

9237 尿細管におけるNaCl輸送のホルモン・薬物による制御

助成研究者:今井 正(自治医科大学 医学部)

共同研究者:吉富 宏治(自治医科大学)

:谷口 淳一(自治医科大学)

1. プロスタグランジンE₂(PGE₂)の接合尿細管(CNT),皮質部集合管(CCD)のイオン輸送に対する作用を調べるため、単離尿細管灌流法を用いて管腔内電位(V_t)および基底側膜電位(V_b)を測定した。
2. 1 mM PGE₂を浴液に加えると、CNTでは負の偏位とそれに引き続く正の偏位の2相性のV_t変化が見られたのに対し、CCDでは正の偏位の1相性の変化のみがみられた。PGE₂はV_bを変化させなかったため、これらの変化は主として管腔側膜電位の変化による。
3. Naを管腔から除くと、PGE₂によるV_tの変化は消失した。10 mM amilorideを管腔に加えると、第1相の負の偏位のみが発現し、第2相の正の偏位は消失した。CCDの正のV_t偏位も同様にamilorideで抑制された。
4. Ouabain 0.1 mM 存在下ではPGE₂の作用は完全に消失したため、その作用発現にはNa, K-ATPaseが正常に働いていることが必須と考えられた。
5. Ba 2 mM 存在下では、PGE₂の作用は変わらなかった。
6. Chlorophenylthio-cAMP 0.1 mM によりPGE₂の負の電位偏位のみが抑制された。
7. 正のV_t偏位は細胞内Ca遊離抑制薬TMB-8 50 mM により抑制されたのに対し、管腔からのCa除去はPGE₂の作用に全く影響を与えなかった。
8. これらの所見より、第1相の負の偏位はアミロライド非感受性のひ選択性カチオンチャネルからのNa流入の増加が関与するのに対して、第2相はアミロライド感受性Naチャネルの抑制が関与すると考えられる。第1相の負の偏位にはcAMPを経由する情報伝達系が関与するものと考えられる。

9237 尿細管におけるNaCl輸送のホルモン・薬物による制御

助成研究者:今井 正(自治医科大学 医学部)

共同研究者:吉富 宏治(自治医科大学)

:谷口 淳一(自治医科大学)

1. 研究目的

プロスタグランジンE₂(PGE₂)は尿細管に直接作用する(8, 14)。PGE₂は皮質部集合管に作用してNa輸送を抑制することが明らかにされているが(11, 24)、膜レベルでの作用機序は不明である。これまでの報告によれば作用機序としては1) Na, K-ATPaseの抑制(13, 16)、2) 管腔側膜からのNa流入の抑制(22)、3) 基底側膜のNa/Ca交換系の抑制(18)の3つが考えられている。Hebertら(10)はPGE₂によって細胞内Caが上昇することによってNa輸送が抑制されることを報告しているが、その機序の詳細は不明である。

PGE₂は接合尿細管(NT)及び皮質部集合管(CD)の細胞の腫脹を来すことから、この両者にPGE₂の受容体があると考えられる(18)。PGE₂はCDに作用して管腔内電位(V_t)を抑制することが知られているが(8)、NTにも同様の作用を示すかどうか不明である。そこで、本研究では膜電位を指標にしてPGE₂のCD, NTのイオン輸送に対する作用を明らかにした。

2. 方法

2.1. 単離尿細管灌流法

Burgらの方法(3)に準じて単離尿細管を灌流した(18-20)。2.0-2.5kg白色ウサギをベントバルビタールで麻酔し(3.5mg/kg, i.v.)、両側の腎を摘出し、1-2mmの厚さのスライスを作成した。接合尿細管(NT)、皮質部集合(CD)を単離し、灌流した。浴液は静水圧で流速5-10ml/minに調節した。

2.2. 電気生理学的方法

管腔内電位V_tは灌流ピペットに装着した1M KClを含む寒天ブリッジをカロメル電極につなぎ、2チャンネル電位計(Duo773, WP-Instrument, Newlaven, CT)に接続した。浴槽は寒天ブリッジ、カロメル電極を介して接地した。基底側膜電位V_bは1M KClを満たした常用の細胞内電極を穿刺して測定した。

2.3. 溶液

用いた溶液の組成は以下の通りである (mM)。115 NaCl, 5.0 KCl, 25 NaHCO₃, 1.0 Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, 1.8 CaCl₂, 1.0 MgCl₂, 5.0 Na acetate, 5.0 D-glucose, 5.0 L-alanine. 溶液は95%O₂, 5%CO₂を通気することによりpH7.4にコントロールした。無Na液はN-methyl-D-glucamineにより置換した。無Ca液はCaCl₂をNaClに置換し、2 mM EGTAを加えた。

