 8 weeks WKY-control

WKY; Wistar Kyoto rat

SHR; spontaneously hypertensive rat

Table 2. The level of serum creatinine in WKY and SHR treated with CCl₄.

(mean ± SD (mg/dL))

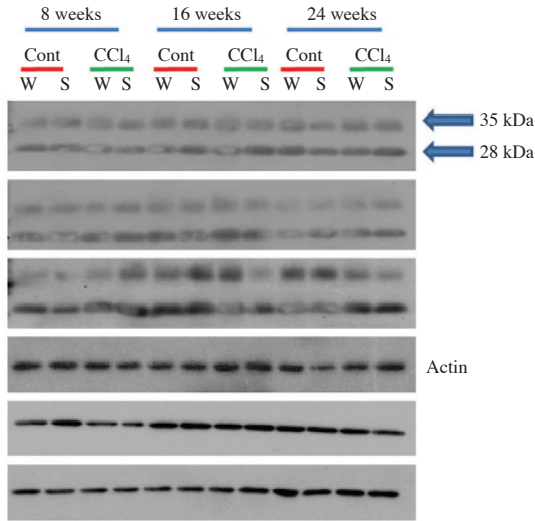
	WKY-control	WKY-CCl ₄	SHR-control	SHR-CCl ₄
8 weeks	0.56 ± 0.08	0.39 ± 0.08*	0.50 ± 0.04	0.40 ± 0.06*
16 weeks	0.60 ± 0.10	0.42 ± 0.18	0.51 ± 0.05	0.41 ± 0.06
24 weeks	0.52 ± 0.08	0.34 ± 0.16	0.64 ± 0.25	0.45 ± 0.06

*; *p* < 0.05, compared with control group

WKY; Wistar Kyoto rat

SHR; spontaneously hypertensive rat

(A)



(B)

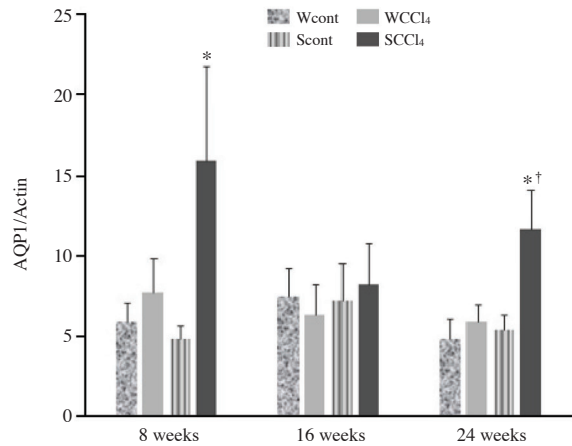


Fig. 3. Western blot of AQP1 in whole kidney homogenate of control and CCl₄-treated rats. The treatment of CCl₄ during 4 weeks increased the expression of AQP1 in renal tissue. A glycosylated band appears at 35 kDa and a non-glycosylated band at 28 kDa (**p* < 0.05 vs. SHR-control within same age groups, [†]*p* < 0.05 vs. 24 weeks age WCCl₄). Wcont; WKY control group, WCCl₄; WKY group treated with CCl₄, Scont; SHR control group, SCCl₄; SHR group treated with CCl₄ (n = 5, mean ± SD).

4. AQP1

1) 면역조직화학염색에서 AQP1은 토리쪽세관과 헨레고리의 내림가지에서 관찰되었다. 사염화탄소 투여는 겉질과 속질에서 AQP1 발현을 증가시켰고, AQP1이 강하게 염색된 세관은 고혈압군에서 더 많았다 (Fig. 2).

2) 사염화탄소 투여는 8주령 고혈압군의 AQP1 발현을 증가시켰다 (*p* < 0.05 vs. SHR-control). 사염화탄소 투여로 증가된 24주령 고혈압군의 AQP1 발현은 사염화탄소를 투여 받은 정상혈압군보다 증가되었다 (*p* < 0.05 vs. WKY-CCl₄) (Fig. 3).

