

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫 期中進度報告

(計畫名稱)

探討過氧化小體增殖活話接受體致效劑抑制氧化性膽固醇
引發細胞凋亡的機制及對活體氧化性血管傷害之保護作用
(1/2)

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC 92-2320-B-038-037-

執行期間： 92年8月1日至 93年7月31日

計畫主持人：鄭幼文

共同主持人：蕭哲志

計畫參與人員：

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)：精簡報告 完整
報告

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

處理方式：除產學合作研究計畫、提升產業技術及人才培育研究

計畫、列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權，一年二年後可公

開查詢

執行單位：台北醫學大學藥學系

中 華 民 國 93年 5 月 31 日

中文摘要:

氧化性膽固醇已被證實存在於氧化性低密度脂蛋白中，且與粥狀動脈硬化的形成有關。在本實驗中，我們針對三種常見的膽固醇氧化物：Cholesterol-5 α ,6 α -epoxide (Epoxide)、7-Keto-cholesterol (7-Keto) 及 Cholesterol-3 β ,5 α ,6 β -triol (Triol) 來做實驗，我們發現此三種膽固醇氧化物會透過調節 MAP kinase 的路徑在 HUVECs 造成細胞毒性，同時間也調節了另一條與 Akt、eNOS phosphorylation 相關的訊息傳遞路徑，而且，這三種氧化膽固醇在 HUVECs 調節的機制皆不盡相同，但似乎都會同時調節了兩個相反的路徑：apoptosis 和 cell protection。

我們發現 Epoxide 在 18 個小時並不會對 HUVECs 造成嚴重的毒性，並且在短時間內 (2h) 同時活化了與細胞保護機制相關的蛋白：ERK、Akt 及 eNOS phosphorylation。而 Triol 則有明顯的雙向調節作用：apoptosis 和 cell protection。A) apoptosis pathway：Triol 能在 HUVECs 誘發 caspase-3 的活化，而此活化作用會被 SP (JNK inhibitor) 所抑制，暗示了 Triol 是透過活化 JNK 來活化 caspase-3。另外，此 caspase-3 的活化作用也會同時被 L-NAME (eNOS inhibitor) 及 wortmannin (PI3 kinase inhibitor) 所抑制，暗示了 PI3 kinase pathway 及 eNOS 的磷酸化也是導致 caspase-3 活化的原因之一。B) cell protection：Triol 同時也活化了另一個蛋白 ERK，而 PD98059 (ERK inhibitor) 會增強 Triol 對 caspase-3 的活化，代表 Triol 對 ERK 的活化在 HUVECs 為 anti-apoptosis 的作用。

我們發現了膽固醇氧化物在 HUVECs 的作用是多樣化的。Triol 及 7-Keto 能誘發細胞的 apoptosis，而在同時間也會誘發另一條具細胞保護作用的路徑 (ERK phosphorylation)，而 Epoxide 在本實驗我們並沒有看到嚴重的毒性作用，誘發的作用似乎以細胞保護作用為主。有一些關鍵的蛋白還需要再做進一步的確認，像是 PI3 kinase 與 Akt 的直接關係；7-Keto 在 JNK 方面的作用以及 Triol 在 c-jun 的作用。而這些關鍵蛋白的確認可以幫助我們進一步去連結各個路徑的直接上下游關係。

英文摘要

Oxidation products of cholesterol have been shown to be present in oxidized low density lipoprotein and in atherosclerotic lesions. Here we shown three oxysterols, Cholesterol-5 α -6 α -epoxide (EPO), 7-keto-cholesterol (7-Keto) and Cholesterol-3 β -5 α -6 β -triol (Triol) induced cytotoxicity were regulated by MAP kinase and Akt, eNOS phosphorylation pathway through diversal pathways in human umbilical endothelial cells (HUVECs). Three oxysterols shown different mechanisms and dual aspects of regulation pathway, apoptosis and cell protection, in HUVECs. Epoxide did not cause cytotoxicity within 18 hrs and show the induction of cell protection proteins, ERK, Akt and p-eNOS in HUVECs within 2 hrs at lower concentration (0.1 ~10 μ g/ml).

Triol have obvious dual effects in apoptosis and cell protection. a) Apoptosis pathways: Triol caused JNK phosphorylation leading the caspases-3 activation and apoptosis, and this effect can be inhibited by JNK inhibitor (SP). The activation of caspase-3 also can be inhibited by L-NAME and wortmannin, indicated the role of PI3 kinase and eNOS phosphorylation were leading to apoptosis. b) Cell protection: Triol also induced ERK phosphorylation, when administrated ERK inhibitor, PD98059, can promote caspase-3 activity and apoptosis. 7-Keto induced ERK, eNOS and c-JUN phosphorylation. Although 7-keto can induced caspase-3 activation, but it might not through JNK, PI3 kinase or eNOS pathway, because SP, wortmannin and

L-NAME did not inhibited 7-keto induced caspase-3 activation. Finally, the role of oxysterols in HUVECs is controversial, we found that triol and 7-Keto can induced apoptosis in higher concentration. But there is still a cell protection pathway going in the same time. Different with triol and 7-keto, epoxide only shown the beneficial effect in this study. Some key proteins involve in these signaling pathway still await to confirm, like PI3 Kinase and Akt in three oxysterols, JNK in 7-keto, and p-cJUN in triol. We need more information to fill in the pathway and make final conclusion when available.

