

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

副甲狀腺素對腎小管鈉氫交換器及重碳酸鈉共同運送器的
調節

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC91-2314-B-002-350-

執行期間：91年08月01日至92年07月31日

執行單位：國立臺灣大學醫學院一般醫學科

計畫主持人：朱宗信

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 92 年 12 月 3 日

一. 中文摘要

副甲狀腺素 (parathyroid hormone) 抑制近端腎小管對磷、鈉、重碳酸根的再吸收，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。在腎小管細胞急性給予副甲狀腺素可抑制蛋白質激酶 A 及 C 而抑制 NHE-3。本計畫的研究目的是探討慢性給予副甲狀腺素對腎小管 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。以各種濃度之副甲狀腺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副甲狀腺素對腎小管細胞 NHE-3 蛋白質表現量的調節。

結果發現在 OKP 細胞給予副甲狀腺素後其鈉氫交換器活性並無顯著變化。同樣地，在 OKP 細胞給予副甲狀腺素後其 NHE3 蛋白質表現量也無顯著變化。由此推論副甲狀腺素的作用主要在鈣、磷，而對鈉及酸的調節可能較無作用。

關鍵詞：副甲狀腺素、腎小管、鈉氫交換器

Abstract

Parathyroid hormone (PTH) decreases phosphate, sodium and bicarbonate reabsorption by the proximal tubule. 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 NHE-3 activity, NHE-3 mRNA abundance, NHE-3 protein abundance. PTH acutely inhibits NHE-3 in OKP cells via a dual signaling cascade involving protein kinase A and C. The purpose of this project is to study the chronic effect of PTH 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 was assayed as the initial rate of Na-dependent pHi recovery from an acid load. We checked chronic effect of PTH in different concentration on Na/H exchange activity in renal

tubular cell. We checked the effect of PTH on NHE-3 protein abundance in OKP cell.

The results showed that there was no significant change of NHE-3 activity or NHE-3 protein abundance by PTH in OKP cells. We think the major effect of PTH is for Ca & P, not for Na & acid.

Keywords : parathyroid hormone、renal tubule、Na/H exchanger

二. 緣由與目的

近端腎小管再吸收 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再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】。

副甲狀腺素的主要作用是將鈣從骨頭釋放出來以及促進磷從腎臟排泄。從此之外, 副甲狀腺素可抑制近端腎小管對重碳酸根的再吸收【11】, 在分離灌注兔子腎小管給予副甲狀腺素可減少腎小管對重碳酸鈉的再吸收【12】。在腎小管細胞培養模式, 急性給予副甲狀腺素可抑制腎鈉氫交換器活性, 及造成重碳酸鈉再吸收的減少【13】。其訊息傳遞機制是經由副甲狀腺受器增加 cAMP 以及增加 PKC【14】。除此之外, NHE3 磷酸化的改變以及胞飲作用 (endocytosis) 的調節亦為其機制【15,16】。

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【17】, OKP 細胞是 OK 的分株, 可表現 NHE-3【18】, 因此是研究 NHE-3 調節很好的模式。

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【19】。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【13,20-22】。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【18,23,24】。一般而言, 鈉氫交換器活性的調節, 慢性及急性常不一樣, 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【25】。內皮素急性刺激而慢性抑制腎小管細胞鈉氫交換器【21,24】。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【26】。

本研究的目的是探討在近端腎小管 (OKP) 細胞慢性給予副甲狀腺素對 NHE-3 的作用及其所經的訊息傳遞機制。

三. 材料與方法

本計畫以負鼠腎 (OKP) 細胞為研究模式，因為負鼠腎細胞為近端腎小管細胞，且表現 NHE-3。細胞內 pH 測定利用螢光物質 BCECF 在不同 pH 值下，其螢光強度不同來測定。鈉氫交換器活性的測定乃給與細胞酸負荷後，再加鈉後看其 pH 恢復速率而求得。NHE-3 蛋白質表現量，以常用的西方轉漬法 (Western blot) 測之，其 NHE-3 抗體由國外取得。以下就細胞培養，鈉氫交換器活性測定，西方轉漬法等分段細述。

