

# 行政院國家科學委員會補助專題研究計畫成果報告

※※※

※

※

## 多巴胺對腎小管細胞鈉氫交換器的調節

※

※

※※※

計畫類別：個別型計畫      整合型計畫

計畫編號：NSC89--2314-B-002-071-

執行期間： 88年8月1日至89年7月31日

計畫主持人：朱宗信

共同主持人：

本成果報告包括以下應繳交之附件：

- 赴國外出差或研習心得報告一份
- 赴大陸地區出差或研習心得報告一份
- 出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份
- 國際合作研究計畫國外研究報告書一份

執行單位：國立台灣大學內科

中華民國 89 年 12 月 18 日

## 一·中文摘要

多巴胺可增加尿鈉排泄而調節胞外液容積，其機制和多巴胺抑制近端腎小管鈉和水的吸收有關。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。近端腎小管具豐富的 DA<sub>1</sub> 受體，與多巴胺結合後，可增加 cAMP 及活化 phospholipase C。本計畫的研究目的是探討多巴胺對近端腎小管細胞 NHE-3 的作用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。結果發現急性給予多巴胺 10<sup>-5</sup>M 可抑制鈉氫交換器活性 21%，而慢性給予多巴胺 10<sup>-6</sup>M 可抑制鈉氫交換器活性 41%；而此刺激作用可被 DA<sub>1</sub> 受體拮抗劑 SCH23390 所抑制。我們推論多巴胺經由 DA<sub>1</sub> 受體而抑制近端腎小管鈉氫交換器活性，即減少鈉再吸收，而達到其利尿鈉之作用。

**關鍵詞：**多巴胺、腎小管、鈉氫交換器

### **Abstract:**

Dopamine plays an important role in regulating extracellular fluid volume by increasing urinary excretion of sodium. Dopamine inhibits sodium and water reabsorption in the renal proximal tubule. Proximal tubule transcellular NaCl and NaHCO<sub>3</sub> 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. DA<sub>1</sub> receptors have been found in proximal convoluted tubule. DA<sub>1</sub> receptors are G-protein coupled receptors and stimulate adenylyl cyclase and/ or phospholipase. The purpose of this project is to study the effect of dopamine on NHE-3 activity and signal transduction mechanism.

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 pH<sub>i</sub> recovery from an acid load. Short-term administration of 10<sup>-5</sup>M dopamine induced a 21% decrease in Na/H antiporter activity. The 24h 10<sup>-6</sup>M dopamine-treated cells demonstrated a 41% decrease in Na/H antiporter activity. The effect of dopamine on Na/H antiporter

activity was blocked by DA<sub>1</sub> antagonist SCH23390. We speculate that dopamine binds DA<sub>1</sub> receptors, inhibits Na/H antiporter activity and Na reabsorption, and causes natriuresis.

**Keywords : dopamine、renal tubule、Na/H exchanger**

## 二·緣由與目的

有很多證據顯示，多巴胺藉由腎臟鈉運送的減少，來調節胞外液容積。當飲食中鈉攝取量改變時，可見尿鈉和尿多巴胺成正相關[1]。胞外液急性增加時，可發現尿中多巴胺排泄增加[2]。急性體液增加所造成的利尿鈉作用，可用多巴胺受體拮抗劑使其減弱[3]。大多數的腎多巴胺是由腎絲球過濾出的 L-dopa，經由近端腎小管上的 L-aromatic amino acid decarboxylase 作用而產生[4]。多巴胺受體是一種與 G-蛋白質協同作用的受體，其周邊受體型式依藥理學可分為 DA<sub>1</sub> 和 DA<sub>2</sub> 兩型[5]。近端腎小管具豐富的多巴胺受體，且以 DA<sub>1</sub> 為主[6]。

近端腎小管經由鈉氫交換器 (Na/H exchanger) 再吸收鈉及重碳酸根。由老鼠腎小管 BBMV (brush border membrane vesicle) 的研究顯示多巴胺可抑制鈉氫交換器活性[7]。鈉氫交換器 (NHE) 有 NHE-1, NHE-2, NHE-3, NHE-4, NHE-5 五種同功型 [8,9]，而近端腎小管腔側膜鈉氫交換器為 NHE-3 [10]。我們想知道多巴胺對腎 NHE-3 的作用。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 [11]。OKP 細胞是 OK 細胞的分株，可表現 NHE-3 [12]，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 [12-16]。NHE-3 的急性調節，一般經由蛋白質激酶 C 的改變 [17]。多巴胺與其 DA<sub>1</sub> 受體結合後，可增加 cAMP 及活化 phospholipase C [18]。NHE-3 的慢性調節，一般是經由 NHE-3 mRNA 及 NHE-3 蛋白質表現量的改變。