報告內容

氧化性膽固醇對人類臍靜脈內皮細胞的毒性在 MTT 的結果

本實驗以測定細胞粒線體對 MTT 的還原能力，間接評估細胞的存活率，以瞭解氧化膽固醇在人類臍靜脈內皮細胞 (HUVECs) 的毒性作用耐受程度，作為評估實驗藥物濃度投予的依據。在細胞長滿之後，分別給予 7-keto-cholesterol、cholesterol-5 α ,6 α -epoxide、cholestane-3 β , 5 α ,6 β -triol 0.3 μ g/ml 至 50 μ g/ml 處理 18 及 36 小時。由結果發現，Epoxide 在 36 個小時內都不會對 HUVECs 造成嚴重的細胞毒性 (Fig. 1B)，而 7-Keto 及 Triol 則在 10 μ g/ml 以上呈現劑量-效應關係的細胞毒性，且 Triol 的曲線下降得比 7-Keto 快 (Fig. 1)，由此可知，此三個膽固醇氧化物對 HUVECs 的毒性大小為：Triol > 7-Keto > Epoxide。另外，隨著處理藥物的時間增加，其對 HUVECs 的毒性也隨之增加，在處理 18 小時後，Triol 及 7-Keto 在 50 μ g/ml 的濃度下分別造成約 70 % 及 30 % 的細胞死亡 (Fig. 1A)；而在處理 36 小時後，7-Keto 在 50 μ g/ml 的濃度下造成約 70 % 的細胞死亡，而 Triol 在 30 μ g/ml 即能造成約 90 % 的細胞死亡 (Fig. 1B)。因此，在後續的實驗操作中，藥物濃度皆不超過 20 μ g/ml，而處理時間也以不超過 36 小時為原則。

氧化性膽固醇在人類臍靜脈內皮細胞造成 necrosis 及 apoptosis 的現象

接著我們利用核酸染劑 propidium iodide 和 phosphatidyl serine 的特異性染劑 annexin V-FITC 來針對 HUVECs 做雙染，再用流式細胞儀來作分析。當細胞早期走向凋亡時，其細胞膜內面的 phosphatidyl serine 會翻轉至細胞膜外，因此 annexin V-FITC 可以染上，但由於此時的細胞膜仍然維持完整狀態，對於無法通透細胞膜的核酸染劑 propidium iodide 拒染，因此在流式細胞儀分析鑑定為走向 apoptosis 的細胞；而若是為 necrosis 細胞，沒有細胞膜內面的 phosphatidyl serine 翻轉至細胞膜外的現象，而且細胞膜會有碎裂的情形，此時 propidium iodide 就可以染上，在流式細胞儀分析鑑定為 necrosis 的細胞。由於 Lizard 等人 (1999) 曾經報導氧化膽固醇造成的細胞死亡包括了細胞壞死 (necrosis) 和細胞凋亡 (apoptosis)，而且通常這兩者是伴隨發生的，因此我們利用此一技術，來判斷這三種氧化性膽固醇在 HUVECs 所造成的細胞死亡分別是哪一種死亡型態。

Triol—我們發現 Triol 在給予 2 個小時之後即能在 HUVECs 誘發 apoptosis 與 necrosis (Fig. 2A)，在 10 μ g/ml 的濃度下約有 10 % 的 apoptosis 與 40 % 左右的 necrosis 現象產生，而在 20 μ g/ml 的濃度下約有 25 % 的 apoptosis 與將近 70 % 左右的 necrosis 現象產生。而在給予 15 個小時之後 (Fig. 2B)，同樣的隨著給予濃度的增加，從 0.5 μ g/ml、1 μ g/ml、3 μ g/ml、5 μ g/ml 到 10 μ g/ml，apoptosis 的現象分別約為 10 %、25 %、20 %、20 %、50 % 及 25 %，而 necrosis 的現象分別約為 15 %、30 %、35 %、40 %、80 % 及 90 %，可以明顯的發現 Triol 所誘發的

死亡型態 necrosis 多於 apoptosis，也就是說，Triol 在 HUVECs 同時誘發 necrosis 與 apoptosis 兩種死亡型態，但是以 necrosis 為主。

7-Keto—而在給予 7-Keto 36 小時之後，我們發現有很明顯的 apoptosis 現象產生 (Fig. 3)，隨著給予的濃度增加，從 5 $\mu\text{g/ml}$ 、10 $\mu\text{g/ml}$ 到 20 $\mu\text{g/ml}$ ，造成的 apoptosis 現象分別為 30 %、40 % 及 50 %，而 necrosis 的現象分別為 4 %、4% 及 10 %，可以很明顯的發現 7-Keto 所誘發的死亡型態主要是 apoptosis，而 7-Keto 在 20 $\mu\text{g/ml}$ 所造成的 necrosis 有統計上的意義，因此我們認為 7-Keto 在 HUVECs 主要誘發的死亡型態以 apoptosis 為主，但在高濃度時，例如像是 20 $\mu\text{g/ml}$ ，同時會伴隨有小量的 necrosis 現象產生。

Epoxide—至於 Epoxide，我們不但在 MTT 36 個小時內的結果沒有發現其毒性，在雙染的結果中，我們發現在 HUVECs 給予 0.5 ~ 20 $\mu\text{g/ml}$ 的 Epoxide 36 小時之後，Epoxide 對於 HUVECs 仍然沒有造成明顯的細胞死亡現象，沒有 apoptosis 的現象也沒有 necrosis 的現象出現 (data not shown)，顯示 Epoxide 在 HUVECs 的角色可能不是負面的，至少在 36 個小時之內不會造成細胞死亡。

氧化性膽固醇能誘發 MAP kinases 及 c-Jun 的磷酸化

在過去許多的研究中，MAP kinases 及其相關的訊息傳遞在主宰細胞的命運上扮演著重要的角色。因此，本實驗即是藉由西方墨點法來探討氧化性膽固醇在人類臍靜脈內皮細胞所造成的細胞毒性是否涉及了 MAP kinases 的磷酸化。

