

47

助成番号 0047

長期間の高 NaCl 食および高 KCl 食が門脈-肝臓領域 Na^+ , K^+ 受容器発現 および門脈-肝臓領域受容器を介する Na^+ , K^+ 調節機構の感度に及ぼす影響

助成研究者：森田 啓之 (岐阜大 医学部)
 共同研究者：土谷 庸 (岐阜大学 生理学講座)
 坂野 喜子 (岐阜大学 生化学講座)
 中島 茂 (岐阜大学 生化学講座)

我々はこれまでの助成により、門脈-肝臓領域 Na^+ , K^+ 受容器が体液恒常性維持に重要な役割をはたしていることを報告してきた。この受容器は bumetanide-sensitive Na^+ - K^+ -2Cl⁻ cotransporter (NKCC1) を介し、門脈血中 Na^+ , K^+ 濃度を感知し、肝臓求心神経を介して中枢の孤束核、最後野、室傍核、視索上核等に投射して、反射性に腎臓の排泄機能および腸管の吸収機能を調節している。門脈-肝臓領域は腸管から吸収された Na^+ , K^+ が、体循環系に到達し、体循環系血液で希釈される前に通過する場所であり、門脈血中 Na^+ , K^+ 濃度は食餌中の Na^+ , K^+ 濃度により影響を受ける。従って、高 NaCl 食および高 KCl 食では、この受容器が長期にわたり高 Na^+ , K^+ 濃度に曝され、受容器発現および受容器感度が何らかの影響を受ける可能性がある。本研究ではこの可能性を検討するため、Sprague-Dawley ラットを4週間(7~11週齢)にわたり高 NaCl 食 (Na^+ 3%, K^+ 0.8%), 高 KCl 食 (Na^+ 0.3%, K^+ 8%) で飼育し、受容器感度および NKCC1 発現を調べ、正常食ラットと比較した。

肝臓求心神経活動を測定しながら高張 NaCl 溶液 (0.375 M, 0.75 M, and 1.5 M) および等張 KCl + NaCl 溶液 (25 mM KCl + 125 mM NaCl, 50 mM KCl + 100 mM NaCl, and 100 mM KCl + 50 mM NaCl) を肝門脈内に投与した (0.1, 0.2, 0.5, and 1.0 ml/kg body wt)。この投与に対し、肝臓求心神経活動は Na^+ および K^+ 濃度依存性に増加した。しかし、その増加は正常食ラットに比べ、高 NaCl 食および高 KCl 食ラットでは有意に抑制されていた。RT-PCR および Western blot により NKCC1 の mRNA およびタンパク発現を調べた。高 NaCl 食および高 KCl 食ラットでは正常ラットに比べ NKCC1 の mRNA 発現が有意に抑制されていた (正常食 1.13 ± 0.15 , 高 NaCl 食 0.67 ± 0.40 , 高 KCl 食 0.64 ± 0.11)。さらに、タンパク発現も高 NaCl 食および高 KCl 食ラットで有意に抑制されていた (正常食 2075 ± 202 , 高 NaCl 食 1016 ± 113 , 高 KCl 食 866 ± 209)。

以上の結果より、高 NaCl 食および高 KCl 食により NKCC1 の mRNA とタンパクの発現が抑制され、門脈-肝臓領域 Na^+ , K^+ 受容器感度が低下することが明らかになった。目的論的に考えれば、高 NaCl 食および高 KCl 食により NKCC1 の発現を増加させ、門脈-肝臓領域 Na^+ , K^+ 受容器感度を高めて、増加した Na^+ , K^+ の尿中への排泄を図らなければならない。しかし、結果は逆であった。本研究で観察された門脈-肝臓領域 Na^+ , K^+ 受容器感度低下が、 Na^+ , K^+ バランス維持にどのような影響を及ぼしているかは不明であるが、長期的なバランスには殆ど影響してない可能性がある。実際 Na^+ 負荷量をステップ状に増加させると、直後の2日間だけ肝臓除神経ラットで有意に Na^+ が蓄積するが、それ以降の Na^+ バランスは正常ラットと差がなかった。高 NaCl 食および高 KCl 食が門脈-肝臓領域 Na^+ , K^+ 受容器感度低下の生理学的小および病態生理学的意義に関しては今後検討していく予定である。

1 2

助成番号 0047

長期間の高NaCl食および高KCl食が門脈—肝臓領域Na⁺、K⁺受容器発現および門脈—肝臓領域受容器を介するNa⁺、K⁺調節機構の感度に及ぼす影響

助成研究者：森田 啓之(岐阜大学 医学部第1生理学講座)
 共同研究者：土谷 庸(岐阜大学 医学部第1生理学講座)
 坂野 喜子(岐阜大学 医学部生化学講座)
 中島 茂(岐阜大学 医学部生化学講座)

【研究目的】

1965年 Haberich 等 [1] により、門脈—肝臓領域に浸透圧受容器が存在する可能性が初めて報告されて以来、この分野に関する多くの研究がなされてきた。その結果、浸透圧、血管内圧、イオン、グルコース、アミノ酸等に対する多くの受容機構が存在する事が明らかになり、よく知られている代謝、解毒、貯蔵臓器としての機能ばかりでなく、受容器臓器としての肝臓の役割が注目されている [2、3、4]。

