

9836 ステロイドホルモンによるNa/H交換輸送体の制御

助成研究者：武藤 重明 (自治医科大学 腎臓内科)
 共同研究者：江幡 理 (自治医科大学 腎臓内科)
 宮田 幸雄 (自治医科大学 腎臓内科)

血管平滑筋細胞 (VSMC) ではNa/H交換輸送体 (NHE) は細胞内pH (pHi) の調節に重要な役割を果たしている。最近、aldosterone (ALDO) が核を介さずNHE活性を亢進するというnongenomic effectがVSMCで示唆されている。そこで、ラット胸部大動脈より単離・培養したVSMCを用いて、ALDOの短期 (3時間) 及び長期 (24時間) 負荷がNHE活性に与える影響をpH感受性蛍光色素であるBCECFを用いて検討した。NHE活性は細胞内酸性化後のNa依存性pHi回復速度 (dpHi/dt) によって算出した。ALDOの短期及び長期負荷で、NHE活性が亢進した。mRNA転写阻害薬 (actinomycin D) や蛋白合成阻害薬 (cycloheximide) は短期負荷によるNHE活性亢進作用には影響しなかったが、長期短期負荷によるNHE活性亢進作用を抑制した。ミネラルコルチコイド受容体拮抗薬 (spironolactone)、グルココルチコイド受容体拮抗薬 (RU 38486) は短期負荷によるNHE活性亢進作用には影響しなかったが、長期短期負荷によるNHE活性亢進作用を抑制した。protein kinase C (pKC) 阻害薬 (staurosporine A, calphostin C) 及びpKCのdownregulation (phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA, 24時間投与) はいずれも短期及び長期負荷によるNHE活性亢進作用を抑制した。PMAの3時間投与ではALDOの短期負荷と同様のNHE活性亢進が認められた。短期負荷によるALDOのNHE活性亢進作用は細胞内微小管の阻害物質 (colchicine) やactin filamentの阻害物質 (cytochalasin B) により抑制された。以上より、(1) ALDOの短期負荷によるNHE活性亢進作用は核内のMRやGRを介さず、またmRNAの転写や蛋白合成も介さず出現する、(2) ALDOの長期負荷によるNHE活性亢進作用は核内のMRやGR、mRNAの転写や蛋白合成も介して出現する、(3) ALDOの短期及び長期作用は共にpKCの活性化が関与している。従って、ALDOは核を介さない作用 (nongenomic effect) と核を介した作用 (genomic effect) によりVSMCのNHE活性を調節していることが明らかになった。

9836 ステロイドホルモンによるNa/H交換輸送体の制御

助成研究者：武藤 重明 (自治医科大学 腎臓内科)
 共同研究者：江幡 理 (自治医科大学 腎臓内科)
 宮田 幸雄 (自治医科大学 腎臓内科)

1. 研究の目的

Na/H交換輸送体 (NHE) は細胞膜に存在し、細胞外Naと細胞内Hを交換輸送する膜蛋白で、血管平滑筋細胞 (VSMC) に存在するものは細胞内pH (pHi) や細胞増殖、細胞容積の調節に重要な役割を担っている (1、2)。一方、mineralocorticoidやglucocorticoid、などのsteroid hormoneは標的細胞の細胞質内に存在するmineralocorticoid受容体 (MR) やglucocorticoid受容体 (GR) に結合後、核へ移行し、標的遺伝子のDNA特定配列に結合し、その遺伝子の情報発現を惹起する。その結果産生された蛋白質がNa、K、Hを中心とした電解質代謝、など種々の生理作用を司る (3、4)。こうした核を介する作用 (genomic effect) の発現には数時間～数日の潜伏期間を要する。これに対し、VSMC (5)、リンパ球 (6)、MDCK細胞 (7) にaldosterone (ALDO) を投与すると数分以内にNHE活性が増加すること、この増加はmRNA転写阻害薬や蛋白合成阻害薬で抑制されないことが報告され、これは核を介さない作用 (nongenomic effect) と考えられている。しかし、その作用機序については十分な検討がなされていない。そこで、本研究ではラットの内因性mineralocorticoidであるALDOのVSMCのNHEへのnongenomic effectの機序をgenomic effectと比較して解明することを目的とする。

2. 研究の方法

2.1. VSMCの培養

Sprague-Dawleyラット (150-200g) の胸部大動脈より酵素法により中膜平滑筋細胞を単離し、10%ウシ胎児血清 (FBS) を含むMEM液にて培養後、継代数4～10代のconfluentの細胞を実験に用いた (3)。ステロイドホルモンの投与はFBS freeのMEM液に置換後48時間目に行った。