3. 成績

3.1. 接合尿細管CNTに対する作用

3.1.1. PGE₂のV_t, V_bに対する作用

1 μM PGE₂を溶液に加えるとV_tは最初に負の方向へ次いで正の方向への2相性の変化がみられた (Fig. 1)。最初の負の偏位は0.5-1.5分で始まり、約5分でピークに達した。ついでV_tは正の方向に偏位し、15-20分で平衡状態に達した。負および正のV_t偏位の大きさはPGE₂の用量に依存して大きくなった (Table 1)。

V_tの変化が管腔側膜かそれとも基底側膜の変化によるものであるかを明かにするため、細胞穿刺を行ない、V_tとV_bを同時に測定した (Fig. 2, Table 2)。V_tの2相性の変化にもかかわらず、V_bは不変であったことより、PGE₂は主として管腔側膜の電位V_aを変化させることがわかる。PGE₂はNa, K-ATPaseを抑制すると報告されているので、V_bに対するouabainの作用と比較した (Fig. 2)。OuabainはPGE₂の作用と異なって、明らかにV_tとV_bを抑制した。したがって、PGE₂による電位変化はNa, K-ATPaseの抑制によるものではないことは明らかである。

3.1.2. Ouabainの作用

PGE₂の作用機序を明らかにすべく、まずouabain存在下でPGE₂がどのように作用するかを観察した。Ouabain 100 nMによりV_tは -20.1 ± 1.3 mVから -0.3 ± 0.2 mVに抑制された。この状態でPGE₂を投与してもV_tは全く変化しなかった。このことは、PGE₂の作用発現には基底側のNa, Kポンプが働いていることが前提となることを示している。

3.1.3. Ba²⁺の作用

CNT細胞は管腔側膜にBa²⁺感受性のKコンダクタンスがある。PGE₂がこのコンダクタンスに影響を与えるかどうかを検討した。管腔内に2mM Ba²⁺を加えてもPGE₂によるV_tの2相性の変化は保持され、Ba²⁺未処置の場合と有意の差がなかった。したがって、PGE₂によるV_tの変化にはKコンダクタンスは関与しないと考えられる。

3.1.4. AmilorideまたはNa除去の影響

管腔側膜のNaコンダクタンスが関与するかどうか検討するため、amilorideまたはNa除去の条件で

PGE₂の作用を観察した。Fig. 3に示すように、10 μM amiloride によってVtは著明に抑制されたが、この条件下にPGE₂を投与するとPGE₂によるVtの2相性の反応は著明に抑制された。特に第2相の正の偏位は完全に抑制された。

第1相の負の偏位は完全には抑制されなかったので、amiloride感受性Naチャネル以外のNaコンダクタンスが関与する可能性を考え、Na除去の影響について検討した(Fig. 4)。Amiloride存在下では第1相の負の偏位は残るが、Na除去によりPGE₂に対する反応は完全に消失した。Naを再び加えるとPGE₂に対する典型的な2相性の反応は回復した。8例の実験で同様のことが確認された。

3.1.5. CPT-cAMPの作用

PGE₂の作用にcAMPが関与するかどうかを見るため、PGE₂のVtに対する作用をcAMPの存在下で調べた。cAMPは単独でVtの2相性の変化を起こす。Vtが安定した状態で1 μMのcAMPを浴液に加えると、Table 3に示すように、第1相の負のVt偏位は見られず、第2相の正の偏位のみが見られた。

3.1.6. TMB-8の作用

PGE₂によって細胞内ストアからのCa遊離が起こる。PGE₂によるCa遊離がVt変化に関与するかどうか調べるため、その抑制薬であるTMB-8の作用を調べた。Fig. 5に示すように、50 μMのTMB-8処理によりVtが減少した。30分後にPGE₂を加えると、第1相の負の偏位は見られたが、第2相の正の偏位は消失した。

3.1.7. 管腔内Ca除去の効果

管腔からのCaの流入が関与するかどうか調べた。管腔内からCaを除き2mM EGTAを加えると、Vtは軽度負に偏位したが、この状態でPGE₂を加えると、正常の2相性の反応が見られた(Fig. 6)。したがって、PGE₂によるVtの変化は管腔からのCaの流入は関与しないことが分かる。

