

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

計畫編號：NSC 88-2314-B-002-244

執行期限：87 年 8 月 1 日至 88 年 7 月 31 日

主持人：吳明修 執行機構及單位名稱：台大醫學院

腎臟內皮一氧化氮合成酶與低氧誘發之細胞凋亡
Renal endothelial nitric oxide synthase in hypoxia-induced apoptosis

一、中文摘要

幾項已知的事實是：1) 腎小管中具有內皮一氧化氮合成酶，2) 一氧化氮與細胞凋亡有關，3) 低氧可誘發腎小管之內皮一氧化氮合成酶與細胞凋亡。基於以上證據，我們推論：因腎臟是易受低氧/缺血傷害的器官，故其一氧化氮/一氧化氮合成酶系統應可調控細胞凋亡的表現；而長期低氧(低壓艙, 380mmHg)已知可增強腎臟中內皮一氧化氮合成酶增加，在此狀況下給予 L-arginine 的異構物(飲水中加入 L-nitro arginine methylester, L-NAME)來抑制一氧化氮，可看出其對細胞凋亡有關分子的影響程度。首先以反轉錄聚合酶連鎖反應(RT-PCR)來比較與細胞凋亡有關之基因(Bcl-xL, Bcl-xs, Bax)在腎皮質的表現，發現 L-NAME 組中在餵食一天的 L-NAME 後，在低氧前這三種基因的基準值均顯著地比對照組(D-NAME 組)為高；在長期低氧時期，D-NAME 組這三種基因的表現在前 24 小時與二至四周時期均有增加，呈 biphasic 的現象，但在三天與至一周時維持正常；比較下，L-NAME 組因偏高的基準值，使這三種基因的表現在長期低氧時未能再有增加，而 Bax 在二至四周時反有明顯受到抑制。免疫組織染色定位顯示 eNOS 在腎皮質的分佈與 Bcl-2 及 Bax 比較一致，而與 Bcl-xL 或 Bad 似乎有相反的關係(Tab. 2)。西方墨點實驗亦顯示腎皮質中 Bcl-xL 的蛋白在長期低氧過程也有 biphasic 的增加，NOS 的抑制亦未見明顯的效果。而這些細胞凋亡有關分子的表現與 eNOS 蛋白的增加在時間上明顯地並不相符。結論為腎皮質中，在生理狀況下 NO 本身是抑制細胞凋亡。長期低氧的刺激，可誘發細胞凋亡的基因表現有 biphasic 增加，而 NOS 的抑制至長期低氧晚期才可能有降低細胞凋亡的效果。

關鍵詞：腎臟，缺氧，細胞凋亡，內皮一氧化氮合成酶

Abstract

Several facts are known : 1) endothelial nitric oxide synthase (eNOS) is expressed in renal tubules, 2) nitric oxide modulates apoptosis, and 3) hypoxia induces renal eNOS and apoptosis. Based on these, we hypothesized that renal NO/NOS might have effect

on apoptotic related molecules for kidney is most susceptible to the hypoxic/ ischemic injury. Chronic hypoxia (hypobaric, 380mmHg) enhances renal eNOS and this enables us a particular condition to inhibit its activity with L-nitro-arginine methylester (L-NAME) in the drinking water and thus to see its effect on the apoptosis. First, the gene expression of Bcl-xL, Bcl-xs, and Bax was compared by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). Baseline value before hypoxia was evidently higher in the L-NAME group than control (D-NAME group) after feeding for one run-in day. The gene expression was increased at the first 24H and between 2 and 4 weeks, showing a biphasic pattern, but kept unaltered at 3 day and 1 week. As compared, the gene expression didnot increase further for the higher baseline value in L-NAME group and that of Bax was evidently depressed at 2 to 4 weeks. Immunolocalization demonstrate that in renal cortex the distribution of eNOS is similar to those of Bcl-2 and Bax but reverse to those of Bcl-xL. Westerblot study also showed a biphasic increase of BCL-xL protein in renal cortex and no effect of NOS inhibition. The changes of these apoptotic molecules did not correspond to the peak increase of renal eNOS. We concluded that under physiological condition, renal NO per se is inhibitory to the apoptosis in renal cortex and NOS inhibition has adverse effect on apoptosis. Chronic hypoxia induces a biphasic increase of apoptotic genes in which NOS inhibition might have some beneficial effect in the late period .

