ƒ ‹ F | Œfia‹ ˙'e›ß• |–M^D‹ ª¤s›p e ƒ¤"G‡ł§i

YC–1 »⁄ RAW 264.7 ¥¤ ‰† ›Mfl ‰Ł⁄ , ⁄§ ¤ –• Q

›p e^ §¡G §O«‹ ›p e

›p e‰ ‚s„¡GNSC93–2320–B–038–038–

ıƒ • ¶¡¡G93 ƒ~08 ⁄°01 ⁄ Ø 94 ƒ~07 ⁄°31 ⁄Ø

ıƒ ‡ ƒ ¡G» O ¥´ ˙⁄j ˙, › ˙‹

›p e¥ D ø⁄¦HG‡ fl "⁄s

ƒ ¶P¥ D ø⁄¦HG§ ı "¿o

‡ł§i^ «‹¡G" °†‡ł§i

‡ B † zŁ¡fG¡¥»›p e¥ i ⁄ ‰ ¶‹ d,

⁄⁄ ¥` Œ 94 ƒ~10 ⁄°28 ⁄Ø

九十三年度國科會計畫 (NSC 93-2320-B-038-038) 結案報告

題目：YC-1 誘導 RAW 264.7 巨噬細胞脂質分解之機制探討

前言：

早期動脈硬化的其中一項主要特徵是堆積脂肪的巨噬細胞 [泡沫細胞 (foam cells)] 在內皮層 (intima) 形成脂肪斑 (fatty streak)。是故，探討泡沫細胞的形成對了解動脈硬化的過程有一定程度的幫助。

YC-1 可經由活化 soluble guanylate cyclase (sGC) 而造成 cGMP 的形成增加 (Ko et al., 1994)。在大鼠的頸動脈中，YC-1 可經由刺激 cGMP 的生成而抑制 balloon injury 所誘導的內皮層增生 (Tulis et al., 2000)，而這種增生則部分導因於巨噬泡沫細胞的形成，且最終會造成動脈硬化 (Ross 1993 & 1999)。另一部分的研究則指出 iNOS 出現在泡沫細胞，故 NO 在泡沫細胞的形成過程扮演一定的角色 (Yang et al., 1994)。另外，在脂肪細胞中，由 cAMP 所誘導的脂質分解亦須內源性的 NO 參與其中 (Gaudiot et al., 2000)。最後，YC-1 又可以在不影響 cGMP 濃度的狀況下刺激內皮細胞的 NO 生成 (Wohlfart et al., 1999)。

由以上的結果我預期 YC-1 應該可以促進巨噬泡沫細胞的脂質分解，至於這種作用是否透過 cGMP 或 NO 而達成亦會在本報告中加以呈現。

結果：

首先以 60 μM YC-1 處理 RAW 264.7 巨噬細胞一段時間，之後再收集細胞外液分析其中的脂肪酸含量以代表細胞有無進行脂質分解。結果顯示，YC-1 可透過 time-dependent 的方式誘導細胞進行脂質的分解 (圖 1)。利用 Nile red 染色法可見到經過 60 μM YC-1 處理 6 小時後的細胞之細胞質內已無脂肪滴 (圖 2)。對 YC-1 誘導脂質分解的機制研究結果顯示，YC-1 在處理巨噬細胞 10 分鐘

後並不會造成 cGMP 產量的上升 (圖 3)，即便合併 60 μM YC-1 和 30μM SNP (後者爲一種 sGC 的活化劑) 的作用亦不會導致 cGMP 的顯著增加 (圖 3)。以 120 μM ODQ 抑制 sGC 的活性無法壓抑 YC-1 所誘導的脂質分解 (圖 4)。進一步支持 YC-1 透過和 cGMP 無關的路線刺激脂質分解的證據來自不論是以 30 μM BAY (一種 sGC 的活化劑) 或是用 1 mM dbcGMP 處理細胞皆不會造成脂質分解的增加 (圖 4)。最後，爲了檢視 NO 是否參與脂質分解的過程，以 YC-1 和泡沫巨噬細胞細胞作用 6 小時後測定 NO 的含量。結果發現，YC-1 並不會促進 NO 含量的增加 (圖 5)。綜合以上的結果，本計劃的結論是 YC-1 會透過和 cGMP 及 NO 皆無關的路線而刺激 RAW 264.7 泡沫巨噬細胞的脂質分解。