門脈—肝臓領域に受容器が存在する利点として、以下の2点が挙げられる：

- 肝門脈血流は心拍出量の20～25%であり、この領域の受容器は体循環系の血流により約5倍に希釈される前の高い濃度の物質を感知することが出来る。
- この情報に基づき、体循環系の状態が変化する前に、体循環系の未来の状態を予測して現在の状態を制御することが出来る。すなわち、広義の予測制御あるいはネガティブ・フィードフォワード的制御が可能になる。

これらのことを考慮に入れ、門脈—肝臓領域に存在する受容器のうちNa⁺、K⁺受容器を介する体液恒常性維持機構について、我々は以下の報告を行ってきた。

1. 門脈—肝臓領域Na⁺受容器を刺激すると、腎臓からのNa⁺排泄が促進され、腸管からのNa⁺吸収が抑制される [5,6]。
2. 求心路は肝臓求心神経であり、この神経は延髄孤束核および最後野、視床下部の室傍核および視索上核に投射する [7,8]。
3. 遠心路はそれぞれ腎交感神経、腸管のコリン作動性神経である [5,6,9]。
4. この応答は摂食のような生理的状态および食塩負荷時にも作動し、体液恒常性維持に重要な役割を果たしている [10,11,12]。
5. 肝硬変では、この応答の感度が低下し、体液恒常性維持の破綻が起こる [13,14]。
6. 高張NaCl溶液肝門脈内投与に対し、肝臓求心神経活動は容量依存性に増加する。この増加 bumetanide 肝門脈内投与により抑制される。従って、Na⁺感知機構にNa⁺K⁺2Cl⁻ cotransporter (NKCC1) が関与している [15]。
7. さらに、この肝臓求心神経は肝門脈内K⁺濃度増加に対しても応答し、神経活動が増加する。この増加は肝門脈内K⁺負荷に対して起こる尿中K⁺排泄増加に不可欠である [16]。経口摂取されたNa⁺、K⁺は腸管で吸収され、体循環系に回る前にまず門脈—肝臓領域を通過する。従って、慢性に高Na⁺、K⁺食を摂取すると、この領域の受容器は体循環系の血流に

より約 5 倍に希釈される前の高い Na^+ , K^+ 濃度に常に曝されることになり, 受容器発現および受容器感度が何らかの修飾を受ける可能性がある。平成 12 年度助成研究においては, この仮説を確かめた。

【研究方法】

全ての実験は Sprague Dawley ラット (体重 300~360 g, n=48) を用いておこなった。実験は日本生理学会規定の “Guiding Principles for Care and Use of Animals in the Field of Physiological Science” に従って行った。

7 週齢のラットを無作為に以下の 3 群に分けた: 正常食 ($\text{Na}^+=0.3\%$, $\text{K}^+=0.8\%$, n=16), 高 NaCl 食 ($\text{Na}^+=3\%$, $\text{K}^+=0.8\%$, n=16), 高 KCl 食 ($\text{Na}^+=0.3\%$, $\text{K}^+=8\%$, n=16)。それぞれの食餌で 4 週間飼育し, 11 週齢で以下の実験に用いた。実験前夜は絶食とし, 水は自由に与えた。

門脈 - 肝臓領域 Na^+ , K^+ 受容器感度の測定 (n=24)

腹腔内ペントバルビタール (50 mg/kg) 注射により麻酔したラットの下大静脈に, 麻酔追加用のカテーテルを挿入した。正中開腹後, 肝門脈カテーテルを挿入し, 肝動脈周囲の肝神経を剥離し, 双極電極を装着した。神経の中樞側は結紮し, 肝臓からの求心性神経活動だけが記録できるようにした。神経および電極は 2 液混合性のシリコンにより包埋固定した。神経活動は 50 Hz~1 kHz のバンドパス・フィルターを持つアンプで増幅した後, A-D 変換器 (100 samples/s) を介して, コンピュータ上に記録した。

高張 NaCl 溶液 (0.375 M, 0.75 M, 1.5 M) を 0.1, 0.2, 0.5, 1.0 ml/kg 肝門脈内に投与した時の肝臓求心神経活動の応答を求めることにより, 門脈 - 肝臓領域 Na^+ 受容器の感度を評価した。同様に, 等張 KCl + NaCl 溶液 (25 mM KCl + 125 mM NaCl, 50 mM KCl + 100 mM NaCl, 100 mM KCl + 50 mM NaCl) を 0.1, 0.2, 0.5, 1.0 ml/kg 肝門脈内に投与した時の肝臓求心神経活動の応答を求めることにより, 門脈 - 肝臓領域 K^+ 受容器の感度を評価した。肝臓求心神経活動応答の定量化のため, 各種溶液投与前の 5 秒間の平均値を 100 %とし, 投与後の応答を%表示した。

NKCC1 の mRNA およびタンパク量測定 (n=24)

