

行政院國家科學委員會專題研究計畫 期中進度報告

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
(1/3)

計畫類別：整合型計畫

計畫編號：NSC93-2321-B-002-034-

執行期間：93 年 08 月 01 日至 94 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：蔡宇致、吳琬儀、謝玠揚

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 94 年 6 月 2 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

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(1/3)

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

執行期間：93 年 8 月 1 日至 94 年 10 月 31 日

計畫主持人：謝學真

計畫參與人員：蔡宇致、吳琬儀、謝玠揚

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 94 年 5 月 31 日

國科會專題研究計畫期中進度報告

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(1/3)

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

執行期間：93 年 8 月 1 日至 94 年 10 月 31 日

計畫主持人：謝學真 教授

計畫參與人員：蔡宇致、吳婉儀、謝玟揚

執行單位：國立台灣大學 化學工程學系暨研究所

一、摘要

血管壁的內皮細胞(ECs)持續受到血液流動所產生的剪力刺激,穩定的剪力能保護內皮細胞並抑制發炎反應相關的基因表現。本研究探討在發炎反應中重要的細胞素 interferon-gamma (IFN- γ) 刺激下,剪力是否對內皮細胞具有保護效果。採用牛的動脈內皮細胞(BAEC)和人的臍帶靜脈內皮細胞(HUVEC)為實驗對象,觀察內皮細胞受到剪力(25 dyn/cm²)作用時,細胞中訊息調控及基因表現的改變。以細胞素 IFN γ (2.5 ng/ml) 刺激內皮細胞會活化 JAK1/2 及 STAT1,造成 JAK1/2 及 STAT1 的酪氨酸(Tyr 701)、絲氨酸(Ser727)磷酸化增加。Tyr 701 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。以不同濃度的 IFN γ 刺激內皮細胞 30 分鐘, Tyr 701、Ser727 磷酸化程度會隨著 IFN γ 濃度的增加而上升。然而,剪力會部分抑制 IFN γ 所引發的 JAK1/2 及 Tyr 701 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 γ 引發的 Tyr 701 磷酸化,其效果也越明顯,但並不會影響 Ser727 磷酸化的程度。由於 IFN γ 透過活化 STAT1,可引發內皮細胞中化學趨化蛋白 IP-10 的表現,本研究後續將探討剪力對 IFN γ 所引發的下游基因(包括 IP-10 等)表現之影響。綜合上述,剪力可藉

抑制發炎反應中重要的細胞素 IFN γ 所引發的 JAK1/2 及 STAT1 Tyr701 磷酸化,進而對內皮細胞產生保護效果。

關鍵詞：剪力、內皮細胞、細胞素、化學趨化蛋白。

Abstract

Endothelial cells (ECs) are constantly exposed to blood flow-induced shear stress. Laminar shear stress protects ECs from endothelial dysfunction. In the present study, the effect of shear stress (SS) on IFN γ -induced responses including STAT1 and JAK1/2 phosphorylation in ECs was examined. SS had no effect on Tyr701 and Ser727 phosphorylation of STAT1 in ECs under basal condition. Further, IFN γ triggered the activation of JAK/STAT1 signaling pathway with the phosphorylation of JAK1/2 and phosphorylation of Tyr701 and Ser727 in STAT1. Under IFN γ treatment, Tyr-701 phosphorylation approached the highest level at 30 minutes and Ser-727 phosphorylation obviously rised after 30 minutes. IFN γ induced Tyr-701 and Ser-727 phosphorylation in a dose-dependent manner, which Tyr-701 and Ser-727 phosphorylation approached their highest levels with IFN γ concentration of 2.5 ng/ml. When SS was applied to IFN γ -treated ECs, it significantly inhibited the IFN γ -induced Tyr701 phosphorylation of STAT1 in a shear force- and time course-dependent manner whiles Ser727 phosphorylation was

unaffected. IFN γ , through STAT1 signaling pathway, induced downstream chemokine IP-10 expression. Whether SS affects IFN γ -induced downstream target gene expressions will be examined in the future study. To sum up, our results demonstrated that SS attenuates IFN γ -induced JAK1/2 and STAT1 activation that will provide a protective effect on ECs during inflammatory response.