2.2. pHiの測定

まず、底部がガラスカバースリップ製の35mm径のpetri dish (MatTec, Ashland, MA, USA) 内でVSMCを培養した。pHiの測定はpH感受性蛍光色素であるBCECF-AMを最終濃度2 μ M、37°Cで負荷し、Berkら (8) の方法に準じて行なった。BCECF-AMを負荷したVSMCは倒立顕微鏡 (IMT-2, Olympus, Tokyo) 下に設置した37°Cのチャンバー内の置き、Hepes緩衝液で灌流し、440 nmおよび490 nmの励起波長で発した530 nmの蛍光波長の強度を二波長顕微側光システム (OSP-3, Olympus, Tokyo) を用いて測定した。pHiの算出はThomasらの報告したK/nigericin法にて行なった (9)。

2.3. NHE活性の測定

VSMCのNHE活性はK/H交換輸送体であるnigericinを用いて、細胞内を酸性化した後のCO₂/HCO₃非存在下でのNa依存性pHi回復速度 (dpHi/dt) にて求めた (10)。灌流する溶液の組成は、(a) Hepes緩衝Na溶液：130 mM NaCl、5 mM KCl、1.5 mM MgCl₂、1 mM CaCl₂、30 mM Hepes、(b) Na free溶液：130 mM N-methyl-D-glucamine、5 mM KCl、1.5 mM MgCl₂、1 mM CaCl₂、30 mM Hepes、ですべて37°CでpH7.4に調整した。

細胞内緩衝能 (β_i) はK/nigericin法によって細胞内を酸性化した後に細胞外に10 mM NH₄Clを加え、このNH₄Clを細胞外より除去した時のpHi変化をもとにして以下の式より求めた。細胞内緩衝能 (β_i) = Δ[NH₄]_i/ΔpHi、[NH₄]_iは細胞外NH₃/NH₄を除去前の細胞内NH₄濃度で、[NH₄]_i = [NH₄]_o × 10^(7.4-pHi)の式より求めた。この時、ΔpHiは細胞外NH₃/NH₄除去時のpHiの変化値を示す (11)。NHEによるH排出量は、dpHi/dtとβ_iとの積で表され、β_iが二群間で有意差がない場合はdpHi/dtがNHE活性を反映する。

3. 研究結果

3.1. ALDOのNHE活性への影響

VSMCにALDO (10⁻⁶ M) を加えると3時間及び24時間後にpHiは有意に増加した (Fig. 1)。このALDOによるpHiの増加がNHE活性の上昇によるものかどうかを次に検討した。Fig. 2にALDO投与3時間後のNa依存性のpHiの変化を示す。まず、130 mMのNaを含むHepes緩衝液にてVSMCを灌流後、nigericinを含むNa free溶液 (0 mM Na) に置換するとpHiは5.9-6.1に低下した。次に、nigericinを除去する目的で1%BSAを加えた後、130 mMのNaを含むHepes緩衝液に戻すと、pHiは急速に増加し、その速度はALDO投与でより急峻であった。同様の結果はALDO投与24時間後にも認められた。これら酸負荷後のNa依存性pHi回復速度はNHEの阻害薬であるethylisopropylamiloride (EIPA) で完全に抑制された (Fig. 2)。一方、細胞内緩衝能 (β_i) はALDOの3時間及び24時間投与によりcontrolと有意差を認めなかった (3時間：control, 19.7 ± 1.0 mM/H.pH, n=7, ALDO, 19.2 ± 1.2 mM/H.pH, n=7; 24時間：control, 18.8 ± 1.1 mM/H.pH, n=7, ALDO 19.2 ± 1.1 mM/H.pH, n=7)。従って、VSMCにおいて細胞内酸負荷後のNa依存性pHi回復速度 (dpHi/dt) はNHE活性を直接反映していることになり、その活性はALDO投与において有意に亢進していることが明らかになった。ALDOによるNHE活性の時間経過をFig. 3に示す。NHE活性はALDO投与後3時間目より上昇し、その上昇は12時間目の2倍をピークに、24時間目まで持続した。

3.2. ALDOのNHE活性亢進作用の濃度依存性

ALDO投与後12時間目のNHE活性について濃度依存性を検討した。Fig. 4に示すように、ALDOのNHE活性亢進作用は10⁻⁸から10⁻⁶ Mの範囲で認められた。ラットのALDOの血漿濃度は10⁻¹⁰から10⁻⁸ Mの範囲にあり (12)、ALDOは生理的濃度でVSMCのNHE活性を刺激することが判明した。以下の実験はALDO投与3時間後 (短期負荷) および24時間後 (長期負荷) に焦点を絞ってその機序を比較検討した。