我們利用西方墨點法來觀察 p-ERK、p-JNK 以及 p-p38 的蛋白表現。分別給予 Triol 10 $\mu\text{g/ml}$ 、7-Keto 10 $\mu\text{g/ml}$ 及 Epoxide 10 $\mu\text{g/ml}$ ，處理經 5、15、30、60 以及 120 分鐘五個時間點。我們發現此三種膽固醇氧化物皆能誘導 p-ERK 的表現，Triol 大約在 15 分鐘左右會出現 (Fig. 4A)，7-Keto 大約在 30 分鐘大量出現且持續至 120 分鐘 (Fig. 4B)，而 Epoxide 大約在 30 分鐘達到最大值 (Fig. 4C)；至於 p-JNK 蛋白的表現，在 Triol 5 $\mu\text{g/ml}$ 的濃度 (Fig. 5A) 與 Epoxide 1 $\mu\text{g/ml}$ 的濃度 (Fig. 5B) 之下可在 2 個小時之內被誘導出來，而在 7-Keto 的部分，我們只看到在 10 $\mu\text{g/ml}$ 的濃度之下，p-c-Jun 蛋白的表現能在 15 分鐘左右被大量誘導出來 (Fig. 5C)，由於 p-c-Jun 為 p-JNK 的下游蛋白，若是 p-c-Jun 有被誘導出來代表在之前 p-JNK 已被誘導出來，因此我們認為，7-Keto 也會誘導 p-JNK 的表現；另外，我們發現 Triol 和 7-Keto 都具有誘導 p-p38 蛋白表現的能力，在處理 12 個小時之後，Triol 10 $\mu\text{g/ml}$ 的濃度 (Fig. 6A) 與 7-Keto 1 $\mu\text{g/ml}$ 的濃度 (Fig. 6B) 與控制組比起來有明顯的增加 p-p38 蛋白的表現，至於 Epoxide，在相同的處理條件之下我們並沒有發現 Epoxide 具有誘導 p-p38 蛋白表現的能力 (data not shown)。

氧化性膽固醇能誘發 eNOS 在 Serine-1177 及 Threonine-495 位置上的磷酸化反應

近年來，許多對於 eNOS 蛋白的研究都探討到其相關位置的磷酸化反應，其中目前最被感興趣的即是在位於 eNOS 蛋白還原區的 serine-1177 及位於 calmodulin 結合位置上的 threonine-495，由於這兩個位置的磷酸化對於 eNOS 活性的調節作用是相反的，因此 p-eNOS(S1177) 與 p-eNOS(T495) 的蛋白表現對於 eNOS 的活性具有關鍵的決定性。此外，已經有一些研究報導指出 MAP kinases 與 eNOS 之間的關聯性，像是 Hisamoto 等人 (2001) 指出在血管內皮細胞，LY117018 能透過 p-ERK 進一步誘導 eNOS 蛋白的磷酸化；而 Go 等人 (2001) 也曾發表過 oxLDL 在血管內皮細胞會透過 eNOS 的活化進一步誘發 p-JNK 蛋白的表現。在前面我們已經證實 MAP kinases 參與在反應中，因此在本實驗中，我

們便進一步探討氧化性膽固醇在 HUVECs 對於 eNOS 是否會透過此兩個位置的磷酸化作用去調節 eNOS 的活性。

分別給予 Triol、7-Keto 及 Epoxid 處理 5、15、30、60 及 120 分鐘五個時間點，我們發現他們皆能同時誘導 p-eNOS(S1177)及 p-eNOS(T495)的表現。Triol 5 $\mu\text{g/ml}$ 的濃度之下，p-eNOS(S1177)會在 60 ~ 120 分鐘大量被誘導出來，而 p-eNOS(T495)約在 15 分鐘左右被誘導出來，30 ~ 60 分鐘左右達到最大量 (Fig. 7A)；7-Keto 在 10 $\mu\text{g/ml}$ 的濃度之下，p-eNOS(S1177)約在 30 ~ 60 分鐘被誘導出來，而 p-eNOS(T495)則在 15 ~ 60 分鐘被誘導出來 (Fig. 7B)；至於 Epoxide 則在 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 的濃度之下，p-eNOS(S1177)蛋白的表現約在 60 分鐘達到最高點，而 p-eNOS(T495)則在 15 ~ 30 分鐘被誘導出來 (Fig. 7C)。可以發現三個氧化性膽固醇對 p-eNOS(S1177)及 p-eNOS(T495)都會誘導表現，但在誘導表現的時間點上，p-eNOS(T495)出現得比較早，消失得也比較早，而 p-eNOS(S1177)表現的時間比較晚，消失得也比較晚。

氧化性膽固醇能誘發 Akt 的磷酸化反應

Akt 是 PI3 kinase 依賴的蛋白，當 PI3 kinase 被活化之後，會進一步將下游的 Akt 蛋白磷酸化，而 p-Akt 已被證實能進一步在 eNOS 蛋白的 serine-1177 位置上作磷酸化反應 (Fisslthaler et al., 2000)，此一個位置的磷酸化反應會增加 eNOS 蛋白的活性，增加 NO 的生成。既然前面我們看到了 Triol、7-Keto 及 Epoxide 皆能誘發 p-eNOS(S1177)的表現，因此我們進一步去探討 Akt 是否也參與反應。

分別給予 Triol 10 $\mu\text{g/ml}$ 與 Epoxide 20 $\mu\text{g/ml}$ ，處理 5、15、30、60 及 120 分鐘五個時間點，可以發現 Triol 在濃度 10 $\mu\text{g/ml}$ 之下，p-Akt 大約在 30 ~ 60 分鐘左右被大量誘導表現 (Fig. 8A)；而 Epoxide 在濃度 20 $\mu\text{g/ml}$ 之下，p-Akt 的表現大約在 15 ~ 30 分鐘左右達到最高點 (Fig. 8B)；至於 7-Keto 在相同的處理條件之下，我們並沒有發現它能誘導 p-Akt 的表現 (data not shown)，這一點可能需要再進一步的釐清。

eNOS 蛋白參與調控氧化性膽固醇對 p-ERK 的表現調節

為了進一步釐清這些參與的蛋白之間的關係，我們使用一些特異性蛋白抑制劑來作進一步確認。PD98059 為選擇性的 MEKs 抑制劑 (Pang et al., 1995)，可以抑制 ERK 上游激酶 MEK1/2 的活性；SP600125 為選擇性的 JNK 抑制劑；Wortmannin 為 PI3 kinase 的選擇性抑制劑 (Ui et al., 1995)，可以進一步抑制 Akt 的活化；L-NAME 為 eNOS 的抑制劑，可以抑制 eNOS 的活性，抑制 NO 的生成。

