

## 行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

## 第三神經系統對肺及呼吸道之調控—

緩激汰引發 cytokines, iNOS, COX-2 及 PLA<sub>2</sub> 表現的訊息傳遞路徑及  
彼此間的調控機制探討

Bradykinin-induced cytokines, iNOS, COX-2 and PLA<sub>2</sub> expression in human airway  
epithelial cells: the interaction mechanisms and signal transduction pathways

計畫編號：NSC 89-2314-B-038-045

執行期限：89 年 8 月 1 日至 90 年 7 月 31 日

主持人：林建煌 執行機構及單位名稱：台北醫學大學醫事技術學系

## 一、中文摘要

本論文主要在探討 bradykinin 刺激人類肺臟上皮細胞 (A549) cyclooxygenase-2 (COX-2) 表現的訊號傳遞路徑。Bradykinin 以濃度及時間相關的方式刺激 COX-2 表現。而蛋白轉錄抑制劑 actinomycin D 和蛋白轉譯抑制劑 cyclohexamide 可抑制 bradykinin 所引發之 COX-2 的表現。B<sub>1</sub> 受體拮抗劑 Lys-(des-Arg<sup>8</sup>-Leu<sup>9</sup>)-BK 並不影響 bradykinin 所引發之 COX-2 表現，但 B<sub>2</sub> 受體拮抗劑 Hoe140 以劑量相關的方式抑制 COX-2 表現。MEK 抑制劑 PD 98059 和 p38 MAPK 抑制劑 SB 203580 以濃度相關的方式抑制 bradykinin 所引發之 COX-2 表現。bradykinin 以劑量及時間相關的方式引發 p44/42 MAPK 之活化，當加入 SB 203580 或 PD 98059 後，發現 PD 98059 幾乎可完全抑制 bradykinin 的作用，但 SB 203580 則不會影響 bradykinin 的作用。Bradykinin 也以劑量及時間相關的方式引發 p38 MAPK 活性的增加，當加入 SB 203580 或 PD 98059 後，發現 SB 203580 幾乎可完全抑制 bradykinin 的作用，但 PD 98059 則不會影響 bradykinin 的作用。NF-κB 抑制劑 pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC) 及 IκB protease 抑制劑 TPCK (3, 10 和 30 μM) 以濃度相關的方式抑制 bradykinin 所引發之 COX-2 表現。當以 bradykinin 刺激 A549 細胞可使 p65 和 p50 NF-κB 由細胞質轉位至細胞核，亦會造成 IκB-α 在細胞質的分解。由 Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) 的結果也發現 bradykinin 可使 NF-

κB 與 DNA 結合的活性增加，於 30 分鐘時達最大反應，但 60 分鐘後反應逐漸地減少，當加入 PD 98059, SB 203580, PDTC 或 TPCK，發現這些抑制劑，皆會抑制 bradykinin 刺激 NF-κB 與 DNA 結合的活性，表示 bradykinin 刺激 NF-κB 活性的增加可受到上游 p44/42MAPK 及 p38 MAPK 的調控。綜合以上的結果得知，在 A549 細胞中，bradykinin 可經由活化 p44/42MAPK 及 p38 MAPK 的路徑，引發 NF-κB 的活化，最後導致 COX-2 的表現。

關鍵詞：緩激汰、環氧酵素-2、  
p44/42MAPK、p38MAPK、上皮細胞

## Abstract

The signal transduction pathway of bradykinin-induced COX-2 expression was studied in human pulmonary epithelial cell line (A549). Bradykinin caused concentration- and time-dependent increases in COX-2 expression in A549 cells. Actinomycin D and cyclohexamide inhibited the bradykinin-induced COX-2 expression. The B<sub>2</sub> receptor antagonist Hoe 140 prevented the bradykinin-induced COX-2 expression, while B<sub>1</sub> receptor antagonist [Lys-(des-Arg<sup>8</sup>-Leu<sup>9</sup>)-BK] had no effect. The bradykinin-induced COX-2 expression were attenuated by the MEK inhibitor (PD 98059) or p38 MAPK inhibitor (SB 203580). Treatment of A549 cells with bradykinin cause the activations of p44/42