腹腔内ペントバルビタール (50 mg/kg) 注射により麻酔したラットを経心臓的にヘパリン加生理的食塩水で還流後, 肝臓を摘出した。肝臓を小片に分割し液体窒素に浸し凍結後, 測定実験まで -30°C にて保存した。

総 RNA 量は guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform method [17] により求めた。すなわち, 肝組織に ISOGEN (1 ml) を加えホモジネートし, 遠沈後上澄み液を採取した。上澄み液に Chloroform を加え遠沈後, さらに上澄み液に isopropanol を加え遠沈し, 沈殿物に

ethanol を加え遠沈した。沈殿物に RNase-free ddH₂O を加えサンプルとして用いた。ラット耳下腺の NKCC1 [18] の第 7 および 9~10 番目の膜貫通部位に対応するプライマー (5'-ATAGGAATCGCAGTGTCTGTAGG, 5'-TAGGAGCAATGACATTCAATTCAGC) を作成し, RT-PCR (94 °C で 30 秒, 64 °C で 1 分, 72 °C で 1 分を 26 サイクル) を行った。Cyclophilin の RT-PCR 産物を対照とし, NKCC1/Cyclophilin の濃度比を densitometer で測定し, NKCC1 の mRNA 発現量を半定量化した。

NKCC1 タンパク量測定は Western blot 法により行った。肝組織からタンパクを抽出後, 100 µg のタンパクに SDS 変性剤を加え 7.5 % SDS-PAGE gel で一晩電気泳動した。Gel から membrane に blotting し, ヒト腸管 NKCC1 抗体 (COSMO-BIO) と免疫反応させた。さらに, horseradish peroxidase 結合 anti-mouse IgG と反応後, Western blotting detection kit (Amersham Pharmacia Biotech) を用い, 反応産物を可視化した。

報告書中の全ての値は平均値±標準誤差で表した。Figure 2, 4 は two-way ANOVA, Figure 5, 6 は one-way ANOVA を用いて解析した。F 値が統計学的有意であれば, グループ間およびグループ内の統計学的解析を post hoc test を用いて行った。統計学的有意水準は $P < 0.05$ に設定した。

【研究結果】

門脈 - 肝臓領域 Na⁺, K⁺受容器感度の測定

Figure 1 に 0.75 M NaCl 溶液 (0.5 ml/kg bw) 肝門脈内高張投与に対する, 肝臓求心神経活動応答を示す。正常食摂取ラットでは 0.75 M NaCl 溶液肝門脈内投与後短い潜時の後, 肝臓求心神経活動が増加した (上段)。高 NaCl 食 (中段) および高 KCl 食 (下段) ラットでは

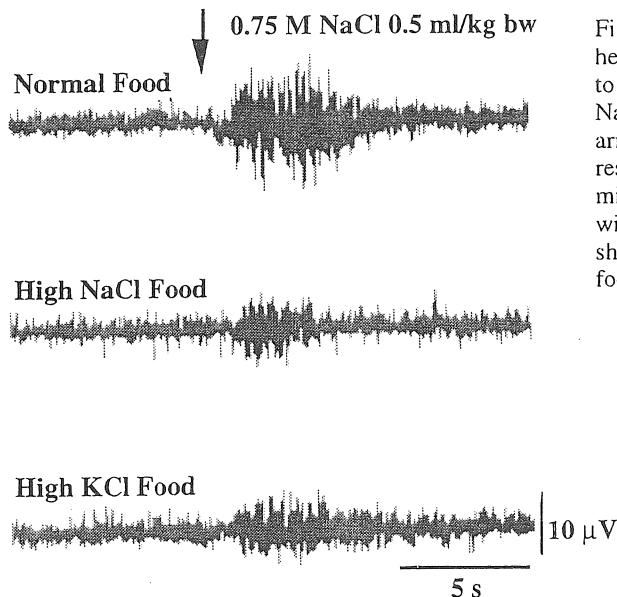
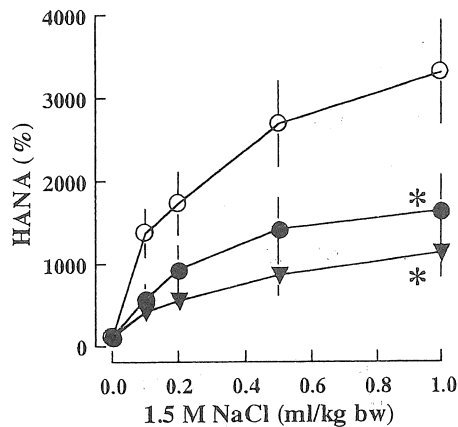
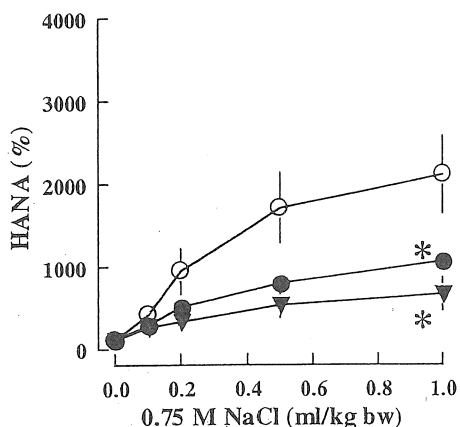
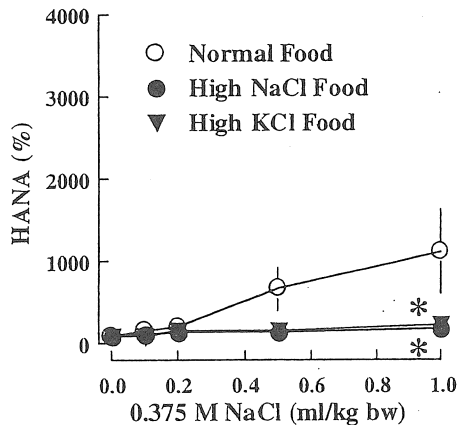


