行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

計畫編號：NSC 88-2314-B-002-236

執行期限：87 年 8 月 01 日至 88 年 07 月 31 日

題目：胰島素對腎小管細胞鈉氫交換器的調節

The Regulation of Na/H Exchanger by Insulin in Renal Tubule Cell

主持人：朱宗信 助理教授　執行機構及單位名稱：國立台灣大學醫學院內科

一、 中文摘要

胰島素抗性和高血壓之間有相當密切的關係，而其中一個可能的相關機制，為高胰島素血症可使腎臟對鈉的再吸收增加。胰島素可增加近端腎小管鈉和水的吸收。近端腎小管經由鈉氫交換器再吸收鈉及重碳酸根，而近端腎小管腔側膜鈉氫交換器為 NHE-3。負鼠腎(OKP)細胞是腎小管細胞，可表現 NHE-3。目前已知有多種因子可調節 NHE-3，如酸可增加 NHE-3 活性、NHE-3 mRNA 表達及 NHE-3 蛋白質表現量。胰島素受器本身即是酪胺酸激酶，我們亦想探討胰島素對 NHE-3 的作用是否經由酪胺酸激　。本計畫的研究目的是探討胰島素對近端腎小管細胞 NHE-3 活性、NHE-3 mRNA 表達的調節，及其所經的訊息傳遞機制。

我們的方法是以負鼠腎(OKP)細胞為研究模式。細胞內 pH 測定利用螢光物質 BCECF 在不同 pH 值下，其螢光強度不同，而以光譜螢光儀來測定，鈉氫交換器活性的測定乃給予細胞酸負荷後，再加鈉後看其 pH 恢復速率而求得。結果發現急性給予胰島素對鈉氫交換器活性並無影響。但慢性(48 小時)給予 10^{-6}M 胰島素可增加鈉氫交換器活性 22%，而此刺激作用可被酪胺酸激酶抑制劑 herbimycin 所阻斷。給予腎小管細胞 10^{-6}M 胰島素 48 小時可增加其 NHE3 mRNA 表現量 70%。我們推論高胰島素可增加腎小管鈉氫交換器活性，即增加鈉再吸收，而增加體液容積，而造成高血壓。

關鍵詞：胰島素、腎小管、鈉氫交換器、酪胺酸激酶

Abstract

Hypertension is very common in hyperinsulinemic type II diabetes (insulin resistance). One postulated mechanism for the association is the effect of hyperinsulinemia on renal sodium reabsorption. Insulin stimulates sodium and water absorption in the rabbit proximal tubule. Proximal tubule transcellular NaCl and $NaHCO_3$ reabsorption is mediated by an apical membrane Na/H exchanger, encoded predominantly by the isoform NHE-3. OKP cells, a cell line of renal proximal tubule, express NHE-3. The regulating factors of NHE-3 are multiple. Acid incubation increases NHE-3 activity, NHE-3 mRNA abundance, NHE-3 protein abundance. Insulin receptor is tyrosine kinase. We also like to know whether the effect of insulin on NHE-3 is through tyrosine kinase. The purpose of this project is to study the effect of insulin on

NHE-3 activity, NHE-3 mRNA abundance in renal tubular cell.

We use OKP cell as the experiment model. Continuous measurement of intracellular pH is accomplished in cells using pH-sensitive dye BCECF. Na/H exchanger activity is assayed as the initial rate of Na-dependent pHi recovery from an acid load. Short-term administration of insulin has no effect on Na/H antiporter activity. The 48h insulin-treated-cells demonstrated a 22% increase in Na/H antiporter activity. The effect of insulin on Na/H antiporter activity was blocked by tyrosine kinase inhibitor herbimycin A. The 48h insulin-treated-cells showed a 70% increase in NHE3 mRNA abundance. We speculate that high insulin stimulates Na/H antiporter activity and Na reabsorption, increases ECF volume, and then causes hypertension.

