

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

血管內皮細胞發炎反應的細胞與分子機制--在發炎物刺激  
下血管內皮細胞中剪流所扮演之保護角色：剪流對干擾素  
引發 Stat1 訊息傳導及相關基因表現之調控(3/3)

研究成果報告(完整版)

計畫類別：整合型  
計畫編號：NSC 95-2320-B-002-052-  
執行期間：95年08月01日至96年10月31日  
執行單位：國立臺灣大學化學工程學系暨研究所

計畫主持人：謝學真

計畫參與人員：博士班研究生-兼任助理：陳柏仰  
碩士班研究生-兼任助理：張弘勳  
其他：蔡宇致

處理方式：本計畫可公開查詢

中華民國 97 年 01 月 07 日

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫  成果報告  
 期中進度報告

整合型總計畫名稱：血管內皮細胞發炎反應的細胞與分子機制

本計畫名稱：在發炎物刺激下血管內皮細胞中剪流所扮演之保護角色：

剪流對干擾素引發Stat1訊息傳導及相關基因表現之調控

(Protective role of shear flow in inflammatory agent-stimulated vascular endothelial cells: Regulation of interferon-induced Stat1 signaling and related gene expression by shear flow)

計畫類別： 個別型計畫  整合型計畫

計畫編號：NSC93-2321-B-002-034, NSC94-2321-B-002-016, NSC95-2320-B-002-052

執行期間：93年8月1日至96年10月31日

計畫主持人：謝學真

整合型總計畫主持人：王寧

計畫參與人員：蔡宇致、謝宗佑、吳琬儀、王安姬、張弘勳等

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：國立台灣大學 化學工程學系暨研究所

中華民國 96 年 12 月 31 日

## 國科會專題研究計畫完整報告

整合型總計畫名稱：血管內皮細胞發炎反應的細胞與分子機制

本計畫名稱：在發炎物刺激下血管內皮細胞中剪流所扮演之保護角色：剪流對干擾素引發Stat1訊息傳導及相關基因表現之調控

(Protective role of shear flow in inflammatory agent-stimulated vascular endothelial cells: Regulation of interferon-induced Stat1 signaling and related gene expression by shear flow)

計畫編號：NSC93-2321-B-002-034, NSC94-2321-B-002-016, NSC95-2320-B-002-052

執行期間：93年8月1日至96年10月31日

計畫主持人：謝學真

整合型總計畫主持人：王寧

計畫參與人員：蔡宇致、謝宗佑、吳曉儀、王安姬、張弘勳等

執行單位：國立台灣大學 化學工程學系暨研究所

### 一、摘要

動脈粥狀硬化是一種慢性疾病，而發炎反應在動脈硬化的病程中扮演相當重要的角色。發炎過程中包括細胞素如 interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) 會刺激內皮細胞，誘導發炎基因如 CXC chemokines 的表現，其中需要 JAK/STAT1 訊息傳導路徑參與。由於血管壁的內皮細胞(ECs)持續受到血液流動所產生的剪力(shear stress, 簡寫 SS)刺激，穩定的層流(laminar flow, 簡寫 LF)剪力作用能保護內皮細胞，抑制動脈粥狀硬化。本研究欲探討在發炎反應中重要的細胞素 IFN $\gamma$  刺激下，層流剪力作用是否能扮演抑制發炎反應的調控角色。以細胞素 IFN $\gamma$  刺激內皮細胞會活化 JAK1/2 及 STAT1，造成 JAK1/2 及 STAT1 的酪氨酸(Tyr701)、絲氨酸(Ser727)磷酸化增加。Tyr701 磷酸化在 30 分鐘達到最高點，而 Ser727 磷酸化在 30 分鐘後才開始明顯上升。然而，剪力會抑制 IFN $\gamma$  所引發的 JAK1/2 及 Tyr701 磷酸化，隨著剪力施予的時間增加，抑制的效果也越明顯。而隨著剪力大小的增加，抑制 IFN $\gamma$  引發的 Tyr701 磷酸化，其效果也越明顯，但並不會影響 Ser727 磷酸化的程度。再進一步探討剪力抑制 STAT1 磷酸化的機制，發現 protein tyrosine phosphatase (PTP) 參與剪力的抑制效果。IFN $\gamma$  的刺激，會經由 JAK/STAT1 訊息傳導路徑，引發下游發炎基因的表現。本研究以 Taqman

real-time PCR 方法測定各發炎基因之 mRNA 的含量，發現以 IFN $\gamma$  刺激內皮細胞，會引發化學趨化蛋白 CXC chemokines (CXCL9, CXCL10, CXCL11) 和 CIITA 的 mRNA 大量表現。再以 siRNA 去除細胞中的 STAT1 蛋白質，發現 IFN $\gamma$  所造成的 CXC chemokines 和 CIITA 的 mRNA 表現會被顯著地降低，說明以 IFN $\gamma$  刺激內皮細胞，會經由活化 STAT1 訊息傳導路徑，引發下游 CXC chemokines 和 CIITA 的表現。血液流動所產生的剪力能抑制 IFN $\gamma$  所引發的上述三種 CXC chemokines mRNA 表現，也能大量降低 IFN $\gamma$  所引發的 CXCL10 蛋白質表現，以及 CIITA mRNA 表現。另外，不同的剪力大小可對 CXC chemokines mRNA 有不同程度的抑制，對內皮細胞施予低剪力(2 dyn/cm<sup>2</sup>)，IFN $\gamma$  所引發的 CXC chemokines mRNA 表現會被部分抑制下來，而高剪力(25 dyn/cm<sup>2</sup>)則幾乎完全抑制 CXC chemokines mRNA 表現。綜言之，本研究證實了層流剪力作用可抑制 IFN $\gamma$  引發的 JAK/STAT1 訊息傳導路徑，進而抑制 STAT1 下游與發炎反應相關的 CXC chemokines 和 CIITA 的基因表現，因而可望對於血管壁的內皮細胞產生保護效果，抑制動脈粥狀硬化。

