

세뇨관 손상 유발 흰쥐에서 신장의 산염기 수송체 발현 변화

전남대학교 의과대학 내과학교실, ¹생리학교실

마성권 · 배은희 · 이종은¹ · 김수완*

Altered Renal Expression of Acid-base Transporters in Rats with Glycerol-induced Tubular Injury

Seong Kwon Ma, Eun Hui Bae, JongUn Lee¹ and Soo Wan Kim

Departments of Internal Medicine and ¹Physiology, Chonnam National University Medical School, Gwangju, Korea

The present study aimed to investigate the altered regulation of renal tubular acid-base transporters in rats with glycerol-induced tubular injury. Male Sprague-Dawley rats were used. Rats were injected with 50% glycerol in normal saline (7 mL/kg, i.m.) after water deprivation for 12 hours and were then sacrificed at 24 hours after the glycerol injection. The expression of Na,K-ATPase α 1-subunit, type 3 Na⁺/H⁺ exchanger (NHE3), type 1 Na⁺:HCO₃⁻ (NBC1), and B1-subunit of apical H⁺-ATPase was determined in the kidney by semiquantitative immunoblotting and immunohistochemistry. In the experimental rats, creatinine clearance was decreased, whereas fractional sodium excretion was not changed. Urine pH and bicarbonate concentrations were decreased, although plasma pH and bicarbonate concentrations were not changed. In the experimental group, the protein expression of Na,K-ATPase α 1-subunit was decreased in the cortex and outer stripe of outer medulla (cortex/OSOM) and inner stripe of outer medulla (ISOM) but increased in the inner medulla. The expression of NHE3 was decreased in the cortex/OSOM and ISOM, and that of NBC1 was decreased in the cortex/OSOM. By contrast, the expression of H⁺-ATPase was increased in the cortex/OSOM and inner medulla but was unchanged in the ISOM. Immunohistochemical analyses confirmed the immunoblotting data. In glycerol-induced tubular injury, the down-regulation of Na,K-ATPase α 1-subunit, NHE3, and NBC1 may contribute to impaired tubular reabsorption of sodium and bicarbonate. The upregulation of H⁺-ATPase may play a preventive role against the development of metabolic acidosis.

Key Words: Sodium-hydrogen exchanger 3; Sodium; Bicarbonates; Membrain transport proteins

서 론

신장은 세뇨관의 이온 수송체들은 나트륨 재흡수를 조절하여 체액 상태를 조절한다. 또한, 세뇨관을 통한 나트륨 재흡수는 수소 이온 및 중탄산 이온 분비 및 재흡수에 밀접하

접수일: 2010년 11월 8일, 게재결정: 2010년 11월 16일
*교신저자: 김수완, 501-757, 전남대학교 의과대학 내과학교실, Phone: 062-220-6271, FAX: 062-225-8578, E-mail: skimw@chonnam.ac.kr

게 관련되어 있기 때문에, 산-염기 항상성 유지에도 중요한 역할을 한다.

Na,K-ATPase는 신장 세뇨관 전체에 걸쳐 분포하며, 세뇨관 세포의 기저외측막에 존재한다. 이는 기저외측막에서 능동적 수송에 의하여 나트륨을 재흡수하며, 이로 인하여 내강막에 존재하는 나트륨 수송체들을 통한 수동적 나트륨 재흡수가 이루어진다.¹ 근위세뇨관에서 내강막을 통한 나트륨 재흡수는 주로 type 3 Na^+/H^+ exchanger (NHE3)에 의한 것이다.² 또한 근위세뇨관에서는 여과된 중탄산 이온의 약 80%가 재흡수되는데, 내강막의 NHE3가 수소 이온 분비의 주된 통로 역할을 하며, 기저외측막의 type 1 $\text{Na}^+:\text{HCO}_3^-$ cotransporter (NBC1)은 중탄산 이온 흡수에 중요한 역할을 한다.³⁻⁵ 따라서, NHE3 및 NBC1은 산-염기 항상성을 유지하는 역할을 하며, 이들의 조절 장애는 산-염기 대사 장애와 밀접한 관련이 있다.⁶⁻⁸

또한, 연결세뇨관 및 집합관은 소변으로의 수소 이온 배설을 조절하여 산-염기 항상성을 최종적으로 조절하는 부위이며, 사이세포(intercalated cell)에 존재하는 vacuolar H^+ -ATPase가 중요한 역할을 수행한다.^{9,10} A형 사이세포(intercalated cell)에는, H^+ -ATPase가 내강막 및 내강소포에 분포하여 수소 이온을 소변으로 분비하는 역할을 하며, 기저외측막에 band 3-like $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchanger (AE1)가 분포하여 중탄산 이온을 재흡수하는 역할을 한다.¹¹⁻¹³ 이와는 반대로 B형 사이세포(intercalated cell)에는 H^+ -ATPase가 기저외측막에 존재하여 수소 이온을 재흡수하고, 내강막에는 anion exchanger pendrin이 분포하여 중탄산 이온을 분비한다.^{14,15}

