ƒ ‹ F | Œfia‹ ˙'e›ß• |–M^D‹ ª¤s›p e ·`⁄⁄¶i« ‡ł§i

⁄l›p e⁄G:ASK1 ƒbfiæ⁄˘"A§C–K« fl ‡J¥ »⁄ ,£⁄"¥ † ›M¥\fl

‡ ¥¢⁄ ¸ƒ"⁄ `' §Œ"t`"¤⁄ƒ (1/3)

›p e^ §¡G ª ¥«»p e

›p e‰ ¸s„¡GNSC93–2745–B–038–003–URD

ıƒ ·`¶¡¡G93 ƒ~08 ⁄°01 ⁄ ø 94 ƒ~07 ⁄°31 ⁄Ø

ıƒ ‡ ƒ ¡G» O ¥´ ˙⁄j ˙' I § ¶v ł¤t

›p e¥ D ø⁄¡HG‡ fl ←–`

ƒ ¶P¥ D ø⁄¡HG‡ \ › « , q A"L« •

›p e »P⁄H›ß¡G„ ø ·@

‡ł§i^ «‹¡G" °†‡ł§i

‡ B † zŁ¡fG¡¥»›p e¥ i ⁄ ‰ ¶‹ d,

⁄⁄ ¥` Œ 94 ƒ~5 ⁄°23 ⁄Ø

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫 ■ 期中進度報告

（計畫名稱）

提昇私校研發能量專案計畫-探討氧化態低密度脂蛋白在中風過程所扮演的病理角色-子計畫二:ASK1在氧化態低密度脂蛋白誘導腦內皮細胞功能喪失及死亡所扮演的角色(1/3)

計畫類別：□ 個別型計畫　　■ 整合型計畫
計畫編號：**93-2745-B-038-003-URD**
執行期間：93 年 08 月 01 日至 94 年 07 月 31 日

計畫主持人：陳炳常

共同主持人：林建煌、許重義

計畫參與人員：廖翊婷

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)：■精簡報告　□完整報告

本成果報告包括以下應繳交之附件：
□赴國外出差或研習心得報告一份
□赴大陸地區出差或研習心得報告一份
□出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份
□國際合作研究計畫國外研究報告書一份

處理方式：除產學合作研究計畫、提升產業技術及人才培育研究計畫、列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢
□涉及專利或其他智慧財產權，□一年□二年後可公開查詢

執行單位:臺北醫學大學呼吸治療學系

中　華　民　國　　94 年 05 月 13 日

中英文摘要及關鍵詞(Keywords)

中文摘要及關鍵詞

關鍵字：中風；氧化低密度脂蛋白；apoptosis signaling-regulation kinase 1 (ASK1)；腦部內皮細胞；細胞凋亡；訊息傳遞

近四十年來中風始終是造成人類死亡及殘障的主要成因，而粥狀動脈硬化更是導致心肌梗塞及中風的主要元凶。在許多的研究顯示，中風病人其血中的低密度脂蛋白(LDL)含量過高的現象。腦部血管內皮細胞(cerebral endothelial cells, CECs)為構成血腦障蔽的主要組成防止一些傷害性物質進入腦部。一旦氧化態 LDL (ox-LDL)誘導腦部內皮細胞凋亡將促使內皮細胞通透性增加及血腦障蔽破壞，而造成腦部的傷害如中風。然而，ox-LDL 誘導 CECs 的凋亡目前還不清楚。於是在本計劃中，我們將探討 apoptosis signaling-regulation kinase 1 (ASK1)及 JNK 在 ox-LDL 誘導腦部內皮細胞凋亡所扮演的角色及詳細的作用機轉。CECs 細胞給予 ox-LDL 可依濃度依賴誘導腦部內皮細胞的凋亡。同樣地，CECs 細胞給予 ox-LDL 也可誘導 caspase 3 的產生從 6 小時直至 12 小時。我們也發現 CECs 細胞給予 ox-LDL 可誘導 ASK1 蛋白激酶的活性。再者，CECs 細胞給予 ox-LDL 在 10 分鐘的時候更可明顯刺激 14-3-3 與 ASK1 解離，且此作用持續至 30 分鐘。CECs 細胞給予 ox-LDL 可依時間依賴誘導 JNK 的磷酸化。SP 600125 (JNK 選擇性抑制劑)抑制 ox-LDL 誘導腦部內皮細胞的凋亡。細胞短暫轉染 dominant negative mutant of ASK1 (ASK1 DN)及 JNK DN 二者皆可抑制 ox-LDL 誘導 JNK 的磷酸化。更進一步研究自由基在 ox-LDL 誘導腦部內皮細胞的凋亡所扮演的角色。我們發現細胞給予抗氧化劑 NAC 及 GSH 二者皆可抑制 ox-LDL 誘導腦部內皮細胞的凋亡。相同地，NAC 及 GSH 二者皆可抑制 ox-LDL 誘導 JNK 的磷酸化。經由以上的結果顯示，在 CECs 細胞中，ox-LDL 會產生自由基來活化 ASK1 及 JNK 的訊息傳遞路徑來誘導腦部內皮細胞的凋亡。