Keywords: shear stress, endothelial cells, cytokine, chemokine.

二、計畫緣由與目的

許多研究指出動脈粥狀硬化與血流動力學有關, 本人之前的研究發現穩定的層流會導致內皮細胞 ROS 的增加, 此外, 層流也會抑制 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, 亦有研究發現有些細胞素如 IFN- γ 、TNF- α 、IL-6, 這些物質會刺激內皮細胞, 誘導發炎相關基因的表現如 MHC-II、IP-10、MCP-1, 驅使血小板與白血球更易黏著於內皮細胞層[2]。另一方面, 細胞素也會引發內皮細胞中的訊息傳導, IFN- γ 和 IL-6 分別會活化 JAK/Stat1 及 JAK/Stat3 訊息傳導路徑[3], 轉錄因子 Stat1、Stat3 可調控細胞中之發炎反應、生長及死亡[4,5]。相關的研究指出, 剪流可抑制內皮細胞中由血清或 IL-6 誘導的 JAK/Stat3 活化[6,7]。根據這些發現, 我們欲探討剪力在發炎反應中所扮演的調控角色。

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%CO₂ 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%CO₂ 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 H₂O 中。由細胞中所分離出之 RNA (10 µg/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 ³²P-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。

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 γ 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/cm²) 之情況下，並不會引起 STAT1 酪氨酸 (Tyr 701) 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 γ 刺激內皮細胞 30 分鐘後，可以看到 Tyr 701 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 γ 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 γ 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 γ (2.5 ng/ml) 刺激內皮細胞，IFN γ 會活化 STAT1，造成 STAT1 的 Tyr 701、Ser727 磷酸化增加，加入 IFN γ 刺激內皮細胞之後，Tyr 701 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 γ 刺激內皮細胞 30 分鐘，Tyr 701、Ser727 磷酸化程度會隨著 IFN γ 濃度的增加而上升，在 2.5 ng/ml 高濃度 IFN γ 的刺激之下，Tyr 701、Ser727 磷酸化程度達到最高。

4.3 剪力會抑制由 IFN γ 所引發的 JAK1/2 及 STAT1 Tyr 701 磷酸化

已有許多報導說明剪力對內皮細胞具有保護效果[]，本研究欲觀察剪力對受到發炎反應因子 IFN γ 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 γ 所引發的 Tyr 701 磷酸化，在預處理 2.5 ng/ml IFN γ 10 分鐘之後，再繼續施予剪力 (25 dyn/cm²) 10 或 20 分鐘，與靜止狀態下加入 IFN γ 的細胞相比，有施予剪力的內皮細胞其 Tyr 701 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 γ 所引發的 Tyr 701 磷酸化，隨著剪力大小的增加，抑制效果也越明顯，施予 5 dyn/cm² 大小的剪力並不影響 Tyr 701 磷酸化程度，當施予 12.5 dyn/cm² 剪力，Tyr 701 磷酸化會有比較明顯的抑制效果，增加剪力大小到 25 dyn/cm² 時，抑制效果最明顯，與 IFN γ 所引發的 Tyr 701 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 γ 所引發的 STAT1 Tyr701 磷酸化，

並且也抑制 IFN γ 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 γ 透過活化 STAT1，引發內皮細胞中化學趨化蛋白 IP-10 的表現

IFN- γ 會引發內皮細胞中 MHCII、CXC chemokines 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 IP-10、Mig、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 γ (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 γ 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 γ 所引發的下游目標基因群表現，如 MHCII、CXC chemokines，以達到保護內皮細胞免於細胞素刺激的效果。

五、結論

1. 以發炎反應中重要的細胞素 IFN γ 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 γ 所引發的 JAK1/2 及 STAT1 Tyr 701 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 γ 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，導致動脈硬化斑塊區域的發炎反應，因此我們將進一步欲探討剪力是否會抑制 CXC chemokines(例如：IP-10 等)的表現。