이처럼, 산-염기 수송체들은 체내의 산-염기 항상성 유지에 중요한 역할을 하며, 세뇨관 손상시 산-염기 수송체들의 조절 장애가 발생할 것으로 여겨진다. 이전의 연구들은 lithium 투여 및 일측성 또는 양측성 요로 폐쇄에 의한 세뇨관 손상 시에 산-염기 대사 장애가 발생하며, 손상의 종류 및 정도에 따라 산-염기 수송체들이 상이하게 조절됨을 보고하였다.¹⁶⁻¹⁸ Glycerol 투여는 주로 근위세뇨관 손상을 통한 급성 신장 손상을 유발하며, 임상적으로 횡문근융해증시와 유사한 신장 손상을 발생시킨다.^{19,20} 그러나, 이로 인한 산-염기 상태의 변조 및 수송체 조절에 대하여는 잘 알려져 있지 않다.

본 연구는 glycerol 투여에 의하여 유발된 세뇨관 손상에서 산-염기 상태 변화와 산-염기 수송체 발현에 대하여 알아보고자 하였다.

대상 및 방법

1. 실험 동물

전체 실험과정은 전남대학교 의과대학 실험 동물 사용 윤리 규정에 관한 지침을 준수하였다. 실험 동물은 체중 220~250 g된 Sprague-Dawley 숫쥐를 사용하였다. 세뇨관 손상을 유발하기 위하여 12시간 동안 수분 섭취를 제한한 후 glycerol (50% glycerol in normal saline, 7 mL/kg, i.m.)을 1회 주사하였다. 정상 대조군에는 생리 식염수를 근육 주사하였다. Glycerol 또는 생리 식염수를 투여한 후, 24시간 후에 실험에 이용하였다.

2. 신기능 및 산-염기 상태 측정

실험 동물들을 대사상자에 넣고 유지하면서 소변을 채집하였으며, 크레아티닌, 나트륨, pH, 중탄산을 측정하였다. 실험 당일 날 pentobarbital (50 mg/kg, i.p.) 마취 하에 개복 후 5 mL 주사기를 이용하여 대정맥에서 혈액을 채취하여 혈청 크레아티닌, 나트륨, pH, 중탄산을 측정하였다.

3. Immunoblotting

신장 조직을 cortex and outer stripe of outer medulla (cortex/OSOM), inner stripe of outer medulla (ISOM) 및 내수질의 세 부분으로 절개 분리한다. 이를 250 mmol/L sucrose, 1 mmol/L EDTA, 0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride와 10 mM Tris-HCl buffer가 함유된 pH 7.6 용액에 넣고 3,000 rpm으로 균질화하였다. 큰 조직 조각과 핵질 파편을 1,000 g, 15분 저속 회전으로 제거하였다.

단백 표본은 12.5% polyacrylamide resolving gel과 5% polyacrylamide stacking gel로 구성된 불연속계에서 전기영동하여 크기에 따라 분리하였다. 분리된 단백질은 40 V로 3시간 동안 전기영동법으로 nitrocellulose 막으로 이동시켰다. 막을 0.1% Tween-20을 함유한 Tris-based saline buffer [TBST (Amresco, Solon, OH, USA), pH 7.4]로 세척한 후 비특이적 결합을 방지하기 위해 5% 탈지분유(NFM)를 포함한 TBST (NFM/TBST)에서 1시간 동안 반응시켰다. Nitrocellulose 막을 다시 0.2% NFM/TBST 용액에 넣고 1차 항체[Na,K-ATPase α 1-subunit (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY, USA), NHE3 (Alpha Diagnostic, San Antonio, TX, USA), NBC1 (Alpha Diagnostic) and B1-subunit of H^+ -ATPase (Santa Cruz Biotechnology, Delaware, CA, USA)]를 첨가하여 밤 동안 4°C에서 반응시켰다. 발광체를 붙이기

위해 막을 2% NFM/TBST 용액에 넣고 2차 항체[horseradish peroxidase-labeled goat anti-rabbit IgG (1 : 1,000)]를 첨가하여 1시간 동안 반응시켰다. 고정된 항체는 enhanced chemiluminescence [ECL (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, UK)] 반응시켜 Image Reader (LAS-3000 Imaging System, Fuji Photo Film, Tokyo, Japan)로 분석하였다.

4. 면역조직화학법

0.2% glutaraldehyde와 pH 7.4의 0.1 M sodium cacodylate buffer에 녹인 2% paraformaldehyde를 혼합하여 대동맥을 통하여 역행성으로 관류함으로써 실험군 및 대조군들을 고정하였다. 신장은 1시간에 걸쳐 후고정시키고 신장 조직 절편은 2% paraformaldehyde가 섞인 2.3 M sucrose에 30분 동안 침윤시키고, mount한 후 액체질소에 급속 냉각하였다. 광학 현미경하에서 동결 조직 block을 동결절편으로 만든 후 1차 항체와 함께 배양하였다. 이후 diaminobenzidine에 배양 후 HRP-conjugated 2차 항체에 의해 식별하였다.