英文摘要及(Keywords)

關鍵字：stroke, oxidized low density lipoprotein (ox-LDL), apoptosis signaling-regulation kinase 1 (ASK1), JNK, cerebral endothelial cells (CECs), apoptosis, signal transduction

Ischemic stroke is the main leading cause of human inability and mortality in these forty years. Several clinical studies demonstrated that plasma level of low density lipoprotein (LDL) are significantly higher in patients with stoke. Dysfunction of the endothelium is a hallmark of the early atherosclerotic lesion and ox-LDL activates cerebral endothelial cells (CEC), leading to an alteration of the functional and structural integrity of the endothelial barrier. CECs have distinct morphological and functional properties that are essential for strict exchange of water and nutrients between blood and brain. Since oxidant LDL (ox-LDL) might play an important role in the pathology of stroke due to cerebral vasculature dysfunction. However, the mechanism of ox-LDL-induced CEC apoptosis is still unclear. In this project, we interested to explore the role of apoptosis signaling-regulation kinase 1 (ASK1) and JNK on ox-LDL-induced CEC apoptosis. Treatment of CECs with Ox-LDL induced CEC apoptosis in a concentration-dependent manner.

CECs treatment with ox-LDL also induced caspase 3 productions from 6 h to 12 h. We also found that ox-LDLinduced ASK1 kinase activity in CECs. Moreover, CECs treatment with ox-LDL induced 14-3-3 disassociation with ASK1 began at 10 min and sustain to 30 min. Similar with ox-LDL caused ASK1 activation, Treatment of CEC with ox-LDL caused phosphorylation of JNK in a time-dependent manner. SP 600125 (a selective JNK inhibitor) inhibited ox-LDL-induced CEC apoptosis. Cells transient transfection with dominant negative mutant of ASK1 (ASK1 D) and JNK DN both inhibited ox-LDL-induced JNK phosphorylation. To further investigate the role of free radical in ox-LDL-mediated CECs apoptosis. Treatment of CECs with antioxidants including NAC and GSH inhibited ox-LDL-induced CEC apoptosis. Furthermore, NAC and GSH also inhibited ox-LDL-induced increase in JNK phosphorylation. These results indicate that ox-LDL-generated free radicals production and activation of ASK1 and JNK signal pathway is very important for ox-LDL-induced CEC apoptosis.

報告內容[前言及文獻探討、研究目的、研究方法、結果與討論(含結論與建議)]

前言及文獻探討

近四十年來中風始終是造成人類死亡及殘障的主要成因，而粥狀動脈硬化更是導致心肌梗塞及中風的主要元凶。在許多的研究顯示，中風病人其血中的膽固醇、三酸甘油脂及低密度脂蛋白有含量過高的現象。目前已知 ox-LDL 會沉積在血管壁上造成動脈硬化斑塊(Kume *et al*., 2001)。此外，中樞神經系統也存在著大量的膽固醇，且為神經髓鞘的組成之一。中樞的膽固醇除了可以藉由中樞神經細胞的合成之外，也會透過血腦障蔽自血漿中緩慢地攝取至腦組織中(Sugawa *et al*., 1997)。直到目前為止，氧化態的低密度脂蛋白被認為是造成膽固醇過度沈積於血管壁的主因，也是導致動脈粥狀硬化的重要過程(Kume *et al*., 2001)。此外，氧化態低密度脂蛋白除了造成脂質堆積外，它也會引起內皮細胞發炎或是凋亡。氧化態低密度脂蛋白也會造成細胞外基質的斷裂降解而使得動脈硬化斑塊不穩定及剝離，進一步導致心肌梗塞或中風的產生(Kume *et al*., 1994)。由以上的結果顯示，氧化態低密度脂蛋白作用至內皮細胞產生的反應如活化、細胞凋亡及內皮細胞功能喪失在中風的形成扮演著舉足輕重的角色。

氧化態低密度脂蛋白目前被認為是引起動脈硬化的主因，但是氧化態低密度脂蛋白造成動脈硬化的詳細機轉目前仍不十分清楚。近來有報導指出，LOX-1 會媒介氧化態低密度脂蛋白的作用而在內皮細胞增加自由基的產生並活化 NF-κB、增加細胞黏附分子的表現及增加低密度脂蛋白受體(LDL-R)的表現(Cominacini *et al*., 2000; Hu *et al*., 2003; Sakurai *et al*., 2003; Kume *et al*., 2004)。此外也有報導指出，氧化態低密度脂蛋白會透過 LOX-1 活化 caspase 而誘導細胞凋亡(Shin *et al*., 2004)。而內皮細胞死亡特別是腦部血管內皮細胞死亡將導致血腦障蔽破壞而誘發腦血管疾病如中風的主因。因此，在本子計劃中，我們將探討氧化態低密度脂蛋白誘導腦部血管內皮細胞(cerebral endothelial cells, CECs)功能喪失及死亡的分子機制。