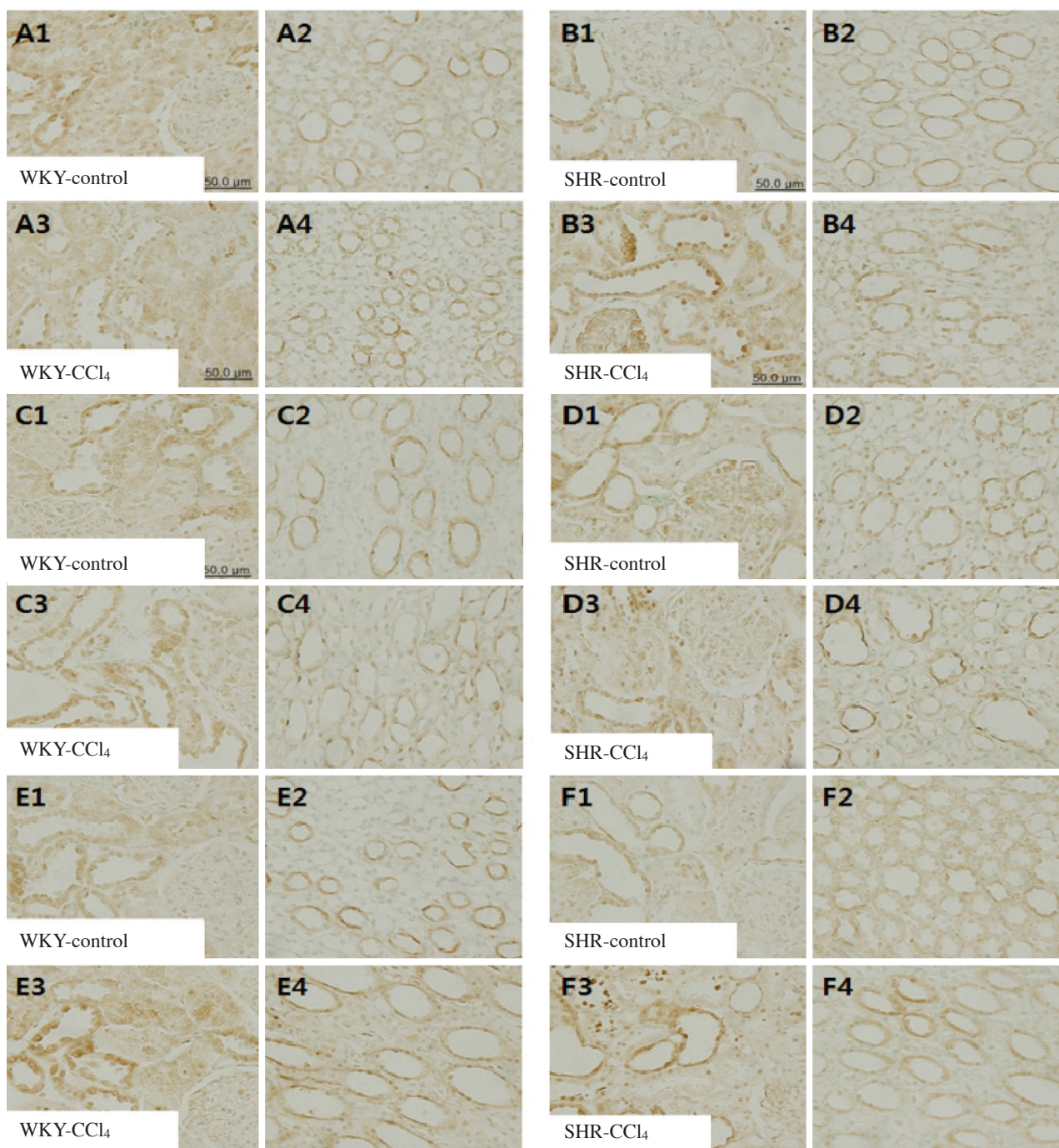


Fig. 4. Immunohistochemical staining of the expression of AQP2. AQP2 is expressed in the distal tubules and collecting ducts. The treatment of CCl₄ during 4 weeks increased the expression of AQP2 in renal cortex and medulla. CCl₄-treated SHR groups show the more strong positive tubules compared with CCl₄-treated WKY groups. A & B; 8 weeks group, C & D; 16 weeks group, E & F; 24 weeks group. Original magnification × 400.

5. AQP2

1) 면역조직화학염색에서 AQP2는 먼쪽세관과 집합관

에서 관찰되었다. 사염화탄소 투여는 겉질과 속질에서 AQP2 염색성을 증가시켰다(Fig. 4).

2) 사염화탄소 투여는 8주과 24주령 고혈압군의 AQP2

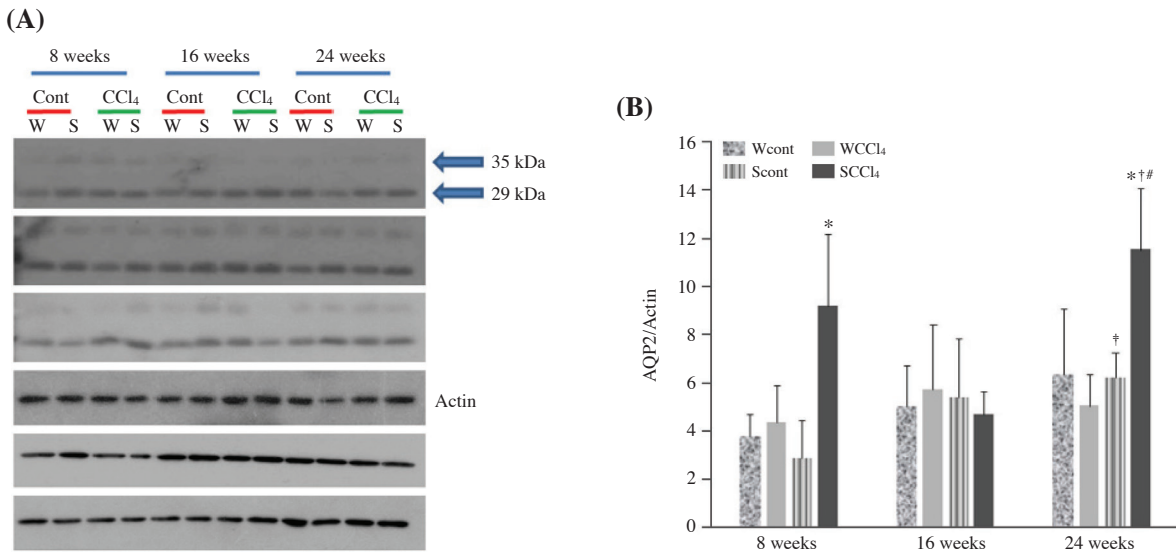


Fig. 5. Western blot of AQP2 in whole kidney homogenate of control and CCl₄-treated rats. The treatment of CCl₄ during 4 weeks increased the expression of AQP2 in renal tissue. A glycosylated band appears at 35 kDa and a non-glycosylated band at 29 kDa (**p* < 0.05 vs. SHR-control within same age groups, †*p* < 0.05 vs. 24 weeks age WCCL₄, ‡*p* < 0.05 vs. 16 weeks age SCCL₄, §*p* < 0.05 vs. 8 weeks age Scont). Wcont; WKY control group, WCCL₄; WKY group treated with CCl₄, Scont; SHR control group, SCCL₄; SHR group treated with CCl₄ (n = 5, mean ± SD).

발현을 증가시켰다 (*p* < 0.05 vs. SHR-CCl₄). 사염화탄소 투여로 증가된 24주령 고혈압군의 AQP2 발현은 사염화탄소를 투여 받은 정상혈압군보다 증가되었고 (*p* < 0.05 vs. WKY-CCl₄), 16주령 고혈압군보다 증가되었다 (*p* < 0.05 vs. 16 weeks SHR-CCl₄, Fig. 5).

6. CuZnSOD

1) 면역조직화학염색에서 CuZnSOD는 겉질과 속질의 세관에서 관찰되었고, 24주령 정상혈압군과 고혈압군에서 강하게 관찰되었다. 사염화탄소 투여로 8주령 정상혈압군과 고혈압군에서 CuZnSOD는 증가되었으나, 16주와 24주령 정상혈압군과 고혈압군에서는 감소되었다 (Fig. 6).