本計畫的研究目的，是探討多巴胺對近端腎小管細胞 NHE-3 的作用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% CO<sub>2</sub> 之潮化空氣的培養櫃培養。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 pH<sub>i</sub> 變化速率(dpH<sub>i</sub>/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。

所用多巴胺濃度為 10<sup>-8</sup>M、10<sup>-7</sup>M、10<sup>-6</sup>M、10<sup>-5</sup>M 等。測急性作用時，加入的時間為 30 分，而測慢性作用時，加入的時間為 24 小時。DA<sub>1</sub> 拮抗劑 SCH 23390，DA<sub>2</sub> 拮抗劑 Sulpiride 各試用幾個適當的濃度。

#### 四·結果與討論

研究結果發現在腎小管細胞 (OKP cell) 急性給予多巴胺 10<sup>-5</sup>M 可抑制鈉氫交換器活性 21%，而 10<sup>-8</sup>M, 10<sup>-7</sup>M, 10<sup>-6</sup>M 則無作用。上述抑制作用可被 DA<sub>1</sub> 拮抗劑 SCH23390 所阻斷，而不被 DA<sub>2</sub> 拮抗劑 sulpiride 所阻斷。慢性給予多巴胺 10<sup>-6</sup>M 即可抑制鈉氫交換器活性 41%，而 10<sup>-8</sup>M, 10<sup>-7</sup>M 則無作用。上述抑制作用可被 DA<sub>1</sub> 拮抗劑 SCH23390 所阻斷，而不被 DA<sub>2</sub> 拮抗劑 sulpiride 所阻斷。

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[19]。內皮素急性刺激而慢性抑制腎小管細胞鈉氫交換器活性[13,20]。胰島素慢性增加腎小管細胞鈉氫交換器活性，而急性則無作用[21]。本研究顯示多巴胺慢性和急性皆抑制腎小管細胞鈉氫交換器活性，但慢性只需較低濃度即可達到作用。

多巴胺主要的受體有 DA<sub>1</sub>, DA<sub>2</sub> 兩種，本研究顯示多巴胺經由 DA<sub>1</sub> 受器再抑制腎小管細胞鈉氫交換器活性。鈉氫交換器的調節常經由 NHE-3 mRNA 表達或 NHE-3 蛋白質表現，如代謝性酸中毒、糖化類固醇、內皮素[12,16,20]。

多巴胺抑制鈉氫交換器活性有何生理意義呢？我們認為多巴胺，特別是慢性給予在低劑量即可抑制腎小管鈉氫交換器活性，即減少鈉再吸收，增加尿鈉排泄，由此可說明多巴胺在鈉平衡慢性調節所扮演的角色。

## 五、參考文獻

1. Alexander RW, Gill JR, Yamabe H, Lovenberg W, Keiser HR: Effects of dietary sodium and of acute saline infusion on the interrelationship between dopamine excretion and adrenergic activity. *J Clin Invest* 1974;54:194-200.
2. McClanahan M, Sowers JR, Beck FWJ, Mohanty PK, McKenzie T: Dopaminergic regulation of natriuretic response to acute volume expansion in dogs. *Clin Sci* 1985;68:263-269.
3. Pelayo JC, Fildes RD, Eisner GM, Jose PA: Effects of dopamine blockade on renal sodium excretion. *Am J Physiol* 1983; 245:F247-F253.
4. Chan YL: Cellular mechanisms of renal tubular transport of L-DOPA and its derivatives in the rat: Microperfusion studies. *J Pharmacol Exp Ther* 1976;199:17-24.
5. Goldberg LI, Kohli JD, Glock D: Conclusive evidence for two subtypes of peripheral dopamine receptors. In: Woodruff GN, Poat JA, Roberts PJ, eds. *Dopaminergic System and their Regulation*. London: Macmillan, 1986:195-212.
6. Felder RA, Jose PA: Dopamine-1 receptor in rat kidneys identified with 125 I-SCH23982. *Am J Physiol* 1991;261: F890-F895.
7. Felder CC, Cambell T, Albrecht F, Jose PA: Dopamine inhibits Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchanger activity in renal BBMVs by stimulation of adenylate cyclase. *Am J Physiol* 1990; 259: F297-F303.
8. Szpirer C, Szpirer J, Riviere M, Levan G, Orlowski J : Chromosomal assignment of four genes encoding Na/H exchanger isoforms in human and rat. *Mammalian Genome* 1994; 5:153-159.