氧化態低密度脂蛋白的組成包含了典型的脂質過氧化產物如: LOOHs、4-HNE 或 oxysterols，並有報導指出氧化態低密度脂蛋白具有神經細胞毒性(Keller *et al*., 1999 ; Sugawa *et al*., 1997)。除了在神經細胞外，目前也有部分報告指出，氧化態低密度脂蛋白在其它的細胞也會誘導細胞凋亡，例如在小腸細胞引起粒腺體媒介的細胞凋亡 (Giovannini *et al*.,

2002)。由此得知氧化態低密度脂蛋白可經由不同的路徑誘導細胞的死亡。然而，直到目前為止，氧化態低密度脂蛋白對於腦內皮細胞死亡則尚未被探討，也是本子計劃研究的重點。腦部血管內皮細胞為構成血腦障蔽的主要組成，可以調控血液與腦部間水份及其他營養物質的交換，並防止一些傷害性物質進入腦部且維持中樞神經系統的恆定(Rubin *et al*., 1999)。當大腦內皮細胞因缺血性損傷而產生細胞凋亡後，會導致血腦障壁的崩解，而加重大腦缺血性的損傷(Zhang *et al*., 2000)。一旦氧化態低密度脂蛋白誘導腦部內皮細胞活化甚至細胞凋亡時，這將會促使內皮細胞所組成的血腦障蔽通透性增加及破壞，使得氧化態低密度脂蛋白及其他毒性物質更容易通過血腦障蔽而沉積於腦部血管形成斑塊，或是引發血栓而更進一步導致血管失去功能而造成中風。因此，氧化態低密度脂蛋白在中風疾病中扮演著重要的角色，但是氧化態低密度脂蛋白造成大腦內皮細胞毒性詳細的分子作用機制到目前還不清楚，值得做深入的探討。

細胞凋亡在多細胞有機體的發育過程及維持組織恆定上是一個相當重要的調控機制，當細胞凋亡機轉失去平衡則會導致許多疾病的發生，其中包括神經退化性疾病、癌症及中風等(Arends *et al*., 1991；Thompson *et al*., 1995)。細胞凋亡又稱做程序性的細胞死亡，其特徵有細胞質縮小且有細胞小體的出現、細胞核濃染、DNA 階梯斷片的產生以及細胞膜上磷脂質的再分佈即 Phosphotidylserine 外翻至細胞膜外等現象(Fadok *et al*., 1992; Jacobson *et al*., 1997; Nagata *et al*., 1997)。這些型態的變化主要是進行細胞自然凋亡時，因活化 caspase (cysteine aspartate-specific protease)而進一步切割細胞內的受質所致。細胞凋亡進行與否則取決於細胞所接受外來的訊息而影響生存或死亡間的平衡所調控(Musci *et al*., 1997)。

ASK1 是 mitogen-activated protein (MAP) kinase kinase kinase 家族成員之一，它可活化 JNK 和 p38 MAPK 訊號傳遞路徑(Ichijo *et al*., 1997)。在許多不同細胞過度表現持續活化的 ASK1，會引起粒腺體依賴性的 caspase 活化及細胞的凋亡(Kanamoto *et al*., 2000 ; Hatai *et al*., 2000)。ASK1 也被認為參與在氧化態壓力或是內質網媒介所引起的細胞凋亡中(Tobiume *et al*., 2001; Nishitoh *et al*., 2002)。此外，許多報導也指出，在發炎細胞激素及許多種壓力，例如：死亡受體 Fas 的活化皆可造成 ASK1 的活化(Ichijo *et al*., 1997；Gotoh *et al*., 1998)。經由這些研究的結果顯示，ASK1 在細胞凋亡的過程中扮演著舉足輕重的角色。因此，了解 ox-LDL 如何調控腦部血管內皮細胞 ASK1 的活化進而誘導內皮細胞功能喪失及死亡，是一個值得研究的課題。

Thioreducin (Trx)可以藉由結合至ASK1 的氮端而抑制ASK1 的激酶活性(Liu and Min, 2002)。許多活性態氧化物質，例如H_2O_2，它可以導致Trx和ASK1 的分離，接著ASK1 本身會形成雙分子的複合體，而在Thr845 或是Thr838 的位置進行自體磷酸化的作用，而活化(Gotoh *et al*., 1998 ; Liu and Min, 2002; Tobiume *et al*., 2002)。另外ASK1 的活性也會被負向調控蛋白磷酸分解酶PP5 所抑制，PP5 會使得ASK1 去磷酸化而失去活性(Morita *et al*., 2001)。目前也有報導也指出Akt也可以負向調控ASK1 的活性，使得細胞得以存活下去(Zhang *et al*., 1999 ; Kim *et al*., 2001)。例如在L292 細胞在去除血清的狀態下會使得內生性 ASK1 的激酶活性增加，而同時給與IGF-1 使得PI3K/Akt訊息路徑活化的情況下，則會在 ASK1 的Ser83 胺基酸殘基位置上進行磷酸化，進而使得ASK1 和 14-3-3 蛋白結合並抑制 ASK1 的活性，而促使細胞得以存活(Zhang *et al*., 1999 ; Kim *et al*., 2001)。因此本實驗的主要假說為氧化態低密度脂蛋白透過LOX-1 活化ASK1，進而引發粒線體中促進細胞凋亡的蛋白的釋放，最後造成腦血管內皮細胞的凋亡進造成血腦障蔽破壞。希望藉此計劃的完成可進一步瞭解氧化態低密度脂蛋白調控腦內皮細胞凋亡的機轉，並發展出治療氧化態低密度

脂蛋白誘發腦血管疾病的治療方針。

參考文獻

Arends, M.J. and Wyllie, A.H. (1991) Apoptosis: mechanisms and roles in pathology. *Int. Rev. Exp. Pathol.* **32,** 223-254.