3.3. ALDOのNHE活性亢進作用に対するactinomycin D、cycloheximideの影響

ALDOのNHE活性亢進作用がmRNAの転写や蛋白合成を介しているかどうかを検討するため、各々の阻害薬であるactinomycin D (ACD)、cycloheximide (CHX) を投与した。Fig. 5に結果を示す。ACD、CHX共に単独ではNHE活性に影響を与えなかった。また、ALDOの短期負荷はACD、CHXいずれにおいてもNHE活性に影響を与えなかったが、長期負荷はACD、CHXにより共に完全に抑制された。

3.4. ALDOのNHE活性亢進作用に対するspironolactone、RU38486の影響

ALDOのNHE活性亢進作用がMRを介するかGRを介するかを検討するため、各々の阻害薬であるspironolactone (SPR)、RU38486 (RU) を投与した。Fig. 6に結果を示す。SPR、RU共に単独ではNHE活性に影響を与えなかった。また、ALDOの短期負荷はSPR、RUいずれにおいてもNHE活性に影響を与えなかったが、長期負荷はSPR、RUにより共に完全に抑制された。

3.5. ALDOのNHE活性亢進作用に対するprotein kinase C (PKC) の役割

VSMCを含めた多くの組織や細胞において、PKCはNHE活性調節に重要な役割を果たしていることが知られている (13-15)。そこで、ALDOのNHE活性亢進作用がPKCの活性化を介するかを検討するため、二種類のPKC阻害薬、staurosporine A (ST) およびcalphostin C (CAL)、を投与した。結果をそれぞれFig. 7A、Fig. 7Bに示す。ST、CAL共に単独ではNHE活性に影響を与えなかったが、ALDOの短期負荷、長期負荷によるNHE活性亢進作用はいずれも完全に抑制した。また、phorol 12-myristate 13 acetate (PMA) を24時間VSMCに投与し、PKC活性を枯渇しておくことALDOの短期及び長期負荷によるNHE活性亢進作用は完全に抑制された (Fig. 7C)。更に、PMAを3時間投与し、PKC活性を上昇させると、ALDOの短期負荷と同様のNHE活性亢進が認められた (Fig. 7D)。

3.6. ALDOのNHE活性亢進作用に対する細胞骨格の果たす役割

最近、細胞骨格と細胞膜との相互作用により、NHEを含めた多くのイオンチャネル活性や輸送体活性が修飾されるとの報告がある (16-18)。そこで、ALDOの短期負荷によるNHE活性亢進に細胞骨格が関与しているかどうかを細胞内微小管、アクチンフィラメントの各々の阻害薬であるclochicine (COL) 及びcytochalasin B (CYTO) を投与して検討した。Fig. 8に示すように、COL、CYTO単独ではNHE活性に影響を与えなかったが、両者共にALDOの短期負荷によるNHE活性亢進作用を完全に阻害した。

4. 考察

本研究ではALDOが短期及び長期にVSMCのNHE活性に影響を与えるかどうか、またその機序は如何なるものかを検討した。今回の結果から、ALDOは負荷3時間目よりNHE活性を刺激し、24時間目までその作用は持続した。ALDOの短期 (3時間) 負荷によるNHE活性亢進作用は核内のMR及びGRに結合せず、またmRNAの転写や蛋白合成も介さないことから、nongenomic effectが考えられた。一方、

ALDOの長期(24時間)負荷によるNHE活性亢進作用は核内のMR及びGRへの結合、mRNA及び蛋白合成を介したgenomic effectであることが判明した。また、短期、長期いずれの場合もPKCの活性化が関与していた。さらに、短期負荷でのNHE活性亢進には細胞骨格の維持が重要であることも明らかになった。

ALDOの短期負荷によるNHE活性亢進作用に、どのような機序でPKCの活性化が関与しているのか現時点では不明である。短期負荷によるNHE活性亢進作用は細胞内微小管及びアクチンフィラメントの阻害薬にて抑制されたことより、PKCの活性化によってすでに細胞質内に蓄積されていたNHE蛋白が細胞膜に融合し、活性が亢進することが推測される。このような"シャトル"と言われる機序を介して各種輸送体が調節されていることは多くの細胞でも報告されている(19)。また、PKCがNHEを調節する蛋白またはNHE自体をリン酸化し(14、20)、その活性を亢進する可能性も考えられる。さらに、PKCが細胞膜に存在するNHEの細胞質側のアロステリック部位を修飾して、Hとの親和性を高め、結果としてNHE活性亢進を引き起こすことも考えられる(21)。