3.2. 皮質部集合管に対する作用

3.2.1. Vtに対する作用

Fig. 7に示すように、CCDに対してはPGE₂はCNTと異なり、Vtを正に偏位させるのみで、2相性の反応はみられなかった。

3.2.2. amilorideの作用

amilorideの管腔内投与によりVtは正の偏位を示した(Fig. 8)。この時、PGE₂を加えても電位はまったく変化しなかった。

4. 考察

PGE₂はCCDに作用してNa輸送を抑制すると報告されている(11, 24)。この論文ではPGE₂はCNTにも作用

することを報告した。これは細胞の腫大からみた PGE_2 の作用部位がDCT, CNT, CCDであるとした前報の結果と良く一致する(18)。

4.1. 管腔側膜のNaコンダクタンス

PGE_2 は V_b をほとんど変化させることなく V_t を変化させることから、 V_t の変化は主として V_a の変化を反映する。CNTの管腔側膜のイオンコンダクタンスとしては① Naチャンネル、② Kチャンネル、③ 非選択性カチオンチャンネルの3つが知られている(17,19,28)。管腔内からNaを除くと、 PGE_2 に対する V_t 変化は完全に消失したが、Ba存在下では PGE_2 に対する反応は不変であった。したがって、 V_t の変化はNa流入の変化によるものであり、Kチャンネルの関与はない。amilorideにより第2相の正の V_t 偏位は抑制されたが、第1相の負の偏位は抑制されなかったことより、第1相の偏位にはアミロライド非感受性のNa流入過程、おそらく非選択性カチオンチャンネルが促進されると考えられる。

一方、CCDでは PGE_2 により V_t は単純に正の変化のみを示した。この変化はamilorideにより完全にブロックされたので、アミロライド感受性Naコンダクタンスの関与が考えられる。

PGE_2 はNa, K-ATPaseを抑制することが報告されている(3,16,27)。したがって、Naポンプの抑制により PGE_2 がナトリウム利尿を起こす可能性が考えられる。しかしながら、われわれの成績によれば PGE_2 の V_t, V_b に対する作用はouabainと全く異なっていたので、ナトリウムポンプの抑制が PGE_2 の利尿作用の主要な機序であるとは考え難い。

4.2. Caの役割

Na輸送はCaによって調節されていることが知られている。CCDでは細胞内Caの上昇により、管腔側膜のNaコンダクタンスが抑制されることが報告されている(7)。Tayler, Windhager(25)は細胞内Caの上昇による管腔側膜のNaコンダクタンスの抑制は、Na輸送調節のフィードバック機構として重要であることを指摘している。Caは直接Naチャンネルに働いて、これを抑制する他に(4, 9)、蛋白キナーゼCの活性化を介してNaチャンネルを抑制する可能性が考えられる(15)。

ウサギのCCDでは、 PGE_2 は細胞内ストアーからCaを遊離することが報告されている(2,10)。 PGE_2 はCNTでもCaを上昇させるので(18)、これによりNaコンダクタンスが抑制されることが考えられる。細胞内ストアーからのCa遊離をIMB-8で抑制すると、負の V_t 偏位のみが発現したことから、第2相の V_t の正の偏位はCaによるNaコンダクタンスの抑制が関与していると考えられる。

4.3. cAMPの役割

PGE_2 はCaのほかにcAMPを経由して生理的作用を発現することが知られている(21)。我々はすでにCNTでcAMPが P_{III} の作用を模倣してアミロライド非感受性のNa流入を促進することを報告した。 PGE_2 による第1相の負の V_t 偏位はcAMPによる偏位に対して付加的ではないことから、この作用はcAMPを経由すると考えられる。この第1相の反応はIMB-8では抑えられなかったので、細胞内Caによるものではない。このような非選択的カチオンチャンネルの促進はガマの膀胱膜でも認められている(1, 26)。

非選択的カチオンチャンネルの生理的意義は不明であるが、 PGE_2 によりCa輸送が促進される可能性がある。これはindomethacinによって尿中のCa排泄が増加することからも考えられる(x)。

PIIIと PGE_2 の V_t に対する作用は似ているが、詳細に見るとやや異なった面がある。PIIIの場合はまず管腔側膜の非選択的カチオンチャンネルを通してCaが流入し、これによってアミロライド感受性Naチャンネルが抑制される(19,20)。一方、 PGE_2 の場合はこのようなシステムも作動するが、Caを管腔から除いても第2相の V_t 偏位は起こるので、細胞内ストアからのCa遊離もアミロライド感受性Naチャンネルの抑制に関与していると考えられる。

