

尿路閉塞ラットモデルにおける腎アクアポリン4発現変化

上 條 武 雄¹ 吉 村 和 修¹ 高 橋 創¹
早 川 洋¹ 横 山 啓 太 郎¹ 長 谷 川 元²

¹東京慈恵会医科大学内科学講座腎臓・高血圧内科

²埼玉医科大学総合医療センター第4内科

(受付 平成17年10月14日)

CHANGES IN AQUAPORIN 4 GENE EXPRESSION IN THE KIDNEYS OF RATS WITH URINARY TRACT OBSTRUCTION

Takeo KAMIJO¹, Kazunobu YOSHIMURA¹, Hajime TAKAHASHI¹,
Hiroshi HAYAKAWA¹, Keitaro YOKOYAMA¹, and Hajime HASEGAWA²

¹*Division of Kidney and Hypertension, Department of Internal Medicine,
The Jikei University School of Medicine*

²*Fourth Department of Internal Medicine, Saitama Medical Center, Saitama Medical School, Kawagoe*

Background: Down-regulation of aquaporin (AQP) water channels of the convoluted tubules and the collecting ducts causes polyuria after urinary tract obstruction. Both AQP2 in the apical membrane and AQP3 in the basolateral membrane in animal models of urinary tract obstruction have been reported. However, detailed examination of AQP4, the main water channel of the basolateral membrane, has not been performed.

Methods: Kidneys were removed 3, 6, 12, and 24 hours after ligation of the ureter or after sham operation (control) in male Wistar rats. Expression of the AQP4 gene and protein was examined with the reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR), competitive RT-PCR, and Western blot analysis. Differences in AQP4 gene expression were examined in the renal cortex, outer medulla, and inner medulla.

Results: After 24 hours of urinary tract obstruction AQP4 gene expression was decreased by 67% relative to controls. AQP1, AQP2, and AQP3 were also significantly decreased in rats after urinary tract obstruction. Furthermore, AQP4 protein expression was decreased by 50% after 24 hours of urinary tract obstruction. Gene expression was decreased more in the inner medulla than in other areas.

Conclusion: These results suggest that down-regulation of AQP4 and other AQPs is an important cause of polyuria after relief of urinary tract obstruction.

(Tokyo Jikeikai Medical Journal 2006 ; 121 : 27-35)

Key words: rat, kidney, urinary tract obstruction, polyuria, aquaporin 4

I. 緒 言

尿路閉塞 (urinary tract obstruction: UTO) は前立腺肥大症, 膀胱腫瘍, 神経因性膀胱や後腹膜線維症などに起因して, 臨床上よく経験される病態である。そして, 閉塞が解除された後には著明

な水利尿とナトリウム利尿の増加が引き起こされる¹⁾。これまでに, 尿路閉塞ラットモデルにおいて, 尿細管での水, およびナトリウム再吸収がともに障害されていることが報告され²⁾, micropuncture を用いた研究においては, ヘンレループから集合管までの遠位側ネフロンでの塩類と水の再

吸収が障害されていることが明らかになっている³⁾。

遠位側ネフロンは尿の濃縮と希釈をすることによって体液の恒常性を維持する最終関門である。効率的な尿濃縮を行うために腎髄質間質は高浸透圧を形成し、そこを通る遠位側ネフロンはバソプレッシン (以下 AVP) 依存性の高い水透過性を有し、ネフロンの管腔内から血管側への水再吸収の最終調節を行っている。この水移動の主要な経路としてアクアポリン (以下 AQP) が重要な役割を担っている。これまでに哺乳類において 11 の AQP isoform が発見され、遺伝子ファミリーを構成している⁴⁾。近位尿細管においては糸球体で濾過された大部分の水は尿細管上皮細胞の管腔側と血管側に存在する AQP1 を通って再吸収される。集合管においては、細胞の管腔側に AQP2 が存在し AVP の制御を受けてその発現が調節され、遠位側ネフロンでの水再吸収調節の主要な役割を担っている⁵⁾。一方、血管側には AVP に非依存性の AQP3⁶⁾ と AQP4⁷⁾ が存在し、細胞内から血管への水移動の主要な経路となっている。

AQP4 は長谷川らによってクローニング⁷⁾され、これまで腎臓や肺、脳、眼などに発現が確認され、各組織における水移動の主要な経路として位置づけられており、とくに脳においては種々の病態での脳浮腫の形成に重要な役割を担っていることが報告されている⁸⁾⁹⁾。各種腎疾患については、AQP2 および AQP3 がいくつかの病態によって、その発現に変化が起ることが報告されているが、AQP4 についての報告は少ない。

