RRPC88030073 (5 .P)

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

內毒素引發呼吸道上皮細胞環氧酵素-2 表現之訊息傳遞路徑

Analysis of the signal transduction in the induction of cyclo-oxygenase-2 by lipopolysaccharide in human airway epithelial cells

計畫編號：NSC 87-2314-B-038-131
執行期限：87 年 8 月 1 日至 88 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

Lipopolysaccharide 可引發人類肺臟上皮細胞（A549）釋放 IL-1β或 TNF-α等細胞激素。本研究主要探討 IL-1β引發人類肺臟上皮細胞 COX-2 表現及 PGE_2 釋放的訊息傳遞路徑。IL-1β以劑量及時間相關的方式刺激 COX-2 表現及 PGE_2 釋放。Tyrosine kinase 抑制(genistein 及 tyrphostin AG126)和 PC-PLC 抑制劑 (D-609)可抑制 IL-1β引發 COX-2 表現及 PGE_2 釋放；而 PI-PLC 抑制劑 U73122 和 phosphatidate phosphoydrolase 抑制劑 propranolol 則不影響 IL-1β 所引發之反應。兩種 PKC 抑制劑(Ro 31-8220 和 Go 6976) 也抑制 IL-1β引發之 COX-2 表現及 PGE_2 釋放。由 Western bloting 之分析發現 A549 細胞存在有 PKC-α, -γ, -ι, -λ, -μ 和-ζ 六種 isoforms。以 IL-1β刺激 A549 細胞發現在六種 isoforms 中只有 PKC-γ會從細胞質轉位到細胞核。而 genistein 及 D-609 可抑制 IL-1β 所引發之 PKC-γ轉位，但 U-73122 則不影響 IL-1β 所引發之反應。

Ras 活化的抑制劑(FPT inhibitor II)、MEK 抑制劑 (PD 98059)和 p38 MAPK 抑制劑 (SB 203580)可抑制 IL-1β所引發之 COX-2 表現及 PGE_2 釋放；但 PI-3 kinase 抑制劑 wortmannin 則不影響 IL-1β 所引發之反應。以 IL-1β刺激 A549 細胞可引發 p44/42 及 p38 MAPK 的活化，加入 genistein, Go 6976, Ro 31-8220, FPT inhibitor II, PD 98059 及 SB 203580，發現除 FPT inhibitor II 及 PD 98059 可抑制 p44/42 MAPK 的活化外，其餘的抑制劑均不會抑制 p44/42 MAPK 的活化。另外，Go 6976 及 FPT inhibitor II 亦不會抑制 p38 MAPK 的活化。

NF-κB 抑制劑 PDTC 可抑制 IL-1β 所引發之 COX-2 表現及 PGE_2 釋放。而 IL-1β可刺激 p65 NF-κB 從細胞質轉位到細胞核，及造成 IκB-α的分解。加入 genistein, Go 6976, FPT inhibitor II, PD 98059, SB 203580 和 PDTC 發現其均可抑制 p65 NF-κB 的轉位。因此在 A549 細胞中，IL-1β刺激 COX-2 表現及 PGE_2 生成的訊號傳遞路徑至少有三條路徑，可分為：(一) IL-1β作用於細胞膜上的受體，而活化 tyrosine kinase，使得 PC-PLC 活化而產生 DAG，DAG 再促使 PKC-γ活化，再進一步活化 NF-κB，最後引發 COX-2 表現及 PGE_2 的生成。(二)IL-1β作用於細胞膜上的受體，而活化 Ras，使得 p44/42 MAPK 活化，再進一步活化 NF-κB，最後引發 COX-2 表現及 PGE_2 的生成。(三)IL-1β作用於細胞膜上的受體，經由未知的機制活化 p38 MAPK，再進一步活化 NF-κB，最後引發 COX-2 表現及 PGE_2 的生成。