討論：

雖然較早發現 YC-1 抑制血小板聚集 (Ko et al., 1994) 及平滑肌收縮 (Yu et al., 1995; Mulsch et al., 1997) 的作用是透過活化 sGC 而增加 cGMP 的濃度，但後來在許多細胞的研究卻發現 YC-1 的作用會經由另一條和 cGMP 無關的路線。舉例來說，YC-1 抑制嗜中性球的功能和 cGMP 無關，反而是經由和 cAMP 有關的方式達成 (Hwang et al., 2003)。另外，cGMP 亦不參與 YC-1 在肺部的巨噬細胞中促進 TNF-α表現的過程—雖然其眞正的機制並不清楚 (Hwang et al., 2003)。以上的結果皆證實 YC-1 的作用並非只透過活化 sGC 而造成 cGMP 的增加。本計劃之結果亦支持這樣的現象。此外，由於 YC-1 在 RAW 264.7 巨噬細胞中會抑制 lipoteichoic acid 所誘導的 iNOS 表現 (Hsiao et al., 2004)，且 NO 和脂肪細胞的脂質分解亦有密切的關係 (Gaudiot et al., 2000)，故本研究亦一併探討 YC-1 和 NO 之間的關係。但我的結果卻顯示 YC-1 在促進脂質分解時並不會造成 NO 產量的增加。事實上，個人之前的研究數據亦證實 NO 並不參與泡沫巨噬細胞的脂質分解過程 (尚未發表)。

本研究最早發現 YC-1 會刺激泡沫細胞的脂質分解，這對了解動脈硬化過程中泡沫細胞所扮演的角色有了初步的認識與幫助。雖然如此，但 YC-1 的眞正作用

機制仍需進一步的研究。個人 94 年度所通過的計畫 (NSC 94-2320-B-038 -020) 即在探討 YC-1 是否透過鈣離子而造成脂質分解，並已獲致初步的成果。

參考文獻

Gaudiot N, Ribière C, Jaubert AM, and Giudicelli Y. (2000). Endogenous nitric oxide is implicated in the regulation of lipolysis through antioxidant-related effect. *Am J. Physiol. Cell. Physiol.* 279: C1603-C1610.

Hsiao G, Huang HY, Fong TH, Shen MY, Lin Ch, Teng CM, and Sheu JR. (2004). Inhibitory mechanisms of YC-1 and PMC in the induction of iNOS expression by lipoteichoic acid in RAW 264.7 macrophages. *Biochem. Pharmacol.* 67: 1411-1419.

Hwang TL, Hung HW, Kao SH, Teng CM, Wu, CC, and Cheng SJS. (2003). Soluble guanylyl cyclase activator YC-1 inhibits human neutrophil functions through a cGMP-independent but cAMP-dependent pathway. *Mol. Pharmacol.* 64: 1419-1427.

Hwang TL, Wu CC, Guh JH, and Teng, CM. (2003). Potentiation of tumor necrosis factor-α expression by YC-1 in alveolar macrophages through a cyclic GMP-independent pathway. *Biochem. Pharmacol.* 66: 149-156.

Ko FN, Wu CC, Kuo SC, Lee FY, and Teng CM. (1994). YC-1, a novel activator of platelet guanylate cyclase. *Blood.* 84: 4226-4233.

Mülsch A, Bauersachs J, Schäfer A, Stasch JP, Kast, R, and Busse R. (1997). Effect of YC-1, an NO-independent, superoxide-sensitive stimulator of soluble guanylyl cyclase, on smooth muscle responsiveness to nitrovasodilators. *Br. J. Pharmacol. 120: 681-689.*

Ross R. (1993). The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s, *Nature* 362: 801-809.