4.4. 結論

PIE_2 はCNTに作用して2相性の V_t 変化を起こす。第1相は管腔側膜の非選択的カチオンチャンネルからのNa流入促進がおり、第2相では管腔側膜のアミロライド感受性Naチャンネルの抑制が起る。一方、CCDに対しては V_t の正の偏位のみを起こす。CNTの第1相の負の V_t 偏位はcAMPによる。第2相の正の偏位には細胞内ストアからのCa流入が関与する。

Table 1 Effect of PGE_2 on transmural voltage (V_T) of the rabbit CNT

PGE_2 (μM)	Control	Experimental	
		Negative	Positive
0.01 (n=6)	-11.0 ± 2.6	-12.7 ± 2.7 $\Delta = -1.8 \pm 0.6^*$	-10.6 ± 2.8 $\Delta = 2.1 \pm 0.6^*$
0.1 (n=7)	-11.0 ± 2.6	-13.3 ± 2.8 $\Delta = -2.3 \pm 0.5^{**}$	-10.1 ± 2.3 $\Delta = 3.2 \pm 0.6^{**}$
1 (n=5)	-12.9 ± 2.5	-16.5 ± 2.7 $\Delta = -3.6 \pm 0.7^{**}$	-11.6 ± 2.4 $\Delta = 5.0 \pm 0.9^{**}$

Units are mV. Data for the experimental period are taken at the peak of initial negative deflection(Negative) and the peak of later positive deflection or steady state (Positive). Δ , voltage change; n, number of experiments; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ as compared to zero.

Table 2 Effect of PGE₂ (1 μM in the bath) on transmural voltage (V_T) and basolateral membrane voltage (V_B) of rabbit CNT

Voltage	Control	Experimental	
		Negative	Positive
V _T	-13.8 ± 4.0	-17.4 ± 4.3 Δ = -3.6 ± 0.4**	-11.6 ± 3.2 Δ = 5.8 ± 1.4*
V _B	-83.5 ± 2.3	-83.2 ± 2.0 Δ = -0.3 ± 0.5	-82.6 ± 1.6 Δ = 0.6 ± 0.7

Units are mV. The data for V_T and V_B were obtained from the same tubules (n=5). Abbreviations are same as in Table 1.

*P<0.05, **P<0.01 as compared to zero.

Table 3 Effect of PGE₂ on transmural voltage (V_T) of rabbit CNT in the presence of CPT-cAMP

Control	Experimental (PGE ₂ 1 μM)	
	Negative	Positive
-14.5 ± 4.2	-14.6 ± 4.2	-10.1 ± 3.1
	Δ = -0.1 ± 0.2	Δ = 4.4 ± 1.2*

The data were obtained from 5 tubules. Effects of PGE₂ were observed in the presence of 0.1 mM chlorophenylthio-cAMP (CPT-cAMP) in the bath. Abbreviations are same as in Table 1.

* P<0.05 as compared to zero

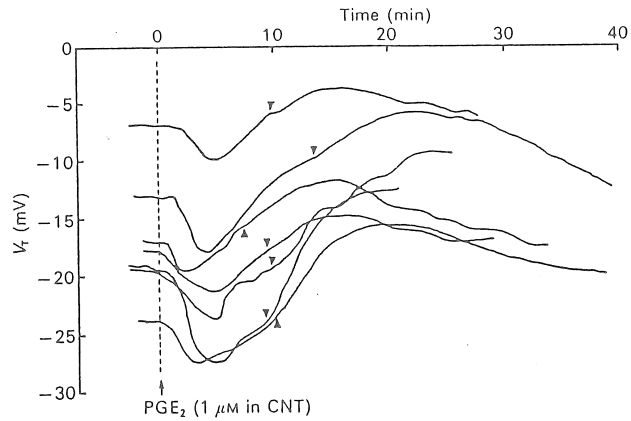


Fig. 1. Time course of transmembrane voltage (V_T) of rabbit connecting tubule after administration of PGE_2 ($1 \mu M$) to the bathing solution. The arrows indicate the time when PGE_2 was eliminated from the bathing fluid.