關鍵詞：IL-1β、環氧酵素-2、上皮細胞

Abstract

The signal transduction pathway of IL-1β-induced cyclooxygenase-2 (COX-2) expression and prostaglandin E_2 (PGE_2) release was studied in human pulmonary epithelial cell line (A549). IL-1β caused a concentration- and time-dependent increase in PGE_2 formation and COX-2 expression. The tyrosine kinase inhibitors (genistein and tyrphostin AG126) and phosphatidylcholine-phospholipase C (PC-PLC) inhibitor (D-609) prevented IL-1β-induced PGE_2 release and

COX-2 expression, while U-73122 (a phosphatidylinositol-phospholipase C inhibitor) and propranolol (a phosphatidate phosphohydrolase inhibitor) had no effect. The PKC inhibitors (Go 6976 and Ro 31-8220) also attenuated IL-1β-induced PGE_2 release and COX-2 expression. Western blot analysis using PKC isoenzyme-specific antibodies indicated that A549 cells expressed PKC-α, -γ, -ι, -λ, -ζ, and -μ. Treatment of A549 cells with IL-1β caused the translocation of PKC-γ but not other isoforms from cytosol to the membrane fraction, indicating activation of the PKC-γ isoform. Moreover, the IL-1β-induced PKC-γ translocation was inhibited by genistein or D-609, but not by U-73122.

The IL-1β-mediated PGE_2 release and COX-2 expression were also inhibited by FPT inhibitor II, MEK inhibitor (PD 98059) and p38 MAPK inhibitor (SB 203580) but not by wortmanin (a PI-3 kinase inhibitor). Treatment of A549 cells with IL-1β caused the activation of both p44/42 and p38 MAPK. Moreover, the IL-1β-induced p44/42 MAPK activation was inhibited by FPT inhibitor II or PD 98059, but not by genistein, Go 6976, or SB 203580. The IL-1β-induced p38 MAPK activation was not affected by FPT inhibitor or Go 6976.

The NF-κB inhibitor, pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC), attenuated IL-1β-induced PGE_2 release and COX-2 expression. IL-1β caused the translocation of p65 NF-κB from cytosol to the nucleus as well as the degradation of IκB-α in cytosol. Furthermore, the translocation of p65 NF-κB was inhibited by genistein, Go 6976, FPT inhibitor II, PD 98059, SB 203580 or PDTC.

These data indicate that in pulmonary epithelial cells, IL-1β has at least four distinct signaling pathways in regulating COX-2 expression and PGE_2 release. First, IL-1β may activate PC-PLC through an upstream tyrosine phosphorylation to elicite PKC-γ activation, which in turn initiates NF-κB activation, and finally induces COX-2 expression and PGE_2 release. Second, IL-1β may activate Ras to elicite p44/42 MAPK activation, which in turn initiates NF-κB activation, and finally induces COX-2 expression and PGE_2 release. Third, IL-1β may activate p38 MAPK through an unknown pathway to initiate NF-κB activation, and finally induces COX-2 expression and PGE_2 release.

Keywords: IL-1β, 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]。

在許多不同細胞如巨噬細胞及呼吸道上皮細胞，LPS 和其它的 cytokines 如 IL-1β 及 TNF-α 均會導致 COX-2 的表現，而造成前列腺素的產生[3,8]。但 LPS 或 cytokines 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。近年來的研究發現，LPS 和其它的 cytokines 如 IL-1β 及 TNF-α 引發細胞內訊息的傳遞相當的複雜，可能有以下的路徑包括 tyrosine kinase，phospholipase C, D，PKC，Ras-Raf-MAPK， transcription factor 等路徑。因此本實驗我們將詳細探討 IL-1β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 tyrosine kinase、PI-Phospholipase C、PC-phospholipase C、PI 3-kinase、protein kinase C、MAP kinase 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. IL-1β 引發 A549 細胞之 PGE_2 生成及 COX-2 表現