Figure 1: Original records illustrating hepatic afferent nerve activity in response to intraportal bolus injection of 0.75 M NaCl (0.5 ml/kg, shown by the arrowheads). The upper panel shows the response in a rat with normal food. The middle panel shows the response in a rat with high NaCl food. The lower panel shows the response in a rat with high KCl food.

この応答は明らかに抑制されていた。各群 8 匹ずつの、肝門脈内 0.375 M, 0.75 M, 1.5 M NaCl 溶液投与に対する肝臓求心神経活動応答を Figure 2 に示す。各群とも NaCl 濃度および投与量依存性に肝臓求心神経活動が増加するが、増加の程度は全ての NaCl 溶液において、正常食群に比べ、高 NaCl 食群および高 KCl 食群において有意に抑制されていた。

Figure 2: Mean \pm SEM of the hepatic afferent nerve activity (HANA) in response to intraportal bolus injection of hypertonic NaCl solution.



KCl + NaCl 溶液肝門脈内投与に対する、肝臓求心神経活動応答を Figure 3 に示す。正常食摂取ラットでは 50 mM KCl + 100 mM NaCl 溶液肝門脈内投与後短い潜時の後、肝臓求心神経活動が増加した (上段)。高 NaCl 食 (中段) および高 KCl 食 (下段) ラットではこの応答は明らかに抑制されていた。各群 8 匹ずつの、肝門脈内 25 mM KCl + 125 mM NaCl, 50 mM KCl + 100 mM NaCl, 100 mM KCl + 50 mM NaCl 溶液投与に対する肝臓求心神経活動応答を Figure 4 に示す。各群とも K⁺濃度および投与量依存性に肝臓求心神経活動が増加するが、増加の程度は全ての KCl + NaCl 溶液において、正常食群に比べ、高 NaCl 食群および高 KCl 食群において有意に抑制されていた。以上の結果から、4 週間の高 NaCl 食および高 KCl 食摂取により、門脈 - 肝臓領域 Na⁺, K⁺受容器の感度が低下することが分かった。この低下が Na⁺, K⁺感知機構に關与する NKCC1 の発現によるものかどうかを確かめるため、NKCC1 の mRNA

およびタンパク発現を調べた。

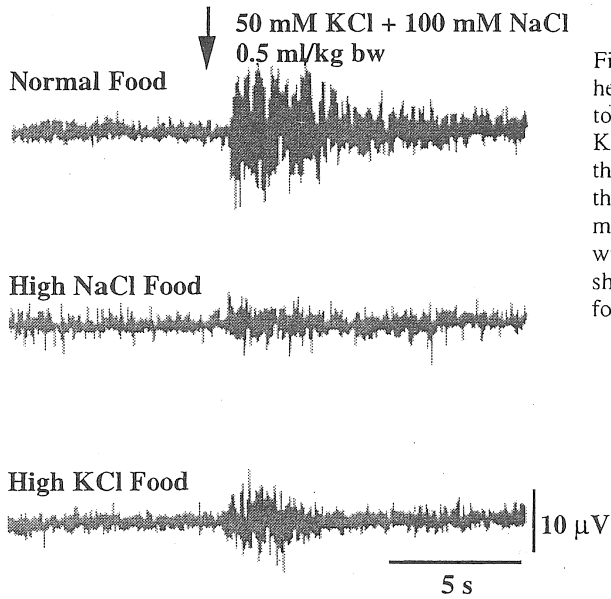


Figure 3: Original records illustrating hepatic afferent nerve activity in response to intraportal bolus injection of 50 mM KCl + 100 mM NaCl (0.5 ml/kg, shown by the arrowheads). The upper panel shows the response in a rat with normal food. The middle panel shows the response in a rat with high NaCl food. The lower panel shows the response in a rat with high KCl food.

Figure 4: Mean \pm SEM of the hepatic afferent nerve activity (HANA) in response to intraportal bolus injection of isotonic KCl + NaCl solution.