これまでに尿路閉塞後の多尿の原因として、AQP の発現変化に関する報告がいくつかなされてきた。最初に Frokiaer ら¹⁰⁾ はラットモデルを用いて尿路閉塞 24 時間に解除を行い、多尿に関連し AQP2 発現が減少していることが報告されている。またその後、多尿とともに AQP2 発現の減少も 2 週間持続することを報告している¹¹⁾。さらに Kim らは 24 時間の尿路閉塞モデルにおいて、AQP1, 2, 3, 4 の発現が減少していることを報告している¹²⁾。しかし、これまでの報告は AQP2, 3 が主体であり AQP4 に関する詳細な検討はなされていない。また、これまでの報告では、尿路閉塞 24 時間後の変化に限定されており、尿路閉塞早期

における発現変化の経過に関しては不明である。今回われわれは、尿路閉塞ラットモデルを用いて、尿路閉塞早期から 24 時間までの AQP1 から 4 までの遺伝子発現変化の詳細な経過を観察し、さらに AQP4 については、腎臓内の各部位 (皮質、髄質外層、および髄質内層) での AQP4 遺伝子の発現変化の相違を検討した。

II. 対象ならびに方法

1. 尿路閉塞ラットモデル

生後 7 週齢の Wistar 系雄性ラット (200-220 g, 日本クレア, 東京) を実験に用いた。飼育時は自由飲水とし、食餌にはラット用標準食 (CE-2, 日本クレア) を用いた。実験開始前 24 時間は絶飲食とし、24 時間蓄尿を行った後、ペントバルビタール (50 mg/kg, 腹腔内投与) にて麻酔を行った。安定した麻酔深度に到達したことを確認後腹部をイソジンにて消毒後下腹部を正中切開し、傍大動静脈の後腹膜を走行する尿管を確認後、両側の尿管を 4-0 絹糸にて結紮した。Shame operation 群では尿管の露出のみを行った後再縫合した。術後は再び自由飲水とし、結紮後 3, 6, 12 および 24 時間後に動物を麻酔後に開腹し、拡張した尿管より尿を採取した後両側の腎を摘出した。対照群として 0 時間閉塞群 (非結紮群) と shame operation 群を用いた。摘出した腎は重量測定後核酸およびタンパク質の抽出に用いた。一部の腎は実体顕微鏡下に皮質、髄質外層および髄質内層に切離し、部位別に核酸抽出を行った。

2. RNA 抽出と RT-PCR

腎全体または皮質、髄質外層および髄質内層に切離したものを乾熱滅菌処理したポリトロンホモジェナイザー (POLYTRON PT-DA 210/2EC, KINEMATICA AG, Littau-Luceme, Switzerland) にて 30-45 秒間ホモジェナイズし、フェノール・クロロフォルム・イソアミルアルコールの混合液 (25:24:1) を塩酸で pH 4.5 に調整した溶液で RNA 抽出を行った。エタノール沈殿・再溶解後に吸光度を測定し濃度の調整を行った¹³⁾。1 μ g に定量化した RNA を逆転写 (50°C, 30 分) した後各条件で PCR 増幅を行った (AQP1: 58°C 60 秒, 72°C 90 秒, 94°C 60 秒, 28 サイクル, AQP2: 57°C 60 秒, 72°C 90 秒, 94°C 60 秒, 28 サイクル, AQP3:

55°C 60 秒, 72°C 90 秒, 94°C 60 秒, 29 サイクル, AQP4: 59°C 60 秒, 72°C 90 秒, 94°C 45 秒, 27 サイクル). RT-PCR 増幅には single step RNA-PCR amplification kit (QIAGEN, Valencia, CA, U.S.A.) を使用した. 各 AQP の primer を Table 1 に示す. 得られた PCR 産物は電気泳動後デジタルスチルカメラ (Kodak・DC-290) にて記録し, 画像解析プログラム (Kodak・1D ver. 3.5.3) にて各バンドの強度を解析した. PCR 産物の量は同時に増幅された β -actin の量によって補正した.