5. 시약 및 통계

기타 시약들은 Sigma-Aldrich company (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 실험 결과는 평균±표준오차로 표시하였으며, 실험군간 차이에 대한 통계적 유의성 분석은 비쌍체 t-검정법을 사용하였다. p 값이 0.05 미만인 경우를 유의하다고 판정하였다.

결 과

1. 신기능 및 산-염기 지표

실험군 및 대조군의 신장 기능 및 산-염기 상태를 나타내는 지표들을 조사하였다. 실험군에서 혈장 크레아티닌 농도가 증가하였으며, 크레아티닌 청소율이 감소하였다. 그러나, 나트륨 분획 배설은 양 군간 유의한 차이가 없었다. Glycerol 투여 후, 혈장 pH 및 중탄산 이온 농도는 변하지 않았으나, 소변 pH 및 중탄산 이온 농도는 유의하게 감소하였다(Table 1).

2. Na,K-ATPase α 1-subunit 발현

실험군에서 Na,K-ATPase α 1-subunit 단백질 발현이 cortex/OSOM 및 ISOM에서 유의하게 감소하였고, 내수질에서는 증가하였다(Table 2 및 Fig. 1A). 면역조직화학 분석에서, Na,K-ATPase α 1 subunit의 면역반응성은 세뇨관의 기저외

Table 1. Parameters of renal function and acid-base status

	Control (n=8)	Exp (n=8)
Body weight (g)	243.3±3.3	224.0±6.8*
Plasma Cr (mg/dL)	0.52±0.02	1.98±0.28*
Ccr (mL/min)	0.87±0.08	0.19±0.04*
FE _{Na} (%)	1.24±0.08	1.80±0.48
Plasma pH	7.39±0.02	7.38±0.02
Plasma HCO ₃ ⁻ (mEq/L)	24.2±0.9	23.0±1.4
Urine pH	8.02±0.11	6.63±0.26*
Urine HCO ₃ ⁻ (mEq/L)	81.5±4.9	17.8±5.7*

Values are mean±SEM. *p<0.05 compared with control rats. Exp, experimental; Cr, creatinine; Ccr, creatinine clearance; FE_{Na}, fractional excretion of sodium into urine.

Table 2. The protein expression of Na,K-ATPase and acid-base transporters

	Control (n=8)	Exp (n=8)
Cortex/OSOM		
Na,K-ATPase α 1 subunit	1.00±0.21	0.67±0.02*
NHE3	1.00±0.06	0.28±0.03*
NBC1	1.00±0.14	0.25±0.02*
H ⁺ -ATPase (B1-subunit)	1.00±0.09	1.41±0.09*
ISOM		
Na,K-ATPase α 1 subunit	1.00±0.12	0.31±0.05*
NHE3	1.00±0.06	0.49±0.04*
H ⁺ -ATPase (B1-subunit)	1.00±0.04	0.88±0.03
Inner medulla		
Na,K-ATPase α 1 subunit	1.00±0.10	1.65±0.11*
H ⁺ -ATPase (B1-subunit)	1.00±0.08	1.36±0.04*

Values are mean±SEM. Exp, experimental; OSOM, outer stripe of outer medulla; ISOM, inner stripe of outer medulla; NHE3, type 3 Na⁺/H⁺ exchanger; NBC1, type 1 Na⁺:HCO₃⁻ cotransporter. *p<0.05 compared with control rats.

측막에서 강하게 발현되었다. 실험군의 근위세뇨관에서 Na, K-ATPase α 1 subunit의 immunolabeling이 대조군에 비하여 감소하였다(Fig. 1B).

3. NHE3 및 NBC1 발현

실험군의 cortex/OSOM 및 ISOM에서 NHE3 단백질 발현이 대조군에 비하여 유의하게 감소하였다(Table 2 및 Fig. 2A). NHE3에 대한 면역조직화학 분석에서, NHE3의 면역반응성은 근위세뇨관 및 비후상행각의 내강막에서 강하게 발현되었다. 대조군에 비하여 실험군에서 NHE3 labelling이 유의하게 감소하였다(Fig. 2B). NBC1 단백질 발현 역시 실험군에서 유의하게 감소하였다(Table 2 및 Fig. 3A). NBC1의 immunolabelling은 근위세뇨관의 기저외측막에서 관찰되었으며, 실험군에서 발현이 감소되었다(Fig. 3B).