Keywords: kidney, hypoxia, apoptosis, endothelial nitric oxide synthase (eNOS)

二、緣由與目的

緣由： 缺氧/缺血是造成組織傷害的重要原因之一，腎小管是腎臟中最易受缺氧/缺血傷害之組織，雖然缺血性的急性腎衰竭的明顯病理變化是腎小管壞死，但有人認為一氧化氮與細胞凋亡在缺血性急性腎衰竭亦有參予。近吾等發現腎臟中有頗豐富的 eNOS 之表現，髓質比皮質多，且遠端腎小管比近端腎小管多，而低氧鼠腎臟之 eNOS 亦較增加；在腎臟中有如此豐富的 eNOS 的表現與其特殊的分佈，到底有何生理意義，值得進一步探討。回顧文獻，一氧化氮可以誘發細胞凋亡，而抑制一氧化氮亦可避免細胞凋亡的發生；同時 eNOS 的表現亦被證明與細胞凋亡有關連。但更近的報告亦出現有相反的看法，即一氧化氮可以抑制由 Fas or TNF α 誘發之細胞凋亡。Shimizu 在 1995 年 Nature 發表在低氧誘發之細胞凋亡中， Bcl-2 有保護之作用。而 Graeber 在 1996 年 Nature 發表由於細胞凋亡之作用，低氧得以選擇腫瘤中缺少 p53 的細胞使其存活，而具有 p53 的細胞會因明顯細胞凋亡而死亡。基此論點，低氧誘發之細胞凋亡似乎有深層的意義。

目的： 在於探討腎臟中 eNOS 是否有參與長期低氧誘發的細胞凋亡。低氧已知可以誘發 eNOS 的增加，此特殊狀況可使我們利用 NOS 的抑制來觀察其與細胞凋亡有關的基因表現的關係。

三、結果與討論

首先以反轉錄聚合酶連鎖反應(RT-PCR)來比較三種跟細胞凋亡有關之基因(Bcl-xL, Bcl-xs, Bax)在腎皮質的表現,發現 L-NAME 組中這三種基因的基準值在餵食一天的 L-NAME 後(未低氧),均比對照組(D-NAME 組)顯著地高;而在長期低氧時, D-NAME 組這三種基因的表現在前 24 小時與二至四周時呈現 biphasic 的增加,在三天至一周時維持正常;而相較下, L-NAME 組因其偏高的基準值,使三種基因的表現在長期低氧時未再有增加,雖然其亦明顯有類似前述 biphasic 的現象,但 Bax 在二至四周時呈現受抑制的現象(Tab. 1 and Fig. 1)。

當進一步由免疫組織染色定位幾種跟細胞凋亡有關的蛋白(Bcl-2, Bcl-xL, Bax, Bad)及 eNOS 在腎皮質的分布,得知 eNOS 的分佈與 Bcl-2 及 Bax 比較一致,而與 Bcl-xL, Bad 似乎有相反的關係(Tab. 2);而在低氧期間, L-NAME 組在前 3 小時與 6 小時, Bcl-2、Bcl-xL 及 eNOS 之免疫染色有減少之跡象,而此時 iNOS 與 nNOS 並無差別。由西方墨點實驗顯現出在低氧時兩組腎皮質的 Bcl-xL 蛋白,均呈 biphasic 的增加並未有所差別(Fig. 2)。

