

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

動脈硬化形成的分子及細胞層面的機轉研究—剪流對內皮細胞中 氧化物及抗氧化物之調節 (3/3)

Modulation of Oxidants and Antioxidants in Vascular Endothelial Cells by Shear Flow

計畫編號：NSC 89-2320-B-002-241-M26

執行期限：89/08/01 - 90/07/31

主持人：謝學真

台灣大學化工系副教授

計畫參與人員：連聖傑、蔡宇致等

一、中文摘要

當血管內皮細胞受到剪力作用時，將會產生多種活性氧族群(ROS)以調控細胞生理，通常適量的 ROS 可擔任細胞內傳遞訊息的重要角色。此外，剪力與 ROS 亦可造成蛋白激酶 C(PKC)及胞外信息調節激酶(ERK1/2)的活化，推動胞內訊息傳遞，而一氧化氮(NO)可降低細胞內 ROS 的含量，進而影響細胞生理。本研究以螢光染料測量胞內 ROS 含量，確認人類臍帶靜脈內皮細胞(HUVEC)受剪力作用後胞內 ROS 會上升。另外，PKC- α 、PKC- ϵ 與 ERK1/2 均有明顯的磷酸化增加。當以 ROS 之一的過氧化氫(H_2O_2)處理時，PKC- α 與 ERK1/2 磷酸化均會增加；抗氧化劑 NAC 與 catalase 的處理則使得三者磷酸化均有下降。綜合上述結果顯示，剪力作用導致內皮細胞中 ROS 的生成，也會使 PKC 的路徑被活化。另外，剪力造成的 PKC 磷酸化也可能需要 ROS 的參與。至於 NO 也會對 ROS 的含量產生影響而間接調控剪力所造成的 PKC 磷酸化。

關鍵詞：活性氧族群、內皮細胞、剪力

Abstract

Vascular endothelial cells (EC) exposed to shear flow are found to produce a variety of reactive oxygen species (ROS) molecules that alter many cellular functions. ROS of moderate amount plays an important role in regulating the signal transduction in EC. In addition, nitric oxide (NO) decreases the amount of ROS in cells and thereby affects the physiology of cells. Moreover, shear flow and ROS are known to activate protein kinase C (PKC) that further modulates many intracellular signaling pathways. This study investigated the foregoing phenomena. Initially, a fluorescence method using 6-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, di(acetoxymethyl ester) was selected to monitor the level of ROS in human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). The intracellular levels of ROS increased about 70 % when HUVEC were exposed to shear stress (25 dynes/cm²) for 30 min. This increase in ROS was

inhibited by a PKC inhibitor (calphostin C), but there was no effect on ROS when the cells were treated with PMA for 24 h. Meanwhile, an NO donor (NOC-18) decreased the intracellular ROS, whereas an NO scavenger (PTIO) increased them. Moreover, the phosphorylation of PKC- α , PKC- ϵ , and extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) was enhanced significantly after 10 min of shear exposure. The phosphorylated PKC- α began to decrease after 30 min and increase again after 2 h. The increase in phosphorylated PKC- ϵ was sustained up to 2 h. However, the phosphorylation of ERK1/2 gradually decreased. Furthermore, hydrogen peroxide induced the phosphorylation of PKC- α and ERK1/2, but no effect on the phosphorylation of PKC- ϵ . The treatment of antioxidants (NAC and catalase) decreased phosphorylated PKC- α , PKC- ϵ , and ERK1/2. NOC-18 also inhibited the phosphorylation. These results suggest that the shear-induced ROS in HUVEC are generated partially via the PKC pathway, which can be inhibited by NO.

Keywords: reactive oxygen species (ROS), endothelial cells (EC), shear flow

二、計畫緣由與目的

動脈粥狀硬化是近年來重要的醫學研究課題，根據研究報告指出，血液動力學與血管內粥狀硬化之形成可能有相當密切的關係[1]。由於人體血管在血管分歧與彎曲處的特定位置上，特別容易有血管內壁增厚及脂質的堆積，使得這些區域的血流容易受到擾動而較易形成動脈粥狀硬化。而血管內皮細胞由於與血液直接接觸，持續受到各種的機械應力，包括有[2]：剪力 (shear stress)、張力 (tensile stress)、正向力 (normal stress)，本論文將針對剪力方面來討論。隨著人體中血管位置的不同，內皮細胞受到大約 2~20 dyne/cm² 不等的剪力作用，而本研究將探討細胞如何傳遞胞外血液流動所產生的剪力信息；其中蛋白激酶 C(PKC)乃是細胞內的一種信息傳導因子，可以將胞外刺激轉移到細胞內以調節許多生理反應[3,4,5,6]，例如細胞型態的改變以及活化