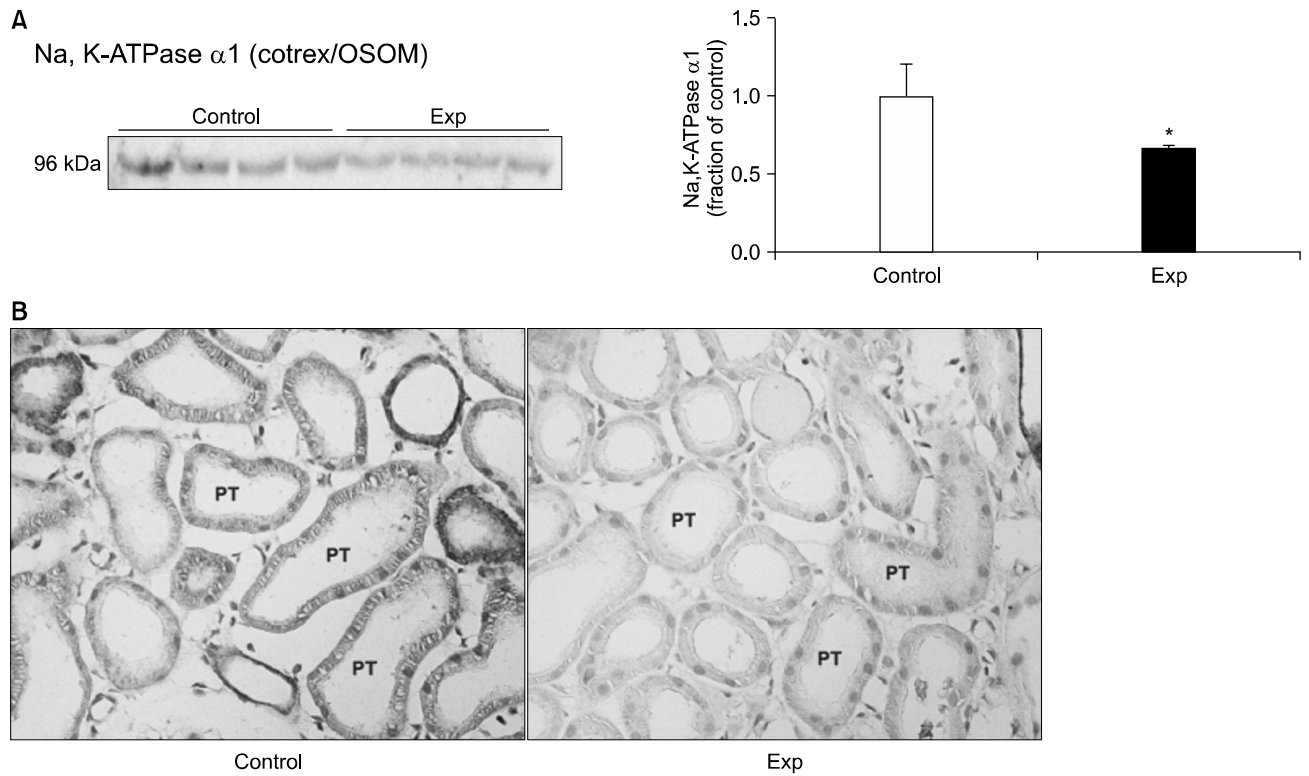


Fig. 1. (A) Semiquantitative immunoblotting of Na,K-ATPase $\alpha 1$ -subunit in the cortex and outer stripe of outer medulla (cortex/OSOM) of the kidney. Exp, experimental. Each column represents mean \pm SEM of 8 rats. * $p < 0.05$ compared with control kidney. (B) Immunoperoxidase microscopy of Na,K-ATPase $\alpha 1$ -subunit in the cortex of the kidney. PT, proximal tubule.