Cominacini, L., Pasini, A.F., Garbin, U., Davoli, A., Tosetti, M.L., Campagnola, M., Rigoni, A., Pastorino, A.M., Lo, Cascio, V. and Sawamura, T. (2000) Oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) binding to ox-LDL receptor-1 in endothelial cells induces the activation of NF-kappaB through an increased production of intracellular reactive oxygen species. *J. Biol. Chem.* **275**, 12633-12638.

Fadok, V. A., Voelker, D. R., Campbell, P. A., Cohen, J. J., Bratton, D. L. and Henson, P. M. (1992) Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *Immunol*. **148**, 2207–2216.

Giovannini, C., Matarrese, P., Scazzocchio, B., Sanchez, M., Masella, R. and Malorni, W. (2002) Mitochondria hyperpolarization is an early event in oxidized low-density lipoprotein-induced apoptosis in Caco-2 intestinal cells. *FEBS Lett*. **523**, 200-206.

Gotoh, Y. and Cooper, J.A. (1998) Reactive oxygen species- and dimerization-induced activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 in tumor necrosis factor-alpha signal transduction. *J. Biol. Chem.* **273**, 17477-17482.

Hatai, T, Matsuzawa, A., Inoshita, S., Mochida, Y., Kuroda, T., Sakamaki, K., Kuida, K., Yonehara, S., Ichijo, H. and Takeda, K. (2000) Execution of apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1)-induced apoptosis by the mitochondria-dependent caspase activation.*J Biol Chem*. **275**, 26576-26581.

Hu, B., Li, D., Sawamura, T. and Mehta, J.L. (2003) Oxidized LDL through LOX-1 modulates LDL-receptor expression in human coronary artery endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* **307**, 1008-10012.

Ichijo, H., Nishida, E., Irie, K., Ten Dijke, P., Saitoh, M., Moriguchi, T., Takagi, M., Matsumoto, K., Miyazono, K. and Gotoh, Y., (1997) Induction of apoptosis by ASK1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and p38 signaling pathways. *Science* **275**, 90-94.

Jacobson, M. D., Weil, M. and Raff, M. C. (1997) Programmed cell death in animal development. *Cell* **88**, 347–354.

Kanamoto, T., Mota, M., Takeda, K., Rubin, L.L., Miyazono, K., Ichijo, H., Bazenet, C.E. (2000) Role of apoptosis signal-regulating kinase in regulation of the c-Jun N-terminal kinase pathway and apoptosis in sympathetic neurons. *Mol. Cell Biol.* **20**, 196-204.

Keller, J. N., Hanni, K. B. and Markesbery, W. R. (1999) Oxidized low-density lipoprotein induces neuronal death: implications for calcium, reactive oxygen species and caspases. *J. Neurochem.* **72**, 2601–2609.

Kim, A.H., Khursigara, G., Sun, X., Franke, T.F., Chao, M.V. (2001) Akt phosphorylates and negatively regulates apoptosis signal-regulating kinase 1. *Mol. Cell Biol.* **21**, 893-901.

Kume, N. and Gimbrone, M.A. Jr. (1994) Lysophosphatidylcholine transcriptionally induces growth factor gene expression in cultured human endothelial cells. *J. Clin. Invest*. **93**,

907-911.

Kume, N. and Kita, T. (2001) Roles of lectin-like oxidized LDL receptor-1 and its soluble forms in atherogenesis. *Curr. Opin. Lipidol.* **12**, 419-423.

Kume, N. and Kita, T. (2004) Apoptosis of vascular cells by oxidized LDL: involvement of caspases and LOX-1 and its implication in atherosclerotic plaque rupture. *Circ. Res.* **94**, 269-270.

Liu, Y. and Min, W. (2002) Thioredoxin promotes ASK1 ubiquitination and degradation to inhibit ASK1-mediated apoptosis in a redox activity-independent manner. *Circ Res*. **90**, 1259-1266.

Morita, K., Saitoh, M., Tobiume, K., Matsuura, H., Enomoto, S., Nishitoh, H. and Ichijo, H. (2001) Negative feedback regulation of ASK1 by protein phosphatase 5 (PP5) in response to oxidative stress. *EMBO J.* **20,** 6028-6036.

Musci, M. A., Latinis, K. M. and Koretzky, G. A. (1997) Signaling events in T lymphocytes leading to cellular activation or programmed cell death. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **83**, 205–222.

Nagata, S. (1997) Apoptosis by death factor. *Cell* **88**, 355–365.