2) 사염화탄소 투여는 8주령 고혈압군의 CuZnSOD 발현을 사염화탄소를 투여한 정상혈압군보다 증가시켰다 (*p* < 0.05 vs. WKY-CCl₄). 24주령 고혈압군의 CuZnSOD는 정상혈압군보다 증가되었으나 (*p* < 0.05 vs. 24 weeks WKY-control), 사염화탄소 투여로 감소되었다 (*p* < 0.05 vs. 24 weeks SHR-control). 고혈압군의 주령이 증가할수록 사염화탄소 투여 후 발현되는 CuZnSOD는 감소되었다 (8 weeks vs. 16 weeks; *p* < 0.05, 8 weeks vs. 24 weeks; *p* < 0.05, Fig. 7).

7. MnSOD

1) 면역조직화학염색에서 MnSOD는 겉질과 속질에 위

치하는 세관에서 관찰되었다. 사염화탄소 투여로 정상혈압군과 고혈압군에서 MnSOD는 감소되었다 (Fig. 8).

2) 24주령 고혈압군의 MnSOD 발현은 정상혈압군보다 증가되었으나 (*p* < 0.05 vs. 24 weeks WKY-control), 사염화탄소 투여는 24주령 고혈압군의 MnSOD 발현을 사염화탄소를 투여 받은 8주과 16주령 고혈압군보다 감소시켰다 (8 weeks SHR-CCl₄ vs. 16 weeks SHR-CCl₄; *p* < 0.05, 8 weeks SHR-CCl₄ vs. 24 weeks SHR-CCl₄; *p* < 0.05, Fig. 9).

고 찰

간독성인자로 알려진 사염화탄소는 간세포의 세포질세망 속에서 시토크롬 P-450 계통을 거치면서 분해된다 [15]. 사염화탄소가 분해되는 과정에서 생성된 활성산소기는 흰쥐 신장을 산화자극에 노출시키며, 세관상피세포의 부종과 공포 형성, 위축, 탈락을 유도하며 사구체의 변성을 초래하는 것으로 알려져 있다 [16].

본실험에서 사염화탄소를 처치한 실험동물의 신장에서는 Khan 등 (2009) [16]과 Ozturk 등 (2003) [2]의 결과와 같이 세관상피의 위축과 탈락이 관찰되었으며, 24주령 고혈압군에서는 사이질조직의 부종과 세관내 원주 (cast)가 관찰되었다. 이러한 변화는 겉질의 토리쪽곱슬세관에서 두드러졌으며, 먼쪽세관과 집합관에서도 관찰되었다 (Fig. 1). 신장의 세관, 특히 토리쪽세관이 수분과 염분의 재흡수에

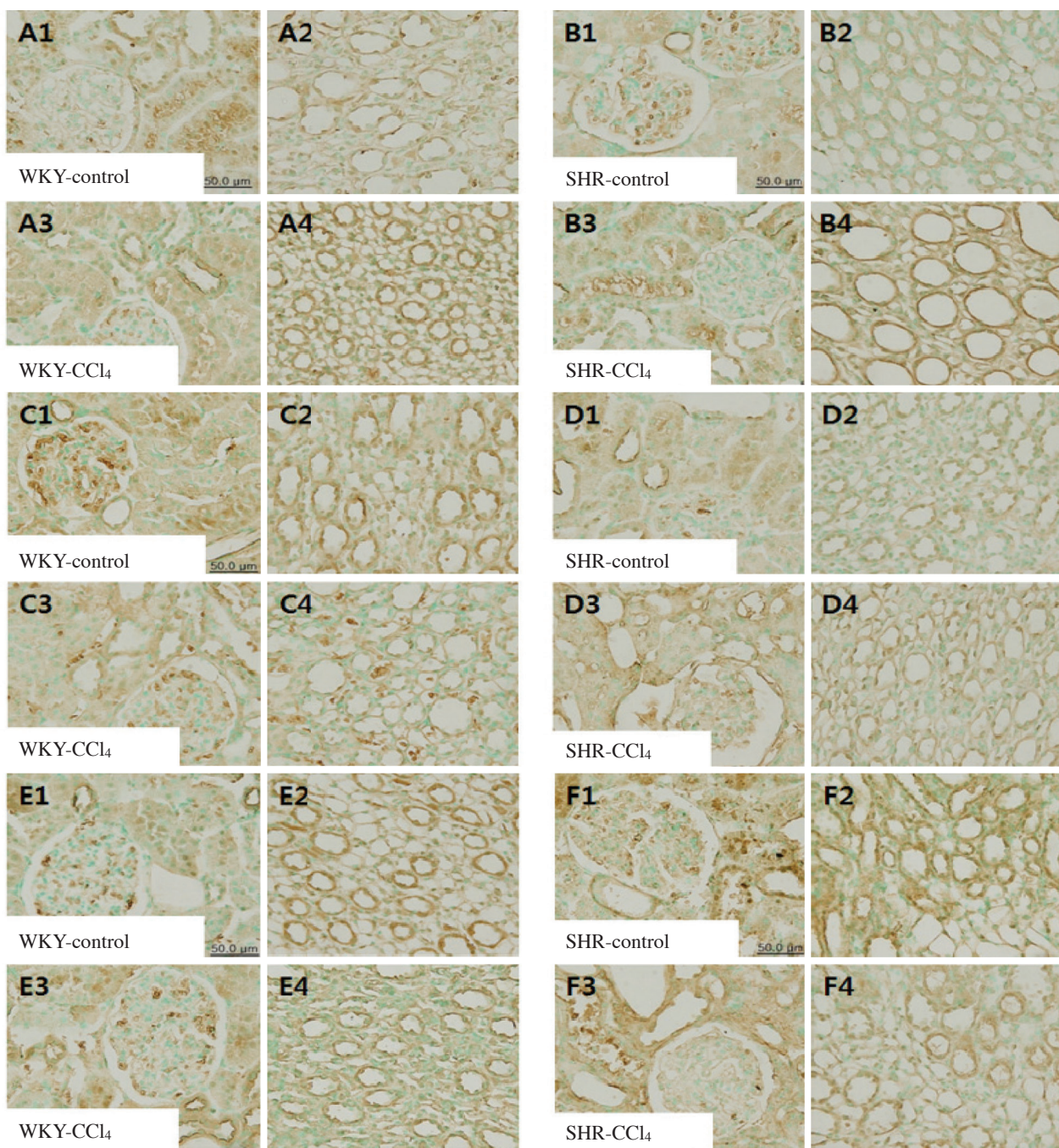
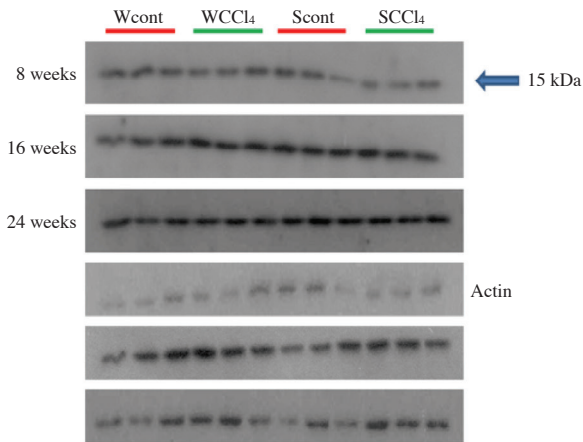