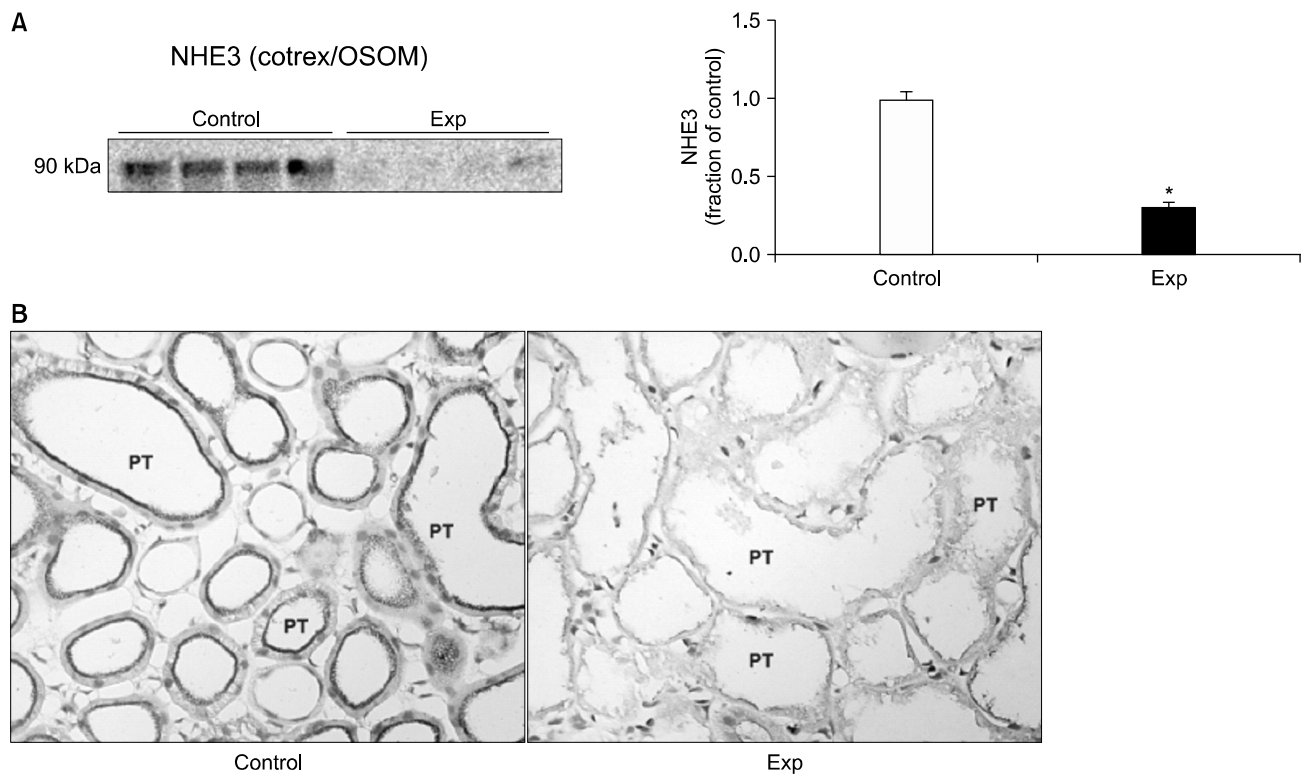


Fig. 2. (A) Semiquantitative immunoblotting of type 3 Na^+/H^+ exchanger (NHE3) in the cortex/OSOM of the kidney. (B) Immunoperoxidase microscopy of NHE3 in the cortex of the kidney. Legends as in Figure 1.