長期負荷でもALDOのNHE活性亢進にはPKCの活性化が関与していた。PKCが様々な遺伝子の発現に関与していることはよく知られているが、こうした遺伝子には通常"PKC response element"と呼ばれる領域が5'隣接領域に見られる(22)。この"PKC response element"がNHE遺伝子にも存在するが、ALDOで反応するかどうか不明である。

5. 今後の課題

本研究ではALDOはVSMCにおいて、短期では核を介さず、一方、長期では核を介してNHE活性を制御していることが明らかになった。PKCの活性化がいずれの場合も関与しているが、その機序については今後詳細に検討してゆきたい。また、短期負荷でのNHE蛋白の細胞膜へのtraffickingの証明とその機序の解明、膜受容体の同定は重要課題と思われる。

6. 文献

1. Wessberg PL, Little PJ, E.J. Cragoe EJ, Bobik A: Na-H antiport in cultured rat aortic smooth muscle: its role in cytoplasmic pH regulation. *Am J Physiol* 253: C193-C198, 1987.
2. Little PJ, Cragoes ED, Bobik A: Na-H exchange is a major pathway for Na influx in rat vascular smooth muscle. *Am J Physiol* 251:C707-C712, 1986.
3. Muto S, Nemoto J, Ohtaka A, Watanabe Y, Yamaki M, Kawakami K, Nagano K, Asano Y: Differential regulation of Na-K-ATPase gene expression by corticosteroids in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol* 270: C731-C739, 1996.
4. Muto S: Action of aldosterone on renal collecting tubule cells. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 4: 31-40, 1995.
5. Christ M, Douwes K, Eisen C, Bechtner G, Theisen K, Wehling M: Rapid effects of aldosterone on sodium transport in vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 25:117-123, 1995.

6. Wehling M, Kasmayer J, Theisen K: Rapid effects of mineralocorticoids on sodium-proton exchanger: genomic or nongenomic pathway? *Am. J. Physiol.* 260:E719-E726, 1991.
7. Oberleithner H, Weigt M, Westphale HJ, Wang W: Aldosterone activates Na^+/H^+ exchange and raises cytoplasmic pH in target cells of the amphibian kidney. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84:1464-1468, 1987.
8. Berk BC, Vallega G, Muslin AJ, Gordon HM, Canessa M, Alexander RW: Spontaneously hypertensive rat vascular smooth muscle cells in culture exhibit increased growth and Na^+/H^+ exchange. *J Clin Invest* 83:822-829, 1989.
9. Thomas JA, Buchsbaum RN, Zimniak A, Racker E: Intracellular pH measurements in Ehrlich ascites tumor cells utilizing spectroscopic probes generated in situ. *Biochemistry* 18:2210-2218, 1979.
10. Grinstein S, Cohen S, Rothstein A: Cytoplasmic pH regulation in thymic lymphocytes by an amiloride-sensitive Na^+/H^+ antiport. *J Gen Physiol* 83:341-369, 1984.
11. Roos A, Boron WF 1981. Intracellular pH. *Physiol Rev* 61:296-434, 1981.
12. Martin, R.S., W. J. Jones, J. P. Hayslett. Animal model to study of the effects of adrenal hormones on epithelial function. *Kidney Int* 24: 386-391, 1983.
13. Nishizuka Y: Studies and perspectives of protein kinase C. *Science* 233:305-312, 1986.
14. Hatori N, Fine BP, Nakamura A, Cragoe E, Aviv A: Angiotensin II effect on cytosolic pH in cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 262:5057-5064, 1987.
15. Berk BC, Elder E, Mitsuka M: Hypertrophy and hyperplasia cause differential effects on vascular smooth muscle cell Na^+/H^+ exchange and intracellular pH. *J Biol Chem* 265:19632-19637, 1990.
16. Dascalu A, Nevo Z, Korenstein R: Hyperosmotic activation of the Na^+/H^+ exchanger in a rat bone cell line: temperature dependence and activation pathways. *J Physiol* 456:503-518, 1992.
17. Bloch RD, Zikos D, Fisher KA, Schleicher L, Oyama M, Cheng JC, Skopicki HA, Sukowski EJ, Cragoe EJ, Peterson DR: Activation of proximal tubular Na^+/H^+ exchange by angiotensin II. *Am J Physiol* 263:F135-F143, 1992.
18. Watson AJM, Levine S, Donowitz M, Montrose MH: Serum regulates Na^+/H^+ exchange in Caco-2 cells by a mechanism which is dependent on F-actin. *J Biol Chem* 267:956-962, 1992.
19. Mills JW, Schwiebert EM, Stanton BA: The cytoskeleton and membrane transport. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 3:529-534, 1994.
20. Sardet C, Fafournoux P, Pouyssegur J: α -thrombin, epidermal growth factor, and okadaic acid activate the Na^+/H^+ exchanger, NHE-1, by phosphorylating a set of common sites. *J Biol Chem* 266:19166-19171, 1991.
21. Aronson PS, Nee J, and Suhm MA: Modifier role of internal H^+ in activating the Na^+/H^+ exchanger in renal microvillus membrane vesicles. *Nature* 299:161-163, 1982.
22. Chiu R, Imagawa M, Imbra RJ, Bockoven JR, Karin M: Multiple cis- and trans-acting elements mediate the transcriptional response to phorbol esters. *Nature* 329:648-651, 1987.

