

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

計畫編號： NSC90-2314-B-002-226

執行期限：90年8月1日至91年7月31日

主持人：朱宗信 執行機構及單位名稱：台大醫學院
一般醫學科

一、中文摘要

血管張力素 (angiotensin II) 調控近端腎小管溶質運送而調節胞外液容積。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，而基底外側膜重碳酸鈉共同運送器為 NBC-1。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 AT₁ 受體，與血管張力素結合後，可抑制 cAMP 及活化 phospholipase C。本計畫的研究目的是探討慢性給予血管張力素對腎小管 NHE-3 活性、NHE-3 蛋白質量的調節。

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。以各種濃度之血管張力素慢性給予後觀察對腎小管鈉氫交換器活性的作用。此外，亦以西方轉漬法來看血管張力素對腎小管細胞 NHE-3 蛋白質表現量的調節。再來以北方轉漬法來看血管張力素對腎小管細胞 NBC-1 mRNA 表達的調節。

結果發現慢性給予血管張力素 10^{-8} M 可抑制鈉氫交換器活性 20%，而 10^{-7} M 可抑制 18%。然而慢性給予 10^{-7} M 或 10^{-8} M 血管張力素對鈉氫交換器蛋白質表現量並沒有影響。因此血管張力素抑制鈉氫交換器可能經由其他的機制。

關鍵詞：血管張力素、腎小管、鈉氫交換器

Abstract:

Angiotensin II regulates extracellular fluid volume, in part, by controlling proximal tubule solute transport. Proximal tubule transcellular NaCl and NaHCO₃ reabsorption is mediated by an apical membrane Na/H exchanger, (NHE-3) and a basolateral Na/HCO₃ (NBC-1). OKP cells, a cell line of renal proximal tubule, express NHE-3. The regulating factors of NHE-3 are multiple. Acid incubation increases

have been found in proximal convoluted tubule. AT_1 receptors are G-protein coupled receptors and inhibit adenylyl cyclase. The purpose of this project is to study the chronic effect of angiotensin on NHE-3 activity, NHE-3 protein abundance.

We used OKP cell as the experiment model. Continuous measurement of intracellular pH was accomplished in cells using pH-sensitive dye BCECF. Na/H exchanger activity is assayed as the initial rate of Na-dependent pH_i recovery from an acid load. We checked chronic effect of angiotensin in different concentration on Na/H exchanger activity in renal tubular cell. We check the effect of angiotensin on NHE-3 mRNA and protein abundance in OKP cell.

Chronic administration of angiotensin II 10^{-8} M induced a 20% decrease in Na/H antiporter activity; and 10^{-7} M induced an 18% decrease. There was no effect of angiotensin II on NHE-3 protein abundance. We postulate that angiotensin chronically inhibited NHE-3 activity through other mechanisms.

Keywords: angiotensin II, renal tubule, Na/H exchanger

二、緣由與目的

近端腎小管在吸收 70-90%濾過的重碳酸鈉及 50%濾過的氯化鈉。近端腎小管腔側膜氫離子分泌 70%經由鈉氫交換器 (Na/H exchanger, NHE)，而另外 30%經由 H-ATPase 【1,2】。近端腎小管在吸收氯化鈉中，40-70%經由細胞旁途徑，而 30-60%經由細胞的再吸收 【3,4】。腎小管腔側膜氯化鈉在吸收全賴鈉氫交換器及氯鹼交換器 【4,5】。近端腎小管基底外側膜則有重碳酸鈉共同運送器 (Na/HCO₃ cotransporter, NBC) 將重碳酸鈉運出 【2,6,7】。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】。

血管張力素 (angiotensin II) 調控近端腎小管溶質運送而調節胞外液容積 【11,12】。全身性給予血管張力素可造成利尿鈉或抗利尿鈉作用 【13,14】。急性給予血管張力素可增加近端腎小管鈉氫交換器活性及重碳酸鈉共同運送器活性 【15,16】。其訊息傳遞機智是經由 AT_1 受器再降低 cAMP 【17,18】。除了 cAMP 以外，亦有其他機制如 PKC, PLA₂, Ca 等 【19,20】。