以不同濃度的 IL-1β (0.001-10 ng/ml) 刺激 A549 細胞 24 小時後，發現 IL-1β 以濃度相關的方式刺激 PGE_2 的生成，於 10 ng/ml 的濃度下時 PGE_2 的生成達到最大。同樣可發現 IL-1β (0.01-10 ng/ml) 以濃度相關的方式刺激 COX-2 的表現。IL-1β (1 ng/ml) 也以時間相關的方式刺激 PGE_2 的生成，於 24 小時達最大反應，可持續至 48 小時。IL-1β (1 ng/ml) 亦以時間相關的方式刺激 COX-2 的表現，於 6 小時後開始有表現，於 24 小時達最大反應。

2. Tyrosine kinase 抑制劑對 IL-1β 引發 PGE_2 生成及 COX-2 表現的影響

為了探討 IL-1β 所引發的 COX-2 表現是否包含 tyrosine kinase 的活化，我們使用 tyrosine kinase 抑制劑 genistein 及 tyrphostin AG126 觀察其對於 IL-1β 所引發之 PGE_2 生成及 COX-2 表現的影響。我們發現 genistein 以劑量相關的方式抑制 IL-1β 所引發的 PGE_2 生成，於 30 μM 濃度下可以抑制 48.5%。而 tyrphostin AG126 僅在 30 μM 的濃度下，才能有意義地抑制 IL-1β 所引發之 PGE_2 生成(抑制 36.7%。由 Western blotting 的結果也發現 genistein (30 μM) 及 tyrphostin AG126 (30 μM) 皆可抑制 IL-1β 所導致之 COX-2 表現。

3. D-609，U-73122 及 propranolol 對 IL-1β 所引發之 PGE_2 生成及 COX-2 表現的影響

當預先以 D609 (50 μM)，U73122 (10 μM) 及 propranolol (100 μM) 處理 A549 細胞 30 分鐘後，再加入 IL-1β (1 ng/ml) 刺激 24 小時，發現僅有 D-609 可抑制 IL-1β 所引發之 PGE_2 生成 (抑制 68.7%)及 COX-2 表現，而 U-73122 及 propranolol 則沒有任何的抑制作用。

4. Protein kinase C 抑制劑對 IL-1β 所引發之 PGE_2 生成及 COX-2 表現的影響

我們使用了兩種 PKC 抑制劑，Ro 31-8220 及 Go 6976 來觀察其對於 IL-1β 所引發之 PGE_2 生成及 COX-2 表現的影響。當預先以 Go 6976 (3-20 μM) 及 Ro 31-8220 (3-20 μM) 處理 A549 細胞 30 分鐘後，再加入 IL-1β(1 ng/ml)刺激 24 小時，發現 Go 6976 及 Ro 31-8220 皆可抑制 IL-1β 所引發之 PGE_2 生成 (抑制 60.1% 及 54.5%)。由 Western blotting 的結果可發現 Ro 31-8220 (20 μM) 及 Go 6976 (20 μM) 皆可抑制 IL-1β 所引發之 COX-2 表現。

5. IL-1β 刺激 PKC isoforms 的轉位

進一步我們想瞭解 IL-1β 所引發之 COX-2 表現是經由那幾種 PKC isoforms 來調控。由 Western blotting 的實驗發現共有 6 種 PKC isoforms 會表現在 A549 細胞中，分別為 PKC-α, -γ, -ι, -λ, -ζ 和 -μ。以 IL-1β 刺激 A549 細胞，發現刺激 10 分鐘後 PKC-γ 即可從細胞質轉位 到細胞膜上，於 60 分鐘時有更大的反應，但 IL-1β 對 PKC-α, -ι, -λ, -ζ, 和-μ 則沒有作用。

6. Genistein，D-609，U-73122 對於 IL-1β 所引發 PKC-γ 轉位之影響

進一步我們想探討 IL-1β 引發 PKC-γ 活化的訊號傳遞途徑，預先以 genistein (30 μM)，D-609 (50 μM) 及 U-73122 (10 μM) 處理 A549 細胞 30 分鐘後，再加入 IL-1β (1 ng/ml) 刺激 30 分鐘，