Ross R. (1999). Atherosclerosis—an inflammatory disease. *New Engl.J. Med.* 340: 115- 126.

Tulis DA, durante W, Peyton KJ, Chapman GB, Evans AJ, and Schafer AI. (2000). YC-1, a benyl indazole derivative, stimulates vascular cGMP and inhibits neointima formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 279: 646-652.

Wohlfart P, Malinski T, Ruetten H, Schindler U, Linz W, Schoenafinger K, STRObel H, and Wiemer G. (1999). Release of nitric oxide from endothelial cells stimulated by YC-1, an activator of soluble guanylyl

cyclase. *Br. J. Pharmacol.* 128: 1316-1322.
Yang X, Cai B, Sciacca RR, and Cannon PJ. (1994). Inhibition of inducible nitric oxide synthase in macrophages by oxidized low-density lipoproteins. *Circ. Res.* 74: 318-328.
Yu SM, Cheng ZJ, Guh JH, Lee, FY, and Kuo SC (1995). Mechanism of anti-proliferation caused by YC-1, an indazole derivative, in cultured rat A10 vascular smooth-muscle cells. *Biochem. J.* 306: 787-792.

圖片

圖 1. YC-1 透過 time-dependent 的方式促進脂質分解。

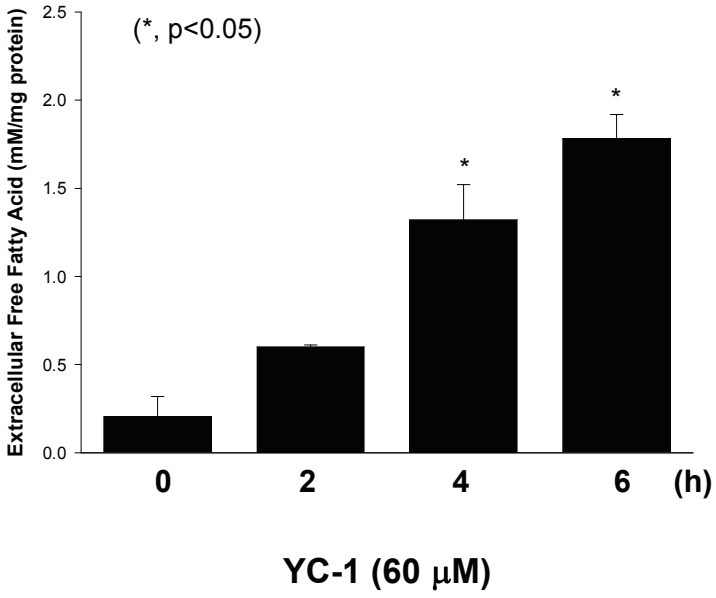

圖 2. YC-1 處理泡沫細胞 6 小時後以 Nile red 染色的結果。YC-1 處理後的細胞內已無脂肪滴。

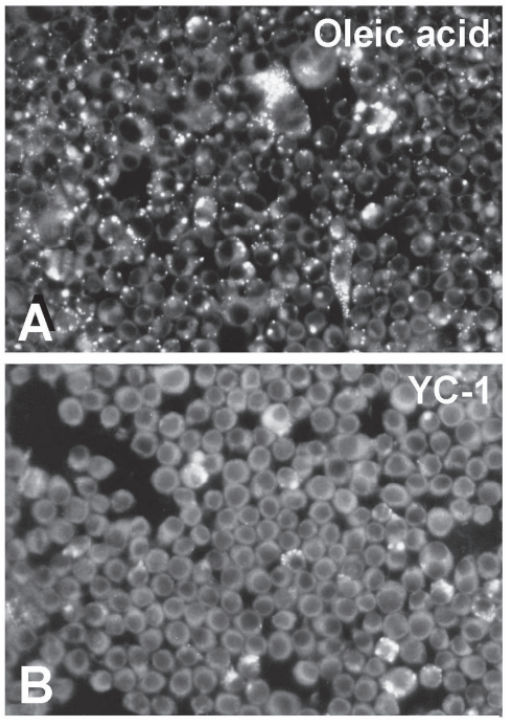

圖 3. sGC 的活化劑 (BAY) 和抑制劑 (ODQ) 並不影響 YC-1 促進脂質分解的作用。

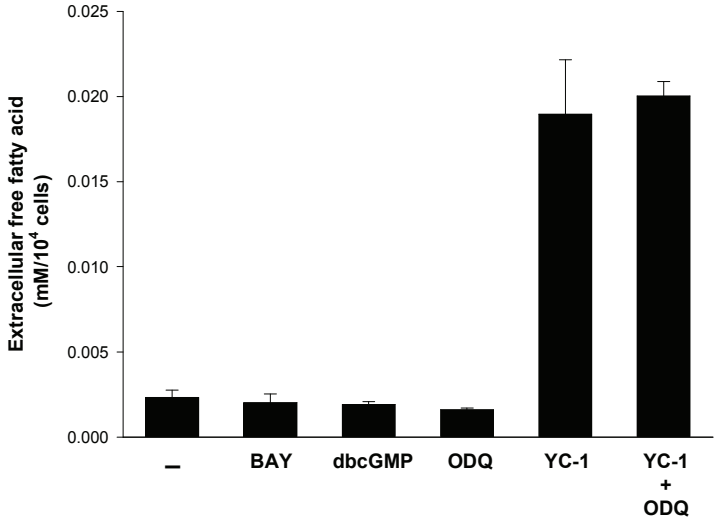

圖 4. YC-1 單獨或合併 SNP 的作用皆不會引起 cGMP 濃度的增加。

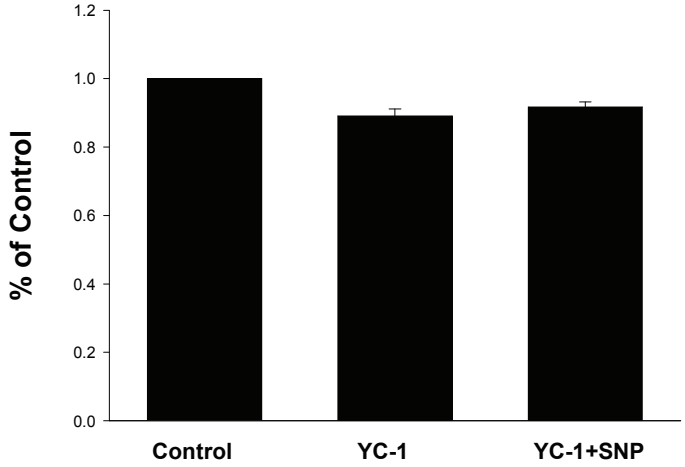
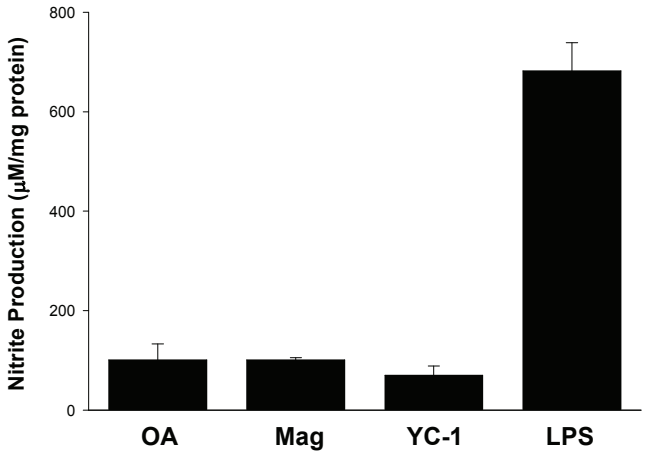
圖 5. 以 YC-1 處理細胞並不會造成 NO 產量的增加。