**關鍵詞：**剪力，層流，內皮細胞，CXC chemokines, interferon-gamma, STAT1

## Abstract

It is known that inflammatory response plays an important role in atherogenesis. Interferon-gamma ( $\text{IFN}\gamma$ ) is an inflammation-related cytokine that can stimulate endothelial cells (ECs) to express CXC chemokines via JAK/STAT1 signaling pathway. ECs are constantly exposed to blood flow-induced shear stress (SS). Laminar flow (LF)-associated shear stress protects ECs from endothelial dysfunction and thus is atheroprotective. This study was conducted to analyze whether ECs under laminar shear stress were protected from  $\text{IFN}\gamma$ -induced inflammatory responses.  $\text{IFN}\gamma$  triggered the activation of JAK/STAT1 signaling pathway with the phosphorylation of JAK1/2 and phosphorylation of Tyr701 and Ser727 in STAT1. The Tyr701 phosphorylation approached the highest level at 30 minutes and Ser727 phosphorylation obviously raised after 30 minutes.  $\text{IFN}\gamma$  induced Tyr701 and Ser727 phosphorylation in a dose-dependent manner, with their highest levels occurring at the  $\text{IFN}\gamma$  concentration of 2.5 ng/ml. When SS was applied to  $\text{IFN}\gamma$ -treated ECs, it significantly inhibited the  $\text{IFN}\gamma$ -induced Tyr701 phosphorylation of STAT1 in a shear force- and time course-dependent manner while Ser727 phosphorylation was unaffected. In the presence of sodium orthovanadate (an inhibitor of protein tyrosine phosphatase), SS was unable to suppress  $\text{IFN}\gamma$ -induced STAT1 Tyr-701 phosphorylation, indicating that protein tyrosine phosphatase (PTP) was involved in the suppression process. Next, we performed Taqman real-time PCR to detect the mRNAs of downstream target genes such as CXC chemokines and CIITA in the JAK/STAT1 signaling pathway.  $\text{IFN}\gamma$  (2.5 ng/ml) stimulation dramatically increased the mRNA levels of CXC chemokines (CXCL9, CXCL10, and CXCL11) and CIITA. To examine the atheroprotective effects of laminar flow on ECs,  $\text{IFN}\gamma$ -treated ECs were subjected to LF for 4 hours. The expression of  $\text{IFN}\gamma$ -inducible CXC chemokines was significantly attenuated. Consistently, LF greatly suppressed CXCL10 secretion into a cultured medium. In addition to CXC chemokines, the  $\text{IFN}\gamma$ -induced expression of CIITA, a crucial transcriptional

regulator of MHCII expression, was also attenuated by LF. We further transfected ECs with STAT1-targeting siRNA to reduce the amount of STAT1 protein and found that the expressions of the  $\text{IFN}\gamma$ -induced CXC chemokines and CIITA were significantly suppressed. This result revealed that CXC chemokines and CIITA are the downstream target genes of STAT1. We also found that LF suppressed  $\text{IFN}\gamma$ -induced CXC chemokines expression in a shear stress-dependent manner, with high shear stress (25 dyn/cm<sup>2</sup>) being more effective than low shear stress (2 dyn/cm<sup>2</sup>) in suppressing CXC chemokines expression. In summary, LF suppressed  $\text{IFN}\gamma$ -induced JAK/STAT1 signaling and downstream inflammation-related target genes including CXC chemokines and CIITA, thereby protecting ECs from dysfunction and suppressing atherogenesis.

**Keywords:** shear stress, laminar flow, endothelial cells, CXC chemokines, interferon-gamma, STAT1

## 二、計畫緣由與目的

目前已有眾多研究指出動脈粥狀硬化與血流動力學有關，本研究室之前的研究發現穩定的層流會導致內皮細胞 reactive oxygen species (ROS)的增加，此外，層流也會抑制 monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1)基因的表現而有保護效果[1]。然而在身體血管內的轉彎分支處往往是粥狀斑塊容易堆積的地方，而此處的血液流動較為緩慢或伴隨著擾流的發生。動脈粥狀硬化是一種慢性疾病，從初期的內皮細胞功能異常發展到形成粥狀斑塊進而導致血栓，發炎反應在整個惡化的過程扮演相當重要的角色。許多文獻指出 interferon-gamma ( $\text{IFN}\gamma$ )與動脈硬化有關， $\text{IFN}\gamma$ 會引發內皮細胞發炎相關的基因表現，如 CXC chemokines 和 major histocompatibility complex class II (MHCII)，讓 T cell 更容易沾黏在內皮細胞上，並穿過內皮細胞層引發後續的發炎反應[2,3]。而 CXC chemokines 中 CXCL9 (Mig), CXCL10 (IP-10), CXCL11 (I-TAC)已被發現會在動脈硬化斑塊處大量表現。另一方面，細胞素也會引發內皮細胞中的訊息傳導，例如  $\text{IFN}\gamma$  和 IL-6 分別會活化 JAK/Stat1 及 JAK/Stat3

訊息傳導路徑[4]，轉錄因子 Stat1、Stat3 可調控細胞中之發炎反應、生長及死亡[5,6]。本研究室之前的研究指出，剪流可抑制內皮細胞中由血清或 IL-6 誘導的 JAK/STAT3 活化[7,8]。根據這些發現，本研究欲探討在發炎反應中重要的細胞素 IFN $\gamma$ 刺激下，層流剪力作用是否能扮演抑制發炎反應的調控角色。

### 三、實驗方法

#### 3.1 細胞株與細胞培養

本實驗採用的細胞為 bovine aortic endothelial cells (BAEC)，以 DMEM (含 10% FBS、penicillin、streptomycin) 培養。從臍帶初級培養取下的 human umbilical vein endothelial cells (HUVEC)，以 M199 (含 20% FBS、penicillin、streptomycin) 培養，並置於於 37°C、5% CO<sub>2</sub> 含飽和濕度的培養箱中。繼代培養時，以緩衝液洗過，再用 1X trypsin-EDTA 將細胞取下，離心收集，移去上清液，加入上述培養基使細胞懸浮分散，再接種到附有 gelatin 的玻璃片上。

#### 3.2 剪流實驗

將培養細胞的培養基裝入玻璃瓶內層，並且通入含 5% CO<sub>2</sub> 的空氣，以保持培養基之 pH 值為 7.4。外層以恆溫水流通，保持溫度為 37°C。開啟轉動式幫浦 (roller pump)，輸送培養基至波動調節器 (pulse dampener) 以消除流體的脈動，並且阻止氣泡進入流動室。待調節器內液面達適當高度時，將調節器平放。此時培養基便經由塑膠管流回瓶中，而成為一循環狀態之流動系統。整個系統以恆溫水域槽控溫，保持流動系統溫度為 37°C。將長滿單層細胞的玻璃片裝置在設計好之平行板流動室 (parallel plate flow chamber)，連接上流動管路，調節幫浦轉速至所需流量後，在恆溫下開始流動實驗。

#### 3.3 細胞內蛋白質含量測定 (西方墨點 Western blot)

經實驗處理後的細胞以 cord buffer 清洗過之後，吸乾殘留之液體，加入 lysis buffer (RIPA buffer, with proteinase inhibitor、0.1%