操作前先分別以 25 μM 的 PD98059、20 μM 的 SP600125、100 nM 的 Wortmannin 及 100 μM 的 L-NAME 進行前處理 30 分鐘之後，再分別給予 Triol 10 $\mu\text{g/ml}$ 7-Keto 20 $\mu\text{g/ml}$ 及 Epoxide 20 $\mu\text{g/ml}$ 刺激 30 分鐘。實驗結果顯示，當 eNOS 活性受到抑制時，Triol、7-Keto 及 Epoxide 所誘發的 p-ERK 表現也很明顯的受到抑制 (Fig. 9A、B、C)，也就是說，Triol、7-Keto 及 Epoxide 所引發的 p-ERK 的表現是透過 eNOS 蛋白的活化而來。

結論

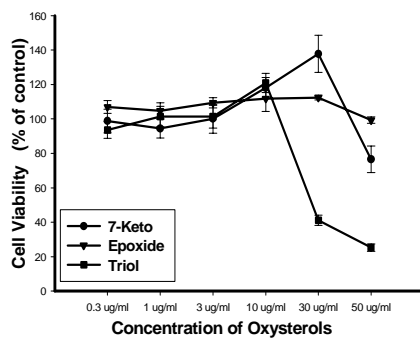
1. 此三種膽固醇氧化物在 HUVECs 所造成的影響皆不相同，而且能同時雙向調節相反方向的兩個路徑：apoptosis 及 cell protection。
2. Epoxide 在 MTT 的結果發現在 18 個小時之內並不會對 HUVECs 造成嚴重的毒性，而且在 Western 的結果發現低濃度的 Epoxide (0.5 ~ 10 $\mu\text{g/ml}$) 能活化

一些走向 cell protection 的蛋白：ERK, Akt, eNOS。

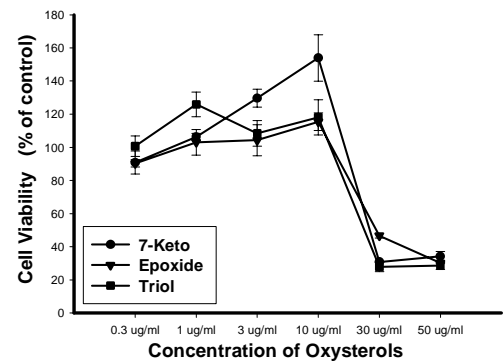
- Triol 有明顯的雙向調節作用在走向 apoptosis 與 cell protection 之間：(A) apoptosis pathway：Triol 在 HUVECs 會造成 caspase-3 的活化，而此活化作用會被 SP (JNK inhibitor) 所抑制，暗示了 Triol 是透過活化 JNK 來活化 caspase-3。另外，此 caspase-3 的活化作用也會同時被 L-NAME (eNOS inhibitor) 及 wortmannin (PI3 kinase inhibitor) 所抑制，暗示了 PI3 kinase pathway 及 eNOS 的磷酸化也是導致 caspase-3 活化的原因之一。(B) cell protection：Triol 同時也活化了另一個蛋白 ERK，而 PD98059 (ERK inhibitor) 會增強 Triol 對 caspase-3 的活化，代表 Triol 對 ERK 的活化在 HUVECs 為 anti-apoptosis 的作用。
- 我們發現了膽固醇氧化物在 HUVECs 的作用是多樣化的。Triol 及 7-Keto 能誘發細胞的 apoptosis，而在同時間也會誘發另一條具細胞保護作用的路徑 (ERK phosphorylation)，而 Epoxide 在本實驗我們並沒有看到嚴重的毒性作用，誘發的作用似乎以細胞保護作用為主。

結果圖表

A.



B.



C.

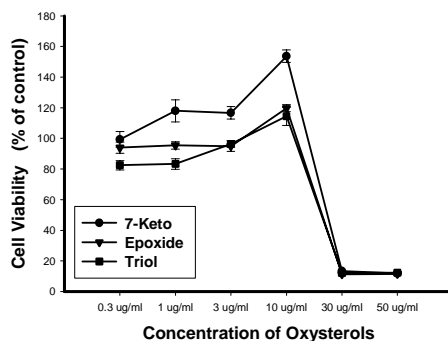


Figure 1. The concentration-dependent cytotoxic effects induced by oxysterols in HUVECs. Cells were treated with different concentrations of oxysterols and MTT assay was performed after 18h (A), 24h (B), and 36h (C). The cytotoxicity effect was occurred between 10 $\mu\text{g/ml}$ and 30 $\mu\text{g/ml}$. The percentage of cell viability was expressed as mean \pm S.E.M. (n = 3).

A.

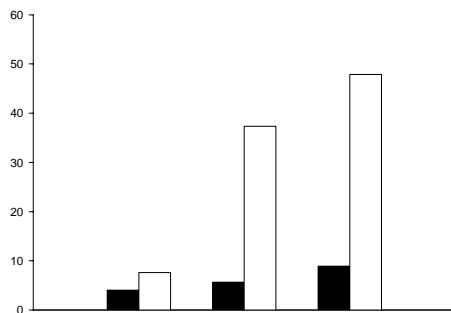
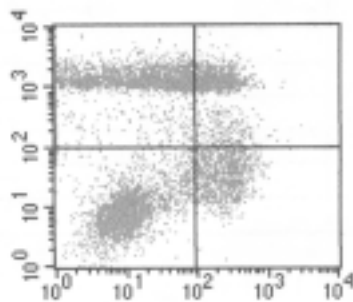


Figure. 2 Cells were treated with different concentrations of Triol for 2h (A) and 15 h (B). Apoptosis was determined by annexin V-PI double staining and analyzed by flow cytometry. Triol induced apoptosis in HUVECs depended on the concentration.

A.



B.