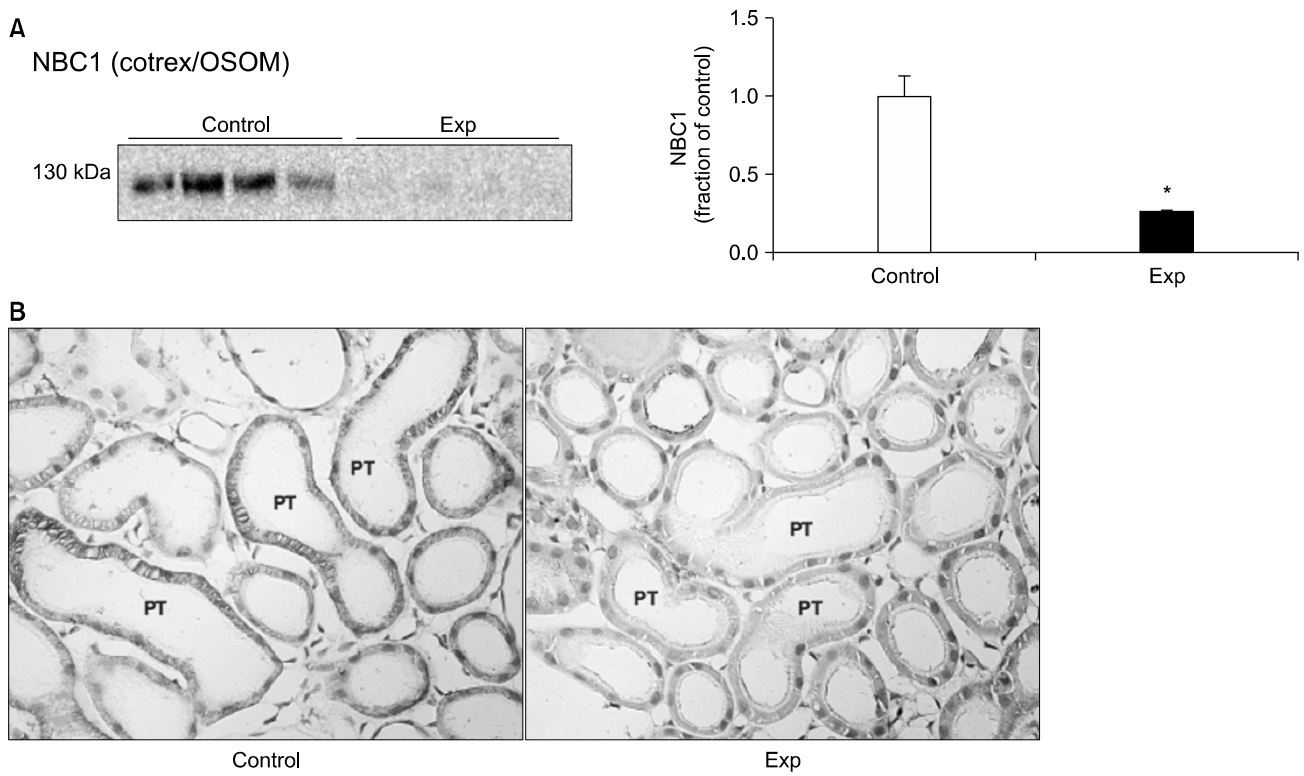


Fig. 3. (A) Semiquantitative immunoblotting of type 1 $\text{Na}^+:\text{HCO}_3^-$ cotransporter (NBC1) in the cortex/OSOM of the kidney. (B) Immunoperoxidase microscopy of NBC1 in the cortex of the kidney. Legends as in Figure 1.

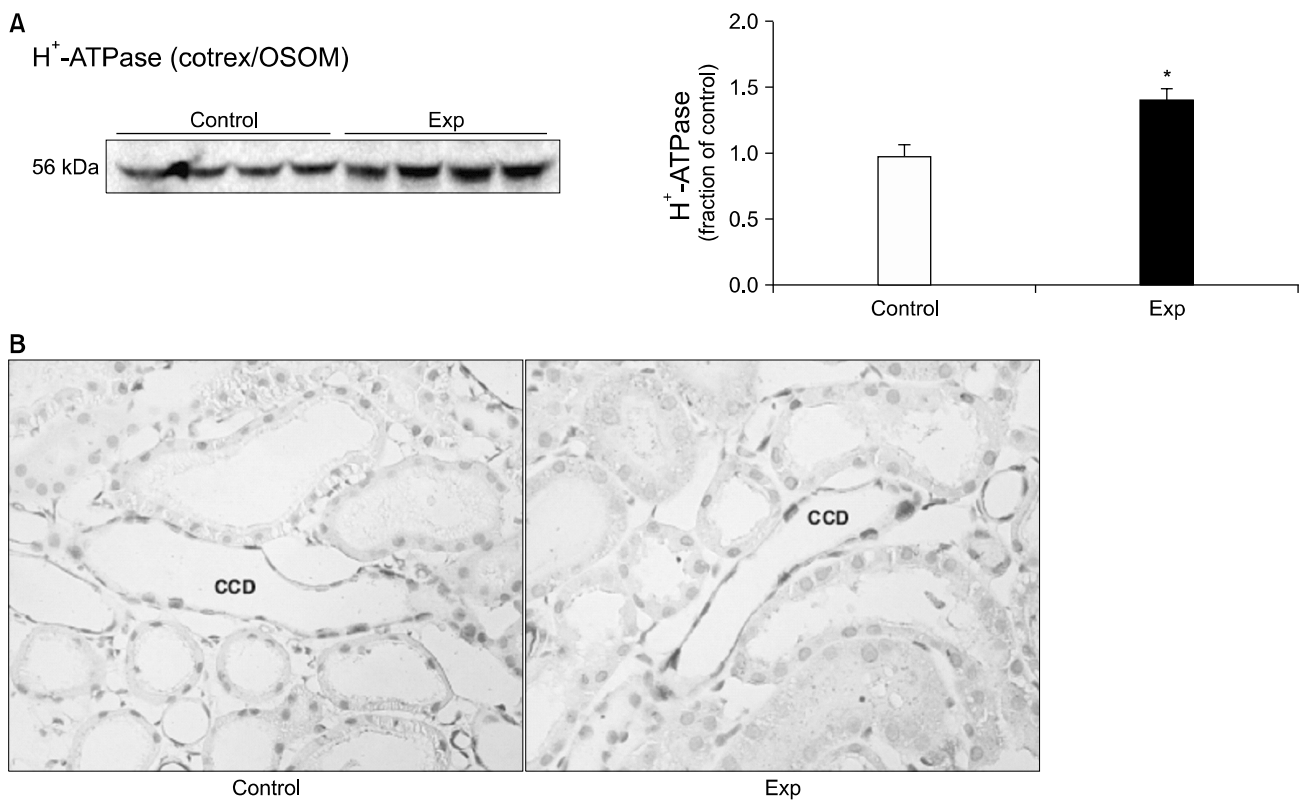


Fig. 4. (A) Semiquantitative immunoblotting of H^+ -ATPase (B1-subunit) in the cortex/OSOM of the kidney. (B) Immunoperoxidase microscopy of H^+ -ATPase (B1-subunit) in the kidney. CCD, cortical collecting duct. Legends as in Figure 1.