SDS)，充分溶解細胞後，將 sample 離心取上清液。以 BCA 蛋白質定量液於 530 nm 之吸光值來計算總細胞之蛋白質含量。取同量之蛋白質並調成同體積，加入還原劑，於 95°C 加熱五分鐘，之後以 8~10% polyacrylamide gel 進行電泳約二到三個小時，取出凝膠，將蛋白質轉移到 nitrocellulose 膜片上。然後以含 5% 脫脂奶粉及 0.2% Tween-20 的 TBS 溶液 (TBS-T) 浸泡膜片一小時，然後依序再以欲定量之單株或多株抗體浸泡搖晃二小時，然後再以 TBS-T 洗三次，每次五分鐘，倒掉 TBS-T 後加入含二次抗體之 TBS-T 浸泡搖晃一小時，然後以 TBS-T 洗三次，每次五分鐘，最後則以 Western-Star Chemiluminescence Detection System 來測量其強度，使用 CDP-Star chemiluminescence substrate 當受質。

#### 3.4 萃取細胞 RNA 與 Northern blot

經實驗處理後的細胞以 cord buffer 清洗過之後，吸乾殘留之液體，加入 4M guanidine thiocyanate 溶液溶解細胞，以 phenol-chloroform 有機溶液萃取細胞中之 total RNA，再以酒精沈澱的方式分離出 RNA，並且溶於 DEPC 處理過的 H<sub>2</sub>O 中。由細胞中所分離出之 RNA (10  $\mu$ g/lane) 將以 1% MOPS-formaldehyde agarose gel，在 1 x MOPS 溶液中進行電泳 (100 V) 約 2.5 小時，以 vacuum blotting 方式將 gel 上之 RNA 轉移到 nylon membrane 膜片上，並以 UV 光交聯使 RNA 固定在膜片上。將膜片浸泡在預雜交溶液中 (42°C) 16~20 小時，再將膜片與 <sup>32</sup>P-labeled IP-10 cDNA probe 雜交 (42°C) 24 小時，雜交完之膜片在室溫下以 wash buffer (1x SSC, 1% SDS) 清洗 2~3 次，每次 30 分鐘，清洗完的膜片置於 -70°C，以 x-ray film 感光 2~3 天。

#### 3.5 轉錄因子-DNA 複合體的偵測 (gel shifting)

將 1~2 ng 的特定序列 (<sup>32</sup>P-end-labeled high-affinity sis-inducible element (hSIE) oligonucleotide probe) 與 5  $\mu$ g 的核蛋白質反應 30 分鐘，將反應後的樣品以 5% nondenaturing polyacrylamide gel 進行電泳約三個小時，再

以真空乾燥的方式轉印到 3M membrane 上，以 autoradiography 方式，用 X-ray film 偵測 membrane 上之放射線訊號。

### 3.6 萃取細胞 RNA 與 Taqman real-time PCR assay

經實驗處理後的細胞以 cord buffer 清洗過之後，吸乾殘留之液體，加入 4M guanidine thiocyanate 溶液溶解細胞，以 phenol-chloroform 有機溶液萃取細胞中之 total RNA，再以酒精沈澱的方式分離出 RNA，並且溶於 DEPC 處理過的 H<sub>2</sub>O 中。將 100 ng 的 total RNA 加入 Taqman one step RT-PCR master mix solution (Applied Biosystems) 中，並加入所欲偵測基因之探針 (委請瑞林公司設計並製作)，一管的總反應體積為 20  $\mu$ l，進行 RT and real-time PCR 之反應。RT 的反應條件為 48°C 30 分鐘，緊接著 95°C 10 分鐘開啟 DNA polymerase 的活性，接著 40 個 PCR cycles (95°C 15 秒，60°C 1 分鐘)，由 ABI 7700 real-time PCR 機器記錄每一個 cycle 的螢光訊號並分析所得的結果。每一個基因的 mRNA 含量除以 GAPDH 的 mRNA 含量，來標準化每一管的結果。

## 四、實驗結果與討論

### 4.1 剪力不影響內皮細胞在基礎狀態下 STAT1 的活性

STAT1 是一種可被 IFN $\gamma$  引發的細胞內重要的訊息轉錄因子，與細胞的生長，凋亡和發炎反應有關，STAT1 的 Tyr701 及 Ser727 磷酸化程度與其活性有關，本研究首先要探討剪力是否會影響 STAT1 的活化狀態。如 Fig. 1 所示，實驗發現對未受細胞素(cytokine) 刺激的內皮細胞施予剪力(25 dyn/cm<sup>2</sup>)之情況下，並不會引起 STAT1 酪氨酸(Tyr701)的磷酸化，也不會改變 STAT1 絲氨酸(Ser727)已有的磷酸化。以 2.5 ng/ml IFN $\gamma$  刺激內皮細胞 30 分鐘後，可以看到 Tyr701 及 Ser727 磷酸化增加。同時並觀察剪力對 ERK1/2 及 Akt 之調控，剪力刺激會造成 ERK1/2 磷酸化在 10 分鐘達到最高點，並在兩小時後回到基礎狀態下的磷酸化程度，同時並觀察到 Akt 受到剪力的刺激之後也會產生短時間的磷酸化

增加，ERK1/2 及 Akt 的結果與其他報導所觀察到的現象一致。

### 4.2 IFN $\gamma$ 刺激內皮細胞中 STAT1 之活化

當內皮細胞受到細胞素的影響後，會產生一連串的訊息傳導過程以調控下游的基因，引發內皮細胞異常並導致發炎反應，IFN $\gamma$  是由 T cell 所釋放出來的一種干擾素，會活化 JAK/STAT1 的訊息傳導路徑，活化的 STAT1 會與其目標 DNA 結合並促進目標基因的轉錄，最後導致目標基因的表現。如 Fig. 2A 所示，本實驗以細胞素 IFN $\gamma$  (2.5 ng/ml) 刺激內皮細胞，IFN $\gamma$  會活化 STAT1，造成 STAT1 的 Tyr701、Ser727 磷酸化增加，加入 IFN $\gamma$  刺激內皮細胞之後，Tyr701 磷酸化在 5 分鐘就開始上升，並在 30 分鐘達到最高點，而 Ser727 磷酸化在 30 分鐘後才開始明顯上升。如 Fig. 2B 所示，以不同濃度的 IFN $\gamma$  刺激內皮細胞 30 分鐘，Tyr701、Ser727 磷酸化程度會隨著 IFN $\gamma$  濃度的增加而上升，在 2.5 ng/ml 高濃度 IFN $\gamma$  的刺激之下，Tyr701、Ser727 磷酸化程度達到最高。