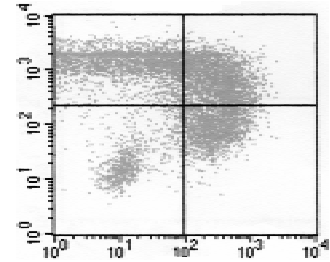
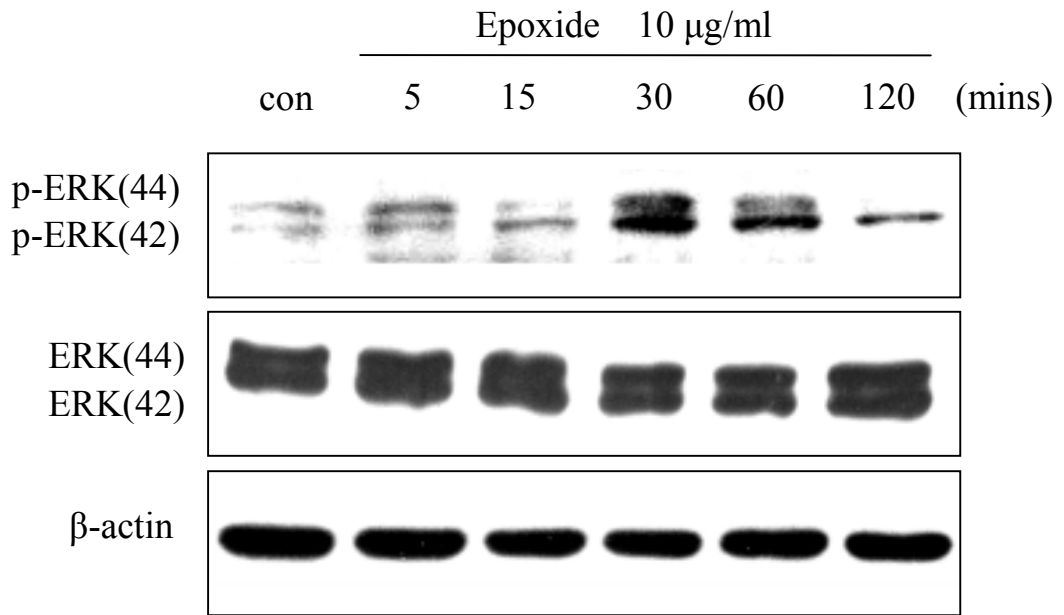
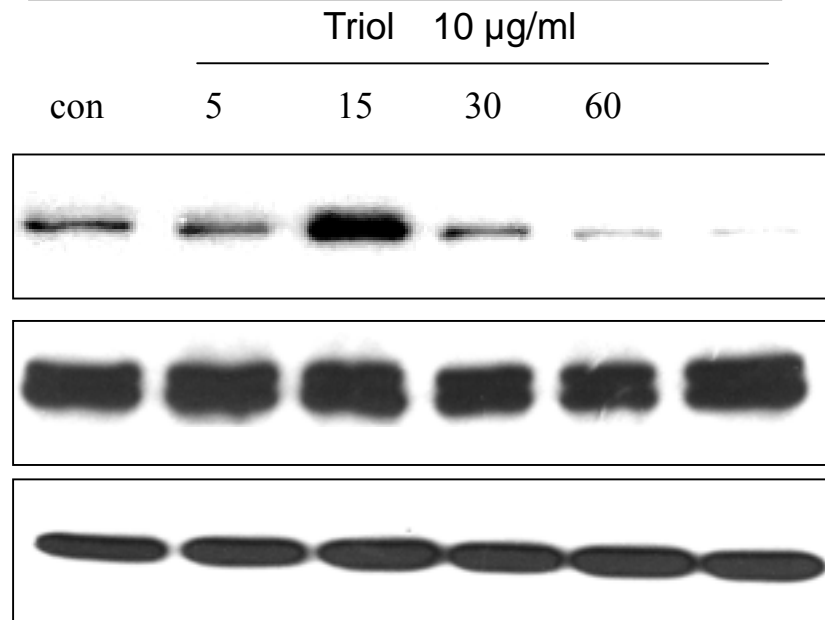


Figure. 3 Cells were treated with Triol 20 $\mu\text{g/ml}$ for 2h(A) and 7.5 $\mu\text{g/ml}$ for 15h(B). Apoptosis was determined by annexin V-PI double staining and analyzed by flow cytometry.

A.



B.



C.

