行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告 RRPC89020344 (5.P)

革蘭氏陽性菌細胞壁成分 lipoteichoic acid 引發呼吸道上皮細胞環氧酵素-2 表現之訊息傳遞路徑

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

計畫編號：NSC 89-2320-B-038-031

執行期限：88 年 8 月 1 日至 89 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

本論文主要在探討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 (COX) 活性增加及 COX-2 表現的訊號傳遞路徑。LTA 以濃度相關的方式刺激 prostaglandin E_2 (PGE_2)的釋放、COX 活性的增加及 COX-2 的表現。當以 LTA 處理不同的時間，在外加 arachidonic acd (30 μM; 30 min)的情況下，發現 LTA 以時間相關的方式引發 COX 活性增加和 COX-2 的表現。而 dexamethasone、蛋白轉錄抑制劑 actinomycin D 和蛋白轉譯抑制劑 cycloheximide 可抑制 LTA 所引發之 COX 活性增加及 COX-2 的表現，然而內毒素的抑制劑 polymyxin B 則不影響 LTA 所引發之反應。PC-PLC 抑制劑 D-609 和 phosphatidate phosphohydrolase 抑制劑 propranolol 可抑制 LTA 所引發之 COX 活性增加及 COX-2 表現，然而 PI-PLC 抑制劑 U-73122 則不影響 LTA 所引發之反應。Go 6976、Ro 31-8220 和 GF 109203X 三種 PKC 抑制劑顯著地抑制 LTA 所引發之 COX 活性增加及 COX-2 的表現。Ca^{2+} 的螯合劑 BAPTA 也抑制 LTA 所引發之 COX 活性增加及 COX-2 的表現。先前的報告已證實 A549 細胞存在有 PKC-α, -γ, -ι, -λ, -ζ, -μ 六種同功酵素。當以 LTA 刺激 A549 細胞發現在六種 PKC isoforms 中只有 PKC-α 和-γ 會從細胞質轉位到細胞核，這結果暗示 PKC-α 和 -γ 可能包含在 LTA 引發 COX-2 表現的訊號傳遞路徑。NF-κB 抑制劑 pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC) 可抑制 LTA 所引發之 COX 活性增加及 COX-2 的表現。以 LTA 刺激細胞 10 分鐘可使 p65 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，兩者反應皆在 60 分鐘後明顯地減少。Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) 的結果也發現 LTA 可使 NF-κB 的活性隨作用時間而增加，於 10 分鐘時達最大反應，但 60 分鐘後反應明顯地減少，當加入 D-609, U-73122, Go 6976、Ro 31-8220 或 PDTC，發現這些抑制劑，皆會抑制 LTA 刺激 NF-κB 活性的增加，表示 LTA 刺激 NF-κB 活性的增加可受到上游 PC-PLC、PC-PLD 及 PKC 的調控。綜合以上的結果得知，在 A549 細胞中，LTA 可經由活化 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。

關鍵詞：LTA、環氧酵素-2、上皮細胞

Abstract

The signal transduction pathway of lipoteichoic acid (LTA)-induced increase of cyclooxygenase (COX) activity and COX-2 expression was studied in human pulmonary epithelial cell line (A549). LTA caused a concentration-dependent increase in COX activity, PGE_2 accumulation, and COX-2 expression. The LTA-induced increase in COX activity was measured by the formation of PGE_2 in the presence of arachidonic acid (30 μM; 30 min). LTA also caused a time-dependent increase in the COX activity and COX-2 expression. Dexamethasone, actinomycin D, and cycloheximide inhibited

the LTA-induced increase in COX activity and COX-2 expression. Polymyxin B, an agent which binds and inactivates endotoxin, did not affect LTA-induced increase in COX activity and COX-2 expression. The phosphatidylcholine-phospholipase C inhibitor (D-609) and phosphatidate phosphohydrolase inhibitor (propranolol) prevented the LTA-induced increase in COX activity and COX-2 expression, while U-73122 (a phosphatidylinositol-phospholipase C inhibitor) had no effect. The PKC inhibitors (Go 6976, Ro 31-8220 and GF 109203X) and Ca^{2+} chelator (BAPTA) also attenuated the LTA-induced increase in COX activity and COX-2 expression. In our previous studies have demonstrated that A549 cells expressed PKC-α, -γ, -ι, -λ, -ζ and -μ. Treatment of A549 cells with LTA caused the translocation of PKC-α and -γ but not other isoforms from cytosol to the membrane fraction, indicating activation of the PKC-α and -γ isoforms. Moreover, the NF-κB inhibitor, pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC), attenuated the LTA-induced increase in COX activity and COX-2 expression. Treatment of A549 cells with LTA for 10 min resulted in the translocation of p65 NF-κB from cytosol to the nucleus as well as the degradation of Iκ-Bα in the cytosol. Treatment of A549 cells with LTA caused NF-κB activation by detecting the formation of NF-κB-specific DNA-protein complex in the nucleus; this effect was inhibited by dexamethasone, D-609, propranolol, Go 6976, Ro 31-8220, or PDTC. Taken together, these results suggest that LTA might activate PC-PLC and phosphatidylcholine-phospholipase D to induce PKC activation, which in turn initiates NF-κB activation, and finally induces COX-2 expression and PGE_2 release in human airway epithelial cell line.