由第一部份的實驗得知在未低氧時, NOS 的抑制可增強腎皮質中 Bcl-xL, Bcl-xs, Bax 這三種基因的表現,明確地顯示在生理狀況下 NO 本身是抑制細胞凋亡。而長期低氧的刺激,在腎皮質誘發細胞凋亡基因的表現有 biphasic 增加, NOS 的抑制未能有明顯影響;而我們之前發現長期低氧誘發 eNOS 蛋白的增加是在二至四周時,故就時間上並不相符;但是 NOS 的抑制恰好在此時可造成 Bax 基因表現的抑制,故在長期低氧狀況下, NOS 的抑制可能反而減少細胞凋亡的生成。

四、計畫成果自評

實驗部分:西方墨點因抗体特異性之關係,部份結果不是很理想,故改用反轉錄聚合酶連鎖反應來探討。結果方面,發現在未低氧時的生理狀況下, NOS 的抑制即可引發細胞凋亡基因的表現,表示在正常的生理狀況下,腎皮質內 NO 系統對細胞凋亡有明顯抑制的效果,去抑制它有不良後果,此項結果可以用來做臨床上研究某些腎臟疾病治病機轉的理論基礎,即 NO 系統之失靈可導致細胞凋亡的產生。而在非常態狀況長期低氧的刺激所產生增強之 NOS 系統,顯然對細胞凋亡無明顯的作用,此時 NO 的抑制可使 Bax 基因表現減少,反而有益。

五、參考文獻

1. Lieberthal, W. 1997. Biology of acute renal failure: therapeutic implications. *Kidney Int.* 52:1102-1115.
2. Edelstein CL., Ling H., Schrier RW. 1997. The nature of renal cell injury. *Kidney Int.* 51:1341-51.
3. Lopez-Farre A., Sanchez de M.L., Caramelo C. 1997. Role of nitric oxide in autocrine control of growth and apoptosis of endothelial cells. *Am. J. Physiol.* 272:H760-8.

4. Muhl H., Sandu K., Brune B., Briner V.A., Pfeilschifter J. 1996. Nitric oxide donors induced apoptosis in glomerular cells, epithelial cells and endothelial cells. *Eur. J. Pharmacol.* 317:137-149.
5. Fukuo K., Hata S., Suhara T., Nakahashi T., Shinto Y., Tsujimoto Y., Morimoto S., Ogihara T. 1996. Nitric oxide induces upregulation of Fas and apoptosis in vascular smooth muscle. *Hypertens.* 27:823-6.
6. Edelstein C.L., Yaqoob M.M., Schrier R.W. 1996. The role of the calcium-dependent enzymes nitric oxide synthase and calpain in hypoxia-induced proximal tubule injury. *Renal Failure* 18:501-11.
7. Kawaguchi H., Shin W.S., Wang Y., Inukai M., Kato M., Matsuo-Okai Y., Sakamoto A., Uehara Y., Kaneda Y., Toyo-oka T. 1997. In vivo gene transfection of human endothelial cell nitric oxide synthase in cardiomyocytes causes apoptosis-like cell death. Identification using Sendai virus-coated liposomes. *Circulation.* 95:2441-7.
8. Mannick J.B., Miao XQ., Stamler J.S. 1997. Nitric oxide inhibits Fas-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 272:24125-8.
9. Melkova Z., Lee S.B., Rodriguez D., Esteban M. 1997. Bcl-2 prevents nitric oxide-mediated apoptosis and poly(ADP-ribose) polymerase cleavage. *FEBS lett.* 403:273-8.
10. Shimizu S., Eguchi Y., Kosaka H., Kamiike W., Matsuda H., Tsujimoto Y. 1995. Prevention of hypoxia-induced cell death by Bcl-2 and Bcl-xL. *Nature* 374:811-3.
11. Graeber T.G., Osmanian C., Jacks T., Housman D.E., Koch C.J., Lowe S.W., Giaccia A.J. 1996. Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours. *Nature* 379:88-91.
12. Gobe G., Zhang X.J., Cuttle L., Pat B., Willgoss D., Hancock J., Barnard R., Endre R.B. 1999. Bcl-2 genes and growth factors in the pathology of ischaemic acute renal failure. *Immunol. Cell Biol* 77:279-86.
13. Buttyan R., Gobe G. 1997. Apoptosis in the mammalian kidney: incidence, effectors, and molecular control in normal development and disease states. *Adv. Pharmacol.* 41:369-81.
14. Basile D.P., Liapis H. 1997. Hammerman MR. Expression of bcl-2 and bax in regenerating rat renal tubules following ischemic injury. *Am. J. Physiol.* 272: F640-7.
15. Lieberthal W., Levine J.S. 1996. Mechanisms of apoptosis and its potential role in renal tubular epithelial cell injury. *Am. J. Physiol.* 271:F477-88.
16. 吳明修 一氧化氮在長期缺氧與腰部熱敷腎臟中的角色 (博士論文，1999)