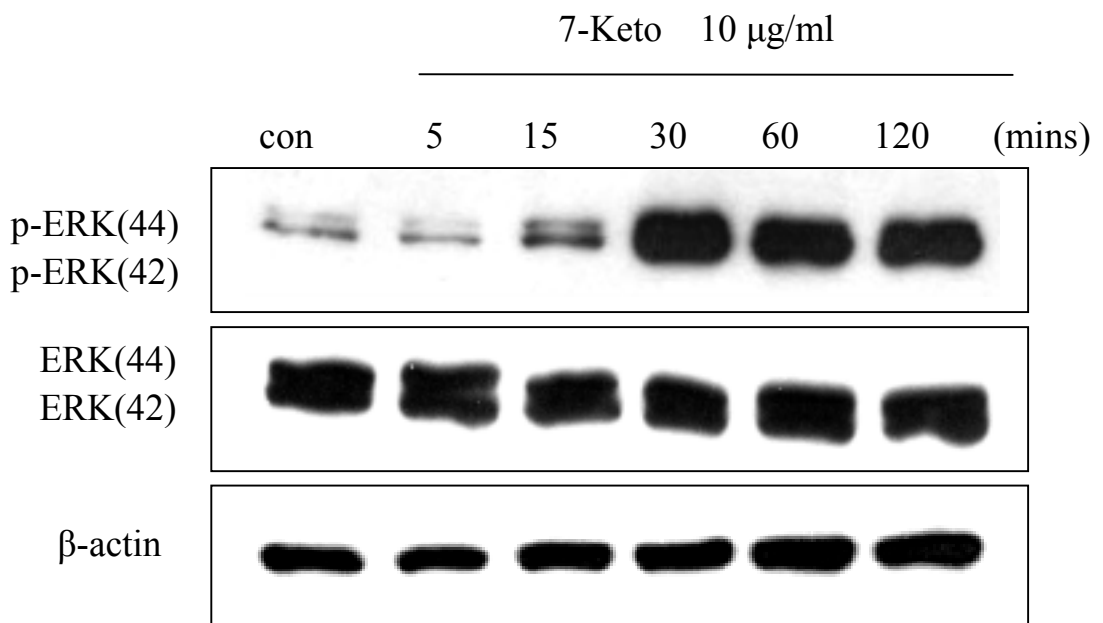


Fig 4 Cells were treated with 10 $\mu\text{g/ml}$ of (A) Epoxide, (B) Triol, (C) 7-Keto for the indicated time. Equal amounts of soluble lysates (10 ~ 50 μg) were subjected to electrophoresis. The blots were analyzed using a specific antibody against ERK and β -actin for loading control. Con : control

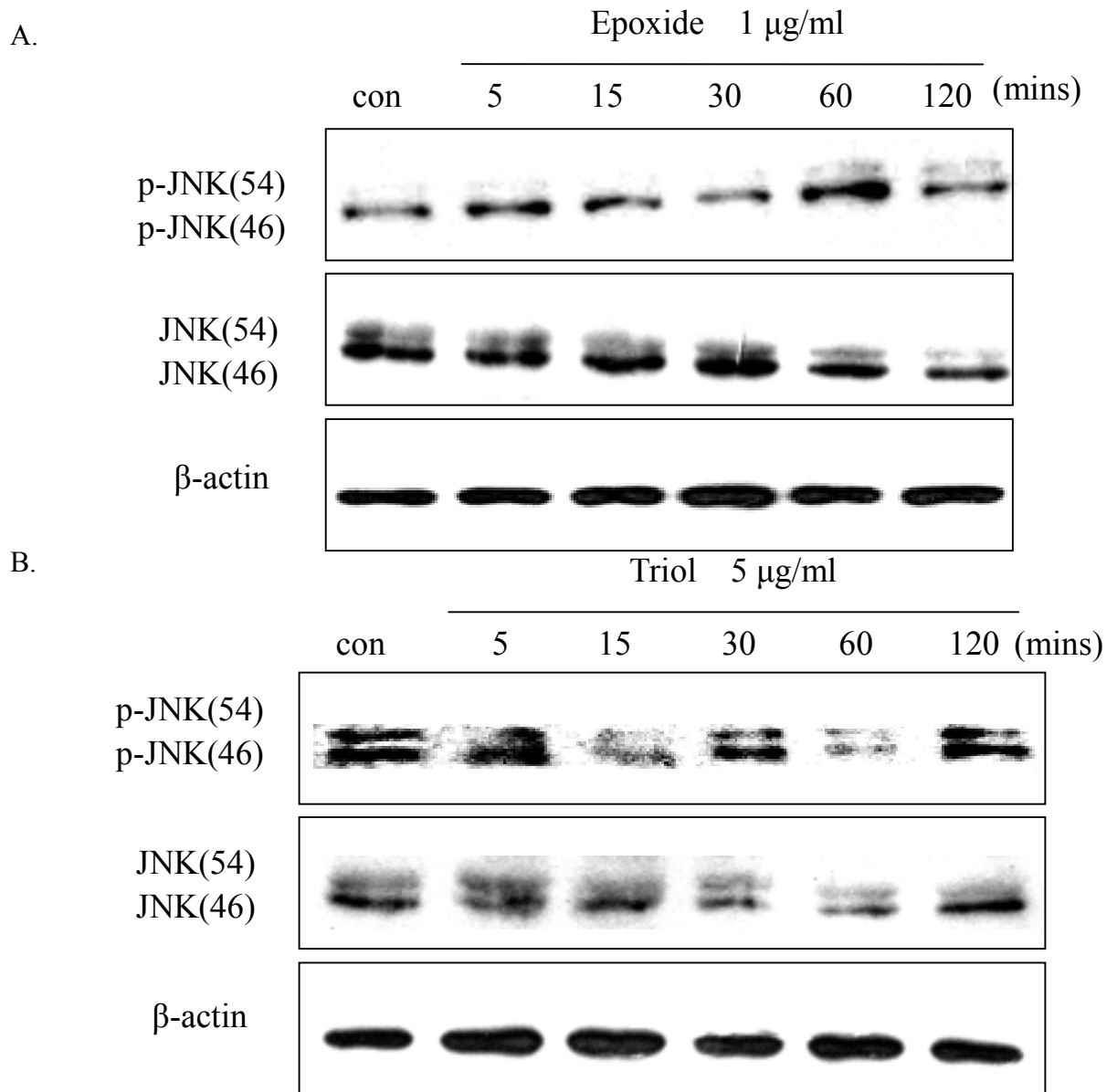


Fig 5 Cells were treated with (A) 1 $\mu\text{g/ml}$ Epoxide, (B) 5 $\mu\text{g/ml}$ Triol for the indicated time. Equal amounts of soluble lysates (10 ~ 50 μg) were subjected to electrophoresis. The blots were analyzed using a specific antibody against p-JNK. JNK and β -actin for loading control. Con : control