Keywords: LTA, COX-2, epithelial 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。但 LTA 究竟經由何種訊息傳遞來誘導 COX-2 的表現，至今仍不十分清楚。因此本實驗我們將詳細探討 LTA 引發人類呼吸道上皮細胞環氧酵素-2 表現的訊息傳遞路徑。藉由較完整的實驗來瞭解 PI-Phospholipase C、PC-phospholipase C、protein kinase C 及 NF-κB 在 COX-2 表現所扮演的角色以及它們之間的相關性。

三、結果與討論

1. LTA 引發 A549 細胞之 PGE_2 生成及 COX-2 表現

在 A549 細胞，以不同濃度之 LTA (1- 100 μg/ml) 刺激 24 小時後，發現 LTA 以濃度相關的方式刺激 prostaglandin E_2 (PGE_2) 的釋放，於 30 μg/ml 的濃度時 PGE_2 的釋放達最大。當有外加 arachidonic acid (30 μM, 30 min)時，LTA (1- 100 μg/ml)刺激 PGE_2 的產生變得更為顯著，這表示 LTA 可刺激 cyclooxygenase (COX) 活性的增加，且於 30 μg/ml 時達到最大。當以 LTA (30 μg/ml) 處理不同的時間，在外加 arachidonic acd (30 μM, 30 min)的情況下，發現 LTA 以時間相關的方式引發 COX 活性的增加，且刺激 2 小時後即遞增，24 小時達最大反應，並可持續至 48 小時。而且 LTA 刺激 COX-2 的表現也隨劑量及時間相關的方式而遞增。當預先以 dexamethasone (0.1 μM)、蛋白轉錄抑制劑 actinomycin D (0.1 μM) 和蛋白轉譯抑制劑 cycloheximide (0.3 μM) 前處理 30 分鐘，再加入 LTA (30 μg/ml) 刺激 24 小時，發現 dexamethasone 、actinomycin D 及 cycloheximide 皆可顯著抑制 LTA 刺激 COX 活性增加的作用，而且 LTA 所引發之 COX-2 表現亦受到 dexamethasone 、 actinomycin D 和 cycloheximide 的抑制，這結果證實 LTA 刺激 COX-2 的表現，的確經由一個蛋白質的合成步驟。當預先以 lipopolysaccharide 的抑制劑 polymyxin B (0.5 μg/ml) 前處理 30 分鐘後，再加入 LTA (30 μg/ml) 刺激 24 小時，發現其並不影響 LTA 所引發之 COX 活性的增加及 COX-2 的表現。

2. D-609，U-73122 及 propranolol 對 LTA 刺激 COX 活性增加及 COX-2 表現的影響

為了瞭解何種 phospholipase 包含在 LTA 引發 COX-2 表現的訊號傳遞中，我們使用 D-609 (PC-PLC 抑制劑)，U-73122 (PI-PLC 抑制劑) 及 propranolol (phosphatidate phosphohydrolase 抑制劑) 來觀察其對於 LTA 所引發之 COX-2 表現及 COX 活性增加的影響。當以 D-609 (50 μM)，U-73122(10 μM)及 propranolol (100 μM)前處理 30 分鐘後，再加入 LTA (30 μg/ml)刺激 24 小時，發現 D-609 和 prapronolol 可抑制 LTA 所引發之 COX 活性的增加，其分別抑制 99.7% 和 68.2%，而 U-73122 則不影響 LTA 的作用。同樣地，LTA (30 μg/ml) 所引發之 COX-2 的表現，D-609 (50 μM) 及 propranolol (100 μM) 亦可抑制，而 U-73122 (10 μM) 則不影響 LTA 的作用。由此結果證明 LTA 引發 COX-2 表現之訊號傳遞路徑，可能是經由 PC-PLC 或 PLD 的路徑，而不是 PI-PLC 的路徑。

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

為了確定 PKC 在 LTA 刺激 COX-2 表現之反應中所扮演的角色，我們使用了三種 PKC 抑制劑，Go 6976 (0.3 和 1 μM)， Ro 31-8220 (0.3 和 1 μM)及 GF 109203X (3 和 10 μM)，將這些抑制劑前處理 30 分鐘，再加入 LTA (30 μg/ml) 刺激 24 小時，發現這些抑制劑均以濃度相關的方式抑制 LTA 所引發之 COX 活性的增加；而 Go 6976 於 1 μM 的濃度下，可