Fig. 6. Immunohistochemical staining of the expression of CuZnSOD. CuZnSOD is expressed in tubules of cortex and medulla. In SHR control groups, the expression of CuZnSOD was increased with aging. The treatment of CCl₄ during 4 weeks increased the expression of CuZnSOD in 8 weeks medulla (A3~4). But, in 16 weeks (C3~4, D3~4) and 24 weeks (E3~4, F3~4), CCl₄ decreased the expression of CuZnSOD. A & B; 8 weeks group, C & D; 16 weeks group, E & F; 24 weeks group. Original magnification $\times 400$.

중요한 기능을 하는 것으로 미루어, 본 실험에서 확인된 세관 상피의 병리적 변화는 신장의 기능을 변화시킬 수 있을 것이라 생각되며, 이는 사염화탄소를 투여한 결과라 생각되었다.

또한 사염화탄소로 유도된 세관 손상은 정상혈압군보다 고혈압군에서 더 두드러졌다. 24주령군에서는 세관상피의 손상이 증가되었고, 호중성구와 포식세포 같은 염증세포의 침윤도 관찰되었다. Ozturk 등 [2]의 실험에서도 관찰된 염

(A)



(B)

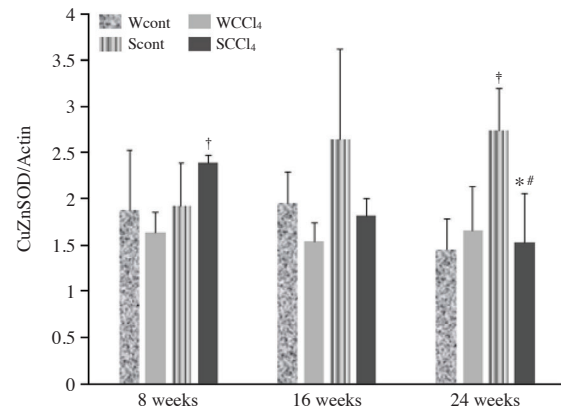


Fig. 7. Western blot of CuZnSOD in whole kidney homogenate of control and CCl₄-treated rats. The treatment of CCl₄ during 4 weeks decreased the expression of CuZnSOD (* $p < 0.05$ vs. SHR-control within same age group, † $p < 0.05$ vs. WKY-CCl₄ within the same group, ‡ $p < 0.05$ vs. 8 weeks or 16 weeks age SCCl₄, # $p < 0.05$ vs. 24 weeks age Wcont). Wcont; WKY control group, WCCl₄; WKY group treated with CCl₄, Scont; SHR control group, SCCl₄; SHR group treated with CCl₄ (n = 5, mean ± SD).

증세포의 침윤은 Galkina와 Ley [17]의 의견처럼 또 다른 활성산소기의 생산지가 되어 신장손상을 가중시킬 것이라 생각되었으며, 주령이 증가할수록, 고혈압의 유병기간이 길 경우 사염화탄소 투여로 인한 신장의 형태학적 손상이 더 심해진다고 생각할 수 있었다.

신장손상을 알려주는 BUN은 사염화탄소 처리시 증가되었고, 주령이 많을수록 증가되는 경향을 보였다 (Table 1). 또한, creatinine은 사염화탄소를 처리하면 유의성 있게 감소되었다. 사염화탄소 처리로 creatinine이 감소된 현상은 사염화탄소가 실험동물의 간세포에 문제를 일으키고 이에 따라 적절한식이섭취와 대사가 제대로 이루어지지 못한 결과라 생각되었다. 본 실험 결과에는 포함되지 않았으나 사염화탄소를 투여하면 실험동물의 체중이 감소되었는데, 체중감소와 동반하여 근육량이 감소됨으로 인해 대사되는 creatinine이 감소된 것으로 생각할 수 있었다. 그러나, 본 실험에서 얻은 실험동물의 creatinine의 수치는 Fukuda 등 [18]이 제시한 8주, 16주, 30주령의 정상혈압흰쥐와 고혈압흰쥐의 creatinine 정상범주에 속하며, 사염화탄소를 처리하여 감소된 creatinine의 수치 역시 정상범주를 벗어나지 않는 것을 알 수 있었다 (Table 2). Khan 등 [16]과 Ogawa 등 [19]은 실험 중 높은 농도의 사염화탄소를 3개월 이상 투여함으로 신장손상이 일어나고 creatinine이 증가되었을 것이라 생각한다. Bhattacharya 등 [20]은 신장 기능의 50% 이상이 손상되었을 때 creatinine이 증가된다고 하였는데, 본 실험에서 creatinine이 정상범위에 있는 것은 처리한 사염화탄소의 농도가 낮아, Khan 등 [16]과 Ogawa 등 [19]의 실험보다 신장손상이 크지 않았기 때문이라고 생각된다.

본 실험에서, 사염화탄소의 처리로 신장의 형태학적 변화와 BUN의 증가가 관찰되었지만, 신장의 기능에 영향을 줄 정도의 손상이 아니기 때문에 [20] BUN이 증가된 것은 주령 또는 혈압에 따른 유의성이 없는 것으로 생각되었다.

AQP1은 토리쪽급슬세관과 가는내림가지에서 관찰되었다 (Fig. 2). 사염화탄소는 8주령과 24주령 고혈압군의 AQP1을 대조군보다 증가시켰고, 24주령 고혈압군의 AQP1은 24주령 정상혈압군보다 증가되었다 (Fig. 3). AQP2는 먼쪽세관과 집합세관, 집합관에서 관찰되었고 사염화탄소를 처리하면 AQP2가 증가되는 것을 알 수 있었다 (Figs. 4, 5). AQP2는 24주령 고혈압군에서 증가되었으며, 사염화탄소를 처리하면 8주령과 24주령 고혈압군의 AQP2를 정상혈압군보다 증가되는 것을 알 수 있었다 (24주령; $p < 0.05$). 또한 AQP1과 AQP2의 증가는 고혈압군에서 두드러졌다.