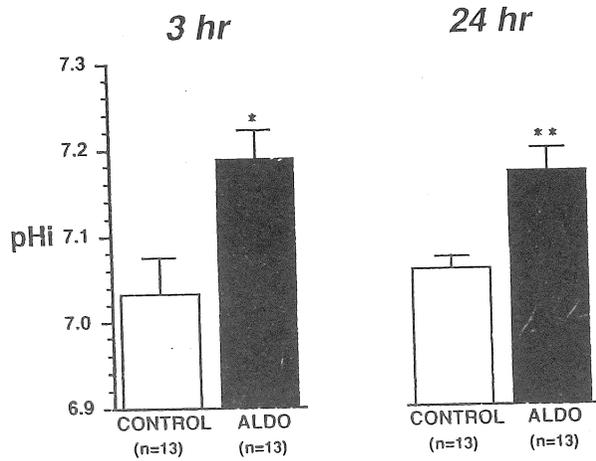


Fig. 1. Effects of ALDO (10^{-6} M) on baseline pH_i in VSMCs. VSMCs were exposed to control MEM or ALDO-supplemented MEM for 3 or 24 hrs before the measurement of pH_i; data are expressed as means \pm SE. * $p < 0.01$, ** $p < 0.05$ compared to control. n, number of experiments.

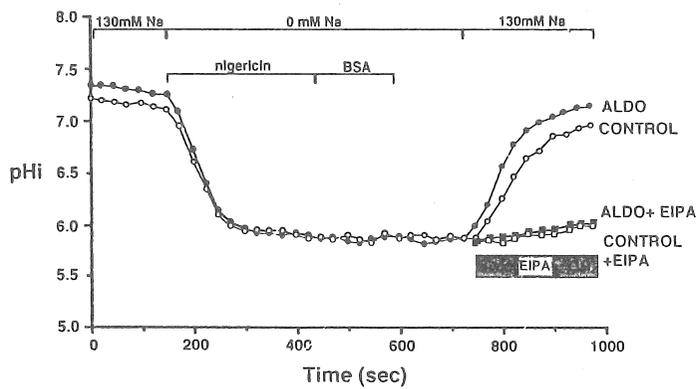


Fig. 2. Typical tracing showing Na⁺-dependent pH_i recovery in VSMC exposed to ALDO (10^{-6} M) for 3 hrs, in the absence or presence of 100 μ M EIPA.

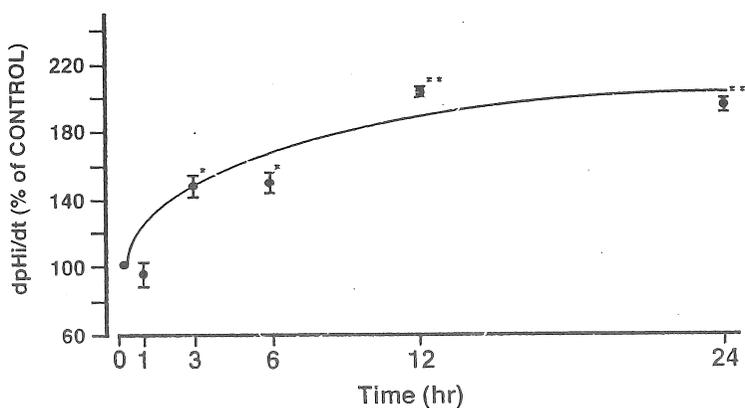


Fig. 3. Time course of NHE activity induced by ALDO in VSMCs. VSMCs were exposed to control MEM or ALDO-supplemented MEM for various terms before the measurement of dpHi/dt after a nigericin-induced intracellular acidosis. Data are expressed as the percentage of dpHi/dt compared with control values at each term, each point is means \pm SE of 6-12 separate experiments. dpHi/dt = initial rate of Na⁺-dependent pHi recovery. *p<0.001, **p<0.0001 compared to control.