4. H^+ -ATPase (B1-subunit) 발현

H^+ -ATPase (B1-subunit) 단백 발현은 대조군에 비하여 실험군에서 유의하게 증가하였다(Table 2 및 Fig. 4A). H^+ -ATPase (B1-subunit)의 면역반응성은 연결세뇨관 및 집합관의 사이세포(intercalated cell)에서 관찰되었다. 실험군에서 사이세포(intercalated cell)의 내강막측 발현 강도가 증가되었다(Fig. 4B).

고 찰

본 연구에서 glycerol 투여 후, 급성 신장 손상이 발생하여 크레아티닌 청소율이 감소하였다. 그러나, 나트륨 배설은 양 구간 차이가 없었다. 이는 세뇨관 손상으로 인한 나트륨 배설 증가에 대한 보상 기전이 존재함을 시사한다. 또한, 대사성 산증이 발생하지 않았으나, 소변의 pH 및 중탄산 이온 농도는 감소하였다. 이는 체내의 산 부하가 증가하여, 대사성 산증을 방지하려는 적응 기전으로서 소변으로의 수소 이온 배설이 증가하였음을 나타낸다.

근위세뇨관에서의 나트륨 재흡수는 일차적으로 기저외측막의 Na,K-ATPase 활성화에 의하며, 이를 통한 나트륨 재흡수가 NHE3를 통한 수소 이온 배설과 NBC1을 통한 중탄산 이온 재흡수에 중요한 역할을 한다.¹⁻⁵ 이전의 연구에 의하면, glycerol 투여 후에 근위세뇨관 손상과 함께 신장 피질부의 Na,K-ATPase 효소 활성이 감소되었다.²¹ 본 연구에서도 실험군의 Na,K-ATPase 단백 발현이 cortex/OSOM 및 ISOM에서 유의하게 감소하였고, 면역조직화학 분석에서도 근위세뇨관에서의 발현이 감소되었다. 또한, NHE3 및 NBC1 발현이 감소하였다. 이러한 근위세뇨관 수송체들의 발현 감소는 근위세뇨관에서의 나트륨 및 중탄산 이온 재흡수 장애에 관련되었을 것으로 생각된다. 한편, 내수질에서의 Na,K-ATPase 단백 발현 증가는 근위세뇨관에서의 나트륨 재흡수 장애에 대한 보상 기전으로 생각된다.

이전에 본 연구자들은 glycerol에 의한 세뇨관 손상에서 Na,K-ATPase 단백 발현이 감소되고, NHE3 및 NBC1 단백 발현은 증가함을 보고하였다.²² 이는 본 실험의 결과와는 일치하지 않는 소견이다. 그러나, 이전의 실험에서는 24시간 수분 제한 후, glycerol 10 mL/kg를 투여하여 본 실험에서보다 더 심한 세뇨관 손상을 유발하였으며, 심한 대사성 산증이 발생하였다. 이러한 결과들은 세뇨관 손상 및 대사성

산증의 정도에 따라서 NHE3 및 NBC1의 발현이 상이하게 조절됨을 나타낸다.

한편, 연결세뇨관과 집합관의 사이세포(intercalated cell)에 존재하는 H^+ -ATPase가 수소 이온 분비 및 흡수를 조절하여 산-염기 조절에 중요한 역할을 함이 알려져 있다.¹⁰⁻¹³ 특히 내강막의 H^+ -ATPase (B1-subunit)가 원위 신원에서 수소 이온 분비에 중요한 역할을 하며, 이를 encoding하는 ATP6B1의 돌연변이는 신세뇨관 산증을 유발함이 알려졌다.²³ 또한 양측성 요로 폐쇄 및 lithium 투여시 대사성 산증에 대한 적응 기전으로서 H^+ -ATPase (B1-subunit) 발현이 증가함이 보고되었다.^{16,18} 본 연구에서도 실험군에서 H^+ -ATPase (B1-subunit) 단백 발현이 유의하게 증가하였으며, 집합관 사이세포(intercalated cell) 내강막의 면역반응성이 증가하였다. 이는 소변으로의 수소 이온 배설 증가를 통해 대사성 산증 발생을 방지하는 적응 기전으로 생각된다.

결론적으로, glycerol 투여에 의하여 발생한 세뇨관 손상에서 Na,K-ATPase α 1-subunit, NHE3 및 NBC1 발현 감소는 세뇨관을 통한 나트륨 및 중탄산 이온 재흡수 장애의 기전으로 생각된다. 한편, 내강막의 H^+ -ATPase (B1-subunit) 발현 증가는 대사성 산증 발생을 방지하는 역할을 하는 것으로 생각된다.

알 림

이 논문은 전남대학교병원 임상의학 연구소 학술연구비(CRI08030-1)에 의하여 연구되었음.