사염화탄소 처리로 AQP1이 증가된 것은 Fernández-Llama 등 [21]의 결과와, AQP2가 증가된 것은 Fujita 등 [22]의 결과와 비슷하였다. Buemi 등 [14]은 AQP2는 3주령 고혈압흰쥐의 신장에서 발현되기 시작하며, 7주령과 12주령 고혈압흰쥐의 신장과 소변 속에서 증가되는 것으로 보아, AQP2의 증가가 고혈압의 발병에 중요한 역할을 할 것이라고 하였다. Liard [23]는 증가된 AQP2가 수분재흡수를 증가시킴으로 순환 혈장량을 늘이며, 이는 결국 심장에 부담을 주게 된다고 하였다. 이들의 실험결과를 고려할 때, 본 실험에서 사염화탄소의 처리로 증가된 AQP1과 AQP2는 신세관의 수분조절 기전에 변화를 일으킬 것이라 생각되었고, 24주령의 고혈압군에서 유의성 있게 증

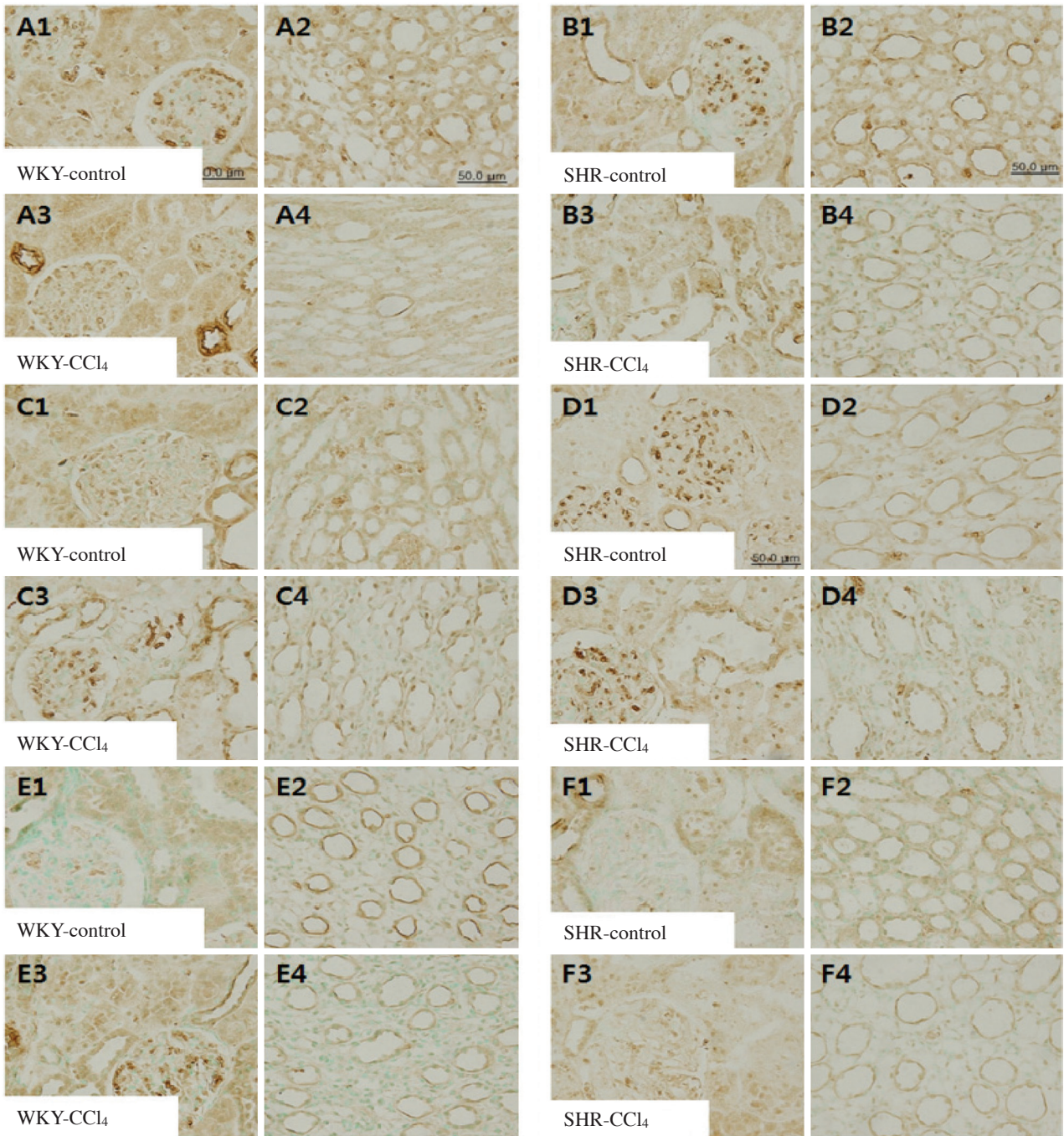
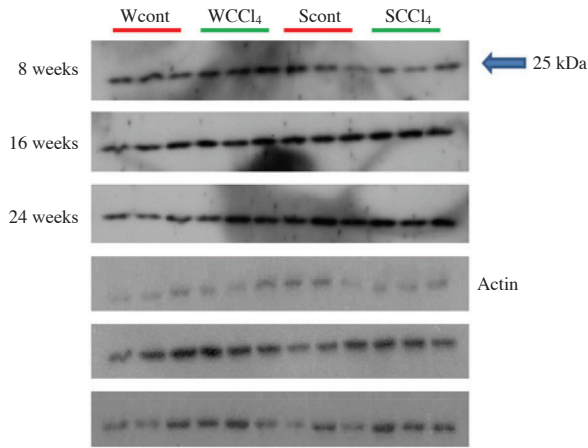


Fig. 8. Immunohistochemical staining of the expression of MnSOD. MnSOD is expressed in tubules of cortex and medulla. In SHR control groups, the expression of MnSOD was increased with aging. The treatment of CCl₄ during 4 weeks decreased the expression of MnSOD in 24 weeks SHR group (F3~4). A & B; 8 weeks group, C & D; 16 weeks group, E & F; 24 weeks group. Original magnification ×400.