### 4.3 剪力會抑制由 IFN $\gamma$ 所引發的 JAK1/2 及 STAT1 Tyr701 磷酸化

本研究室先前的研究發現穩定的層流會抑制 MCP-1 基因的表現而有保護效果[1]，本研究欲觀察剪力對受到發炎反應因子 IFN $\gamma$  刺激的內皮細胞是否同樣具有保護作用。如 Fig. 3A 所示，對臍帶靜脈內皮細胞(HUVEC)施予剪力，會抑制 IFN $\gamma$  所引發的 Tyr701 磷酸化，在預處理 2.5 ng/ml IFN $\gamma$  10 分鐘之後，再繼續施予剪力(25 dyn/cm<sup>2</sup>) 10 或 20 分鐘，與靜止狀態下加入 IFN $\gamma$  的細胞相比，有施予剪力的內皮細胞其 Tyr701 磷酸化會被抑制，隨著剪力施予的時間增加，抑制的效果也越明顯。如 Fig. 3B 所示，由 IFN $\gamma$  所引發的 Tyr701 磷酸化，隨著剪力大小的增加，抑制效果也越明顯，施予 5 dyn/cm<sup>2</sup> 大小的剪力並不影響 Tyr701 磷酸化程度，當施予 12.5 dyn/cm<sup>2</sup> 剪力，Tyr701 磷酸化會有比較明顯的抑制效果，增加剪力大小到 25 dyn/cm<sup>2</sup> 時，抑制效果最明顯，與 IFN $\gamma$  所引發的 Tyr701 磷酸化程度相比，約可抑制 50%，另一

方面，剪力並不會對 Ser727 磷酸化有影響。而在牛的動脈內皮細胞(BAEC)也可以看到剪力的保護效果，如 Fig. 4 所示，剪力也同樣會抑制 IFN $\gamma$ 所引發的 STAT1 Tyr701 磷酸化，並且也抑制 IFN $\gamma$ 所引發的 JAK1/2 磷酸化。由上述實驗可以證明剪力對於兩種來源不同的內皮細胞，都具有抑制 JAK/STAT1 訊息傳導活化的效果。

#### 4.4 IFN $\gamma$ 透過活化 STAT1，引發內皮細胞中化學趨化蛋白 CXCL10 (IP-10)的表現

IFN- $\gamma$  會引發內皮細胞中 CXC chemokines、MHCII 基因的表現，這些基因也都透過 JAK/STAT1 訊息傳導路徑的調控，其表現出之蛋白則會刺激內皮細胞導致後續的發炎反應。本研究欲探討 CXC chemokines 對內皮細胞的影響，CXC chemokine 家族中包括 CXCL9 (Mig), CXCL10 (IP-10), CXCL11 (I-TAC)這三種，已有報導指出在動脈硬化的斑塊表面，內皮細胞會表現大量的 CXC chemokine 並且會吸引許多活化的 T cell 沾黏到斑塊表面並轉移到斑塊的組織裡面，並在此處放出許多細胞素，擴大發炎反應[8]。如 Fig. 5 所示，IFN $\gamma$  (2.5 ng/ml)會刺激內皮細胞，使 IP-10 mRNA 的表現量隨刺激時間增長而上升，在刺激 4 小時後達到最高點。由之前所得的結果，證實剪力會抑制 IFN $\gamma$ 所引發的 JAK/STAT1 訊息傳導路徑，未來我們將探討，剪力是否同樣會抑制 IFN $\gamma$ 所引發的下游目標基因群表現，如 CXC chemokines、MHCII，以達到保護內皮細胞免於細胞素刺激的效果。

#### 4.5 Protein tyrosine phosphatase 參與層流(LF)剪力作用抑制 IFN $\gamma$ 所引發 STAT1 Tyr701 磷酸化

STAT1 屬於一種可被 IFN- $\gamma$ 引發磷酸化的細胞內重要的訊息轉錄因子，與細胞的生長，凋亡和發炎反應有關。之前的結果顯示層流(LF)剪力作用會抑制 STAT1 Tyr701 的磷酸化。本研究欲探討 LF 所產生的剪力抑制 STAT1 Tyr701 磷酸化的作用機制為何。如 Fig. 6 所示，比較 lane 3 和 lane 5，對 BAECs 施予剪力，剪力會抑制 IFN $\gamma$  (2.5 ng/ml)所引

發的 STAT1 Tyr701 磷酸化。比較 lane 5 和 lane 6，以 100  $\mu$ M Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>(protein tyrosine phosphatase 抑制劑)預先處理 30 分鐘後，再施予 LF (25 dyne/cm<sup>2</sup>)20 分鐘之後，LF 抑制 IFN $\gamma$ 所引發 STAT1 Tyr701 磷酸化的效果就會消失，表示 protein tyrosine phosphatase 參與 LF 對 STAT1 Tyr701 去磷酸化的過程。

#### 4.6 層流(LF)剪力作用會抑制由 IFN- $\gamma$ 所引發的 STAT1-DNA 結合

IFN $\gamma$ 會促使內皮細胞中 STAT1磷酸化，形成 STAT1/1 homodimer，此 homodimer 再進入細胞核，與核內 DNA promoter 上的特定序列(hSIE)進行結合，以啟動下游相關基因的表現。如 Fig. 7 所示，lane 1 表示在基礎狀況的 HUVECs 並沒有產生 DNA binding 的現象。lane 2 表示以 IFN $\gamma$  (2.5 ng/ml)刺激細胞 4 小時之後，引發 DNA binding，比較 lane 2 和 lane 3，當施予剪力 4 小時於 IFN $\gamma$ -induced 的內皮細胞，發現剪力會明顯地抑制 STAT1/1 的 DNA binding。在 lane 4 和 lane 5，分別使用 anti-STAT1 和 anti-STAT3 抗體加入到核蛋白和 DNA 結合反應的溶液中，發現當加入 anti-STAT1 抗體之後，DNA binding 的現象就消失，據此確認核蛋白中與 DNA (hSIE) binding 的分子就是 STAT1。

#### 4.7 IFN $\gamma$ 經由活化 JAK/STAT1 訊息傳導路徑，增加 CXC chemokines 和 CIITA 的表現

已有報導指出，IFN- $\gamma$ 會刺激內皮細胞，引發許多發炎相關基因如 CXC chemokines 和 CIITA (MHCII 基因轉錄的重要調控因子)的表現。本實驗欲觀察層流(LF)對上述基因表現的影響，以 Taqman real-time PCR 的方式分析細胞中基因的表現量。如 Fig. 8 所示，以 IFN $\gamma$  (2.5 ng/ml)刺激 HUVECs，在刺激 1,2,4,6 小時後，觀察不同時間點的基因表現，在基礎狀況未受刺激的狀態下，內皮細胞 CXC chemokines (CXCL9, CXCL10, CXCL11)和 CIITA 的表現量非常低，當受到 IFN $\gamma$ 刺激 1 小時之後，這些基因開始大量表現，隨著刺激的時間增長，這些基因的表現量也會慢慢升高。為確認這些受到 IFN $\gamma$ 刺激而表現的基因是透過 STAT1 的活化而表現，本研究以 siRNA 技術去除內皮細胞中的

