RRPC89100545 (5 .P)

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

革蘭氏陽性菌細胞壁成分 lipoteichoic acid 引發上皮細胞環氧酵素-2 表現之訊息傳遞路徑探討(2/2)

Studies on the expression of cyclooxygenase-2 protein induced by lipoteichoic acid from gram-positive organisms in human airway epithelial cells (2/2)

計畫編號：NSC 89-2314-B-038-048

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：台北醫學院醫事技術學系

一、中文摘要

先前的研究成果已證實革蘭氏陽性菌細胞壁成分 lipoteichoic acid (LTA) 刺激人類肺臟上皮細胞 (A549) cyclooxygenase-2 (COX-2) 表現的訊號傳遞路徑是經由活化 PC-PLC 及 PC-PLD 的路徑引發 PKC 的活化，並進而引發 NF-κB 的活化，最後導致 COX-2 的表現及 PGE_2 的釋放。本計畫我們發現 adenylate cyclase 抑制劑 2,5-dideoxyadenosine (DDA) 及 PKA 抑制劑 KT-5720 和 H-8 可抑制 LTA 所引發之 COX 活性增加及 COX-2 表現。Tyrosine kinase 抑制劑 genistein 及 tyrphostin AG126 可抑制 LTA 所引發之 COX 活性增加及 COX-2 的表現。MEK 抑制劑 PD 98059 和 p38 MAPK 抑制劑 SB 203580 亦可抑制 LTA 刺激 COX-2 活性增加及 COX-2 的表現。LTA 以劑量及時間相關的方式引發 p44/42 MAPK 之活化，當加入 genistein、Ro 31-8220、SB 203580、PD 98059 或 KT-5720，發現 genistein 可部分抑制 LTA 所引發之 p44/42 MAPK 的活化，PD 98059 幾乎可完全的抑制 LTA 的作用，但 Ro 31-8220、SB 203580 及 KT-5720 這些抑制劑則皆不會影響 LTA 的作用，表示 LTA 所引發之 p44/42 MAPK 的活化可受到上游 tyrosine kinase 之調控，但並不會受到 PKC 、 PKA 及 p38 MAPK 的調控。LTA 也以劑量及時間相關的方式引發 p38 MAPK 活性的增加，當加入 Ro 31-8220 、genistein 、 PD 98059、 SB 203580 或 KT-5720，發現這些抑制劑，除了 PD 98059 不影響 LTA 所引發之 p38 MAPK 活性的增加，其他抑制劑則皆有抑制作用，表示 LTA 刺激 p38 MAPK 的活性增加可受到上游 PKC、tyrosine kinase 及 PKA 之調控，但並不會受到 MEK 的調控。由 Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) 的結果也發現 genistein、KT-5720、PD 98059 或 SB 203580 這些抑制劑對於 LTA 所刺激 NF-κB 活性的增加皆有抑制作用，表示 LTA 刺激 NF-κB 活性的增加可受到上游 tyrosine kinase、PKA、MEK 及 p38 MAPK 之調控。綜合以上的結果得知 LTA 可活化 p44/42MAPK 及 p38MAPK 進而引發 NF-κB 的活化，最後導致 COX-2 的表現及 PGE_2 的釋放。而 p44/42MAPK 及 p38MAPK 皆可受到上游 tyrosine kinase 的活化，另外 p38MAPK 可受到上游 PKC 及 PKA 的調控，但是 p44/42MAPK 則不受 PKC 及 PKA 的調控。

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

Abstract

Previously, we have reported that protein kinase C (PKC) and NF-κB are involved in the COX-2 expression stimulated by *Staphylococcus aureus* lipoteichoic acid (LTA) in human pulmonary epithelial cell line (A549). The role of p44/42 and p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) in the LTA-induced COX-2 expression was studied in the present research. The LTA-induced increases in COX activity and COX-2 expression were attenuated by the tyrosine kinase inhibitors (genistein and tyrphostin AG126), MEK inhibitor (PD 98059), or p38