Keywords：insulin、renal tubule、Na/H exchanger、tyrosine kinase

二、 緣由與目的

大多數第二型糖尿病人，具有肥胖相關之胰島素抗性而有內源性的高胰島素血症，且常合併高血壓 [1,2]。高胰島素和高血壓之間的關係，目前尚不確知，但其中一個可能的相關機制，為高胰島素血症可使腎臟對鈉的再吸收增加 [3,4]。離體狗腎臟給予胰島素可減少尿鈉排泄 [5]。人體給予胰島素亦可減少尿鈉排泄 [3]。腎小管鈉再吸收約 2/3 在近端腎小管進行 [6]，且近端腎小管上亦有胰島素接受器 [7]。在兔子離體近端腎小管的研究顯示，胰島素可增加其鈉和水的吸收 [8]，而其可能的機制為增加鈉氫交換器活性或增加 Na / K-ATPase [9,10]。

近端腎小管經由鈉氫交換器 (Na /H exchanger)再吸收鈉及重碳酸根 [11]。鈉氫交換器 (NHE)有 NHE-1, NHE-2, NHE-3, NHE-4, NHE-5 五種同功型 [12,13]，而近端腎小管腔側膜鈉氫交換器為 NHE-3 [14]。我們想知道胰島素可否刺激 NHE-3。負鼠腎 (OK) 細胞是近端腎小管細胞，且只具有腔側膜上鈉氫交換器活性 [15]。OKP 細胞是 OK 細胞的分株，可表現 NHE-3 [16]，因此是研究 NHE-3 調節很好的模式。

對 NHE-3 的急性調節，目前已知甲型交感神經興奮劑、血管張力素、內皮素可刺激 NHE-3，而副甲狀腺素及多巴胺可抑制 NHE-3。慢性調節方面，則知代謝性酸中毒、糖化類固醇、鉀缺乏、甲狀腺素可增加 NHE-3 活性，NHE-3 mRNA 表達及 NHE-3 蛋白質表現量 [16-20]。由於胰島素受器本身即是酪胺酸激酶[21]，因此我們亦探討加入酪胺酸激酶抑制劑，是否可抑制胰島素對 NHE-3 的作用。

本計畫的研究目的，是探討胰島素對近端腎小管 (OKP) 細胞 NHE-3 活性、NHE-3 mRNA 表達，及其所經的訊息傳遞機制。

三、 材料與方法

細胞培養

由 Dr. Alpern 的實驗室取得負鼠腎細胞(OKP cells)，使用含高葡萄糖 (450mg/dL)，10%胎牛血清(fetal bovine serum)，100U/ml penicillin，100mg/ml streptomycin 的 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)培養液，置於 37°C，含

5% CO2 之潮化空氣的培養櫃培孵。細胞的繼代遷植(passage)按一般方法實行之。要作實驗時，細胞在低葡萄糖培養液長滿後換成不含胎牛血清培養液48小時再作實驗。

細胞內 pH 值和鈉氫交換器活性的測定

細胞內 pH 的測定是利用一種對 pH 敏感的色素 2', 7'-bis (2-carboxyethyl)-5, 6-carboxyfluorescein (BCECF)，細胞長在玻片(coverslip)加入 10mM BCECF-AM (acetoxymethyl ester) 37°C 下，35 分。玻片清洗後，放在 cuvette，再置入電腦控制光譜螢光儀 (spectrofluorometer) (SLM 8000 C，Rochester，NY)。激發波長用 500 nm 及 450 nm，放出波長用 530 nm，以 500 nm/450 nm 螢光強度比值來估計細胞內 pH 值。此 ratio 的校正是利用 nigericin technique，由 pH 6.2 到 pH 7.6 得到一條線性反應。