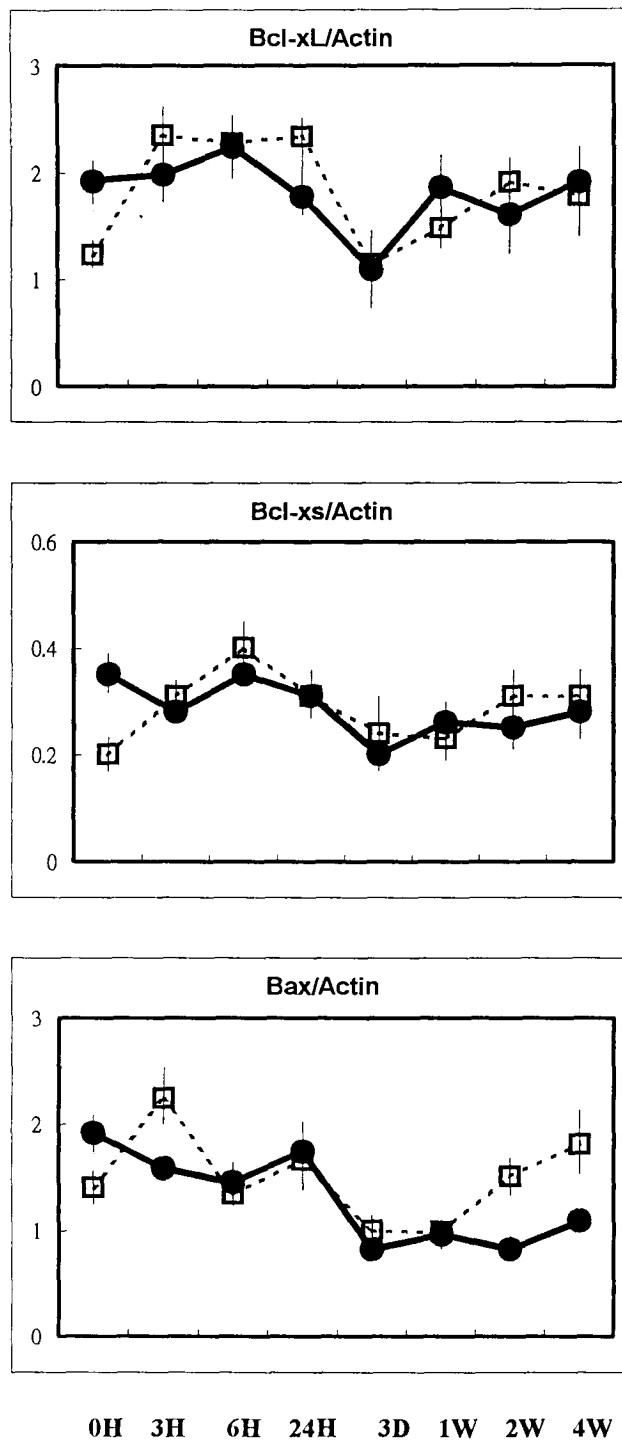


Fig. 1. The effect of nitric oxide synthase inhibition on the apoptotic gene expression during chronic hypoxia. (□ : D-NAME ; ● : L-NAME)

Tab. 1. The comparison of gene expression of Bcl-xL, Bcl-xs, and Bax during chronic hypoxia.