3. Competitive RT-PCR 解析

発現している m-RNA のより正確な定量化を目的に, AQP3 と AQP4 について one-step RNA-PCR と組み合わせて competitive PCR 解析を行った. DNA competitor は競合させる AQP3 および AQP4 遺伝子と同一の primer によって増幅される様に, 両端に同一の塩基配列を持ち, フラグメントの長さや GC content がほぼ同一となるように設計された. また, DNA competitor は, それより得られた PCR 産物とオリジナルの PCR 産物と区別するため, 長さがより短くなる様に設計された. DNA competitor の作成には Competitive PCR kit (タカラバイオ, 滋賀) を使用した. さらにより正確な定量のため, 目的 mRNA から cDNA を合成する際の生成率の差や逆転写効率の差を考慮し, DNA competitor から *in vitro* transcription により cRNA を合成し, template total RNA と混入することで逆転写反応の時点から同一条件となる様にした. 得られた PCR 産物は電気泳動後デジタルスチルカメラ (Kodak・DC-290) にて記録し, 画像解析プログラム (Kodak・1D ver. 3.5.3) にて各バンドの強度

を解析した. 比色法による定量結果を基に, 以下の計算式により遺伝子発現コピー数を算出した. $OD_{260} \times 300 \times 10^{14} / (\text{bp length}) \times 660$

4. Western blot 解析

摘出された腎臓から ISOGEN solution (ニッポンジーン, 東京) を用いてタンパク質抽出を行った. 抽出されたタンパク質は 4-15% の勾配 SDS-ポリアクリルアミドゲル (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, U.S.A.) を用いて電気泳動を行った. 次に, 電気泳動法でタンパク質をニトロセルロース膜に移した. プロットニングには, 一次抗体として 1:150 の希釈された抗ラット AQP4 ウサギ IgG 抗体 (CHEMICON International, Inc., Temecula, U.S.A.) を用い, 二次抗体にはアルカリ・ホスファターゼでラベルされた 1:1,400 希釈抗ウサギ IgG ヤギ IgG 抗体を用いた. 最終的に, ラベリングは BCIP/NBT を用いた発色法により画像化し, その密度をコンピュータ・ソフトウェア (NIH image ver. 1.61) を用いて解析した.

5. 統計学的解析

以上の方法で得られた結果を, t-検定を用いて 0 時間コントロール群との有意差検定を行った. 統計学的に *p* 値が 0.05 未満を有意差ありと判定した.

すべての動物実験は東京慈恵会医科大学と埼玉医科大学の両方の動物実験倫理委員会の承認を得て, 動物実験指針に則して遂行した.

III. 結 果

Table 2 に血清と尿の生化学マーカー測定値を示す. 閉塞後 12 時間群での血清尿素窒素とクレアチニン濃度のみに有意な上昇が見られた. Table 3

Table 1. RT-PCR primer of each AQPs

AQP1 sense primer	GCCAGCGAGTTCAAGAAGAAGC	+4~+25
AQP1 anti-sense primer	GCCCTGGAGTTGATATCATCA	+774~+794
AQP2 sense primer	GGGAACCTCAGATCCATAGCC	+5~+24
AQP2 anti-sense primer	CCCAGTGATCATCAAACCTTGCC	+586~+607
AQP3 sense primer	CCGGCTGCTTCGCCAGGCTC	+18~+37
AQP3 anti-sense primer	CGAGGTCCAAAGTCACGAGC	+610~+631
AQP4 sense primer	GTGGCTTTCAAAGGCGTCTG	+4~+23
AQP4 anti-sense primer	GTAAAGTGCACCTGCCAGCA	+659~+678

Table 2. Biochemical markers of UTO animals at the time after obstruction

		0h control	6h	12h	24h
Serum	Blood urea nitrogen (mg/dl)	19.6±0.4	23.6±0.7	29.2±2.1*	22.4±6.4
	Creatinine (mg/dl)	0.22±0.06	0.33±0.05	0.35±0.03*	0.31±0.06
	Na (mmol/l)	143±1.2	137±2.0	139±0.9	142±1.5
	K (mmol/l)	4.5±0.1	5.6±0.2	4.7±0.3	4.6±0.2
	Osmolality (mOsm/kg H ₂ O)	309±2.2	283.5±1.5	294±10.5	318±6.0
Urine	Creatinine (mg/dl)	30.0±2.2	44.4±3.1	30.8±4.6	40.0±2.6
	Na (mmol/l)	83.7±5.4	85±1.0	117±1.8	273±25.0
	Osmolality (mOsm/kg H ₂ O)	891±59	891±11	764±72	590±61

A top line of the table indicates time progress after the obstruction.

*Indicates statistical significance ($p < 0.05$) comparing to the values at 0h control.