其他信息傳導因子[7]。近來的研究指出，內皮細胞製造過量的 reactive oxygen species (ROS)可能也與動脈粥狀硬化有關。而根據本實驗室先前的研究結果亦指出內皮細胞在受剪力的情況下，細胞內 ROS 的含量會增加，適量的 ROS 亦在細胞中扮演二次信使之角色，由此可知 ROS 對於動脈粥狀硬化之致病機制有相當關鍵的影響。此外，一氧化氮(NO)對人體生理反應調節有極為密切的關係，血管內皮細胞產生的 NO 能促使血管舒張，近來也發現細胞中 NO 的含量可調控細胞的信息傳遞及生理狀態。由於在剪力作用之下內皮細胞會產生較多量的 NO，因此 NO 對剪力作用下的細胞反應調節是重要的研究課題。由於機械力的刺激引起的動脈粥狀硬化致病機制仍不甚明確，因此本研究試圖瞭解在內皮細胞中 PKC、ROS 和 NO 受剪力作用之變化以及之間的互動關係，希望能釐清部分動脈粥狀硬化致病機制。

三、材料與方法

3.1. 細胞培養與流動實驗

將新鮮的人類臍帶靜脈內皮細胞以膠原蛋白酶(collagenase)取下，將內皮細胞種在含培養基(20%胎牛血清加 medium 199)的組織培養皿中生長 1~2 天以增加細胞數目，接著以胰蛋白酶(trypsin)將培養皿上的內皮細胞取下，並經過離心以及重新懸浮於同樣培養基的步驟，將足量的細胞繼代培養在經明膠(gelatin)覆蓋的玻璃片上以形成細胞單層(monolayer)。在進行流動實驗前 16~24 小時，更換繼代細胞培養基為含 2%胎牛血清的培養基(medium 199)藉降低血清濃度以減少細胞反應之背景值。

將形成細胞單層的玻片裝置在設計好的平行板層流流動室，並以轉動式幫浦輸送含 2%胎牛血清的培養基以形成一密閉循環流動的狀態，本研究將以平均剪力 25 dynes/cm² 刺激 HUVEC，而整個裝置在實驗過程中保持 37°C 和 5%CO₂ 的空氣環境中。

3.2. 細胞內活性氧族群的測量

在本研究中採用 6-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, di(acetoxymethyl ester)來做為細胞內過氧化氫(H₂O₂)的探針(probe)，並以螢光光度計(fluorescence spectrophotometer; HITACHI F-4010, Japan)測量螢光的強度，便可推知細胞內過氧化氫的多寡。

3.3. 細胞處理與西方墨點法

經實驗處理後玻片上的細胞以緩衝溶液潤洗，加入溶解細胞之溶液(RIPA buffer, with proteinase inhibitor, 0.1% SDS)，充分溶解細胞並刮下後，將 sample 離心取上清液。取該

溶液以 8% SDS-polyacrylamide gel 進行電泳。再將蛋白質電轉移至 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，再加入一次抗體浸泡搖晃 1 小時，然後以 TBS-T 潤洗，之後加入含二次抗體之 TBS-T 浸泡搖晃 1 小時並以 TBS-T 潤洗，最後則以 Western-Star Chemiluminescence Detection System 來測量其強度。

四、實驗結果

4.1. 使用螢光染劑測定活性氧族群

本研究以 6-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, di(acetoxymethyl ester)來測定 ROS。其方式是將含染劑之培養基預先處理細胞 30 分鐘，再以流動培養基刺激細胞 30 分鐘後偵測細胞內螢光強度。如 Fig. 4.1 所示，不同的螢光染劑濃度(25、50、100 μM)所測得剪力作用下內皮細胞產生 ROS 的結果均約有 70% 的增加。

4.2. 剪力作用下對 PKC 磷酸化之影響

研究指出，剪力會造成 PKC 的活化，內皮細胞中的 PKC isoform，以 PKC-α 與 PKC-ε 之活性變化較為顯著[33]。由於 PKC 在活化之前必須經過磷酸化，因此藉由觀察 PKC 的磷酸化程度便可間接瞭解其活性的變化。本研究中著重於剪力作用下 PKC-α 與 PKC-ε 磷酸化的變化。由 Fig. 4.2 所示，細胞在受剪力作用 10 分鐘時，PKC-α 與 PKC-ε 磷酸化程度明顯增加，另外並觀察 HUVEC 中 ERK1/2 的磷酸化情形，發現在 10 分鐘時，ERK1/2 便有明顯的磷酸化情形，此部分與本實驗室先前的結果相似[8]。