MAPK inhibitor (SB 203580). The adenylate cyclase inhibitor (2', 5'-dideoxyadenosine), and PKA inhibitors (KT-5720 and H-8) also prevented the LTA-induced increases in COX activity and COX-2 expression. The LTA-induced p44/42 MAPK activation was inhibited by genistein or PD 98059, but not by the PKC inhibitor (Ro 31-8220), KT-5720, or SB 203580. On the other hands, the LTA-induced activation of p38 MAPK was inhibited by Ro 31-8220, genistein, KT-5720 or SB 203580, but not by PD 98059. Treatment of A549 cells with LTA stimulated NF-κB-specific DNA-protein complex formation in nuclear extracts; the effect was inhibited by genistein, KT-5720, PD 98059 or SB 203580. These results suggest that the activations of p44/42 and p38 MAPK by LTA resulted in the stimulation of NF-κB-specific DNA-protein binding and the subsequent COX-2 expression in A549 cells. Both events required the activation of an upstream protein tyrosine kinase. The activation of p38 MAPK was downstream signal of the LTA-mediated activation of PKC or PKA, whereas activation of p44/42 MAPK was mainly PKC- and PKA-independent.

Keywords: Lipoteichoic acid, Cyclooxygenase-2, p44/42 MAPK, p38 MAPK, A549 cells.

二、緣由與目的

環氧酵素 (cyclo-oxygenase, COX) 是身體內一個重要的酵素，其主要的作用是將花生四烯酸 (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)。目前已知環氧酵素具有兩種不同的同功酵素 (isoforms) 分別是 COX-1 及 COX-2[1]。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[2]。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[3,4]。呼吸道上皮細胞不僅扮演天然的障蔽，而且一般認為它在呼吸道的發炎反應扮演重要的調節角色，主要是藉由產生前列腺素、一氧化氮、cytokines 等介質以及增加吸附分子的表現[5]。

近年對於革蘭氏陰性菌所引起的敗血性休克已獲得廣泛的研究與證實，然而由革蘭氏陽性菌所引起的敗血性休克，據統計機率則已高達 1/2，但有關這方面的研究則仍有限[6]。相對於 LPS (革蘭氏陰性菌主要的毒性來源)，目前的研究結果發現位在革蘭氏陽性菌細胞壁表面的脂台口酸 (lipoteichoic acid, LTA)可能是革蘭氏陽性菌具有感染能力的主要結構[7]。脂台口酸 (LTA)，主要是由甘油(glycerol)和磷酸組合而成，是一些水溶性的三碳醣醇聚合物;一端結合在細胞膜的磷脂上，另一端則形成甘油-台口酸聚合體，穿過太聚醣層 (peptidoglycan layers)而成為細胞壁表層成份之一[8]。由於 LTA 帶有陰性電荷(磷酸基)，故可連結及調節陽離子之進出細胞；另外，LTA 也被視為革蘭氏陽性菌重要的表面抗原[8]。當寄主感染革蘭氏陽性菌後，LTA 會在細菌溶解時被釋放出來，進而作用在寄主細胞上。

近年來的研究發現，LTA 所引發的作用是經由與 CD14 結合的路徑來活化[9]。有報告指出 LTA 可刺激巨噬細胞及血管平滑肌細胞之 iNOS 表現，此作用被認為與革蘭氏陽性菌引發之敗血性休克有重大關聯[10]。另外在血管的實驗也證實 LTA 會降低一些血管收縮劑的收縮反應及在體內會引發低血壓的反應，這些結果均認為與 iNOS 的表現有關[10]。而 LTA 也會活化補體的系統及 arachidonic acid 的釋放。先前的研究成果已證實革蘭氏陽性菌細胞壁成分 lipoteichoic acid (LTA) 刺激人類肺臟上皮細胞 (A549) cyclooxygenase-2 (COX-2) 表現的訊號傳遞路徑是經由活化 PC-PLC 及 PC-PLD 的路徑引發 PKC 的活化，並進而引發 NF-κB 的活化，最後導致 COX-2

的表現及 PGE_2 的釋放。本計畫將探討 p44/42MAPK 及 p38MAPK 活化是否包含在 LTA 引發 NF-κB 活化及 COX-2 表現的訊號傳遞路徑。以及 p44/42MAPK 及 p38MAPK 活化是受到上游何種訊息傳遞的調控。