Table 3. Changes in kidney wet weight (g/kg BW)

	0h control	3h	6h	12h	24h
sham	-	-	-	-	5.68±0.08
UTO	5.74±0.12	7.28±0.10**	6.77±0.25**	6.43±0.32	6.38±0.29

A top line of the table indicates time progress after the obstruction. The values were corrected by body weight individually (mean±S.E., $n=6$).

**Indicates statistical significance ($p < 0.01$) comparing to the values of 0h control kidneys.

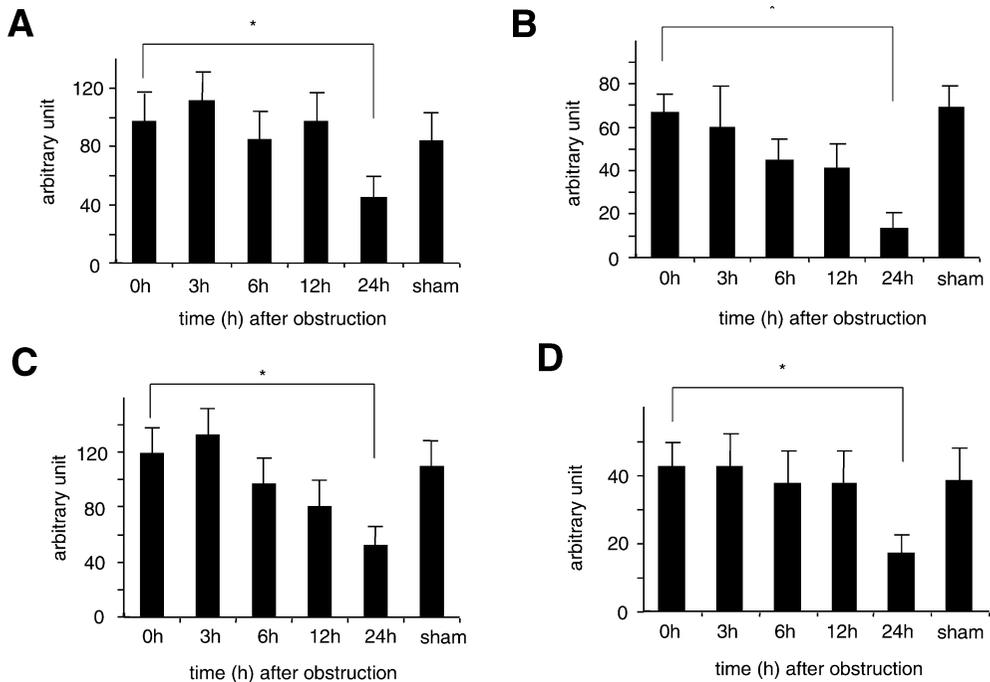


Fig. 1. RT-PCR amplification of AQP1, 2, 3 and 4 in urinary tract obstruction (UTO) animals. Quantified amounts of PCR products corrected by β -actin gene expression were depicted (mean±S.E., $n=6$) with representative PCR bands. (A) AQP1, (B) AQP2, (C) AQP3, (D) AQP4. * $p < 0.05$ versus 0h control.

