RRPC90091223 (5 .P)

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 iNOS 表現及 cytokines 釋放之訊息傳遞路徑及
彼此間的調控機制探討(2/3)

Bradykinin-induced iNOS expression cytokines release in human airway epithelial cells: the interaction mechanisms and signal transduction pathways (2/3)

計畫編號：NSC 90-2320-B-038-047
執行期限：90 年 8 月 1 日至 91 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。在第一年的研究中發現，在 A549 細胞中，bradykinin 可經由活化 p44/42MAPK 及 p38 MAPK 的路徑，最後導致 COX-2 的表現。在第二年的研究我們將探討 bradykinin 引發 p44/42MAPK 及 p38 MAPK 活化的訊息傳遞路徑以及 p44/42MAPK 及 p38 MAPK 的活化是經由何種受體來引發。Tyrosine kinase 抑制劑 genistein (10 和 30 μM) 及 PI 3-kinase 抑制劑 wortamanin (10 和 30 nM) 抑制 bradykinin 引發之 COX-2 表現。B_1 受體拮抗劑 Lys-(des-Arg^8-Leu^9)-BK 並不影響 bradykinin 所引發之 p44/42 及 p38 MAPK 的活化，但 B_2 受體拮抗劑 Hoe140 以劑量相關的方式抑制 p44/42 及 p38 MAPK 的活化。當加入 genistein (30 μM)、wortamanin (30 nM)、SB 203580 或 PD 98059 後，發現 PD 98059 幾乎可完全抑制 bradykinin 引發 p44/42 的活化，但 genistein (30 μM)、wortamanin (30 nM) 及 SB 203580 則不會影響 bradykinin 的作用。另外，genistein (30 μM)、wortamanin (30 nM)、SB 203580 可完全抑制 bradykinin 引發 p38MAPK 的活化，但 PD 98059 則不會影響 bradykinin 的作用。Bradykinin 可使 NF-κB luciferase 的活性增加，於 10^{-8} M 達最大反應。當加入 PD 98059, SB 203580, 或 PDTC，發現這些抑制劑皆會抑制 bradykinin 刺激 NF-κB luciferase 活性的增加。在 A549 細胞中，bradykinin 刺激 p44/42 及 p38 MAPK 的活化是經由活化 B_2 受體，而非 B_1 受體。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。Bradykinin 引發之 p38 MAPK 活化，是經由 tyrosine kinase 及 PI 3-kinase 的路徑；然而 p44/42 MAPK 活化，並不經由 tyrosine kinase 及 PI 3-kinase 的路徑。

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). The tyrosine kinase inhibitor, genistein and PI 3-K inhibitor (wortamanin) concentration-dependently attenuated the bradykinin-induced COX-2 expression. The B_2 receptor antagonist Hoe 140 prevented the bradykinin-induced the activation of p44/42 and p38 MAPK, while B_1 receptor antagonist [Lys-(des-Arg^8-Leu^9)-BK] had no effect. The bradykinin-induced p44/42 MAPK activation was almost completely inhibited by PD 98059, but not by genistein, wortamanin, or SB 203580. On the other hands, the bradykinin-induced activation of p38 MAPK was inhibited by genistein, wortamanin, and SB 203580, but not by PD 98059. Treatment of A549 cells with bradykinin resulted in the increase in NF-κB luciferase activity; this effect was inhibited by PD 98059, SB 203590, or PDTC. Taken together, these results suggest that bradykinin might activate p44/42 MAPK and p38 MAPK to induce

NF-κB activation, which in turn initiates COX-2 expression in human airway epithelial cell line. The signal of tyrosine kinase and PI 3-kinase is upstream of bradykinin-induced p38 MAPK, but not p44/42 MAPK activation.

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[1]。 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[1]。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[1]。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_2 受體拮抗劑可有效抑制過敏原所誘發 late phase 之發炎反應[2]。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)[1]。

磷酯酵素 A_2 (phospholipase A_2, PLA_2) 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酯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_2 (PGE_2), prostacyclin (PGI_2) 和 thromboxane A_2 (TxA_2)。目前已知磷酯酵素 A_2 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 PLA2 (sPLA2) 和 85 kDa 之 cytosolic PLA2 (cPLA2)。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[3]。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[3]。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-1β, TNF-α 等的刺激皆會誘導其表現[4,5]。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[3]。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[6]。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[6]。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_2 和 NADPH 當作受質，以及 FAD, FMN, tetrahydropiopterine 等輔助因子來幫助電子的轉移[7]。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)[8]。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-1β, TNF-α 等刺激才會誘導其表現[8]。

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-1β, IL-2, IL-6 的表現[9]；在人類的纖維母細胞 bradykinin 可刺激 IL-8 的產生[10]；在人類的氣管平滑肌細胞 bradykinin 可刺激 COX-2 的表現和 PGE_2 的釋放[11]。另外在人類的纖維母細胞，可發現 PGE_2 可增強 IL-1β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 cPLA2 的活化及 cytokines (IL-1β, TNF-α, 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, $cPLA_2$ 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

在第一年的研究中發現，在 A549 細胞中，bradykinin 可經由活化 p44/42MAPK 及 p38 MAPK 的路徑，最後導致 COX-2 的表現。在第二年的研究我們將探討 bradykinin 引發 p44/42MAPK 及 p38 MAPK 的訊息傳遞路徑以及 p44/42MAPK 及 p38 MAPK 的活化是經由何種受體來引發。