가한 것으로 보아, AQP1과 AQP2의 증가는 고혈압 유무와 유병기간과 관련이 있다고 생각할 수 있었다. AQP1과 AQP2의 증가가 신장손상의 지표로 사용되는 것으로 보아, 고혈압흰쥐에서는 사염화탄소로 유도되는 신장손상이 정상혈압흰쥐보다 더 클 것이라 생각되었다.

CuZnSOD는 24주령 고혈압군에서 정상혈압군보다 증가되나, 사염화탄소를 처리하면 유의성 있게 감소되었다 (Figs. 6, 7). MnSOD 역시 24주령 고혈압군에서 유의성 있게 증가되었으나, 사염화탄소로 처리하면 감소되었다 (Figs. 8, 9). 사염화탄소 처리시 강력한 활성산소기 제거제

(A)



(B)

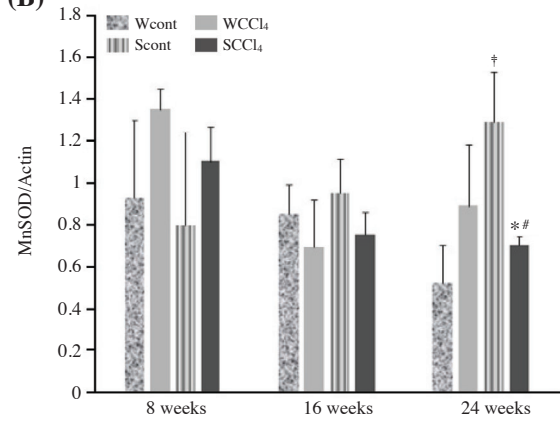


Fig. 9. Western blot of MnSOD in whole kidney homogenate of control and CCl₄-treated rats. The treatment of CCl₄ during 4 weeks increased the expression of MnSOD in 8 weeks and 16 weeks group, but it's not significant. In 24 weeks group, CCl₄ treatment decreased the expression of MnSOD significantly (**p*<0.05 vs. SHR-control within same age group, †*p*<0.05 vs. 24 weeks age Wcont, #*p*<0.05 vs. 8 weeks or 16 weeks age SCCL₄). Wcont; WKY control group, WCCL₄; WKY group treated with CCl₄, Scont; SHR control group, SCCL₄; SHR group treated with CCl₄ (n = 5, mean ± SD).

로 알려진 SOD가 유의하게 감소된 고혈압군, 특히 24주령에서 신장손상이 심할 것으로 생각할 수 있었다. 이러한 예측은 24주령 고혈압군에서 관찰된 신장의 형태학적 손상과 BUN 수치, AQP1과 AQP2 증가로 설명할 수 있다고 생각되었다.

Hsiao 등 [24]은 사염화탄소가 간에서 CuZnSOD 활성을 감소시키며, 항산화제를 함께 투여하면 SOD 활성이 대조군 수준으로 회복된다고 하였다. Ozturk 등 [2]은 사염화탄소를 처리하면 신장에서 CuZnSOD 단백질과 활성도가 감소되나 항산화물질을 투여하면 신장의 손상이 적어지고 SOD 활성 역시 대조군 수준으로 회복된다고 하였다. Natarajan 등 [3]도 사염화탄소로 간경화가 유도된 흰쥐에서는 신장 기능에도 문제가 생기며, 이러한 문제는 과도한 활성산소기의 생성 때문이며, 감소된 항산화효소는 신장의 산화 손상을 더 가중시킬 수 있다고 하였다. 이들의 실험 결과를 고려하면, 24주령의 CuZnSOD와 MnSOD가 사염화탄소 처리로 감소된 것으로 보아 24주령의 신장손상이 8주 또는 16주령 보다 클 것으로 생각되었다. 그리고 감소된 SOD는 사염화탄소로 유도되는 활성산소기를 처리하지 못하여 세포의 손상을 가중시킬 것이라 생각된다. 또한 본 실험결과에는 포함시키지 않았지만, 주령이 증가할수록, 그리고 고혈압흰쥐에서 간의 지방변성이 더 증가되는 것으로 보아 고혈압흰쥐의 간세포 역시 활성산소기를 처리하는데 비효율적일 것으로 생각되었다.

한편 대조군의 고혈압흰쥐에서는 주령이 증가할수록

CuZnSOD와 MnSOD가 증가되었는데, 이는 고혈압의 진행 과정이 SOD의 발현에 영향을 준 것으로 생각된다 (Figs. 6~9).

고혈압은 혈관과 심장, 신장에서 발현되는 항산화효소에 영향을 준다고 알려져 있다. Umamoto 등 [13]은 12주령 고혈압흰쥐의 심장에서 CuZnSOD가 감소되며 혈압약을 투여하면 CuZnSOD는 유의성 있게 증가되나, MnSOD의 발현에는 차이가 없고, 이는 고혈압과 관련이 없다고 하였다. 그러나, Ito 등 [25]은 고혈압흰쥐의 심장에서 MnSOD 활성이 감소된다고 하였다. Sainz 등 [26]은 N⁰-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) 투여로 고혈압을 유도하면, 흰쥐 신장의 겔질과 속질에서 CuZnSOD가 증가하며, 속질에서는 MnSOD의 활성이 증가된다고 하였고, 증가된 SOD의 활성은 고혈압의 병태생리 과정에 적응하는 결과라 하였다. Zhan 등 [27]은 고혈압흰쥐의 신장 속질에서 MnSOD가 감소되고, 겔질에서는 증가된다고 하였으나, 산화작용을 받아도 MnSOD의 활성에는 변화가 없다고 하였다. Hismiogullari 등 [28]은 사염화탄소를 흰쥐에 투여하면 산화손상의 증거인 malondialdehyde 생성과 신독성이 증가 된다고 하였다. 또한 이들은 항산화제로 알려진 강황 (curcumin)을 투여하면 malondialdehyde 생성이 감소되며, 이는 강황 즉 항산화제가 신장을 산화손상에서 보호하는 기전이라고 하였다.