STAT1 蛋白質，如 Fig. 9 下半圖所示，lane 3 和 lane 4 表示，HUVECs 中的 STAT1 蛋白質受到 siRNA STAT1 的影響而被去除掉，但細胞中 STAT3 和 tubulin 蛋白質的含量並沒有改變，由此證明 siRNA STAT1 可以專一性地去除細胞中 STAT1 而不影響其它蛋白質含量。如 Fig. 9 上半圖中所示，經過 STAT1-silenced 內皮細胞，再以 IFN $\gamma$  (2.5 ng/ml) 處理 4 小時後，觀察 STAT1 下游基因的表現，發現 CXC chemokines 和 CIITA 的 mRNA 表現都會被明顯地抑制下來，證明內皮細胞當受到 IFN $\gamma$  刺激，主要會透過活化 STAT1，來表現 CXC chemokines 和 CIITA。

#### 4.8 層流(LF)剪力作用會抑制由IFN $\gamma$ 所引發的CXC chemokines及CIITA基因表現

為了探討層流(LF)剪力作用對內皮細胞所產生保護效果，若對 HUVECs 施予剪力 4 小時，如 Fig. 10A 所示，並不會引發 CXC chemokines (CXCL9, CXCL10, CXCL11) 基因表現，若以 IFN $\gamma$  (2.5 ng/ml) 刺激 HUVECs 則會大量增加 CXC chemokines 的表現，然而若以 IFN $\gamma$  刺激 HUVECs 再施予剪力 4 小時，則層流(LF)剪力作用會顯著抑制由 IFN $\gamma$  所引發的 CXC chemokines 基因表現(Fig. 10A)。另外，LF 剪力作用也會顯著抑制由 IFN $\gamma$  所引發的 CXCL10 蛋白質的釋放量(Fig. 10B)，與上述現象一致。此外，LF 剪力作用也會顯著抑制由 IFN $\gamma$  所引發的 CIITA (MHCII 基因轉錄的重要調控因子)的基因表現(Fig. 10C)。綜言之，LF 剪力作用會抑制由 IFN $\gamma$  所引發的 CXC chemokines 及 CIITA 基因表現。

#### 4.9 LF 剪力越大可產生對 IFN $\gamma$ 引發 CXC chemokines 基因表現越顯著的抑制效果

在血管分支處，會產生 disturbed flow，伴隨低剪力或是非單一方向流動，來刺激內皮細胞，與穩定剪力所產生的效果有所不同。本實驗欲觀察不同剪力大小，對內皮細胞所產生保護效果之差異。如 Fig. 11 所示，lane 2 表示以 IFN $\gamma$  (2.5 ng/ml) 刺激 HUVECs 4 小時又 10 分鐘，CXC chemokines 會大量表現。若對內皮細胞施予低剪力(2 dyn/cm<sup>2</sup>)4 小時，則 IFN- $\gamma$  所引發的 CXC chemokines 的

mRNA 表現會被部分抑制下來(約抑制掉 50~60%)，而高剪力(25 dyn/cm<sup>2</sup>) 則有更好的抑制 CXC chemokines mRNA 的效果(約抑制掉 80~90%)。因此，LF 可抑制發炎基因表現，進而保護內皮細胞，而此效果強弱也與剪力的大小呈現正相關的趨勢。

## 五、結論

根據本研究上述各項實驗結果，歸納出以下重點：

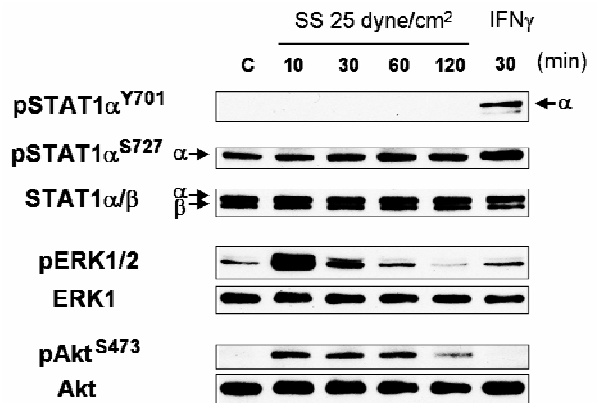
1. 以發炎反應中重要的細胞素 IFN $\gamma$  刺激內皮細胞會造成 STAT1 Tyr701 及 Ser727 磷酸化上升，引發 STAT1 之活化。
2. 剪力作用可抑制由 IFN $\gamma$  所引發的 JAK1/2 及 STAT1 Tyr701 磷酸化，因而血管中血液流動所產生的剪力可以保護內皮細胞，緩和細胞素刺激所引發的後續發炎反應。
3. IFN $\gamma$  的刺激會引起內皮細胞表現 CXC chemokines，吸引活化的 T cells 沾黏到內皮細胞表面，可能導致動脈硬化斑塊區域的發炎反應。
4. 在層流(LF)剪力作用抑制 IFN $\gamma$  所引發 STAT1 Tyr701 磷酸化的過程，有 protein tyrosine phosphatase 參與其中。
5. 層流(LF)剪力作用會抑制由 IFN $\gamma$  所引發的 STAT1/1 與 DNA binding 現象。
6. IFN $\gamma$  可經由活化 JAK/STAT1 訊息傳導路徑，增加 CXC chemokines 和 CIITA 的表現。
7. LF 剪力作用會抑制由 IFN $\gamma$  所引發的 CXC chemokines (CXCL9, CXCL10, CXCL11) 及 CIITA 基因表現。
8. LF 剪力作用的抑制效果與剪力的大小呈現正相關的趨勢。

綜合上述，本研究明確顯示層流剪力作用可抑制 IFN $\gamma$  引發的 JAK/STAT1 訊息傳導路徑，進而抑制 STAT1 下游與發炎反應相關的 CXC chemokines 和 CIITA 的基因表現，因而可望對於血管壁的內皮細胞產生保護效果，抑制動脈粥狀硬化。