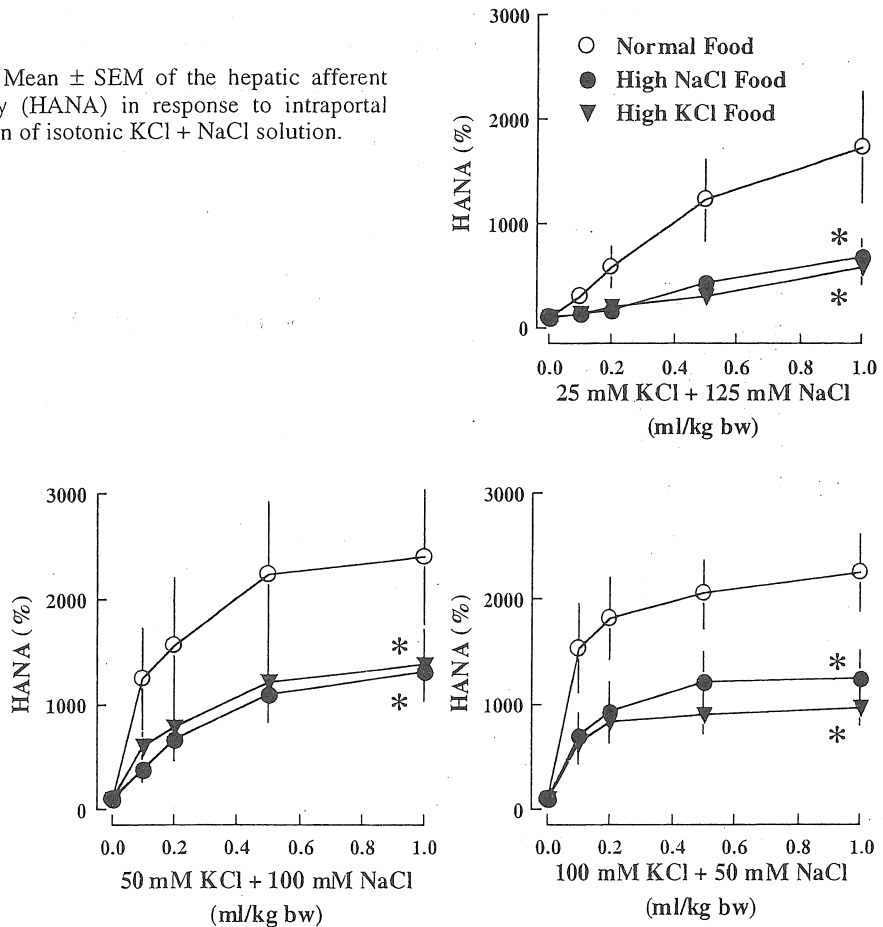


Figure 5 に NKCC1 (425 bp) および Cyclophilin の電気泳動パターンに対する高 NaCl 食および高 KCl 食の影響を示す。Cyclophilin の発現は食餌により有意な影響を受けなかった。従って、NKCC1 の mRNA 発現量を Cyclophilin の mRNA 発現量で標準化し、Figure 5 下段に表した。NKCC1 / Cyclophilin mRNA は高 NaCl 食および高 KCl 食で有意に低下した ($F(2,21) = 6.244, P = 0.0074$)。さらに、Western blot により調べた NKCC1 タンパク (140 kDa) の発現も高 NaCl 食および高 KCl 食で 50 %以下に低下した (Figure 6, $F(2,21) = 13.40, P = 0.0002$)。