MAPK and p38 MAPK in a concentration-dependent manner. The bradykinin-induced p44/42 MAPK activation was almost completely inhibited by PD 98059, but not by SB 203580. On the other hands, the bradykinin-induced activation of p38 MAPK was inhibited by SB 203580, but not by PD 98059. The NF- $\kappa$ B inhibitor, pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC) and I $\kappa$ B protease inhibitor (TPCK) concentration-dependently attenuated the bradykinin-induced COX-2 expression. Treatment of A549 cells with bradykinin resulted in the translocation of p65 and p50 NF- $\kappa$ B from cytosol to the nucleus as well as the degradation of I $\kappa$ B- $\alpha$  in the cytosol. Treatment of A549 cells with bradykinin caused NF- $\kappa$ B activation by detecting the formation of NF- $\kappa$ B-specific DNA-protein complex in the nucleus; this effect was inhibited by PD 98059, SB 203590, PDTC or TPCK. Taken together, these results suggest that bradykinin might activate p44/42 MAPK and p38 MAPK to induce NF- $\kappa$ B activation, which in turn initiates COX-2 expression in human airway epithelial cell line.

**Keywords:** Bradykinin, Cyclooxygenase-2, p44/42 MAPK, p38 MAPK, A549 cells.

## 二、緣由與目的

當組織受傷或有發炎性的刺激時皆會引發血漿或組織之 kallikrein 的活化，進一步再將 kininogen 分解成具有生物活性之 kinins<sup>1</sup>。Bradykinin 是一個具有九個胺基酸之 kinin，目前已知其具有很多生理及病理的性質，包括引起平滑肌的收縮、血管的擴張、增加血管的通透性、黏液的分泌、增加肥大細胞 histamine 的釋放、促進 neutrophil 和 eosinophil 的增生及誘發疼痛的產生<sup>1</sup>。Bradykinin 亦可刺激非膽鹼性神經系統的傳入神經而引起 neuropeptide 的釋放，因而引發神經性發炎反應<sup>1</sup>。當以過敏原刺激氣喘病人時，可發現其呼吸道之 kinin 的濃度有顯著的增加；而 B<sub>2</sub> 受體拮抗劑可有效抑制過敏原所誘發 late phase 之發炎反應<sup>2</sup>。另外，bradykinin 是一個很重

要的發炎(pro-inflammatory)介質，其可經由增加微血管血漿的滲出，進而導致組織的浮腫，而引發支氣管的過度反應(bronchial hyperreactivity)<sup>1</sup>。

磷脂酶 A<sub>2</sub> (phospholipase A<sub>2</sub>, PLA<sub>2</sub>) 是身體產生一些脂質類發炎介質的一個重要的酵素，其主要的作用是將細胞膜上的磷脂質代謝成花生四烯酸，而環氧酵素 (cyclo-oxygenase, COX) 再進一步將花生四烯酸 (arachidonic acid) 代謝成前列腺素 (prostaglandin)，包括 prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>)，prostacyclin (PGI<sub>2</sub>) 和 thromboxane A<sub>2</sub> (TxA<sub>2</sub>)。目前已知磷脂酶 A<sub>2</sub> 具有多種不同的型式，與發炎反應較有關係的是分子量 14 kDa 之 secretory PLA<sub>2</sub> (sPLA<sub>2</sub>) 和 85 kDa 之 cytosolic PLA<sub>2</sub> (cPLA<sub>2</sub>)。而環氧酵素則有兩種不同的同功酵素 (isoforms) 分別是 COX-1 及 COX-2<sup>3</sup>。COX-1 稱為固定存在型 (constitutive form) 其存在很多種的細胞，包括內皮細胞及血小板，它們所產生之前列腺素主要扮演維持細胞恆定的功能<sup>3</sup>。COX-2 稱為誘導型 (inducible form)，當受到一些發炎性物質如 lipopolysaccharide (LPS) 或 cytokines 如 IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  等的刺激皆會誘導其表現<sup>4,5</sup>。進一步的實驗也證實 COX-2 主要是負責產生一些跟發炎有關的前列腺素<sup>3</sup>。而且不管在正常的生理狀態或在病理的狀態下，肺部的組織均會釋放出很多的前列腺素來調節呼吸道的功能，包括呼吸道的張力、細胞的增生、血漿的滲出、黏液的分泌及交感與副交感神經的活性。但無論如何，這些肺部所產生之前列腺素，其所扮演之功能主要是依賴它們在局部區域的濃度的高低、與是否有其特異的受體存在以及其所活化的訊號傳遞路徑之不同，因而產生不同的功能。