以細胞培養方式來研究近端腎小管運送可避免一些腎絲球血行動力學的干擾，亦是一個很好的研究方式。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。在 OKP 細胞急性給予生理劑量血管張力素可增加其鈉氫交換器活性但不影響 cAMP 量 【23】。Tyrosin kinase c-*Src* 在血管張力素活化 NHE-3 亦扮演某些角色 【24】。

以上所討論的主要是急性的作用，而 NHE-3 的急性調節，一般經由蛋白質激酶的改

變【25】。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【23,26,27】。慢性的作用應更符合實際生理狀況。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【22,28,29】。

本計畫的研究目的乃是探討慢性給予血管張力素對近端腎小管細胞 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% CO₂ 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 24 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。

所用血管張力素濃度為 10⁻¹¹M、10⁻¹⁰M、10⁻⁹M、10⁻⁸M、10⁻⁷M、10⁻⁶M 等。測慢性作用時，加入的時間為 24 小時。

西方轉漬法(Western Blotting)

細胞於培養皿長滿後，換成不含血清之培養液 48 小時，用 PBS 清洗 3 次，以 RIPA 緩衝液(內含 NaCl 150mM, Tris HCl [pH7.4] 50 mM, EDTA 2.5mM, EGTA 5 mM, b-glycerophosphate 50 mM, NaF 50 mM, Na orthovanadate 1 mM, phenylmethylsulfonyl fluoride [PMSF] 1 mM, dithiothreitol 0.5mM, Triton X-100 1%, Na deoxycholate 1%, SDS 0.1%, pepstatin 2 mg/ml, leupeptin 5 mg/ml, aprotinin 5 mg/ml) 將細胞刮下，置於 4°C 45 分，以 10,000 g 離心 15 分，取上清液以 RIPA 緩衝液稀釋為 3 mg protein/ml (Bradford, 1976)。再以 2X SDS loading buffer (內含 5mM TrisHCl [pH6.8], 1% SDS, 10% glycerol, 1% 2-mercaptoethanol)稀釋，以 7.5%膠作 SDS-PAGE(polyacrylamide gel electrophoresis)。再將膠所含的蛋白質用 electrotransfer 於 4°C 轉移至 nitrocellulose 膜。先用內含 5%脫脂奶粉及 0.05% Tween 20 的 PBS 來 blocking 膜 1 小時。再來以同樣溶液加入 $1\mu\text{g/ml}$ 兔子 anti-OKP-NHE-3 多株抗體和膜作用 1 小時。再用含 0.1% Tween 20 的 PBS 清洗膜 15 分 1 次，5 分 2 次。再以含 1/5000 稀釋 horseradish peroxidase-labeled sheep anti-rabbit IgG, 5% 脫脂奶粉, 0.05% Tween 20 的 PBS 與膜作用一小時。再依前述的方法清洗之。然後再作 enhanced chemiluminescence (ECL)，所用的 ECL kit 為 Amersham 出品。各種操作時，所用血管張力素濃度、時間，參見測定鈉氫交換器活性部份。

四、結果與討論

研究結果發現在腎小管細胞 (OKP cell) 慢性 (24 小時) 給予血管張力素 10^{-9}M 可抑制鈉氫交換器 10%(NS), 10^{-8}M 可抑制 20%($p<0.05$), 10^{-7}M 可抑制 18%($p<0.05$)。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【30】。內皮素急性刺激而慢性抑制腎小管細胞鈉氫交換器【26,29】。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【31】。本研究顯示血管張力素慢性抑制腎小管細胞鈉氫交換器活性，而之前的研究顯示血管張力素急性刺激腎小管細胞鈉氫交換器活性【23】。血管張力素對鈉氫交換器的作用和內皮素相似。