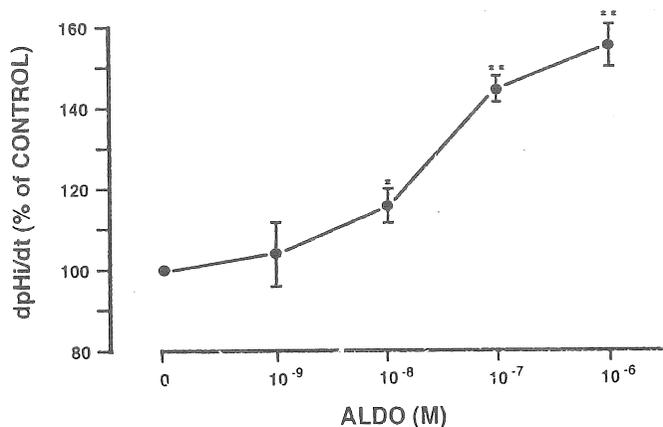


Fig. 4. Dose-dependent effects of ALDO on NHE activity in VSMCs. VSMCs were exposed to ALDO (10⁻⁶ M) for 12 hrs at various concentrations. Data are expressed as the percentage of dpHi/dt compared with those observed in VSMCs exposed to MEM (control), each point is means \pm SE of 6 separate experiments. *p<0.05, **p<0.01 compared to control value.

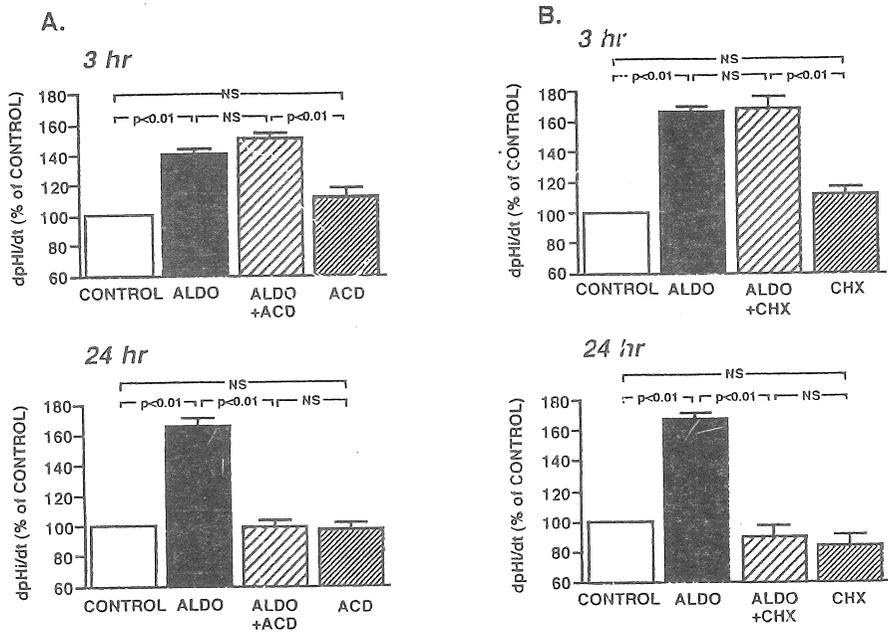


Fig. 5. Effects of inhibitors of gene transcription, actinomycin D (ACD), or protein synthesis, cycloheximide (CHX) on ALDO-induced increase in NHE activity in VSMCs. A. VSMCs were exposed to control MEM or ALDO (10^{-6} M)-supplemented MEM for 3 or 24 hrs, in the absence or presence of ACD (4 μ g/ml). B. VSMCs were exposed to control MEM or ALDO (10^{-6} M)-supplemented MEM for 3 or 24 hrs, in the absence or presence of CHX (20 μ g/ml). Data are expressed as the percentage of dPHi/dt compared with those observed in ALDO-untreated VSMCs without ACD or CHX (control). The number of experiments done on ACD- or CHX-treated VSMCs is 6.