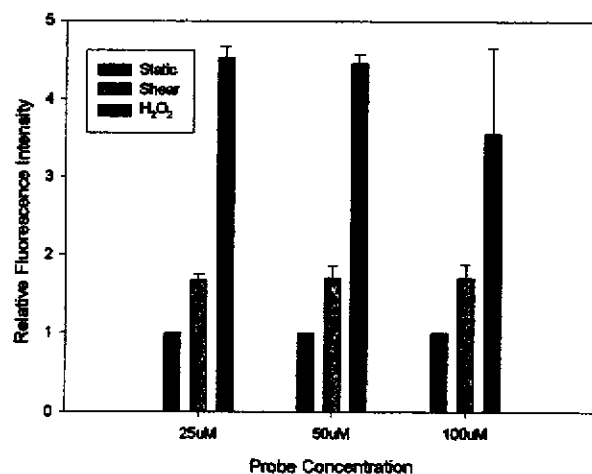


Fig. 4.1. 剪力和過氧化氫造成 HUVEC 內 ROS(螢光強度)上升。螢光相對量都是除以對照組(static condition)螢光強度所得到的比值(means ± S.E.) (n=3)。

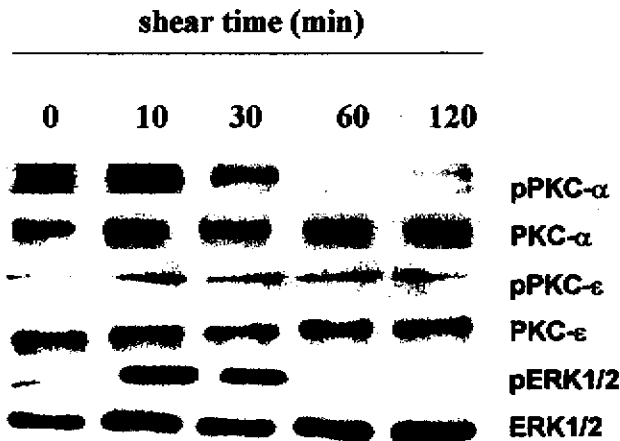


Fig. 4.2. 剪力作用下對 PKC 和 ERK1/2 磷酸化之影響。以平均剪力 25 dynes/cm² 在不同的作用時間下刺激 HUVEC，並以西方墨點法分析 cell lysates 中 PKC-α、PKC-ε 與 ERK1/2 的磷酸化程度。pPKC-α phosphorylated PKC-α; PKC-α total PKC-α, 餘類推。

4.3. ROS 對 PKC 磷酸化之影響

根據 4.2 節得知，在經過剪力作用 10 分鐘後，PKC-α 與 PKC-ε 的磷酸化均有明顯的上升，因此本實驗以受剪力作用 10 分鐘的細胞來觀察 NAC 與 catalase 兩種抗氧化劑對 PKC 磷酸化的調控，試圖了解 ROS 對 PKC 的影響。實驗結果如 Fig. 4.3 所示，HUVEC 以 NAC 或 catalase 預處理再經剪力作用後，細胞內 PKC-α 與 PKC-ε 的磷酸化程度明顯比起未經藥物處理的細胞為低，顯示細胞內的 ROS 若被清除，則剪力作用下 PKC 的磷酸化將被抑制；此外，ERK1/2 的磷酸化也因此有下降的趨勢。為了更進一步確認 ROS 對 PKC 磷酸化的影響，實驗中亦加入高濃度(5 mM)的過氧化氫刺激細胞 10 分鐘，觀察外加的 ROS 對於 PKC 與 ERK1/2 的磷酸化有何影響。當以過氧化氫刺激時，PKC-α、ERK1/2 的磷酸化均有顯著增加(結果未列出)，由此可知 ROS 的存在與否很有可能是 PKC-α 與 ERK1/2 磷酸化的條件之一。

4.4. NO 抗氧化角色和對 PKC 磷酸化之影響

在心血管系統中，NO 有調節舒緩血管的功能，並且會作用於許多信息傳導物質。已有研究指出，NO 會與 ROS 中的 superoxide(O₂⁻)反應而降低細胞中的 ROS 含量。故本實驗添加 NO 供應劑 NOC-18 與 NO 清除劑 PTIO，觀察在兩種相反的處理之下，剪力刺激內皮細胞所產生之 ROS 含量。實驗(結果未列出)顯示，以 NOC-18 處理的細胞中，經剪力作用後