鈉氫交換器活性測定，乃利用細胞給予酸負荷後，其鈉依賴性 pH 恢復的速率來評估。含鈉溶液成份為 Na 130, K 5.0, Ca 1.1, Mg 1.5, Cl 140.2, Hepes (N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid) 30 mM。在不含鈉的溶液，以 choline 來取代 Na。所有溶液以 N-methyl-D-glucammonium hydroxide 調 pH 至 7.4。細胞首先置於含鈉溶液，並測其基底 pH 值，然後換成 13 mM nigericin 不含鈉的溶液 4 分，使 pH 值降至 6.4-6.6。移去 nigericin ，再加入含 1%透析過的牛血清蛋白的不含鈉溶液 2 分，再換成不含鈉溶液 30 秒。再換成含鈉溶液，由於鈉氫交換器活性的關係，pH 值會回升，由圖形畫一條切線而算出鈉依賴性 pHi 變化速率(dpHi/dt)。所有實驗，對照組和實驗組使用同一代的細胞，並在同一天測定鈉氫交換器活性。

所用胰島素濃度為 10^{-8}M、10^{-7}M、10^{-6}M 等，加入的時間分別為 30 分及 48 小時。酪胺酸激酶抑制劑 herbimycin A 所用濃度為1μM ，於加入胰島素前 16 小時加入。

四、 結果與討論

研究結果發現在腎小管細胞(OKP cell)急性給予胰島素 10^{-8}M, 10^{-7}M，10^{-6}M 對其鈉氫交換器活性皆無作用。但在此細胞慢性(48 小時)給予胰島素 10^{-7}M，可增加鈉氫交換器活性 15%；而給予胰島素 10^{-6}M，可增加鈉氫交換器活性達 22%(表一，圖一)。酪胺酸激酶抑制劑 10^{-6}M herbimycin 可阻斷胰島素增加鈉氫交換器活性的作用(表一)。腎小管細胞慢性(48 小時)給予胰島素 10^{-6}M，可增加 NHE3 mRNA 表現量 70%。

胰島素慢性可增加腎小管細胞鈉氫交換器活性，而急性則無作用。一般而言，鈉氫交換器活性的調節，慢性和急性常不一樣，甚至作用相反。cAMP 急性抑制而慢性刺激腎小管細胞鈉氫交換器活性[22]。內皮素急性刺激而慢性抑制腎小管細胞鈉氫交換器活性[17,23]。

鈉氫交換器活性的調節常經由 NHE3mRNA 表達或 NHE-3 蛋白質表現，如代謝性酸中毒、糖化類固醇[16,20]。本研究亦發現胰島素經由 NHE3 mRNA 表達的增加而活化鈉氫交換器。本研究未測 NHE3 蛋白質量。胰島素本身是酪胺酸激酶 [21]，因此 herbimycin A 可抑制胰島素增加鈉氫交換器活性的作用，就不待說明了。

胰島素增加鈉氫交換器活性有何生理意義呢？由於目前認為胰島素抗性和高血壓有相關，我們推論高胰島素可增加腎小管鈉氫交換器活性，即增加鈉再吸收而增加體液容積，而造成高血壓。