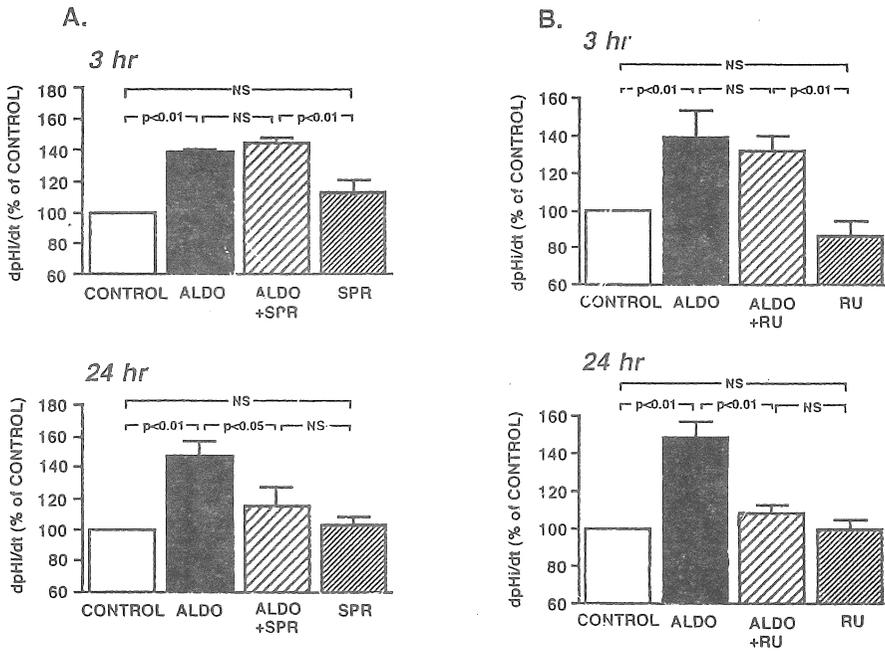


Fig. 6. Effects of MR antagonist spironolactone (SPR) or the GR antagonist RU 38486 (RU) on ALDO-induced increase in NHE activity in VSMCs. A. VSMCs were exposed to control MEM or ALDO (10^{-6} M)-supplemented MEM for 3 or 24 hrs, in the absence or presence of SPR (10^{-4} M). B. VSMCs were exposed to control MEM or ALDO (10^{-6} M)-supplemented MEM for 3 or 24 hrs, in the absence or presence of RU (10^{-5} M). Data are expressed as the percentage of dpHi/dt compared with those observed in ALDO-untreated VSMCs without SPR or RU (control). The number of experiments done on SPR- or RU-treated VSMCs is 6 and 8, respectively.