Nishitoh, H., Matsuzawa, A., Tobiume, K., Saegusa, K., Takeda, K., Inoue, K., Hori, S., Kakizuka, A. and Ichijo, H. (2002) ASK1 is essential for endoplasmic reticulum stress-induced neuronal cell death triggered by expanded polyglutamine repeats. *Genes. Dev.* **16**, 1345-1355.

Rubin, L.L. and Staddon, J.M. (1999) The cell biology of the blood-brain barrier. *Annu. Rev. Neurosci.* **22**,11-28

Sakurai, K. and Sawamura, T. (2003) Stress and vascular responses: endothelial dysfunction via lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1: close relationships with oxidative stress. *J. Pharmacol. Sci.* **91,** 182-186.

Shin, H.K., Kim,Y.K., Kim, K.Y., Lee, J.H. and Hong, K.W. (2004) Remnant Lipoprotein Particles Induce Apoptosis in Endothelial Cells by NAD(P)H Oxidase-Mediated Production of Superoxide and Cytokines via Lectin-Like Oxidized Low-Density Lipoprotein Receptor-1 Activation. Prevention by Cilostazol. *Circulation*. (in press)

Sugawa, M., Ikeda, S., Kushima, Y., Takashima, Y. and Cynshi, O. (1997) Oxidized low density lipoprotein caused CNS neuron cell death. *Brain Res*. **761**, 165-172.

Thompson, C.B. (1995) Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* **267,** 1456-1462.

Tobiume, K., Matsuzawa, A., Takahashi, T., Nishitoh, H., Morita, K., Takeda, K., Minowa, O., Miyazono, K., Noda, T. and Ichijo, H. (2001) ASK1 is required for sustained activations of JNK/p38 MAP kinases and apoptosis. *EMBO Reports.* **2,** 222-228.

Tobiume, K., Saitoh, M. and Ichijo H. (2002) Activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 by the stress-induced activating phosphorylation of pre-formed oligomer. *J Cell Physiol.* **191**, 95-104.

Zhang, J., Tan, Z. and Tran, N.D. (2000) Chemical hypoxia-ischemia induces apoptosis in cerebromicrovascular endothelial cells. *Brain Res.* **877**, 134-140.

Zhang, L., Chen, J. and Fu H. (1999) Suppression of apoptosis signal-regulating kinase 1-induced cell death by 14-3-3 proteins.*Proc Natl Acad Sci U S A.* **96**, 8511-8515.

研究方法

1. 細胞培養:將老鼠大腦內皮細胞培養在DMEM含有 10%胎牛血清及抗生素(100 units/ml penicillin 及 100 μg/ml streptomycin)中以進行下列的實驗。2. 氧化低密度脂蛋白的製備:以人類血液來製備ox-LDL。3. MTT分析:可用來評估ox-LDL 對於腦內皮細胞存活率的影響。4. 流式細胞儀測定以PI 染色的細胞來比較細胞死亡的程度。5:西方點墨法:測定ASK1-p、ASK、caspase 3、JNK-p、JNK及 14-3-3 蛋白的變化。6:免疫沈澱法及蛋白激酶活性測定:測定ASK1 及JNK的活性。7:統計方法:所有實驗數據皆以平均值±標準差(mean ± S.E.M)表示，並以Analysis of Variance (ANOVA)配合Dunnet's test分析比較各組間是否有顯著差異。$p < 0.05$ 視為有統計上的意義。

研究目的

台灣在出血性或缺血性中風的發生率上始終高於西方國家，根據行政院衛生署統計中風疾病久為國人十大死因的第二名，因此中風疾病在台灣對於整個醫療體系，甚至整個社會的影響實為沉重的負荷，中風發生原因包括腦部組織因腦部內皮細胞喪失功能引起血管栓塞失去血液循環造成缺氧而引起組織壞死。腦部血管內皮細胞為構成血腦障蔽的主要組成，一旦 ox-LDL 誘導腦部內皮細胞活化甚至細胞凋亡將促使內皮細胞通透性增加及血腦障蔽破壞，使得 ox-LDL 及其他毒性物質更容易通過血腦障蔽而沉積於腦部血管形成斑塊，或是引發血栓而更進一步導致血管失去功能而造成腦部的傷害如中風。因此，ox-LDL 在中風疾病中扮演著重要的角色，這促使我們有興趣進一步探討 ox-LDL 對於構成血腦障蔽的腦部血管內皮細胞的作用特別是細胞凋亡及其詳細的分子作用機轉。因此本實驗的主要探討 ox-LDL 經由何種訊息傳遞路徑來增加 ASK1 的活性，進而引發腦內皮細胞凋亡的機制。希望藉此計劃的完成可進一步瞭解 ox-LDL 調控腦內皮細胞凋亡的機轉，並且發展出治療 ox-LDL 誘發腦血管疾病的治療方針。