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(3), 428-434(2003)
- [2] Mach F, Sauty A, Iarossi AS, Sukhova GK, Neote K, Libby P, Luster AD, "The interferon- γ 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] Aaronson DS, Horvath CM, "A road map for those who know JAK-STAT", *Science* 296, 1653-1655(2002)
- [4] 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(2), 157-168(2003)
- [5] 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)
- [6] Ni CW, Hsieh HJ, Chao YJ, Wang DL, "Shear flow attenuates serum-induced STAT3 activation in endothelial cells", *J. Biol. Chem.*, 278(22), 19702-19708(2003)
- [7] 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(3) C771-C780(2004)
- [8] Mach F, Sauty A, Iarossi AS, Sukhova GK, Neote K, Libby P, Luster AD, "Differential expression of three T lymphocyte-activating CXC chemokines by human atheroma-associated cells", *J. Clin. Invest.*, 104(8) 1041-1050(1999)

七、圖表

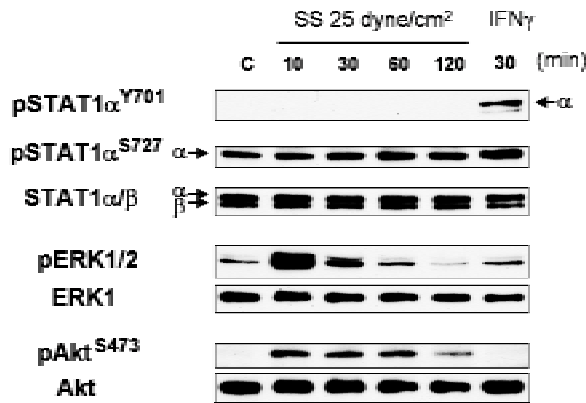


Fig. 1 Shear stress (SS) does not affect the basal STAT1 Tyr 701 and Ser727 phosphorylation in HUVECs. HUVECs were in static condition or exposed to SS (25 dyn/cm²) for 10, 30, 60, 120 minutes. ECs were stimulated by IFN γ (2.5 ng/ml) for 30 minutes as positive controls. Arrows indicate STAT1 α and STAT1 β .

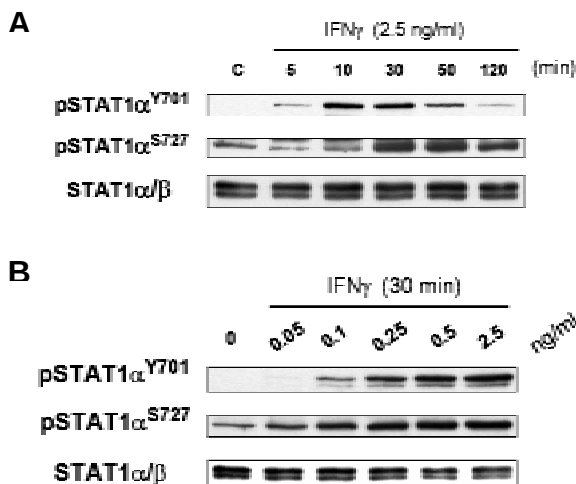
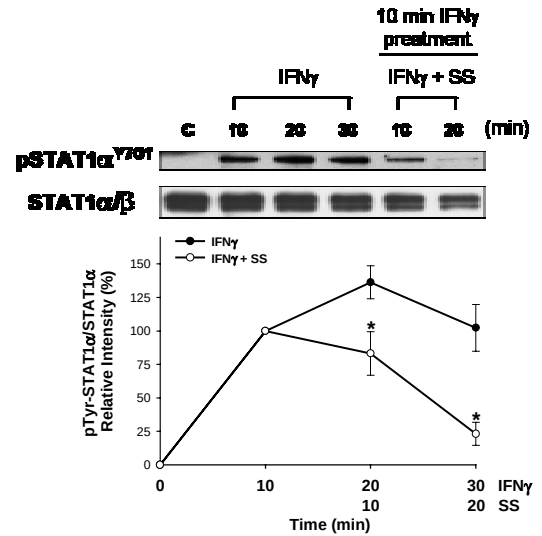