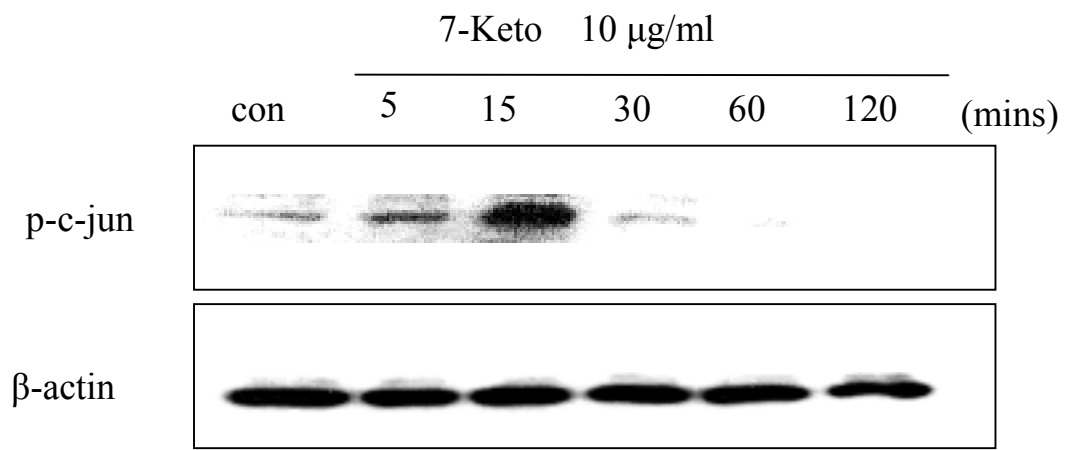
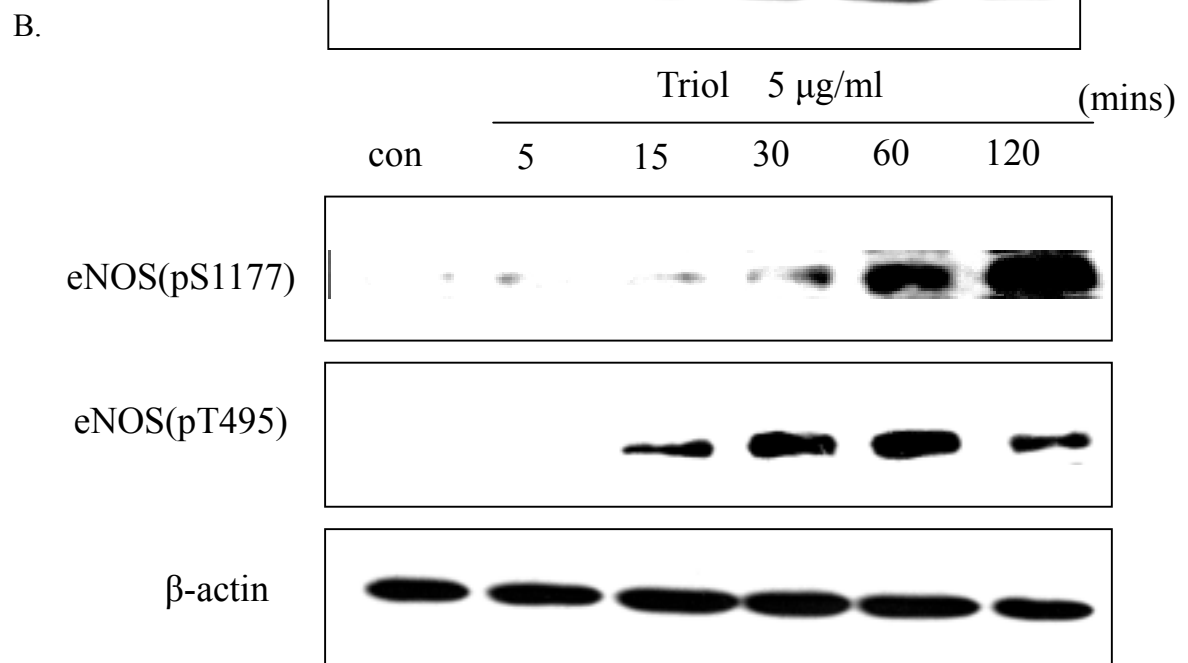
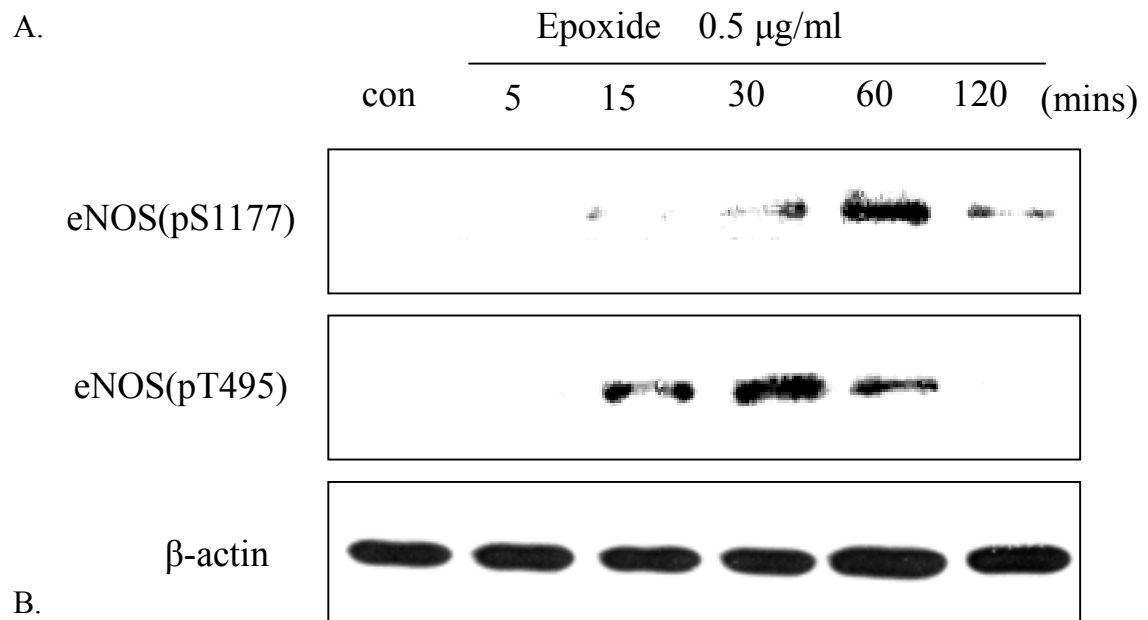


Fig 6 Cells were treated with 10 $\mu\text{g/ml}$ of 7-Keto for the indicated time. Equal amounts of soluble lysates (10 ~ 50 μg) were subjected to electrophoresis. The blots were analyzed using a specific antibody against p-c-jun, and β -actin for loading control. Con : control



C.