本研究結果顯示慢性給予血管張力素 $10^{-7}\text{M}, 10^{-8}\text{M}, 10^{-9}\text{M}$ 對鈉氫交換器蛋白質表現量並沒有影響。因此，血管張力素慢性抑制鈉氫交換器活性的機制和 NHE-3 蛋白質表現量無關，而可能有其他機制。此點和內皮素慢性給予造成 NHE-3 蛋白質表現量減少進而抑制鈉氫交換器活性不同【29】。

五、參考文獻

1. 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;80:970-978.
2. Alpern RJ: Cell mechanisms of proximal tubule acidification. *Physiol Rev* 1990;70:79-114.
3. Alpern RJ: Mechanism of basolateral membrane $\text{H}^+/\text{OH}^-/\text{HCO}_3^-$ transport in the rat proximal convolution tubule. *J Gen Physiol* 1985;86:613-636.
4. Preisig PA, Rector FC Jr.: Role of Na^+-H^+ antiport in rat proximal tubule NaCl

- absorption. *Am J Physiol* 1988;255:F461-F465.
5. Baum M: Evidence that parallel $\text{Na}^+\text{-H}^+$ and $\text{Cl}^-\text{-HCO}_3^-$ -antiporters transport NaCl in proximal tubule. *Am J Physiol* 1987;252:F338-F345.
 6. Romero MF, Hediger MA, Boulpaep EL, Boron WF: Expression cloning and characterization of a renal electrogenic $\text{Na}^+\text{/HCO}_3^-$ -cotransporter. *Nature* 1997;378:409-413.
 7. Burnham CE, Flagella M, Wang Z, Amlal H, Shull GE, Soleimani M: Cloning, renal distribution, and regulation of the rat $\text{Na}^+\text{-HCO}_3^-$ cotransporter. *Am J Physiol* 1998;274:F1119-F1126.
 8. Szpirer C, Szpirer M, Levan G, Orłowski J: Chromosomal assignment of four genes encoding Na/H exchanger isoforms in human and rat. *Mammalian Genome* 1994;5:153-159.
 9. Kanke CA, Su YR, Callen DF, Wang Z, Menton P, Baird N, Kandasamy RA, Orłowski J, Otterud BE, Leppert M: Molecular cloning and physical and genetic mapping of a novel human Na/H exchanger (NHE5/SLC9A5) to chromosome 16q22.1. *Genomics* 1995;25:615-622.
 10. Biemesderfer D, Pizzonia J, Abu-Alfa A, Exner M, Reilly R, Igarashi P, Aronson PS: NHE-3: A $\text{Na}^+\text{/H}^+$ exchanger isoform of renal brush border. *Am J Physiol* 1993;265:F736-F742.
 11. Moe OW, Alpern RJ, Henrich WL: The renal proximal tubule renin-angiotensin system. *Semin Nephrol* 1993;13:552-557.
 12. Quan A, Baum M: Regulation of proximal tubule transport by angiotensin II. *Semin Nephrol* 1997;17:423-430.
 13. Healy JK, Elliott AJ: The effect of a natriuretic dose of angiotensin on rabbit kidney composition. *Clin Sci* 1970;38:727-739.
 14. Johnson MD, Malvin RL: Stimulation of renal sodium reabsorption by angiotensin II. *Am J Physiol* 1977;232:F298-F306.
 15. Liu FY, Cogan MG: Angiotensin II: a potent regulator of acidification in the rat early proximal tubule. *J Clin Invest* 1987;80:272-275.
 16. Geibel J, Giebisch G, Boron WF: Angiotensin II stimulates both Na-H exchange and Na/HCO_3^- cotransport in the rabbit proximal tubule. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:7917-7920.
 17. Liu FY, Cogan MG: Angiotensin II stimulates early proximal bicarbonate absorption in the rat by decreasing cyclic adenosine monophosphate. *J Clin Invest* 1989;84:83-91.
 18. Douglas JG: Angiotensin receptor subtypes of the kidney cortex. *Am J Physiol* 1987;253:F1-F7.
 19. Morduchowicz GA, Sheikh-Hamad D, Dwyer BE, et al: Angiotensin II directly increases rabbit renal brush-border membrane sodium transport: Presence of local signal transduction system. *J Membrane Biol* 1991;122:43-53.
 20. Houillier P, Chambrey R, Achard JM, Froissart M, Poggioli J, Paillard M: Signaling