三、結果與討論

1. Adenylate cyclase 抑制劑及 PKA 抑制劑對 LTA 刺激 COX 活性增加及 COX-2 表現的影響

細胞內的訊號傳遞路徑除了 DAG-PKC 的活化路徑外，adenylate cyclase-cAMP-PKA 的路徑也相當重要。我們發現使用 adenylate cyclase 抑制劑 2,5-dideoxyadenosine（DDA, 300 μM 和 500 μM）可抑制 LTA 刺激 COX 活性的增加，DDA 於 500 μM 的濃度下可抑制 71.1%，由 Western blotting 的結果也發現 DDA（500 μM）可以抑制 LTA 所引發之 COX-2 表現。PKA 抑制劑 KT-5720 (3 μM) 及 H-8 （60 μM）皆可抑制 LTA 刺激 COX-2 活性增加，而 KT-5720 於 3 μM 的濃度下，可抑制 92.3%， H-8 於 60 μM 濃度下，可抑制 58.6%。由 Western blotting 的結果也發現 KT-5720（3 μM）及 H-8 (60 μM）可以抑制 LTA 所引發之 COX-2 的表現。因此 adenylate cyclase-cAMP-PKA 路徑的活化也包含在 LTA 引發 COX-2 表現的訊號傳遞路徑當中。

2. Tyrosine kinase 抑制劑對 LTA 刺激 COX 活性增加及 COX-2 表現的影響

將細胞以 tyrosine kinase 抑制劑 genistein (10 和 30 μM) 及 tyrphostin AG126 (10 和 30 μM)前處理 30 分鐘後，再加入 LTA （30μg/ml）作用 24 小時，發現 genistein 及 tyrphostin AG126 皆以劑量相關的方式抑制 LTA 刺激 COX 活性增加；而 genistein 於 30 μM 的濃度下，可抑制 83.2%， Tyrphostin AG126 於 30 μM 的濃度下，可抑制 49.8%。由 Western blot 的結果也發現 genistein（30 μM）及 tyrphostin AG126（30 μM）可抑制 LTA 所引發之 COX-2 表現。由此結果說明 tyrosine kinase 的活化的確包含在 LTA 刺激 COX-2 表現及活性增加之訊號傳遞路徑。

3. MEK 抑制劑及 p38 MAPK 抑制劑對 LTA 刺激 COX 活性增加及 COX-2 表現的影響

進一步我們想探討 MAPK family 是否包含在 LTA 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（10 和 30 μM）或 p38 MAPK 抑制劑 SB 203580（1 和 10 μM）前處理 30 分鐘後，再加入 LTA （30 μg/ml）刺激 24 小時，發現 PD 98059 及 SB 203580 皆可抑制 LTA 刺激 COX 活性增加的作用。而 PD 98059 於 30 μM 的濃度下，可抑制 95.2%，SB 203580 於 10 μM 的濃度下，可抑制 86.1%。由 Western blotting 的結果也發現 PD 98059（30 μM）及 SB 203580（10 μM）皆可抑制 LTA 所引發之 COX-2 表現。由這些結果可得知 MEK 及 p38 MAPK 的活化是包含在 LTA 引發 COX-2 表現的訊號傳遞路徑當中。

4. LTA 引發 p44/42 MAPK 之活化及 p38 MAPK 活性增加

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 LTA (1- 30 μg/ml) 刺激 A549 細胞 10 分鐘後，發現 p44/42 MAPK 的活化可依劑量相關的方式而遞增，於 30 μg/ml 的濃度時反應達到最大。以 LTA (30 μg/ml) 刺激 A549 細胞 10, 30, 60 和 120 分鐘後，發現 p44/42 MAPK 的活化在 10 分鐘時達最大反應，於 30 分鐘後即逐漸地減少。當預先以 genistein (30 μM)， Ro 31-8220 (1 μM)， SB 203580 (10 μM) ，PD 98059（30 μM）及 KT-5720 (3 μM)，前處理 30 分鐘後，再加入 LTA（30 μg/ml）刺激 10 分鐘，可發現 genistein 可部分抑制 LTA 所引發之 p44/42 MAPK 的活化，PD 98059 幾乎

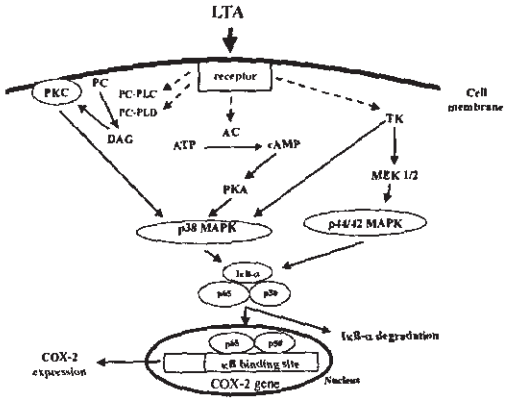
可完全的抑制 LTA 的作用，但 Ro 31-8220，SB 203580 及 KT-5720 這些抑制劑則皆不會影響 LTA 的作用。由此結果可知，LTA 所引發之 p44/42 MAPK 的活化可受到上游 tyrosine kinase 之調控，但並不會受到 PKC、PKA 及 p38 MAPK 的調控。