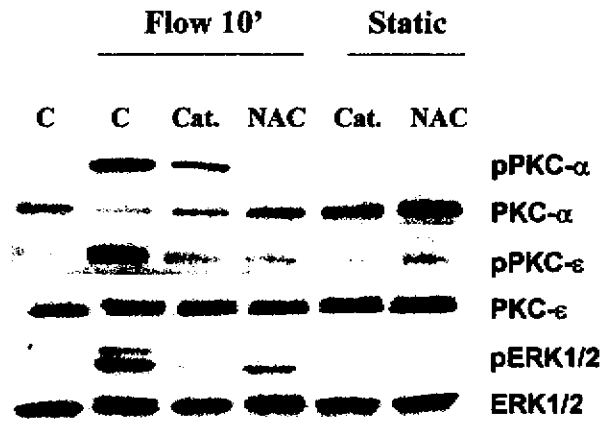


Fig. 4.3. ROS 對 PKC 以及 ERK1/2 之影響。A. HUVEC 以 NAC (20 mM)預處理 2 小時或 Catalase (300 units/ml)預處理 1 小時再以平均剪力 25 dynes/cm² 刺激 HUVEC 10 分鐘，並以西方墨點法分析 cell lysates 中 PKC-α、PKC-ε 與 ERK1/2 的磷酸化程度。Cat.: catalase; C: static control。

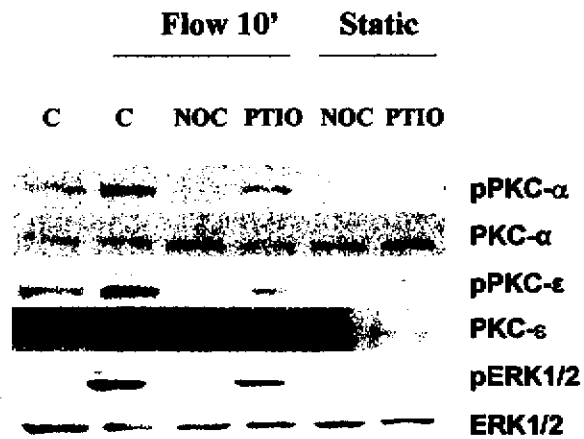


Fig. 4.4. NO 對 PKC 以及 ERK1/2 之影響。HUVEC 以 NOC 或 PTIO 預處理後再以剪力刺激，並以西方墨點法分析蛋白質，符號說明同前。

所產生的螢光值比起未經處理的細胞為低；相反的，在以 PTIO 處理的實驗中，剪力作用後所產生的螢光值則比控制組為高，顯示在 NO 的存在之下，可以有效清除細胞內的 ROS，進而降低細胞內的螢光值。

由上述得知，以 NO 預先處理的細胞，可以有效降低細胞中的 ROS 含量，在本研究中添加 NOC-18 與 PTIO，藉此觀察經剪力作用之細胞在 NO 存在或缺乏的情形之下 PKC 磷酸化的情形。實驗中以 NOC-18 (500 μM)與 PTIO (100 μM)分別預先處理細胞一小時與 30 分鐘，並以剪力刺激細胞 10 分鐘，結果如 Fig.

4.4 所示。經 NOC-18 處理的細胞，其 PKC- α 、PKC- ϵ 及 ERK1/2 的磷酸化均有明顯的下降趨勢，此結果更進一步證明 NO 可清除細胞中的 ROS，因此使得 PKC- α 、PKC- ϵ 及 ERK1/2 的磷酸化降低；但 PTIO 並未如預測中會使 PKC 磷酸化的程度提高而呈現些許降低的現象，此部分原因尚待探討。

五、討論

本研究首先觀察 HUVEC 在剪力作用下 ROS 的含量變化，以 6-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, di(acetoxymethyl ester) 為螢光染劑，確實可以穩定地測量出細胞內 ROS 的含量，改良過去以 DCFH-DA 為螢光染劑，其自細胞內滲漏和不穩定的缺點 [9]，進一步地增加實驗的可信度。