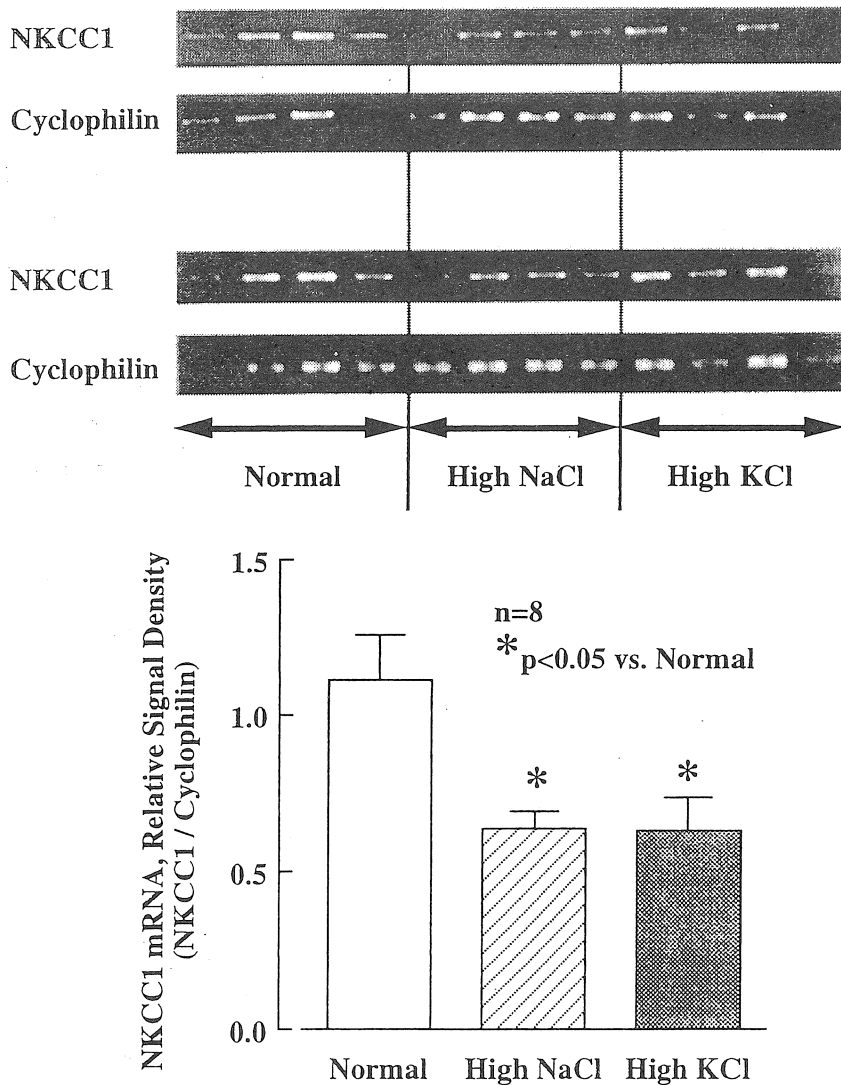


Figure 5: Upper panel: electrophoretic profiles of the NKCC1 and cyclophilin. Lower panel: Effects of high NaCl and KCl diet to ratio of density of NKCC1 to cyclophilin.

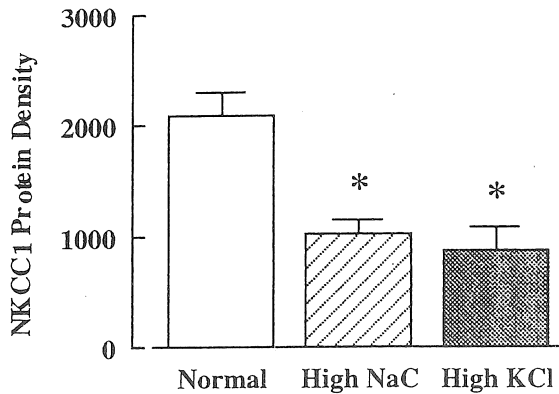


Figure 6: Density of protein band of NKCC1 in 3 groups of animal. *P < 0.05, significantly different from normal diet.

【考察】

我々は、以前の助成研究において門脈-肝臓領域 Na^+ , K^+ 受容機構に NKCC1 が関与していることを示した [15, 16]。本研究では高 NaCl 食および高 KCl 食により NKCC1 の発現が抑制され、門脈-肝臓領域 Na^+ , K^+ 受容器の感度が低下することを解明した。

食餌中の成分によりその成分に対する輸送系の発現が影響されることが種々の臓器で知られている。Stokes, Sigmund [19] は低 NaCl 食によりラットの下行結腸で起電性 Na^+ channel の mRNA 発現が増加することを示した。これは、低 NaCl 食環境では腸管での Na^+ 吸収を増加させるという、環境変化に対する生理的適応であると理解することが出来る。しかし、今回の研究の結果は目的論的には逆の応答である。高 NaCl 食および高 KCl 食では、 Na^+ , K^+ 排泄を増加させるため、門脈-肝臓領域 Na^+ , K^+ 受容器の感度を増加させる方が生理的適応と思われるが、結果は逆であった。

高 NaCl 食および高 KCl 食摂取により、腸管から吸収された Na^+ , K^+ により門脈血中 Na^+ , K^+ 濃度が増加する。この Na^+ , K^+ が体循環系に回り、やがて体循環系の Na^+ , K^+ 濃度が増加することが予測される。門脈-肝臓領域 Na^+ , K^+ 受容器を介する体液恒常性維持機構はこの予測に基づいた制御である。予測制御系は外乱から将来の生体の変化(体循環系の変化)を予測し、素早くいわゆる "bang-bang" 制御的に動作する。従って、制御速度は速く、強力であるが、制御結果には誤差が入りやすい [10, 16]。この誤差は、ネガティブ・フィードバック制御系により修正される。門脈-肝臓領域 Na^+ , K^+ 受容器は摂食直後 [10]、あるいは肝門脈内投与直後 [16] の短期的調節には重要な役割を果たしているが、長期的調節には重要ではない [11, 12]。実際、 Na^+ 負荷量をステップ状に増加させると、直後の 2 日間だけ肝臓除神経ラットで有意に Na^+ が蓄積するが、それ以降の Na^+ バランスは正常ラットと差がなかった [12]。従って、門脈-肝臓領域 Na^+ , K^+ 受容器感度の低下により、摂食直後の Na^+ , K^+ 排泄増加は少なくなるかもしれないが、長期的な Na^+ , K^+ バランスは殆ど影響を受けないと思われる。高 NaCl 食および高 KCl 食による門脈-肝臓領域 Na^+ , K^+ 受容器感度低下の生理学および病態生理学的意義に関しては今後検討していく予定である。