一氧化氮(NO) 是一種具有高度生物活性的自由基，其可調控許多細胞和組織的功能，包括調節血管的張力、抑制血小板凝集、當作神經傳遞物質、以及在宿主的防衛和免疫反應中扮演重要的功能<sup>6</sup>。最近許多實驗更證實 NO 在發炎反應中扮演重要的角色，其可引發與發炎反應相關許

多反應如血管擴張、組織浮腫、引發細胞毒性等反應<sup>6</sup>。NO 在體內之前驅物為 L-arginin 其可經由一氧化氮合成酵素(nitric oxide synthase, NOS)的作用,轉變為 NO 和 L-citrulline 之後,NO 進一步轉變為較穩定之 nitrite 和 nitrate,在合成之過程中還需要 O<sub>2</sub>和 NADPH 當作受質,以及 FAD, FMN, tetrahydropterine 等輔助因子來幫助電子的轉移<sup>7</sup>。目前已知一氧化氮合成酵素具有三種不同的同功酵素 (isoforms) 分別是 endothelial NOS (eNOS), neuronal NOS (nNOS) 及 inducible NOS (iNOS)<sup>8</sup>。而 eNOS 主要存在血管內皮細胞, nNOS 主要存在腦部及周邊之神經細胞, iNOS 平常並不存在於人體內只有一些特定的細胞,如 macrophages, 白血球及腦神經膠細胞等其它發炎細胞。當這些細胞受到一些發炎性物質如 lipopolysaccharide (LPS) 或 cytokines 如 IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  等刺激才會誘導其表現<sup>8</sup>。

最近的實驗報告亦指出 bradykinin 可刺激 eicosanoid 的合成及 cytokines 的產生。在天竺鼠的肺部組織, bradykinin 可刺激 IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6 的表現<sup>9</sup>; 在人類的纖維母細胞 bradykinin 可刺激 IL-8 的產生<sup>10</sup>; 在人類的氣管平滑肌細胞 bradykinin 可刺激 COX-2 的表現和 PGE<sub>2</sub> 的釋放<sup>11</sup>。另外在人類的纖維母細胞,可發現 PGE<sub>2</sub> 可增強 IL-1 $\beta$  所引發之 IL-6 和 IL-8 的產生。但 bradykinin 究竟是否會誘導呼吸道上皮細胞或巨噬細胞 COX-2, iNOS 的表現 cPLA<sub>2</sub> 的活化及 cytokines (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-8 和 GM-CSF) 的釋放, 及其是經由何種訊息傳遞將訊號由細胞膜傳至細胞核來誘導這些發炎性蛋白質的表現, 則至今尚未有完整的報告。而呼吸道上皮細胞和巨噬細胞是重要的發炎細胞, 其與呼吸道的發炎反應有重要的關連性。因此, 本研究計畫將使用呼吸道上皮細胞及巨噬細胞, 來探究 bradykinin 引發 COX-2, iNOS 表現, cPLA<sub>2</sub> 活化及 cytokine 放的訊號傳遞路徑, 以及它們彼此之間的調控關係。