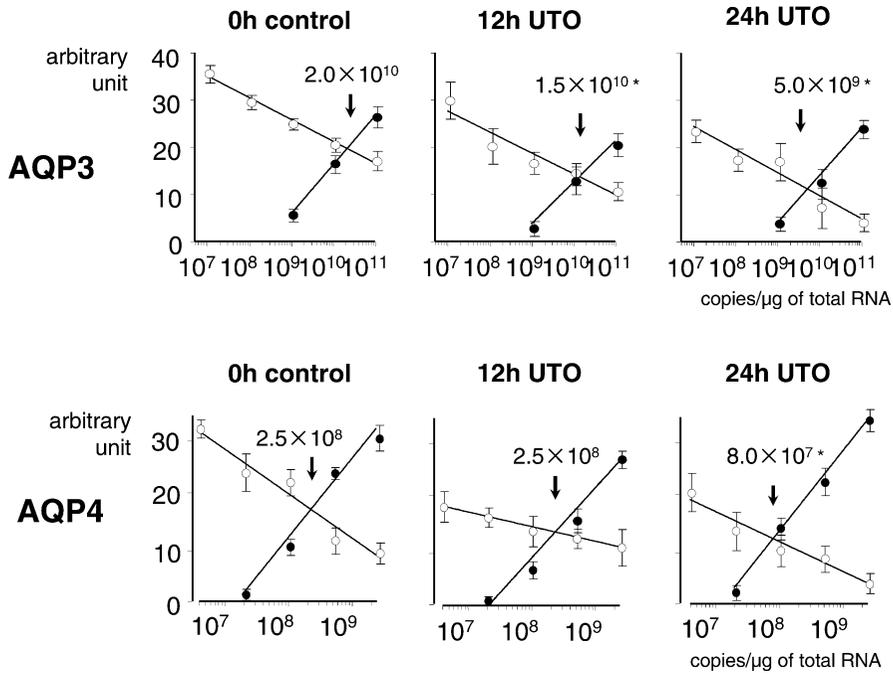


Fig. 2. Results of competitive RT-PCR analysis of AQP3 and AQP4 expression at 0h control, 12h and 24h after the obstruction. Copy number of target gene in 1 μ g of total RNA was quantified and averaged by three independent experiments (mean \pm S.E., $n=3$). Arrows show the intersection of AQP3 or AQP4 gene expression (open circles) and competitor expression (closed circles), indicating calculated copy number of AQP3 or AQP4 genes in total RNA. * $p < 0.05$ versus 0h control.

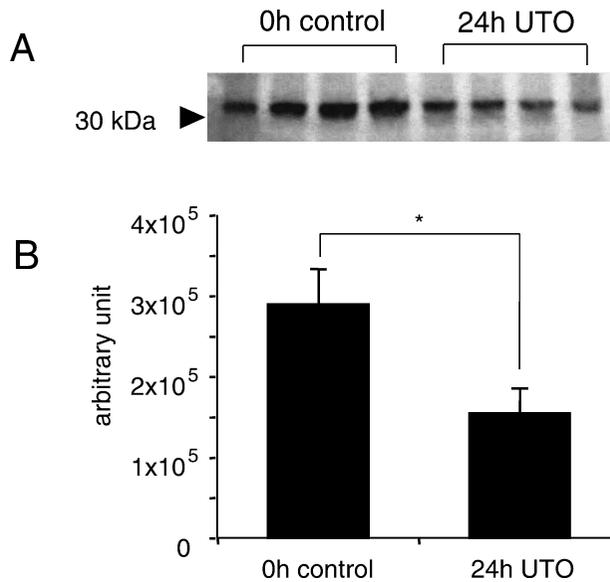


Fig. 3. Immunoblot analysis of AQP4 protein in UTO kidneys. Representative blots were demonstrated in the upper panel (A). Averaged density of the blots was depicted in the lower panel (B, mean \pm S.E., $n=4$). * $p < 0.05$ versus 0h control.

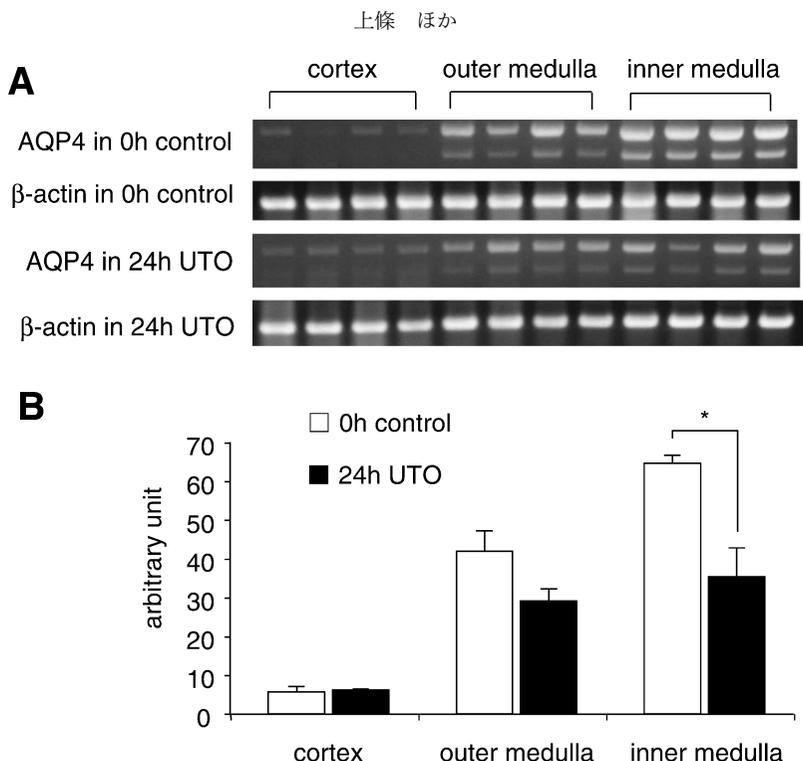


Fig. 4. AQP4 gene expression in dissected part of the kidney. (A) A series of representative AQP4 expression in cortex, outer medulla and inner medulla was analyzed in 0h control and 24h UTO kidneys. (B) Averaged expression corrected by β -actin was demonstrated (mean \pm S.E., $n=4$). Open and closed bars indicate the expression in 0h control and 24h UTO kidneys, respectively. * $p<0.05$ versus 0h control.