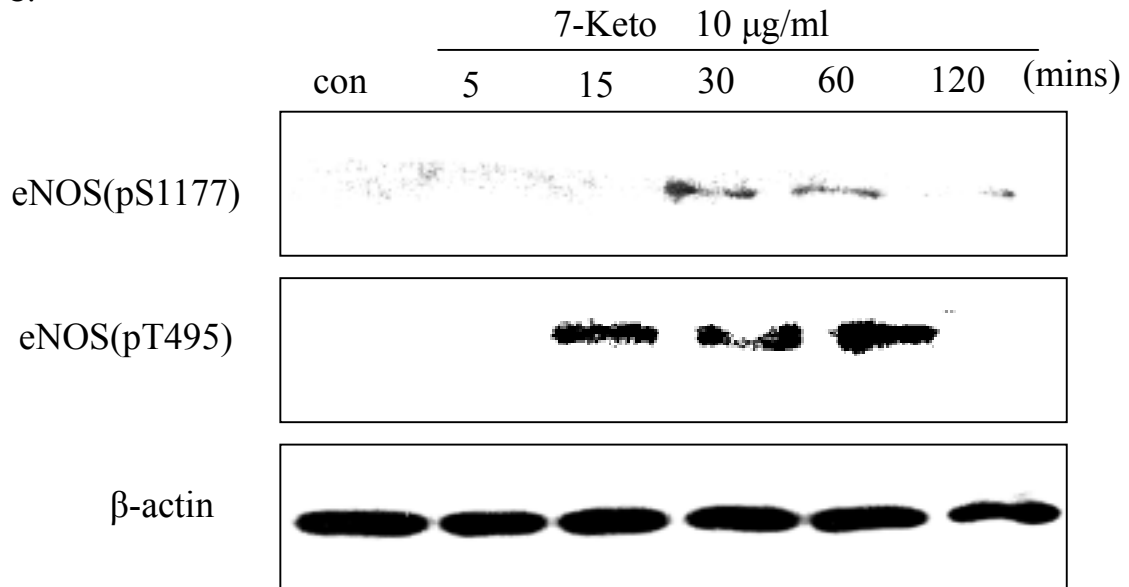
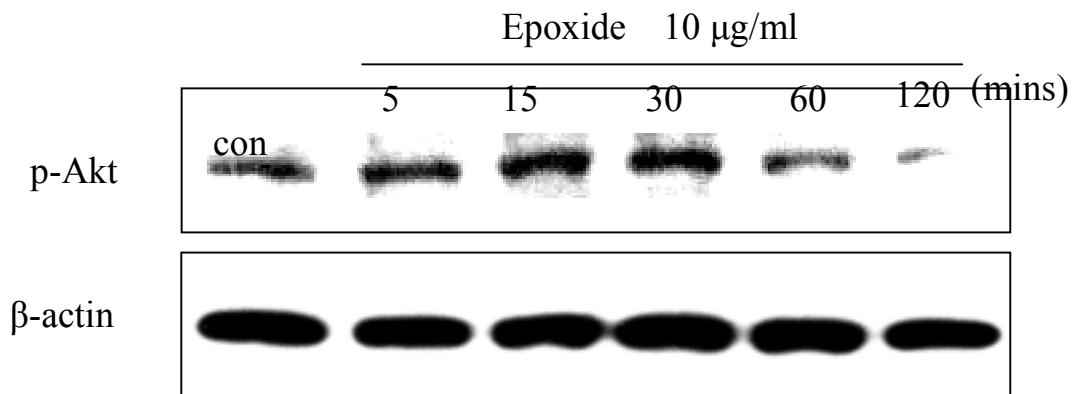


Fig 7 Cells were treated with (A) Epoxide 0.5 μ g/ml, (B) Triol 5 μ g/ml, (C) 7-Keto 10 μ g/ml for the indicated time. Equal amounts of soluble lysates (10 ~ 50 μ g) were subjected to electrophoresis. The blots were analyzed using a specific antibody against p-eNOS(pS1177), p-eNOS(pT495), and β -actin for loading control. Con : control

A.



B.

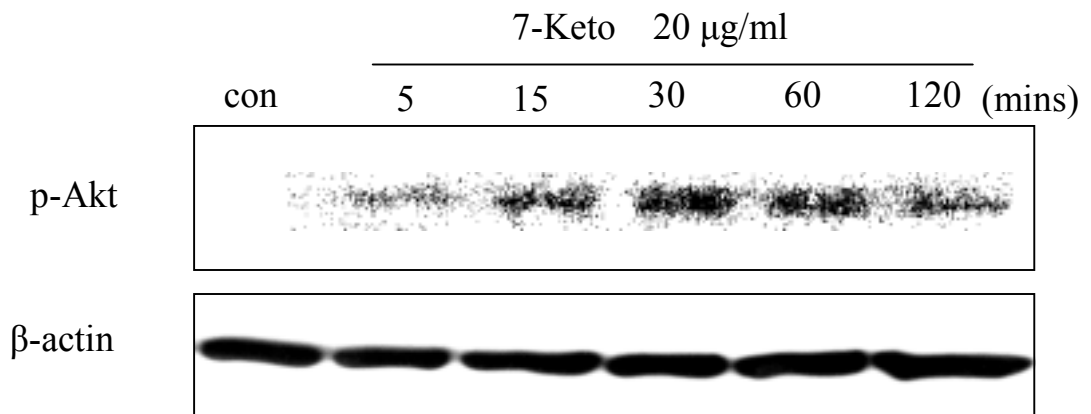


Fig 8 Cells were treated with (A) Epoxide 10 $\mu\text{g/ml}$, (B) Triol 20 $\mu\text{g/ml}$ for the indicated time. Equal amounts of soluble lysates (10 ~ 50 μg) were subjected to electrophoresis. The blots were analyzed using a specific antibody against p-Akt(thr308), and β -actin for loading control. Con : control