- pathways in the biphasic effect of angiotensin II on apical Na/H antiport in proximal tubule. *Kidney Int* 1996;50:1496-1505.
21. Malstrom K, Stange G, Murer H: Identification of proximal tubule transport functions in the established kidney cell line, OK. *Biochim Biophys Acta* 1987;902:269-277.
 22. 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.
 23. Cano A, Miller RT, Alpern RJ, Preisig PA: Angiotensin II stimulation of Na-H antiporter activity is cAMP independent in OKP cells. *Am J Physiol* 1994;266:C1603-C1608.
 24. Tsuganezawa H, Preisig PA, Alpern RJ: Dominant negative c-Src inhibits angiotensin II induced activation of NHE-3 in OKP cells. *Kidney Int* 1998;54:394-398.
 25. Moe OW: Sodium-hydrogen exchange in renal epithelia: mechanisms of acute regulation. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1997;6:440-446.
 26. Chu TS, Peng Y, Cano A, Yanaisawa M, Alpern RJ: Endothelin_B receptor activates NHE-3 by a Ca²⁺-dependent pathway in OKP cells. *J Clin Invest* 1996;97:1454-1462.
 27. Wakabayashi S, Shigekawa M, Poussegur J: Molecular physiology of vertebrate Na⁺/H⁺ exchangers. *Physiol Rev* 1997;77:51-74.
 28. 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.
 29. Chu TS, Wu KD, Wu MS, Hsieh BS: Endothelin-1 chronically inhibits Na/H exchanger-3 in ET_B-overexpressing OKP cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;271:807-811.
 30. 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.
 31. Chu TS, Wu KD, WU MS, Hsieh BS: Insulin chronically activates Na/H exchanger-3 in OKP cells. (submitted)

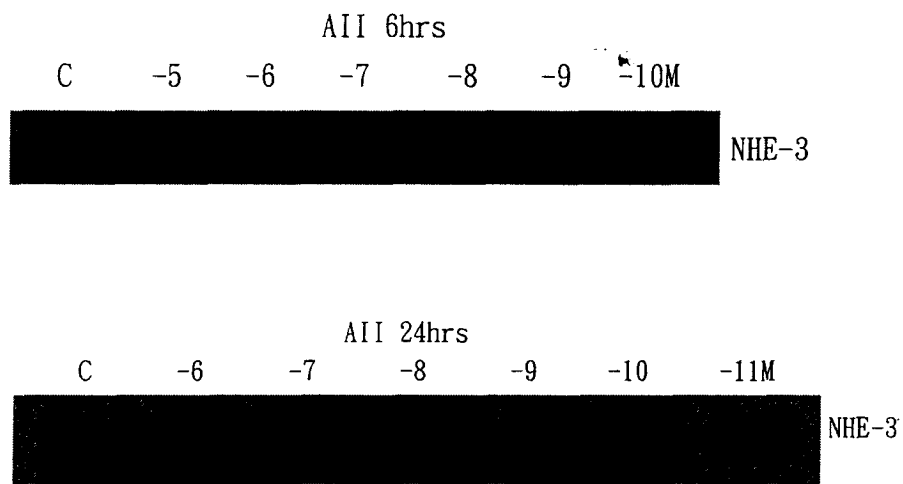


Fig. The effect of angiotensin II on NHE protein abundance.