に閉塞後の各時間での腎重量を示す。3時間群にて重量はピークを示し、以降24時間まで暫時減少している。これは観察した尿路閉塞24時間の範囲では、水腎症による腎盂と尿細管腔内圧の上昇が一過性にとどまることを意味する。

RT-PCR解析によるAQP1から4の各遺伝子の閉塞後の経時的な発現変化の結果をFig. 1に示す。AQP1から4のすべてについて24時間群において0時間コントロール群と比較して有意な遺伝子発現の減少が認められた。AQP2と3の発現は、3時間から12時間の群においても暫時発現が減少する傾向がみられたが、RT-PCRから得られた結果からは有意差は確認できなかった。

AQP3と4について実施したcompetitive RT-PCR解析の結果をFig. 2に示す。RT-PCR解析結果と同様にAQP3, 4ともに24時間群において有意な遺伝子発現減少が確認された。減少率はAQP3で75%で、AQP4では67%であった。一方閉塞後12時間においては、AQP3遺伝子発現

の有意な減少が認められたが、AQP4については減少は認められなかった (AQP3; 0h control: 2.0×10^{10} copy/ μ g total RNA, 12h UTO: 1.5×10^{10} copy/ μ g total RNA, 24h UTO: 5.0×10^9 copy/ μ g total RNA, AQP4; 0h control: 2.5×10^8 copy/ μ g total RNA, 12h UTO: 2.5×10^8 copy/ μ g total RNA, 24h UTO: 8.0×10^7 copy/ μ g total RNA)。

尿路閉塞24時間群において、AQP4遺伝子発現減少に相応するタンパク質発現の減少が認められるかを確認する目的で行ったWestern blot解析の結果をFig. 3に示す。遺伝子発現減少に相応してタンパク質発現も0時間コントロール群と比較して50%の減少が認められた。

さらに、AQP4遺伝子の発現減少が腎内の各部位において同等か否かを検討する目的で、0時間コントロール群と24時間群の腎臓を皮質、髄質外層および髄質内層に分離して評価した結果をFig. 4に示す。腎髄質内層において有意な遺伝子

発現の減少が確認された。

IV. 考 察

これまで尿の濃縮/希釈に関わる様々な病態における各 AQP の発現変化がヒトや動物において報告されている。AQP1 については肝硬変¹⁴⁾や実験的部分的腎摘出による急性腎不全モデル¹⁵⁾にて発現減少が確認されている。AQP2 については脱水において AVP 分泌を介して発現が増加することが知られているが、先天性の腎性尿崩症¹⁶⁾、リチウムによる多尿¹⁶⁾や低カリウム血症による多尿¹⁵⁾において発現が減少していることが報告されている。AQP3 についても AVP や脱水によって発現が調節されることが報告されている¹⁸⁾。

AQP4 は腎臓において AQP3 と同じ主要な血管側水チャネルで、他に脳、眼、肺⁷⁾¹⁹⁾など広く発現が確認されている。最近、水分負荷の状況下において他の AQP 同様に AQP4 も腎臓での発現が変化すると報告がなされたが²⁰⁾、尿の濃縮/希釈に関わる種々の病態での AQP4 の役割は正確には理解されていなかった。

今回われわれは、尿閉塞後の多尿の原因として、AQP4 の発現変化を中心に観察した。結果は他の AQP と同様^{10)21)–23)}に閉塞 24 時間の時点での AQP4 の発現の減少が確認された。閉塞後のより早期での AQP 遺伝子発現への影響を調べた実験では、Competitive RT-PCR の結果から、遠位側ネフロン内の血管側 AQP のうち、AQP3 では閉塞 12 時間の時点で発現減少が観察されたが、AQP4 では変化は認めなかった。ノックアウトマウスを用いた研究で Verkman らは²⁴⁾、AQP3 ノックアウト群では著明な尿濃縮障害を示したが、AQP4 ノックアウト群では尿濃縮障害は軽度にとどまることを報告している。さらに AQP3 と AQP4 両者のノックアウトでは、AQP3 単独ノックアウト群より強い尿濃縮障害を示すことを報告している。このことより、集合管での尿濃縮における AQP4 の役割は補助的なものと考えられている。今回の実験で、AQP4 が AQP3 より尿路閉塞による影響を受けるのに時間を要したことは、AQP4 が尿路閉塞の早期では、集合管での尿濃縮機能に対し保護的に働いていると考えられる。