本研究により肝臓 NKCC1 の発現に影響を及ぼした因子を特定することは出来ないが、幾つかの可能性が考えられる。高 NaCl 食、高 KCl 食では血中 Na^+ 、 K^+ 、 Cl^- 濃度の増加、浸透圧上昇、体液量増加等の変化が起こり、アルドステロンおよびバゾプレッシン分泌の変化が引き起こされると考えられる。アルドステロンは大腸の Na^+ チャネル、 K^+ チャネル、腎臓の Na^+ チャネル、 Na^+ K^+ ATPase 発現を増加させることが知られている [19, 20, 21, 22]。しかし、高 NaCl 食ではアルドステロン低下、高 KCl 食ではアルドステロン増加と、2つの環境で逆方向に動くにも関わらず、NKCC1 発現は同一方向に減少することから考えると、本研究で見られたNKCC1 発現低下にアルドステロンが関与している可能性は低いと思われる。一方、Kim [23] 等はバゾプレッシン V_2 受容器アナログ投与によりヘンレループ上行脚太い部のNKCC2 発現が増加することを報告した。この変化は腎内の浸透圧勾配を増加させ、対向流増幅系による尿浸透圧増加に寄与しているものと思われる。肝臓 NKCC1 の発現に影響を及ぼした因子を特定するため、これらの体液調節に関わるホルモンのNKCC1 発現に及ぼす影響について検討する必要がある。

以上、高 NaCl 食および高 KCl 食により、門脈 - 肝臓領域 Na^+ 、 K^+ 受容器の感度が低下する。この低下に、肝臓内NKCC1 発現低下が関与している可能性が示された。

【今後の課題】

門脈 - 肝臓領域 Na^+ 、 K^+ 受容器について以下の点を明らかにするため、研究を継続中である。

1. Na^+ K^+ 2Cl^- cotransporter の肝臓内局在は何処であるのか？
2. Na^+ および K^+ 濃度の増加が Na^+ K^+ 2Cl^- cotransporter を介し、どのような機序により活動電位発生という電気的な変化に変換されるのか？
3. 高 NaCl 食および高 KCl 食による門脈 - 肝臓領域 Na^+ 、 K^+ 受容器感度低下の生理学的および病態生理学的意義
4. NKCC1 発現変化のメディエータの特定

【文献】

1. Haberich FJ, Aziz O, Nowacki PE: Über einen osmoreceptorisch tätigen Mechanismus in der Leber. Pflügers Arch 285: 73-89, 1965.
2. 森田啓之: 受容器の宝庫肝臓: 門脈 - 肝臓領域 Na^+ 受容機構による予測制御的 Na^+ 恒常性維持。膜 (Membrane) 24: 64-71, 1999.
3. Morita H, Matsuda T, Tanaka K, Hosomi H: Role of hepatic receptors in controlling body fluid homeostasis (review). Jpn J Physiol 45: 355-368, 1995.
4. Sawchenko PE, Friedman MI: Sensory functions of the liver: a review. Am J Physiol 236: R5-R20, 1979.

5. Morita H, Ohyama H, Hagiike M, Horiba T, Miyake K, Yamanouchi H, Matsushita K, Hosomi H: Effects of portal infusion of hypertonic solution on jejunal electrolyte transport in anesthetized dogs. *Am J Physiol* 259: R1289-R1294, 1990.
6. Morita H, Nishida Y, Hosomi H: Neural control of urinary sodium excretion during hypertonic NaCl load in conscious rabbits: role of renal and hepatic nerves and baroreceptors. *J Auton Nerv Syst* 34: 157-170, 1991.
7. Morita H, Tanaka K, Hosomi H: Chemical inactivation of the nucleus tractus solitarius abolished hepatojejunal reflex in the rat. *J Auton Nerv Syst* 48: 207-212, 1994.
8. Morita H, Yamashita Y, Nishida Y, Tokuda M, Hatase O, Hosomi H: Fos induction in rat brain neurons after stimulation of the hepatoportal Na-sensitive mechanism, *Am J Physiol* 272: R913-R923, 1997.
9. Morita H, Ishiki K, Hosomi H: Effects of hepatic NaCl receptor stimulation on renal nerve activity in conscious rabbits. *Neurosci Lett* 123: 1-3, 1991.
10. Morita H, Matsuda T, Furuya F, Khanchowdhury MR, Hosomi H: Hepatorenal reflex plays an important role in natriuresis after high-NaCl food intake in conscious dogs. *Circ Res* 72: 552-559, 1993.
11. Morita H, Chen Q, Hosomi H: Role of hepatic nerves in long-term control of NaCl homeostasis in Wistar-Kyoto rats. *J Auton Nerv Syst* 54: 9-15, 1995.
12. Morita H, Tsunooka K, Hagiike M, Yamaguchi O, Lee K: Role of the liver in long-term control of drinking behavior, Na balance and arterial pressure in Dahl rats. *Am J Physiol* 274: R1111-R1118, 1998.
13. Tanaka K, Matsuda T, Morita H, Hosomi H: Depressed sensitivity of the hepatoportal NaCl receptors in rats with carbon tetrachloride-induced liver cirrhosis. *Am J Physiol* 269: R1390-R1395, 1995.
14. Matsuda T, Morita H, Hosomi H, Okada M: Response of renal nerve activity to high NaCl food intake in dogs with liver cirrhosis. *Hepatology* 23: 303-309, 1996.
15. Morita H, Fujiki N, Hagiike M, Yamaguchi O, Lee K: Functional evidence for involvement of bumetanide-sensitive $\text{Na}^+ \text{K}^+ 2\text{Cl}^-$ cotransport in the hepatoportal Na^+ receptor of the Sprague-Dawley rat. *Neurosci Lett* 264: 65-68, 1999.
16. Morita H, Fujiki N, Miyahara T, Lee K, Tanaka K: Hepatoportal bumetanide-sensitive K^+ -sensor mechanism controls urinary K^+ excretion. *Am J Physiol* 278: R1134-R1139, 2000.
17. Chomczynski P, Sacchi N: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Biochim Biophys Acta* 1373: 261-269, 1998.
18. Moore-Hoon ML, Turner RJ: Molecular and topological characterization of the rat parotid $\text{Na}^+ \text{K}^+ 2\text{Cl}^-$ cotransporter. *Biochim Biophys Acta* 1373: 261-269, 1998.