另外，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。當以不同濃度之 LTA (3-100 μg/ml) 刺激 A549 細胞 10 分鐘後，發現 p38 MAPK 的活性可依劑量相關的方式而遞增，且於 30 μg/ml 的濃度時達到最大。以 LTA (30 μg/ml)刺激 A549 細胞 5, 10 和 30 分鐘後，發現刺激 10 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 Ro 31-8220 (1 μM)，genistein (30 μM)， PD 98059 (30 μM)，SB 203580 (10 μM) 及 KT-5720 (3 μM)，前處理 30 分鐘後，再加入 LTA (30 μg/ml) 刺激 10 分鐘，可發現這些抑制劑，除了 PD 98059 不影響 LTA 所引發之 p38 MAPK 活性的增加，其他抑制劑則皆有抑制作用。由此結果可推測，LTA 所引發之 p38 MAPK 活性的增加可受到上游 PKC、tyrosine kinase 及 PKA 之調控，但並不會受到 MEK 的調控。

5. LTA 引發 NF-κB 的活化

先前已證實 NF-κB 的活化包含在 LTA 刺激 COX-2 表現的訊號傳遞路徑。另外由 EMSA 的結果也發現 LTA 可活化 NF-κB 和 DNA 之結合。進一步我們探討 tyrosine kinas、protein kinase A 和 MAP kinase 對 LTA 引發 NF-κB 活化之影響。將細胞前處理 genistein (30 μM)、KT-5720 (3 μM)、PD 98059 (30 μM)和 SB 203580 (10 μM) 30 分鐘，由 EMSA 的結果發現，這些抑制劑皆可抑制 LTA 刺激 NF-κB 的活化。由此結果可推測，LTA 所引發 NF-κB 的活化可受到上游 tyrosine kinase、protein kinase A、MEK 及 p38 MAPK 之調控。

六、綜合以上的結果以及去年計畫的研究成果我們提供一個 LTA 活化 A549 細胞 COX-2 表現之模式圖：



四、計畫成果自評

一、此計畫探討 LTA 引發人類呼吸道上皮細胞 COX-2 表現的訊息傳遞路徑。這些研究將為革蘭氏陽性菌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、本研究的結果已投稿於 British Journal of Pharmacology。題目為 Lipoteichoic acid-induced cyclooxygenase-2 expression in human pulmonary epithelial cells requires activations of p44/42 and p38 MAPK signal pathways

三、本研究計畫提供一位碩士班學生完成其碩士論文。題目為 LTA 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. Xie, W.L., Chipman, J.G., Robertson, D.L., Erikson, R.L. and Simmons, D.L. (1991) Expression of a mitogen-response gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 88, 2692-2696.
2. Mitchell, J.A., Larkin, S. and Williams,

T.J. (1995) Cyclooxygenase-2: regulation and revelance in inflammation. Biochem. Pharmacol. 50, 1535-1542.

3. 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.
4. 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.
5. Knight, D.A., Stewart, G.A. and Thompson, P.J. (1994) The respiratory epithelium and airway smooth muscle homeostasis. Clin. Exp. Allergy, 24, 698-706.
6. Bone, R.C. (1994) Gram-positive organisms and sepsis. *Arch Intern. Med.* 154, 26-34.
7. Ken, M.K., Sjef, D.K., Caroline, R., Simon, J.F. and Christoph, T. (1998) Mechanism of gram-positive shock: Identification of peptidoglycan and lipoteichoic acid moieties essential in the induction of nitric oxide synthase, shock, and multiple organ failure. *J. Exp. Med.* 188, 305-315.
8. Wicken, A.J. and Knox, K.W. (1975) Lipoteichoic acids: a new class of bacterial antigen. *Science* 187, 1161-1167.
9. Dziarski, R., Ulmer, A. and Gupta, D. (2000) Interaction of CD14 with components of gram-positive bateria. *Chem. Immuno.* 74, 83-107.
10. Hattor, Y., Kasai, K., Akimoto, K. and Thiemermann, C. (1997) Induction of NO synthesis by lipoteichoic acid from Staphylococcus aureus in J774 macrophages: involvement of a CD14-Dependent pathway. *Biochem. Biophy. Res. Com.* 233,375-379.