一方、今回の実験では、腎内でも腎盂近傍では

尿路閉塞の影響をより強く受けるものと推測し、腎内の各部位での AQP4 発現変化の差異を検討した。その結果、髄質内層で、他の部位より強い遺伝子発現減少が確認された。しかし、今回の実験で得られた尿路閉塞後の腎重量は 3 時間後に一過性に増加するものの、以後 24 時間までは漸次減少していた。尿路閉塞 24 時間までは、糸球体血流低下により単一ネフロンあたりの GFR が低下するとの報告²⁵⁾があり、今回の実験系でも尿産生が抑制され、腎盂にかかる圧負荷は尿路閉塞後漸増しないことが推測される。腎重量と、AQP 発現変化との間には時間的な解離が生じていることは、発現変化のメカニズムとして、水腎症の形成から受ける圧負荷は主因ではないことが推測された。これまでに急性腎虚血モデルにおいて AQP 発現の減少が報告されている²⁶⁾。尿路閉塞においては腎血流の低下していることが報告されているが、その中で腎髄質内層が最も影響が大きいとされている²⁷⁾²⁸⁾。今後、尿路閉塞モデルでの AQP 発現変化のメカニズムとして、腎内の血行動態や管腔内圧をはじめとした各種パラメーターと AQP 発現の関係を明らかにしていくべきであると考えられる。

V. 結 語

尿路閉塞ラットモデルを用いて、AQP4 の尿路閉塞解除後の多尿への役割を検討した。その結果、① 尿路閉塞 24 時間において、67% の AQP4 遺伝子発現の減少と、50% の AQP4 タンパク質発現の減少が確認された。② 腎内各部位では、髄質内層に強い遺伝子発現の減少が確認された。これまで、尿の濃縮/希釈に関わる種々の病態での AQP4 の正確な役割は不明であったが、他の AQP と同様に尿路閉塞後の多尿に AQP4 も関与しているものと考えられた。

ご指導とご校閲くださった東京慈恵会医科大学内科学講座腎臓・高血圧内科細谷龍男教授、技術的なアドバイスを下さった同腎臓・高血圧内科宇都宮保典先生、ご協力くださった同腎臓・高血圧内科腎生理代謝班の先生方、ならびに埼玉医科大学総合医療センター第 4 内科御手洗哲也教授および専任研究員の高柳佳織さんに深謝いたします。