19. Stokes JB, Sigmund RD: Regulation of rENaC mRNA by dietary NaCl and steroids: organ, tissue, and steroid heterogeneity. *Am J Physiol* 274: C1699-C1707, 1998.
20. Barbry P, Hofman P: Molecular biology of Na⁺ absorption. *Am J Physiol* 273: G571-G585, 1997.
21. Ewart HS, Klip A: Hormonal regulation of the Na⁺-K⁺-ATPase: mechanisms underlying rapid and sustained changes in pump activity. *Am J Physiol* 269: C295-C311, 1995.
22. Verrey F: Early aldosterone action: toward filling the gap between transcription and transport. *Am J Physiol* 277: F319-F327, 1999.
23. Kim G, Ecelbarger CA, Mitchell C, Packer RK, Wade JB, Knepper MA: Vasopressin increases Na-K-2Cl cotransporter expression in thick ascending limb of henle's loop. *Am J Physiol* 276: F96-F103, 1999.

Effects of High NaCl and High KCl Diet on Hepatic Na⁺- and K⁺- Receptor Sensitivity and Expression of NKCC1 in Rats

Hironobu Morita¹, You Tsuchiya¹, Yoshiko Banno², Shigeru Nakashima²

Department of Physiology¹ and Biochemistry², Gifu University School of Medicine,
40 Tsukasa-Machi, Gifu 500-8705, Japan

Summary

We have demonstrated that Na⁺ and K⁺ receptors exist in the hepatoportal region plays an important role in regulating body fluid homeostasis. These receptors sense Na⁺ and K⁺ concentration via the bumetanide-sensitive Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter (NKCC1) and transduce to electrical activity of the hepatic nerve, and project to the nucleus solitary tract, area postrema, paraventricular hypothalamic nucleus, and supraoptic nucleus. Then reflexively control renal excretory and intestinal absorptive functions. It has been reported that high or low Na⁺ and high or low K⁺ diet affected the expression of Na⁺ and K⁺ transporter in the intestine and kidney. These changes in expression might contribute to regulating body fluid homeostasis by altering amounts of absorption and excretion. Accordingly, there is a possibility that alternation of oral intake of Na⁺ or K⁺ alters NKCC1 expression in the liver. To test this hypothesis, we investigated the effects of high NaCl and high KCl diet on sensitivity of the hepatic Na⁺ and K⁺ receptor and the expression of NKCC1 in the liver of Sprague-Dawley rat. The rats were randomly assigned to the 3 experimental groups and put on normal diet (Na⁺ 0.3 %, K⁺ 0.8 %), high NaCl diet (Na⁺ 3 %, K⁺ 0.8 %), and high KCl diet (Na⁺ 0.3 %, K⁺ 8 %) for 4 weeks (from 7-weeks old to 11-weeks old). While measuring hepatic afferent nerve activity, hypertonic NaCl solutions (0.375 M, 0.75 M, and 1.5 M) and isotonic KCl + NaCl solutions (25 mM KCl + 125 mM NaCl, 50 mM KCl + 100 mM NaCl, and 100 mM KCl + 50 mM NaCl) were injected as bolus doses of 0.1, 0.2, 0.5, and 1.0 ml/kg via the portal venous catheter. In response to injections, hepatic afferent nerve activity increased in a Na⁺ or K⁺ concentration dependent manner. Under intakes of high NaCl or high KCl diet for 4 weeks, the responses of hepatic afferent nerve activity were significantly attenuated compared to those on normal diet. RT-PCR and Western blot were used to measure the NKCC1 mRNA and protein expression, respectively. In both high NaCl and high KCl diet groups, the level of NKCC1 mRNA expression was significantly lower than normal diet (1.13 ± 0.15 in normal diet, 0.67 ± 0.40 in high NaCl diet and 0.64 ± 0.11 in high KCl). Furthermore, the expression of NKCC1 protein was also significantly depressed by high NaCl diet and KCl diet (2075 ± 202 in normal diet, 1016 ± 113 in high NaCl diet and 866 ± 209 in high KCl). These results suggest that intakes of high NaCl or high KCl diet decrease the expression of NKCC1 in the liver and it may cause the attenuation of hepatic Na⁺- and K⁺-receptor sensitivity.