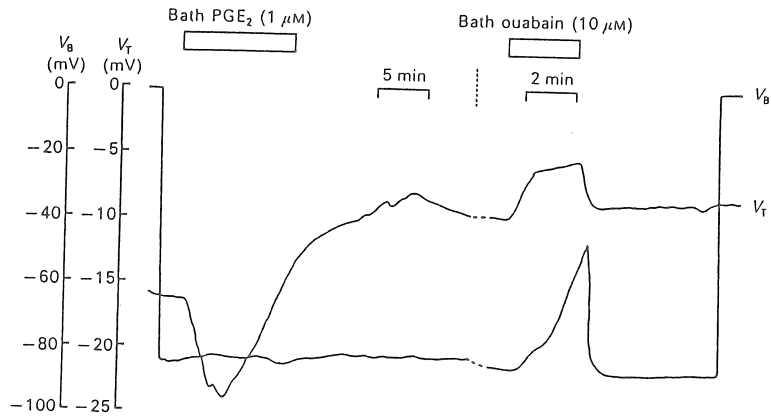


Fig. 2. A representative study examining the effects of PGE_2 and ouabain on V_T and basolateral membrane voltage (V_B) of the connecting tubule. PGE_2 ($1 \mu M$) and ouabain ($10 \mu M$) were added to the bathing solution.

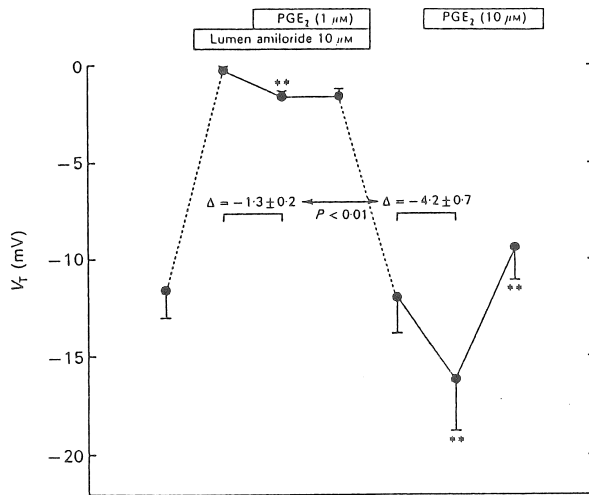


Fig. 3. Summary of seven paired experiments in which the effect of PGE₂ on V_T was observed in the connecting tubule with or without addition of amiloride (10 μM) to the lumen. The V_T values (mV) for each period were -11.6 ± 1.6, -0.3 ± 0.2, -1.6 ± 0.2, -12.1 ± 1.9, -16.3 ± 2.6, and -9.6 ± 1.6.

***p* < 0.01 compared to the preceding values.

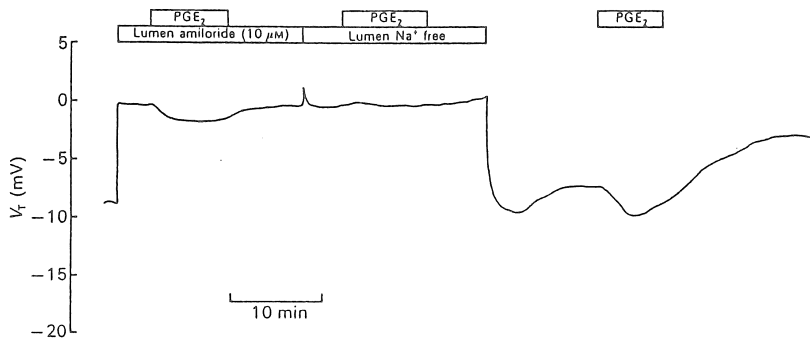


Fig. 4. A representative study showing the effect of PGE₂ on V_T in the connecting tubule in the presence of luminal amiloride (10 μM) and elimination of luminal Na⁺. Both maneuvers induced positive deflection of V_T. In the first period with luminal amiloride, PGE₂ induced a small negative deflection of V_T. But in the second period, under the luminal Na⁺-free condition, PGE₂ did not change V_T. The intactness of the biphasic response of V_T to PGE₂ was confirmed in the final period.

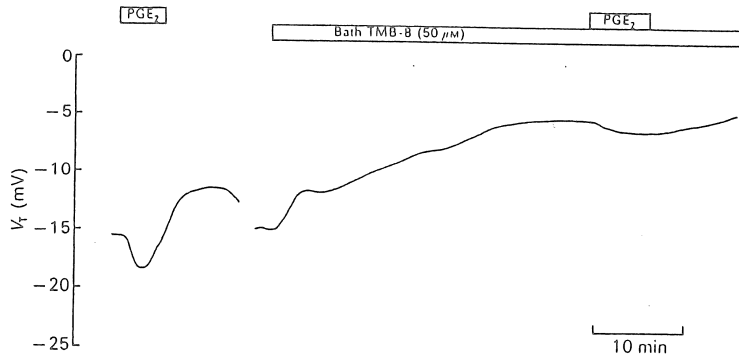


Fig. 5. A representative study showing the effect of PGE₂ on V_T in the connecting tubule in the presence of TMB-8 in the bathing solution. The PGE₂-induced depolarization was inhibited in the presence of TMB-8 (50 μM). The similar observations were made in five tubules.