References

1. Kashgarian M, Biemesderfer D, Caplan M, Forbush B 3rd. Monoclonal antibody to Na,K-ATPase: immunocytochemical localization along nephron segments. *Kidney Int* 1985;28:899-913.
2. Amemiya M, Loffing J, Lötscher M, Kaissling B, Alpern RJ, Moe OW. Expression of NHE-3 in the apical membrane of rat renal proximal tubule and thick ascending limb. *Kidney Int* 1995;48:1206-15.
3. Mahnensmith RL, Aronson PS. The plasma membrane sodium-hydrogen exchanger and its role in physiological and pathophysiological processes. *Circ Res* 1985;56:773-88.
4. Preisig PA, Ives HE, Cragoe EJ Jr, Alpern RJ, Rector FC Jr. Role of the Na⁺/H⁺ antiporter in rat proximal tubule bicarbonate absorption. *J Clin Invest* 1987;80:970-8.
5. Soleimani M, Grassi SM, Aronson PS. Stoichiometry of Na⁺-HCO₃

- cotransport in basolateral membrane vesicles isolated from rabbit renal cortex. *J Clin Invest* 1987;79:1276-80.
6. Preisig PA, Alpern RJ. Chronic metabolic acidosis causes an adaptation in the apical membrane Na/H antiporter and basolateral membrane Na(HCO₃)₃ symporter in the rat proximal convoluted tubule. *J Clin Invest* 1988;82:1445-53.
7. Eladari D, Levieil F, Pezy F, Paillard M, Chambrey R. Rat proximal NHE3 adapts to chronic acid-base disorders but not to chronic changes in dietary NaCl intake. *Am J Physiol Renal Physiol* 2002;282:F835-43.
8. Amlal H, Chen Q, Greeley T, Pavelic L, Soleimani M. Coordinated down-regulation of NBC-1 and NHE-3 in sodium and bicarbonate loading. *Kidney Int* 2001;60:1824-36.
9. Nicoletta JA, Schwartz GJ. Distal renal tubular acidosis. *Curr Opin Pediatr* 2004;16:194-8.
10. Wall SM. Recent advances in our understanding of intercalated cells. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2005;14:480-4.
11. Brown D, Hirsch S, Gluck S. Localization of a proton-pumping ATPase in rat kidney. *J Clin Invest* 1988;82:2114-26.
12. 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* 1989;86:5429-33.
13. Kim J, Kim YH, Cha JH, Tisher CC, Madsen KM. Intercalated cell subtypes in connecting tubule and cortical collecting duct of rat and mouse. *J Am Soc Nephrol* 1999;10:1-12.
14. Royaux IE, Wall SM, Karniski LP, Everett LA, Suzuki K, Knepper MA, et al. Pendrin, encoded by the Pendred syndrome gene, resides in the apical region of renal intercalated cells and mediates bicarbonate secretion. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:4221-6.
15. Kim YH, Kwon TH, Frische S, Kim J, Tisher CC, Madsen KM, et al. Immunocytochemical localization of pendrin in intercalated cell subtypes in rat and mouse kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 2002;283:F744-54.
16. Kim YH, Kwon TH, Christensen BM, Nielsen J, Wall SM, Madsen KM, et al. Altered expression of renal acid-base transporters in rats with lithium-induced NDI. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003;285:F1244-57.
17. Wang G, Ring T, Li C, Kim SW, Wen J, Djurhuus JC, et al. Unilateral ureteral obstruction alters expression of acid-base transporters in rat kidney. *J Urol* 2009;182:2964-73.
18. Wang G, Li C, Kim SW, Ring T, Wen J, Djurhuus JC, et al. Ureter obstruction alters expression of renal acid-base transport proteins in rat kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008;295:F497-506.
19. Zager RA, Burkhart KM, Conrad DS, Gmur DJ. Iron, heme oxygenase, and glutathione: effects on myohemoglobinuric proximal tubular injury. *Kidney Int* 1995;48:1624-34.
20. Homsí E, Janino P, de Faria JB. Role of caspases on cell death, inflammation, and cell cycle in glycerol-induced acute renal failure. *Kidney Int* 2006;69:1385-92.
21. Rodrigo R, Bosco C, Herrera P, Rivera G. Amelioration of myoglobinuric renal damage in rats by chronic exposure to flavonol-rich red wine. *Nephrol Dial Transplant* 2004;19:2237-44.
22. Ma SK, Bae EH, Lee JU, Kim SY, Kim SZ, Choi KC, et al. Altered regulation of type 3 Na⁺/H⁺ exchanger, type 1 Na⁺/HCO₃⁻ cotransporter, and Na⁺,K⁺-ATPase in the Kidney of Rats with experimental rhabdomyolysis. *Electrolyte Blood Press* 2007;5:55-61.
23. Karet FE, Finberg KE, Nelson RD, Nayir A, Mocan H, Sanjad SA, et al. Mutations in the gene encoding B1 subunit of H⁺-ATPase cause renal tubular acidosis with sensorineural deafness. *Nat Genet* 1999;21:84-90.