結果

氧化態低密度脂蛋白(ox-LDL)誘導腦部內皮細胞凋亡

利用流式細胞儀方法發現ox-LDL (20 μg/ml, 100 μg/ml, 24 h)可以明顯增加腦部內皮細胞位於sub G1 phase的細胞數目亦即細胞凋亡的細胞數量(圖一)。於氧化狀態 20°C 16 小時或 37°C 3 小時處理的ox-LDL (100 μg/ml)，可分別誘導腦內皮細胞位於sub G1 phase的細胞數約 87%及 84% (圖一)。

氧化態低密度脂蛋白經由濃度依賴性關係降低腦部內皮細胞的存活率

為了進一步了解氧化態低密度脂蛋白對腦內皮細胞存活率的影響。我們利用MTT的方式加以評估。圖二顯示，在腦內皮細胞中，給予不可條件氧化的ox-LDL不同時間，呈現時間相關曲線降低腦內皮細胞的存活率。在氧化狀態20^{o}C 16小時或37^{o}C 3小時處理的ox-LDL (100 μg/ml)分別可降低腦內皮細胞存活率約86%及83% (圖二)。

氧化態低密度脂蛋白誘導 procaspase 3 的分解

在細胞凋亡的過程中將有 caspase 3 的參與。接下來我們將測定在老鼠腦內皮細胞給予 ox-LDL 刺激下，來測定 caspase 3 活化態的產生。將細胞給予 ox-LDL (20 μg/ml)刺激 6-24

小時，發現 caspase 3 在 6 小時就有明顯的增加，且持續至 12 小時，但在 24 小時的時候就漸漸下降(圖三)。

氧化態低密度脂蛋白誘導 ASK1 蛋白激酶活性的增加

為了解 ASK1 蛋白激酶在氧化態低密度脂蛋白誘導腦內皮細胞死亡所扮演的角色。接著我們將直接測定氧化態低密度脂蛋白在腦內皮細胞所誘導的 ASK1 蛋白激酶活性增加的現象。利用專一性的 anti-ASK1 抗體做免疫沉澱及使用 MBP 當作受質來測定其激酶活性。圖四顯示，在腦內皮細胞中，給予氧化態低密度脂蛋白(ox-LDL, 30 μg/ml)不同時間呈現時間相關曲線增加 ASK1 蛋白激酶的活性，且氧化態低密度脂蛋白可在短時間內即迅速誘導的 ASK1 活化(圖四)。

氧化態低密度脂蛋白誘導 14-3-3 與 ASK1 分離

當 ASK1 與 14-3-3 結合的時候，ASK1 呈現不活化的現象。接下來我們想要測試 ox-LDL 是否會誘導 14-3-3 與 ASK1 分離。老鼠腦內皮細胞加入 ox-LDL (100 μg/ml)刺激，發現在 5 分鐘的時候 14-3-3 即有明顯與 ASK1 分離，且此現象持續至 30 分鐘之久(圖五)。

氧化態低密度脂蛋白誘導 JNK 的活化

ASK1 引起細胞的死亡過程中，會經由活化 JNK 而誘導細胞的死亡。接下來我們將測試 ox-LDL 是否會誘導 JNK 的活化。老鼠腦部內皮細胞加入 ox-LDL (100 μg/ml)刺激，發現在 5 分鐘 JNK 有明顯的被磷酸化，且在 30 分鐘的時候達到最大(圖六)。

SP600125 抑制氧化態低密度脂蛋白誘導腦部內皮細胞凋亡

接下來為了探討 JNK 的確參與在 ox-LDL 的過程中，給予 JNK 特異性的抑制劑 SP600125 是否可以抑制 ox-LDL 誘導腦內皮細胞的死亡。老鼠腦內皮細胞先給予 SP600125 (1 μM)後再加入 ox-LDL (100 μg/ml)刺激 24 小時後，利用流式細胞儀方法發現 SP 600125 明顯抑制 ox-LDL 增加腦部內皮細胞位於 sub G1 phase 的細胞數目亦即細胞凋亡的細胞數量(圖七)。

ASK1 DN 及 JNK DN 抑制氧化態低密度脂蛋白誘導 JNK 的活化

為了進一步確定 ASK1 參與 ox-LDL 誘導 JNK 活化的訊號傳遞過程中，給予 ASK1 DN 及 JNK DN 是否可以抑制 ox-LDL 誘導 JNK 的磷酸化。老鼠腦內皮細胞先短暫轉染 ASK1 DN (0.5 μg)及 JNK DN (0.5 μg) 24 小時後，後再加入 ox-LDL (100 μg/ml)刺激 30 分鐘後，發現 ASK1 DN 及 JNK DN 明顯抑制 ox-LDL 誘導 JNK 的磷酸化(圖八)。

NAC 及 GSH 抗氣化劑抑制氧化態低密度脂蛋白誘導腦部內皮細胞凋亡

一般認為 ox-LDL 誘導細胞的死亡是經由體產生 ROS 來媒介的。接著我們將探討 antioxidants 例如：NAC 及 GSH 是否可以抑制 ox-LDL 誘導腦部內皮細胞的死亡。老鼠腦內皮細胞先給予 NAC (5 mM)及 GSH (1 mM)後，發現 NAC 及 GSH 可明顯抑制 ox-LDL (100 μg/ml)腦部內皮細胞凋亡的細胞數量(圖九)。

