

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

緩激肽引發 iNOS 表現及 cytokines 釋放之訊號傳遞路徑及
彼此間之調控機制探討

計畫類別：整合型計畫

計畫編號：NSC91-2314-B-038-010-

執行期間：91 年 08 月 01 日至 92 年 07 月 31 日

執行單位：臺北醫學大學醫事技術學系

計畫主持人：林建煌

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2 年後可公開查詢

中 華 民 國 92 年 10 月 30 日

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

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

計畫編號：NSC 91-2314-B-038-010

執行期限：91 年 8 月 1 日至 92 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

本計畫主要在探討 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，在第一年及第二年的研究中發現，在 A549 細胞中，bradykinin 可經由活化 p44/42 MAPK 及 p38 MAPK 的路徑引發 NF- κ B 的活化，最後導致 COX-2 的表現。在第三年的研究中我們將更進一步探討 bradykinin 導致 COX-2 表現的路徑中，p44/42 MAPK 及 p38 MAPK 與 NF- κ B 之間的訊息傳遞路徑，以及其他引起 p44/42 MAPK 及 p38 MAPK 活化的訊息傳遞路徑。Ras 抑制劑 manumycin A (0.3, 1 和 3 μ M) 及 Raf 抑制劑 GW 5074 (0.3, 1 和 3 nM) 以劑量相關的方式抑制 bradykinin 引發之 COX-2 表現。Manumycin A (3 μ M) 與 GW 5074 (3 μ M) 也可以抑制 bradykinin 引發 p44/42 MAPK 的活化，但並不會影響 p38 MAPK 的活化。Bradykinin 以時間相關的方式使得 IKK α/β 活性增加，當加入 PD 98059 (30 μ M)、SB 203580 (1 μ M) 和 manumycin A (3 μ M) 後，發現 PD 98059 與 manumycin A 可完全抑制 bradykinin 引發 IKK α/β 的活化，但 SB 203580 只會部分抑制 IKK α/β 的活化。Bradykinin 刺激 A549 細胞除了促使 I κ B- α 的分解進而使 p65 和 p50 NF- κ B 進入細胞核之外，也會以時間相關的方式引發

I κ B- α 與 p65 磷酸化。綜合以上結果得知，在 A549 細胞中，bradykinin 經由活化 Ras/Raf/p44/42 MAPK 及 p38 MAPK 的路徑，來引發 IKK α/β 的活化，使 I κ B- α 磷酸化與分解而進一步活化 NF- κ B。除了

bradykinin 引發 I κ B- α 磷酸化之外，也會造成 p65 磷酸化。

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 Ras inhibitor (manumycin A) and Raf inhibitor (GW 5074) concentration-dependently attenuated the bradykinin-induced COX-2 expression. The bradykinin-induced p44/42 MAPK but not p38 MAPK activation was inhibited by manumycin A and GW 5074. Bradykinin caused time-dependent increases in IKK α/β , I κ B- α and p65 phosphorylation, IKK α/β activity in A549 cells. The IKK α/β activation was almost completely inhibited by manumycin A and PD 98059. However, SB 203580 partially inhibited IKK α/β activation. Taken together, these results suggest that bradykinin might activate I κ B- α and p65 phosphorylation and IKK α/β activation in human airway epithelial cell line. The signal of Ras/Raf/p44/42MAPK and p38 MAPK is upstream of bradykinin-induced IKK α/β 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 kinins¹。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 B₂ 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。

磷脂酶 A₂ (phospholipase A₂, PLA₂) 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 E₂ (PGE₂)，prostacyclin (PGI₂) 和 thromboxane A₂ (TxA₂)。目前已知磷脂酶 A₂ 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-2³。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-1 β , 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。

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 β , 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 PGE₂ 的釋放¹¹。另外在人類的纖維母細胞，可發現 PGE₂ 可增強 IL-1 β 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 COX-2 表現，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，來探究 bradykinin 引發 COX-2 表現的訊號傳遞路徑。

三、結果與討論

在第一年及第二年的研究中發現，在 A549 細胞中，bradykinin 可經由活化 p44/42 MAPK 及 p38 MAPK 的路徑引發 NF- κ B 的活化，最後導致 COX-2 的表現。Bradykinin 可經由活化 B₂ 受體來引發 p44/42 MAPK 及 p38 MAPK 活化。在第三年的研究中我們將更進一步探討 bradykinin 導致 COX-2 表現的路徑中，p44/42 MAPK 及 p38 MAPK 與 NF- κ B 之間的訊息傳遞路徑，以及其他引起 p44/42 MAPK 及 p38 MAPK 活化的訊息傳遞路徑。