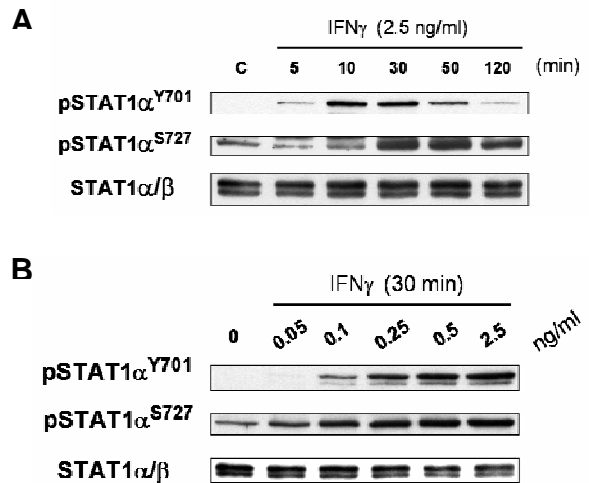
## 六、參考文獻

- [1] Ni CW, Wang DL, Lien SC, Cheng JJ, Chao YJ, Hsieh HJ., "Activation of PKC-epsilon and ERK1/2 participates in shear-induced endothelial MCP-1 expression that is repressed by nitric oxide", *J. Cell. Physiol.* 195, 428-434 (2003)
- [2] Mach F, Sauty A, Iarossi AS, Sukhova GK, Neote K, Libby P, Luster AD, "The interferon- inducible CXC chemokines IP-10, Mig, and I-TAC are differentially expressed by human atheroma-associated cells: implications for lymphocyte recruitment in atherogenesis", *J. Clin. Invest.* 104, 1041-1050 (1999)
- [3] Pober JS, Collins T, Gimbrone MA Jr, Cotran RS, Gitlin JD, Fiers W, Clayberger C, Krensky AM, Burakoff SJ, Reiss CS. Lymphocytes recognize human vascular endothelial and dermal fibroblast Ia antigens induced by recombinant immune interferon. *Nature* 305, 726-729 (1983)
- [4] Aaronson DS, Horvath CM, "A road map for those who know JAK-STAT", *Science* 296, 1653-1655 (2002)
- [5] Calo V, Migliavacca M, Bazan V, Macaluso M, Buscemi M, Gebbia N, Russo A, "STAT proteins: from normal control of cellular events to tumorigenesis", *J. Cell. Physiol.* 197, 157-168 (2003)
- [6] Masuda M, Suzui M, Yasumatu R, Nakashima T, Kuratomi Y, Azuma K, Tomita K, Komiyama S, Weinstein IB, "Constitutive activation of signal transducers and activators of transcription 3 correlates with cyclin D1 overexpression and may provide a novel prognostic marker in head and neck squamous cell carcinoma", *Cancer Res.* 62, 3351-3355 (2002)
- [7] Ni CW, Hsieh HJ, Chao YJ, Wang DL, "Shear flow attenuates serum-induced STAT3 activation in endothelial cells", *J. Biol. Chem.*, 278, 19702-19708 (2003)
- [8] Ni CW, Hsieh HJ, Chao YJ, Wang DL, "Interleukin-6 induced JAK2/STAT3 signaling pathway in endothelial cells is suppressed by hemodynamic flow", *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.*, 287, C771-C780 (2004)

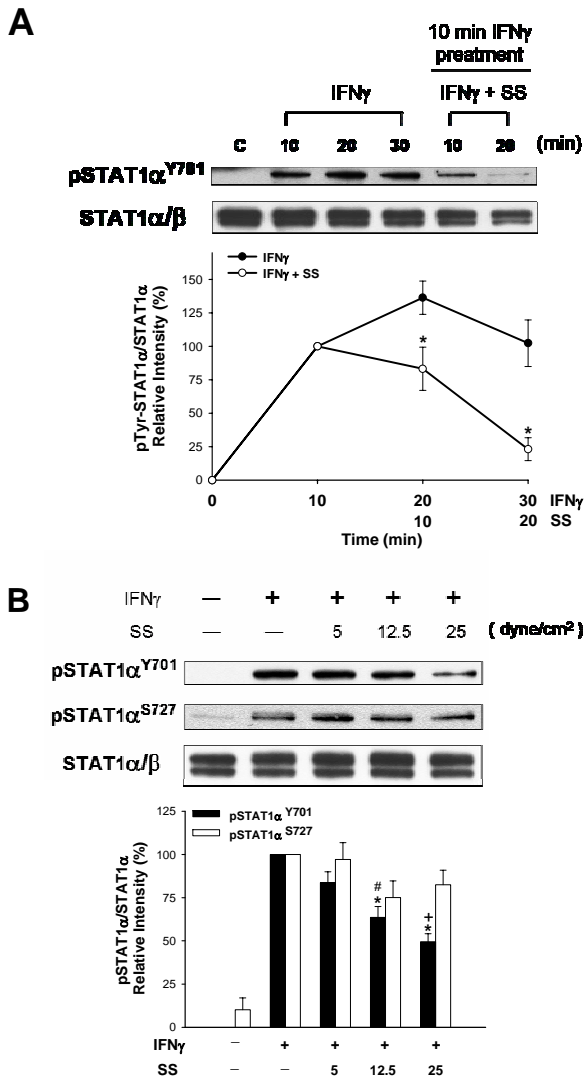
## 七、圖表



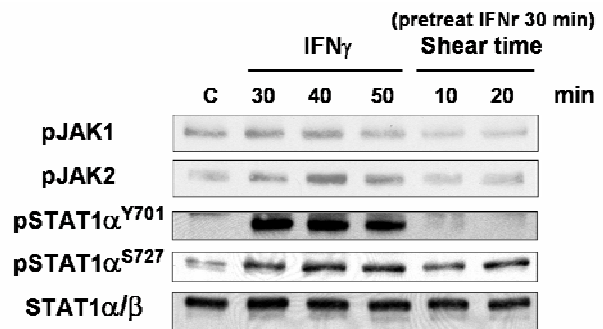
**Fig. 1. Shear stress (SS) does not affect the basal STAT1 Tyr 701 and Ser727 phosphorylation in HUVECs.** HUVECs were in static condition or exposed to SS (25 dyn/cm $^2$ ) for 10, 30, 60, 120 minutes. ECs were stimulated by IFN $\gamma$  (2.5 ng/ml) for 30 minutes as positive controls. Arrows indicate STAT1 $\alpha$  and STAT1 $\beta$ .



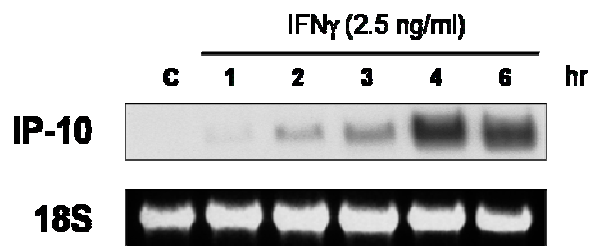
**Fig. 2. IFN $\gamma$  stimulates STAT1 tyrosine and serine phosphorylation.** A, IFN $\gamma$  induced Tyr 701 and Ser727 phosphorylation of STAT1 in a time-dependent manner. HUVECs were treated with IFN $\gamma$  (2.5 ng/ml) for 5, 10, 30, 50, 120 minutes. B, IFN $\gamma$  induced tyrosine and serine phosphorylation of STAT1 in a concentration-dependent manner. ECs were treated with IFN $\gamma$  at the indicated concentration for 30 minutes.