五、 參考文獻

1. Landsberg L：Diet, obesity and hypertension：an hypothesis involving insulin, the sympathetic nervous system, and adaptive thermogenesis. QJ Medicine 1986; 236: 1081-1090.
2. Landsberg L：Insulin and hypertension - lessons from obesity. N Engl J Med 1987; 317: 378-379.
3. DeFronzo RA, Cooke CR, Andres R, Faloona GR, Davis PJ：The effect of insulin on renal handling of sodium, potassium, calcium, and phosphate in man. J Clin Invest 1975; 55: 845-855.
4. Reaven GM, Lithell H, Landsberg L：Hypertension and associated metabolic abnormalities - the role of insulin resistance and the sympathoadrenal system. N Engl J Med 1996; 45:216-222.
5. Nizet A, LeFrebre P, Crabbe R：Control by insulin of sodium, potassium and water excretion by the isolated dog kidney. Pfleugers Arch (Eur J Physiol) 1971; 323:11-20.
6. Alpern RJ, Stone DK, Rector FC：Renal acidification mechanisms. In Brenner BM, Rector FC, eds. The Kidney. 4th ed. Phildelphia; WB Saunders 1991:318-379.
7. Nakamura R, Emmanouel DS, Katz AI：Insulin binding sites in various segments of the rabbit nephron. J Clin Invest 1983; 72: 388-392.
8. Baum M：Insulin stimulates volume absorption in the rabbit proximal convoluted tubule. 1987; 79: 1104-1109.
9. Fine LG, Badie-Dezfooly B, Lowe AG, Hamzeh A, Wells J, Salehmoghaddam S：Stimulation of Na-H antiport is an early event in hypertrophy of renal proximal tubular cells. Proc Natl Acad Sci USA 1985; 82:1736-1740.
10. Moore RD：Effect of insulin upon ion transport. Biochim Biophys Acta 1983; 737:1-49.
11. Alpern RJ：Cell mechanisms of proximal tubule acidification. Physiol Rev 1990; 70:79-114.
12. Szpirer C, Szpirer J, Riviere M, Levan G, Orlowski J：Chromosal assignment of four genes encoding Na /H exchanger isoforms in human and rat. Mammalian Genome 1994; 5:153-159.
13. Kanke CA, Su YR, Callen DF, Wang Z, Menton P, Baird N, Kandosamy RA, Orlowski J, Otterud BE, Leppert M：Molecular Cloning and physical and genetic mapping of a novel human Na/ H exchanger (NHE 5/ SLC9A5) to chromosome 16q 22.1. Genomics 1995; 25:615-622.
14. Biemesderfer D, Pizzonia J, Abu-Alfa A, Exner M, Reilly R, Igarashi P, Aronson

PS：NHE-3：A Na^+/H^+ exchanger isoform of renal brush border. Am J Physiol 1993; 265: F736 - F742.

15. Malstrom K, Stange G, Murer H：Identification of proximal tubular transport functions in the established kidney cell line, OK. Biochim Biophys Acta 1987; 902:269-277.
16. Amemiya M, Yamaji Y, Cano A, Moe OW, Alpern RJ：Acid incubation increases NHE-3 mRNA abundance in OKP cells. Am J Physiol 1995; 269:C126-C133.
17. Chu TS, Peng Y, Cano A, Yanaisawa M, Alpern RJ：$Endothelin_B$ receptor activates NHE-3 by a Ca^{2+} - dependent pathway in OKP cells. J Clin Invest 1996; 97:1454 -1462.
18. Moe OW, Alpern RJ：Na^+/H^+ exchange in mammalian kidney. In: Fliegel L ed. The Na^+/H^+ Exchanger. New York: Chapman & Hall, 1996:21-46.
19. Wakabayashi S, Shigekawa M, Poussegur J：Molecular physiology of vertebrate Na^+/H^+exchangers. Physiol Rev 1997; 77:51-74.
20. Ambuhl PM, Amemiya M, Danczkay M, Lotscher M, Kaissling B, Moe OW, Preisig PA, Alpern RJ：Chronic metabolic acidosis increases NHE-3 protein abundance in rat kidney . Am J Physiol 1996; 271: F917-F925.
21. Lee J, Pilch PF：The insulin receptor: structure, function, and signaling. Am J Physiol 1994; 266:C319-C334.
22. Cano A, Preisig P, Alpern RJ：Cyclic adenosine monophosphate acutely inhibits and chronically stimulates Na^+/H^+ antiporter in OKP cells. J Clin Invest 1993;92: 1632-1638.
23. Chu TS, Wu KD, Wu MS, Hsieh BS: Endothelin-1 chronically inhibits Na/H antiporter activity and decreases NHE-3 mRNA abundance in ET_B-overexpressing OKP cells. (submitted)

Table 1 : Herbimycin inhibits insulin-induced Na/H exchanger activation

Insulin	Herbimycin A	NHE activity (% of control)	P value
0	0	100	
10^{-8}M	0	103±4	NS
10^{-7}M	0	115±5	<0.1
10^{-6}M	0	122±5	<0.05
0	10^{-6}M	98±3	NS
10^{-6}M	10^{-6}M	101±4	NS

Data are expressed as mean±SD. The OKP cells were incubated with insulin for 48h.