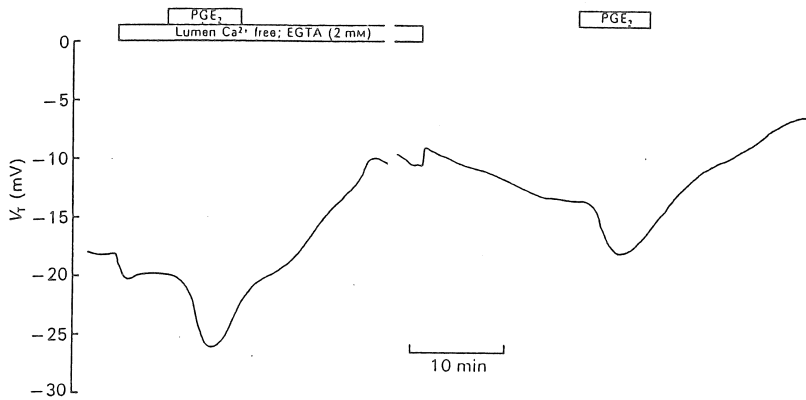


Fig. 6. A representative study showing the effect of PGE₂ on V_T in the connecting tubule under the elimination of luminal Ca²⁺. In the initial period, the effect of PGE₂ was observed under luminal Ca²⁺-free condition. In the next period, the effect of PGE₂ was again observed with restoration of luminal Ca²⁺. In five paired experiments, it was confirmed that the PGE₂-induced biphasic response in V_T was unchanged in the absence of luminal Ca²⁺.

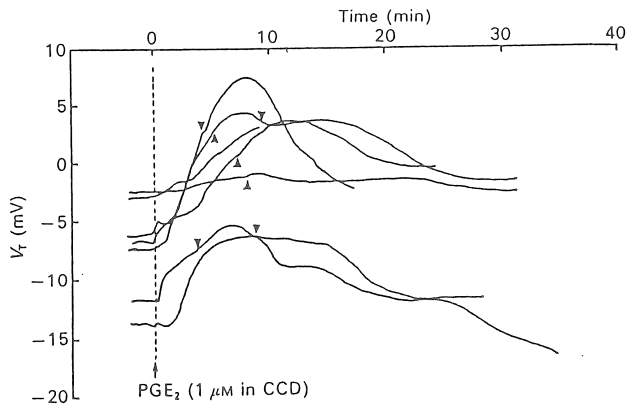


Fig. 7. Time course of (V_T) of rabbit cortical collecting duct after administration of PGE_2 . PGE_2 ($1 \mu M$) was added to the bathing solution. The arrows indicate the time when PGE_2 was eliminated from the bathing fluid..

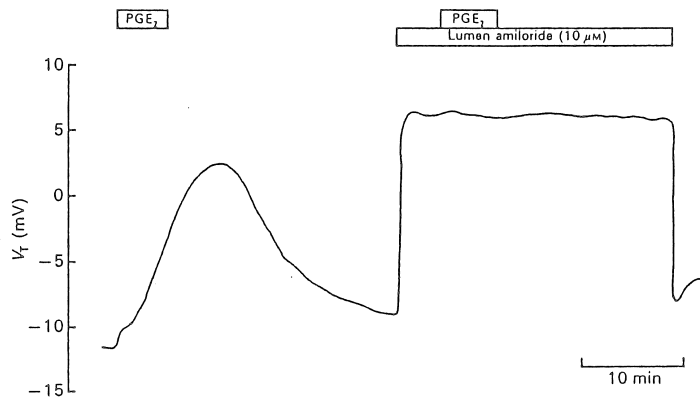


Fig. 8. A representative study showing the effect of PGE_2 on V_T in the cortical collecting duct in the presence of luminal amiloride ($10 \mu M$). PGE_2 -induced depolarization in V_T is completely blocked by luminal amiloride administration.