1. Ras 及 Raf 包含在 bradykinin 刺激 COX-2 表現的訊號傳遞路徑

當預先以 Ras 抑制劑 manumycin A (0.3, 1 和 3 μ M) 及 Raf 抑制劑 GW 5074 (0.3, 1 和 3 μ M) 前處理 30 分鐘後，再加入

bradykinin (10^{-8} M) 作用 4 小時，發現 manunycin A 及 GW 5074 皆以劑量相關的方式抑制 COX-2 表現。由這些結果可得知 Ras 及 Raf 的活化是包含在 bradykinin 引發 COX-2 表現的訊息傳遞路徑。

2. Ras 及 Raf 包含在 bradykinin 刺激 p44/42 MAPK 活化的訊息傳遞路徑

進一步我們探討 Ras 及 Raf 是否參與調控 p44/42 和 p38 MAPK 的活化。當預先以 manunycin A ($3 \mu\text{M}$) 及 GW 5074 ($3 \mu\text{M}$) 前處理 30 分鐘後，再加入 bradykinin (10^{-8} M) 作用 5 分鐘，也可發現 manunycin A 及 GW 5074 可以抑制 bradykinin 引發之 p44/42 MAPK 的活化，但不影響 p38MAPK 的活性。由以上結果可以得知，bradykinin 可以經由經由 Ras 及 Raf 的訊息傳遞路徑來調控 p44/42 MAPK 的活化。

3. Bradykinin 引發 A549 細胞 I κ B α 及 p65 磷酸化

我們利用 anti-phospho-I κ B α 和 anti-phospho-p65 之抗體來進行 Western blot，以測定 I κ B α 和 p65 磷酸化的程度。當以 bradykinin (10^{-8} M) 刺激 A549 細胞 5, 10, 20, 30 和 60 分鐘後，發現 I κ B α 的磷酸化在 20 分鐘時達到最大量，30 分鐘後即逐漸減少，而 p65 的磷酸化，也再 10 分鐘時達到最大。由此可知，在 A549 細胞中，bradykinin 可以引發 I κ B α 及 p65 磷酸化。

4. Bradykinin 引發 IKK α/β 活化

接下來，我們也利用 anti-phospho-IKK α/β 之抗體來進行 Western blot，以測定 IKK α/β 磷酸化的程度，以及利用 immunoprecipitation 的方法，將受到活化的 IKK α/β 沉澱下來，再給予作為受質來進行反應，並利用 anti-phospho-I κ B α 之抗體來進行 Western blot，以測定 IKK α/β 的活性。當以 bradykinin (10^{-8} M) 刺激 A549 細胞 3, 5, 10, 20, 30 和 60 分鐘後，發現的 IKK α/β 磷酸化與活性增加分別在 5 和 10 分鐘時達到最大，之後隨著時間增加而逐漸減少。由此以上結果得知，

bradykinin 可引發 IKK α/β 活性增加。

5. Ras、p44/42 和 p38 MAPK 包含在 bradykinin 引發 IKK α/β 活化的訊息傳遞路徑

當預先以 manunycin A ($3 \mu\text{M}$) ($30 \mu\text{M}$) 及 SB 203580 ($1 \mu\text{M}$) 前處理 30 分鐘後，再加入 bradykinin (10^{-8} M) 刺激 3 和 5 分鐘後，發現 manunycin A 及 PD 98059 幾乎可以完全的抑制 IKK α/β 磷酸化與活性，SB 203580 則只有部分抑制。由以上的結果得知 bradykinin 引發 IKK α/β 的活化可能經由 Ras 及 p44/42 MAPK 的訊息傳遞路徑，而 p38 MAPK 可能只部分參與調控。

綜合以上的結果得知，在 A549 細胞中，bradykinin 經由活化 Ras/Raf/p44/42 MAPK 及 p38 MAPK 的路徑，來引發 IKK α/β 的活化，使 I κ B- α 磷酸化與分解而進一步活化 NF- κ B。除了 bradykinin 引發 I κ B- α 磷酸化之外，也會造成 p65 磷酸化。

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 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 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, pathology, 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.