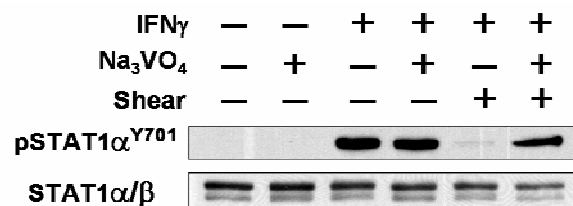
**Fig. 3. Shear stress (SS) suppresses IFN $\gamma$ -induced STAT1 Tyr701 phosphorylation in HUVECs.** SS suppresses IFN $\gamma$ -induced STAT1 Tyr701 phosphorylation in a time- and force-dependent manner. A, HUVECs pretreated with IFN $\gamma$  (2.5 ng/ml) for 10 min were either maintained static or exposed to following SS (25 dyn/cm<sup>2</sup>) in medium containing IFN $\gamma$  for an additional 10 or 20 minutes. After stimulation, cell lysates were subjected to western blot analysis and the Tyr701 phosphorylation was examined. The intensity of Tyr701 phosphorylation was normalized to the level of STAT1 $\alpha$  and is presented as mean  $\pm$  SE of three independent experiments. \*  $P < 0.05$  vs. respective IFN $\gamma$ -treated ECs under static conditions. B, HUVECs pretreated with 2.5 ng/ml IFN $\gamma$  for 10 min were maintained static or exposed to SS in medium containing IFN $\gamma$  for 20 minutes with increasing shear stress as indicated, and the Tyr701 and Ser727 phosphorylation of STAT1 was examined. STAT1 phosphorylation was normalized to the level of STAT1 and is presented as mean  $\pm$  SE of three independent experiments. \*  $P < 0.05$  vs. respective IFN $\gamma$ -treated ECs under static conditions. # $P < 0.05$  vs. ECs under SS of 5 dyn/cm<sup>2</sup>. + $P < 0.05$  vs. ECs under SS of 12.5 dyn/cm<sup>2</sup>.



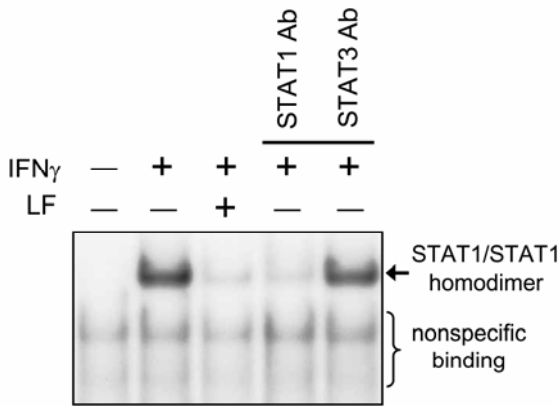
**Fig. 4. Shear stress (SS) suppresses IFN $\gamma$ -induced JAK/STAT1 activation in BAECs.** SS suppresses IFN $\gamma$ -induced JAK/STAT1 tyrosine phosphorylation in a time- dependent manner. BAECs pretreated with IFN $\gamma$  (0.5 ng/ml) for 30 min were either maintained static or exposed to following SS (25 dyn/cm<sup>2</sup>) in medium containing IFN $\gamma$  for an additional 10 or 20 minutes.



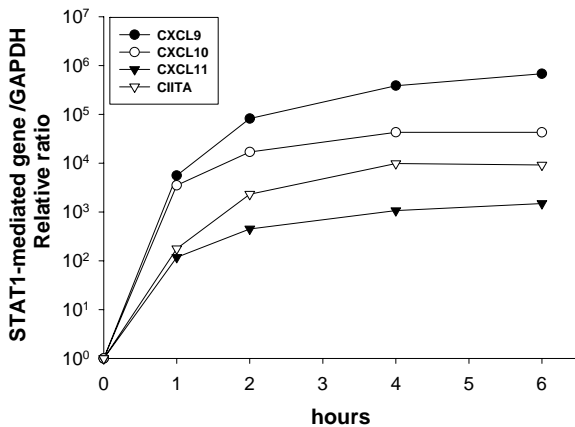
**Fig. 5. IFN $\gamma$  induces CXCL10 (IP-10) expression in HUVECs.** Time course study of IFN $\gamma$ -induced IP-10 mRNA levels. HUVECs were in static condition or treated with IFN $\gamma$  (2.5 ng/ml) for 1, 2, 3, 4, or 6 hours.



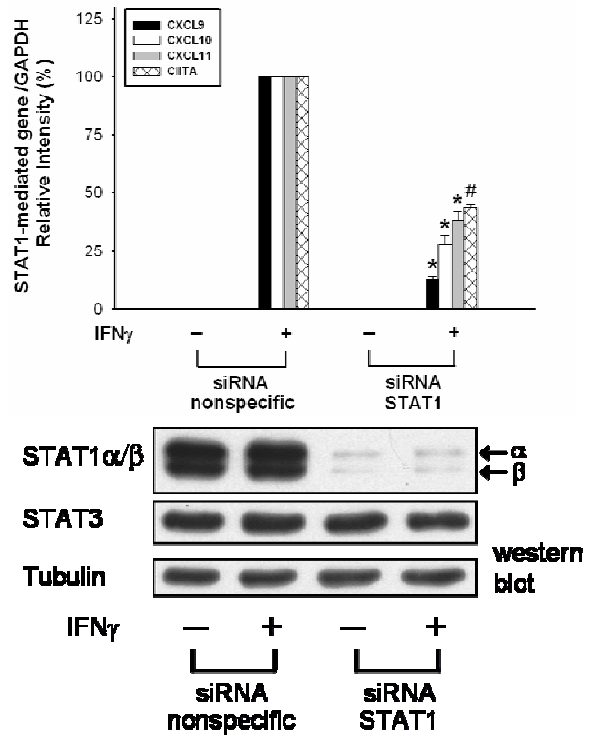
**Fig. 6. Protein tyrosine phosphatase is involved in tyrosine dephosphorylation of STAT1.** BAECs were pretreated with Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> (100  $\mu$ M), an inhibitor to protein tyrosine phosphatase, for 30 min followed by 0.5 ng/ml IFN $\gamma$  for 30 min and then maintained static or exposed to LF (shear stress: 25 dyn/cm<sup>2</sup>) for 20 min. The phosphorylation of STAT1 was analyzed by Western blot using antibody specific to either pTyr-STAT1 or STAT1. Results are representative of 3 independent experiments with similar results.