文 献

- 1) Gillenwater JY, Westervelt FB Jr, Vaughan ED Jr, Howards SS. Renal function after release of chronic unilateral hydronephrosis in man. *Kidney Int* 1975; 7: 179-86.
- 2) Harris R, Yarger WE, Yarger W. The pathogenesis of post-obstructive diuresis: the role of circulating natriuretic and diuretic factors, including urea. *J Clin Invest* 1975; 56: 880-7.
- 3) Yarger W, Aynedjian H, Bank N. A micropuncture study of postobstructive diuresis in the rat. *J Clin Invest* 1972; 51: 625-37.
- 4) 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.
- 5) Fushimi K, Uchida S, Hara Y, Hirata Y, Marumo F, Sasaki S. Cloning and expression of apical membrane water channel of rat kidney collecting tubule. *Nature* 1993; 361: 549-52.
- 6) Ishibashi K, Sasaki S, Fushimi K, Uchida S, Kuwahara M, Saito H, et al. Molecular cloning and expression of a member of the aquaporin family with permeability to glycerol and urea in addition to water expressed at the basolateral membrane of kidney collecting duct cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 6269-73.
- 7) Hasegawa H, Ma T, Skach W, Matthay MA, Verkman AS. Molecular cloning of a mercurial-insensitive water channel expressed in selected water transporting epithelia. *J Biol Chem* 1994; 269: 5497-500.
- 8) Manley GT, Fujimura M, Ma T, Noshita N, Filiz F, Bollen AW, et al. Aquaporin-4 deletion in mice reduces brain edema after acute water intoxication and ischemic stroke. *Nat Med* 2000; 6: 159-63.
- 9) Papadopoulos MC, Verkman AS. Aquaporin-4 gene disruption in mice reduces brain swelling and mortality in pneumococcal meningitis. *J Biol Chem* 2005; 280: 13906-12.
- 10) Frokiaer J, Marples D, Knepper MA, Nielsen S. Bilateral ureteral obstruction downregulates expression of vasopressin-sensitive AQP-2 water channel in rat kidney. *Am J Physiol* 1996; 270: F657-68.
- 11) Li C, Wang W, Kwon TH, Isikay L, Wen JG, Marples D, et al. Downregulation of AQP1, -2, and -3 after ureteral obstruction is associated with a long-term urine-concentrating defect. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001; 281: F163-71.
- 12) Marples D, Frokiaer J, Dorup J, Knepper MA, Nielsen S. Hypokalemia-induced downregulation of aquaporin-2 water channel expression in rat kidney medulla and cortex. *J Clin Invest* 1996; 97: 1960-8.
- 13) Hasegawa H, Verkman AS. Functional expression of cAMP dependent and independent urea transporters in *Xenopus* oocytes. *Am J Physiol* 1993; 265: C514-20.
- 14) Fernandez-Llama P, Jimenez W, Bosch-Marce M, Arroyo V, Nielsen S, Knepper MA. Dysregulation of renal aquaporins and Na-Cl cotransporter in CCl4-induced cirrhosis. *Kidney Int* 2000; 58: 216. V28.
- 15) Kwon TH, Frokiaer J, Knepper MA, Nielsen S. Reduced AQP1, -2, and -3 levels in kidneys of rats with CRF induced by surgical reduction in renal mass. *Am J Physiol* 1998; 275: F724. VF41.
- 16) Deen PM, Verdijk MA, Knoers NV, Wieringa B, Monnens LA, van Os CH, et al. Requirement of human renal water channel aquaporin-2 for vasopressin-dependent concentration of urine. *Science* 1994; 264: 92-5.
- 17) Marples D, Christensen S, Christensen EI, Ottosen PD, Nielsen S. Lithium-induced downregulation of aquaporin-2 water channel expression in rat kidney medulla. *J Clin Invest* 1995; 95: 1838-45.
- 18) Terris J, Ecelbarger CA, Nielsen S, Knepper MA. Long-term regulation of four renal aquaporins in rats. *Am J Physiol* 1996; 271: F414-22.
- 19) Frigeri A, Gropper MA, Turck CW, Verkman AS. Immunolocalization of the mercurial-insensitive water channel and glycerol intrinsic protein in epithelial cell plasma membranes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 4328-31.
- 20) Murillo-Carretero M, Ilundain AA, Echevarria M. Regulation of aquaporin mRNA expression in rat kidney by water intake. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10: 696. V703.
- 21) Frokiaer J, Christensen BM, Marples D, Djurhuus JC, Jensen UB, Knepper MA, et al. Downregulation of aquaporin-2 parallels

- changes in renal water excretion in unilateral ureteral obstruction. *Am J Physiol* 1997; 273: F213-23.
- 22) Li C, Wang W, Knepper MA, Nielsen S, Frokiaer J. Down regulation of renal aquaporins in response to unilateral ureteral obstruction. *Am J Physiol* 2003; 284: F1066-79.
- 23) Kim SW, Cho SH, Oh BS, Yeum CH, Choi KC, Ahn KY, et al. Diminished renal expression of aquaporin water channels in rats with experimental bilateral ureteral obstruction. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12: 2019-28.
- 24) Verkman AS, Li J, Ma T, Yang B. Role of aquaporin water channel in kidney function studied using transgenic mice. *Clin Exp Nephrol* 2001; 5: 75-84.
- 25) Dal CA, Corradi A, Stanziale R, Maruccio G, Migone L. Glomerular hemodynamics before and after release of 24-hour bilateral ureteral obstruction. *Kidney Int* 1980; 17: 491-6.
- 26) Kwon TH, Frokiaer J, Fernandez-Llama P, Knepper MA, Nielsen S. Reduced abundance of aquaporins in rats with bilateral ischemia-induced acute renal failure: prevention by alpha-MSH. *Am J Physiol* 1999; 277: F413-27.
- 27) Gaudio KM, Siegel NJ, Hayslett JP, Kashgarian M. Renal perfusion and intratubular pressure during ureteral occlusion in the rat. *Am J Physiol* 1980; 238: F205-9.
- 28) Sweeney P, Young LS, Fitzpatrick JM. An autoradiographic study of regional blood flow distribution in the rat kidney during ureteric obstruction: the role of vasoactive compounds. *BJU Int* 2001; 88: 268-72.