Fig. 2 IFN γ stimulates STAT1 tyrosine and serine phosphorylation. A, IFN γ induced Tyr 701 and Ser727 phosphorylation of STAT1 in a time-dependent manner. HUVECs were treated with IFN γ (2.5 ng/ml) for 5, 10, 30, 50, 120 minutes. B, IFN γ induced tyrosine and serine phosphorylation of STAT1 in a concentration-dependent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

A



B

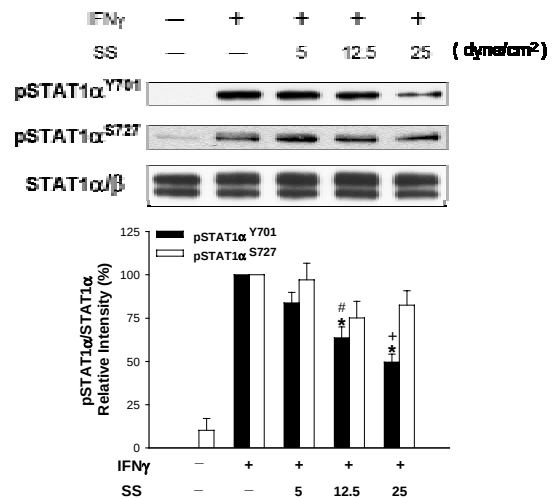


Fig. 3 Shear stress (SS) suppresses IFN γ -induced STAT1 Tyr701 phosphorylation in HUVECs. SS suppresses IFN γ -induced STAT1 Tyr701 phosphorylation in a time- and force-dependent manner. A, HUVECs pretreated with IFN γ (2.5 ng/ml) for 10 min were either maintained static or exposed to following SS (25 dyn/cm²) in medium containing IFN γ 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 α and is presented as mean $\pm$ SE of three independent experiments. * $P < 0.05$ vs. respective IFN γ -treated ECs under static conditions. B, HUVECs pretreated with 2.5 ng/ml IFN γ for 10 min were maintained static or exposed to SS in medium containing IFN γ 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 γ -treated ECs under static conditions. # $P < 0.05$ vs. ECs under SS of 5 dyn/cm². + $P < 0.05$ vs. ECs under SS of 12.5

dyn/cm².

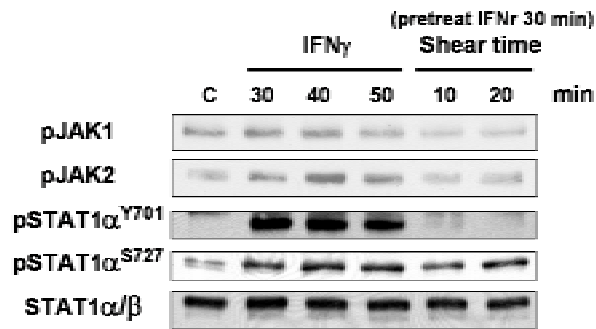


Fig. 4 Shear stress (SS) suppresses IFN γ -induced JAK/STAT1 activation in BAECs. SS suppresses IFN γ -induced JAK/STAT1 tyrosine phosphorylation in a time- dependent manner. BAECs pretreated with IFN γ (0.5 ng/ml) for 30 min were either maintained static or exposed to following SS (25 dyn/cm²) in medium containing IFN γ for an additional 10 or 20 minutes.

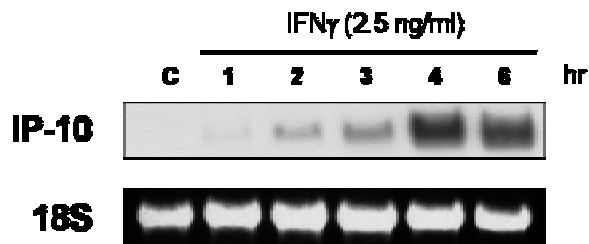


Fig. 5 IFN γ induces IP-10 expression in HUVECs. Time course study of IFN γ -induced IP-10 mRNA levels. HUVECs were in static condition or treated with IFN γ (2.5 ng/ml) for 1, 2, 3, 4, or 6 hours.