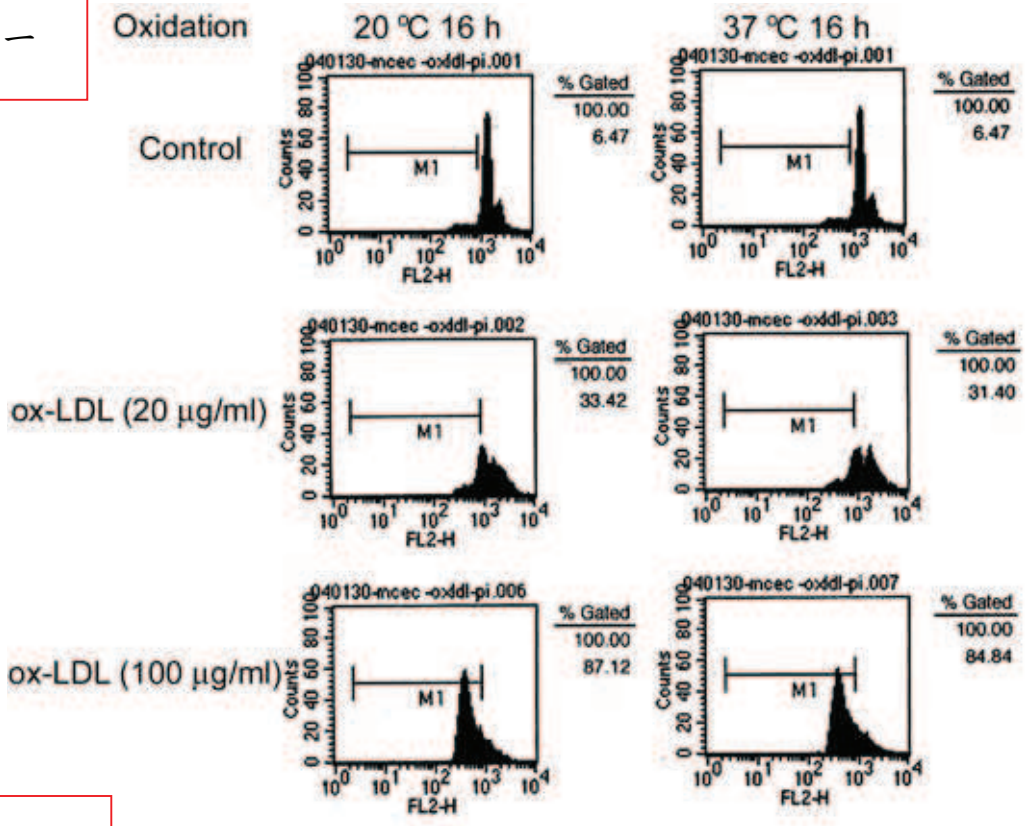
NAC 及 GSH 抗氣化劑抑制氧化態低密度脂蛋白誘導 JNK 的活化

為了進一步確定ox-LDL經由自由基來誘導JNK活化，給予NAC (5 mM)及GSH (1 mM)後，是否可以抑制 ox-LDL (100 μg/ml)誘導 JNK 的磷酸化。發現 NAC 及 GSH 可明顯抑制 ox-LDL 誘導 JNK 的磷酸化(圖十)。

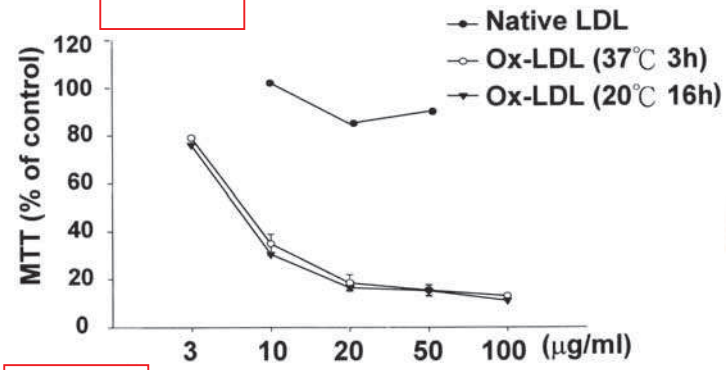
討論(含結論與建議)

經由此計劃的完成，將有助於了解氧化態低密度脂蛋白引發腦部內皮細胞凋亡的機轉及血腦障蔽破壞進而增加中風疾病罹患之機會之相關性。並可更進一步釐清 ASK1 在氧化態低密度脂蛋白的作用中所扮演的角色。在本年度的研究中，我們將探討 ROS、ASK1、JNK 在誘導血腦障蔽通透性增加及破壞所參與的訊息傳遞路徑。此外，我們也將詳細探討 ASK1 的活性會受何種磷酸分解酶或蛋白激酶所調控，以及所誘導出的 ASK1 活性增加又會與其胺基酸殘基特定位置上的磷酸化程度之間的相關性，最後進一步增加 caspase 3 活化及引起大腦內皮細胞凋亡及血腦障蔽破壞的現象。希望藉此研究能夠在血脂過高或是具有動脈粥狀硬化病人中引發中風疾病的治療上提供一個新方向。