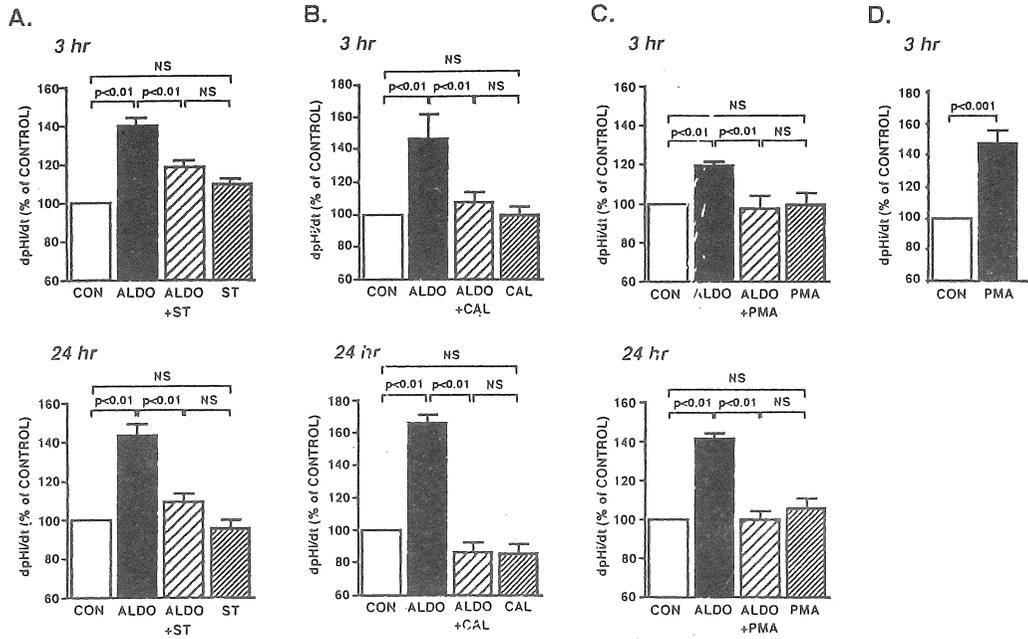


Fig. 7. Effects of PKC inhibitors or PKC downregulation on ALDO-induced increase in NHE activity in VSMCs. A. VSMCs were exposed to control MEM or ALDO (10^{-6} M)-supplemented MEM for 3 or 24 hrs, in the absence or presence of staurosporine A (ST). Data are expressed as the percentage of dpH/dt compared with those observed in ALDO-untreated VSMCs without ST (control). The number of experiments done on ST-treated VSMCs is 8. B. VSMCs were exposed to control MEM or ALDO (10^{-6} M)-supplemented MEM for 3 or 24 hrs, in the absence or presence of calphostin C (CAL) (5×10^{-7} M). Data are expressed as the percentage of dpH/dt compared with those observed in ALDO-untreated VSMCs without CAL (control). The number of experiments done on CAL-treated VSMCs is 6. C. VSMCs were exposed to control MEM or ALDO (10^{-6} M)-supplemented MEM for 3 or 24 hrs with or without 24 hrs preexposure of phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) (10^{-7} M). Data are expressed as the percentage of dpH/dt compared with those observed in ALDO-untreated VSMCs without PMA (control). The number of experiments done on PMA-treated VSMCs is 6. D. VSMCs were exposed to control MEM or PMA (10^{-7} M)-supplemented MEM for 3 hrs. Data are expressed as the percentage of dpH/dt compared with those observed in control MEM. The number of experiments done on PMA-treated VSMCs is 5.

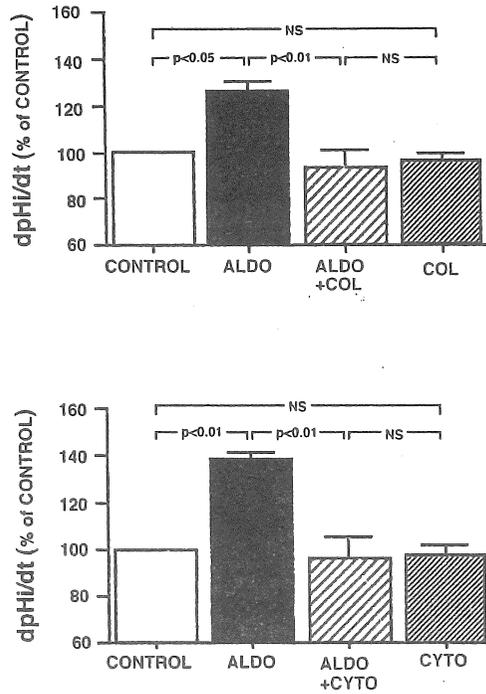


Fig. 8. Effects of cytoskeleton disruptors, colchicine (COL) or cytochalasin B (CYTO) on the short-term ALDO-induced increase in NHE activity in VSMCs. VSMCs were exposed to control MEM or ALDO (10^{-6} M)-supplemented MEM for 3 hrs in the absence or presence of COL (10^{-4} M) or CYTO (10^{-4} M). Data are expressed as the percentage of dpHi/dt compared with those observed in ALDO-untreated VSMCs without COL or CYTO (control).

Regulation of Na/H exchanger by steroid hormoens

Shigeaki Muto, Satoru Ebata, Yukio Miyata

Department of Nephrology, Jichi Medical School

Summary

In vascular smooth muscle cells (VSMC), Na/H exchange (NHE) plays an important role in intracellular pH (pHi) regulation. Recently, nongenomic effect of aldosterone (ALDO) on NHE activity has been suggested in VSMC. The effects of short (3 hr)- and long (24 hr)-term exposure to ALDO on NHE activity were examined in cultured VSMC from rat thoracic aortae by using a pH-sensitive fluorescent dye (BCECF). The NHE activity was calculated from the initial rate of Na-dependent pHi recovery after acid load. The NHE activity significantly increased after short- and long-term exposure of VSMC to ALDO. The inhibitors of mRNA transcription (actinomycin D) and of protein synthesis (cycloheximide) had no effect on the short-term ALDO effect, but inhibited the long-term ALDO effect. The antagonists of mineralocorticoid receptor (MR)(spironolactone) and of glucocorticoid receptor (GR)(RU 38486) caused no effect on the short-term ALDO effect, but inhibited the long-term ALDO effect. Two protein kinase C (PKC) inhibitors (staurosporine A, calphostin C) and PKC downregulation (24 hr preexposure to phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA) inhibited both the short- and long-term ALDO effects. Exposure to PMA for 3 hr mimicked the short-term ALDO effect. The short-term ALDO effect was inhibited by disruptors of microtubule (colchicine) and of filamentous actin (cytochalasin B).

We conclude: (1) the short-term effect of ALDO on NHE activity is not mediated through either MR or GR, occurs independent of gene transcription and protein synthesis, and involves in the structural elements of cytoskeleton, (2) the long-term effect of ALDO on NHE activity occurs through both MR and GR and requires gene transcription and protein synthesis. Both short- and long-term effects of ALDO are mediated through PKC activation. Therefore, ALDO activates NHE by nongenomic and genomic mechanisms in VSMC.