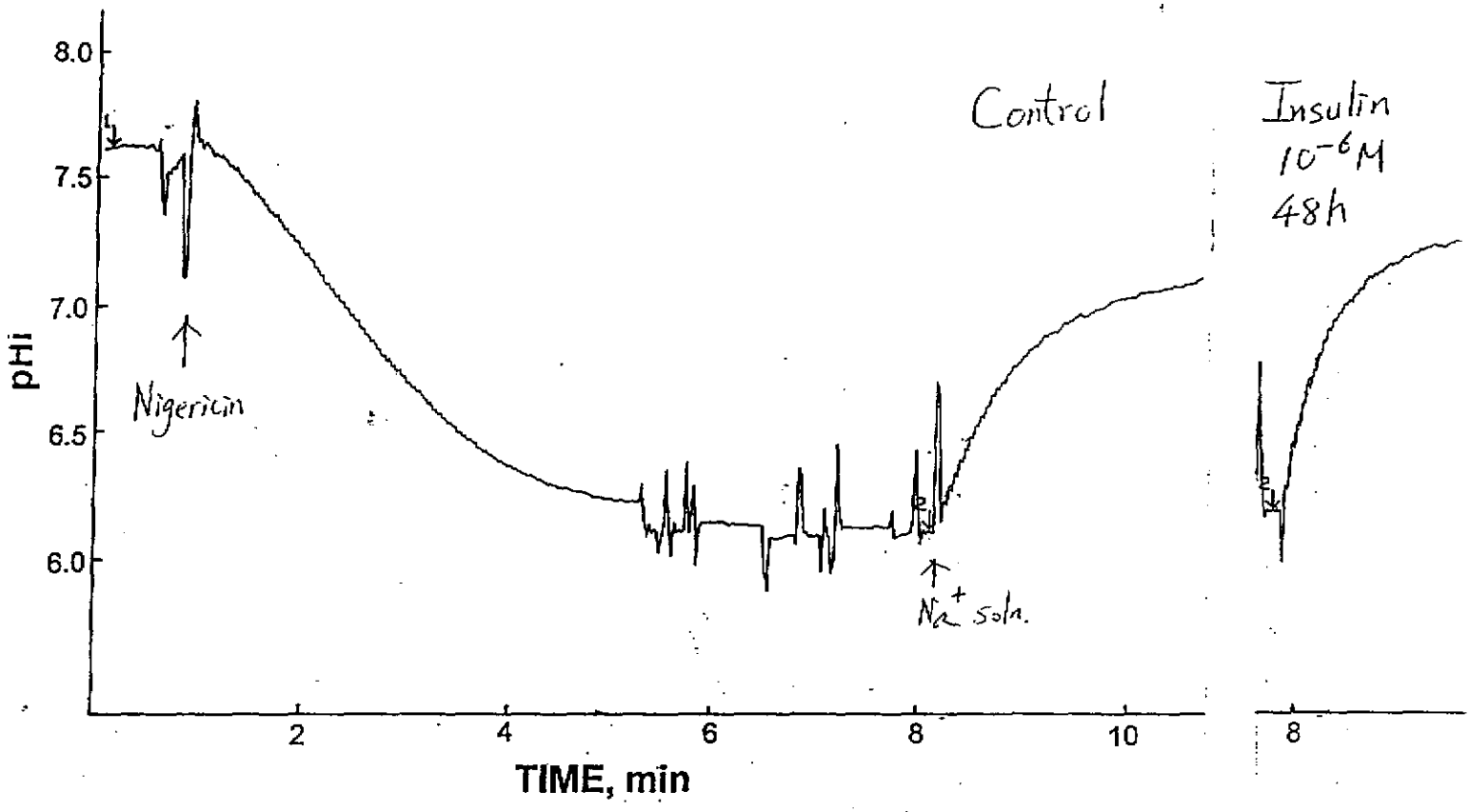

Fig. 1 : Insulin increase Na/H antiporter activity