1. Tyrosine kinase 及 PI 3-kinase 包含在 bradykinin 刺激 COX-2 表現的訊號傳遞路徑

當預先以 tyrosine kinase 抑制劑 genistein (10 和 30 μM) 及 PI 3-kinase 抑制劑 wortamanin (10 和 30 nM)前處理 30 分鐘後，再加入 bradykinin (10^{-8} M) 刺激 4 小時，發現 genistein 及 LY 294002 皆以劑量相關的方式抑制 COX-2 表現。由這些結果可得知 tyrosine kinase 及 PI 3-kinase 的活化是包含在 bradykinin 引發 COX-2 表現的訊號傳遞路徑當中。

2. Bradykinin 刺激 A549 細胞 p44/42MAPK 活化是經由 B_2 受體而非 B_1 受體

進一步我們利用 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。當預先以 B_1 受體拮抗劑 Lys-(des-Arg^8-Leu^9)-BK (10 和 100 μM) 及 B_2 受體拮抗劑 Hoe140 (10^{-9}-10^{-7} M)前處理 30 分鐘後，再加入 bradykinin (10^{-8} M) 刺激 5 分鐘，發現 Lys-(des-Arg^8-Leu^9)-BK 並不影響 bradykinin 所引發之 p44/42 MAPK 的活化，但 Hoe140 以劑量相關的方式抑制 p44/42 MAPK 的活化。此結果證實 bradykinin 刺激 A549 細胞之 p44/42 MAPK 的活化可能是經由活化 B_2 受體，而非 B_1 受體。

3. Tyrosine kinase 及 PI 3-kinase 並不包含在 bradykinin 刺激 p44/42 MAPK 活化的訊號傳遞路徑

當預先以 wortamanin (30 nM), genistein (30 μM)，PD 98059 (30 μM) 及 SB 203580 (1 μM) 前處理 30 分鐘後，再加入 bradykinin (10^{-8} M) 刺激 5 分鐘，可發現 PD 98059 幾乎可完全的抑制 bradykinin 的作用，但 wortamanin, genistein, SB 203580 則皆不會影響 bradykinin 的作用。由以上結果可得知，bradykinin 引發之 p44/42 MAPK 活化，並不經由 tyrosine kinase 及 PI 3-kinase 的路徑。

4. Bradykinin 刺激 A549 細胞 p38 活化是經由 B_2 受體而非 B_1 受體

我們利用 immunopreciptation 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。當預先以 B_1 受體拮抗劑 Lys-(des-Arg^8-Leu^9)-BK (10 和 100 μM)

及 B_2 受體拮抗劑 Hoe140 (10^{-9}-10^{-7} M)前處理 30 分鐘後，再加入 bradykinin (10^{-8} M) 刺激 5 分鐘，發現 Lys-(des-Arg^8-Leu^9)-BK 並不影響 bradykinin 所引發之 p38 MAPK 的活化，但 Hoe140 以劑量相關的方式抑制 p38 MAPK 的活化。此結果證實 bradykinin 刺激 A549 細胞之 p38 MAPK 的活化可能是經由活化 B_2 受體，而非 B_1 受體。

5. Tyrosine kinase 及 PI 3-kinase 包含在 bradykinin 刺激 p38 MAPK 活化的訊號傳遞路徑

當預先以 wortamanin (30 nM), genistein (30 μM)，PD 98059(30 μM)及 SB 203580 (1 μM) 前處理 30 分鐘後，再加入 bradykinin (10^{-8} M) 刺激 3 分鐘，可發現 wortamanin, genistein 可部分抑制 bradykinin 所引發之 p38 MAPK 的活化，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。由以上結果可得知，bradykinin 可經由刺激 tyrosine kinase 及 PI 3-kinase 引發 p38 MAPK 的活化，並進而調控 COX-2 的表現。

5. Bradykinin 引發 NF-κB leuciferase 活性增加

以不同濃度 bradykinin (10^{-10}-M 10^{-8} M) 刺激 A549 細胞 24 小時後，發現 NF-κB leuciferase 的活性即顯著地增加，於 10^{-8} M 的濃度時達到最大反應。

6. p44/42 及 p38 MAPK 包含在 bradykinin 引發 NF-κB 活化的路徑

將細胞前處理 PD 98059 (30 μM), SB 203580 (1 μM) 及 PDTC (25 μM) 30 分鐘後，發現這些抑制劑皆可抑制 bradykinin 刺激 NF-κB leuciferase 活性的增加。由此結果可推測，bradykinin 所引發 NF-κB 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 刺激 p44/42 及 p38 MAPK 的活化是經由活化 B_2 受體，而非 B_1 受體。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。Bradykinin 引發之 p38 MAPK 活化，是經由 tyrosine kinase 及 PI 3-kinase 的路徑；然而 p44/42 MAPK 活化，並不經由 tyrosine kinase 及 PI 3-kinase 的路徑。

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 p44/42 和 p38 MAPK 包含在 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 revelance 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 dexamethasoner. 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. Palmerm R.M.J. and Higgs, A. (1991) Nitric oxide: physiology, pathyology, and pharmacology. Pharmacol. Rev. 43: 109-142.

7.Moncada, S. Palmerm 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. 1661: 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.