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 pH_i 變化速率 (dpH_i/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。

所用副甲狀腺素濃度為 10^{-10} M、 10^{-9} M、 10^{-8} M、 10^{-7} M 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 Tris HCl [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，所用副甲狀腺素濃度、時間，參見測定鈉氫交換器活性部份。

四. 結果與討論

在 OKP 細胞給予副甲狀腺素 24 小時後，其鈉氫交換器活性(以對照組當 100% 來比較)分別為 10^{-10} M 94%, 10^{-9} M 108%, 10^{-8} M 100%, 10^{-7} M 104%，經統計分析後發現和對照組皆無顯著差異。

在 OKP 細胞給予副甲狀腺素 6 小時後，測定其 NHE3 蛋白質表現量，結果發現 10^{-11} M, 10^{-10} M, 10^{-9} M, 10^{-8} M, 10^{-7} M 和對照組皆無顯著差異。在 OKP 細胞給予 10^{-8} M 副甲狀腺素後，測其 NHE3 蛋白質表現量，結果發現不論 3 小時，6 小時，12 小時，24 小時皆和對照組無明顯差異。

副甲狀腺素除了調節鈣、磷外，亦可調節腎對重碳酸鈉的排泄。副甲狀腺機能亢進的病人可產生某些程度的代謝性酸中毒。腎衰竭病人常見副甲狀腺機能亢進，其目的在維持鈣磷平衡，但 PTH 過高，可能有其他作用，包括對鈉及酸排泄的影響。由我們的實驗結果發現在 OKP 細胞，慢性給予副甲狀腺素對鈉氫交換器活性及 NHE3 蛋白質的表現並無影響，由此推知副甲狀腺素對鈣、磷的作用較明顯，對鈉及酸的調節可能較無作用。

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 Na^+/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 Na^+/H^+ exchanger isoform of renal brush border. *Am J Physiol* 1993;265:F736-F742.
11. Bank N, Aynedjian SH: A micropuncture study of the effect of parathyroid hormone on renal bicarbonate resorption. *J Clin Invest* 1976;58:336-344.
12. McKinney TD, Myers P: Bicarbonate transport by proximal tubules: effect of parathyroid hormone and dibutryl cyclic AMP. *Am J Physiol* 1980;238:F166-F174
13. Pollock AS, Warnock DG, Strewler GJ: Parathyroid hormone inhibition of Na/H antiporter activity in a cultures renal cell line. *Am J Physiol* 1986;250:F217-F225
14. Azarani A, Goltzman D, Orłowski J: Parathyroid hormone and parathyroid

hormone-related peptide inhibit the apical Na/H exchanger NHE-3 isoform in renal cell (OK) via a dual signaling cascade involving protein kinase A and C. *J Biol Chem* 1995;270:20004-20010

15. Fan L, Wiederkehr MR, Collazo R, Wang H, Crowder LA, Moe OW: Dual mechanisms of regulation of Na/H exchanger NHE-3 by parathyroid hormone in rat kidney. *J Biol Chem* 1999;274:11289-11295

16. Collazo R, Fan L, Hu MC, Zhao H, Wiederkehr MR, Moe OW: Acute regulation of Na/H exchanger NHE-3 by parathyroid hormone via NHE-3 phosphorylation and Dynamin-dependent endocytosis. *J Biol Chem* 2000;275:31601-31608

17. 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

18. 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

19. Moe OW: Sodium-hydrogen exchange in renal epithelia: mechanisms of acute regulation. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1997;6:440-446.

20. 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.

21. 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.

22. Wakabayashi S, Shigekawa M, Poussegur J: Molecular physiology of vertebrate Na⁺/H⁺ exchangers. *Physiol Rev* 1997;77:51-74.

23. 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.

24. 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.

25. 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.

26. Chu TS, Wu KD, Wu MS, Hsieh BS: Insulin chronically activates Na/H exchanger-3 in OKP cells. (submitted)