抑制 98.8%，Ro 31-8220 於 1 μM 的濃度下，可抑制 74.5%，GF 109203X 於 10 μM 的濃度下，可抑制 48.2%。Western blot 的結果也發現 Go 6976 (1 μM)，Ro 31-8220 (1 μM) 及 GF 109203X (10 μM) 皆可抑制 LTA 所引發之 COX-2 表現。而當我們使用 Ca^{2+} 的螯合劑 BAPTA (10 和 20 μM) 前處理 30 分鐘，再加入 LTA (30 μg/ml) 刺激 24 小時，發現 BAPTA 以濃度相關的方式抑制 LTA 所引發之 COX 活性的增加，於 20 μM 的濃度下，可抑制 75.1%，由 Western blot 的結果也發現 BAPTA (20 μM)可抑制 LTA 所引發之 COX-2 表現。由以上結果說明，PKC 的活化及 Ca^{2+}的確包含在 LTA 刺激 COX-2 表現之訊號傳遞路徑。

4. LTA 刺激 PKC isoform 的轉位

在先前我們實驗室的報告，已證實 A549 細胞中，共有 6 種 PKC isoforms 會表現，分別為 PKC-α, -γ, -ι, -λ, -ζ 和 -μ (Lin et al., 2000)。當以 LTA (30 μg/ml) 刺激 A549 細胞 30, 60 和 120 分鐘後，發現刺激 30 分鐘後，PKC-α 和 PKC-γ 皆可從細胞質轉位 (translocation) 到細胞膜上，於 120 分鐘時達最大反應，但 LTA 對 PKC-ι, -λ, -ζ, 和-μ 則沒有任何影響。由以上的結果推測 PKC-α 和 -γ 的活化可能包含在 LTA 所引發的訊號傳遞途徑當中。

5. NF-κB 抑制劑對 LTA 刺激 COX 活性增加及 COX-2 表現的影響

我們也使用 NF-κB 的抑制劑 PDTC (10 和 25 μM)來觀察其對於 LTA 刺激 COX 活性增加及 COX-2 表現的影響。我們發現 PDTC 以劑量相關的方式抑制 LTA 所刺激之 COX 活性增加。由 Western blot 的結果也發現 PDTC (25 μM) 的確可以減少 LTA 所引發之 COX-2 表現。由此結果可看出 NF-κB 的活化的確包含在 LTA 刺激 COX 活性增加及 COX-2 表現的訊號傳遞路徑。

6. LTA 引發 p65 NF-κB 轉位及 IκB-α分解的作用

我們以 anti-p65 NF-κB 之抗體來測定 LTA 引發 NF-κB 由細胞質轉位到細胞核的情形，以及 anti-IκB-α 之抗體來測定細胞質 IκB-α 分解的情形，來代表 NF-κB 是否有被活化。以 LTA (30 μg/ml) 刺激 A549 細胞 10, 30, 60 和 120 分鐘後，發現刺激 10 分鐘後， p65 NF-κB 即可從細胞質轉位到細胞核，而在 30 分鐘後 p65 NF-κB 在細胞質減少的部分，即已逐漸恢復。另外也發現刺激 10 分鐘後，細胞質中之 IκB-α 的量即可明顯地減少，但在 60 分鐘後則幾乎完全回復。

Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)是利用 NF-κB 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 DIG 一酵素標示後和細胞的 nuclear extract 反應，利用凝膠電泳分離結合與未結合的探針，再用 CDP chemiluminescent reagent 作用後，依壓片結果來判斷 NF-κB 被活化的情形。由 EMSA 的實驗，也觀察到 NF-κB 於 LTA (30 μg/ml) 刺激 10 分鐘後即被活化，持續至 30 分鐘，但 60 分鐘後反應明顯地減少。將細胞前處理 D-609 (50 μM)、U-73122 (30 μM)、Go 6976 (1 μM)、Ro 31-8220 (1 μM)及 PDTC (25 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 活化的作用。由此結果可推測，LTA 所引發 NF-κB 的活化可受到上游 PI-PLC, PC-PLC 及 PKC 之調控。

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。這些研究將為新型抗發炎的藥物的開發提供一個新的方向。

二、本研究的結果已投稿於 Molecule Pharmacology。題目為 Induction of cyclooxygenase-2 protein in human airway epithelial cells by lipoteichoic

acid derived from *Staphylococcus aureus*: Involvement of the protein kinase C- and nuclear factor-κB-dependent mechanisms.

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.