REFERENCES

- 1) AELVOET, I., ERLIJ, D. & VAN DRIESSCHE, W. (1988) Activation and blockage of calcium-sensitive cation-selective pathway in the apical membrane of toad urinary bladder. *Journal of Physiology* **398**, 555-574.
- 2) BREYER, M.D., JACOBSON, H.R. & HÉBERT, R. (1990) Cellular mechanisms of prostaglandin E₂ and vasopressin interactions in the collecting duct. *Kidney International* **38**, 618-624, 1990.
- 3) BURG, M., GRANTHAM, J., ABRAMOW, M. & ORLOFF, J. (1966) Preparation and study fragments of single rabbit nephron. *American Journal of Physiology* **210**, 1293-1298.
- 4) CHASE, H.S.Jr. & AL-AWQUATI, Q. (1983) Calcium reduces the sodium permeability of luminal membranes vesicles from toad bladder. studies using a fast reaction apparatus. *Journal of General Physiology* **81**, 643-666.
- 5) CHIOU, C.Y. & MALAGODE, M.H. (1975) Studies on the mechanism of action of new Ca²⁺ antagonist, 8-(N,N-diethylamino)octyl-3,4,5, trimethoxybenzoate hydrochloride in smooth and skeletal muscles. *British Journal of Pharmacology* **53**, 279-285.
- 6) COLETTE, C., AGUIRRE, L., MOMMIER, L. & MIMRAN, A. (1982) The influence of indomethacin and possible role of prostaglandins on calcium renal excretion. *Renal Physiology* **5**, 68-75.
- 7) FRINDT, G. & WINDHAGER, E.E. (1990) Ca²⁺-dependent inhibition of sodium transport in rabbit cortical collecting tubules. *American Journal of Physiology* **258**, F568-F582.
- 8) FROLICH, J.C., WILSON, T.W., SWEETAN, B.J., SMIGEL, M. NIES, A.S., CARR, K., WATSON, J.T. & OATES, J.A. (1973) Urinary prostaglandins. Identification and origin. *Journal of Clinical Investigation* **55**, 763-770.
- 9) GARTY H., ASHER, C. & YEGER, O. (1987) Direct inhibition of epithelial Na⁺ channels by Ca²⁺ and other divalent cation. *Journal of Membrane Biology* **96**, 151-162.
- 10) HÉBERT, R.L., JACOBSON, H.R. & BREYER, M.D. (1991) Prostaglandin E₂ inhibits sodium transport in rabbit cortical collecting duct by increasing intracellular calcium. *Journal of Clinical Investigation* **87**, 1992-1998.
- 11) IINO, Y. & IMAI, M. (1978) Effect of prostaglandins on Na transport in isolated collecting tubules. *Pfluegers Archiv* **373**, 125-132.
- 12) IMAI, M. (1979) The connecting tubule. A functional subdivision of the rabbit distal nephron segments. *Kidney International* **15**, 346-356.
- 13) JABS, K. ZEIDEL, M.L. & SILVA, P. (1989) Prostaglandin E₂ inhibits Na⁺/K⁺-ATPase activity in the inner medullary collecting duct. *American Journal of Physiology* **257**, F424-F430.
- 14) KOKKO, J.P. (1981) Effect of prostaglandins on renal epithelial electrolyte transport. *Kidney International* **19**, 791-796.
- 15) LING, B. & EATON, D.C. (1989) Effect of luminal Na⁺ on single Na⁺ channel in A6 cells, a regulatory role for protein kinase C. *American Journal of Physiology* **256**, F1094-F1103.