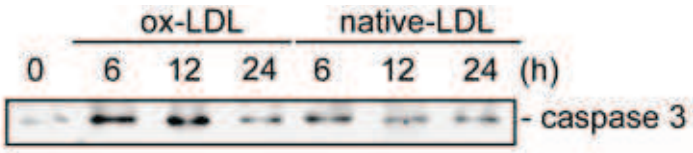
圖一



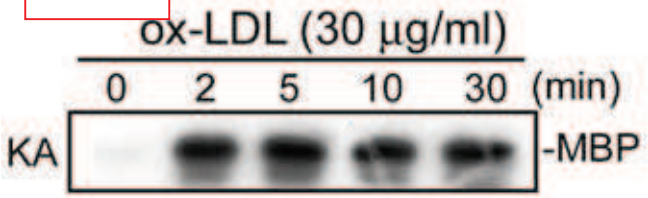
圖二



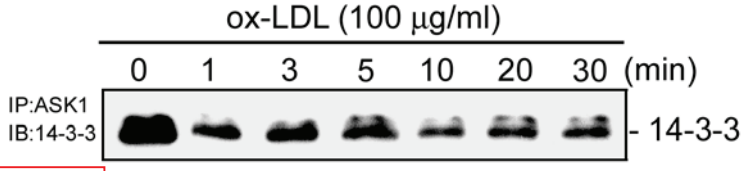
圖三



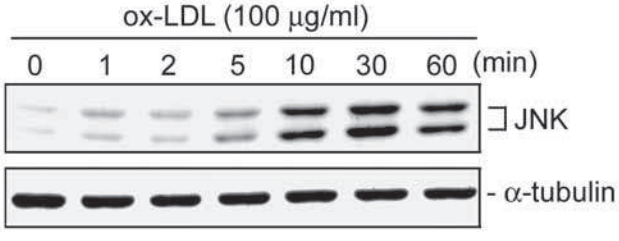
圖四



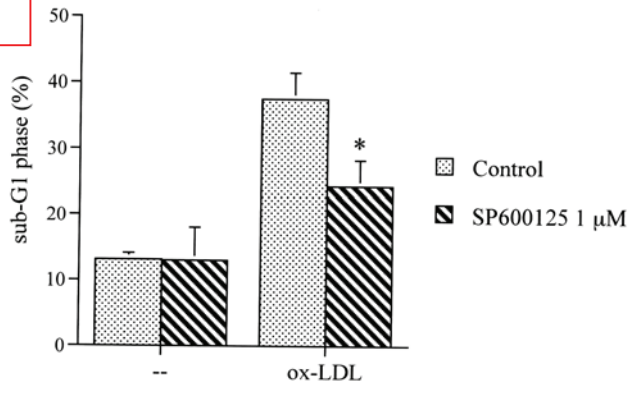
圖五



圖六



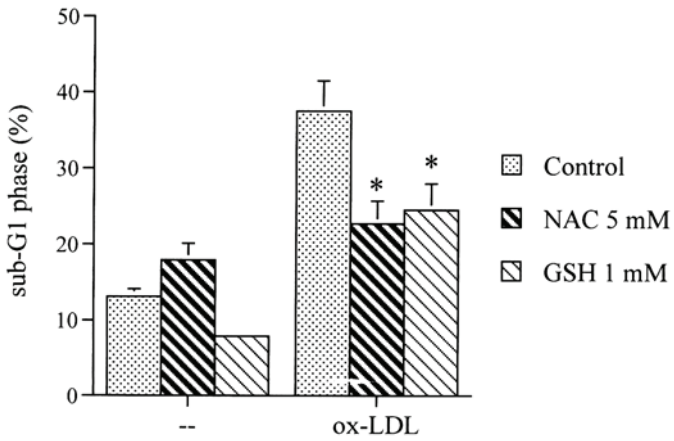
圖七



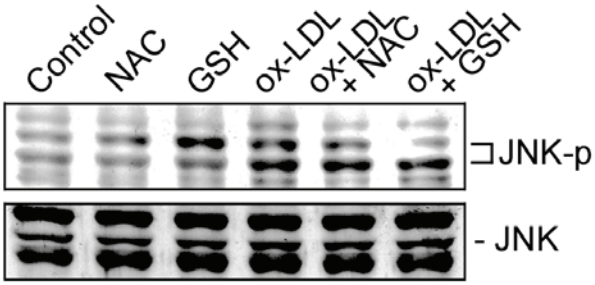
圖八

pCDNA3
ox-LDL + pCDNA3
ox-LDL + ASK1 DN
ox-LDL + JNK DN
ASK1 DN
JNK DN
JNK-p
- JNK

圖九


sub-G1 phase (%)
50
40
30
20
10
0
--
ox-LDL
*
*
Control
NAC 5 mM
GSH 1 mM

圖十


Control
NAC
GSH
ox-LDL
ox-LDL + NAC
ox-LDL + GSH
JNK-p
- JNK