HUVEC 在剪力的作用下 PKC 會被磷酸化 (Fig. 4.2)，造成其活性增加，亦有文獻指出，平滑肌細胞中由過氧化氫造成的 ERK1/2 活化會經過 PKC 此一路徑 [10]，也因此順便觀察 ERK1/2 之變化，其中 PKC- α 的磷酸化在短時間內有明顯增加後便開始有下降的趨勢，而 PKC- ϵ 則能維持其磷酸化程度，此一結果與內皮細胞經機械張力作用之下的趨勢大致相同 [11]。此現象可能是因不同的 PKC isoforms 在細胞中有其不同的調控機制，因此在接受刺激之後 PKC- α 與 PKC- ϵ 的磷酸化才会有短暫 (transient) 與持續 (sustained) 的兩種情形。PKC 和 ERK1/2 的磷酸化程度亦可由高濃度的過氧化氫刺激增強或抗氧化劑所降低 (Fig. 4.3)，顯示胞內的 ROS 應與調節 PKC 和 ERK1/2 之磷酸化有關。內皮細胞中除了 ROS，NO 亦具有調節信息傳導之功能，因此瞭解在剪力作用之下兩者之間的交互關係是十分重要的，在本研究中發現，當加入 NOC-18 此一 NO 供應劑時會降低細胞內的螢光值；相反的，若加入 NO 清除劑 PTIO 時螢光值會上升，則可能是由於 NO 的減少，因此造成 ROS 相對多量所致，表示 NO 在內皮細胞中會造成 ROS 下降。至於其原因可能是直接與 ROS 反應或是抑制 ROS 的生成，確切原因需要再做進一步地確認，本研究亦發現 (Fig. 4.4) 加入 NOC-18 會降低 PKC 和 ERK1/2 磷酸化之程度，代表 PKC 和 ERK1/2 之磷酸化會被 NO 所抑制，不過 PKC- ϵ 的磷酸化程度會因 NOC-18 的處理而降低至比基礎值更低，可能在少量 NO 存在時細胞之 PKC- ϵ 有去磷酸化 (dephosphorylation) 的情形，此外，加入 PTIO 並不如我們所預期會增加 PKC 和 ERK1/2 之磷酸化程度，懷疑可能是 PTIO 會引起細胞內之其它反應，其原因尚待釐清。

綜合上述，HUVEC 受到剪力作用會活化 PKC 和 ERK1/2，可能是透過 ROS 傳遞訊息，

使 PKC 和 ERK1/2 磷酸化程度增加所致。另一方面，NO 會造成細胞內 ROS 下降，但也會降低 PKC 和 ERK1/2 之磷酸化程度。ROS、PKC 以及 NO 三者間之相互關係，直至目前仍不甚明瞭，其詳細之調控機制有待後續研究來進一步釐清。

六、參考文獻

- [1] Netem RM. Vascular fluid mechanics, the arterial wall, and atherosclerosis. *ASME J Biomech Engr* 114:274-282, 1992
- [2] Sumpio BE. *Hemodynamic Forces and Vascular Cell Biology*, R.G. Landes Co, Austin, Texas, PP 47-49, 1993
- [3] Nishizuka Y. Studies and perspectives of protein kinase C. *Science* 233:305-312, 1986
- [4] Keller HU, Zimmermann A, Cottier H. Phorbol myristate acetate (PMA) suppresses polarization and locomotion and alters F-actin content of Walker carcinosarcoma cells. *Int J Cancer* 36:495-501, 1985
- [5] Peppers SC, Holz RW. Catecholamine secretion from digitonin-treated PC12 cells: effects of calcium, ATP, and protein kinase C activators. *J Biol Chem* 261:14665-14669, 1986
- [6] Scholz J, Schaefer B, Schmitz W, Scholz H, Steinfath M, Lohse M, Schwabe U, Puurunen J. Alpha-1 adrenoceptor-mediated positive inotropic effect and inositol trisphosphate increase in mammalian heart. *J Pharmacol Exp Ther* 245:327-335, 1988
- [7] Sugden D, Vanecek J, Klein DC, Thomas TP, Anderson WB. Activation of protein kinase C potentiates isoprenaline-induced cyclic AMP accumulation in rat pinealocytes. *Nature* 314:359-361, 1985
- [8] 陳振隆. 一氧化氮調節內皮細胞中剪力誘發之訊息傳遞之探討. 國立台灣大學化學工程研究所碩士論文, 1999
- [9] Hsieh HJ, Cheng CC, Wu ST, Chiu JJ, Wung BS, Wang DL. Increase of reactive oxygen species in endothelial cells by shear flow and involvement of ROS in shear-induced c-fos expression. *J Cell Physiol* 175: 156-162, 1998
- [10] Lu G, Greene EL, Nagai T, Egan BM. Reactive oxygen species are critical in the oleic acid-mediated mitogenic signaling pathway in vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 32:1003-1010, 1998
- [11] Cheng JJ, Wung BS, Chao YJ, Wang DL. Sequential activation of PKC- α and PKC- ϵ contributes to sustained Raf/ERK1/2 activation in endothelial cells under mechanical strain. *J Biol Chem* 276: 31368-31375, 2001