- 16) MARVER, D. & ANWAR-KHAN, R. (1988) Mechanism of inhibition of Na⁺/K⁺-ATPase by PGE₂ in the rabbit cortical collecting tubule (CCT) . *Journal of Cell Biology* **107**, 398a (Abstract).
- 17) MUTO, S, YASOSHIMA,, K, YOSHITOMI, K, IMAI, M, & ASASNO, Y. (1990) Electrophysiological identification of α- and β-intercalated cells and their distribution along the rabbit distal nephron segments. *Journal of Clinical Investigation* **86**, 1829-1839.
- 18) SHIMIZU, T. NARUSE, M., NAKAMURA, M., YOSHITOMI, K. & IMAI, M. (1992) Mechanism of PGE₂ induced cell swelling in distal nephron segments. *American Journal of Physiology* (in press).
- 19) SHIMIZU, T., YOSHITOMI, K., NAKAMURA, M. & IMAI, M. (1990a) Effect of parathyroid hormone on the connecting tubule from the rabbit kidney: biphasic response of transmural voltage. *Pfluegers Archiv* **416**, 252-261.
- 20) SHIMIZU, T., YOSHITOMI, K., NAKAMURA, M. & IMAI, M. (1990b) Effect of PTH, calcitonin, and cAMP on calcium transport in rabbit distal nephron segments. *American Journal of Physiology* **259**, F408-F414.
- 21) SONNENBURG, W.K. & SMITH, W.L. (1988) Regulation of cAMP metabolism in rabbit cortical collecting tubule cells by prostaglandins. *Journal of Biochemistry* **263**, 6155-6160.
- 22) STOKES, J.B. (1986) Patterns of K⁺ permeation following inhibition of Na⁺ transport in rabbit cortical collecting tubule. *American Journal of Physiology* **250**, F120-F126.
- 23) STOKES, J.B. (1979) Effect of prostaglandin E₂ on chloride transport across the rabbit thick ascending limb of Henle. Selective inhibition of the medullary portion. *Journal of Clinical Investigation* **64**, 495-501.
- 24) STOKES, J.B. & KOKKO, J.P. (1977) Inhibition of sodium transport by prostaglandin E₂ across the isolated perfused rabbit collecting tubule. *Journal of Clinical Investigation* **59**, 1099-1104.
- 25) TAYLOR, A. & WINDHAGER, E.E. (1979) Possible role of cytosolic calcium and Na-Ca exchanger in regulation of transepithelial sodium transport. *American Journal of Physiology* **239**, F505-F512.
- 26) VAN DRIESSCHE, W., AELVOET, I. & ERLIJ, D. (1987) Oxytocin and cAMP stimulate monovalent cation movements through a Ca²⁺-sensitive, amiloride-insensitive channel in the apical membrane toad urinary bladder. *Proceedings of National Academy of Sciences, USA* **84**, 313-317.
- 27) WALD, H., SCHERZER, P., RUBINGER, D. & POPOUTZER, M.M. (1989) Effect of indomethacin in vivo and PGE₂ in vitro on mTAL Na⁺/K⁺-ATPase of kidney. *Clinical Research* **37**, 586 (Abstract).
- 28) YOSHITOMI, K., SHIMIZU, T. & IMAI, M. (1988) Functional cellular heterogeneity in the rabbit connecting tubule. *Kidney International* **33**, 430 (Abstract).

Mechanisms of Action of Hormones and Drugs on NaCl Transport across Renal Tubules (Effects of prostaglandin E₂ on the CNT and CCD)

Masashi Imai, M.D.

Department of Pharmacology, Jichi Medical School, Tochigi

1. Effects of prostaglandin E₂ (PGE₂) on ion transport were examined by observing the transmural (V_T) and basolateral membrane voltage (V_B) in the in vitro perfused rabbit connecting tubule (CNT) and the cortical collecting duct (CCD).
2. Addition of 1 μ M PGE₂ to the bath induced a biphasic response of transmural voltage (V_T), with initial negative V_T deflection followed by positive deflection in the CNT, but monophasic negative deflection in the CCD. Because PGE₂ had no effect on the basolateral membrane voltage (V_B), PGE₂ mainly causes changes in the apical membrane voltage.
3. Elimination of Na⁺ from the lumen abolished the PGE₂-induced V_T response in the CNT. In the presence of 10 μ M luminal amiloride, PGE₂ only caused initial negative deflection without causing later positive deflection. The positive V_T deflection induced by PGE₂ in the CCD was also blocked by luminal amiloride.
4. Addition of ouabain (0.1 mM) to the bath completely abolished the PGE₂-induced V_T changes in the CNT, indicating that intact Na⁺-K⁺ pump is prerequisite for the V_T response to PGE₂.
5. Addition of 2 mM Ba²⁺ to the lumen did not affect biphasic V_T response to PGE₂, indicating that Ba²⁺ sensitive K⁺ conductance is not involved.
6. Basolateral addition of 0.1 mM 8-(p-chlorophenylthio)-cAMP inhibited only the negative V_T deflection induced by PGE₂.
7. The positive V_T deflection was blocked by basolateral addition of 50 μ M 8-(N,N-dimethylamino) octyl-3,4,5-trimethoxy-benzoate hydrochloride (TMB-8), an inhibitor of intracellular Ca²⁺ release. But elimination of luminal Ca²⁺ did not affect the biphasic response to PGE₂.
8. These findings suggest that the initial negative V_T deflection is caused by an increase in Na⁺ influx across the luminal membrane through an amiloride-insensitive Na⁺ conductive pathway, whereas the later positive deflection is caused by the inhibition of Na⁺ influx through the amiloride-sensitive Na⁺ conductive pathway. The cAMP messenger system may be responsible for the initial negative deflection, whereas an increased intercellular Ca²⁺ released from the store is necessary for the later positive deflection caused by PGE₂. The response in the CCD is comparable to the later response in the CNT.