### 三、結果與討論

#### 1. Bradykinin 引發 A549 細胞之 COX-2 表現

在 A549 細胞, 以不同濃度之 bradykinin (10<sup>-10</sup>-10<sup>-7</sup> M) 刺激 4 小時後, 發現 bradykinin 以濃度相關的方式刺激 COX-2 的表現, 於 10<sup>-8</sup> M 的濃度時 COX-2 表現達最大。當以 bradykinin (10<sup>-8</sup> M) 處理不同的時間, 發現 bradykinin 以時間相關的方式引發 COX-2 表現, 於刺激 2-4 小時後達最大反應, 之後反應逐漸減少。當預先以蛋白轉錄抑制劑 actinomycin D (1  $\mu$ M) 和蛋白轉譯抑制劑 cycloheximide (3  $\mu$ M) 前處理 30 分鐘, 再加入 bradykinin (10<sup>-8</sup> M) 刺激 4 小時, 發現 actinomycin D 及 cycloheximide 皆可顯著抑制 bradykinin 所引發之 COX-2 表現, 這結果證實 bradykinin 刺激 COX-2 表現, 的確經由一個蛋白質的合成步驟。當預先以 B<sub>1</sub> 受體拮抗劑 Lys-(des-Arg<sup>8</sup>-Leu<sup>9</sup>)-BK (100  $\mu$ M) 及 B<sub>2</sub> 受體拮抗劑 Hoe140 (10<sup>-9</sup>-10<sup>-7</sup> M) 前處理 30 分鐘後, 再加入 bradykinin (10<sup>-8</sup> M) 刺激 4 小時, 發現 Lys-(des-Arg<sup>8</sup>-Leu<sup>9</sup>)-BK 並不影響 bradykinin 所引發之 COX-2 表現, 但 Hoe140 以劑量相關的方式抑制 COX-2 表現。此結果證實 bradykinin 刺激 A549 細胞之 COX-2 表現可能是經由活化 B<sub>2</sub> 受體。

#### 2. MEK 抑制劑及 p38 MAPK 抑制劑對 bradykinin 刺激 COX-2 表現的影響

進一步我們想探討 MAPK family 是否包含在 bradykinin 引發 COX-2 表現的訊號傳遞路徑中。當預先以 MEK 的抑制劑 PD 98059 (3, 10 和 30  $\mu$ M) 或 p38 MAPK 抑制劑 SB 203580 (0.1, 1 和 10  $\mu$ M) 前處理 30 分鐘後, 再加入 bradykinin (10<sup>-8</sup> M) 作用 4 小時, 發現 PD 98059 及 SB 203580 皆以劑量相關的方式抑制 bradykinin 引發之 COX-2 表現。由這些結果可得知 MEK 及 p38 MAPK 的活化是包含在 bradykinin 引發 COX-2 表現的訊號傳遞路徑當中。

### 3. Bradykinin 引發 p44/42 MAPK 及 p38 MAPK 之活化

我們利用 anti-phospho-p44/42 MAPK 之抗體來進行 Western blot，以測定 p44/42 MAPK 被活化的程度。當以不同濃度之 bradykinin ( $10^{-10}$ - $10^{-6}$  M) 刺激 A549 細胞分鐘後，發現 p44/42 MAPK 的活化可依劑量相關的方式而遞增，於  $10^{-9}$ - $10^{-8}$  M 的濃度時反應達到最大。當以 bradykinin ( $10^{-8}$  M) 刺激 A549 細胞 1, 3, 5, 10 和 30 分鐘後，發現 p44/42 MAPK 的活化在 3-5 分鐘時達最大反應，於 10 分鐘後即逐漸地減少。當預先以 PD 98059 (30  $\mu$ M) 及 SB 203580 (10  $\mu$ M)，前處理 30 分鐘後，再加入 bradykinin ( $10^{-8}$  M) 刺激 5 分鐘，可發現 PD 98059 幾乎可完全抑制 bradykinin 所引發 p44/42 MAPK 的活化，但 SB 203580 則不會影響 bradykinin 的作用。