可發現 genistein 及 D-609 可抑制 IL-1β 所引發之 PKC-γ 轉位，而 U-73122 則不影響 IL-1β 的作用。

7. MEK 抑制劑及 p38 MAPK 抑制劑對 IL-1β 所引發之 PGE_2 生成及 COX-2 表現的影響

預先以 MEK 的抑制劑 PD 98059(30 和 50 μM) 或 p38 MAPK 抑制劑 SB 203580(10 和 30 μM)處理 A549 細胞 30 分鐘後，再加入 IL-1β (1 ng/ml) 刺激 24 小時，發現 PD 98059 及 SB 203580 皆可抑制 IL-1β 所引發之 PGE_2 生成。而 PD 98059 於 50 μM 的濃度下可抑制 77.6%，SB 203580 於 30 μM 的濃度下，可抑制 81.9 %。由 Western blotting 的結果也發現 PD 98059 (50 μM) 及 SB 203580 (30 μM) 可抑制 IL-1β 所引發之 COX-2 表現。

8. IL-1β 引發 p44/42 MAPK 及 p38 MAPK 之活化

以 IL-1β 刺激 A549 細胞，發現刺激 10 分鐘後 p44/42 MAPK 及 p38 MAPK 的活化皆會增加，且同樣於 30 分鐘時達最大反應，於 60 分鐘後即顯著地減少 (Fig. 13)。當預先以 genistein (30 μM)，Go-6976 (20 μM)，Ro 31-8220 (20 μM)，KT-5720 (3 μM)，FPT inhibitor II (30 μM)，PD 98059 (50 μM) 及 SB 203580 (30 μM) 分別與 A549 細胞處理 30 分鐘後，可發現 FPT inhibitor II 可部分抑制 IL-1β 所引發之 p44/42 MAPK 的活化，PD 98059 則有明顯的抑制作用，但 genistein，Go-6976 及 SB 203580 則皆不會影響 IL-1β 所引發之反應。另外也發現 Go-6976 , FPT inhibitor II, PD98059 並不影響 IL-1β 所引發之 p38 MAPK 的活化。

9.NF-κB 抑制劑對 IL-1β 所引發之 PGE_2 生成及 COX-2 表現的影響

NF-κB 的抑制劑 PDTC 以劑量相關的方式抑制 IL-1β 所引發的 PGE_2 生成 (抑制 86.8%) 及 COX-2 表現。以 IL-1β 刺激 A549 細胞，發現刺激 10 分鐘後 p65 NF-κB 即可從細胞質轉位到細胞核，於 30 分鐘的反應達到最大，而在 1 小時後 p65 NF-κB 的轉位即逐漸地減少。另外也發現在 IL-1β 刺激 A549 細胞 10 分鐘後，細胞質中之 IκB-α 幾乎完全分解，且可持續到 30 分鐘，但在 1 小時後即幾乎完全回復。而我們也發現 genistein (30 μM)，Go 6976 (20 μM)， PD 98059 (50 μM)，SB 203580 (30 μM) 和 PDTC (50 μM) 這些抑制劑均可部分抑制 IL-1β 所引發之 NF-κB 的活化。

四、計畫成果自評

一、此計畫已詳細探討 IL-1β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、本研究部分的結果已被 **Molecule Pharmacology(SCI, IF:5.4)**接受。題目為 Involvment of protein kinase C- in IL-1β-induced COX-2 expressionin in human pulmonary epithelial cells.

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 IL-1β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. Churchill, L., Chilton, F.H., Resau, J. H., Bascow, R. and Hubbard, W. C. (1989) Cyclooxygenase metabolism of endogeneous arachidonic acid by cultured human tracheal smooth muscle cells. Am. Rev. Respir. Dis. 140, 449-459.
7. Phipps. R.P., Stein, S.H. and Roper, R.P. (1991) A new view of prostaglandin E regulation of the immune response. Immunol. Today 12, 349-352.
8. Newton, R., Kuitert, L.M., Slater, D.M., Adcock, I.M. and Barnes, P.J. (1996) Cytokines induction of cytosolic phospholipase A_2 and cyclooxygenase-2 mRNA is supressed by glucocorticoids in human epithelial cells. Life Sci. 60, 67-77.