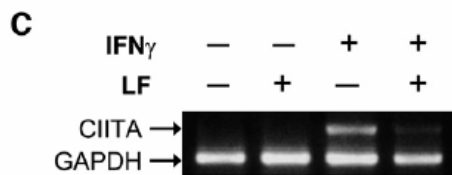
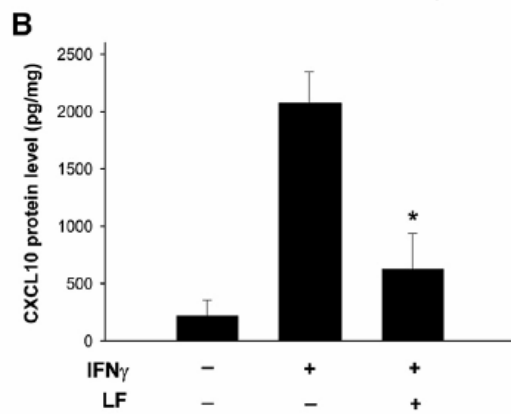
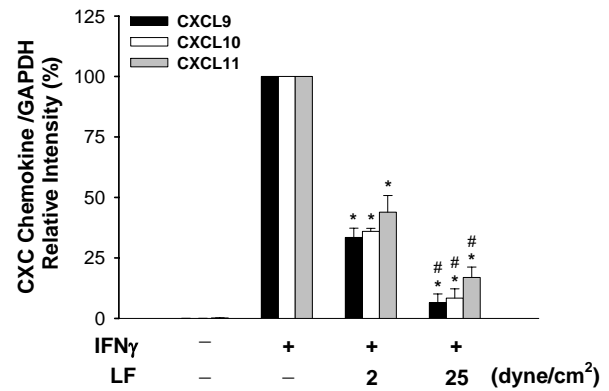
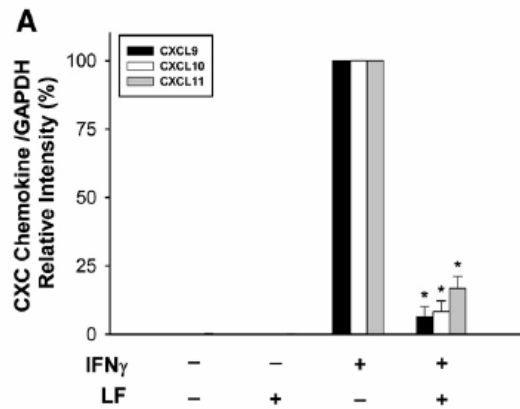
**Fig. 7. Laminar flow (LF) suppresses IFN- $\gamma$ -induced DNA binding of STAT1.** Nuclear extracts were prepared and analyzed by gel shifting using a  $^{32}$ P-labeled high-affinity sis-inducible element (hSIE) oligonucleotide probe. HUVECs were maintained under static conditions (lane 1) or treated with 2.5 ng/ml IFN $\gamma$  for 4 hours and 10 minutes (lane 2). Followed by IFN $\gamma$  pretreatment, ECs were exposed to laminar flow (LF) with shear stress of 25 dyn/cm $^2$  for 4 hours in the presence of IFN $\gamma$  (lane 3). The specificity of the retarded complex (STAT1/STAT1 homodimer) was confirmed by preincubating the nuclear extracts with an antibody to STAT1 or STAT3. Results are representative of 3 independent experiments with similar results.



**Fig. 8. IFN- $\gamma$  stimulates CXC chemokines (CXCL9, CXCL10, CXCL11) and CIITA expressions.** ECs were treated with IFN $\gamma$  (2.5 ng/ml) at different intervals as indicated. Total RNA was extracted, purified and were subjected to Taqman real-time PCR analysis. All these gene expressions (CXCL9, CXCL10, CXCL11, and CIITA) were normalized to the level of GAPDH. Results are representative of 2 independent experiments with similar results.



**Fig. 9. IFN- $\gamma$  induces expression of CXC chemokines (CXCL9, CXCL10, CXCL11) via STAT1 activation.** HUVECs were transfected with either STAT1-specific or nonspecific siRNA. mRNA expression of CXC chemokines and CIITA was analyzed using Taqman real-time PCR analysis. In a parallel experiment, ECs transfected with siRNA were analyzed by western blotting to detect the expression of STAT1 in ECs transfected with STAT1-specific or nonspecific siRNA. Results are presented as the mean  $\pm$  S.E. from three independent experiments. \*P < 0.05 and #P < 0.001 vs. respective gene mRNA expression in IFN $\gamma$ -treated HUVECs transfected with nonspecific siRNA.



**Fig. 11. Laminar flow (LF) suppresses IFN $\gamma$ -induced CXC chemokines (CXCL9, CXCL10, CXCL11) in a shear stress-dependent manner.** ECs were maintained under static conditions (lane 1), treated with IFN $\gamma$  for 4 hours and 10 minutes, or pretreated with IFN $\gamma$  (2.5 ng/ml) for 10 minutes and then subjected to LF in medium containing IFN- $\gamma$  for 4 hours with shear stress of 2 or 25 dyn/cm<sup>2</sup>. CXCL9, CXCL10 and CXCL11 mRNA levels were determined using Taqman real-time PCR analysis. Chemokine expression was normalized to GAPDH and is presented as the mean  $\pm$  S.E. of three independent experiments. \*P < 0.05 vs. respective chemokine expression of IFN $\gamma$ -treated ECs under static conditions. #P < 0.05 vs. respective chemokine expression of IFN $\gamma$ -treated ECs under LF (2 dyn/cm<sup>2</sup>).

**Fig. 10. Laminar flow (LF) suppresses IFN $\gamma$ -inducible CXC chemokines (CXCL9, CXCL10, CXCL11) and CIITA.** (A) ECs were maintained under static conditions (lane 1) or exposed to LF (25 dyne/cm<sup>2</sup>) for 4 hours and 10 min (lane 2); ECs were treated with IFN $\gamma$  for 4 hours and 10 min (lane 3) or exposed to IFN $\gamma$  for 10 min followed by LF for 4 hours in a medium containing IFN $\gamma$  (lane 4). CXCL9, CXCL10 and CXCL11 mRNA levels were determined by real-time quantitative RT-PCR. Chemokine expression was normalized to GAPDH. (B) LF suppresses IFN $\gamma$ -induced CXCL10 protein production. ECs were treated as in lanes 1, 3 and 4 of A. Conditioned medium was collected for ELISA analysis. CXCL10 protein is expressed as pg/mg of total protein. (C) LF attenuated IFN $\gamma$ -induced CIITA expression in ECs pretreated with IFN $\gamma$ . The expression of CIITA was analyzed using RT-PCR. Results are presented as the mean $\pm$ S.E. from three independent experiments. \*P < 0.05 vs. IFN $\gamma$ -treated ECs under static condition.