본 실험에서는 24주령 고혈압군 신장에서 CuZnSOD와 MnSOD가 가장 많이 증가되었다. Sainz 등 [26]과 Zhan 등

[27]의 의견을 고려하면, 고혈압흰쥐의 신장에서 증가된 CuZnSOD와 MnSOD는 고혈압의 병태생리기전에 적응한 결과라 생각할 수 있었다. 또한 사염화탄소 처리는 고혈압군에서 SOD를 유의성 있게 감소시켰다. 이는 Zhan 등 [27]의 의견처럼 고혈압흰쥐에서 비록 SOD가 증가되어 있지만, 다량의 활성산소기가 발생할 경우 정상혈압흰쥐에 비해 이를 효과적으로 처리하지 못하며, 활성산소기로 인한 세관 상피세포의 손상으로 SOD 합성도 감소된 결과라 생각할 수 있었다.

본 실험에서는 사염화탄소를 처리함으로 생성되는 활성산소농도와 CuZnSOD와 MnSOD의 활성을 측정하지 못하였다. 앞으로의 연구에서 활성산소농도를 측정하고, 고혈압흰쥐에서 감소된다고 알려진 SOD 활성도를 측정하는 과정이 추가되어야 한다고 생각한다. 아직까지 활성산소기에 의해 증가되는 AQP과 SOD 활성 사이에 직접적인 관계가 있는지 명확히 알려져 있지 않으므로, 이를 확인할 수 있는 방법을 고안하고 시행한다면 더 의미 있는 연구가 될 것이라 생각되었다. 또한 고혈압의 발병과 관련이 있다고 알려진 세관상피의 나트륨채널 단백질에 대한 연구가 추가적으로 실시된다면, 활성산소기가 고혈압에서 관찰되는 수분불균형에 어떤 영향을 주는지 확인할 수 있을 것이라 생각된다.

본 연구자들은 고혈압흰쥐와 정상혈압흰쥐에 사염화탄소를 처리하면, AQP1과 AQP2의 발현이 증가되고, CuZnSOD와 MnSOD가 감소되는 것을 알았으며, 세관 손상이 유도되는 것을 확인하였다. 이러한 변화가 고혈압흰쥐 특히 24주령에서 더 명확하게 관찰되는 것으로 보아, 사염화탄소로 유도되는 활성산소기가 유병기간이 긴 고혈압흰쥐에서 AQP1과 AQP2를 증가시켜 수분균형을 변화시킬 것으로 생각되며, 감소된 CuZnSOD와 MnSOD는 신장손상을 가중시키는데 관여할 것이라 생각할 수 있었다.

참 고 문 헌

1. Claria J, Jimenez W. Renal dysfunction and ascites in carbon tetrachloride-induced cirrhosis in rats, in Ascites and renal dysfunction in Liver disease pathogenesis diagnosis and treatment edited by Arroyo V, Gines P, Rodes J, Schrier RW, Malden, Blackwell Science. 1999; 379-396pp. cited from Fernández-Llama P, Jimenez W, Bosch-Marcé M, Arroyo V, Nielsen S, Knepper MA. Dysregulation of renal aquaporins and Na-Cl cotransporter in CCl4-induced cirrhosis. *Kidney Int.* 2000; 58:216-28.
2. Ozturk F, Ucar M, Ozturk IC, Vardi N, Baticioglu K. Car-

- bon tetrachloride induced nephrotoxicity and protective effect of betaine in Sprague-Dawley rats. *Urology.* 2003; 62:353-6.
3. Natarajan SK, Basivireddy J, Ramachandran A, Thomas S, Prabhu Ramamoorthy P, Pulimood AB, et al. Renal Damage in experimentally-induced cirrhosis in rats: role of oxygen free radicals. *Hepato.* 2006; 43:1248-56.
4. Murata K, Mitsuoka K, Hirai T, Walz T, Agre P, Heymann JB, et al. Structural determinants of water permeation through aquaporin-1. *Nature.* 2000; 407:599-605.
5. Nielsen S, Frokiaer J, Marples D, Kwon TH, Agre P, Knepper MA. Aquaporins in the kidney: from molecules to medicine. *Physiol Rev.* 2002; 82:205-44.
6. Knepper MA. Molecular physiology of urinary concentrating mechanism: regulation of aquaporin water channels by vasopressin. *Am J Physiol.* 1997; 272:F3-F12.
7. Bedford JJ, Leader JP, Walker RJ. Aquaporin expression in normal human kidney and in renal disease. *J Am Soc Nephrol.* 2003; 14:2581-7.
8. Fernández-Llama P. Aquaporins and renal water metabolism. Role in the physiopathology of water retention in cirrhosis. *Gastroenterol Hepatol.* 2001; 24: 205-9.
9. Jun DW, Park JH, Park YS, Kang JS, Kim EK, Kim KT, et al. The role of nitric oxide in the expression of renal aquaporin 2 in a cirrhotic rat model: does an AVP-independent mechanism exist for the regulation of AQP2 expression? *Dig Dis Sci.* 2010; 55:1296-304.
10. Botsoglou N, Taitzoglou I, Zervos I, Botsoglou E, Tsantariotou M, Chatzopoulou PS. Potential of long-term dietary administration of rosemary in improving the antioxidant status of rat tissues following carbon tetrachloride intoxication. *Food Chem Toxicol.* 2010; 48:944-50.
11. Park JW, Qi WN, Liu JQ, Urbaniak JR, Folz RJ, Chen LE. Inhibition of iNOS attenuates skeletal muscle reperfusion injury in extracellular superoxide dismutase knockout mice. *Microsurgery.* 2005; 25:606-13.
12. Chen Z, Siu B, Ho YS, Vincent R, Chau CC, Hamdy RC, et al. Overexpression of MnSOD protects against myocardial ischemia/reperfusion injury in transgenic mice. *J Mol Cell Cardiol.* 1998; 30:2281-9.
13. Umemoto S, Tanaka M, Kawahara S, Kubo M, Umeji K, Hashimoto R, et al. Calcium antagonist reduces oxidative stress by upregulating Cu/Zn superoxide dismutase in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Hypertens Res.* 2004; 27:877-85.
14. Buemi M, Nostro L, Di Pasquale G, Cavallaro E, Sturiale A, Floccari F, et al. Aquaporin-2 water channels in spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens.* 2004; 17:1170-8.
15. de Zwart LL, Hermanns RC, Meerman JH, Commandeur