		0H	3H	6H	24H	3D	1W	2W	4W
*									
Bcl-xL/Actin	D-NAME	1.23 ± 0.12	2.35 ± 0.27	2.28 ± 0.17	2.34 ± 0.18	1.14 ± 0.17	1.48 ± 0.20	1.91 ± 0.23	1.73 ± 0.33
	L-NAME	1.92 ± 0.20	1.98 ± 0.25	2.24 ± 0.29	1.77 ± 0.15	1.09 ± 0.37	1.86 ± 0.31	1.60 ± 0.36	1.91 ± 0.33
*									
Bcl-xs/Actin	D-NAME	0.20 ± 0.02	0.31 ± 0.03	0.40 ± 0.05	0.31 ± 0.04	0.24 ± 0.07	0.23 ± 0.04	0.31 ± 0.06	0.31 ± 0.05
	L-NAME	0.35 ± 0.04	0.28 ± 0.02	0.35 ± 0.02	0.31 ± 0.02	0.20 ± 0.03	0.26 ± 0.04	0.25 ± 0.04	0.28 ± 0.05
**									
Bax/Actin	D-NAME	1.40 ± 0.15	2.24 ± 0.30	1.34 ± 0.10	1.66 ± 0.27	1.00 ± 0.15	0.99 ± 0.11	1.51 ± 0.17	1.81 ± 0.32
	L-NAME	1.91 ± 0.17	1.58 ± 0.11	1.45 ± 0.19	1.74 ± 0.29	0.82 ± 0.06	0.96 ± 0.13	0.82 ± 0.06	1.09 ± 0.05

(* : p <0.05; ** : p <0.05)

Tab. 2 The immunolocalization of eNOS, Bcl-2, Bcl-xL, Bax and Bad within renal cortex.

	Cortex		
	Glomeruli	Prox. Tub.	Dist. Tub.
eNOS	+	+	++
Bcl-2	—	+	+
Bcl-XL	+	+	±
Bax	±	+	+
Bad	+	—	—

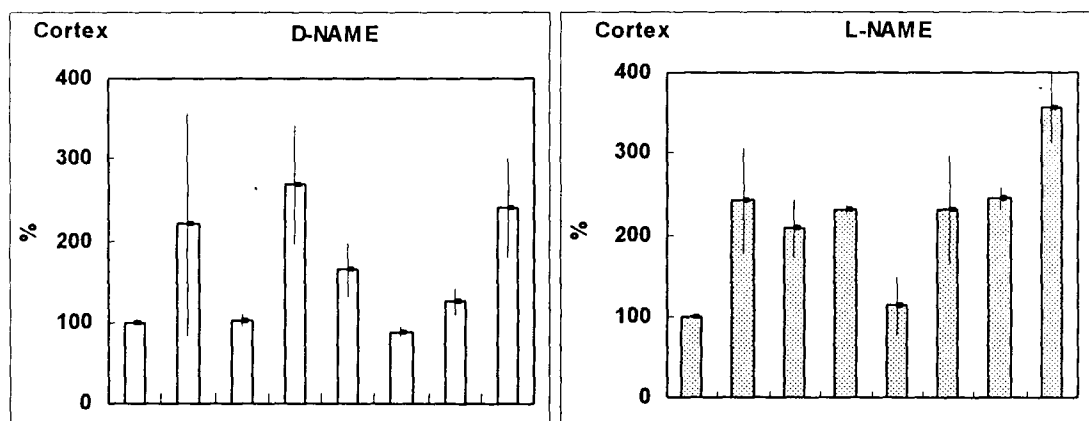


Fig. 2. Western Blot analysis of the effect of NOS inhibition on the Bcl-xL during chronic hypoxia.