另外，我們利用 Immunoprecipitation 的方法將細胞內受到活化的 phospho p38 MAPK 沉澱下來，再給予 ATF-2 作為受質來進行反應，並利用 anti-phospho-ATF-2 之抗體來進行 Western blot，以測定 p38 MAPK 的活性。當以不同濃度之 bradykinin 刺激 A549 細胞 5 分鐘後，發現 p38 MAPK 的活性可依劑量相關的方式而遞增，且於  $10^{-9}$ - $10^{-8}$  M 的濃度時達到最大。當以 bradykinin ( $10^{-8}$  M) 刺激 A549 細胞 1, 3, 5, 10 和 30 分鐘後，發現刺激 3-5 分鐘後 p38 MAPK 的活性達最大反應，於 30 分鐘後即逐漸地減少。進一步我們利用 anti-phospho-p38 MAPK 之抗體來進行 Western blot，以測定 p38 MAPK 被活化的程度。以 bradykinin ( $10^{-8}$  M) 刺激 A549 細胞 1, 3, 5, 10 和 30 分鐘後，發現刺激 3-5 分鐘後 p38 MAPK 的活性達最大反應，於 30 分鐘後即逐漸地減少。當預先以 PD 98059 (30  $\mu$ M) 及 SB 203580 (10  $\mu$ M) 前處理 30 分鐘後，再加入 bradykinin ( $10^{-8}$  M) 刺激 5 分鐘，可發現可發現 SB 203580 幾乎可完全抑制 bradykinin 所引發 p38 MAPK 的活化，但 PD 98059 則不會影響 bradykinin 的作用。

### 4. NF- $\kappa$ B 抑制劑及 I $\kappa$ B protease 抑制劑對 Bradykinin 刺激 COX-2 表現的影響

我們也使用 NF- $\kappa$ B 的抑制劑 PDTC (3, 10 和 30  $\mu$ M) 及 I $\kappa$ B protease 抑制劑 TPCK (3, 10 和 30  $\mu$ M) 來觀察其對於 bradykinin 刺激 COX-2 表現的影響。我們發現 PDTC 及 TPCK 以劑量相關的方式抑制 bradykinin ( $10^{-8}$  M 刺激之 COX-2 表現。由此結果可得知 NF- $\kappa$ B 的活化的確包含在 bradykinin 刺激 COX-2 表現的訊號傳遞路徑。

### 5. Bradykinin 引發 NF- $\kappa$ B 活化的作用

我們以 anti-p65 和 anti-p50 NF- $\kappa$ B 之抗體來測定 bradykinin 引發 p65 和 p50 NF- $\kappa$ B 由細胞質轉位到細胞核的情形，以及 anti-I $\kappa$ B- $\alpha$  之抗體來測定細胞質 I $\kappa$ B- $\alpha$  分解的情形，來代表 NF- $\kappa$ B 是否有被活化。以 bradykinin ( $10^{-8}$  M) 刺激 A549 細胞 10, 30, 60 和 120 分鐘後，發現刺激 10 分鐘後，p65 和 p50 NF- $\kappa$ B 即可從細胞質轉位到細胞核，而在 60 分鐘後 p65 和 p50 NF- $\kappa$ B 在細胞質減少的部分，即已逐漸恢復。另外也發現刺激 30 分鐘後，細胞質中之 I $\kappa$ B- $\alpha$  的量即可明顯地減少。

Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) 是利用 NF- $\kappa$ B 會和基因起始區的某段特定序列產生特異性結合的性質，將此特定序列做成一小段探針，並用  $^{32}$ P 標示後和細胞的 nuclear extract 反應，利用凝膠電泳分離結合與未結合的探針，來判斷 NF- $\kappa$ B 被活化的情形。由 EMSA 的實驗，也觀察到 NF- $\kappa$ B 於 bradykinin ( $10^{-8}$  M) 刺激 10 分鐘後即被活化，於 30 分鐘時反應達到最大，但 60 分鐘後反應逐漸地減少。將細胞前處理 PD 98059 (30  $\mu$ M)、SB 203580 (10  $\mu$ M)、PDTC (25  $\mu$ M)、TPCK (10  $\mu$ M) 及 PDTC (25  $\mu$ M) 30 分鐘後，可發現，這些抑制劑皆可抑制 bradykinin 刺激 NF- $\kappa$ B 活化的作用。由此結果可推測，bradykinin 所引發 NF- $\kappa$ B 的活化可受到上游 p44/42 MAPK 及 p38MAPK 之調控。綜合以上的結果得知，在 A549 細胞中，

bradykinin 可經由活化 p44/42MAPK 及 p38 MAPK 的路徑，引發 NF- $\kappa$ B 的活化，最後導致 COX-2 的表現。

#### 四、計畫成果自評

- 一、此計畫探討 Bradykinin 引發人類呼吸道上皮細胞 COX-2 表現的訊息傳遞路徑。這些研究將為 bradykinin 引發炎症反應提供一個可能的致病原因；且為抗發炎藥物的開發提供一個新的方向。
- 二、本研究計畫提供一位碩士班學生完成其碩士論文。題目為 Bradykinin 引發人類呼吸道上皮細胞 COX-2 表現的訊息傳遞路徑。

#### 五、參考文獻

1. Proud, D. and Kaplan A.P. (1988) Kinin formation: mechanisms and role in inflammatory disorders *Annu. Rev. Immunol.* 6:49-83.
2. Abraham, W.M. (1992) The potential role of bradykinin antagonists in the treatment of asthma. *Agents Actions* 38: 439-449.
3. Mitchell, J.A., Larkin, S. and Williams, T.J. (1995) Cyclooxygenase-2: regulation and relevance in inflammation. *Biochem. Pharmacol.* 50, 1535-1542.
4. Mitchell, J.A., Belvisi, M.G., Akaresereenont, P. Robbins, R.A., Kwon, O.J., Croxtall, J., Barnes, P.J. and Vane, J.R. (1994) Induction of cyclo-oxygenase-2 by cytokines in human pulmonary epithelial cells: regulation by dexamethasone. *Br. J. Pharmacol.* 113, 1008-1014.
5. Vane, J.R., Mitchell, J.A., Appleton, I., Tomlinson, A., Bishop-Bailey, D.A., Croxtall, J. and Westwick, J. (1996) Inducible isoforms of cyclooxygenase and nitric oxide synthase in inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 2046-2050.
6. Moncada, S. Palmer R.M.J. and Higgs, A. (1991) Nitric oxide: physiology, pathology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* 43: 109-142.
7. Moncada, S. Palmer R.M.J. and Higgs, A. (1993) The L-arginin-nitric oxide pathway. *New Eng. J. Med.* 329: 2002-2012.
8. Forstermann, U. Gath, I., Schwartz, P., Closs, E.I. and Kleinert, H. (1995) Isoforms of nitric oxide synthase. *Biochem Pharmacol.* 50: 1321-1332.
9. Paegelow, I., Werner, H., Vietinghoff, G. and Modeer, T. (1995) Release of cytokines from isolated lung strips by bradykinin. *Inflamm. Res.* 44:306-311.
10. Pang, L. and Knox, A.J. (1998) Bradykinin stimulates IL-8 production in cultured human airway smooth muscle cells: Role of cyclooxygenase products. *J. Immunol.* 166: 2509-2515.
11. Pang, L. and Knox, A.J. (1997) PGE2 release by bradykinin in human airway smooth muscle cells: involvement of cyclooxygenase-2 induction. *Am. J. Physiol.* 273: L1132-1140.