- JN, Salemink PJ, Vermeulen NP. Evaluation of urinary biomarkers for radical-induced liver damage in rats treated with carbon tetrachloride. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1998; 148:71-82.
16. Khan MR, Rizvi W, Khan GN, Khan RA, Shaheen S. Carbon tetrachloride-induced nephrotoxicity in rats: Protective role of *Digera muricata*. *J Ethnopharmacol*. 2009; 122:91-9.
17. Galkina E, Ley K. Leukocyte recruitment and vascular injury in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2006; 17:368-77.
18. Fukuda S, Tsuchikura S, Iida H. Age-related changes in blood pressure, hematological values, concentrations of serum biochemical constituents and weights of organs in the SHR/Izm, SHRSP/Izm and WKY/Izm. *Exp Anim*. 2004; 53:67-72.
19. Ogawa M, Mori T, Mori Y, Ueda S, Azemoto R, Makino Y, et al. Study on chronic renal injuries induced by carbon tetrachloride: selective inhibition of the nephrotoxicity by irradiation. *Nephron*. 1992; 60:68-73.
20. Bhattacharya H, Lun L, Gomez R. Biochemical effects to toxicity of CCl₄ on rosy barbs (*Puntius conchonius*). *Our Nature*. 2005; 3:20-25. cited from Khan MR, Rizvi W, Khan GN, Khan RA, Shaheen S. Carbon tetrachloride-induced nephrotoxicity in rats: Protective role of *Digera muricata*. *J Ethnopharmacol*. 2009; 122:91-9.
21. Fernández-Llama P, Jimenez W, Bosch-Marcé M, Arroyo V, Nielsen S, Knepper MA. Dysregulation of renal aquaporins and Na-Cl cotransporter in CCl₄-induced cirrhosis. *Kidney Int*. 2000; 58:216-28.
22. Fujita N, Ishikawa SE, Sasaki S, Fujisawa G, Fushimi K, Marumo F, et al. Role of water channel AQP-CD in water retention in SIADH and cirrhotic rats. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol*. 1995; 269:F926-F931.
23. Liard JF. Effects of a specific antidiuretic agonist on cardiac output and its distribution in intact and anephric dogs. *Clin Sci*. 1998; 74:293-9.
24. Hsiao G, Shen MY, Lin KH, Lan MH, Wu LY, Chou DS, et al. Antioxidative and hepatoprotective effects of antrodia camphorate extract. *J Agric Food Chem*. 2003; 51:3302-8.
25. Ito H, Torii M, Suzuki T. Decreased SOD activity and increased O₂⁻ production in cardiac hypertrophy of SHR. *Clin Exp Hyertens*. 1995; 17:803-16.
26. Sainz J, Wangenstein R, Rodríguez Gómez I, Moreno JM, Chamorro V, Osuna A, et al. Antioxidant enzymes and effects of tempol on the development of hypertension induced by nitric oxide inhibition. *Am J Hypertens*. 2005; 18:871-7.
27. Zhan CD, Sindhu RK, Pang J, Ehdaie A, Vaziri ND. Superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in the spontaneously hypertensive rat kidney: effect of antioxidant-rich diet. *J Hypertens*. 2004; 22:2025-33.
28. Hismiogullari AA, Hismiogullari SE, Karaca O, Sunay FB, Paksoy S, Can M, et al. The protective effect of curcumin administration on carbon tetrachloride (CCl₄)-induced nephrotoxicity in rats. *Pharmacol Rep*. 2015; 67:410-6.

The Effects of CCl₄ on the Expressions of Aquaporin and Superoxide Dismutase in the Kidney of the Spontaneously Hypertensive Rat

Kyung-Tae Kim, Doohwan Lee, Youn Kyoung Seo, Shin Young Kim

Department of Anatomy and Cell Biology, College of Medicine, Hanyang University

Abstract : Carbon tetrachloride (CCl₄) induces hepatocellular damage, resulting in liver cirrhosis by generating reactive oxygen species (ROS). At the stage of decompensated liver cirrhosis, many patients suffer from the abnormal regulation of sodium and water balance such as ascites. Also, the kidney can be directly damaged by CCl₄-induced ROS generation. The aquaporin (AQP) is an important transmembrane protein located in the kidney to reabsorb water, and it may be affected by the ROS to alter water balance. ROS is related with the development of hypertension and alteration of antioxidant enzymes.

This study was undertaken to investigate the effects of CCl₄ on the expression of AQPs (AQP1 and AQP2) and superoxide dismutase (SOD) in the kidney of spontaneously hypertensive rat (SHR) and normotensive Wistar-Kyoto rat (WKY). The SOD is known as a scavenger of ROS, and we hypothesized that oxidative stress in the aged kidneys may be increased by hypertension.

Male WKY and SHR were randomly divided into control and CCl₄-treated groups at 8, 16 and 24 weeks of age, respectively. The experimental group received olive oil-dissolved CCl₄ (1.6 mL/kg) on its back subcutaneous tissue twice a week for 4 weeks, and control animals received olive oil only. After 24 hours following the last injection, blood samples and kidneys were obtained under anesthesia. Renal histopathology was examined by H&E stain, and the expression of AQP1, AQP2, CuZn-SOD and Mn-SOD were evaluated by immunohistochemical methods and Western blot analysis.

CCl₄ treatment induced the tubular swelling, tubular epithelial atrophy or detachment in both WKY and SHR, and interstitial edema, tubular cast and infiltration of leukocyte in SHR.

The BUN levels in both WKY and SHR were increased by CCl₄ treatment at 16 weeks of age. The expression of AQP1 were increased by CCl₄ treatment at 8 and 24 weeks of age SHR. The expressions of AQP2 in 24 week-old control SHR was decreased compared to 8 week-old control SHR. CCl₄ treatment increased the expressions of AQP2 at 8 week-old and 24 week-old SHR, and the increasing of AQP2 was more remarkable in advanced age. The expressions of CuZnSOD and MnSOD were increased at 24 week-old control SHR compared to same aged WKY. Whereas the expression of CuZnSOD was increased by CCl₄ treatment in 8 week-old SHR, the expression of both CuZnSOD and MnSOD were decreased by CCl₄ treatment in 24 week-old SHR.

In summary, CCl₄-treated SHR showed an increase in AQP expression and a decrease in SODs at the advanced age. These results suggest that CCl₄-induced oxidative stress in the aged hypertensive rats may alter water balance via upregulation of AQPs and accelerate renal damage via downregulation of SODs.

Keywords : Spontaneously hypertensive rat (SHR), CCl₄, AQP, SOD

